

**Untersuchungen der molekularen Mechanismen
des Austritts von intrazellulären Bakterien am
Beispiel des *Mycobakterium marinum* –
Dictyostelium discoideum Modellsystems**

Dissertation

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

vorgelegt von
Lilli Gerstenmaier
aus Berlin

Hamburg, 2016

Genehmigt vom Fachbereich Biologie,
der Fakultät Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Dr. Monica Hagedorn
weiterer Gutachter der Dissertation:
Prof. Dr. Christian Lohr
Tag der Disputation: 24. Juni 2016

Hamburg, 30. Juni 2016

Die Betreuung der vorliegenden Dissertation wurde von Frau Dr. Monica Hagedorn übernommen. Die experimentellen Arbeiten wurden von April 2013 bis Januar 2016 in der Arbeitsgruppe Zellbiologie am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg durchgeführt.

Erstgutachter der Dissertation: Dr. Monica Hagedorn

Zweitgutachter der Dissertation: Prof. Dr. Christian Lohr

Inhaltsverzeichnis

I. Zusammenfassung	I
II. Abstract	II
III. Abbildungsverzeichnis	III
IV. Tabellenverzeichnis	V
V. Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1 Tuberkulose	1
1.1.1 Symptome und Diagnostik	2
1.1.2 Therapie	3
1.1.3 Der Lebenszyklus von <i>M. tuberculosis</i>	3
1.1.4 Der Infektionsverlauf von <i>M. tuberculosis</i> in Makrophagen	6
1.2 Das <i>Mycobakterium marinum</i>/<i>Dictyostelium discoideum</i> Modellsystem	7
1.2.1 <i>Mycobakterium marinum</i>	7
1.2.2 <i>Dictyostelium discoideum</i>	9
1.2.3 Der Infektionsverlauf von <i>M. marinum</i> in <i>D. discoideum</i>	10
1.3 Das Ejektosom	12
1.4 Autophagie	13
1.5 ESCRT-Maschinerie	16
1.6 Zielsetzung	18
2. Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 Geräte	19
2.1.2 Verbrauchsmaterial	21
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	23
2.1.4 Antibiotika	24
2.1.5 Kits	25
2.1.6 Software	26
2.2 Methoden	26
2.2.1 Zellbiologie	26
2.2.1.1 Organismen und Kultivierung	26
2.2.1.1.1 <i>Dictyostelium discoideum</i>	27
Transfektion von <i>D. discoideum</i>	28
Kryopräservierung von <i>D. discoideum</i>	29
2.2.1.1.2 Mykobakterien	29
Transformation von Mykobakterien	31
Kryopräservierung von Mykobakterien	32
2.2.1.1.3 <i>Escherichia coli</i>	33
Transformation von <i>E. coli</i>	33
2.2.1.2 Infektion von <i>D. discoideum</i>	33
2.2.1.2.1 Co-Infektions-Analysen	35
2.2.1.3 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse	35

2.2.1.3.1 Fixierung infizierter Zellen	35
2.2.1.3.2 Verwendete Antikörper, Phalloidin und DAPI	36
2.2.1.3.3 Immunfluoreszenzfärbung	37
2.2.1.3.4 Fluoreszenzmikroskopie	38
Weitfeldmikroskopie	38
Konfokale Mikroskopie fixierter Proben	38
Bildbearbeitung und –auswertung	39
Quantifizierungs-Experimente	40
Statistik	40
2.2.1.4 Lebendzellmikroskopie	40
2.2.1.5 Korrelative Mikroskopie	41
2.2.1.6 Durchflusszytometrie	42
2.2.1.7 Permeabilitätstest mit Propidiumiodid	43
2.2.1.8 Transmissions-Analyse	43
2.2.2 Molekularbiologie	44
2.2.2.1 Klonierung von Plasmiden und Vorbereitungen für Transfektionen	44
2.2.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	44
2.2.2.1.2 Restriktionsverdau von DNA	45
2.2.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese	46
2.2.2.1.4 Extraktion von DNA	47
2.2.2.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten	47
2.2.2.1.6 Isolierung von Plasmid-DNA	47
2.2.2.1.7 DNA-Sequenzierung	48
2.2.2.2 Überexpressionskonstrukte	48
3. Ergebnisse	49
3.1 Die Rolle der Autophagie beim nicht-lytischen Austritt von Mykobakterien	49
3.1.1 Eine vakuoläre Struktur am distalen Pol des austretenden Bakteriums	49
3.1.2 Charakterisierung der distalen Membranstruktur	53
3.1.2.1 Die spezifische Rekrutierung der Autophagie-Maschinerie	53
3.1.3 Autophagie ist essentiell für die Bildung der vakuolären Struktur	57
3.1.3.1 Ausbildung von Ejektosomen in Autophagie-defizienten Zellen	57
3.1.3.2 Abwesenheit der vakuolären Struktur in der <i>atg1</i> - Mutante	59
3.1.4 Relevanz weiterer Faktoren der Autophagie-Maschinerie	60
3.1.5 Charakterisierung des autophagosomalen Kompartiments	61
3.1.6 Die Rekrutierung der autophagosomalen Maschinerie erfolgt unabhängig von der lokalen Aktivität von ESX-1	64
3.1.7 Eine effiziente, nicht-lytische Zell-Zell-Übertragung von <i>M. marinum</i> benötigt eine intakte Autophagie-Maschinerie	66
3.1.7.1 Ejektosomen in <i>atg1</i> - sind nicht funktionell	66
3.1.7.2 Eine intakte Autophagie-Maschinerie ist essentiell für die Erhaltung der Plasmamembranintegrität infizierter <i>Dictyostelium</i> -Zellen	69
3.1.7.2.1 Immunfluoreszenz-Assay (IFA)	69
3.1.7.2.2 Permeabilitätstest mit Propidiumiodid	70
3.2 Charakterisierung der ESCRT-Maschinerie als Plasmamembran-reparatursystem beim nicht-lytischen Austritt von <i>M. marinum</i>	72
3.2.1 Charakterisierung der Akkumulation von ESCRT-Proteinen am distalen Pol des Bakteriums	73
3.2.2 ESCRT-Mutanten gelangen früher ins Zytoplasma und bilden mehr Ejektosomen	75

4. Diskussion	78
4.1 Die Rolle der Autophagie beim nicht-lytischen Austrittsmechanismus im <i>Dictyostelium/M. marinum</i>-Modellsystem	78
4.1.1 Die Rekrutierung der kanonischen Autophagie-Maschinerie an den Pol von <i>M. marinum</i>	79
4.1.2 Die Lokalisation des mykobakteriellen Sekretionssystems ESX1 bestimmt nicht die Rekrutierung der autophagosomalen Vakuole	82
4.1.3 Rekrutierung der autophagosomalen Vakuole verläuft unabhängig vom Adapterprotein SQSTM1	83
4.1.4 Plasmamembranintegrität und effiziente Transmission der Bakterien werden durch die kanonische Autophagie-Maschinerie vermittelt	84
4.2 Die Rolle der ESCRT-Maschinerie als Plasmamembranreparatur-Mechanismus beim nicht-lytischen Austritt von <i>M. marinum</i>	86
VI. Literaturverzeichnis	IX
VII. Danksagung	XXIV
Eidesstattliche Versicherung	XXV

I. Zusammenfassung

Tuberkulose ist eine Infektionskrankheit, der jährlich etwa 1,5 Millionen Menschen zum Opfer fallen¹. Ein Großteil der Weltbevölkerung ist mit dem krankheitsverursachenden Bakterium *Mycobacterium tuberculosis* infiziert. Trotz intensiver Bemühungen konnten in den letzten Jahrzehnten weder ein effizienter Impfstoff, noch neue Wirkstoffansätze für Medikamente entwickelt werden. Im Gegensatz zu der schwierigen und zeitaufwendigen Arbeit mit *M. tuberculosis*, konnte mit Hilfe des nahen Verwandten *Mycobacterium marinum* in Kombination mit der Amöbe *Dictyostelium discoideum* ein einfaches, genetisch manipulierbares und biochemisch lenkbares Modell etabliert werden. Grundlegende Mechanismen der Interaktion zwischen mykobakterieller Pathogenität und zellulären Abwehrmechanismen der Wirtszelle können damit untersucht werden.

Während die Aufnahme über Phagozytose und die Ausbildung der Replikationsnische von Mykobakterien recht gut verstandene Prozesse sind, ist über den Austritt und die Verbreitung der intrazellulären Bakterien aus den Wirtszellen wenig bekannt. In *Dictyostelium* konnte eine auf F-Aktin basierende Struktur, das Ejektosom, identifiziert werden, die eine nicht-lytische Verbreitung der Mykobakterien erlaubt². Unklar ist allerdings der Mechanismus, wie die Wirtszelle beim Austritt der Bakterien durch das Ejektosom intakt bleibt, da die Plasmamembran bei diesem Prozess lokal beschädigt wird. Mit Hilfe unterschiedlicher Mikroskopiemethoden konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die wirtseigene Autophagie-Maschinerie spezifisch an den distalen Pol von aus dem Ejektosom austretenden Bakterien rekrutiert wird. Die Autophagie-Maschinerie ist essentiell für eine effiziente Übertragung der Mykobakterien von Zelle zu Zelle, aber auch für die Erhaltung der Plasmamembranintegrität der Wirtszelle nach Austreten des Bakteriums, was den Zelltod der Wirtszelle verhindert. Des Weiteren akkumulieren Proteine der ESCRT-Maschinerie in sehr ähnlicher Weise wie die autophagosomalen Faktoren an der vakuolären Membranstruktur am Pol austretender Bakterien. Eine Interaktion von Autophagie- und ESCRT-Maschinerie könnte als Reparaturmechanismus von Wunden in der Plasmamembran fungieren, die durch den nicht-lytischen Austritt von *M. marinum* aus *D. discoideum* entstanden sind. Im Zusammenspiel mit der ESCRT-Maschinerie konnte der Autophagie eine neue und unerwartete Rolle bei der Erhaltung der Plasmamembranintegrität im Verlauf der mykobakteriellen Infektion nachgewiesen werden.

II. Abstract

Nearly 1.5 million people are dying from tuberculosis every year¹ and the global burden of the infection with *Mycobacterium tuberculosis* remains enormous. Despite intense research no effective vaccines or treatment targets have been developed in the last decades. In contrast to the difficult and time-consuming work with *M. tuberculosis*, its close relative *M. marinum* was in combination with the amoeba *Dictyostelium discoideum* established as a tractable model system to study the mechanisms of mycobacterial pathogenicity and cellular host defense.

While host cell entry and the establishment of a replication compartment are well understood, little is known about the egress of mycobacteria from their host cells and how the infection spreads between cells. In *Dictyostelium* a F-actin based structure, the ejectosome, has been shown to allow non-lytic egress of cytosolic mycobacteria². It remains unclear how the host cell maintains intact during the ejection process in which its plasma membrane ruptures locally. Applying different microscopy techniques we were able to show that the autophagic machinery is specifically recruited to the distal pole of ejecting bacteria. If autophagy is impaired, cell-to-cell transmission is reduced, the plasma membrane becomes compromised and the host cells eventually die. Furthermore, we could show that factors of the ESCRT machinery localize to ejecting bacteria in a similar pattern as the autophagy machinery does. We propose that an interplay of the autophagic and ESCRT machinery seals the wound that is generated by egressing bacteria, suggesting an important and unexpected role for autophagy in collaboration with the ESCRT pathway in maintaining plasma membrane integrity during mycobacterial infection.

III. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Tuberkulose-Inzidenz im Jahr 2014 (WHO)	1
Abb. 1.2:	Der Lebenszyklus von <i>M. tuberculosis</i>	5
Abb. 1.3:	Phylogenetischer Baum ausgewählter Mykobakterien-Stämme auf Grundlage der 16S rRNA	8
Abb. 1.4:	Proteom-basierter phylogenetischer Baum von unterschiedlichen Modellorganismen	10
Abb. 1.5:	Schema des Infektionsverlaufs von <i>M. marinum</i> in <i>D. discoideum</i>	11
Abb. 1.6	Eintritt in die Zelle (Phagozytose) versus Austritt aus der Zelle (Ejektion)	13
Abb. 1.7	Schematische Darstellung der Makroautophagie	15
Abb. 1.8	Schema der ESCRT-vermittelten Abschnürung verwundeter Plasmamembranregionen	17
Abb. 2.1	Punktwolkendarstellung der Durchflusszytometrie	42
Abb. 2.2	Schema des Transmissions-Analyse	44
Abb. 3.1	Korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie eines Ejektosoms	50
Abb. 3.2	Dreidimensionales Modell der Vakuole am distalen Pol des Bakteriums	52
Abb. 3.3	Das Autophagie-Markerprotein Atg8 lokalisiert am distalen Pol von <i>M. marinum</i>	54
Abb. 3.4	Rekrutierung der Autophagie-Maschinerie an das auszuschleusende Bakterium	55
Abb. 3.5	Spezifische Rekrutierung autophagosomaler Marker am Ejektosom	56
Abb. 3.6	Die Ausbildung von Ejektosomen in der <i>atg1</i> - Deletionsmutante	58
Abb. 3.7	Die Deletion von Atg1 führt zum Verlust der Vakuole am distalen Pol des Bakteriums	59
Abb. 3.8	Die kanonische Autophagie-Maschinerie wird für die Rekrutierung von Atg8 benötigt	60
Abb. 3.9	Markerproteine der frühen, expandierenden autophagosomalen Membran lokalisieren am Ejektosom	62
Abb. 3.10	Der <i>Fluid-phase</i> Marker Dextran akkumuliert nicht am distalen Pol austretender Bakterien	63
Abb. 3.11	Die Rekrutierung der Autophagie erfolgt unabhängig von der ESX-1 Lokalisation	65
Abb. 3.12	Eine effiziente Zell-Zell-Transmission von <i>M. marinum</i> benötigt eine intakte Autophagie-Maschinerie	67
Abb. 3.13	Intrazelluläres Material gelang bei Verlust der Autophagie über das Ejektosom nach außen	69
Abb. 3.14	Atg1-Defizienz führt zu einer Permeabilität der Plasmamembran während der Infektion	71
Abb. 3.15	ESCRT-Marker lokalisieren am distalen Pol austretender Bakterien oder	74

an der Ejektosom-Struktur

Abb. 3.16	Der Verlust von ESCRT-Faktoren führt zu einer reduzierten Assoziation von p80 an intrazellulären Mykobakterien	76
Abb. 3.17	ESCRT-Mutanten zeigen eine veränderte Anzahl an Ejektosomen im Vergleich zu wildtypischen <i>Dictyostelium</i> -Zellen	77
Abb. 4.1	Modell des autophagosomalen Verschlussmechanismus einer Ejektosomen-assoziierten Wunde in der Plasmamembran	86
Abb. 4.2	Schematische Darstellung des möglichen Ursprungs der beobachteten Vakuole am Pol von Ejektosom-assoziierten Mykobakterien	91
Abb. 4.3	Überblick über vorhergehende und geplante Experimente	94

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1	Geräte	19-21
Tabelle 2.2	Verbrauchsmaterialien	21-23
Tabelle 2.3	Chemikalien und Reagenzien	23-24
Tabelle 2.4	Antibiotika	24-25
Tabelle 2.5	Kits	25
Tabelle 2.6	Software	26
Tabelle 2.7	<i>D. discoideum</i> : Wildtypische und Überexpressions-Zelllinien mit entsprechender Resistenz	27
Tabelle 2.8	<i>D. discoideum</i> : Knockout-Zelllinien	27-28
Tabelle 2.9	<i>M. marinum</i>	30-31
Tabelle 2.10	<i>M. smegmatis</i>	31
Tabelle 2.11	OD ₆₀₀ – KBE von <i>M. marinum</i>	34
Tabelle 2.12	primäre Antikörper	36
Tabelle 2.13	sekundäre Antikörper, Phalloidin und DAPI	36-37
Tabelle 2.14	Filtersätze des Olympus Weitfeldmikroskops	38
Tabelle 2.15	Laserlinien des konfokalen Mikroskops von Olympus	39
Tabelle 2.16	Laserlinien des konfokalen Mikroskops von Zeiss	40
Tabelle 2.17	Primer, Labornummer und entsprechende Sequenzen	48

V. Abkürzungsverzeichnis

α	anti
Δ	Delta
μ	Mikro
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
%	Prozent
Abb.	Abbildung
AF	AlexaFluor
Alix	<i>ALG-2 interacting protein X</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Atg1	<i>autophagy related gene 1</i>
Atg5	<i>autophagy related gene 5</i>
Atg6	<i>autophagy related gene 6</i>
Atg7	<i>autophagy related gene 7</i>
Atg18	<i>autophagy related gene 18</i>
bzw.	beziehungsweise
Ca^{2+}	Calcium-Ionen
d.h.	das heißt
ddH₂O	doppelt destilliertes Wasser
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
ESCRT	<i>endosomal sorting complexes required for transport</i>
ESX-1	<i>early secreted antigen 6 kilodaltons (Esat-6) secretion system 1</i>
et al.	und andere (<i>et alii</i>)
evt.	eventuell
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
GA	Glutaraldehyd
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
h	Stunde
hpi	Stunden nach Infektion (<i>hours post infection</i>)
IFA	Immunfluoreszenzanalyse

KBE	Kolonie-bildende Einheiten
l	Liter
M	Molar (Mol pro Liter)
max.	Maximal
mcherry	rot fluoreszierendes Protein
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
<i>M. marinum</i>	<i>Mykobakterium marinum</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
ms	Millisekunden
mV	Millivolt
n	Anzahl der Versuche
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
n.s.	nicht signifikant
OD	Optische Dichte
P	Signifikanzwert (<i>probability</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PI(3)P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
RD1	<i>Region of difference 1</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s. o.	siehe oben
SQSTM1	Sequestosome 1
TAE	Tris-Acetat-EDTA- Puffer
TB	Tuberkulose
Tsg101	<i>tumor susceptibility gene 101</i>
U	katalytische Aktivität (<i>units</i>)
UV	Ultraviolettstrahlung
vgl.	vergleiche
Vps4	<i>vacuolar protein sorting-associated protein 4</i>
Vps32	<i>vacuolar protein sorting-associated protein 32</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>world health organisation</i>)
WT	Wildtyp

x g Gravitationskraft
z.B. zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Tuberkulose

Tuberkulose ist eine Infektionskrankheit, die durch das Bakterium *Mycobacterium tuberculosis* verursacht wird. Der Erreger der Tuberkulose ist ein aerobes, unbewegliches, langsam wachsendes, stäbchenförmiges Bakterium der Familie *Mycobacteriaceae*³. Der deutsche Mediziner und Mikrobiologe Robert Koch entdeckte 1882 erstmals das krankheitsverursachende Bakterium und schuf damit die Grundlage für die weitere Erforschung der Krankheit, die Entwicklung von Medikamenten sowie eines möglichen Impfstoffs. Obwohl *M. tuberculosis* vor über 130 Jahren als krankheitsverursachender Erreger entdeckt wurde und bereits seit über 50 Jahren Medikamente und ein Impfstoff gegen die Tuberkulose (TB) existieren, gilt TB noch immer als eine der tödlichsten Infektionskrankheiten weltweit^{4,5}. Die Anzahl an TB-Neuinfektionen konnte zwar von 1990 bis 2015 um fast 50 % gesenkt werden, im Jahr 2014 erkrankten jedoch immer noch 9,6 Millionen Menschen an TB, wovon 1,5 Millionen Menschen starben¹. 95 % aller TB-Infektionen kommen vor allem in Niedrig- oder Mitteleinkommensländern vor. Ursächlich dafür sind sowohl die schlechte medizinische Versorgung und Diagnostik, die hygienischen Maßnahmen und die nicht stringente Einnahme der Medikamente⁶⁻⁸.

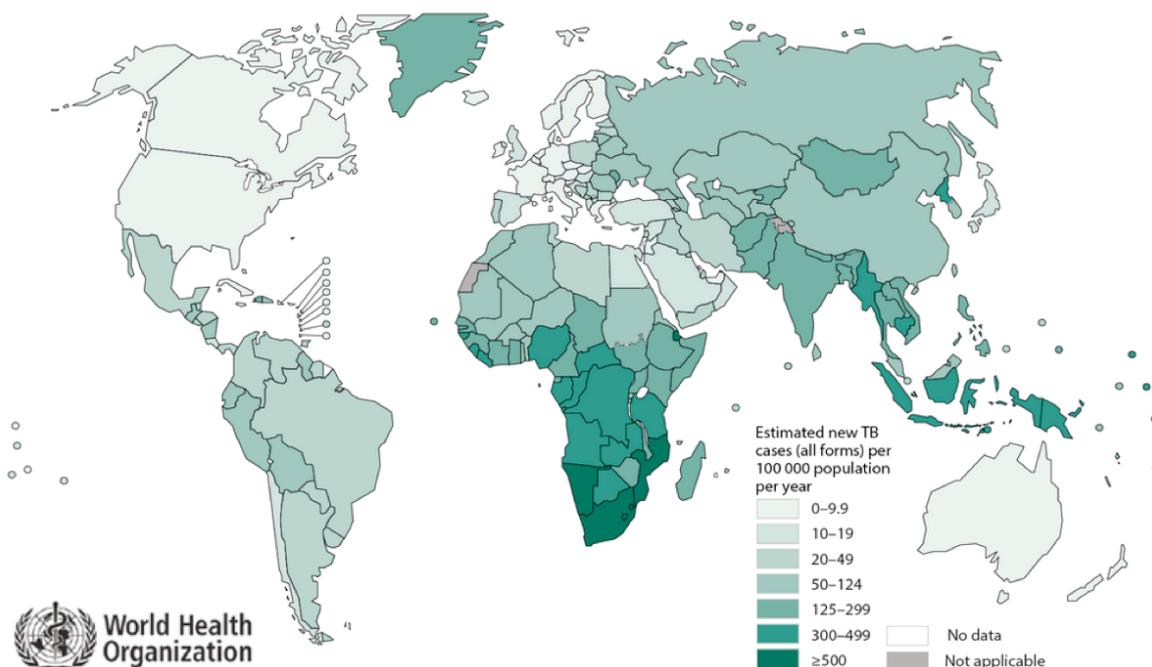


Abb. 1.1: Tuberkulose-Inzidenz im Jahr 2014 (WHO)¹

Obwohl etwa ein Drittel der Weltbevölkerung mit *M. tuberculosis* infiziert ist, entwickeln nur 5-10 % der Menschen im Laufe ihres Lebens aktive TB. Die Durchseuchung mit dem humanen Immundefizienzvirus (HIV) und die daraus resultierende Immunschwäche sind von großer Bedeutung für die Entwicklung einer aktiven, offenen TB-Erkrankung. Sowohl HIV-Patienten, als auch Menschen mit anderen Immundefizienzen haben ein vielfach erhöhtes Risiko an einer aktiven Tuberkulose zu erkranken als gesunde Menschen^{9,10}.

1.1.1 Symptome und Diagnostik

Nur ein Teil der Infizierten entwickelt eine behandlungsbedürftige Form der Tuberkulose. In den meisten Fällen kann das Immunsystem die Bakterien erfolgreich bekämpfen und diese in Form eines Granuloms abkapseln^{11,12}. Die Infektion ist somit dauerhaft eingegrenzt und wird als latente tuberkulöse Infektion bezeichnet (LTBI)¹³. Auch Jahrzehnte nach einer Infektion kann es aufgrund eines geschwächten Immunsystems zu einer Erkrankung an Tuberkulose kommen (Reaktivierung)¹⁴. Prinzipiell kann die Tuberkulose jedes Organ befallen, allerdings manifestiert sie sich in 80 % der Erkrankten als Lungentuberkulose¹⁵. Während die primäre, respiratorische TB meist asymptomatisch verläuft, entwickeln sich verschiedenste respiratorische Symptome bei der Post-Primären-Tuberkulose (Reaktivierung). Produktiver Husten, teilweise mit Blutauswurf, Fieber, Müdigkeit, Schmerzen im Brustkorb, Gewichtsverlust und Nachtschweiß sind verbreitete Symptome einer aktiven TB-Infektion¹³. Basierend auf der Symptomatik ist die Diagnose allerdings schwierig von anderen Infektionen des Brustkorbs zu unterscheiden¹⁶. Für die Diagnostik einer latenten Tuberkulose stehen momentan sowohl der Tuberkulin-Hauttest (THT) als auch der Interferon-Gamma-Freisetzungstest (*interferone gamma release test* = IGRT) zur Verfügung¹³. Die Diagnose einer aktiven Tuberkulose erfolgte bislang mit Hilfe der Röntgendiagnostik oder dem bakteriologischen Nachweis¹³. Der Röntgennachweis spielt nach wie vor bei der Erkennung einer Lungentuberkulose, als auch bei der Beurteilung des Therapieerfolges eine entscheidende Rolle. Eine Einordnung der Spezies war dabei lange Zeit nur mit Hilfe eines zeitaufwendigen bakteriologischen Nachweises möglich. Abhilfe könnte der 2010 entwickelte, auf *Real-Time-PCR* basierende, Xpert MTB/RIF-Test schaffen, der mit minimaler technischer Expertise die Diagnose einer Tuberkulose-Erkrankung mit gleichzeitiger Untersuchung auf Resistenz gegen eines der *first-line* Antibiotika (Rifampizin) innerhalb von 2 Stunden ermöglicht¹⁷⁻¹⁹.

1.1.2 Therapie

Die Standardtherapie einer aktiven Antibiotika-sensitiven TB-Erkrankung erfolgt mit Hilfe von vier antimikrobiellen Medikamenten (Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamid und Ethambutol) über einen Zeitraum von mindestens sechs Monaten^{20,21}. Sowohl der Zugang zu Medikamenten als auch eine regelmäßige Kontrolle der Einnahme ist von immenser Bedeutung für den Ausgang der Erkrankung, da die inkorrekte Einnahme von TB-Medikamenten zu Resistenzen führen kann. Multiresistente Tuberkulose (*multidrug resistance*-TB) ist eine Form der TB, bei der die Bakterien eine Resistenz gegen mindestens eines der zwei stärksten zu erst verabreichten Antibiotika (*first-line drugs*, Erstrangmedikamente: Isoniazid oder Rifampicin) aufweisen. Mit Hilfe von Zweitrangmedikamenten ist eine Heilung möglich, allerdings ist die Therapie teuer, nicht überall zu erlangen und deutlich langwieriger (bis zu 2 Jahre)²⁰. Vor allem in Ländern wie Russland, China und Indien ist eine steigende Zahl von MDR-TB zu verzeichnen¹. *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)²² ist das einzig erprobte und zugelassene Vakzin gegen TB. Der Impfstoff basiert auf einem attenuierten *M. bovis* Stamm und wird heutzutage in TB-endemischen Ländern eingesetzt, um Kinder vor schweren Formen der Tuberkulose (z.B. TB-Meningitis und Miliartuberkulose) zu schützen^{23,24}. Die Effizienz des Impfstoffs ist jedoch in Abhängigkeit der Population eines Landes sehr unterschiedlich. Während in einigen Ländern wie z.B. Großbritannien eine Effizienz in der protektiven Wirkung gegen TB nachgewiesen werden konnte²⁵, gibt es kaum oder keinen signifikanten Schutz in anderen Ländern²⁶. Mit steigender Zahl an Multiresistenzen, einem Stagnieren der Entwicklung neuer Klassen an TB-Medikamenten seit über 40 Jahren und keinem effizienten Impfstoff, scheint die Erforschung und Entwicklung neuer chemotherapeutischer Ansätze von großer Bedeutung.

1.1.3 Der Lebenszyklus von *M. tuberculosis*

Verschiedene Spezies gehören zum krankheitsverursachenden *M. tuberculosis*-Komplex, wie *M. tuberculosis*, *M. bovis* (*ssp. bovis* und *caprae*), *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti* und *M. pinnipedii* sowie der Impfstamm *M. bovis* BCG.^{1,13,27} Allerdings ist *M. tuberculosis* (Mtb) der häufigste Erreger einer Tuberkulose-Infektion beim Menschen¹. Mtb ist ein strikt humanes Pathogen, das sich evolutionär perfekt an sein Reservoir, den Menschen, angepasst hat^{28,29}. Für die Tuberkulose-verursachenden Mykobakterien *M. tuberculosis* und *M. africanum* sind Menschen das bislang einzige relevante Reservoir. Die Übertragung von

Mtb erfolgt über die Luft³⁰. Durch Husten, Niesen oder Spucken eines Menschen mit einer aktiven, offenen (infektiösen) Form der Tuberkulose gelangen die Bakterien in die Luft und können dort in Form von infektiösen Partikeln über einige Stunden verbleiben¹. Das Einatmen einiger weniger Bakterien führt zu einer Infektion, wobei die minimale infektiöse Dosis ab einem Bakterium aufwärts entsprechen kann¹. Die Bakterien werden zunächst von alveolaren Makrophagen oder dendritischen Zellen (DCs) phagozytiert. *M. tuberculosis* moduliert die phagosomale Reifung, in dem die Fusion mit sauren und hydrolytisch-aktiven Lysosomen verhindert wird³¹⁻³³. Mtb-infizierte Phagozyten können vom alveolären Raum in das Lungeninterstitium migrieren und die Mykobakterien können von dort über eine Nekrose der Wirtszelle ins umliegende Gewebe entkommen^{34,35}. Ein neuer Infektionszyklus kann beginnen und die Ausbreitung erfolgt über die lymphatischen und hämatogenen Routen in andere Organe³⁶. Das Eindringen in umliegendes Epithelgewebe führt zu einer lokalen Inflammation. Mononukleäre Zellen aus den umliegenden Blutgefäßen wandern ein und dienen als neue Wirtszellen für die expandierende Bakterienpopulation, was in eine Ausbildung von Granulomen resultiert. Diese charakteristische pathologische Erscheinung der Erkrankung ist durch ein kompakt, organisiertes Aggregat von Epithelioidzellen³⁷ (z.B. Makrophagen, Neutrophile, Dendritische Zellen, Riesenzellen, NK-Zellen, T- und B-Zellen) gekennzeichnet^{24,37}. Zum frühen Zeitpunkt der Granulomenausbildung ist eine starke Vaskularisierung des Granuloms³⁸ und Zellen (Makrophagen, Monozyten und neutrophile Granulozyten) werden aktiv an den Infektionsherd rekrutiert²⁴. Makrophagen differenzieren zu unterschiedlichen spezialisierten Zelltypen, wie multinukleare Riesenzellen, *foamy* Makrophagen³⁹ mit hohem Fettanteil und Epitheloid-Makrophagen³⁷. Durch die Aktivierung des adaptiven Immunsystems sammeln sich Lymphozyten wie ein Mantel um den Makrophagen-reichen Kern des Granuloms²⁴. Nach und nach wird das Granulom immer vielschichtiger und es kommt zur Ausbildung einer Fibrinschicht, die die infizierten Makrophagen von den umliegenden Lymphozyten und Blutgefäßen trennt (Abb. 1.2)^{24,40}. Initiierender Faktor zur Ausbildung und Aufrechterhaltung von Granulomen ist der von infizierten Makrophagen und T-Zellen gebildete Tumornekrosefaktor (TNF). TNF ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Chemokinkonzentration der infizierten Zellen und somit für die Granulomenformation^{12,41-43}. Bei der latenten Form der TB werden die Bakterien in der stabilen Einheit, dem Granulom, zurückgehalten. Lediglich in 10 % der Infektionen kann eine latente Infektion in eine aktive Form umgewandelt werden. Eine verstärkte Akkumulation

von Caseum (nekrotisches Gewebe der Lunge) im Granulomzentrum führt zum Zusammenbruch des Granuloms, wodurch mehrere tausend infektiöse Bakterien in die Atemwege entlassen werden. Der resultierende produktive Husten sorgt für eine Freisetzung der Bakterien^{39,44}.

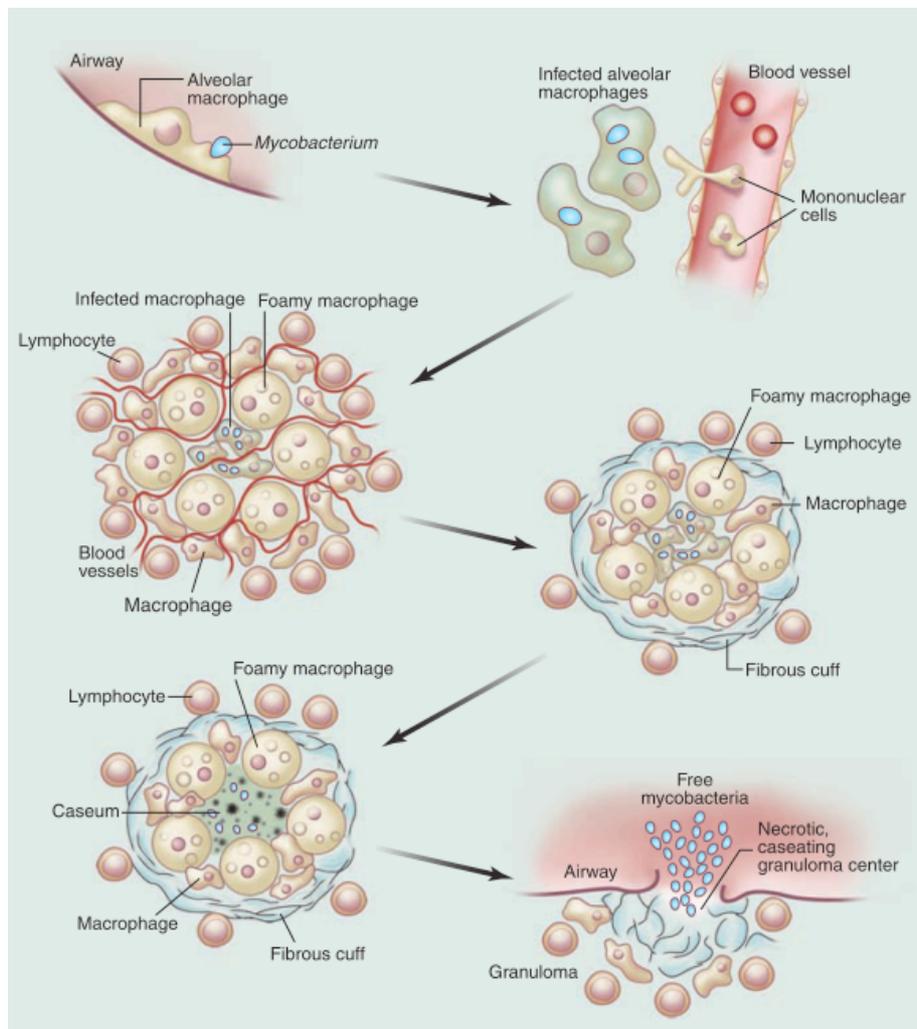


Abb. 1.2: Der Lebenszyklus von *M. tuberculosis*

Die Übertragung von *M. tuberculosis* (Mtb) erfolgt durch Husten, Niesen oder Spucken von infizierten Menschen mit einer aktiven Tuberkulose. Mtb-haltige Aerosole können einigen Stunden in der Luft persistieren. Das Einatmen von weniger als 10 Bazillen reicht, um sich zu infizieren. Sobald die Bakterien die Lunge erreichen, werden diese von alveolären Makrophagen phagozytiert und aufgrund der aktivierten Immunreaktion wandern die infizierten Zellen in das umliegende Gewebe. Die Rekrutierung von Immunzellen aus umliegenden Blutgefäßen erfolgt. Im frühen Stadium der Granulom-Bildung besteht der Kern aus infizierten Makrophagen, die umringt sind von *foamy* Makrophagen und anderen mononukleären Phagozyten und einer Schicht Lymphozyten. Während der weiteren Reifung entsteht eine Fibrin-Schicht, die sich wie eine Kapsel um den Makrophagenkern legt und den Großteil der Lymphozyten und der Blutgefäße ausschließt. Die Anzahl an *foamy* Makrophagen steigt und ist vermutlich für die Anreicherung von Caseum im Zentrum des Granuloms verantwortlich. Dies kann zu einer Reaktivierung der latenten Form und zu einer aktiven Tuberkulose führen. Das nekrotische Zentrum des Granuloms verflüssigt sich und mehrere tausend infektiöse Bakterien können aus der Zelle in die Atemwege freigesetzt werden. Der entstandene Schaden des

Lungengewebes führt zur Entwicklung eines produktiven Hustens, der die Bakterien freisetzt und den Lebenszyklus von Mtb abschließt (Quelle: Russell et al., 2009³⁹).

1.1.4 Der Infektionsverlauf von *M. tuberculosis* in Makrophagen

Der Infektionsverlauf beginnt mit der Aufnahme der Bakterien durch die Makrophagen des alveolären Trakts des Menschen. Die einzigartige Zellwandstruktur des Gram-positiven Bakteriums *M. tuberculosis* aus hoch komplex angeordneten Glykolipiden und Mykolsäuren kann durch bestimmte Rezeptoren der Makrophagen erkannt werden. Der C-Typ Lektin-Rezeptor Mincle erkennt den immunstimulatorischen Cord-Faktor (Trehalose-6,6-Dimycolat) der Bakterien⁴⁵⁻⁴⁷. Die Bindung aktiviert Makrophagen und die Phagozytose der Mykobakterien in ein phagosomales Kompartiment kann erfolgen⁴⁵. Das Bakterien-enhaltende Kompartiment durchläuft eine Reifung, die aus folgenden Schritten besteht: (1) der Ansäuerung des Phagosoms durch die Aktivität einer Protonen-ATPase in der phagosomalen Membran, (2) der Phagosomen-Lysosomen-Fusion, die das resultierende Phagolysosomen mit proteolytischen Enzymen versorgt, (3) der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies und Nitrogen-Intermediate und (4) der Antigen-Prozessierung⁴⁸. Pathogene Mykobakterien haben eine Vielzahl von Mechanismen entwickelt, um diesen Abtötungsmechanismen der Immunzellen zu entgehen. So konnte schon vor mehr als 40 Jahren gezeigt werden, dass Mtb-enhaltende Phagosomen einer Fusion mit dem späten endolysosomalen System ausweichen können^{48,49}. Die Blockade dieser phagosomalen Reifung ist einer der Schlüsselmechanismen pathogener Mykobakterien. Virulenzfaktoren, wie z.B. das ESX-1 Sekretionssystem^{50,51}, verhelfen dem Abbau zu entkommen und in Makrophagen zu überleben. Eine wichtige Rolle beim phagosomalen Reifungsprozess spielt eine Familie kleiner GTPasen, die Rab-Familie, die für die Fusionsprozesse zwischen frühen und späten Organellen des endozytotischen Signalwegs verantwortlich sind. Während Rab5 spezifisch für die Kontrolle von Fusionen der frühen endosomalen Kompartimente benötigt wird, kann Rab7 ausschließlich an späten Endosomen detektiert werden⁵². Eine selektive Akkumulation von Rab5, nicht aber von Rab7, konnte am mykobakteriellen Phagosomen nachgewiesen werden^{53,54}. Die Fusion mit Lysosomen wird blockiert und führt zur Abwesenheit von späten endosomalen Markerproteinen, wie der vakuolären Protonen-ATPase³¹, des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors⁵⁵ und der lysosomalen Protease Cathepsin D^{56,57}. Eine Vielzahl von

Proteinen von *M. tuberculosis* sind für die Arretierung der phagosomalen Reifung verantwortlich^{58,59}.

1.2 Das *Mycobacterium marinum/Dictyostelium discoideum* Modellsystem

Da *M. tuberculosis* keinen anderen natürlichen Wirt als den Menschen hat, ist es aus ethischen Gründen unabdingbar, abgeleitete Infektionsmodelle zu verwenden, um die komplexe Biologie zwischen Pathogen und Wirt besser zu verstehen. Das häufigste verwendete System ist das Maus-Modell, mit dem vor allem im Bereich der Genetik und der Immunologie des Infektionsverlaufs große Fortschritte erzielt werden konnten⁶⁰. Um jedoch ein besseres Verständnis über die Infektion der alveolären Makrophagen, die intrazelluläre Replikation des Erregers im phagosomalen Kompartiment und die molekularen Mechanismen des Austritts zu erlangen, wurden Zell-basierte Modellsysteme etabliert. Mit Hilfe der genetisch und biochemisch einfach zu manipulierenden, professionellen Phagozyte *D. discoideum*⁶¹ in Kombination mit dem nahen Verwandten *M. marinum*^{62,63} können wirtsspezifische und bakterielle Komponenten in Hinblick auf Replikation und Lokalisation von mykobakteriellen Infektionen hin untersucht werden^{64,65}.

1.2.1 *Mycobacterium marinum*

M. marinum ist ein Bakterium, das eine chronische, systemische Tuberkulose-ähnliche Erkrankung in Fischen, Amphibien und Menschen verursacht⁶⁶. Während das Humanpathogen *M. tuberculosis* über Aerosole ausschließlich von Mensch zu Mensch übertragbar ist, kann *M. marinum* eine Vielzahl von Fischgattungen infizieren. Auch Amöben, die über Wasser übertragen werden, dienen als mögliches Reservoir für das Pathogen⁶⁷. Ähnlich wie beim Menschen können durch eine Infektion mit *M. marinum* Granulome im Fisch entstehen. Aber auch beim Menschen kann eine Infektion mit *M. marinum* zu einer opportunistischen Erkrankung, der Aquariums- oder Schwimmbad-Granulome, führen. Aufgrund der optimalen Temperaturbedingungen zwischen 25-35 °C des Erregers entstehen die Granulome nur lokal an kühleren Oberflächen, wie z.B. der Haut^{68,69}. *M. marinum* ist unter BSL-2 Bedingungen händelbar und auch die Generationszeiten in der logarithmischen Wachstumsphase sind mit 4 Stunden deutlich kürzer als die von *M. tuberculosis* (mehr als 20 Stunden). In Bezug auf die Analyse der 16S rRNA von 19 Mykobakterien-Spezies sind *M. marinum* und *M. ulcerans* die nahsten Verwandten des *M. tuberculosis*-Komplexes mit

einer Sequenzhomologie von 99,4 %⁷⁰ (Abb. 1.3). Unabhängig von der genetischen Ähnlichkeit von *M. ulcerans* und *M. marinum*, stellt die Infektion mit *M. marinum* aufgrund der größeren Ähnlichkeiten zum *M. tuberculosis* Infektionsverlauf und der verursachten Erkrankung das bessere Modell dar⁶³.

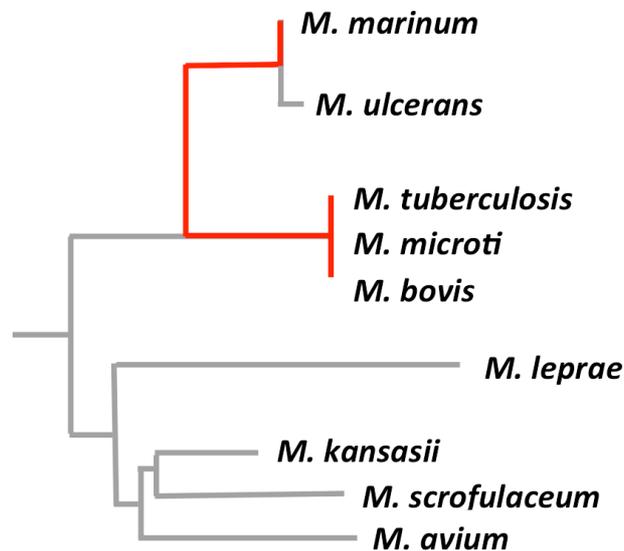


Abb. 1.3: Phylogenetischer Baum ausgewählter Mykobakterien-Stämme auf Grundlage der 16S rRNA (verändert nach Stamm & Brown, 2004)⁶⁶

Die Infektion von Phagozyten durch *M. marinum* rekapituliert den Verlauf einer Infektion mit *M. tuberculosis*. Ähnlich wie bei der *M. tuberculosis* Infektion, wird nach der Phagozytose des Erregers eine Ansäuerung des phagosomalen Kompartiments von *M. marinum* verhindert⁷¹⁻⁷³, die Mykobakterien replizieren⁷⁴ und können anschließend aus dem phagosomalen Kompartiment ins Zytosol gelangen⁷⁵⁻⁷⁷. Neben der Verbreitung von *M. marinum* und *M. tuberculosis* über eine Lyse der Wirtszellen, Nekrose oder Apoptose^{34,78,79}, wurden auch Antibiotika-insensitive Zell-Zell-Übertragungswege beschrieben^{2,80,81}. Verantwortlich für die Arretierung der phagosomalen Reifung, den Ausbruch der Mykobakterien ins Zytosol und den Austritt aus der Zelle ist das *early secreted antigen 6 kilodaltons (Esat-6) secretion system 1 (ESX-1)* Sekretionssystem^{50,51} pathogener Mykobakterien. Mit Hilfe dieser Maschinerie können pathogene Mykobakterien Effektormoleküle über die Membran ins Zytosol der Wirtszelle transportieren⁵⁰. Die Sekretion der in der RD1-Region⁸²⁻⁸⁵ des ESX-1 Lokus^{86,87} kodierten Effektormoleküle ESAT-6 und CFP-10^{88,89} ist von entscheidender Bedeutung für die Pathogenität von *M. marinum* und *M. tuberculosis*⁵⁰. Eine Deletion der RD1-Region führt zu einer verminderten Zell-Zell-

Transmission, zu einem veränderten Zytokin-Profil und dem Verlust die phagosomalen Reifung zu verhindern^{87,90–95}. Nicht nur die vergleichbaren Pathogenitätsmechanismen von *M. marinum* und *M. tuberculosis*, sondern auch die großen Ähnlichkeiten in der Pathologie, in Kombination mit einer höheren Arbeitssicherheit, schnelleren Generationszeiten und einer einfachen Handhabung, machen *M. marinum* zu einem guten Modellsystem zur Erforschung der grundlegenden Virulenzmechanismen von *M. tuberculosis*^{63,66,96,97}.

1.2.2 *Dictyostelium discoideum*

D. discoideum ist ein Mitglied der Familie der Amoebazoa und kommt ubiquitär in Waldböden und Laub gemäßigter Zonen vor. Die unabhängig wachsenden, einzelligen Amöben nehmen über Phagozytose Bakterien und Hefen als Futter auf⁹⁸. Unter Hungerbedingungen können *D. discoideum* Zellen eine Aggregation und Zelldifferenzierung zu einem multizellulären Organismus durchlaufen^{99,98}. Der Organismus bietet eine Vielzahl einzigartiger Vorteile, um fundamentale zelluläre Prozesse im Bereich der Chemotaxis, Zytokinese, Zellmotilität, Signaltransduktion und Entwicklungsbiologie zu untersuchen^{100–103}. Aufgrund des haploiden Genoms der einzelligen Amöben können Mutanten sehr einfach generiert werden¹⁰⁴. Die einfache Kultivierung der Zellen, die Zugänglichkeit zu wichtigen zellbiologischen, genetischen und biochemischen Methoden als auch zur sequenzierten und annotierten Genomsequenz machen *D. discoideum* zu einem attraktiven Modellorganismus für eine komplexe, phagozytierende Zelle^{104–108}. In mehrzelligen Organismen wird der evolutionär hoch konservierte Mechanismus der Phagozytose neben der Nährstoffaufnahme vor allem zum Abbau von toten Zellen oder Zellbestandteilen, sowie als Teil des Immunsystems zur Abwehr von Pathogenen genutzt. In einzelligen Organismen wie *D. discoideum* hingegen wird die Phagozytose vor allem als Mechanismus zur Internalisierung von Bakterien als Futterressource verwendet. Über einen Reifungsprozess des Phagosoms zum Phagolysosom (Fusion mit Lysosomen) werden die aufgenommenen Mikroorganismen über hydrolytische Enzyme abgebaut^{109–111}. *Dictyostelium* und Makrophagen teilen fundamentale zellbiologische Mechanismen und zeigen, dass die Bereitstellung von Makromolekülen für den eigenen Metabolismus und der Abbau von Mikroorganismen zum Schutz evolutionär eng miteinander verknüpfte Prozesse sind^{104,110,112} (Abb. 1.4).

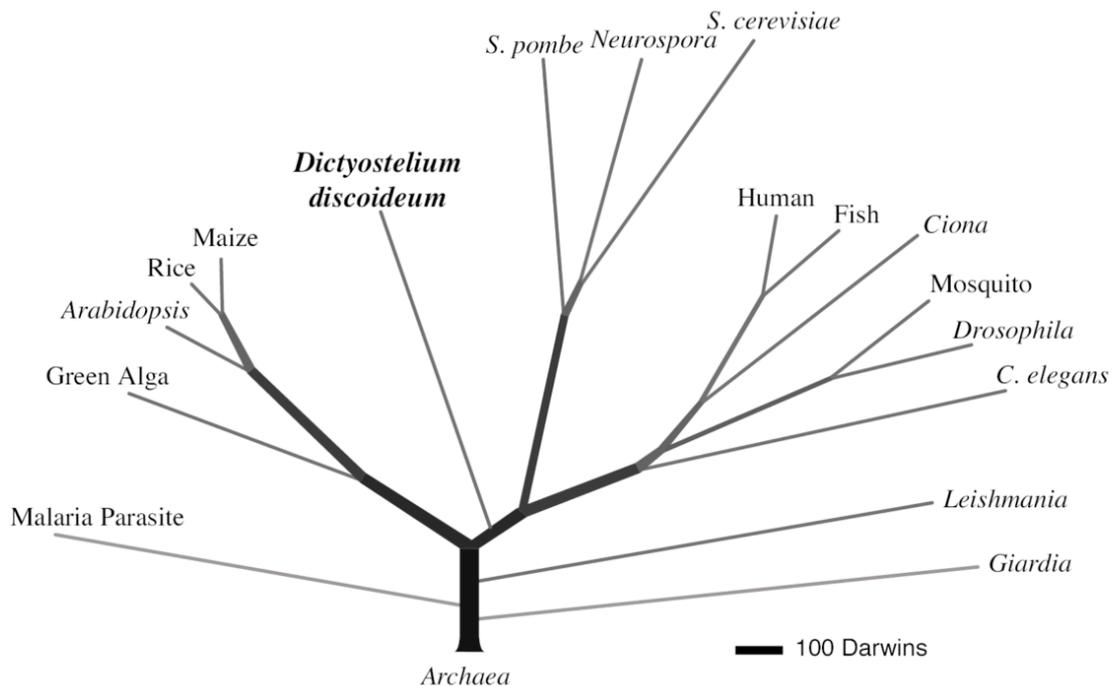


Abb. 1.4: Proteom-basierter phylogenetischer Baum von unterschiedlichen Modellorganismen (Eichinger *et al.*, 2005)¹⁰⁴

Phylogenetische Studien zeigen, dass *D. discoideum* sich vom Zweig der Tiere und Pflanzen abspaltet nachdem die Abzweigung der Pflanzen erfolgte¹⁰⁴. Noch bevor Tiere und Pflanzen sich voneinander getrennt haben, scheinen sich die Grundlagen der Virulenzmechanismen von pathogenen Bakterien und zellulärer Abwehrmechanismen co-evolutionär entwickelt zu haben (Abb. 1.4). Aufgrund der funktionellen Konservierung zellulärer Prozesse gilt *D. discoideum* als geeignetes Wirtszell-Modell, um die Pathogenese einer Vielzahl von bakteriellen Erregern, wie z.B. *Legionella pneumophila*^{113,114}, *Pseudomonas aeruginosa*^{115–117}, *Vibrio cholera*¹¹⁸, *Francisella noatunensis*¹¹⁹ und Mykobakterien^{64,65,116} zu untersuchen.

1.2.3 Der Infektionsverlauf von *M. marinum* in *D. discoideum*

Einige pathogene Mikroorganismen haben Mechanismen entwickelt, der phagosomalen Reifung zu entkommen oder diese zu blockieren. Sehr ähnlich wie der humane Erreger *M. tuberculosis* in Makrophagen kann *M. marinum* in *D. discoideum* die phagosomale Reifung unterbinden und das Kompartiment für die eigene Proliferation nutzen^{64,65}.

Der Verlauf der Infektion von *M. marinum* in *D. discoideum* kann grundsätzlich in 3 Schritte unterteilt werden: Etablierung der Infektionsnische, Proliferation der Bakterien und Freisetzung des Pathogens aus der Wirtszelle (schematische Darstellung in Abb. 1.5). Sowohl *M. marinum* als auch *M. tuberculosis* werden über Phagozytose durch die Wirtszelle

aufgenommen. Pathogene Mykobakterien unterbinden eine weitere Reifung des Kompartiments, in dem die vakuoläre H^+ -ATPase abgeführt und der Transport von lysosomalen endoproteolytischen Enzymen (z.B. Cathepsin D) zum Kompartiment blockiert wird^{35,64}. Die Bakterien replizieren in dem endosomalen Kompartiment^{40,120,121} und während des gesamten intravakuolären Replikationsprozesses der Mykobakterien akkumulieren die Wirtsproteine Vacuolin B (Flotilin-Homolog) und p80 (putativer Kupfertransporter) bis die Bakterien aus der Vakuole ins Zytosol brechen⁶⁴. Zytosolische Mykobakterien werden mit Hilfe eines nicht-lytischen Mechanismus über eine dichte F-Aktin Struktur, dem Ejektosom, aus der Wirtszelle transportiert und ein neuer Infektionszyklus kann von vorne beginnen². Sowohl die Präsenz bakterieller Faktoren (z.B. MAG24-1, RD1-Lokus) als auch Wirtszellproteine (z.B. Vacuolin B, RaxH) sind essentiell für die Etablierung und Erhaltung der Replikationsnische⁶⁴.

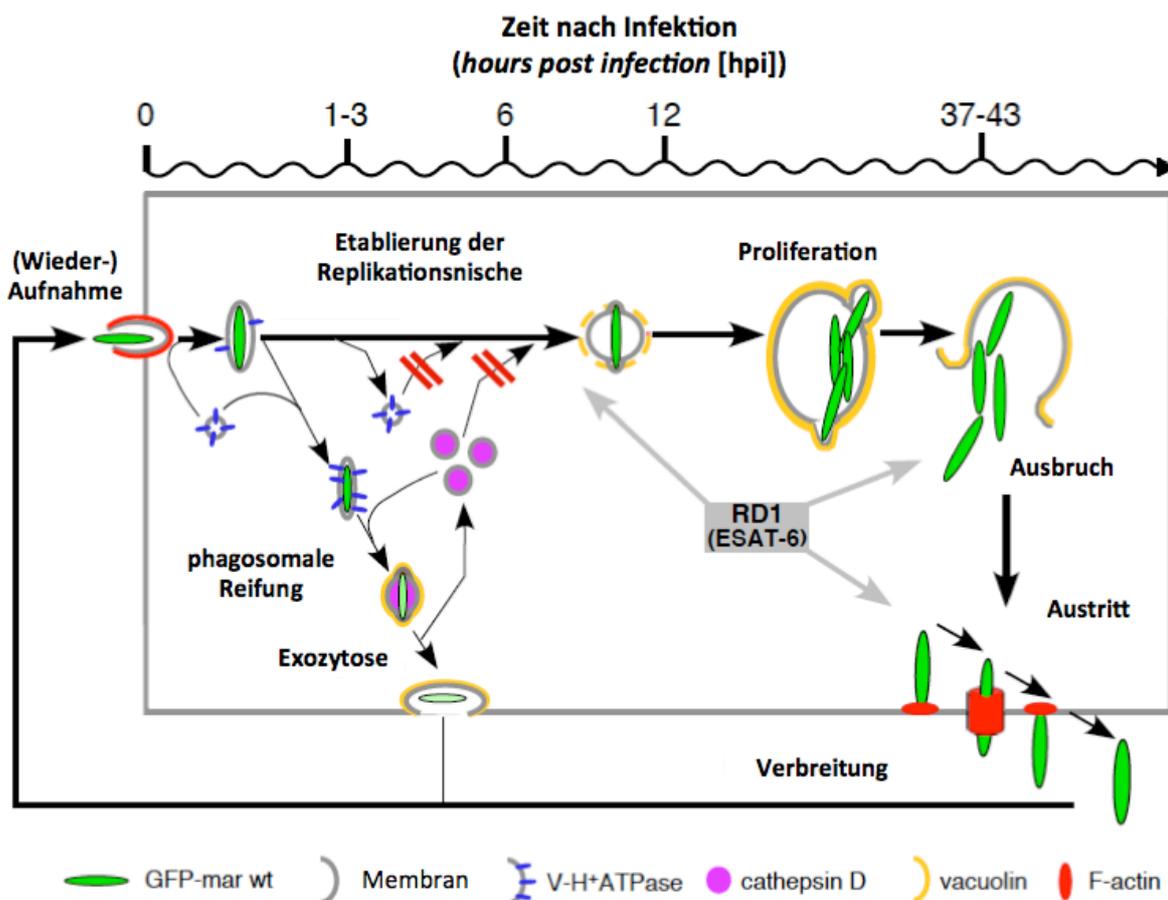


Abb. 1.5: Schema des Infektionsverlaufs von *M. marinum* in *D. discoideum* (verändert nach Hagedorn *et al.*, 2009)²

Mykobakterien werden über Phagozytose aufgenommen. Während nicht-pathogene Mykobakterien über eine Reifung des Phagosoms abgebaut werden, kann *M. marinum* die vakuoläre H^+ -ATPase abführen und blockiert die weitere Reifung des Kompartiments durch die Unterbindung der Fusion mit Lysosomen (Cathepsin D). Nach erfolgter Proliferation gelangen die pathogenen Mykobakterien

über einen RD1-abhängigen Prozess ins Zytosol und werden von dort über einen nicht-lytischen Mechanismus durch eine F-Aktin-Struktur (das Ejektosom) aus der Zelle transportiert. Sowohl mykobakterielle (ESAT-6 des RD1-Lokus) als auch wirtseigene Faktoren sind sowohl für die Etablierung der Replikationsnische als auch für den Austritt durch das Ejektosom verantwortlich.

Werden nicht-pathogene Mykobakterien, wie z.B. *M. smegmatis*, aufgenommen, erfolgt die Reifung des *M. smegmatis*-Phagosoms. Weder in *D. discoideum* noch in Makrophagen kann *M. smegmatis* replizieren^{64,122,123} und der Abbau der Bakterien wird durch eine Fusion des endosomalen Kompartiments mit Lysosomen eingeleitet. Der avirulente Stamm *M. marinum* ΔRD1 kann hingegen die Fusion mit dem lysosomalen System verhindern, eine effiziente Translokation ins Zytosol kann allerdings aufgrund der Deletion der RD1-Region nicht stattfinden^{77,124}. Das im RD-1 Locus kodierte Effektormolekül ESAT-6 (*Early Secretory Antigenic Target-6*) scheint eine membranolytische Aktivität zu besitzen und so die Translokation der Bakterien zu bewerkstelligen^{93,124}. Die grundlegenden Übereinstimmungen des Infektionsverlaufs und der beteiligten Prozesse im Vergleich zur humanen Infektion von *M. tuberculosis* in Makrophagen zeigen, dass das *D. discoideum*/*M. marinum*-Modellsystem für eingehendere Untersuchungen von zellulären Prozessen während des Infektionsverlaufs geeignet ist.

1.3 Das Ejektosom

Während die Phagozytose und die Etablierung der Replikationsnische von pathogenen Mykobakterien in Wirtszellen gut charakterisierte Prozesse sind, ist über die Austrittsmechanismen der Bakterien vergleichsweise wenig bekannt. In *D. discoideum* wurde eine F-Aktin-Struktur, das Ejektosom, entdeckt, die eine nicht-lytische, Antibiotika-insensitive und effiziente Verbreitung von *M. marinum* und *M. tuberculosis* ermöglicht². Mykobakterien brechen dabei mit Hilfe des Ejektosoms durch die Membran, ohne eine Zell-Lyse zu induzieren. Das Ejektosom ist somit für die Ausschleusung und Verbreitung der zytoplasmatischen Mykobakterien verantwortlich². Sowohl beim Eintritt in die Zelle über Phagozytose als auch bei Austritt über das Ejektosom handelt es sich um Aktin-abhängige zelluläre Mechanismen. Bei der Phagozytose von *M. marinum* stülpt sich die Wirtszelle um das aufzunehmende Bakterium herum². Beim Austritt durch das Ejektosom durchspannt das Bakterium die Membran. Die ringförmige Ejektosom-Struktur befindet sich meist in flachen Membranregionen und eine Aktin-Anreicherung am intrazellulären Teil der austretenden Bakterien kann nicht beobachtet werden² (Abb. 1.6).

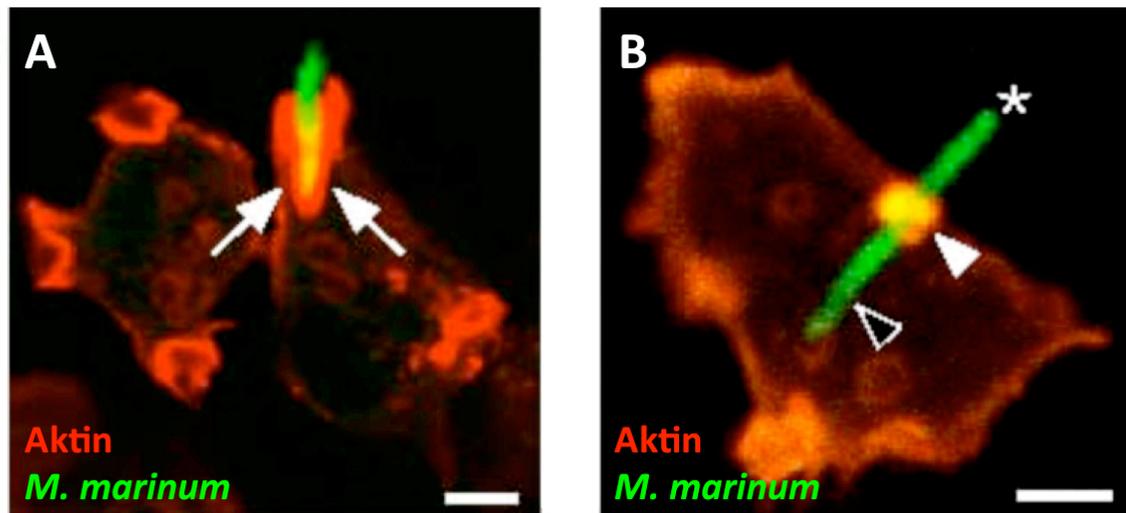


Abb. 1.6: Eintritt in die Zelle (Phagozytose) versus Austritt aus der Zelle (Ejektion) (verändert nach Hagedorn *et al.*, 2009)²

(A) Bakterium wird über Phagozytose in die Zelle aufgenommen. Ausstülpungen der Zelle (Lamellipodien) umschließen das Bakterium (weiße Pfeile) und nehmen es auf. (B) Ein Bakterium durchspannt die Membran durch die dichte F-Aktin-Struktur des Ejektosoms (weiße Pfeilspitze), während der intrazelluläre Teil des Bakteriums keine Akkumulation von Aktin aufweist (schwarze Pfeilspitze). Aktin = rot, *M. marinum* = grün, Größenbalken = 1 μm

Sowohl mykobakterielle Faktoren als auch Faktoren auf Seiten der Wirtszelle *D. discoideum* sind notwendig für die nicht-lytische Ausschleusung der Bakterien aus der Zelle. Auf Seiten der Wirtszelle konnte gezeigt werden, dass die kleine GTPase RacH¹²⁵, die für die Regulation des Aktin-Zytoskeletts verantwortlich ist, essentiell für die Ausbildung des Ejektosoms ist². Der mykobakterielle Virulenz-Faktor ESAT-6 des ESX-1 Sekretionssystems wurde als essentielle Komponente beim Austritts-Prozess von Mykobakterien aus *D. discoideum* ausgemacht². Zusammengefasst wurde mit Hilfe der professionellen Phagozyte *D. discoideum* eine konservierte Strategie tuberkulöser Mykobakterien identifiziert, die einen nicht-lytischen Austritt aus der Zelle und eine effiziente Verbreitung der Bakterien erlaubt.

1.4 Autophagie

Makroautophagie (im Weiteren als Autophagie bezeichnet) ist ein zellulärer Prozess, bei dem zytoplasmatische Proteine und Organellen für den Abbau zu Lysosomen transportiert werden¹²⁶. Der degradative Mechanismus ist durch die spezifische Bildung einer Vakuole mit Doppelmembran, dem Autophagosom, gekennzeichnet¹²⁷. Makroautophagie kann entweder selektiv oder nicht-selektiv sein. Unter Hunger- und Stressbedingungen dient die nicht-selektive Autophagie dazu durch den Abbau von zytoplasmatischem Material Nährstoffe

bereit zu stellen und somit das Überleben der Zelle zu sichern^{128,129}. Bei der selektiven Autophagie werden hingegen spezifische Zielstrukturen, wie überflüssige und kaputte Organellen, Proteine und intrazelluläre Pathogene durch Autophagosomen umschlossen und durch die Fusion mit Lysosomen abgebaut^{130,127}. Die Auswahl der Zielstruktur erfolgt mittels Bindung zwischen Zielstruktur-Rezeptor und Adapterproteinen. Bestimmte Adaptermoleküle, wie p62¹³¹ (Sequestosome 1 = SQSTM1 in *D. discoideum*), *nuclear dot protein 52 kDa*¹³² (NDP52), *neighbor of Brca1*¹³³ (NBR1) oder Optineurin¹³⁴ (OPTN), vermitteln eine Interaktion zwischen ubiquitinierten Strukturen und isolierten autophagosomalen (LC3 (Atg8)-positiven) Membranen¹³⁵. Abhängig von der abzubauenen Zielstruktur und den spezifischen Komponenten der Autophagie wurden die Prozesse unterschiedlich benannt. Der autophagosomale Mechanismus des selektiven Abbaus von intrazellulären Mikroorganismen nennt sich: Xenophagie^{130,136}. Die Xenophagie bildet einen wichtigen Schutz gegen eine Vielzahl von intrazellulären Mikroorganismen und gehört zusammen mit weiteren Faktoren des angeborenen Immunsystems zu den abwehrenden Mechanismen in der Zelle^{137,138}. Intrazelluläre Bakterien im Zytosol, in beschädigten Vakuolen oder in Phagosomen können erkannt und das bakterielle Wachstum durch proteolytischen Abbau begrenzt werden^{130,139}.

Während in Hefezellen die Bildung von Autophagosomen an sogenannten *phagophore assembly sites* (PAS) initiiert wird¹⁴⁰, konnte in Säugerzellen und in *D. discoideum* eine Ausbildung von Autophagosomen ausgehend von multiplen zytoplasmatischen Stellen beobachtet werden^{140,141}. Das Omegasom, eine am endoplasmatischen Retikulum (ER)-assoziierte Struktur, scheint ein möglicher Initiierungsursprung in Säugerzellen zu sein^{142,143}. Nach erfolgter Induktion der Autophagie assembliert eine vakuoläre Membran, bekannt als Phagophor. Diese breitet sich aus, umschließt zytoplasmatische Ziel-Komponenten und schließt sich zu einer Doppelmembran-Vakuole, dem Autophagosom. Durch eine Fusion mit Lysosomen werden die zytoplasmatischen Zielstrukturen mittels hydrolytischer Enzyme abgebaut und die Nährstoffe recycelt^{130,144} (Abb. 1.7). Schlüsselkomponenten für die autophagosomale Maschinerie sind *autophagy-related* (ATG)-Proteine¹⁴⁵. Basierend auf dem Wissen aus *Saccharomyces cerevisiae* und Säugerzellen können die Autophagie-Proteine in *D. discoideum* in drei konservierten Funktionskomplexen zusammengefasst werden: der Atg1-Komplex, der PI3K-Komplex und der *ubiquitin-like conjugation* Komplex¹²⁹. Während der Atg1-Komplex für die Initiierung der Autophagie von entscheidender Bedeutung ist¹⁴⁶,

wird der PI3K-Komplex für die Bindung weiterer ATG-Proteine (z.B. Atg18) an die wachsende Autophagie-Membran (Phagophor) benötigt¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Die Bildung eines reifen Autophagosoms erfordert zwei Ubiquitin-ähnliche Konjugationsreaktionen (Atg12 und Atg8-Konjugationssysteme^{127,150-152})¹⁵³, durch die unter anderem die Bindung des Markerproteins Atg8 an die wachsende Doppelmembran generiert wird^{154,155}.

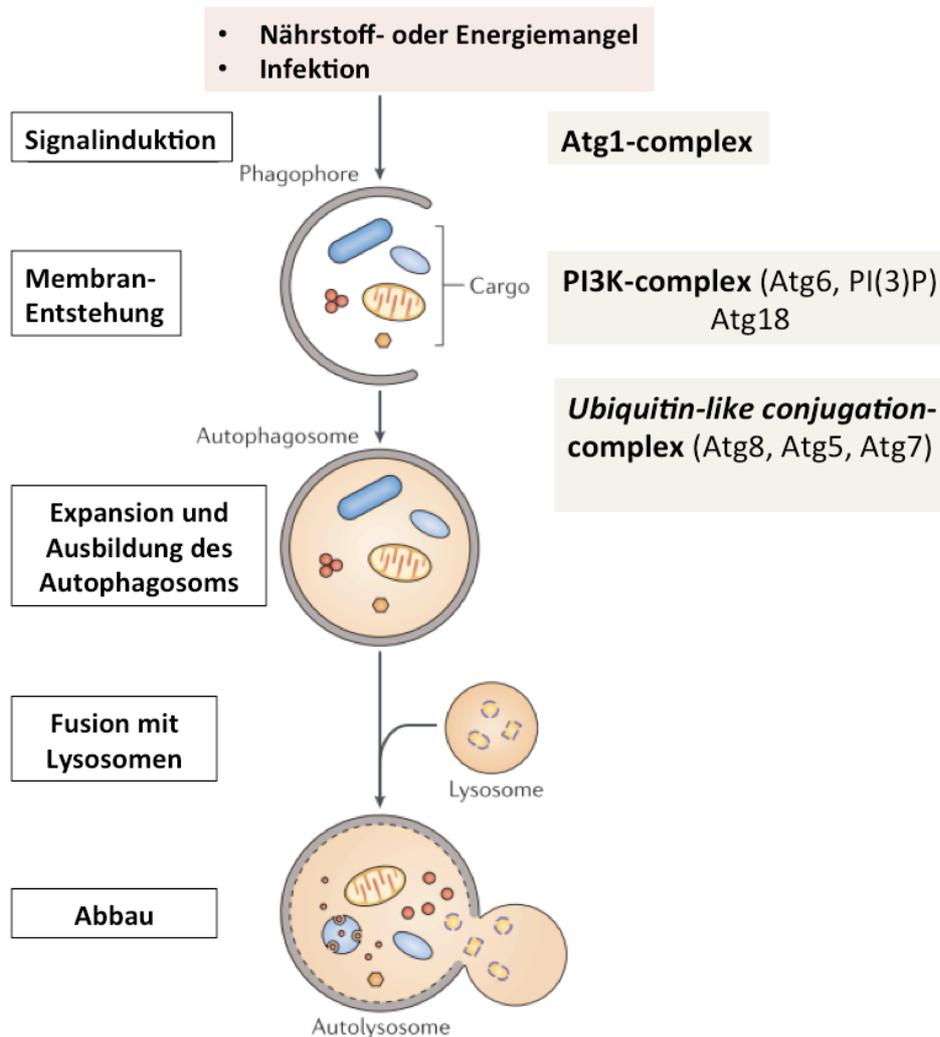


Abb. 1.7: Schematische Darstellung der Makroautophagie (verändert nach Huang & Brumell, 2014)¹³⁰

Nach erfolgter Stimulation der Autophagie assembliert eine Membranstruktur, bekannt als Phagophor, und umschließt zytoplasmatische Komponenten (Proteine, Organellen, Mikroorganismen). Das Phagophor expandiert und schließt sich zu einem Doppelmembran-Kompartiment, dem Autophagosom. Durch die Fusion mit Lysosomen werden die umhüllten Komponenten zersetzt. Die Schlüsselproteine der wichtigsten Komplexe der Autophagie sind auf der rechten Seite dargestellt. Atg = *autophagy-related*; PI(3)P = Phosphatidylinositol-3-Phosphat

Eine Vielzahl von Studien zeigen, dass Autophagie eine wichtige Rolle während der Infektion einnimmt¹³⁰. Mikroorganismen haben jedoch verschiedenste Mechanismen entwickelt, um einem Abbau durch die Autophagie-Maschinerie zu entgehen¹³⁰. Während einige Bakterien,

wie z.B. *Salmonella typhimurium*¹⁵⁶ und *M. tuberculosis*^{157,158}, die Signalwege, die zur Induktion der Autophagie führen, blockieren^{159,156}, können z.B. *Shigella flexneri*^{160–162} und *Listeria monocytogenes*^{163–167} sich mit wirtseigenen Proteinen maskieren und somit der Erkennung entkommen. Sowohl die Interaktion bestimmter bakterieller Faktoren von *S. flexneri*¹⁶⁸ und *Legionella pneumophila*¹⁶⁹ mit Bestandteilen des autophagosomalen Signalwegs als auch die Blockade der Reifung von Autophagosomen zu Autolysosomen durch pathogene Mikroorganismen, wie *M. marinum*¹⁷⁰ und *M. tuberculosis*¹⁷¹, führen zu einem erfolgreichen Überleben der Mikroorganismen innerhalb der Zelle. Im Kontrast zur Blockade der Erkennung durch die Autophagie, nutzen einige Bakterien, wie *Staphylococcus aureus*^{172–174}, *Coxiella burnetii*^{175–178} oder *M. tuberculosis*¹⁷⁹ die autophagosomalen Komponenten um ihr eigenes intrazelluläres Wachstum aktiv voranzutreiben¹³⁰. Im Falle pathogener Mykobakterien konnte gezeigt werden, dass diese sowohl durch die autophagosomale Maschinerie erkannt und ein Abbau initiiert wird^{180–182} als auch Mechanismen entwickelt haben, um der Autophagie zu entkommen oder diese für sich nutzen zu können^{130,183}. So ist z.B. *M. marinum* in der Lage durch Abwerfen der ubiquitinierten Zellwand in effizienter Weise der autophagosomalen Maschinerie zu entgehen¹⁸⁴.

1.5 ESCRT-Maschinerie

Die *endosomal sorting complexes required for transport* (ESCRT)-Proteine assemblieren zu einer Maschinerie, die eine topologisch einzigartige Membranabschnürung in Richtung des Zytosols bewerkstelligen können¹⁸⁵. Dieser evolutionär hoch konservierte Mechanismus ist in verschiedenste zelluläre Prozesse involviert, wie der Biogenese multivesikulärer Körperchen (*multivesicular bodies* = MVB)^{186–188}, der Zytokinese^{189,190}, der spontanen viralen Abschnürung von der Plasmamembran^{191,192} und der Reparatur von Plasmamembranwunden^{193,194}. Fünf Subkomplexe (ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III und Vps4-ATPase) werden nacheinander rekrutiert und übernehmen unterschiedlichste Funktionen^{195,196,185}. ESCRT-0 erkennt ubiquitinierte Zielproteine¹⁹⁷ und rekrutiert Clathrin-beschichteten endosomalen Membranen für die Initiierung der Maschinerie¹⁹⁸. In der Folge wird das Heterotetramer ESCRT-I rekrutiert und bedingt wiederum die Einberufung eines weiteren Heterotetramer-Komplexes, ESCRT-II^{185,198,199}. Zusammen sind diese beiden Komplexe für die Ausformung der abzuschnürenden Vesikel verantwortlich¹⁹⁸. Der ESCRT-III-

Komplex wird anschließend aktiviert und katalysiert die Abschnürung des Vesikels von der Membran^{196,200,201}. Durch die Aktivität von Vps4 erfolgt ein Recycling der ESCRT-Maschinerie^{200,202–204}. Während der ESCRT-III-Komplex und der ESCRT-Disassemblierungskomplex (Vps4) an allen ESCRT-beteiligten Prozessen von essentieller Bedeutung zu sein scheinen, kann die Funktion anderer Faktoren zum Teil komplementiert werden. So kann z.B. das Adapterprotein *ALG2-interacting protein X* (Alix) die Funktion der Komplexe ESCRT-I und ESCRT-II überbrücken und den Komplex ESCRT-III direkt rekrutieren^{192,205–211}.

Vor kurzem konnte der ESCRT-Maschinerie eine kritische Rolle in der Reparatur von Wunden in der Plasmamembran von Säugerzellen nachgewiesen werden^{193,194}. ESCRT-Proteine werden dazu innerhalb von Sekunden an die verletzte Membranregion rekrutiert¹⁹³. Die Aktivität des ESCRT-III-Komplexes sichert das Überleben der Zellen bei kleinen Membranwunden, indem die beschädigten Membranregionen in den Extrazellularraum abgeschnürt werden¹⁹³ (Abb. 1.8). Kalzium, ein essentielles Molekül für Wundreparatur in der Plasmamembran²¹², ist auch in diesem Mechanismus ein wichtiges Signalmolekül für die frühe Aktivierung und Rekrutierung der ESCRT-Faktoren. In Abhängigkeit der Größe der Wunden in der Plasmamembran werden unterschiedliche Reparatur-Mechanismen aktiviert. So scheint der ESCRT-vermittelte Plasmamembranreparaturmechanismus nicht nur für die Reparatur kleiner Wunden (< 100 nm) in Abhängigkeit der Aktivität des ESCRT-III-Komplexes verantwortlich zu sein¹⁹³, sondern auch in Muskelzellen werden ESCRT-Proteine an größere Wunden rekrutiert¹⁹⁴.

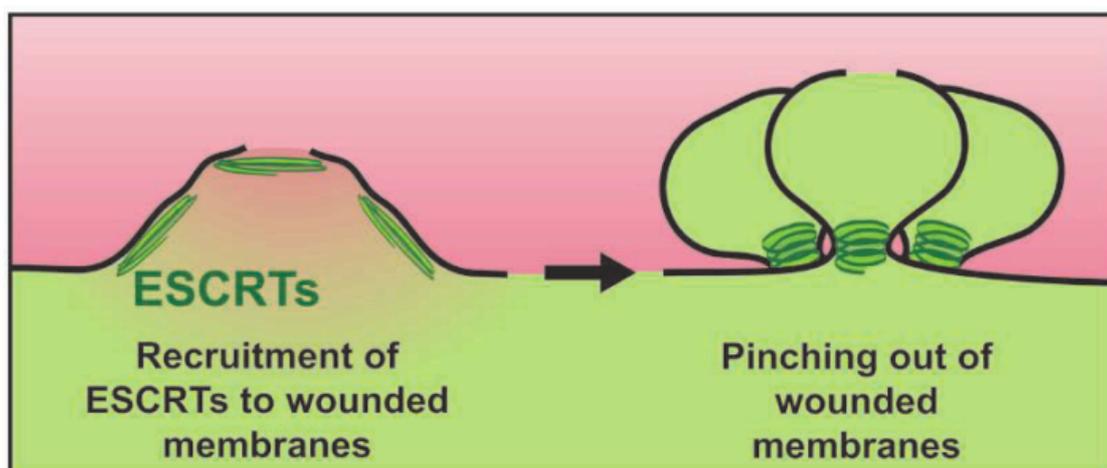


Abb. 1.8: Schema der ESCRT-vermittelten Abschnürung verwundeter Plasmamembranregionen (nach Jimenez *et al.*, 2014)²¹³

Innerhalb von Sekunden akkumulieren ESCRT-Proteine an verwundete Membranregion. Die betroffene Region wird vom Zytosol weg abgeschnürt und so die Integrität der Membran wieder hergestellt.

1.6 Zielsetzung

Im *M. marinum*/*D. discoideum* Modellsystem konnte eine auf F-Aktin basierende Struktur, das Ejektosom, identifiziert werden. Diese Struktur ist für eine konservierte, nicht-lytische Verbreitung von Mykobakterien verantwortlich und sowohl wirtseigene als auch Faktoren pathogener Mykobakterien sind an der Ausbildung beteiligt. Beim Austritt der Mykobakterien durch die Ejektosom-Struktur wird die Plasmamembran von *D. discoideum* lokal verwundet, jedoch bleibt die Wirtszelle auf bislang ungeklärte Weise intakt². In dieser Arbeit sollten die molekularen Mechanismen, die zur Bildung und Funktionalität des Ejektosoms, sowie zur Aufrechterhaltung der nicht-lytischen Transmission der Bakterien führen, eingehender untersucht werden.

Mittels korrelativer Mikroskopie wurde die Ultrastruktur des Austrittsprozesses von *M. marinum* in infizierten *Dictyostelium*-Zellen analysiert. Die Lokalisation von möglichen involvierten Wirtsproteinen an der Ejektosom-Struktur sollte in Überexpressions- und *knockout*-Zelllinien von *D. discoideum* mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie bestimmt werden. Die Deletion von Faktoren involvierter molekularer Mechanismen (z.B. Autophagie- und ESCRT-Maschinerie) wurden in dieser Arbeit auf eine Veränderung in der Ausbildung von Ejektosomen hin untersucht und dynamische Prozesse einer möglichen Akkumulation von involvierten Proteinen an der Ejektosom-Struktur konnten mit Lebenszellmikroskopie quantifiziert werden. Die Relevanz von Faktoren auf die Funktionalität der Ejektosomen, eine erfolgreiche Verbreitung der Bakterien von Zelle zu Zelle, sollte mit Hilfe eines auf Durchflusszytometrie-basierten Transmissions-Assays überprüft werden. Auch auf Seiten des Pathogens *M. Marinum* konnte mit Hilfe von Deletionsmutanten und nicht-pathogenen bzw. avirulenten Mykobakterien die Beteiligung von Pathogenitätsfaktoren (ESX1-Sekretionssystem) auf den nicht-lytischen Austrittsmechanismus durch das Ejektosom eingehender untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 2.1: Geräte

Gerät	Modell	Hersteller / Lieferant
Agarose- Gelelektrophoresekammer	40-0708	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Analysewaage	Handy H51	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Autoklav	2540EL	Tuttnauer, Breda, Niederlande
Durchflusszytometer	Accuri C6	BD, Franklin Lakes, USA
Einfrierbehälter	Mr. Frosty	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Elektroporator	Electro Square Porator ECM 830	BTX, Holliston, USA
Geldokumentation		
Heizblock	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Inkubatoren		
• Schüttelinkubator (37°C)	Innova 4400	New Brunswick Scientific, Enfield, USA
• Mykobakterien-Kultur (32°C)	Innova 42	New Brunswick Scientific, Enfield, USA
• Brutschrank (37°C)	Heraeus B6060	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
• Brutschrank und Schüttler für Infektionen (25°C)	Innova 42	New Brunswick Scientific, Enfield, USA

Magnetrührer	combimag RCT	IKA, Staufen, Deutschland
Mikroskope		
• Lichtmikroskop	CKX41	Olympus, Hamburg, Deutschland
• konfokales Laser- Scanning Mikroskop (Punktscanner)	FluoView 1000	Olympus, Hamburg, Deutschland
• konfokales Laser- Scanning Mikroskop (Linienscanner)	LSM 5	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
• Weitfeld- Fluoreszenzmikroskop	cellR Imaging System	Olympus, Hamburg, Deutschland
Mikrowelle	R-234	Sharp, Osaka, Japan
PCR-Zykler	Advanced Primus 25	Peqlab, Erlangen, Deutschland
pH-Meter	pH Level 1	inoLab, Weilheim, Deutschland
Photometer		
• Optische Dichte	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
• Nukleinsäuren	Nanodrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipetten	P2, P10, P20, P100, P200, P1000	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe	Matrix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Präzisionspinzette	INOX 5	Dumont &Fils, Montignez, Schweiz
Präzisionswaage	PCB 1000-1	Kern &Sohn, Balingen, Deutschland
Sterilbänke		

• <i>Dictyostelium</i> -Kultur	Kojair 2009	Kojair, Vilppula, Finnland
• Mykobakterien-Kultur	Haraeus Herasafe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vakuumpumpe	Laboport	KNF, Freiburg, Deutschland
Vortexer	VF2	IKA, Staufen, Deutschland
Wasserbad	HaakeB3	Artisan Technology Group, Champaign, USA
Zählkammer	Neubauer-improved	Marienfeld, Lauda- Königshofen, Deutschland
Zellzähler		Roche, Basel, Schweiz
Zentrifugen		
• Tischkühlzentrifuge	5810 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
• Tischzentrifuge	5415 D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
• Tischzentrifuge	5417	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
• Standzentrifuge	GS-6KR	Beckmann, Krefeld, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller
Deckgläschen	12 mm, No. 0 / No. 1	Assistent, Sondheim, Deutschland
Filter für Mykobakterienkultur	50 µm CellTrics	Sysmex Partec, Görlitz, Deutschland
Glaskügelchen	4 mm	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Impfeschlinge	10 µl	Saarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Kanülen für Spritzen (Mykobakterienkultur)	Anel mit Knick 0,5 x 18 mm 25G x 3/4	Neoject Dispomed, Gelnhausen, Deutschland
Kryo-Röhrchen	1,5 ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Küvetten	Halb-Mikro-Einmalküvetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Kulturschalen für Lebendzell- Mikroskopie	μ -Slide 8 well / 60 μ -Dish, 35 mm high	Ibidi, Martinsried, Deutschland
Kulturschale für korrelative Mikroskopie	60 – μ -Dish, 35 mm high, Grid 500	Ibidi, Martinsried, Deutschland
Objektträger	76 x 26 mm	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
Parafilm	Parafilm M	Pechiney, Chicago, USA
Petrischalen	100x 15 mm	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipettenspitzen	10 μ l / 200 μ l / 1000 μ l	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Probenröhrchen für Durchflusszytometrie	12 x 75 mm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße	PCR, 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten	5 ml / 10 ml / 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritzen	Luer-Lok, 5 ml / 10 ml	BD, Franklin Lakes, USA
Vakuumfilter	0,22 μ m / 500 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturplatten	6 Loch / 24 Loch	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

		BD, Franklin Lakes, USA
Zellkulturschalen	100 x 20 mm	BD, Franklin Lakes, USA
Zentrifugenröhrchen	15 ml / 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2.3: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie / Reagenz	Hersteller / Lieferant
5x Green Loading GoTaq Puffer	Promega, Madison, USA
7H9 (Kultivierung von Mykobakterien)	BD, Franklin Lakes, USA
7H11 (Kultivierung von Mykobakterien auf Platten)	BD, Franklin Lakes, USA
Agarose	Bio & Sell, Feucht, Deutschland
Antibiotika	s. Tabelle 2.4
Antikörper	s. Tabelle 2.12
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Fluka Analytics/ Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dikaliumhydrogenphosphat (K₂HPO₄)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
D-Sorbitol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Einbett-Medium (Pro Long Gold Antifade)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Ethanol (100%)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Fluka Analytics / Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fetales Kälberserum (FKS)	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB
Glyzerol	BD, Franklin Lakes, USA
Glutaraldehyd (GA)	Electron Microscopy Sciences (EMS), Hatfield, USA
HL5-C mit Glukose	Formedium, Hunstanton, USA
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

LB-Agar (Kultivierung von <i>E.coli</i> auf Platten)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium (Kultivierung von <i>E.coli</i>)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin (100x)	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB
Natriumazid (NaN_3)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH , 50%)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB
OADC (Kultivierung von Mykobakterien)	BD, Franklin Lakes, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Paraformaldehyd für EM	Electron Microscopy Sciences (EMS), Hatfield, USA
Phalloidin (Alexa Fluor 488, 568, und 647)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Propidiumiodid	Fluka Analytics / Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.4 Antibiotika

Folgende Antibiotika wurden für die Selektion von transformierten oder transfizierten Organismen und *Knockout*-Zelllinien verwendet.

Tabelle 2.4: Antibiotika

Antibiotikum	Stock-Konzentration	Anwendung
Ampicillin Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	100 mg/ml	Selektion von <i>E.coli</i> (100 µg/ml)
Blasticidin InviviGen, San Diego, USA	10 mg/ml	Selektion von <i>Dictyostelium</i> <i>Knockout</i> -Zelllinien (5 µg/ml)
Gentamycin (G418) Formedium, Hunstanton, USA	10 mg/ml	Selektion von Überexpressionen in <i>Dictyostelium</i> (pDM304 als Grundlage) (5 µg/ml)

Hygromycin InvivoGen, San Diego, USA	50 mg/ml	Selektion von Überexpressionen in <i>Dictyostelium</i> , Selektion von <i>M. marinum</i> mcherry und <i>M. marinum</i> Δ RD1 GFP (50 μ g/ml)
Kanamycin Formedium, Hunstanton, USA	50 mg/ml	Selektion von <i>M. marinum</i> GFP (50 μ g/ml)
Penicillin-Streptomycin-Lösung (100x) Life Technologies, Carlsbad, USA	1x: 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin	Zugabe zu <i>Dictyostelium</i> - Kulturmedium

2.1.5 Kits

Tabelle 2.5: Kits

Kit-Name	Hersteller	Anwendung
NucleoBond PC100	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland	Isolierung von Plasmid-DNA in großen Mengen (Midi- Prep)
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland	Isolierung von Plasmid-DNA in kleinen Mengen (Mini- Prep)
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen und Entfernung von Rückständen der PCR
T4 DNA-Ligase	NEB, Frankfurt, Deutschland	Ligation von DNA- Fragmenten

2.1.6 Software

Tabelle 2.6: Software

Software	Anwendung
Prism, v5.0b GraphPad, La Jolla, USA	Auswertung und Darstellung aller Quantifizierungen
Exel, 2011 Microsoft, Redmond, USA	Auswertung von FACS-Experimenten
FlowJo, v7.6.3 Tree Star, Ashland, USA	Auswertung und Darstellung von FACS-Experimenten
ImageJ, v1.48 National Institutes of Health, USA	Bildbearbeitung
Fluo View, v1.7b Olympus, Hamburg, Deutschland	Bildaufnahmen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Punktscanner)
Xcellence rt 1.2 Olympus, Hamburg, Deutschland	Bildaufnahme und Bildbearbeitung am Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop
Zen 2009 Zeiss, Oberkochen, Deutschland	Bildaufnahmen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Linienscanner)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologie

2.2.1.1 Organismen und Kultivierung

Alle Puffer, Medien und Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser angesetzt. Hitzestabile Lösungen wurden für 15 min bei 121 °C autoklaviert und hitzeempfindliche Lösungen mit einem 0,22 µm Filter sterilisiert. Fetales Kälberserum wurde vor Verwendung für 30 min auf 56 °C erhitzt, um Komplementfaktoren zu inaktivieren.

2.2.1.1.1 *Dictyostelium discoideum*

Der in dieser Arbeit verwendete wildtypische *D. discoideum* Stamm Ax2 wurde erstmals 1970 beschrieben²¹⁴. Mindestens drei Mutationen befähigen diese Zellen zum axenischen Wachstum^{215,216} und bieten somit den Vorteil der Verwendung eines definierten Mediums und einfacher, sowie vergleichbarer Handhabung. Die Zellen wurden wie in Tabelle 2.7 dargestellt von dictybase¹⁰⁸ bezogen, von Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt oder selbstständig genetisch verändert.

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

Tabelle 2.7: *D. discoideum*: Wildtypische und Überexpressions- Zelllinien mit entsprechender Resistenz

Zelllinie	Resistenzmarker
Ax2	-
Ax2 GFP-atg18	H
Ax2 GFP-2xFYVE	G
Ax2 GFP-SQSTM1	H
Ax2 GFP	G
Ax2 GFP-vps32	G
Ax2 vps4-GFP	G
Ax2 alix-GFP	G
Ax2 Lifeact-RFP	G
Ax2 Lifeact-RFP GFP-atg8	G
Ax2 ABD-GFP	G

G = Gentamycin, H = Hygromycin

Tabelle 2.8: *D. discoideum*: Knockout-Zelllinien

Zelllinie	Merkmale	Bezugsquelle / Referenz
Ax2 ΔracH	Deletionsmutante der GTPase RacH, keine Formation von Ejektosomen (Negativkontrolle)	Francisco Rivero , Hull York Medical School, UK
Ax2 Δatg1	Autophagie-Deletionsmutante (Deletion des Autophagie-Initiationskomplexes)	King et al. (2013) ²¹⁷ dictyBase ID: DBS0350450
Ax2 ΔSQSTM1	Autophagie-Deletionsmutante	Thierry Soldati, Universität Genf,

	(Deletion des Adaptermoleküls SQSTM1)	Schweiz
DH1 Δatg5	Autophagie-Deletionsmutante (Deletion eines Bestandteils der <i>ubiquitin-like conjugation machinery</i>)	Otto <i>et al.</i> (2003) ²¹⁸ dictyBase ID: DBS0236371
DH1 Δatg6	Autophagie-Deletionsmutante (Deletion des Phosphatidyl 3-Kinase Komplexes)	Otto <i>et al.</i> (2003) ²¹⁸ dictyBase ID: DBS0236344
DH1 Δatg7	Autophagie-Deletionsmutante (Deletion eines Bestandteils der <i>ubiquitin-like conjugation machinery</i>)	Otto <i>et al.</i> (2003) ²¹⁹ dictyBase ID: DBS0236372
JH10 Δalix	ESCRT-Deletionsmutante (Deletion des Adaptermoleküls Alix)	Mattei <i>et al.</i> (2005) ²²⁰ dictyBase ID: DBS0235475
Ax3 Δ tsg101	ESCRT-Deletionsmutante (Deletion des ESCRT-I-Faktors Tsg101)	Mattei <i>et al.</i> (2006) ²²⁰ dictyBase ID: DBS0237022
Ax2 Δtsg101	ESCRT-Deletionsmutante (Deletion des ESCRT-I-Faktors Tsg101)	Zur Verfügung gestellt von T. Soldati (nicht publiziert)
Ax2 Δtsg101 Δatg1	ESCRT- und Autophagie-Deletionsmutante	Zur Verfügung gestellt von T. Soldati (nicht publiziert)

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 10 ml HL5-C Medium in 10 cm-Kulturschalen unter sterilen Bedingungen und einem Temperaturoptimum von 22°C. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen verdünnt. Die Zellen wurden abgelöst und in frischem HL5-C Medium aufgenommen, welches abhängig von der Zelllinie durch ein Selektionsantibiotikum ergänzt wurde.

Transfektion von *D. discoideum*

Die Transfektion von *D. discoideum* erfolgte mit Hilfe von Elektroporation. Aufgrund des kurzfristigen elektrischen Impulses wird die Membran von *D. discoideum* permeabel und Plasmid-DNA kann in die Zelle gelangen. Ein Gen von Interesse wurde dazu in einen episomalen Expressionsvektor²²¹ für *D. discoideum* kloniert und für die Transfektion von Salzen befreit. Zunächst wurden 10-15 µg Plasmid-DNA mit Hilfe von 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 5,2) und dem 2,5 fachen Volumen 100 % Ethanol präzipitiert. Die Lösung wurde für 15 min bei 14000 rpm abzentrifugiert und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur Transfektion auf Eis

aufbewahrt. Eine 80 - 90 % konfluent bewachsene Platte (etwa 4×10^7 Zellen) wildtypischer Ax2 Zellen wurde abgelöst und in 1 ml Elektroporations (EP)-Puffer aufgenommen. Die Zellsuspension wurde für 3 sec bei 6000 rpm zentrifugiert. Zwei weitere Waschschriffe mit EP-Puffer erfolgten bis das Pellet in 100 μ l aufgenommen und zu der getrockneten DNA auf Eis gegeben wurde. Nach Durchmischung wurde die Suspension in ein vorgekühlte Kuvette (BTX, 2mm) pipettiert und die Elektroporation bei 250 V, 5 Pulse mit einer Pulslänge von 2 ms und einem Pulsintervall von 1 sec durchgeführt. Die Zellen wurden für 5 min auf Eis inkubiert und auf zwei Zellkulturplatten verteilt. Nach einer Regeneration von 22-24 h erfolgte die Selektion der transfizierten Zellen mit Hilfe eines Antibiotikums (Tabelle 2.4).

Elektroporations (EP)-Puffer	10 mM K_2HPO_4 / KH_2PO_4 , pH 6.2,
200 ml	50 mM Sukrose
	autoklavieren

Kryopräservierung von *D. discoideum*

Für die Langzeitlagerung von *D. discoideum* wurden Zellstabilate angefertigt und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Zellen einer 100% konfluenten Zellkulturplatte (etwa 5×10^7 Zellen) wurden abgelöst, in 10 ml frischem HL5-C Medium aufgenommen, abzentrifugiert und das Pellet in Einfrierlösung aufgenommen. Die Zugabe von DMSO verhindert die Bildung von Eiskristallen. Jeweils 1 ml wurde in Einfriergefäße aliquotiert und über Nacht mit einer gleichmäßigen Rate von 1 °C/min bei -80°C eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die Stabilate in flüssigen Stickstoff zur dauerhaften Aufbewahrung transferiert.

Einfrierlösung	10% DMSO in HL5-C
-----------------------	-------------------

2.2.1.1.2 Mykobakterien

Der in dieser Arbeit verwendete wildtypische „M-Stamm“ von *M. marinum*, sowie der davon abgeleitete *M. marinum* Δ RD1 stammen aus dem Labor von Lalita Ramakrishnan (Universität Washington, USA). Der M-Stamm ist ein klinisches Isolat aus einer Hautläsion eines Patienten²²², das 1992 isoliert und im biologischen Ressourcenzentrum ATTC unter der Nummer BAA-535 hinterlegt wurde. Der Stamm *M. marinum* Δ RD1 weist eine Deletion des

RD1 (*region of difference 1*)-Lokus auf. In dieser Region werden neun Gene codiert, die für die Virulenz von Mykobakterien von essentieller Bedeutung sind²²³. Mittels homologer Rekombination wurde der RD1-Lokus durch eine Kanamycin-Resistenzkassette ausgetauscht⁹⁵.

Alle Mykobakterien-Stämme wurden unter sterilen Bedingungen in 7H9-Medium in einem Glaskolben bei 32 °C und 120 rpm schüttelnd kultiviert. Um ein Verklumpen der Bakterien zu vermeiden, wurden 0,05 % Tween 80 und Glaskugeln mit einem Durchmesser von 4 mm der Kultur hinzugefügt. Durch die Transformation des Wildtyps mit einem extrachromosomalen Plasmid konnten fluoreszente Stämme generiert werden und abhängig vom jeweiligen Plasmid erfolgte die Selektion der transformierten Mykobakterien über ein Antibiotika-Resistenzgen (Tabelle 2.9).

Medium für Mykobakterien-Flüssigkultur (7H9)	4,7 g 7H9-Pulver
<i>M. marinum</i> , <i>M. smegmatis</i>	2ml Glycerol
	900 ml ddH ₂ O
	autoklavieren
	100 ml OADC
	0,5 ml Tween 80
	steril filtrieren, bei 4°C lagern
Medium für Kultivierung von Mykobakterien auf Platte (7H11)	21 g 7H11-Pulver
	5 ml Glycerol
	900 ml ddH ₂ O
	autoklavieren, auf 50-55 °C abkühlen
	lassen
	100 ml OADC
	handwarm in Petrischalen gießen, bei 4°C lagern

Tabelle 2.9: *M. marinum*

Stamm	Expressionsvektor	Resistenz	Bezugsquelle / Referenz
<i>M. marinum</i> M-Stamm	-	-	L. Ramakrishnan (ATTC, BAA-535)

<i>M. marinum</i> mCherry M-Stamm	pCHERRY10 (addgene: 24664)	H	selbst transformiert
<i>M. marinum</i> GFP M-Stamm	pMSP12::GFP (Chan et al., 2002)	K	Volkman <i>et al.</i> , 2004 ⁹⁵
<i>M. marinum</i> ΔRD1 M-Stamm	-	-	Volkman <i>et al.</i> , 2004 ⁹⁵
<i>M. marinum</i> ΔRD1 mcherry M-Stamm	pCHERRY10 (addgene: 24664)	H	selbst transformiert
<i>M. marinum</i> ΔRD1 GFP M-Stamm	pHyg-GFP	H	in der AG Hagedorn transformiert

H = Hygromycin, K= Kanamycin

Der Stamm *Mykobakterium smegmatis* mc(2)155 wurde aus dem menschlichen Smegma isoliert und ist unter der Katalognummer 700084 bei ATCC zu finden. Die Kultivierungsbedingungen von *M. smegmatis* und *M. marinum* sind identisch. In dieser Arbeit wurde *M. smegmatis* mc(2)155 mit pCherry10 (addgene: 24664) transformiert und über Hygromycin selektiert.

Tabelle 2.10: *M. smegmatis*

Stamm	Expressionsvektor	Resistenz	Bezugsquelle / Referenz
<i>M. smegmatis</i> mc(2)155	-	-	Norbert Reiling, Forschungszentrum Borstel, Deutschland
<i>M. smegmatis</i> mCherry mc(2)155	pCHERRY10 (addgene: 24664)	H	selbst hergestellt

H = Hygromycin

Transformation von Mykobakterien

Die Transformation von Mykobakterien erfolgte mit Hilfe von Elektroporation. Durch den elektronischen Impuls wird die Membran der Bakterien vorübergehend permeabilisiert und DNA kann in die Zelle eindringen. Die nötige Elektrokompetenz der Bakterien wurde durch

das Entfernen sämtlicher Salze der Mykobakterien-Kultur erreicht. Dafür wurde eine frische Mykobakterien-Kultur aufgetaut und in 7H9c Medium bei 32 °C zu einer optischen Dichte von 3 – 6 kultiviert. Vier frische 100 ml Kulturen wurden mit jeweils 1 ml der Vorkultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,65 - 0,85 wachsen gelassen. Die Kulturen wurden abzentrifugiert (3000 x g, 15 min, 4 °C) und das Pellet in jeweils 50 ml 10 % Glycerol aufgenommen. In den folgenden Waschschrritten wurde das Volumen des 10 % igen Glycerols graduell verringert, so dass zuletzt vier Pellets in jeweils 1 ml 10 % Glycerol aufgenommen, zentrifugiert (3000 x g, 2 min, 4 °C) und in zweifachem Volumen des Pellets in 10 % Glycerol gelöst werden konnten. 50 µl Aliquots wurden bei -80°C gelagert.

Für die Transformation von Mykobakterien wurde ein elektrokompetentes Aliquot auf Eis aufgetaut und in 500 µl 10 % Glycerol aufgenommen und abzentrifugiert (1200 rpm, 2 min). Das Pellet wurde in 100 µl 10 % Glycerol resuspendiert und auf Eis gelagert. 100 – 200 µl DNA wurde zu den Mykobakterien gegeben, vermischt, in eine 1 mm Küvette gegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV, 25 µF und 800 Ω. Direkt nach dem Puls wurden 900 µl 7H9 zu den Zellen hinzugegeben und die Küvette mit den Bakterien über Nacht bei 32 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden zwei unterschiedliche Mengen von Bakterien (20 µl und 200 µl) auf 7H11 Platten ausplattiert und 5 bis 7 Tage bei 32 °C kultiviert.

Kryopräservierung von Mykobakterien

Für die Langzeitlagerung aller Mykobakterien-Stämme wurden jeweils 100 ml Kultur beimpft und bis zur stationären Wachstumsphase ($OD_{600} = 3$) kultiviert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (3000 x g, 20 min, 4 °C) und das Pellet in 7H9 mit 50 % Glycerin aufgenommen. Aliquots von jeweils 1 ml wurden auf Kryoröhrchen verteilt und bei -80 °C gelagert. Von den häufig für die Infektion benötigten fluoreszierenden Mykobakterien-Stämmen wurden Aliquots aus einer 100 ml Kultur ($OD_{600} = 1$) hergestellt. dafür wurde die Zellsuspension abzentrifugiert (3000 x g, 20 min, 4 °C), das Pellet in 7H9 mit 50 % Glycerin aufgenommen und jeweils 1 ml Aliquots bei -80°C gelagert.

2.2.1.1.3 *Escherichia coli*

Die Bakterien wurden in LB (Luria-Bertani)-Medium kultiviert. Transformierte Bakterienkulturen konnten aufgrund des in pJet- oder pDM-Plasmiden kodierten Resistenzgens mit Ampicillin (AMP; 100 µg/ml) selektiert werden.

Medium für <i>E.coli</i>-Flüssigkultur (LB-Medium)	20 g LB-Medium-Pulver 1 l ddH ₂ O autoklavieren
Medium für <i>E.coli</i>-Kultur auf Platte (LB-Agar)	35 g LB-Agar-Pulver 1 l ddH ₂ O autoklavieren, abkühlen lassen auf 60 °C, in Petrischalen gießen, bei 4 °C lagern

Transformation von *E.coli*

Chemisch kompetente Zellen werden aufgrund einer Behandlung mit Calciumchlorid befähigt Plasmid-DNA aufzunehmen. Für die Durchführung wurden *E. coli* XL10 Gold-Bakterien auf Eis aufgetaut, 1-5 µg Plasmid-DNA zu den Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock (1 min, 42 °C) erfolgte eine erneute Inkubation von 3 min auf Eis. Zur Stabilisierung der Zellen wurde 900 µl LB-Medium zu den Zellen gegeben und der Ansatz schüttelnd für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (4000 rpm, 5 min) und das Pellet im restlichen Überstand aufgenommen. Die Suspension wurde auf LB_{AMP}-Platten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.2.1.2 Infektion von *D. discoideum*

Die zu infizierenden *D. discoideum* Zellen wurden etwa 15 Stunden vor Infektion mit einer Konfluenz von 30 - 60 % (ungefähr $2,5 \times 10^7$ Zellen) in Medium ohne Antibiotikum in einer 10 cm Kulturschale ausgesät. Die Infektion erfolgte mit einer frischen Über-Nacht-Mykobakterienkultur. Um die Bakterien zu vereinzeln wurde die Kultur durch einen 50 µm Filter pipettiert und durch eine Kanüle (25 G x ¾) gefiltert. Anhand der optischen Dichte bei 600 nm konnte auf die koloniebildenden Einheiten (KBE) pro Volumen und somit auf die

Zellzahl/ml geschlossen werden. Zum Zeitpunkt der Infektion sollte die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,8 – 1,5 (Tabelle 2.11) aufweisen.

Tabelle 2.11: OD₆₀₀ – KBE von *M. marinum*

OD _{600nm}	KBE
0,8	1,2 x 10 ⁸
0,9	1,7 x 10 ⁸
1,0	2,0 x 10 ⁸
1,1	2,5 x 10 ⁸
1,2	4,0 x 10 ⁸
1,3	6,0 x 10 ⁸
1,4	9,0 x 10 ⁸
1,5	1,3 x 10 ⁹

Eine 100 % konfluente *Dictyostelium*-Zellkulturschale weist eine Zellzahl von etwa 5 x 10⁷ pro Platte auf. Für eine Infektion wurde eine *multiplicity of infection* (MOI) von mindestens 100 Bakterien pro Zelle gewählt. 5 x 10⁹ Mykobakterien wurden dafür zentrifugiert (2000 x g, 3 min), das Mykobakterienpellet in 10 ml HL5-C-Medium aufgenommen und die Suspension auf die adhärennten *Dictyostelium*-Zellen gegeben. Mit Hilfe von drei Zentrifugationsschritten konnte eine Synchronisation der Aufnahme von Bakterien durch *Dictyostelium*-Zellen erfolgen. Als Startpunkt der Infektion, 0 hpi (*hours post infection*), wurde der Beginn der Zentrifugation festgelegt. Zwischen den einzelnen Zentrifugationsschritten wurde die Zellkulturschale immer um 45° gedreht, um eine gleichmäßige Verteilung der Bakterien zu gewährleisten. Anschließend wurde die Schale für 30 min bei 25 °C inkubiert, wodurch die weitere Phagozytose ermöglicht werden sollte. Um extrazelluläre Bakterien zu entfernen, wurde die Kulturplatte mindestens sechsmal mit jeweils 10 ml HL5-C gewaschen und am Mikroskop (20 x Vergrößerung) kontrolliert. Die Zellen wurden in HL5-C aufgenommen, eine vom Zeitpunkt der Probenentnahme abhängige Menge in eine neue Zellkulturschale ausplattiert und mit Medium aufgefüllt. Dem Medium wurden 5 µg/ml Penicillin/Streptomycin hinzugefügt, um die extrazelluläre Proliferation der Bakterien zu unterbinden. Eine halbe Stunde vor Probenentnahme wurden die Platten erneut gewaschen, um extrazelluläre Bakterien zu entfernen. Das Medium wurde abgenommen, die Zellen

abgelöst und in 12 ml Medium aufgenommen. Für eine Fixierung mit anschließender Immunfluoreszenz-Analyse wurden in eine 24-Loch-Platte Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser vorgelegt und eine Zellzahl von etwa 1×10^6 Zellen pro Vertiefung der Platte ausgesät.

2.2.1.2.1 Co-Infektions-Analysen

Um zu testen, ob der zu untersuchende Ejektionsprozess ein auf pathogene Mykobakterien beschränkter Mechanismus ist, wurde eine Co-Infektion von *M. marinum* mit dem nicht-pathogenen *M. smegmatis* oder dem avirulenten *M. marinum* Δ RD1 durchgeführt. Dazu wurden *Dictyostelium*-Zellen, die *actin binding domain* (ABD)-GFP überexprimieren, simultan mit rot fluoreszierenden *M. smegmatis* respektive *M. marinum* Δ RD1 und grün fluoreszierenden *M. marinum* infiziert. Die Bakterien wurden getrennt voneinander kultiviert und zum Infektionszeitpunkt vermischt. Es wurde eine MOI von 100 für die pathogenen *M. marinum* gewählt und eine MOI von 30 für die nicht-pathogenen bzw. avirulenten Bakterien. Die Infektion bzw. Phagozytose und Waschschriffe wurden wie in Punkt 2.2.1.2 beschrieben durchgeführt. Nach 24 hpi wurden die Zellen fixiert und für die Immunfluoreszenz vorbereitet.

2.2.1.3 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse

2.2.1.3.1 Fixierung infizierter Zellen

24 Stunden nach Infektion wurden die Proben mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) in Sörensen-Puffer fixiert. Dazu wurde das Medium von den bewachsenen Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern abgenommen und durch Fixierlösung ersetzt. Die Platten wurden für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend die Lösung abgenommen und die Deckgläser mit 1 ml 1x PBS überschichtet. Bis zur Verwendung in der Immunfluoreszenz wurden die Platten bei 4 °C gelagert.

Sörensen-Puffer	99,86 g KH_2PO_4
50x	13,61 g Na_2HPO_4
	in 800 ml ddH ₂ O lösen, mit NaOH pH 6 einstellen, mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen, autoklavieren

Fixierlösung	8 g Paraformaldehyd
200 ml	200 ml Sörensen-Puffer bei max. 60 °C lösen, aliquotieren, bei -20 °C lagern
10x PBS-Lösung (<i>Phosphate-Buffered-Saline</i>)	100 mM Na ₂ HPO ₄
1l	100 mM NaH ₂ PO ₄ 1,5 M NaCl in 800 ml ddH ₂ O lösen, mit NaOH auf pH 7,4 einstellen, auf 1 l mit ddH ₂ O auffüllen

2.2.1.3.2 Verwendete Antikörper, Phalloidin und DAPI

Tabelle 2.12: primäre Antikörper

primärer Antikörper	Spezies / Klonalität	Verdünnung	Hersteller
α-atg8	Kaninchen / monoklonal	1:1000	Jason King, Universität Sheffield, UK
α -GFP	Kaninchen / polyklonal	1:1000	MBL, Woburn, USA
α -RFP (5F8)	Ratte / monoklonal	1:1000	Chromotek GmbH, Planegg-Martinsried, Deutschland
α -ubiquitinierte Konjugate (FK2)	Maus / monoklonal	1:500	Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland

Tabelle 2.13: sekundäre Antikörper, Phalloidin und DAPI

sekundäre Antikörper*	Spezies	Verdünnung
α -Maus Alexa Fluor 488	Ziege	1:1000
α -Maus Alexa Fluor 568	Ziege	1:1000
α -Maus Alexa Fluor 647	Huhn	1:500

α -Kaninchen Alexa Fluor 488	Ziege	1:1000
α -Kaninchen Alexa Fluor 568	Ziege	1:1000
α -Kaninchen Alexa Fluor 647	Huhn	1:500
Phalloidin Alexa Fluor 568		1:300
Phalloidin Alexa Fluor 647		1:300
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)		1:100

* Alle sekundären Antikörper und Phalloidin wurden von Life Technologies, Carlsbad, USA bezogen.

2.2.1.3.3 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung der fixierten Zellen wurde in einer lichtundurchlässigen Färbekammer durchgeführt. Für alle Inkubationsschritte wurden die Deckgläser mit der Zellseite auf einen 30 μ l Tropfen gelegt. Um die Stringenz der Antikörper zu erhöhen, erfolgte zunächst die Absättigung freier Bindungsstellen mithilfe des in der Blockierlösung enthaltenen fetalen Kälberserums. Danach wurden die Deckgläser jeweils 1 Stunde mit dem primären und sekundären Antikörper inkubiert (Verdünnungen siehe Tabelle 2.13). Zwischen beiden Inkubationsschritten wurden die Deckgläser in 1x PBS getaucht, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Um eine Färbung von Aktin und/oder des Zellkerns durchzuführen, wurde zusätzlich Phalloidin und/oder DAPI zu der Lösung des sekundären Antikörpers gegeben und auf die gleiche Weise inkubiert. Zuletzt wurde überschüssige Färbelösung durch das Eintunken in 1x PBS entfernt und das Deckglas in einen Tropfen Einbettmedium mit der zellbewachsenen Seite nach unten auf einem Objektträger gelegt. Das Präparat wurde über Nacht bei 22 °C getrocknet bevor es am Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden konnte.

Blockierlösung für Immunfluoreszenz	0,5 % fetales Kälberserum
50 ml	0,01 % TritonX-100
	50 ml 1x PBS

2.2.1.3.4 Fluoreszenzmikroskopie

Weitfeldmikroskopie

Die Weitfeldmikroskopie ist eine Methode bei der eine Lichtquelle eingesetzt wird, die Licht unterschiedlicher Wellenlängen des gesamten Spektrums erzeugt. Mit Hilfe spezifischer Filtersätze kann Licht einer bestimmten Wellenlänge generiert werden, welches spezifisch für die Anregung eines bestimmten Fluorophors ist. Außerdem wird das gesamte Sichtfeld der Probe beleuchtet und somit liegen Bildinformationen über einen großen Sichtbereich innerhalb kürzester Zeit vor. Besonders bei der Bestimmung von Proteinsignalen transfizierter *Dictyostelium*-Zellen und Langzeitaufnahmen unterschiedlicher Positionen wurde das Weitfeld-Mikroskop verwendet. Das in dieser Arbeit verwendete *cellR Imaging System* besteht aus dem Inversmikroskop Olympus IX81, einem Olympus 100 x 1,4 UPlanSApo Ölimmersionsobjektiv, zwei Filtersätzen (Tabelle 2.14) und einem MT20-I-Fluoreszenzbeleuchtungssystem mit einem Xenonbrenner.

Tabelle 2.14: Filtersätze des Olympus Weitfeldmikroskops

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

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

Konfokale Mikroskopie fixierter Proben

In der konfokalen Mikroskopie wird Punkt für Punkt bzw. Zeile für Zeile einer Probe gescannt, um ein Bild zu erstellen. Mit Hilfe einer Lochblende im Strahlengang des Mikroskops werden nur Informationen einer Fokusebene detektiert. Die Informationen der Pixel werden zu einem Bild mit hohem Kontrast und hoher Auflösung in x-, y- und z-Ebene zusammengesetzt. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten konfokalen Mikroskop von Olympus handelte es sich um das Inversmikroskop Olympus IX81 mit der Software FluoView. Bilder wurden mit dem Olympus 60x Plan-Apochromat 1.35 oder dem Olympus 100 x

UPlanSApo 1,4 Ölimmersionsobjektiv aufgenommen und die Fluorophore durch unterschiedliche Laser angeregt (Tabelle 2.15).

Tabelle 2.15: Laserlinien des konfokalen Mikroskops von Olympus

Laserlinien*	angeregte Fluorophore
405 nm Diode	DAPI
488 nm Argon	GFP, Alexa Fluor 488, DIC (<i>Differential Interference Contrast</i>)
559 nm Diode	mCherry, Alexa Fluor 568
635 nm Diode	Alexa Fluor 647

* Hersteller: Olympus, Hamburg, Deutschland

Die Laserintensität wurde möglichst gering gehalten und an die jeweilige Probe angepasst. Mit Hilfe eines Photovervielfachers kann das emittierte Licht detektiert werden. Die Beschleunigungsspannung wurde dazu auf 600-900 mV eingestellt und die elektronische Nachverstärkung des Signals (*gain*) und die Kontrastverstärkung (*offset*) auf Null gesetzt. Die Bilder wurden mit einer Auflösung von 1024 x 1024 dpi (*dots per inch*), einem elektronischen Zoom von 6-12 x, einer Verweilzeit von 5-8 μ s pro Pixel und dreifachem Mittel (3 x Kalman) aufgenommen. Alle Einstellungen wurden über die Software FluoView 1.7b vorgenommen.

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe von konfokaler Mikroskopie Lokalisationsexperimente von fluoreszenzmarkierten Proteinen in der Zelle durchgeführt. Dazu wurde das Aktinzytoskelett mit Phalloidin angefärbt, um die Ejektosom-Struktur sichtbar zu machen, und um mögliche Assoziationen an dieser Struktur zu untersuchen. Aufgrund des besseren Signal/Rausch-Verhältnisses im Vergleich zur Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie wurden alle in dieser Arbeit vorliegenden Fluoreszenzbilder in Kapitel 3 (mit Ausnahme der Bilder der Lebendzell-Mikroskopie) mit dieser Methode aufgenommen.

Bildbearbeitung und –auswertung

Aufgenommene Bilder wurden als oif (*original imaging format*) - Dateien gespeichert und exportiert. Das Bildbearbeitungsprogramm *ImageJ* ermöglichte ein Zuschneiden, die Zuweisung von Farben, die Überlagerung von Kanälen, sowie die Anpassung von Helligkeit und Kontrasten.

Quantifizierungs-Experimente

Die Anzahl von Ejektosomen und Lokalisation bestimmter Markerproteine an der Ejektosom-Struktur oder der Region von Interesse wurde mit Hilfe des konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskops analysiert. Dafür wurden mindestens drei technisch und biologisch unabhängige Experimente (n=3) pro Zeitpunkt durchgeführt. Um die Anzahl der Ejektosomen zu einem bestimmten Zeitpunkt zu ermitteln, wurden mindestens 200 infizierte Zellen auf die Bildung der Struktur untersucht. Für die Quantifizierung einer möglichen Akkumulation von Proteinen am Ejektosom wurden 5 bis 15 Ejektosomen pro Experiment auf eine deutliche Anreicherung analysiert.

Statistik

Die Erstellung eines Graphs und die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms Prism. Bei allen dargestellten Werten handelt es sich um Durchschnittswerte einschließlich eines Standardfehlers (SEM = *standard error of the mean*). Um die statistische Signifikanz der gemessenen Werte zu berechnen, wurden abhängig vom Experiment ein ungepaarter t-Test oder ein ANOVA-Test mit folgenden Kriterien durchgeführt: $p > 0,05$ (n.s. = nicht signifikant), $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), und $p \leq 0,001$ (***)).

2.2.1.4 Lebendzellmikroskopie

Die Lebendzellmikroskopie wurde mit Hilfe des konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskops (LSM) von Zeiss durchgeführt. Das LSM von Zeiss ist ein Linienscanner und bietet den Vorteil besonders schnelle Zellprozesse mit hoher Auflösung konfokal verfolgen zu können. Bilder wurden mit dem Zeiss 63x Plan-Apochromat 1.4 oder dem Zeiss 100x Plan-Apochromat 1.4 Ölimmersionsobjektiv aufgenommen und unterschiedliche Laser für die Anregung der Fluorophore verwendet (Tabelle 2.16).

Tabelle 2.16: Laserlinien des konfokalen Mikroskops von Zeiss

Laserlinien*	angeregte Fluorophore
488 nm Diode	GFP, Alexa Fluor 488
595 nm DPSS	mCherry, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594

*Hersteller: Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Grün fluoreszierende *Dictyostelium*-Zellen wurden mit mCherry exprimierenden Mykobakterien infiziert und nach 22 hpi für die Mikroskopie vorbereitet. Aufgrund einer geringeren Autofluoreszenz wurde sterilfiltriertes HL5-C Medium verwendet.

2.2.1.5 Korrelative Mikroskopie

Die Kombination von Licht- und Elektronenmikroskopie ermöglichte eine Analyse der Ultrastruktur von Ejektosomen. Dazu wurden infizierte Zellen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht und die Position in einem Orientierungsraaster (Grid) markiert. Unterschiedliche Vergrößerungsaufnahmen der jeweiligen Zelle ermöglichten es dieselbe Zelle in elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu identifizieren und die Bilder zu korrelieren.

*Actin-binding domain (ABD)*²²⁴-GFP *Dictyostelium*-Zellen wurden dazu wie beschrieben mit *M. marinum* mCherry infiziert (2.2.1.2). Nach 22 hpi wurden die Zellen in sterile „35 mm μ -dish“ mit vorgezeichneten Raster (Ibidi) pipettiert und nach 24 Std mit 2 % PFA und 0,25 % Glutaraldehyd (GA) in HL5-C Medium fixiert. Nach 1 Stunde Inkubation wurden die Zellen gewaschen und für 30 min mit Phalloidin Alexa Fluor 488 gefärbt. Lokalisation und Dokumentation der Fluoreszenzaufnahmen der Ejektosom-Struktur wurden mit dem konfokalen Mikroskop Olympus IX81 durchgeführt (2.2.1.3). Die Zellen wurden mit 2,5 % GA in 1x PBS über Nacht fixiert und nach 2-maligem Waschen in 1x PBS mit 1 % OsO₄ (in 1x PBS) für 30 min inkubiert. Erneut wurde die Probe gewaschen und für weitere 30 min mit 1 % Gallussäure (in 0,5x PBS) inkubiert. Mit Hilfe einer Ethanolreihe erfolgte die Dehydratisierung der Probe. Anschließend wurde diese in 50 % Epoxidharz in 100 % Ethanol über Nacht eingedeckt und am nächsten Tag in 100 % Epoxidharz für 6 Std bei 60°C polymerisiert. Konsekutive Ultradünnschnitte wurden mit dem Leica EM UC7 Mikrotom hergestellt und die Probenaufnahme erfolgte mit dem Tecnai Spirit Transmissionselektronenmikroskop (FEI) bei 80 kV. Die Überlagerung aller TEM-Aufnahmen der seriellen Dünnschnitte wurde zu einer dreidimensionalen Rekonstruktion des zellulären Volumens mit Hilfe der Programme *ImageJ* und *Imaris* zusammengesetzt. Die Probenpräparation für die elektronenmikroskopische Analyse wurde von der EM-Abteilung des Bernhard-Nocht-Instituts durchgeführt.

2.2.1.6 Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie basiert auf der Detektion der Emission optischer Signale, die entsteht, wenn eine Zelle einen Laserstrahl passiert. Sowohl Streulicht als auch Fluoreszenz kann mit Hilfe dieser Methode gemessen werden. Das Seitwärtsstreulicht SSC (*side scatter*) ist ein Maß für die Granularität und das Vorwärtsstreulicht FSC (*forward scatter*) für das Volumen von Zellen. Mit Hilfe durchflusszytometrischer Analysen war es möglich den Infektionsverlauf von mit *M. marinum* GFP in *Dictyostelium*-Zellen verfolgen zu können. Dazu wurde die grüne Fluoreszenz der transformierten Bakterien herangezogen, die es ermöglichte die infizierten *Dictyostelium*-Zellen von den nicht-infizierten zu unterscheiden. Mit Hilfe des Vorwärtsstreulichts können kleinere von größeren Partikeln unterschieden werden. Die unterschiedliche Größe und Granularität von Mykobakterien (2-6 μm) und *Dictyostelium* (10 μm) sowie die Fluoreszenz ermöglichen die Trennung distinkter Populationen im Durchflusszytometer. Mit Hilfe der Quantifizierung der jeweiligen Eigenschaften kann der Infektionsverlauf interpretiert werden (Abb. 2.1). Nicht nur die Infektionsrate konnte mit dieser Methode bestimmt werden, sondern auch die Bakterienlast/Zelle und die Anzahl extrazellulärer Bakterien.

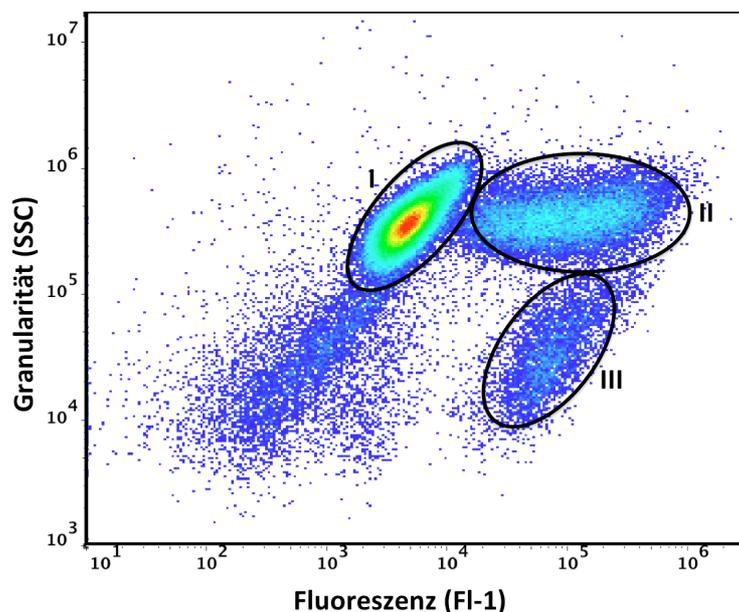


Abb. 2.1: Punktwolkendarstellung der Durchflusszytometrie

Auf der X-Achse wurde grüne Fluoreszenz (FI-1) gegen Granularität (SSC) auf der y-Achse aufgetragen. Population I: *Dictyostelium*-Zellen, Population II: infizierte *Dictyostelium*-Zellen, Population III: extrazelluläre Bakterien

2.2.1.7 Permeabilitätstest mit Propidiumiodid

Propidiumiodid (PI) ist ein rot-fluoreszierender Farbstoff, der in Nukleinsäuren interkaliert. PI kann nur perforierte Plasmamembranen von toten oder „löchrigen“ Zellen überwinden. Mit Hilfe von PI konnte die Permeabilität sowie die Anzahl toter Zellen von bestimmten Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtypen untersucht werden. Der Farbstoff weist ein Anregungsmaximum von 535 nm und ein Fluoreszenzemissionsmaximum von 617 nm auf und ist im FI-3 Kanal des Durchflusszytometers detektierbar.

Die Durchlässigkeit für PI in infizierten und nicht-infizierten Zellen wurde in wildtypischen Zellen (Ax2) und der Autophagie-Deletionszelllinie *Δatg1* untersucht. Dazu wurden die Zellen mit *M. marinum* GFP (MOI 100) infiziert (Protokoll 2.2.1.2). Nach dem Wegwaschen extrazellulärer Bakterien wurden etwa 4×10^6 Zellen in eine 6-Loch-Platte übertragen und in 5 ml HI5-C (+ 5 μ l P/S) geschüttelt (100 rpm). 24 hpi wurde die Zellsuspension durchmischt und 1 ml der Schüttelkultur abzentrifugiert (500 x g, 5 min). Das Pellet wurde mit 500 μ l Sörensen-Sorbitol-Puffer gewaschen und anschließend in 200 μ l Sörensen-Azid-Puffer aufgenommen. 10 % einer PI-Stammlösung (0,5 mg/ml) wurden hinzugegeben, vermischt und auf Eis im Dunkeln gelagert. Für den Permeabilitätstest wurden 1×10^5 Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometers unter Verwendung des 619/620 nm Filters analysiert. Die Datenauswertung erfolgte mit Flojo 7.6.3 (TreeStar).

Sörensen-Sorbitol-Puffer	20 mM D-Sorbitol
200 ml	200 ml 1x Sörensen-Puffer
Sörensen-Azid-Puffer	65 mg Natriumazid
200 ml	200 ml 1x Sörensen-Puffer

2.2.1.8 Transmissions-Analyse

Die Funktion des Ejektosoms ist die Transmission und Ausbreitung der Mykobakterien, welche mit Hilfe von Durchflusszytometrie quantifiziert wurde. *Dictyostelium*- Zellen (Ax2, *Δrach* und *Δatg1*) wurden mit *M. marinum* GFP wie unter Punkt 2.2.1.2 beschrieben infiziert und die Infektionsrate anschließend mit Hilfe des Durchflusszytometers bestimmt. Unterschiedliche Infektionsraten zwischen verschiedenen Zelllinien wurden durch die Zugabe nicht-infizierter Zellen normalisiert. 6 hpi wurden die infizierten Donorzellen mit rot

fluoreszierenden (RFP-exprimierenden) Akzeptorzellen in einem Verhältnis 1:5 gemischt (Abb. 2). Zu jedem Zeitpunkt (6, 24, 28, 32 hpi) wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert und eine Immunfluoreszenzfärbung zur Verstärkung des roten Signals mit einem anti-RFP Antikörper durchgeführt (2.2.1.3). $2,5 \times 10^5$ Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert. Die Auswertung der Transmission konnte mit Hilfe der Berechnung des Quotienten aus infizierten Akzeptorzellen pro infizierten Donorzellen erfolgen.

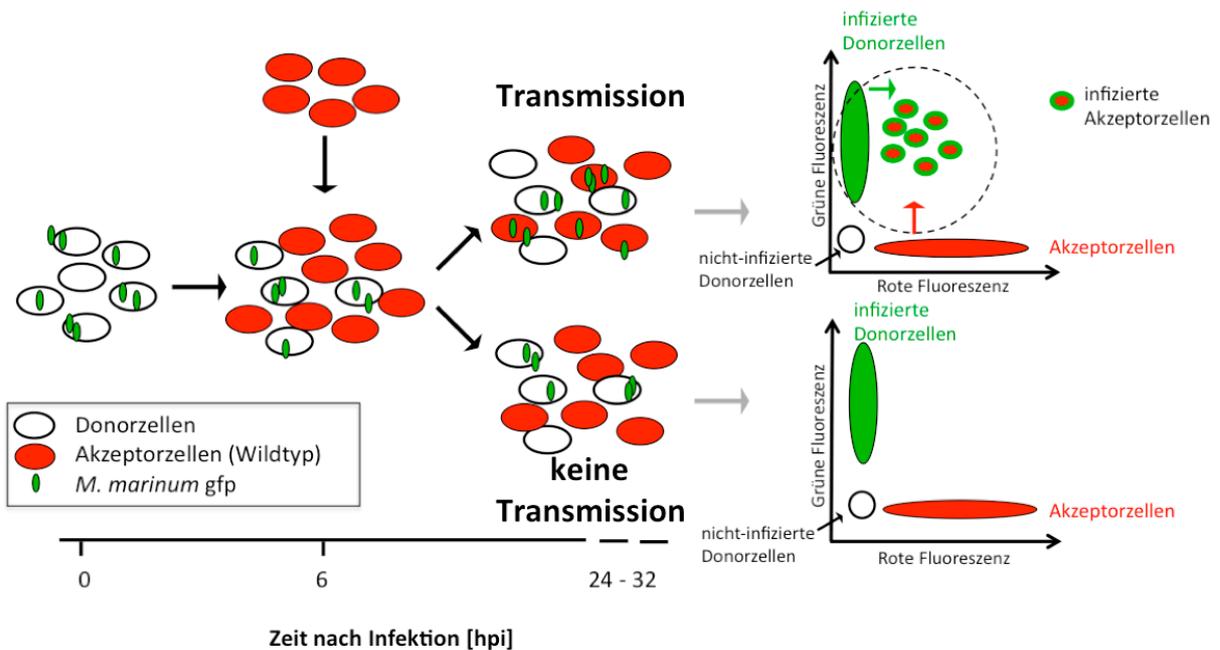


Abb. 2.2: Schema des Transmissions-Analyse

Infizierte Donorzellen wurden nach 6 hpi mit rot-fluoreszierenden Akzeptorzellen vermischt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Transmission der Bakterien mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Aufgrund unterschiedlicher Fluoreszenzen konnten einzelne Populationen separiert werden. Bei erfolgreicher Transmission konnte eine doppelt-fluoreszente Population (rote Akzeptorzellen infiziert mit grünen Bakterien) über die Zeit detektiert werden. Auf der x-Achse wurde die rote Fluoreszenz (FI-3) detektiert und auf der y-Achse die grüne Fluoreszenz (FI-1).

2.2.2 Molekularbiologie

2.2.2.1 Klonierung von Plasmiden und Vorbereitungen für Transfektionen

2.2.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode, um DNA zu vervielfältigen. Primerpaare binden an bekannte Sequenzen und Kopien der Zielsequenz können innerhalb kurzer Zeit generiert werden. Zur Durchführung einer PCR werden folgende Grundkomponenten benötigt: ein spezifisches Primerpaar (20 bis 30 Nukleotide lang),

Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)-Mix, eine DNA-Matrize und eine hitzestabile DNA-Polymerase. Die PCR besteht aus einzelnen Amplifizierungszyklen, die nacheinander unter Veränderung der Temperatur durchgeführt werden. Ein Zyklus besteht aus folgenden drei Schritten:

1. **Denaturierung:** Trennung der DNA-Stränge
2. **Annealing:** Hybridisierung der Primer mit jeweils dem 3`Ende oder dem 5`Ende der komplementären DNA-Stränge
3. **Extension:** DNA-Synthese bei Temperaturoptimum der DNA-Polymerase

Die PCR wurden nach folgendem Schema zusammen pipettiert:

10x PCR-Puffer	5 µl
5`Primer	2 µl
3`Primer	2 µl
dNTPs	1,5 µl
50 mM MgCl	1 µl
template	20 ng
Phusion Polymerase	0,5-1 µl
ddH₂O	ad 50 µl

Die Polymerasekettenreaktion erfolgte nach folgendem Programm:

Temperatur	Zeit	Zyklen
94°C	2 min	1
94°C	30 sec	30
57°C	30 sec	30
72°C	40 sec	30
72°C	5 min	1
4°C	∞	

2.2.2.1.2 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die bestimmte DNA-Sequenzen spezifisch erkennen und schneiden, so dass an diesen Stellen Fremd-DNA eingefügt werden kann. Anhand der

bekannten Schnittstellen eines Vektors kann mit Hilfe eines Restriktionsverdau die Größe der entstehenden Vektor-Fragmente abgeschätzt werden und der Erfolg der Amplifizierung kontrolliert. Nach folgendem Schema wurde ein Restriktionsverdau angesetzt:

Puffer	2,0 µl
Enzym 1	0,4 µl
Enzym 2	0,4 µl
DNA	1-2 µg
H₂O_{steril}	ad 20 µl

Ein Kontrollverdau wurde 60 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.2.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese werden DNA-Moleküle ihrer Größe nach aufgetrennt. Unter Einfluss eines elektrischen Feldes wandert die negativ geladene DNA durch das Gel zur Anode, wobei die kleineren Fragmente sich schneller bewegen als die Größeren. Anhand eines mitgeführten DNA-Markers konnte die Größe der getrennten Fragmente bestimmt und die Konzentration abgeschätzt werden. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte nach Sambrook *et al.*²²⁵ in 1-2 %-igen Agarosegelen mit 1x TAE-Puffer und einer Spannung von 8 V/cm. Der Nachweise wurde über den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid (0,1 mg/ml) unter UV-Belichtung durchgeführt. Als Größenstandard dienten die Marker „Hyperladder 1kb“ und „Hyperladder 100bp“ der Firma Bionline, von dem 5 µl eingesetzt wurden.

10x TAE Puffer	40 mM Tris-HCl
	5 mM Na-Acetat
	2 mM EDTA
	pH 7,9, autoklavieren

2.2.2.1.4 Extraktion von DNA

Nach erfolgter Gelelektrophorese wurde das gesuchte DNA-Fragment aus dem Gel geschnitten und mit Hilfe des „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up“-Kit aus dem Gel extrahiert. Anhand des NanoDrop-Photometers konnte die Konzentration und Qualität (Reinheit) der DNA bestimmt werden.

2.2.2.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Um zwei DNA-Fragmente mit passenden Schnittstellen miteinander zu verbinden, wurde eine Ligation durchgeführt. Das Enzym Ligase katalysiert die Verknüpfung des 3'-Hydroxy-Endes mit dem 5'-Phosphat-Ende der Nukleinsäurefragmente durch Ausbildung einer Phosphodiesterbindung. Die Menge des zu verwendenden Inserts wurde nach folgender Formel berechnet:

$$x = \frac{100 \text{ ng} \times \text{Größe Insert [kb]}}{\text{Größe Vektor [kb]}} \times 3$$

Es wurde dazu ein 10 µl Ansatz hergestellt:

T4 DNA-Ligase	1 µl
10xLigase-Puffer	1 µl
Insert	x µl
Vektor (100 ng)	y µl
ddH₂O	ad 10 µl

Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert und 5 µl für eine Transformation von *E.coli* eingesetzt.

2.2.2.1.6 Isolierung von Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA aus einer transformierten *E. coli* Kultur zu extrahieren, wurde das „NucleoSpin Plasmid“ oder „NucleoBond PC100“ Kit verwendet. Dafür wurden 5 ml bzw. 100 ml LB_{Amp}-Kultur am Vortag mit einer Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Konzentration der gewonnenen DNA wurden mit dem NanoDrop Photometer bestimmt.

2.2.2.1.7 DNA-Sequenzierung

Nach Isolation der Plasmid-DNA konnte diese zum Sequenzieren geschickt werden. Die Sequenzierung wurde von der Firma „Seqlab Sequence Laboratories GmbH“ in Göttingen durchgeführt.

2.2.2.2 Überexpressionskonstrukte

Alle in dieser Arbeit verwendeten ESCRT-Gene wurden in die Vektoren pDM317 mit N-terminaler GFP-Markierung und den pDM323 mit C-terminaler GFP-Markierung kloniert. Die pDM-Vektoren²²¹ sind episomale Plasmide, die speziell für die Expression in *Dictyostelium* hergestellt wurden und über das *Dictybase stock center*¹⁰⁸ öffentlich zugänglich sind. Mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Bgl*III und *Spe*I wurden Insert und Vektor linearisiert und eine spezifisch in die *multiple cloning site* (MCS) ligiert. Ein zusätzliches Gen konnte über eine *Ngo*MIV- Schnittstelle in den gleichen Vektor eingefügt werden. Die Klonierung musste dazu über den Shuttle-Vektor pDM344 erfolgen, um eine weitere Promotor- und Terminator-Sequenz zusätzlich zu extrahieren und eine zweite unabhängige Transkription und Expression zu garantieren.

Tabelle 2.17: Primer, Labornummer und entsprechende Sequenzen

Primer	Labor-Nr.	Sequenz 5` - 3`
Atg8-C <i>Bgl</i> III_fw	283	GAGAGATCTAAAATGGTTCATGTATCAAGCTTTAAAAC GA
Atg8-C <i>Spe</i> I_ <i>Xba</i> I_ <i>Eco</i> RV_fw	284	GAGACTAGTGAGTCTAGAGAGGATATCTAAATCACTACC AAA
RFP-C <i>Eco</i> RV_fw	285	GAGGATATCAAAAATGGCATCATCAGAAGATGTTATTAA GAA
RFP-C <i>Xba</i> I_rev	286	GAGTCTAGATGCACCTGTTGAATGTCTACCTTCTGCTCT TC
RFP-C <i>Xba</i> I stopp_rev	287	GAGTCTAGATTATGCACCTGTTGAATGTCTACCTTCTGCT CTTC
Vps32 <i>Bgl</i> III_fw	303	GAGAGATCTAAAATGGGTGATGTTAATTTCTTACAAAA GC
Vps4 <i>Spe</i> I_ <i>Xba</i> I_ <i>Eco</i> RV_rev	304	GAGACTAGTGAGTCTAGAGAGGATATCTACACCATCTTG CCCAAATC
Vps32 <i>Bgl</i> III_fw	305	GAGAGATCTAAAATGAAACTCTTGGTAAACCAAACC
Vps32 <i>Spe</i> I_ <i>Xba</i> I_ <i>Eco</i> RV_rev	306	GAGACTAGTGAGTCTAGAGAGGATATCCATTGCTAAAGA TTCTTCCAAA

3. Ergebnisse

Tuberkulose, eine Erkrankung verursacht durch eine Infektion mit dem Bakterium *Mykobakterium tuberculosis*, kostet jährlich Millionen von Menschen das Leben¹. Aufgrund der gleichbleibend hohen Infektionsrate in der Weltbevölkerung ist die Suche nach einem Impfstoff oder möglicher Angriffspunkte neuer Medikamente von großer Bedeutung. Mit dem hier verwendeten, etablierten Modellsystem, bestehend aus der Amöbe *Dictyostelium discoideum* und *Mykobakterium marinum*, ist es möglich grundlegende Untersuchungen zur zellulären Interaktion zwischen phagozytierenden Wirtszellen und intrazellulären pathogenen Mykobakterien vorzunehmen, sowie Aufschluss über die molekularen Mechanismen der Infektion zu erhalten. Während der initiierende Schritt der Mykobakterien-Infektion und die Aufnahme über phagozytierende Zellen bereits gut untersucht sind, ist über die Ausschleusung und die Ausbreitung der zytoplasmatischen Mykobakterien aus den Wirtszellen wenig bekannt. In *Dictyostelium* konnte eine auf F-Aktin basierende Struktur, das sogenannte Ejektosom, identifiziert werden. Es wurde gezeigt, dass Ejektosomen für eine nicht-lytische Verbreitung von Mykobakterien verantwortlich sind und sowohl wirtseigene als auch mykobakterielle Faktoren in diesen Prozess involviert sind².

Die der Formation des Ejektosoms zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen wurden in dieser Arbeit eingehender analysiert. In diesem Zusammenhang wurde sowohl die Funktion der Autophagie- und ESCRT-Maschinerie als auch eine Beteiligung mykobakterieller Faktoren in Hinblick auf die Formation und Aufrechterhaltung der nicht-lytischen Verbreitung von Bakterien ermittelt.

3.1 Die Rolle der Autophagie beim nicht-lytischen Austritt von Mykobakterien

3.1.1 Eine vakuoläre Struktur am distalen Pol des austretenden Bakteriums

Um ein besseres Verständnis über den nicht-lytischen Austrittsmechanismus von tuberkulären Mykobakterien zu entwickeln, wurde die Ultrastruktur des Ejektosoms mit Hilfe von korrelativer Licht- und Elektronenmikroskopie (CLEM) näher untersucht. Wildtypische *Dictyostelium*-Zellen wurden dazu mit Mykobakterien infiziert, nach 24 hpi fixiert und Aktin mit Hilfe von Phalloidin angefärbt. Mittels konfokaler Lichtmikroskopie (Abb. 3 A-B) konnten zunächst in einzelnen *Dictyostelium*-Zellen Ejektosomen identifiziert

werden. Anschließend wurde in diesen Zellen die Ultrastruktur des zugehörigen Ejektosoms analysiert. Mit Hilfe der Analyse serieller Ultra-Dünnschnitte im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) konnte die gesamte Zelle erfasst werden (Abb. 3.1 C – E).

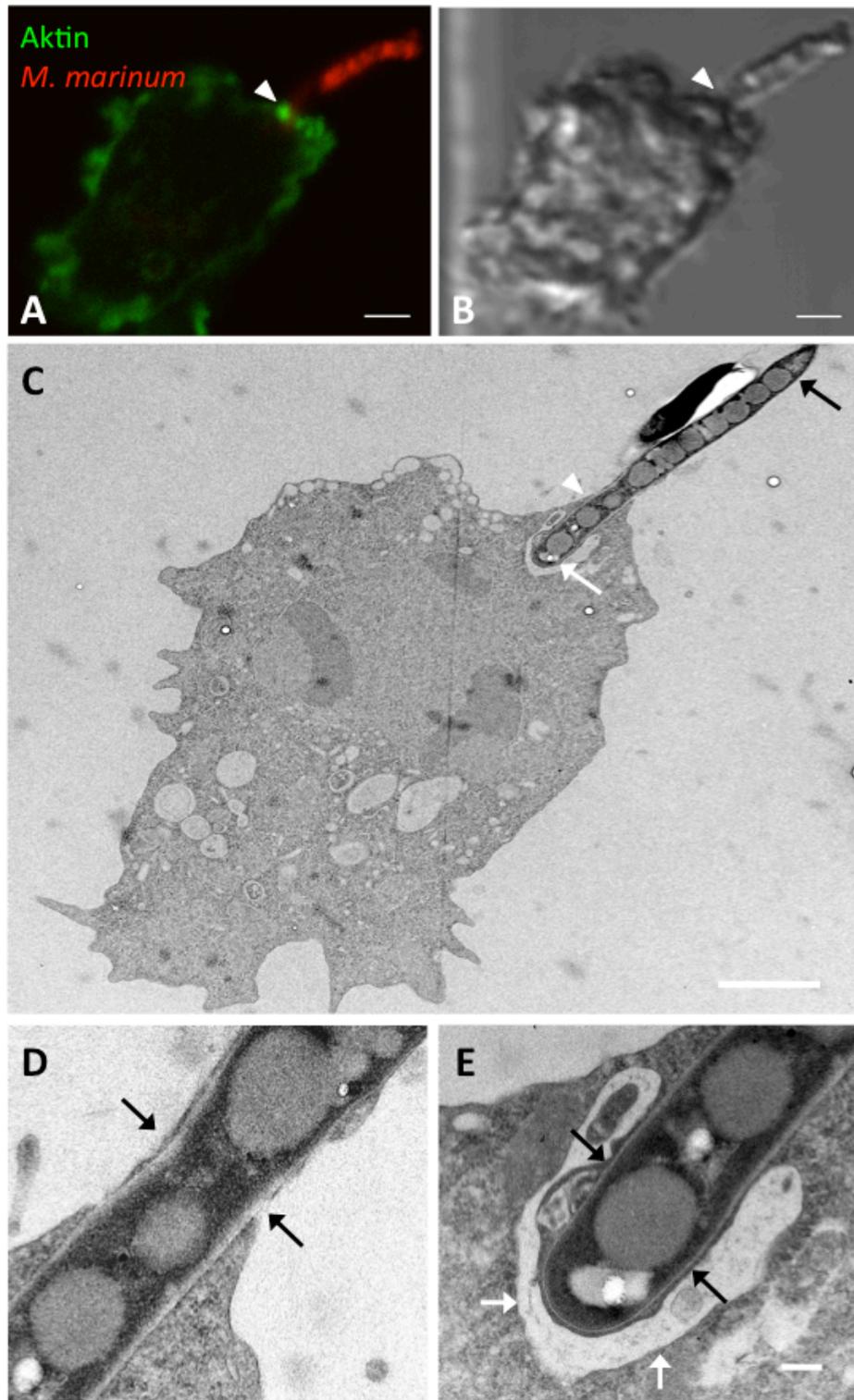


Abb. 3.1: Korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie eines Ejektosoms²²⁶

Wildtypische *Dictyostelium*-Zellen wurden mit *M. marinum* infiziert, 24 hpi fixiert und die Aktinstruktur mit Phalloidin AlexaFluor 568 für lichtmikroskopische Aufnahmen markiert. Die Fluoreszenzaufnahmen erfolgten mit Hilfe konfokaler Mikroskopie (A und B). Anschließend wurden die Zellen in Epoxidharz eingebettet, geschnitten und für die korrelative Transmissionselektronenmikroskopie präpariert (C–E). **(A)** Repräsentatives Bild einer infizierten *Dictyostelium*-Zelle mit einem Ejektosom (Aktin-Akkumulation, grün), um ein auszuschleusendes Mykobakterium (rot) in der Fluoreszenz- und **(B)** in der Durchlichtmikroskopie. Größenbalken = 2 μm **(C)** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Schnittes durch die gleiche Zelle. Der intrazelluläre, distale Pol des Bakteriums ist durch einen weißen Pfeil gekennzeichnet und der extrazelluläre, proximale Pol durch einen schwarzen Pfeil. Größenbalken = 2 μm . **(D)** Vergrößerung der Membranregion, die durch das austretende Bakterium durchbrochen wird. **(E)** Vergrößerung des distalen Pols des Bakteriums. Schwarze Pfeile weisen auf die Becher-förmige Struktur, die dicht am distalen Teil des Bakteriums anliegen und weiße Pfeile auf die Membran, die in Richtung Zytoplasma zeigt. Größenbalken = 500 nm. Das Ejektosom ist in A-C mit einer Pfeilspitze gekennzeichnet. n = 3

Abbildung 3.1 zeigt eine repräsentative Aufnahme einer infizierten *Dictyostelium*-Zelle. Die Ejektosomen-Struktur aus der ein Bakterium aus der Zelle geschleust wird, ist deutlich als starke F-Aktin-Akkumulation in einer flachen Membranregion zu erkennen (Abb.3.1 A). Das Bakterium befindet sich an einem sehr späten Zeitpunkt des Ausschleusungsprozesses, wobei der distale Pol des Bakteriums sich innerhalb der Zelle befindet und der proximale extrazellulär lokalisiert ist (Abb. 3.1 C). Typisch für einen Ejektionsprozess, bei dem ein Bakterium durch die Plasmamembran bricht, ist der nahtlose Übergang der Membran in Richtung des austretenden Bakteriums. Eine undurchlässige Abdichtung um das Bakterium (Abb. 3.1 D) ermöglicht eine Verbreitung des Erregers ohne die Wirtszelle zu lysieren. In jeder elektronenmikroskopischen Aufnahme konnte eine becherförmige Struktur um den distalen, intrazellulären Pol des Bakteriums beobachtet werden (Abb. 3.1 E). Sowohl ausgedehnte Zisternenstrukturen als auch flache Strukturen mit elektronendurchlässigem Lumen konnten erfasst werden.

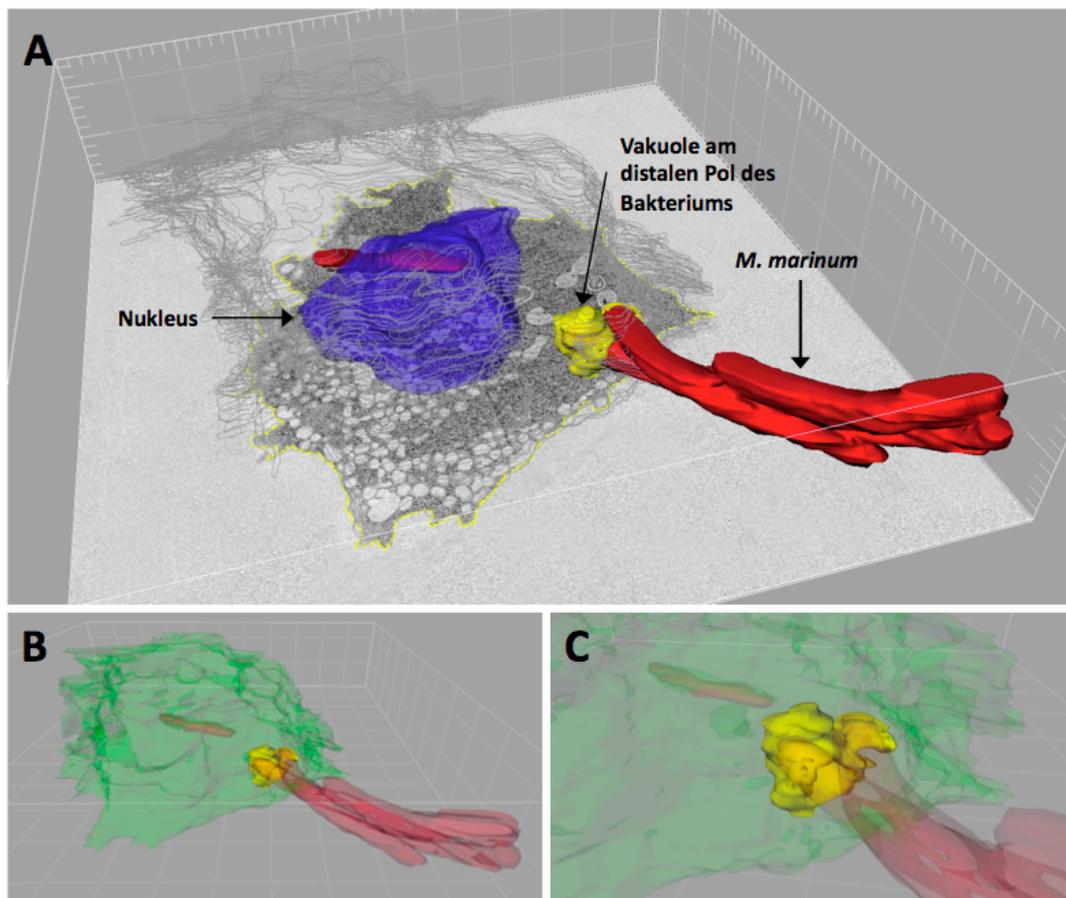


Abb. 3.2: Dreidimensionales Modell der Vakuole am distalen Pol des Bakteriums²²⁶

Serielle Schnitte von der Ejektosom-Struktur infizierter *Dictyostelium*-Zellen wurden angefertigt, mittels TEM visualisiert und die resultierende Bildserie zur Rekonstruktion der dreidimensionalen Struktur verwendet. In allen Modellen wurde die Plasmamembran in grün dargestellt, der Nukleus ist blau, das Bakterium rot und die Vakuole am Pol des Bakteriums gelb. **(A)** zeigt die Überlagerung aller TEM-Aufnahmen der seriellen Dünnschnitte, die durch die manuelle Segmentierung der jeweiligen Struktur in jedem einzelnen Schnitt zu einer Rekonstruktion des zellulären Volumens zusammengesetzt wurden. **(B)** Ein 3D Modell in der die Plasmamembran, das Bakterium und die umschließende Vakuole dargestellt sind. **(C)** Eine Vergrößerung der Membranstruktur zeigt, dass diese den distalen Pol des Bakteriums komplett umschließt und Vakuolen-ähnliche Struktur aufweist.

Anhand der 3D-Rekonstruktion konnte beobachtet werden, dass das einzelne Bakterium der Fluoreszenzmikroskopie einer Bakterienansammlung von 2-3 Bakterien entspricht. Bei Vergrößerung des distalen Pols des Bakteriums wird ersichtlich, dass es sich bei der entdeckten Zisternenstruktur um eine Vakuole handelt, die den Pol von *M. marinum* umschließt. Im Folgenden wurden Experimente durchgeführt um den Ursprung und die Funktion der Membran zu klären.

3.1.2 Charakterisierung der distalen Membranstruktur

Die Struktur der polaren Vakuole, die in der Ultrastrukturanalyse ersichtlich wurde, ähnelt einer sich erweiternden, autophagosomalen Membran, einem Phagophor. Autophagie ist ein zellulärer katabolischer Signalweg für den Abbau zellulärer Komponenten und intrazellulärer Mikroorganismen²²⁷. Charakteristisch für Autophagie ist die Formation einer Doppelmembranstruktur, das Autophagosom, mit dessen Hilfe zytoplasmatische Strukturen zu Lysosomen oder zur pflanzlichen Vakuole für den Abbau transportiert werden¹²⁸. Aufgrund der beobachteten vakuolären Struktur aus der Elektronenmikroskopie wurde diese mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Analyse (IFA) genauer charakterisiert.

3.1.2.1 Die spezifische Rekrutierung der Autophagie-Maschinerie

Um die Hypothese des autophagosomalen Ursprungs der vakuolären Membran zu untersuchen, wurde die Anwesenheit autophagosomaler Marker am austretenden Bakterium überprüft. Hierfür wurden *Dictyostelium*-Zellen mit *M. marinum* infiziert und 24 hpi fixiert. Ein bekanntes Markerprotein für Autophagie ist das Protein *autophagy-related protein 8* (Atg8/LC3), welches spezifisch mit der autophagosomalen Membran interagiert¹⁵⁵. Mit Hilfe eines Antikörpers gegen Atg8 wurde eine IFA durchgeführt und anschließend mit konfokaler Mikroskopie ausgewertet.

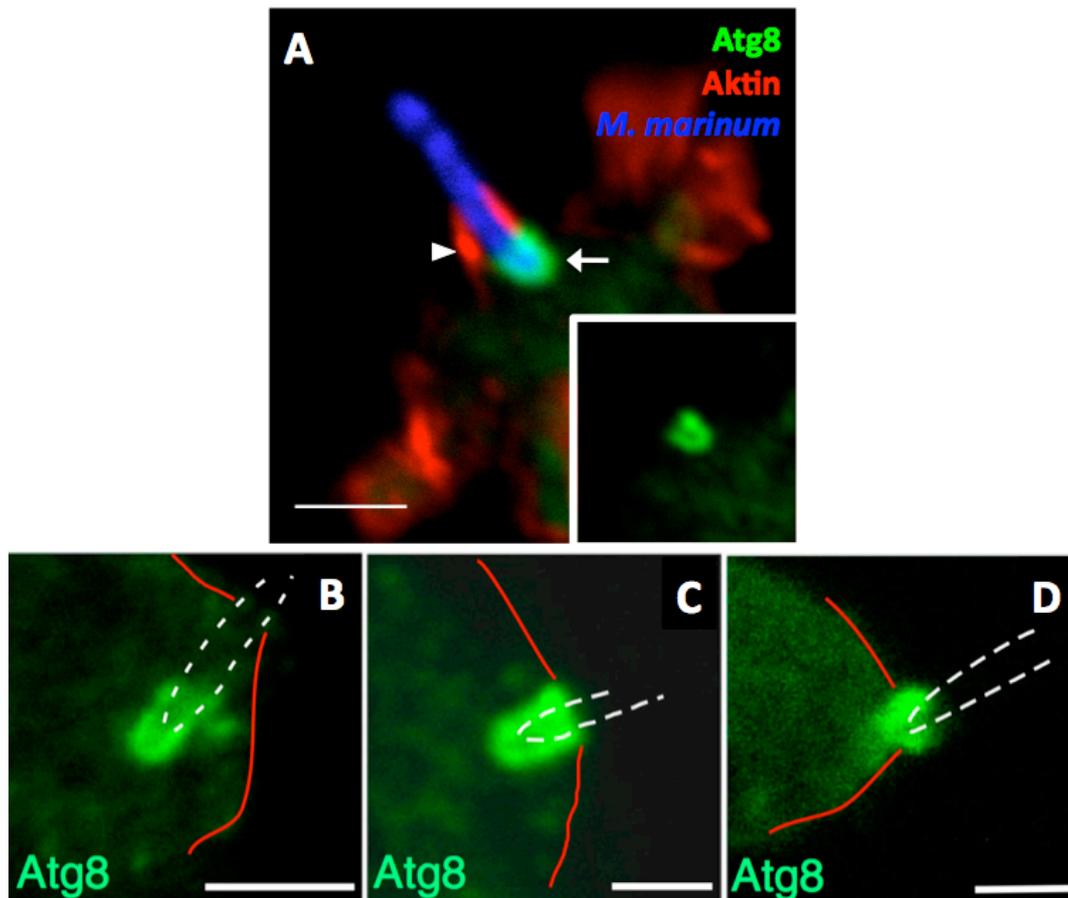


Abb. 3.3: Das Autophagie-Markerprotein Atg8 lokalisiert am distalen Pol von *M. marinum*²²⁶

(A – D) Infizierte Zellen wurden nach 24 hpi fixiert und mit anti-Atg8/anti-Hase AF488 gefärbt. Fluoreszenzmikroskopie zeigt polare Atg8-Akkumulation zu unterschiedlichen Stadien der Ausschleusung des Bakteriums durch das Ejektosom. (A) Zum frühen Zeitpunkt des Auswurfmechanismus ist eine Atg8-Akkumulation (grün) als große, becherförmige Struktur zu beobachten. Größenbalken = 2 μm (B - D) Je mehr das Bakterium nach außen gelangt, desto näher wandert die Atg8-Struktur Richtung Plasmamembran. Das Bakterium ist mit einer weiß-gestrichelten Linie angedeutet und die Plasmamembran mit einer roten durchgängigen Linie. Größenbalken = 2 μm .

Die Immunfluoreszenzaufnahmen zeigten eine spezifische Lokalisation von Atg8 am Pol des aus dem Ejektosom austretenden Bakteriums (Abb. 3.3 A). Diese Atg8-positive Struktur konnte bei allen Stadien des Austritts beobachtet werden: Sowohl in einem sehr frühen Stadium, wenn das Bakterium noch zum Großteil intrazellulär ist (Abb. 3.3 B), als auch zu einem sehr späten Zeitpunkt, wenn der Ejektionsprozess des Bakteriums schon fast beendet ist (Abb. 3.3 D), konnte eine deutliche Akkumulation am Pol beobachtet werden. Die Akkumulation von Atg8 könnte auf eine spezifische Rekrutierung der autophagosomalen Maschinerie hindeuten. Selektive Autophagie wird über die Ubiquitinierung eines Zielobjektes und die Rekrutierung eines Adapterproteins, wie *Sequestosome 1* (SQSTM1), vermittelt. SQSTM1 besitzt sowohl eine Bindungsstelle für Ubiquitin als auch für Atg8²²⁸.

Aufgrund dieser bekannten Interaktions- und Regulationsmuster wurde getestet, ob die Autophagie-vermittelnden Proteine SQSTM1 und Ubiquitin ebenfalls an der beobachteten Membran akkumulieren. Dazu wurde die Lokalisation von GFP-SQSTM1 und Ubiquitin in infizierten Zellen mittels IFA untersucht (Abb. 3.4).

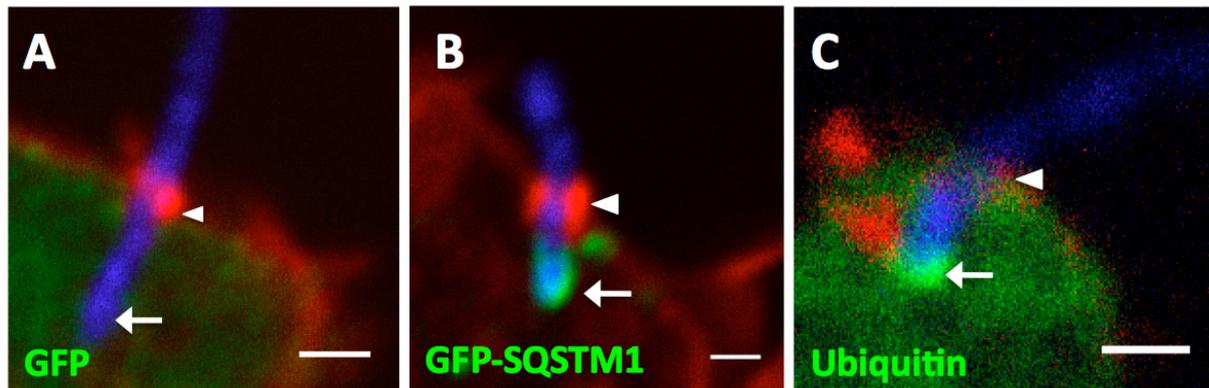


Abb. 3.4: Rekrutierung der Autophagie-Maschinerie an das auszuschleusende Bakterium²²⁶

Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen infizierter *Dictyostelium*-Zellen, die zytosolisches GFP als Kontrolle (A), GFP-SQSTM1 (B) überexprimieren oder mit anti-Ubiquitin (C) nachgefärbt wurden. Die Marker der Autophagie SQSTM1 und Ubiquitin lokalisieren am distalen Pol des Bakteriums. Im Gegensatz dazu zeigte die Kontrolle (A) keine Assoziation. Aktin ist rot, *M. marinum* blau und der entsprechende Marker grün. Das Ejektosom ist jeweils mit einer Pfeilspitze markiert und der distale Pol des Bakteriums mit einem Pfeil. Größenbalken = 1 μm .

Sowohl das in *Dictyostelium* orthologe Adapterprotein SQSTM1 (Abb. 3.4 B) als auch Ubiquitin (Abb. 3.4 C) konnten am distalen Pol des Bakteriums als becherförmige Struktur detektiert werden. Um herauszufinden, ob die Markerproteine der Autophagie spezifisch am distalen Pol akkumulieren, wurde die jeweilige Assoziation im Vergleich zu intrazellulären Bakterien quantifiziert (Abb. 3.5).

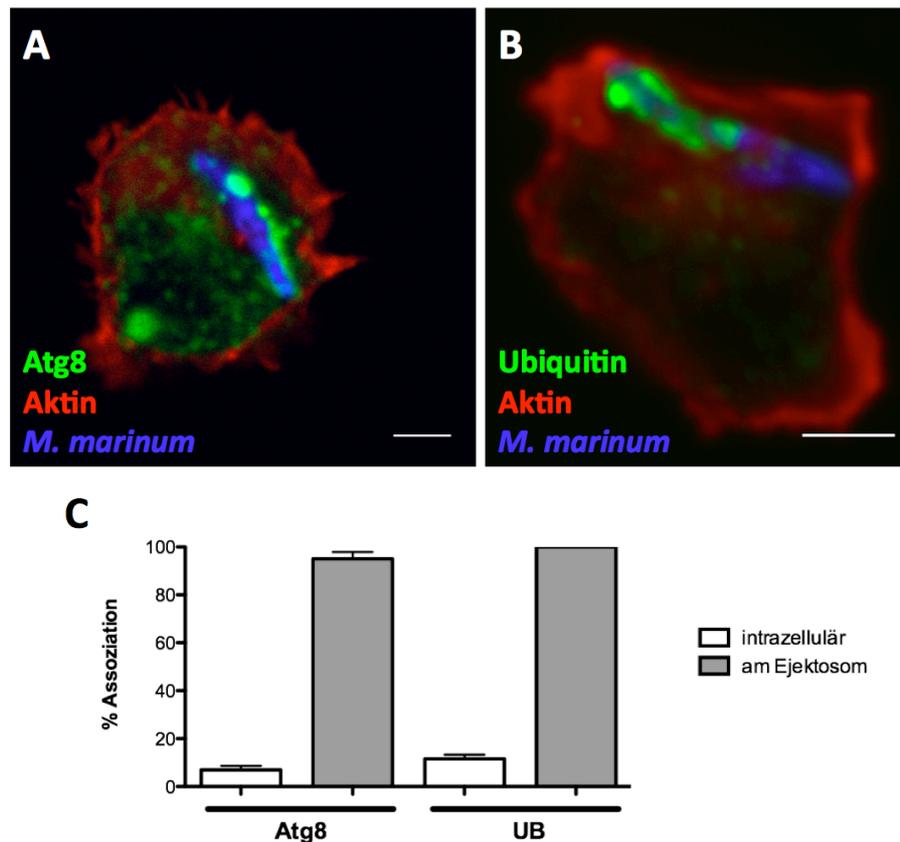


Abb. 3.5: Spezifische Rekrutierung autophagosomaler Marker am Ejektosom²²⁶

Vergleich der Assoziation von Ubiquitin und Atg8 an zytoplasmatischen und durch Ejektosomen austretenden Mykobakterien. (A-B) Repräsentative Fluoreszenzaufnahme der Assoziation an intrazellulären Bakterien von Atg8 (A) und Ubiquitin (B) *M. marinum* ist blau dargestellt, die Aktinstruktur ist rot und die Markerproteine weisen eine grüne Fluoreszenz auf. Größenbalken = 2 μ m. (C) Quantifizierung der Assoziation von Ubiquitin und Atg8. n = 3.

Während austretende Bakterien fast immer mit den Markern Atg8 und Ubiquitin assoziiert waren, wiesen intrazelluläre Bakterien eine Anreicherung von Atg8 von $7,0 \pm 1,7$ % (Abb. 3.5 A und C) und von Ubiquitin von $11,6 \pm 1,7$ % auf (Abb. 3.5 B und C). Im Gegensatz dazu waren die Pole der über das Ejektosom ausgeschleusten Bakterien zu $95 \pm 2,9$ % mit Atg8 bzw. 100 % mit Ubiquitin dekoriert (Abb. 3.5 C). Dabei wiesen zytoplasmatische Bakterien eine punktuelle Assoziation der Marker auf der gesamten Oberfläche auf, wohingegen die Lokalisation der autophagosomalen Proteine bei den ausgeschleusten Bakterien auf den Pol beschränkt war. Die spezifische und charakteristische Rekrutierung der Autophagie-Maschinerie an den Pol austretender Mykobakterien deutet auf einen spezialisierten Mechanismus hin, der eine Funktion bei der nicht-lytischen Ausschleusung übernimmt.

3.1.3 Autophagie ist essentiell für die Bildung der vakuolären Struktur

Der Phosphoproteinkinase-Komplex Atg1 (Ulk1/2) ist eine der Schlüsselkomponenten für die Initiierung und Regulation der kanonischen Autophagie-Maschinerie²²⁹. Durch den Verlust von Atg1 weisen *Dictyostelium*-Zellen schwere Defekte in Makroautophagie und der Entwicklung auf²³⁰.

3.1.3.1 Ausbildung von Ejektosomen in Autophagie-defizienten Zellen

Um zu bestimmen, ob für die Rekrutierung der Atg8-positiven Vakuole am Pol des Bakteriums die kanonische Autophagie-Apparatur benötigt wird, wurden Atg1 defiziente *Dictyostelium*-Zellen (*atg1*-)^{230,231} untersucht. Zunächst wurden *atg1*- Zellen mit *M. marinum* infiziert, nach 24 hpi fixiert und mittels konfokaler Mikroskopie die Bildung von Ejektosomen analysiert (Abb. 3.6).

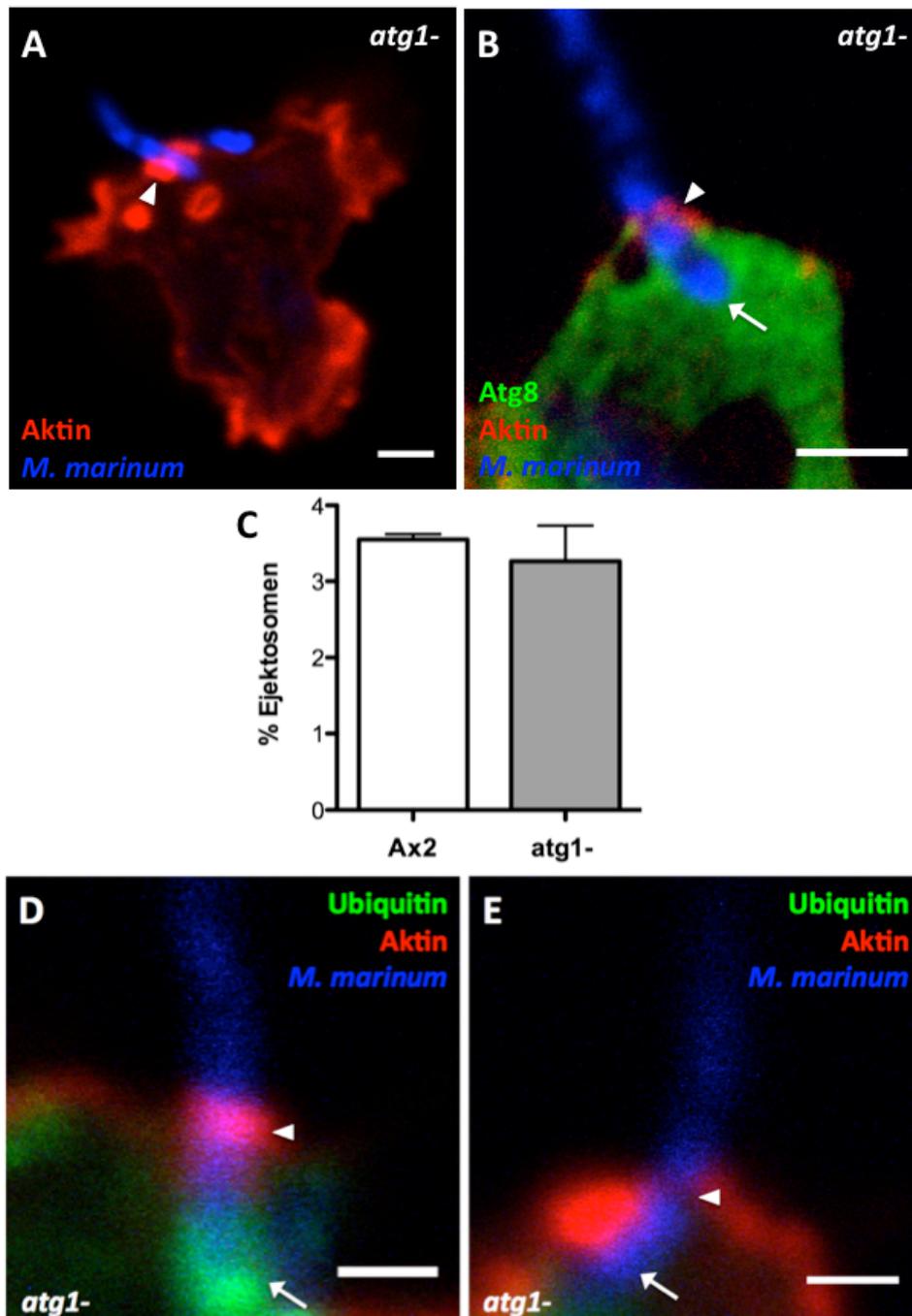


Abb. 3.6: Die Ausbildung von Ejektosomen in der *atg1-* Deletionsmutante²²⁶

Wildtypische *Dictyostelium*-Zellen und *atg1-* Mutanten wurden infiziert und nach 24 hpi fixiert. **(A - B)** Repräsentative Fluoreszenzbilder der infizierten *atg1-* Deletionsmutante. Aktin ist rot, *M. marinum* ist blau und Atg8 ist grün dargestellt. **(A)** Ejektosom-Struktur (Pfeilsitze) in der Mutante. Größenbalken = 2 μm . **(B)** verdeutlicht die Abwesenheit einer Atg8 Anreicherung am Pol des Bakteriums (Pfeil). Die Ejektosom-Struktur ist mit einer Pfeilspitze markiert. Größenbalken = 1 μm **(C)** Die Quantifizierung der Anzahl der Ejektosomen ist unverändert in *atg1-* Zellen im Vergleich zum Wildtypen (n = 3) **(D und E)** Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen zeigen, dass Ubiquitin in der Hälfte aller aufgenommenen Ejektosom-Strukturen in *atg1-* Zellen akkumuliert. Der Antikörper FK-2 wurde für das Anfärben ubiquitiniertes Strukturen verwendet (grün), Ejektosomen sind mit Pfeilsitze markiert (rot) und der Pol des Bakteriums mit einem Pfeil verdeutlicht.

In *Atg1*-defizienten Zellen konnten Ejektosomen detektiert werden, die in gleicher Frequenz wie im Wildtypen gebildet werden (Abb. 3.6 A und C). Sowohl im Wildtypen, als auch in der Autophagie-Mutante konnten in 3 bis 4 % der infizierten Zellen Ejektosomen zum Zeitpunkt von 24 hpi gefunden werden. Obwohl die Hälfte ($46,4 \pm 3,6$ %) aller aus dem Ejektosom geschleusten Bakterien eine Assoziation von Ubiquitin am Pol aufwiesen (Abb. 3.6 D und E), konnte keine Akkumulation von *Atg8* in *atg1*- Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.6 B).

3.1.3.2 Abwesenheit der vakuolären Struktur in der *atg1*- Mutante

Um die Beobachtungen der fehlenden Lokalisation von *Atg8* in *atg1*- Zellen aus der Lichtmikroskopie näher zu charakterisieren, wurde die Ultrastruktur im Transmissionselektronenmikroskop untersucht (Abb. 3.7).

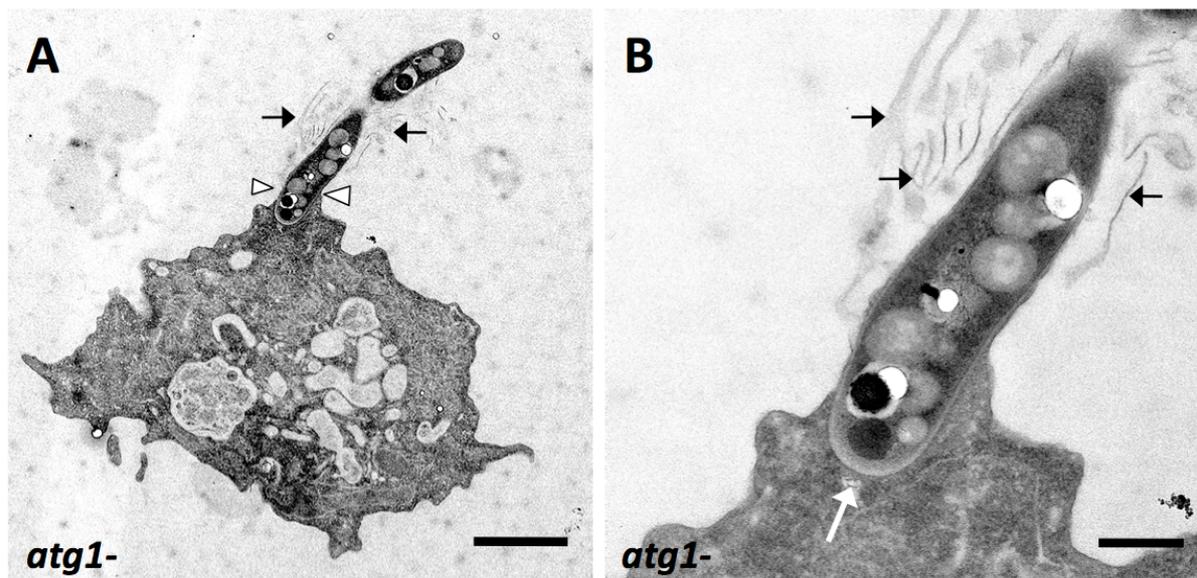


Abb. 3.7: Die Deletion von *Atg1* führt zum Verlust der Vakuole am distalen Pol des Bakteriums²²⁶
TEM-Aufnahmen infizierter *atg1*- Zellen, die nach 24 hpi fixiert wurden. **(A-B)** Die TEM-Bilder zeigen keine distale Vakuole am Pol des Bakteriums. **(A)** Das Ejektosom ist mit Pfeilspitzen angedeutet. Größenbalken = 2 μ m **(B)** Vergrößerung zeigt, dass der distale Pol des Bakteriums (weißer Pfeil) nicht durch eine Vakuole umschlossen wird und zytoplasmatisches Material und Membranfragmente können außerhalb der Zelle detektiert werden (schwarze Pfeile). Größenbalken = 500 nm.

Die TEM-Aufnahmen der *atg1*- Zellen zeigten zwar eine Ejektosom-Struktur (Abb. 3.7 A), jedoch keine vakuoläre Struktur am distalen Pol des Bakteriums (Abb. 3.7 B).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass ein Defekt der Schlüsselkomponente der Autophagie-Maschinerie *Atg1* von *Dictyostelium*-Zellen keinen Einfluss auf die Bildung von Ejektosomen hat. Allerdings führt dieser Defekt zum Verlust der Vakuole am distalen Pol des Bakteriums während des Ejektionsprozesses.

3.1.4 Relevanz weiterer Faktoren der Autophagie-Maschinerie

Im Gegensatz zur klassischen oder kanonischen Autophagie, wird bei der nicht-kanonischen Autophagie nicht die komplette Garnitur der Atg-Proteine für die Bildung von Autophagosomen benötigt^{232,233}. Um herauszufinden, ob weitere Komponenten der kanonischen Autophagie-Maschinerie eine Bedeutung bei der nicht-lytischen Ausschleusung von Mykobakterien haben, wurde die Rekrutierung von Atg8 in unterschiedlichen Deletionsmutanten (*SQSTM1*⁻, *atg5*⁻, *atg6*⁻, *atg7*⁻) im Vergleich zum Wildtypen quantifiziert. Mit Hilfe der Deletionsmutation des in *Dictyostelium* bekannten Adaptermoleküls *SQSTM1*¹²⁹ konnte die Rekrutierung des autophagosomalen Apparats untersucht werden (Abb. 3.8).

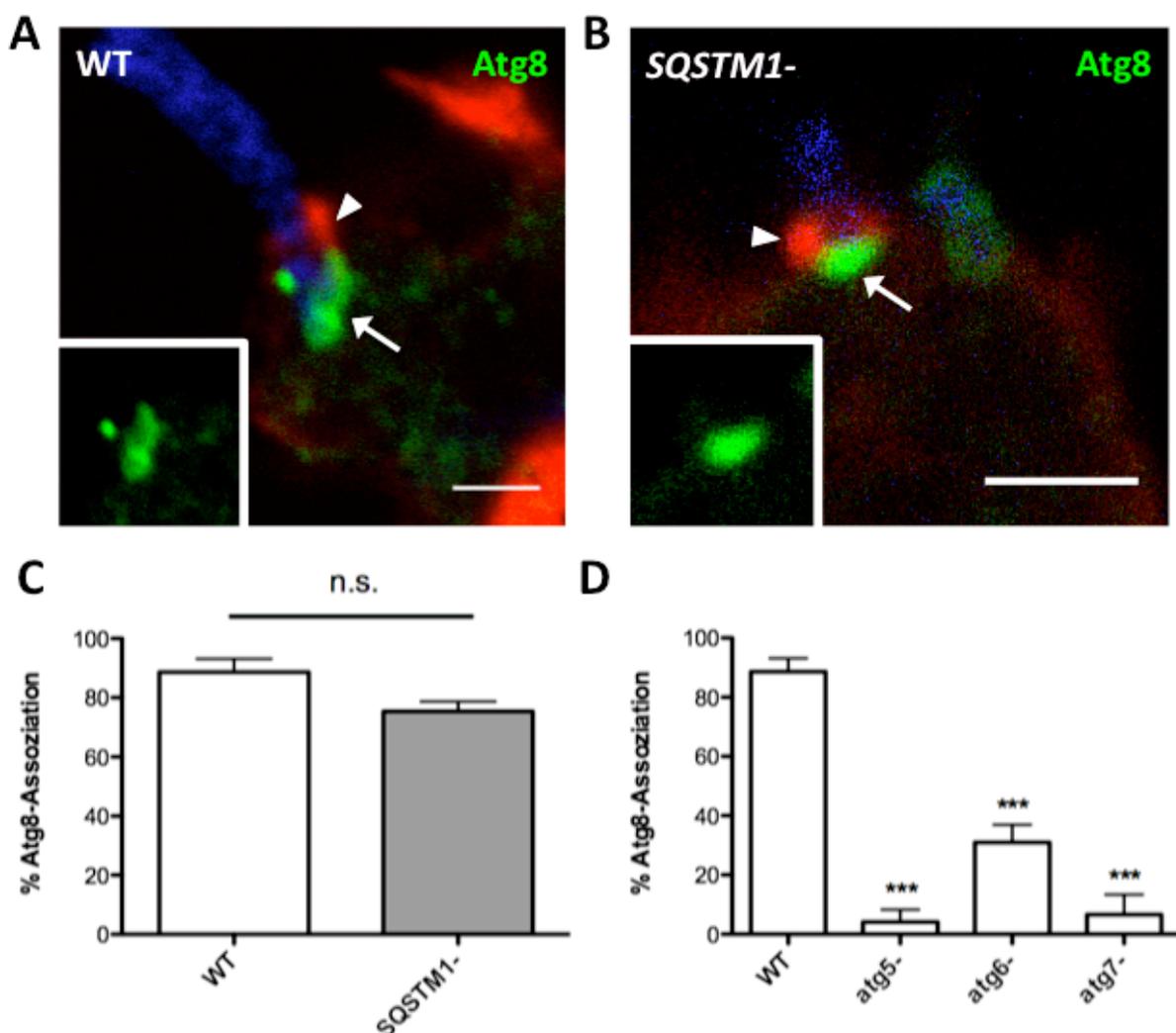


Abb. 3.8: Die kanonische Autophagie-Maschinerie wird für die Rekrutierung von Atg8 benötigt²²⁶

Infizierte *Dictyostelium*-Zellen wurden nach 24 hpi fixiert und mit anti-Atg8 gefärbt. Die Analyse der Atg8-Assoziation am Ejektosom in den unterschiedlichen Zelllinien (WT, *SQSTM1*⁻, *atg5*⁻, *atg6*⁻, *atg7*⁻) erfolgte über Fluoreszenzmikroskopie und wurde anschließend quantifiziert. Eine deutliche Assoziation des Markers konnte im Vergleich zum WT (A) in *SQSTM1*⁻ Zellen (B) detektiert werden. Das Ejektosom ist mit einer Pfeilspitze und die Atg8-Assoziation mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Aktin ist rot, *M. marinum* blau und Atg8 grün dargestellt. Größenbalken = 1 μm (C - D) Die Quantifizierung der Rekrutierung der Autophagie-Maschinerie erfolgte nach drei unabhängigen Experimenten. Während das Fehlen von SQSTM1 keinen Einfluss auf eine Atg8 Akkumulation zu haben scheint (C), sind vor allem Atg5 und Atg7 als auch Atg6 essentiell für die Rekrutierung von Atg8 an den Pol des Bakteriums. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem One-Way-ANOVA Test (***) $p \leq 0,001$; n.s. = nicht signifikant), $n = 3$.

In *SQSTM1*- Zellen wurden Ejektosomen gebildet (Abb. 3.8 B) und Atg8 in ähnlicher Weise wie in wildtypischen Zellen rekrutiert (Abb. 3.8 C). Die Assoziation von Atg8 am distalen Ende des auszuwerfenden Bakteriums war in *SQSTM1*- Zellen nicht signifikant reduziert, so dass der Verlust des Adapters keinen Einfluss auf die Rekrutierung von Atg8 zu haben scheint. Alternative Autophagie-Adaptermoleküle wie Optineurin oder NDP52 aus Säugerzellen konnten aufgrund der geringen Konservierung im Laufe der Evolution bisher nicht in *Dictyostelium* identifiziert werden. Deshalb wird angenommen, dass weitere unbekannte Adaptermoleküle existieren oder alternative Mechanismen, die für die Rekrutierung der Autophagie-Maschinerie verantwortlich sind.

Um die Notwendigkeit weiterer Komponenten der kanonischen Autophagie zu testen, wurden die Deletionsmutanten der ubiquitin-like conjugation Maschinerie (*atg5*- und *atg7*-) und des Phosphatidyl-3-Kinase (PI3K) Komplexes (*atg6/Beclin1*-) infiziert und auf Atg8-Rekrutierung untersucht (Abb. 3.8 D). Eine Atg8-Akkumulationen von $4,2 \pm 4,2$ % in *atg5*-Zellen und von $6,7 \pm 6,7$ % in *atg7*- Zellen konnte beobachtet werden. Bei der *atg6*-Zelllinie war zwar eine Reduktion der Assoziation auf 31 ± 6 % im Vergleich zum WT zu erkennen, jedoch nicht so deutlich ausgeprägt wie in *atg5*- und *atg7*- Zellen.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass es in *Dictyostelium* einen alternativen Adapter zu SQSTM1 geben könnte, der für die Rekrutierung der autophagosomalen Maschinerie verantwortlich ist. Die Komponenten der ubiquitin-like conjugation Maschinerie (*atg5*- und *atg7*-) scheinen essentiell für die Rekrutierung der Autophagie zu sein. Der Verlust des Phosphatidyl-3-Kinase (PI3K) Komplexes (*atg6/Beclin1*-) hingegen führt zu einer verminderten Assoziation von Atg8 am Pol des Bakteriums. Atg6 scheint zwar eine Rolle zuzukommen, jedoch ist diese nicht essentiell.

3.1.5 Charakterisierung des autophagosomalen Kompartiments

Um das autophagosomale Kompartiment am Pol des Bakteriums näher zu charakterisieren, wurde die Lokalisation der beiden Proteine Atg18 (ein Ortholog des Säugerproteins WIPI1/2) und 2xFYVE (ein PI(3)P-Reporter) am Ejektosom untersucht. Im Gegensatz zum Marker Atg8,

der an der Autophagosomenmembran assoziiert bleibt, werden die beide Proteine Atg18 und 2xFYVE ausschließlich an die frühe, expandierende Phagophor-Membran der Makroautophagie rekrutiert^{234,235}. GFP-Atg18 und GFP-2xFYVE exprimierende Zellen wurden mit *M. marinum* infiziert und nach 22 hpi für die Lebenszellmikroskopie vorbereitet. Die Assoziation des jeweiligen Markers am Ejektosom einer infizierten Zelle wurde anschließend quantifiziert (Abb. 3.9).

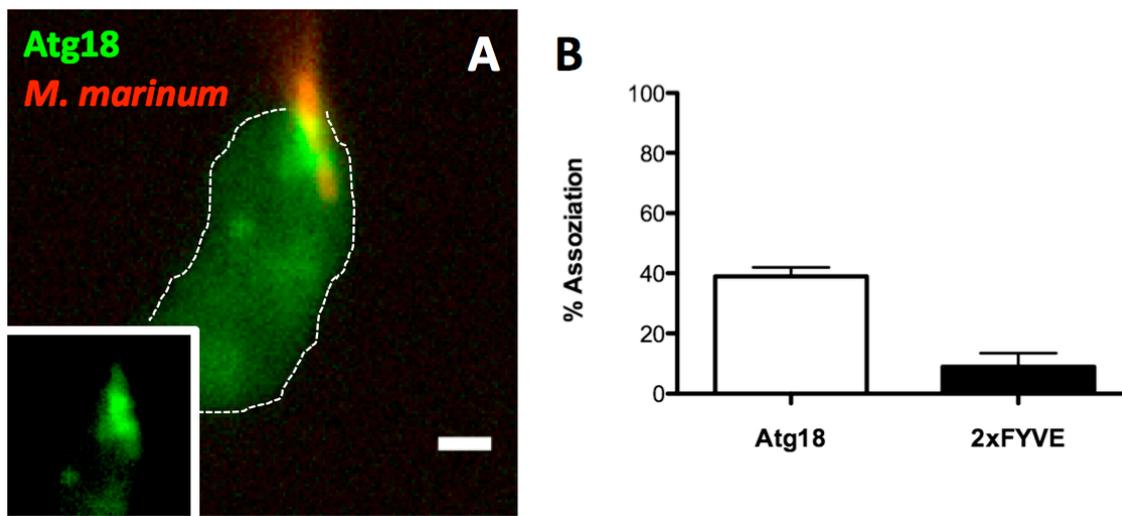


Abb. 3.9: Markerproteine der frühen, expandierenden autophagosomalen Membran lokalisieren am Ejektosom²²⁶

GFP-Atg18 und GFP-2xFYVE überexprimierende Zellen wurden mit *M. marinum* infiziert. **(A)** Mit Hilfe von Lebenszellmikroskopie wurde 24 hpi nach einer Anreicherung der Marker am Ejektosom gesucht. *M. marinum* ist rot und Atg18 grün dargestellt. Die Membran der Zelle ist weiß-gestrichelt. Größenbalken = 2 μ m **(B)** Die Akkumulation der Marker am distalen Pol der austretenden Bakterien wurde anschließend quantifiziert. Beide Marker konnten in unterschiedlicher Ausprägung am Ejektosom gefunden werden. n = 3.

Das Protein Atg18 lokalisierte zu $38 \pm 2,9$ % am austretenden Bakterium (Abb. 3.9 A und B). Bei 2xFYVE konnte hingegen nur eine Assoziation von $8,9 \pm 4,4$ % beobachtet werden (Abb. 3.9 B). Die teilweise Assoziation dieser beiden Marker weist darauf hin, dass die beobachtete Membranstruktur an der Stelle des Ejektionsprozesses selbst gebildet wird.

Bei der klassischen selektiven Autophagie durchlaufen die Autophagosomen eine Reifung, in dem diese mit Lysosomen fusionieren. Mit Hilfe von fluoreszierendem Dextran kann das lysosomale System sichtbar gemacht werden. Um herauszufinden, ob die Atg8-positive Membran eine Reifung durch die Fusion mit Lysosomen durchläuft, wurden infizierte

Dictyostelium-Zellen 23 hpi mit Dextran beladen und mit Hilfe der Lebendzellmikroskopie analysiert (Abb. 3.10).

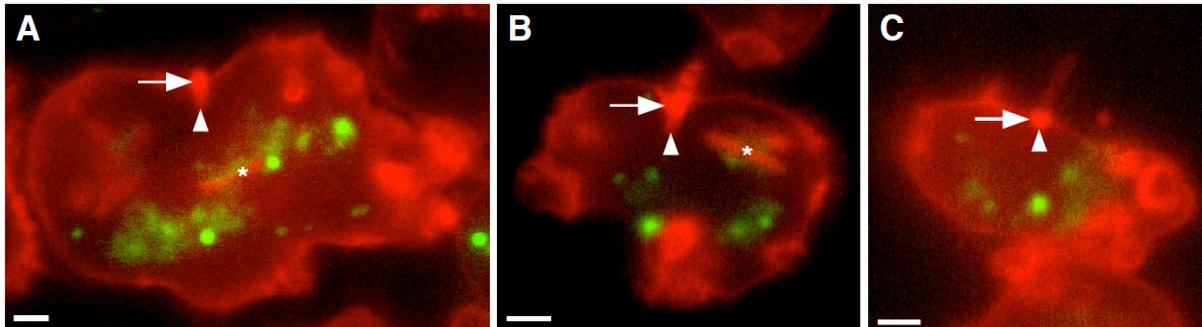


Abb. 3.10: Der *Fluid-phase* Marker Dextran akkumuliert nicht am distalen Pol austretender Bakterien²²⁶

ABD-GFP exprimierende *Dictyostelium*-Zellen wurden mit *M. marinum* infiziert und 23 hpi mit TRITC-Dextran (0,5 mg/ml) bis zu 6 Stunden beladen. Mit Hilfe von Weitfeld-Mikroskopie wurden Bakterien zu unterschiedlichen Stadien des Austritts (frühe (A), mittlere (B) und späte (C) Phase) analysiert. Sowohl Bakterien als auch Aktin sind rot dargestellt und Dextran ist grün. Ejektosomen sind mit einem Pfeil und der distale Pol des Bakteriums durch eine Pfeilspitze gekennzeichnet. Während keine Akkumulation von Dextran am distalen Pol des austretenden Bakteriums bzw. am Ejektosom detektiert werden konnte, wurde an intrazellulären Bakterien eine Assoziation beobachtet (durch Sternchen gekennzeichnet). Größenbalken = 0,5 μm .

Unterschiedliche Zeitpunkte der Ausschleusung der Bakterien durch das Ejektosom wurden untersucht (Abb. 3.10 (A) früher, (B) mittlerer, (C) später Zeitpunkt des Austritts). Während die Bakterien zum frühen Zeitpunkt noch fast vollständig zytoplasmatisch sind, kann bei einem späten Zeitpunkt nur noch der Pol des Bakteriums in der Ejektosom-Struktur beobachtet werden. Der Rest des Bakteriums befindet sich beim späten Stadium des Austritts auf der extrazellulären Seite. Zu keinem Zeitpunkt der Ausschleusung konnte eine Akkumulation von Dextran am Pol des Bakteriums oder am Ejektosom detektiert werden. Intrazelluläre Bakterien weisen hingegen zum Teil eine Akkumulation von Dextran auf.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass Marker der frühen, sich ausbreitenden autophagosomalen Membran an austretenden Bakterien lokalisieren. Die Reifung der Membran zu einem späten Autophagosomen und eine Fusion mit Endolysosomen konnte nicht beobachtet werden.

3.1.6 Die Rekrutierung der autophagosomalen Maschinerie erfolgt unabhängig von der lokalen Aktivität von ESX-1

Das ESX-1 Sekretionssystem ist von großer Bedeutung für die Pathogenität von *M. tuberculosis* und *M. marinum* und hoch konserviert zwischen den beiden Spezies²³⁶. Der Großteil der Virulenzfaktoren des ESX-1 Sekretionssystem ist in der *region of difference 1* (RD1) kodiert und ist verantwortlich für die erfolgreiche Etablierung der Infektion in der Zelle und die Verbreitung der Bakterien von Zelle zu Zelle^{91,93-95,237,238}. Es konnte gezeigt werden, dass das Sekretionssystem an den Polen der Bakterien akkumuliert und aktiv ist²³⁹. Außerdem ist das Sekretionssystem am Ejektionsmechanismus von Mykobakterien aus den Zellen beteiligt². Aufgrund der spezifischen Rekrutierung der autophagosomalen Membran an den distalen Pol austretender Bakterien stellte sich die Frage, in wie weit das polare ESX-1 Sekretionssystem von *M. marinum* an der Aktivierung und Rekrutierung der Autophagie involviert ist. Ein Co-Infektions-Assay als Transportsystem ins Zytoplasma, bestehend aus pathogenen Mykobakterien mit einem intakten Sekretionssystem (*M. marinum*) und avirulenten *M. marinum* Δ RD1 oder nicht-pathogenen *M. smegmatis*, wurde etabliert. Für einen erfolgreichen Austritt aus der Wirtszelle über die Ejektosom-Struktur müssen die Bakterien zunächst ins Zytoplasma gelangen. Im Falle der Aufnahme nicht-pathogener *M. smegmatis* durch *D. discoideum* erfolgt eine phagosomale Reifung und ein resultierender Abbau der Bakterien. Der avirulente Mykobakterien-Stamm *M. marinum* Δ RD1 kann trotz Verlust des ESX1-Sekretionssystems zwar die phagosomale Reifung blockieren, jedoch können die Mykobakterien nicht aus dem endosomalen Kompartiment ins Zytoplasma ausbrechen ohne den Einfluss von Effektorproteinen, wie ESAT-6^{77,124}. Da avirulente und nicht-pathogene Mykobakterien die Translokation ins Zytoplasma nicht selbstständig bewerkstelligen können, müssen diese erst einmal dorthin transportiert werden. Dabei wurden sich die Mechanismen der Inhibierung der phagosomalen Reifung und des Ausbruchs ins Zytoplasma von wildtypischen, pathogenen Mykobakterien²⁴⁰ zu nutzen gemacht. Die gemeinsame Aufnahme von unterschiedlich fluoreszenten wildtypischen und avirulenten oder nicht-pathogenen Mykobakterien in ein Phagosom stellt den Transport ins Zytoplasma sicher. Die Rekrutierung der autophagosomalen Maschinerie an den Pol nicht-pathogener oder avirulenter Mykobakterien, sowie der Austritt aus dem Ejektosom wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Abb.3.11).

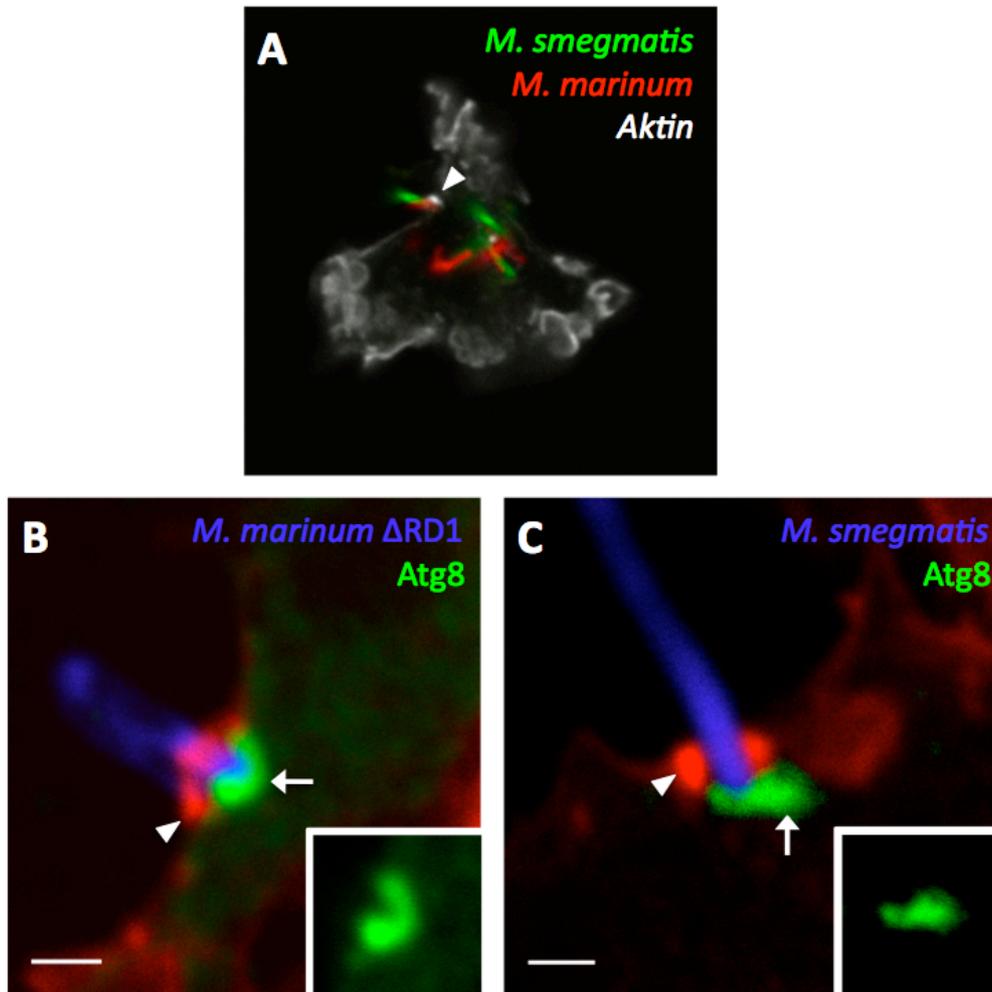


Abb. 3.11: Die Rekrutierung der Autophagie erfolgt unabhängig von der ESX-1 Lokalisation²²⁶

Die Co-Infektion pathogener Mykobakterien (*M. marinum*) mit avirulenten (*M. marinum* Δ RD1) bzw. nicht-pathogenen (*M. smegmatis*) Mykobakterien ermöglichte die Untersuchung der Relevanz des ESX-1 Sekretionssystems für die polare Akkumulation der autophagosomalen Maschinerie. Ejektosomen werden in beiden Co-Infektionen gebildet (**A-C**) und wurden mit einer Pfeilspitze markiert. (**A**) zeigt den gemeinsamen Austritt von *M. marinum* und *M. smegmatis* durch dieselbe Ejektosom-Struktur. (**B-C**) Der Marker Atg8 (grün) akkumuliert am distalen Pol von *M. marinum* Δ RD1 (**B**, blau) und *M. smegmatis* (**C**, blau). Größenbalken = 1 μ m.

Vorversuche zeigten, dass die Co-Infektion von pathogenen Mykobakterien mit avirulenten (*M. marinum* Δ RD1) oder nicht-pathogenen Mykobakterien (*M. smegmatis*) eine erfolgreiche Freisetzung ins Zytoplasma und den Austritt aus der Zelle durch ein Ejektosom ermöglicht (Abb. 3.11 A). Sowohl wildtypische *M. marinum* als auch Bakterien mit Verlust der RD1-Region gelangten über Ejektosomen aus der Zelle und Atg8 wurde an den distalen Pol der avirulenten Mykobakterien rekrutiert (Abb. 3.11 B). Um herauszufinden, ob der beobachtete Ejektionsprozess und die Aktivierung der Autophagie-Maschinerie ein Phänomen pathogener Mykobakterien ist, wurde außerdem eine Co-Infektion mit dem nicht-pathogenen *M. smegmatis* durchgeführt. Wie auf den Fluoreszenzaufnahmen zu

erkennen, konnte *M. smegmatis* in der Co-Infektion Ejektosomen formen und auch eine Atg8-positive Akkumulation am distalen Pol war zu beobachten (Abb. 3.11 A und C). Die Bildung von Ejektosomen ist abhängig von der ESX1- vermittelten Sekretion des immunogenen Pathogenitätsfaktors ESAT-6², allerdings scheint die Polarität und die lokale Aktivität des Sekretionssystems für die Aktivierung und die Rekrutierung der Autophagie an den Pol der Bakterien nicht von Bedeutung zu sein.

Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen, dass die Rekrutierung der autophagosomalen Maschinerie an den Pol des Bakteriums beim Austrittsprozess durch das Ejektosom unabhängig von der Polarität und der lokalen Aktivität des ESX-1 Sekretionssystems verläuft.

3.1.7 Eine effiziente, nicht-lytische Zell-Zell-Übertragung von *M. marinum* benötigt eine intakte Autophagie-Maschinerie

Nachdem gezeigt werden konnte, dass ein Verlust der Autophagie-Maschinerie keinen Einfluss auf die Bildung von Ejektosomen hat (Abb. 3.6), stellte sich die Frage, ob die Funktion der Ejektosomen in Autophagie-defizienten *atg1-* Zellen verändert ist. Der nicht-lytische Austrittsmechanismus von tuberkulösen Mykobakterien über das Ejektosom ist hauptverantwortlich für eine effiziente Zell-Zell-Übertragung und die Verbreitung der Infektion in *Dictyostelium*².

3.1.7.1 Ejektosomen in *atg1-* sind nicht funktionell

Um herauszufinden, ob die in *atg1-* generierten Ejektosom-Strukturen funktionell sind, wurde die Transmission der Mykobakterien über die Zeit mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe 2.2.1.8). Dazu wurde die Übertragung GFP-exprimierender *M. marinum* aus nicht-fluoreszenten *Dictyostelium*-Donorzellen (WT, *atg1-*, *rach-*) zu RFP-exprimierenden wildtypischen Akzeptorzellen gemessen. Die Akzeptorzellen wurden 6 hpi als Startpunkt des Experiments zu den infizierten Donorzellen gegeben, um den Großteil exozytotischer Ereignisse aus dem Versuch auszuschließen. Nach 24, 28 und 32 hpi wurde die Verbreitung der Bakterien mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Transmission wildtypischer Zellen wurde mit der Ejektosomen-Negativkontrolle *rach-* (keine Ejektosomausbildung)² und der Autophagie-defizienten Mutante *atg1-*^{230,231} verglichen (Abb. 3.12). Der Ablauf des Experiments ist in Abbildung 2.2 schematisch dargestellt.

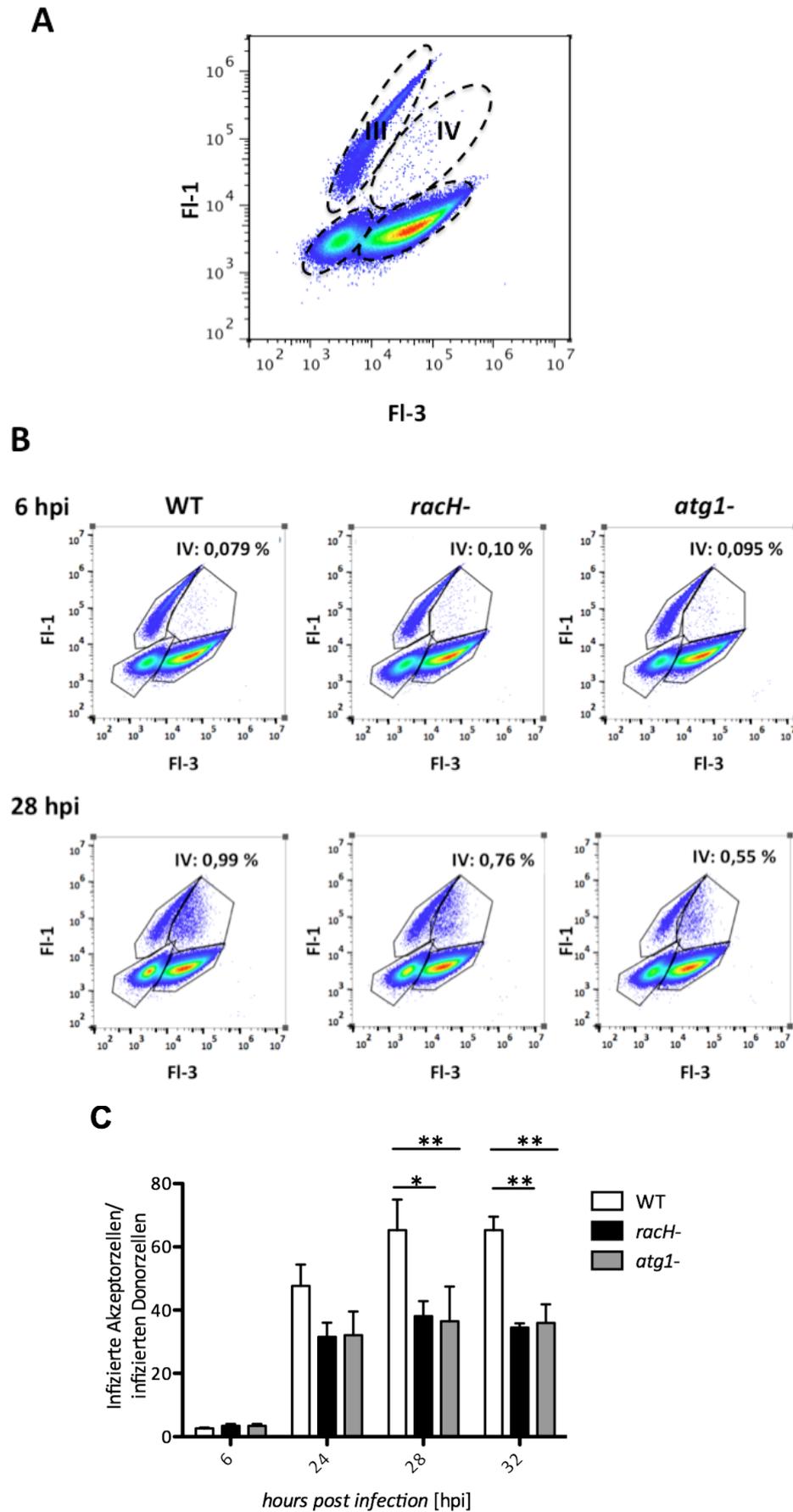


Abb. 3.12: Eine effiziente Zell-Zell-Transmission von *M. marinum* benötigt eine intakte Autophagie-Maschinerie²²⁶

Die Zell-Zell-Transmission von Mykobakterien aus den unterschiedlichen *Dictyostelium*-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen. Nicht-fluoreszente Donorzellen (WT, *racH*-, *atg1*-) wurden mit GFP-exprimierenden Bakterien infiziert und mit rot-fluoreszenten Akzeptorzellen gemischt. Aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzen konnten die Populationen in der Durchflusszytometrie voneinander getrennt werden und die Ausbreitung der Bakterien quantifiziert werden. **(A)** In den durchflusszytometrischen Analysen wurde die grüne Fluoreszenz (Fl-1) als Funktion der roten Fluoreszenz (Fl-3) aufgetragen und folgende vier Populationen konnten getrennt werden: nicht-fluoreszente, nicht-infizierte Donorzellen (I), fluoreszente, nicht-infizierte Akzeptorzellen (II), nicht-fluoreszente, infizierte Donorzellen (III) und fluoreszente, infizierte Akzeptorzellen (IV) **(B)** Population IV entspricht der Anzahl erfolgreicher Zell-Zell Übertragungen der Bakterien über die Zeit. 6 hpi ist der Startpunkt der Messung, und es ist kaum Transmission der Bakterien zu beobachten. 28 hpi ist ein prozentueller Anstieg in der Zahl der Ereignisse dieser Population zu verzeichnen. **(C)** Die Dissemination der Bakterien wurde 6, 24, 28 und 32 hpi quantifiziert. Der Quotient aus infizierten Akzeptorzellen zu infizierten Donorzellen ermöglichte die Berechnung der Verbreitung der Bakterien aus unterschiedlichen Donorzellen. Sowohl *racH*- (Negativkontrolle) als auch *atg1*- wiesen eine signifikante Reduktion der Zell-Zell-Transmission der Bakterien auf. $n = 3$; Die statistische Analyse erfolgte mittels Two-Way-ANOVA, * $p \leq 0,1$; ** $p \leq 0,01$).

Basierend auf der Detektion unterschiedlicher Fluoreszenzen konnten Populationen in der Durchflusszytometrie separiert werden (Abb. 3.12 A). Nach 24 hpi wurde ein deutlicher Anstieg von roten (Akzeptor-) Zellen infiziert mit grünen Bakterien (Population IV) festgestellt. Der Quotient aus infizierten Akzeptorzellen pro infizierten Donorzellen ermöglichte die Berechnung und den Vergleich der Transmission aus den unterschiedlichen *Dictyostelium*-Zellen. Die Anzahl an doppelt fluoreszenten Zellen in der *atg1*- Population als auch in der Negativkontrolle *racH*- war deutlich geringer als im Wildtyp 24 hpi (Abb. 3.12 B). Während 24 hpi die Populationsgröße der doppelt-fluoreszenten Zellen beim WT auf 1,04 % gestiegen war, konnte in *racH*- nur ein Anstieg auf 0,57 % und in *atg1*- auf 0,42 % vermessen werden. Über die Zeit bis 32 hpi wurde die Veränderung der Transmission der Bakterien noch deutlicher erkennbar. Eine signifikante Reduktion der Übertragung der Bakterien wurde in der Autophagie-defizienten Mutante gemessen (Abb. 3.12 C). Der Quotienten aus infizierten Akzeptorzellen pro infizierten Donorzellen ermöglichte die Verbreitung der Bakterien von Zelle zu Zelle über die Zeit zu bestimmen. Ein signifikanter Unterschied der Transmission konnte zum Zeitpunkt 24 hpi mit Werten von $47,7 \pm 6,8$ im WT, $32,1 \pm 7,5$ in *atg1*- Zellen und $31,5 \pm 4,5$ % in der Negativkontrolle *racH*- nicht detektiert werden. 28 und 32 hpi verbreiteten sich die Bakterien in Wildtyp-Zellen hingegen deutlich auf $65,3 \pm 9,7$ (28 hpi) bzw. $65,3 \pm 4,3$ (32 hpi). Sowohl in der Negativkontrolle, als auch in der Autophagie-Deletionsmutante konnte im weiteren Verlauf kein Anstieg der Transmission der Bakterien beobachtet werden. Während 32 hpi in *racH*- Zellen das Verhältnis zwischen infizierten Akzeptorzellen zu infizierten Donorzellen bei $34,5 \pm 1,3$ und in *atg1*- Zellen bei $35,9 \pm 5,9$ lag

und somit kaum Veränderung über die Zeit zu vermessen war, wurde eine signifikant stärkere Transmission der Bakterien im WT gemessen. Die Deletion des Autophagie-Gens *atg1* in *Dictyostelium*-Zellen führte zu einer signifikanten Reduktion der Transmission und somit zu einer vergleichbaren Verbreitung der Bakterien wie in *rach*-Zellen, die nicht in der Lage sind Ejektosomen auszubilden¹³.

3.1.7.2 Eine intakte Autophagie-Maschinerie ist essentiell für die Erhaltung der Plasmamembranintegrität infizierter *Dictyostelium*-Zellen

Beim Austritt von Mykobakterien aus der *Dictyostelium*-Zelle durch die Ejektosom-Struktur entsteht ein Riss in der Plasmamembran der Wirtszelle. Die F-Aktin-basierende Struktur formt einen engen Verschluss rund um das Bakterium und gewährleistet somit vermutlich einen nicht-lytischen und Antibiotikum-insensitiven Austritt aus der Wirtszelle¹³. In *atg1*-Zellen wurden diese Aktinstrukturen in gleicher Weise als ringartige Struktur um die austretenden Bakterien gebildet. Allerdings gab es die Fluoreszenzmikroskopie Hinweise auf eine Durchlässigkeit der Membran (Abb. 3.13).

3.1.7.2.1 Immunfluoreszenz-Assay (IFA)

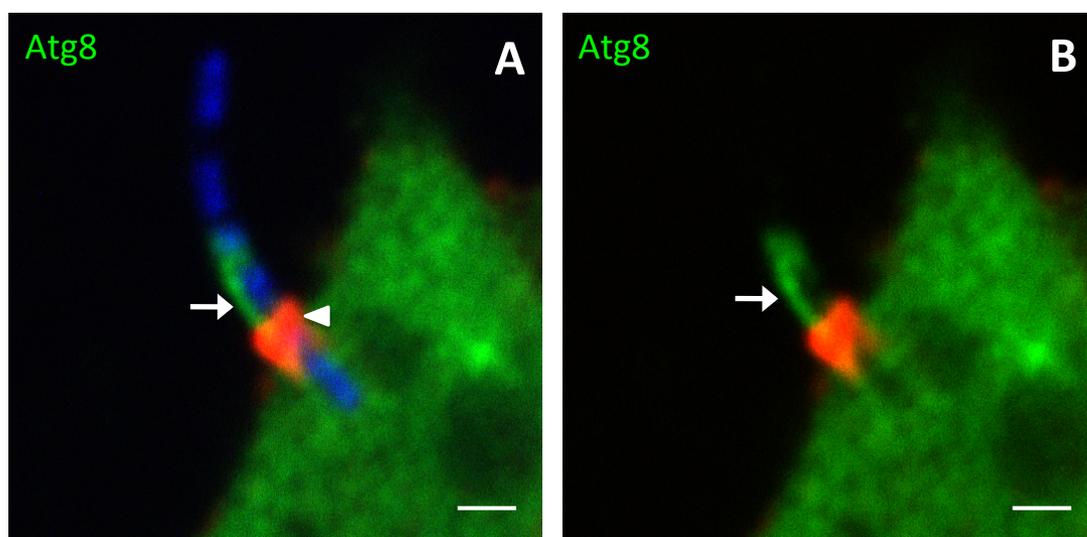


Abb. 3.13: Intrazelluläres Material gelang bei Verlust der Autophagie über das Ejektosom nach außen²²⁶

atg1-Zellen wurden infiziert, 24 hpi fixiert und mit α -Atg8/ α -Kaninchen AF488 gefärbt. **(A)** In einer Aufnahme konnte intrazelluläres Material (grün, Pfeil) beim Austritt von *M. marinum* außerhalb der *atg1*-Zelle detektiert werden. Aktin ist rot, das Bakterium blau dargestellt. **(B)** Das zytoplasmatische Protein Atg8 wurde auf extrazellulärer Seite nachgewiesen. Größenbalken = 1 μ m.

Auf extrazellulärer Seite einer *atg1*- Zelle konnte die zytoplasmatische Form des Proteins Atg8 beobachtet werden (Abb. 3.13). Aus dem mit der Pfeilspitze gekennzeichneten Ejektosom tritt *M. marinum* aus der Zelle und intrazelluläres Material konnte um den extrazellulären Teil des Bakteriums detektiert werden (Abb. 3.13 B). Schon in elektronenmikroskopischen Aufnahmen von *atg1*- Zellen konnte intrazelluläres Material auf extrazellulärer Seite eines durch das Ejektosom austretenden Bakteriums beobachtet werden (Abb. 3.13 B). Eine Möglichkeit ist, dass die Ejektosom-Struktur rund um das Bakterium eine Abdichtung der Zelle in Autophagie-defizienten Zellen nicht mehr gewährleisten kann (Abb. 3.7 B, schwarze Pfeile).

3.1.7.2.2 Permeabilitätstest mit Propidiumiodid

Zur Bestätigung der Hypothese und besseren Quantifizierung der Beobachtung aus 3.1.7.2.1 wurde mit Hilfe von Propidiumiodid (PI) die Membranintegrität von *atg1*- Zellen untersucht (Protokoll 2.2.1.7). Propidiumiodid ist ein Nukleinsäure-interkalierender Farbstoff, der nur durch die perforierte Membran toter oder beschädigter Zellen dringen kann. Mit Hilfe dieses Farbstoffs konnte untersucht werden, ob die Plasmamembran infizierter *atg1*- Zellen intakt ist. Zunächst wurden wildtypische und *atg1*- Zellen mit GFP-exprimierenden *M. marinum* infiziert, 24 hpi mit PI versetzt, 10 min inkubiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften von PI konnten perforierte Zellen mit einer höheren Fluoreszenz im roten (Fl-3) Kanal detektiert werden (Abb. 3.14).

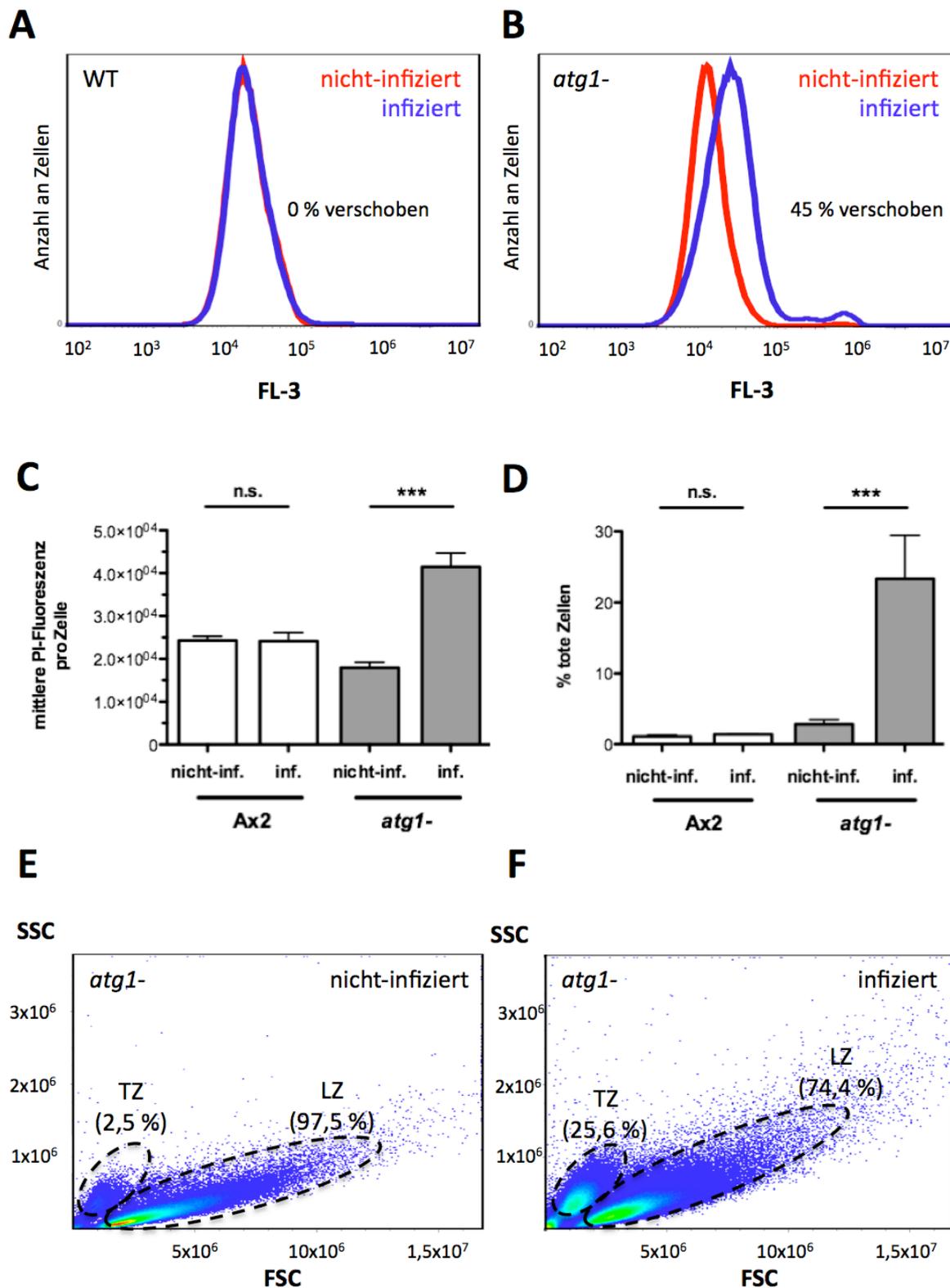


Abb. 3.14: *Atg1*-Defizienz führt zu einer Permeabilität der Plasmamembran während der Infektion²²⁶

Die Intaktheit der Plasmamembran wurde mit Hilfe von Propidiumiodid (PI) getestet. Wildtypische und *atg1-* Zellen wurden infiziert, 24 hpi mit PI (0,05 mg/ml) beladen und mit Hilfe von Durchflusszytometrie analysiert. **(A)** Infizierte WT-Zellen weisen keinen Unterschied bezüglich der Durchlässigkeit für PI zu nicht infizierten auf. **(B)** Infizierte *atg1-* Zellen zeigen eine deutlich höhere PI-Fluoreszenz als nicht infizierte. Rot: nicht-infizierte Zellen; blau: infizierte Zellen **(C)** Die mittlere PI-Fluoreszenz/Zelle infizierter *atg1-* Zellen ist signifikant erhöht. In WT-Zellen ist kein Unterschied zu

erkennen. **(D)** Die Anzahl toter Zellen in der mit *M. marinum* infizierten Autophagie-Mutante *atg1*- ist signifikant erhöht, während der WT unbeeinflusst bleibt. Die statistische Analyse erfolgte anhand der One-Way ANOVA Analyse (n = 3-4, *** p ≤ 0,01; n.s. = nicht signifikant) **(E - F)** zeigt nicht-infizierte **(E)** und infizierte **(F)** *atg1*- Zellen in der Durchflusszytometrie. Dargestellt ist der SSC (Zellgranularität) als Funktion des FSC (Zellvolumen). Die Population der lebenden Zellen (LZ) kann deutlich von der kleineren Population toter Zellen (TZ) unterschieden werden. Infizierte *atg1*- Zellen weisen einen deutlich höheren Anteil toter Zellen auf.

Die Histogramme der roten Fluoreszenz beider Proben (infiziert und nicht-infiziert) waren im WT deckungsgleich. Nicht-infizierte und infizierte Wildtypen wiesen die gleiche Durchlässigkeit für PI auf (Abb. 3.14 A). Eine deutliche Verschiebung der Histogramme war hingegen zwischen nicht-infizierten und infizierten *atg1*- Zellen zu beobachten. In der Auswertung der Experimente (n=3) konnte eine signifikante Erhöhung der mittleren PI-Fluoreszenz von $40 \pm 3,2$ % von infizierten *atg1*- Zellen im Vergleich zu nicht-infizierten beobachtet werden (Abb. 3.14 C). Mit einer Differenz der PI-Fluoreszenz von 10 ± 6 % zwischen infizierten und nicht-infizierten WT-Zellen konnte hingegen kein signifikanter Unterschied detektiert werden. Nicht nur die Permeabilität infizierter *atg1*- Zellen war erhöht, sondern auch die Anzahl toter Zellen (Abb. 3.14 D - F). Mittels FSC/SSC wurde die Anzahl toter und lebender Zellen quantifiziert (Abb. 3.14 E, F). Die Infektion mit *M. marinum* hatte keinen Einfluss auf den Anteil toter Zellen im Wildtypen (nicht-infiziert: $1,1 \pm 0,2$ %, infiziert: $1,4 \pm 0,03$ %). In *atg1*- Zellen war der Anteil toter Zellen hingegen signifikant erhöht (nicht-infiziert: $2,8 \pm 0,6$ %, infiziert: $23,3 \pm 6,1$ %) (Abb. 3.14 D).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass an der extrazellulären Seite des aus dem Ejektosom austretenden Bakteriums intrazelluläres Material detektiert werden konnte. Das Fehlen der Autophagie-Komponente Atg1 führte zu einer erhöhten Permeabilität der Plasmamembran während der Infektion und vermutlich zu einer erhöhten Sterblichkeit der Zellen.

3.2 Charakterisierung der ESCRT-Maschinerie als Plasmamembran-reparatursystem beim nicht-lytischen Austritt von *M. marinum*

Plasmamembranschäden können durch verschiedene Ursachen entstehen. Durch effiziente Reparaturmechanismen können Schäden gezielt behoben und das Überleben der Zelle gewährleistet werden. Jimenez *et al.* zeigten 2014 erstmals, dass die ESCRT-Maschinerie unabhängig von den bis dahin bekannten Funktionen in der Zelle von großer Bedeutung für die Reparatur von Wunden in der Plasmamembran ist²¹³. In den vorherigen Abschnitten

dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass Autophagie eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Membranintegrität beim nicht-lytischen Austritt von Mykobakterien spielt. Eine Beteiligung des ESCRT-abhängigen Plasmamembranreparaturmechanismus beim nicht-lytischen Ausbruch von *M. marinum* und eine mögliche Interaktion zwischen Autophagie und ESCRT-Maschinerie sollte untersucht werden. Zunächst wurde eine Charakterisierung der Lokalisation von ESCRT-Proteinen mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie vorgenommen und anschließend der Einfluss von ESCRT-Verlustmutationen in *D. discoideum* in Hinblick auf die Bildung von Ejektosomen untersucht.

3.2.1 Charakterisierung der Akkumulation von ESCRT-Proteinen am distalen Pol des Bakteriums

Während der ESCRT-III-Komplex und der *ESCRT disassembly complex* (ATPase Vps4) an allen ESCRT-beteiligten Prozessen von essentieller Bedeutung zu sein scheinen, kann die Funktion anderer Komponenten zum Teil komplementiert werden. Um zu testen, ob die ESCRT-Maschinerie in den nicht-lytischen Austrittmechanismus von Mykobakterien involviert ist, wurden sowohl die Proteine Vps32 (ESCRT-III-Komplex), die ATPase Vps4 als auch das Adapterprotein Alix auf eine Akkumulation am Ejektosom hin untersucht. Dafür wurden Überexpressionszelllinien generiert, die Vps32, Vps4, respektive Alix fusioniert mit GFP überexprimieren. Diese Zelllinien wurden mit *M. marinum* infiziert, 24 hpi fixiert und mit Fluoreszenzmikroskopie analysiert. In drei unabhängigen Experimenten wurde die Assoziation der ESCRT-Proteine an austretenden Bakterien quantifiziert (Abb. 3.15).

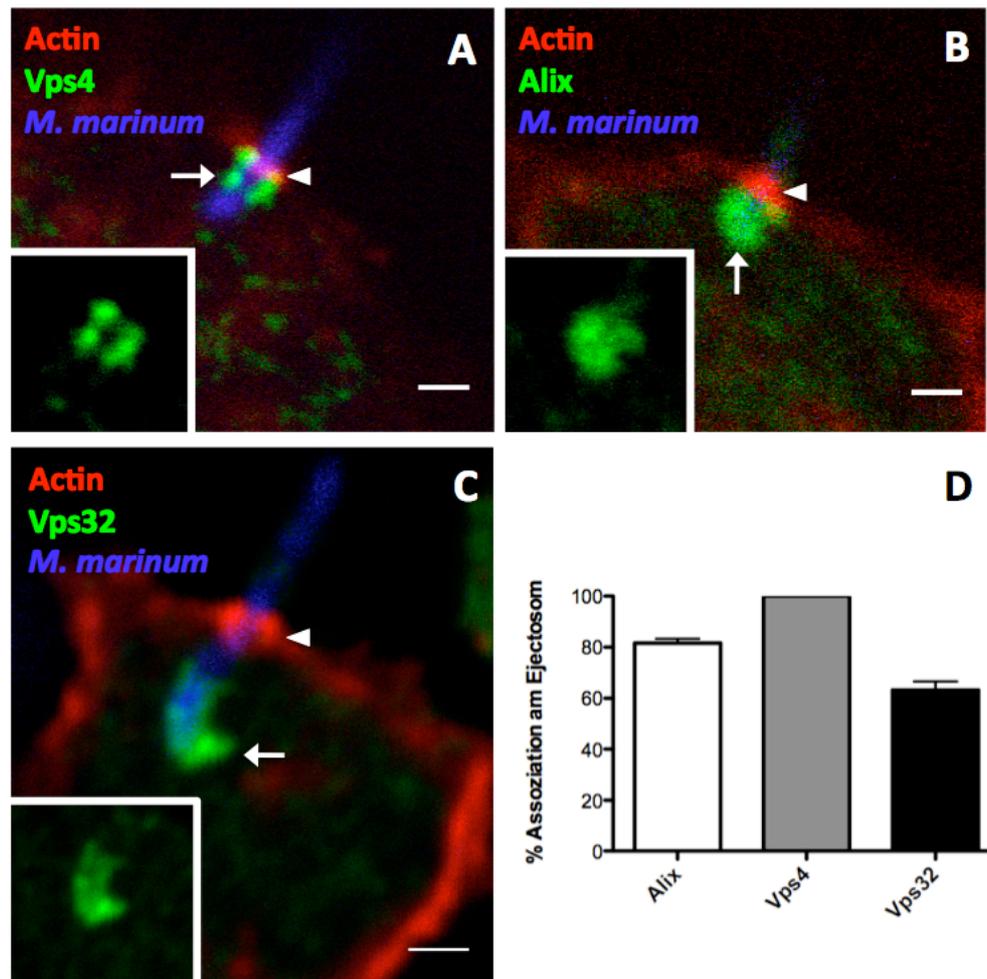


Abb. 3.15: ESCRT-Marker lokalisieren am distalen Pol austretender Bakterien oder an der Ejektosom-Struktur

Dictyostelium-Zellen, die unterschiedliche ESCRT-Maschinerie-Marker überexprimieren (Vps4, Alix und Vps32) wurden mit *M. marinum* infiziert, 24 hpi fixiert und mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie analysiert und quantifiziert. Aktin-Zytoskelett = rot, *M. marinum* = blau, Markerprotein = grün. (A – C) Repräsentative Aufnahmen der Lokalisationen des jeweiligen ESCRT-Markers. Während Alix (B) und Vps32 (C) am distalen Pol des Bakteriums akkumulieren, konnte eine deutliche Assoziation von Vps4 (A) um die Ejektosom-Struktur selbst detektiert werden. (D) zeigt, dass alle drei Marker-Proteine in 60-100 % der Fälle am Bakterium bzw. am Ejektosom lokalisieren (n=3).

Alle drei Marker der ESCRT-Maschinerie, Vps4, Alix und Vps32 lokalisieren am distalen Pol des austretenden Bakteriums (Alix, Vps32) oder an der Ejektosom-Struktur selbst (Vps4) (Abb. 3.15 A-D). Sowohl das ESCRT-III Protein Vps32 als auch das Adapterprotein Alix umhüllen den distalen Pol des Bakteriums in sehr ähnlicher Weise wie die beobachtete Atg8-positive Vakuolenstruktur. Dabei ist Alix in mehr als 80 % und Vps32 in mehr als 60 % der untersuchten austretenden Bakterien zu finden. Die ATPase Vps4, die für die Freisetzung der einzelnen ESCRT-Komponenten verantwortlich ist, zeigt hingegen eine deutliche Assoziation rund um die Ejektosom-Struktur selbst und eine Akkumulation an 100 % der dokumentierten Ejektionsprozesse.

Die Ergebnisse zeigen, dass die ESCRT-Proteine in hohem Maß am Pol der Bakterien (Alix und Vps32) oder an der Ejektosom-Struktur selbst (Vps4) lokalisieren.

3.2.2 ESCRT-Mutanten gelangen früher ins Zytoplasma und bilden mehr Ejektosomen

Um den Infektionsverlauf von *M. marinum* in *D. discoideum* Mutanten näher zu charakterisieren, wurden unterschiedliche ESCRT-Verlustmutationen infiziert und untersucht. Die Deletion des Faktors Tsg101, der für die Bindung an ubiquitinierte Zielmoleküle und die Rekrutierung von ESCRT-II und ESCRT-III verantwortlich ist, als auch eine Doppelmutante mit dem Verlust eines autophagosomalen und eines ESCRT-Faktors (*atg1- tsg101-*) wurden analysiert und der Einfluss auf die Etablierung des mykobakteriellen Kompartiments, den Austritt ins Zytoplasma und die Formation von Ejektosomen in *Dictyostelium*-Zellen untersucht. Der putative Kupfertransporter p80 ist ein später phagosomaler Marker, der während der gesamten Replikationsphase am mykobakteriellen Kompartiment akkumuliert ist, bis die Bakterien ins Zytoplasma ausbrechen⁶⁴. Die Anreicherung von p80 am mykobakteriellen Kompartiment wurde analysiert (Abb. 3.16) und in einem weiteren Schritt wurde die Anzahl an Ejektosomen-Strukturen in *tsg101-*, *tsg101-/atg1-* und *alix-* Zellen bestimmt (Abb. 3.17).

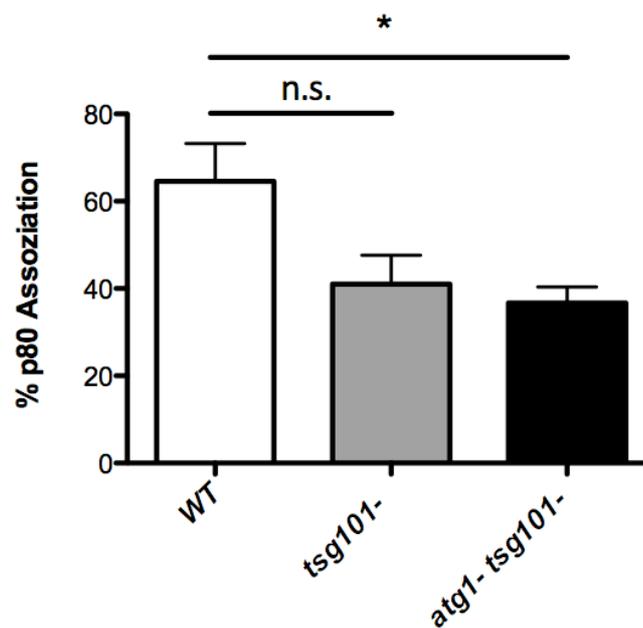


Abb. 3.16 Der Verlust von ESCRT-Faktoren führt zu einer reduzierten Assoziation von p80 an intrazellulären Mykobakterien

WT, *tsg101*- und *atg1-tsg101*- Zellen wurden mit *M. marinum* infiziert und 24 hpi fixiert. Die Zellen wurden mit anti-p80 gefärbt und die Akkumulation an *M. marinum* quantifiziert (n = 3). Die Assoziation von p80 an *M. marinum* ist in *tsg101*- reduziert (n.s.) und in der Doppelmutante signifikant reduziert (* p ≤ 0,05). Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des *students T-tests*.

In wildtypischen Zellen waren $64 \pm 8,6$ % der Mykobakterien mit p80 assoziiert (Ab. 3.16). Sowohl in *tsg101*- Zellen, als auch in der Doppelmutante, war hingegen eine Reduktion der Assoziation mit p80 zu beobachten. *tsg101*- Zellen wiesen mit $41 \pm 6,7$ % einen leicht reduzierten Anteil von p80 assoziierten Mykobakterien im Vergleich zum Wildtypen auf. In der Doppelmutante konnte eine signifikante Reduktion auf $37 \pm 3,7$ % beobachtet werden. Aufgrund der geringeren Assoziation der intrazellulären Mykobakterien mit dem phagosomalen Marker p80, könnten möglicherweise 24 hpi mehr Bakterien der infizierten Deletionsmutanten ins Zytoplasma gelangt sein. Um zu überprüfen, ob die Mutationen der ESCRT-Faktoren in den *Dictyostelium*-Zellen einen Einfluss auf die Bildung von Ejektosomen hat, wurden WT, *alix*-, *tsg101*- und *atg1-tsg101*- Zellen infiziert. Mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie wurde die Anzahl an Ejektosomen 6 und 24 hpi bestimmt (Abb. 3.17).

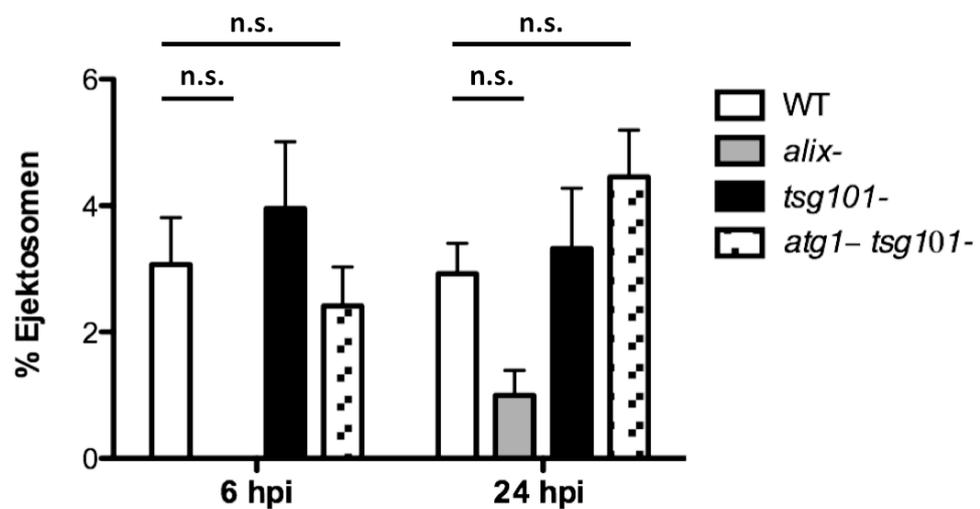


Abb. 3.17 ESCRT-Mutanten zeigen eine veränderte Anzahl an Ejektosomen im Vergleich zu wildtypischen *Dictyostelium*-Zellen

Die Anzahl der Ejektosomen wurde in ESCRT-Deletionsmutanten quantifiziert. Die unterschiedlichen *Dictyostelium*-Zellen wurden mit *M. marinum* infiziert und 6 und 24 hpi die Anzahl an Ejektosomen mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. n= 4-6

Sowohl *alix*- als auch *tsg101*- Zellen und die zweifache Deletionsmutante *atg1*- *tsg101*- zeigten keine signifikante Veränderung in der Anzahl an Ejektosomen im Vergleich zum Wildtypen. Auch wenn statistisch nicht signifikant belegbar, konnte die Tendenz einer Reduktion der Ejektosomen über die Zeit in *alix*- Zellen beobachtet werden. 24 hpi konnte außerdem ein leichter Anstieg der Ejektosomenanzahl in der Doppelmutante im Vergleich zu wildtypischen Zellen beobachtet werden (Abb. 3.17).

Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass sowohl die Deletion des ESCRT-Faktors Tsg101 als auch der doppelte Verlust von Atg1/Tsg101 zu einer geringeren Assoziation des phagosomalen Markers p80 führt. Dies deutet auf eine Rolle der ESCRT-Faktoren für die Translokation der Mykobakterien ins Zytoplasma hin. Wenn auch statistisch noch nicht belegt, konnte zudem gezeigt werden, dass in der Doppelmutante 24 hpi mehr Ejektosomen als im WT gebildet werden und der Verlust des ESCRT-Adapter-Proteins Alix zu einer Reduktion der Anzahl an Ejektosomen 24 hpi führt.

4. Diskussion

Die Erkenntnisse über die Aufnahme von pathogenen Mykobakterien durch die Wirtszelle und die adaptierten zellulären Prozesse wachsen stetig, jedoch ist über die Strategien des Austritts und die Verbreitung der Infektion noch relativ wenig bekannt. Mit Hilfe des *Dictyostelium/M. marinum*-Modellsystems wurde das Ejektosom identifiziert². Dabei handelt es sich um eine F-Aktin Struktur, die für die effiziente und nicht-lytische Übertragung von Mykobakterien von Zelle zu Zelle verantwortlich ist. Es konnte zudem eine Beteiligung sowohl wirtseigener, als auch mykobakterieller Faktoren an der Ausbildung von Ejektosomen nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die molekularen Mechanismen, die zur Ausbildung und Funktion des Ejektosoms führen untersucht.

4.1 Die Rolle der Autophagie beim nicht-lytischen Austrittsmechanismus im *Dictyostelium/M. marinum*-Modellsystem

In dieser Studie wurde eine neue Rolle für die Autophagie in der Aufrechterhaltung der Membranintegrität während des Austritts von Mykobakterien aus der Wirtszelle beschrieben. Bei der klassischen Autophagie handelt es sich um einen durch Stress induzierten zellulären Mechanismus zum Abbau von zytoplasmatischem Material²²⁷. Einige Komponenten der Autophagie-Maschinerie wurden spezifisch an den nicht-lytischen Austrittsprozess von *M. marinum* rekrutiert und ermöglichten eine effiziente Verbreitung der Bakterien von Zelle zu Zelle. Die am Pol des Bakteriums lokalisierte autophagosomale Vakuole erhält die Integrität der Plasmamembran von *D. discoideum* beim Austritt der Mykobakterien und schützt die Wirtszelle vor dem Zelltod.

Über die sogenannte selektive Autophagie werden nicht nur defekte intrazelluläre Kompartimente, wie Organellen, abgebaut, sondern auch Mikroorganismen können Ziel der Maschinerie sein (Xenophagie)¹³⁶. Als Teil des angeborenen Immunsystems in Säugerzellen werden sowohl zytoplasmatische Bakterien als auch Bakterien in Vakuolen erkannt und das bakterielle Wachstum durch die Degradation in Autophagosomen begrenzt^{139,241,242}. Autophagie ist auch in *D. discoideum* ein wichtiger Mechanismus, um bakterielles Wachstum zu beschränken. So konnte gezeigt werden, dass Faktoren der Autophagie zum Schutz gegen eine Infektion mit *S. typhimurium*²⁴³ oder *F. noatunensis*¹¹⁹ beitragen. Einige

Mikroorganismen haben allerdings Strategien entwickelt mit denen sie der autophagosomalen Maschinerie entkommen, diese unterdrücken oder für ihr eigenes Wachstum nutzen können²⁴⁴. Eine bislang unbekannt Interaktion zwischen *M. marinum* und der autophagosomalen Maschinerie wurde in dieser Arbeit näher untersucht. Der hier gezeigte kontrollierte Austrittsmechanismus der Mykobakterien (Abb. 3.12) scheint vor allem den Mykobakterien zu nutzen, da diese effizient, Antibiotika-insensitiv und ohne den Wirt zu beschädigen, von Zelle zu Zelle übertragen werden. Aber auch die Wirtszellen können von diesem Mechanismus profitieren, da die autophagosomale Membran vor einer Permeabilität der Plasmamembran und somit vor dem Zelltod schützt.

4.1.1 Die Rekrutierung der kanonischen Autophagie-Maschinerie an den Pol von *M. marinum*

Mit Hilfe der korrelativen Licht- und Elektronenmikroskopie konnten Membranen am Pol austretender Bakterien entdeckt werden. Die drei-dimensionale Rekonstruktion zeigte, dass eine Vakuole den kompletten, distalen Pol des Bakteriums umhüllte (Abb. 3.1, 3.2). Aufgrund der Ähnlichkeiten zu einem Phagophor wurde eine Beteiligung der Autophagie-Maschinerie mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie geprüft. Dabei konnten sowohl das für die autophagosomale Biogenese wichtige Protein Atg8^{154,155,245}, als auch Ubiquitin^{246,247} und das Adapterprotein SQSTM1²⁴⁸ spezifisch an austretenden Bakterien nachgewiesen werden (Abb. 3.3, 3.4). Diese Rekrutierung der Autophagieproteine an den Pol austretender Mykobakterien deutet auf einen spezialisierten und regulierten Mechanismus hin. Weder an intrazellulären noch an extrazellulären Bakterien wurde eine Akkumulation der drei Marker beobachtet. Daraus lässt sich schließen, dass die autophagosomale Membran in der Wirtszelle zurückbleibt und nicht am austretenden Bakterium haftet und mit diesem nach außen gezogen wird.

Die klassische Autophagie besteht aus folgenden grundlegenden Schritten: Signalinduktion, Nukleation der Membran, Bindung des Zielmoleküls, Ausdehnung der vesikulären Struktur (Phagophor) und Ausbildung des Autophagosomen, Fusion mit Lysosomen, Abbau des Zielmoleküls und Nährstoffaufbereitung¹⁴⁴. In dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass der Initiierungskomplex der Autophagie Atg1 (ULK1- in Säugern)^{249–251} essentiell für die Atg8-positiven Membran am distalen Pol austretender Bakterien ist. Durch die Deletion von Atg1

konnte weder eine Vakuole am Pol des austretenden Bakteriums in der EM (Abb. 3.7) noch eine Akkumulation von Atg8 in der Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 3.6) detektiert werden. Während alternative, nicht-kanonische Autophagie-Mechanismen (z.B. unter Glukose-Mangel) zeigen, dass die Rekrutierung von Atg8 auch unabhängig von der Initiierung durch den Atg1-Komplex verlaufen kann^{252,253}, wird die hier entdeckte Atg8-positive Struktur in Abhängigkeit von Atg1 gebildet. Auch eine Beteiligung von Prozessen wie der LC3(Atg8)-abhängigen Phagozytose^{254,255} kann somit ausgeschlossen werden.

Autophagosomale Proteine können zudem in Autophagie-unabhängigen Mechanismen, wie der Regulation der Endosomen-Lysosomen Fusion²⁵⁶ oder beim Vorantreiben pathogener Replikation (z.B. beim Equinen Arteritis Virus²⁵⁷)^{179,258,259}, eine Rolle spielen²⁴⁴. Aufgrund dessen wurde untersucht, ob weitere Proteine der klassischen Autophagie-Maschinerie in den nicht-lytischen Austrittsmechanismus von pathogenen Mykobakterien involviert sind. Atg1 rekrutiert Atg6, eine Untereinheit des PI3K-Komplexes, die für die Bindung weiterer ATG-Proteine (z.B. Atg18) an die wachsende Autophagiemembran (Phagophor) verantwortlich ist¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Atg5 und Atg7 sind Bestandteil zweier Ubiquitin-ähnlicher Konjugationsreaktionen¹⁵³, die für die Ausbildung eines reifen Autophagosoms erforderlich sind^{154,155}. Die durch die zwei Ubiquitin-ähnlichen Konjugationssysteme vermittelte autophagosomale Elongation der Membran ist ein wichtiger Bestandteil der Reifung von Autophagosomen. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Untereinheit des PI3K-Komplexes Atg6, als auch die Komponenten der *ubiquitin like conjugation* Maschinerie Atg5 und Atg7 von essentieller Bedeutung für die Rekrutierung der Atg8-positiven Membranen an den Pol austretender Bakterien ist. Während bei der Deletion von Atg6 des PI3K-Komplexes, wie auch schon von Calvo-Carrido *et al.*¹²⁹ beschrieben, keine vollständige Blockierung der Autophagie-Maschinerie und somit Rekrutierung von Atg8 beobachtet werden konnte, führte die Deletion von Atg5 als auch von Atg7 zu einem kompletten Verlust der Rekrutierung von Atg8 an den distalen Pol (Abb. 3.8).

Die Proteine Atg18 und PI(3)P (2x FYVE) werden an die frühe autophagosomale Struktur rekrutiert und sind von essentieller Bedeutung für die Reifung des Phagophors zum Autophagosomen^{235,260,261}. Die zusätzliche Präsenz von Atg18 und 2x FYVE am Ejektosom (Abb.3.9) deutet darauf hin, dass die Bildung der vakuolären Struktur an der Stelle der Ausschleusung durch die kanonische Autophagie-Maschinerie vermittelt wird. Obwohl die aus dem Ejektosom austretenden Bakterien nur teilweise eine Anreicherung von Atg18 und

2x FYVE aufweisen, scheint die autophagosomale Struktur einen gewissen Reifungsprozess zu durchlaufen. Zusätzliche Experimente mit dem *fluid-phase* Marker Dextran (Abb. 3.10) sollten Aufschluss darüber geben, ob eine Reifung zum Autolysosomen erfolgt. Es konnte jedoch keinerlei Dextran-Anreicherung am Pol des Bakteriums oder an der Ejektosomstruktur detektiert werden. Eine Fusion der autophagosomalen Vakuole mit Lysosomen und die Reifung zu einem abbauenden Kompartiment erscheint aufgrund dieser Beobachtung unwahrscheinlich.

Die Rekrutierung der autophagosomalen Vakuole an den Pol des Bakteriums ist strikt mit der Transmission der Mykobakterien und der Anzahl toter Zellen verbunden. Jedoch ist der Vorgang bzw. der Mechanismus der Rekrutierung ungeklärt. Sowohl wirtsspezifische als auch pathogene Faktoren könnten an der Aktivierung der Maschinerie oder Ausbildung der autophagosomalen Vakuole beteiligt sein. Es ist bekannt, dass über bestimmte Adaptermoleküle des Wirts die Autophagie-Maschinerie auch an Verletzungen der Plasmamembran rekrutiert werden kann²⁶². So erzeugt der Ausbruch von intrazellulären Erregern, wie z.B. *S. typhimurium*, Wunden in Membranen und führt zu einer vermehrten Exposition von β -Galactosid in der Plasmamembran und in Endosomen. Der wirtsspezifische zytoplasmatische Rezeptor Galectin-8 kann die verstärkte Exposition detektieren und über den Adapter NDP52 die Maschinerie der Autophagie aktivieren, um die Wirtszelle zu schützen^{132,262}. Bei der Infektion von *D. discoideum* mit *M. marinum* werden sowohl durch den Ausbruch aus dem Replikationskompartiment ins Zytoplasma als auch durch den nicht-lytischen Austritt des Bakteriums aus der Zelle Membranen beschädigt. Über einen ähnlichen Mechanismus der Detektion von Membranwunden durch Rezeptoren wie z.B. Galectin-8 in *D. discoideum*²⁶³ könnte eine wirtsspezifische Rekrutierung der autophagosomalen Membran an den Pol des Bakteriums zu erklären sein. Jedoch ist schon beim beginnenden Ejektosom-assoziierten Austritt eine Vakuole am Pol der Bakterien zu beobachten (Abb. 3.3). Zu diesem Zeitpunkt befindet sich die Plasmamembran einige Mikrometer vom distalen Pol des Bakteriums entfernt. Es ist unwahrscheinlich, dass die durch den Austritt verursachte Wunde in der Plasmamembran die Rekrutierung aktiviert. Um den Mechanismus der Rekrutierung zu verstehen, sind somit weitere Untersuchungen notwendig.

4.1.2 Die Lokalisation des mykobakteriellen Sekretionssystems ESX1 bestimmt nicht die Rekrutierung der autophagosomalen Vakuole

Die Voraussetzung zur Ausbildung von Ejektosomen und die gerichtete Zell-Zell Übertragung ist die Freisetzung von Mykobakterien ins Zytoplasma der Wirtszelle. Um den Einfluss des mykobakteriellen Sekretionssystems bei der Rekrutierung der autophagosomalen Vakuole an den Pol austretender Bakterien zu untersuchen, wurden avirulente *M. marinum* Δ RD1 und nicht-pathogene *M. smegmatis* ins Zytoplasma befördert. Das in der RD1-Region codierte ESX-1 Sekretionssystem^{86,87} ist ein Virulenzfaktor von Mykobakterien, ist hoch konserviert zwischen *M. tuberculosis* und *M. marinum*⁹⁷ und essentiell für den nicht-lytischen Austritt von *M. marinum* aus der Zelle². Nicht-pathogene Mykobakterien wie *M. smegmatis* sind nicht in der Lage die phagosomale Reifung zu arretieren und die Bakterien werden über diesen Weg abgebaut. Hingegen können avirulente Mykobakterien wie *M. marinum* Δ RD1 trotz Verlust des Virulenzfaktors die phagosomale Reifung blockieren, wobei jedoch die Mykobakterien nicht aus dem endosomalen Kompartiment ins Zytoplasma gelangen, ohne die im RD1-Lokus codierten Effektorproteine wie ESAT-6^{77,124}. Da avirulente und nicht-pathogene Mykobakterien die Translokation ins Zytoplasma nicht selbstständig bewerkstelligen können, müssen diese erst einmal dorthin transportiert werden. Für eine effiziente Freisetzung ins Zytoplasma wurden Co-Infektionen von wildtypischen *M. marinum* in Kombination mit den avirulenten oder nicht-pathogenen Mykobakterien durchgeführt. In der Studie von Carlsson *et al.* (2009) wurde gezeigt, dass die ESX1-Sekretionsmaschinerie an den Polen wachsender *M. marinum* akkumuliert und der Sekretionsprozess auch dort aktiv ist²³⁹. Aufgrund der spezifischen Rekrutierung der Autophagie-Maschinerie an den Pol austretender Bakterien wurde die Beteiligung der Lokalisation des ESX1-Sekretionssystems von pathogenen Mykobakterien eingehender untersucht. Sowohl avirulente Mykobakterien mit dem Verlust der RD1-Region (*M. marinum* Δ RD1) als auch nicht-pathogene Mykobakterien (*M. smegmatis*) konnten in den Co-Infektionsexperimenten über Ejektosomen die Zelle verlassen, als auch eine Atg8-positive Vakuole an den distalen Pol rekrutieren (Abb. 3.11). Die lokale Aktivität der RD1-Region und die spezifischen Virulenzfaktoren von *M. marinum* spielen bei der Ausbildung der autophagosomalen Vakuole um den Pol der Bakterien keine Rolle. Diese Ergebnisse deuten eher auf einen wirtsspezifischen Mechanismus hin, als auf einen Mechanismus bakteriellen Ursprungs. Da jedoch die Co-Infektionsmethode Limitierungen aufweist, kann eine Relevanz der

pathogenen Virulenzfaktoren der wildtypischen Bakterien auf die Rekrutierung der autophagosomalen Maschinerie und die Bildung von Ejektosomen nicht ausgeschlossen werden. So kann der Transport der avirulenten bzw. nicht-pathogenen Mykobakterien ins Zytoplasma ausschließlich über eine gemeinsame phagosomale Aufnahme mit wildtypischen Bakterien erfolgen. In Folge dessen könnten die avirulenten bzw. nicht-pathogenen Mykobakterien vom intakten Sekretionssystem und den sekretierten Virulenzfaktoren der wildtypischen Bakterien nicht nur bei der Freisetzung ins Zytoplasma profitieren, sondern auch bei der Ausbildung von Ejektosomen und der Rekrutierung der autophagosomalen Maschinerie.

4.1.3 Rekrutierung der autophagosomalen Vakuole verläuft unabhängig vom Adapterprotein SQSTM1

Bei der selektiven Autophagie werden spezifische Zielstrukturen erkannt und gezielt in Autophagosomen aufgenommen. Die Erkennung von Zielstrukturen verläuft über eine Interaktion von Adapterproteinen wie z.B. p62 (SQSTM1)^{264,265}, das sowohl eine Bindungsstelle für ubiquitinierte Strukturen als auch für das autophagosomale Protein Atg8 besitzt²⁴⁶. Am distalen Pol austretender Mykobakterien konnte eine Anreicherung von Ubiquitin und SQSTM1 nachgewiesen werden (Abb. 3.4). Über eine Exposition spezifischer mykobakterieller Faktoren auf der Membran wird vermutlich die Rekrutierung der beiden Autophagie-assoziierten Proteine vermittelt. In *D. discoideum*-Zellen, die eine Deletion von Atg1 aufwiesen, konnte eine Reduktion der Ubiquitinierung von aus dem Ejektosom austretenden Mykobakterien beobachtet werden (Abb. 3.6). Möglicherweise trägt die Autophagie-Maschinerie auf bestimmte Weise zu einer sterischen Stabilisierung der Ubiquitinierung bei. Auch in Abwesenheit des Adaptermoleküls SQSTM1 kann eine Rekrutierung von Atg8 im *D. discoideum*/*M. marinum* Modellsystem erfolgen (Abb. 3.8). Die Existenz anderer Adaptermoleküle, die die Aktivierung der Autophagie-Maschinerie vermitteln können, ist somit wahrscheinlich. In Säugerzellen sind vier Adapterproteine (SQSTM1, NDP52, NBR1 und Optineurin) bekannt, die zu einer maximalen Ausbeute der Erkennung von zytoplasmatischen Pathogenen und der Aktivierung der Autophagie führen¹³⁰. Die durch *M. tuberculosis* verursachte phagosomale Permeabilisierung führt zu einer Ubiquitinierung und anschließend zu einer p62 (SQSTM1) oder NDP52-vermittelten

Autophagie-Aktivierung in Säugerzellen¹⁸⁰. In *D. discoideum* ist bisher nur SQSTM1 als mögliches Adaptermolekül bekannt. Orthologe für NDP52, Optineurin oder NRB1 wurden in der Literatur bislang nicht beschrieben. Auch die gleichzeitige Bindung mehrerer Adaptermoleküle, um Autophagie zu aktivieren, scheint möglich. So konnte zum Zeitpunkt der maximalen Atg8-Assoziation von *Salmonella typhimurium* eine Rekrutierung sowohl von Ubiquitin als auch von Galectin-8 beobachtet werden, die vermutlich p62 (SQSTM1), Optineurin und NDP52 parallel rekrutieren^{130,262,266}. Die Komplementierung beim Fehlen eines Adapters scheint somit möglich und die Existenz weiterer Adaptermoleküle in *D. discoideum* sehr wahrscheinlich.

4.1.4 Plasmamembranintegrität und effiziente Transmission der Bakterien werden durch die kanonische Autophagie-Maschinerie vermittelt

Die Induktion der Autophagie im Kontext einer Infektion kann von Vorteil für einen Erreger sein, sich aber auch nachteilig auswirken. Während die Rolle der Autophagie bisher vor allem in der Erkennung des Erregers, der Abtötung^{139,241,242} oder der Gewährleistung einer erfolgreichen Replikation^{244,257} von Pathogenen bestand, konnte im *Dictyostelium*/Mykobakterien-Modellsystem gezeigt werden, dass die Autophagie-Maschinerie essentiell für die Aufrechterhaltung der Plasmamembranintegrität beim Ejektionsprozess (Abb.3.14) und für eine effiziente Übertragung der Mykobakterien von Zelle zu Zelle ist (Abb.3.12). Plasmamembranschäden können über verschiedenste Mechanismen unter Einbeziehung intrazellulärer Kompartimente, wie: Endozytose²⁶⁷, Verwendung von intrazellulären Membranen als Wundpflaster²⁶⁸ und Exozytose von beschädigten Membranbestandteilen²⁶⁹, repariert werden. Während die Fusion der Ca²⁺-regulierten Exozytose von Lysosomen mit verwundeten Teilen der Plasmamembran²⁷⁰ der erste identifizierte Lysosomen-assoziierte Reparaturmechanismus war, konnte vor kurzem in Säugerzellen gezeigt werden, dass auch der ESCRT-Maschinerie eine wichtige Rolle bei der Reparatur von Wunden in der Plasmamembran zukommt^{193,194}. Mit Hilfe der ESCRT-Proteine werden Membranwunden als Vesikel in den extrazellulären Raum abgeschnürt, um die Integrität der Membran wieder herzustellen. Beim hier untersuchten Ausbruch der Mykobakterien durch das Ejektosom entsteht eine große Wunde in der Plasmamembran, aber ein Sterben der wildtypischen Wirtszellen konnte nicht beobachtet werden². Der Verlust einer intakten Autophagie-Maschinerie führte hingegen zu einer verstärkten

Permeabilität infizierter Zellen und einer zunehmenden Anzahl toter Zellen. Die Autophagie-Maschinerie könnte zur schnellen Mobilisierung von großen „Flächen“ beitragen und so als Membranlieferant zum Erhalt der Membranintegrität und der Reparatur der Plasmamembran im Infektionsmodell dienen.

Obwohl die Autophagie-Maschinerie zwar keinen Einfluss auf die Bildung von Ejektosomen hat, konnte gezeigt werden, dass diese essentiell für eine effiziente Zell-Zell-Übertragung von *M. marinum* aus der Wirtszelle ist (Abb. 3.12). Autophagie-vermittelte Mechanismen können bei der Freisetzung und Verbreitung von intrazellulären Pathogenen wie Bakterien²⁷¹ und Viren^{272–276} eine entscheidende Rolle spielen. Auch wenn bislang keine konkreten Modelle über mögliche molekulare Mechanismen existieren, konnte beobachtet werden, dass die autophagosomale Doppelmembranstruktur für eine effiziente Replikation und die nicht-lytische Freisetzung von RNA-Viren, wie z.B. Polio-Viren²⁷³, verantwortlich ist. Außerdem werden Autophagie-Komponenten an die bakterielle Vakuole von *Brucella abortus* rekrutiert und sind für die bakterielle Ausbreitung des Bakteriums von Zelle zu Zelle notwendig²⁷⁷. Auch die effiziente Freisetzung und Verbreitung des Coxsackievirus B ist auf eine Interaktion mit der autophagosomalen Maschinerie zurück zu führen²⁷⁵. In dieser Arbeit konnten die autophagosomalen Proteine ausschließlich an zytoplasmatischen, aus dem Ejektosom austretenden Bakterien gefunden werden. Bei Infektionsmodellen mit *B. abortus* konnte hingegen eine Rekrutierung von Autophagie-Markern an eine bereits bestehende bakterielle Replikationsvakuole gezeigt werden²⁷⁷. Die Konversion der Vakuole in eine Vakuole mit autophagosomalen Eigenschaften ist für die Verbreitung des intrazellulären Erregers von essentieller Bedeutung. Die Freisetzung von *Brucella* führte zu keiner erhöhten Sterberate infizierter Zellen²⁷⁷. Ähnlich wie bei dem in dieser Arbeit beschriebenen Autophagie-abhängigen Austrittsmechanismus von *M. marinum*, ist die autophagosomale Maschinerie auch für die effiziente Verbreitung der intrazellulären *Brucella*-Bakterien von Zelle zu Zelle notwendig.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Autophagie-Maschinerie für die nicht-lytische Zell-Zell Übertragung von *M. marinum* aus *D. discoideum* notwendig ist. Vermutlich dient die autophagosomale Membran am distalen Pol austretender Bakterien als eine Art Abdichtung der Plasmamembran, wenn die Mykobakterien durch die Ejektosom-Struktur aus der Zelle brechen und eine große Wunde in der Plasmamembran hinterlassen (Abb. 4.1). Der Verlust der autophagosomalen Maschinerie und somit der polaren Vakuole am

Bakterium führt möglicherweise zu einer verstärkten Permeabilität der Membran am Ejektosom und zum Zelltod der Wirtszelle. Während Autophagie schon im Zusammenhang mit der Reparatur von kleinen, durch *nanosecond pulsed electric fields* (nsPEF) entstandene Wunden nachgewiesen werden konnte²⁷⁸, kommt der autophagosomalen Maschinerie hier eine neue Rolle als Wundheilungs-Mechanismus von großen Plasmamembranwunden zu.

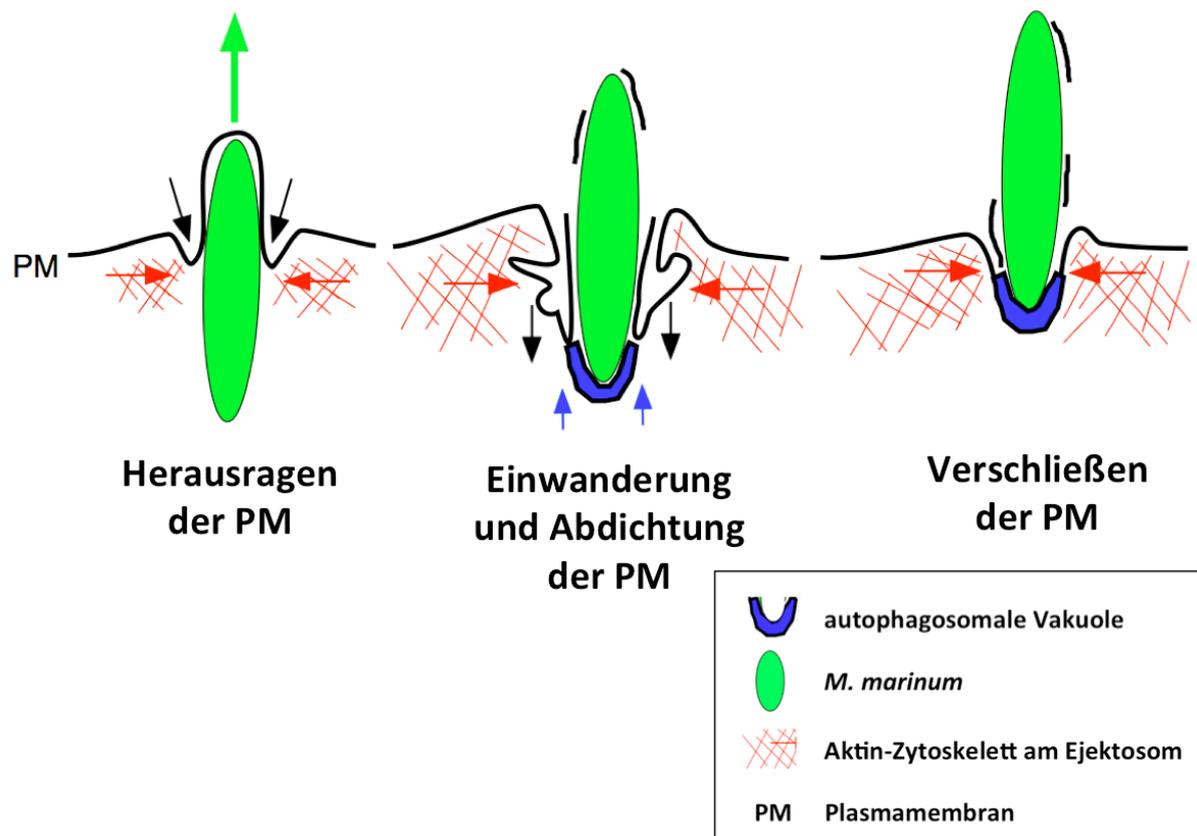


Abb. 4.1: Modell des autophagosomalen Verschlussmechanismus einer Ejektosomen-assoziierten Wunde in der Plasmamembran

M. marinum kann über einen nicht-lytischen Mechanismus aus der Wirtszelle *D. discoideum* gelangen. Die F-Aktin-Struktur, das Ejektosom, befindet sich rund um das auszuschleusende Bakterium. Die Plasmamembran der Wirtszelle ragt zunächst heraus, wandert während das Bakterium nach außen dringt weiter nach innen ein und dichtet die Zelle ab. An den Pol des Bakteriums wird eine autophagosomale Vakuole rekrutiert, die das Bakterium auf dem Weg aus der Zelle begleitet und die entstandene Wunde in der Plasmamembran vermutlich verschließt.

4.2 Die Rolle der ESCRT-Maschinerie als Plasmamembranreparatur-Mechanismus beim nicht-lytischen Austritt von *M. marinum*

Aufgrund der neuen Rolle von Autophagie in der Aufrechterhaltung der Membranintegrität während des Austritts von Mykobakterien aus der Wirtszelle, wurde eine Reihe von Lokalisationsexperimenten zur Abklärung einer Interaktion mit anderen

Plasmamembranreparaturmechanismen durchgeführt. Der für Säugerzellen beschriebene ESCRT-abhängige Reparaturmechanismus ist Ca^{2+} -abhängig^{193,194}. Ca^{2+} ist ein wichtiges Signalmolekül bei der Induktion von Plasmamembranreparaturmechanismen^{193,194,212,267,269,279}. Auch in *D. discoideum* konnte gezeigt werden, dass Ca^{2+} ein wichtiges Signalmolekül für die schnelle Induktion von Wundreparatur-Mechanismen ist²⁸⁰. Innerhalb von Sekunden werden Proteine der ESCRT-Maschinerie in Abhängigkeit von Ca^{2+} an Plasmamembranwunden rekrutiert und der verletzte Teil durch eine extrazelluläre Abschnürung repariert^{193,194}. Dieser Mechanismus ist deutlich von der Abschnürung eines Membranbläschens (*blebbing*) oder der Aktin-vermittelten großräumigen Entfernung verletzter Membranregionen zu unterscheiden^{279,281}. Während die ESCRT-Maschinerie vor allem für die Reparatur kleiner Wunden (< 100 nm) in Säugerzellen¹⁹³ oder von größeren Wunden in Muskelzellen¹⁹⁴ verantwortlich ist, konnte in dieser Studie beobachtet werden, dass Autophagie essentiell für die Erhaltung der Integrität der Membran in infizierten *D. discoideum* ist. Es stellte sich die Frage, ob eine Interaktion von Autophagie mit der ESCRT-Maschinerie für die Reparatur größerer Wunden, die durch den nicht-lytischen Austritt von *M. marinum* entstehen, stattfindet. Vor allem die Proteine des ESCRT-III-Komplexes, in Kombination mit Vps4 (Disassemblierungskomplex, ATPase) sind essentiell für die Reparatur der Plasmamembran¹⁹³. Aber auch das Adapterprotein Alix scheint für eine effiziente Reparatur in Muskelzellen notwendig zu sein¹⁹⁴. Die Lokalisation dieser drei Proteine wurde mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie an austretenden Bakterien untersucht. Die ESCRT-Proteine Alix und Vps32 lokalisieren in sehr ähnlicher Weise wie die autophagosomalen Marker am Pol des Bakteriums. Das deutet darauf hin, dass sie mit der polaren Vakuole assoziieren. Im Gegensatz dazu, akkumuliert Vps4 direkt an der Ejektosom-Struktur (Abb. 3.15). Vps4 ist eine ATPase, die durch die Hydrolyse von ATP Energie für die Disassemblierung der ESCRT-III-Proteine bereitstellt^{202,201,204,203,282}. Die charakteristische Akkumulation der ATPase Vps4 an der Ejektosom-Struktur könnte darin begründet sein, dass Vps4 die Energie für einen ESCRT-III-Komplex abhängigen Abschnürungsprozess der verwundeten Membranregion beim Austritt von *M. marinum* liefert. Somit könnte Vps4 im Austrittsprozess des Bakteriums und bei der nachfolgenden Reparatur der Austrittsstelle eine bedeutende Rolle spielen.

In Säugerzellen konnte eine mögliche Interaktion zwischen Autophagie und ESCRT-Maschinerie bislang nur bei der Fusion von MVB's des endosomalen Systems mit

Autophagosomen zum Hybridkompartiment, dem Amphisom²⁸³, und einer anschließenden Fusion mit Lysosomen beobachtet werden^{283–288}. Das Amphisom ist eine Doppelmembran-Struktur, die sowohl Marker der Autophagie als auch der ESCRT-Maschinerie aufweist^{286,289}, sie könnte somit potenzieller Ursprung der beobachteten polaren Struktur austretender Bakterien sein. In einer Studie mit humanen Retikulozyten konnte gezeigt werden, dass LC3(Atg8)-positive MVB`s mit der Plasmamembran fusionieren und den Inhalt exozytieren können²⁹⁰. Amphisomen konnten bislang nicht in *D. discoideum* beschrieben werden. Da aber sowohl die konservierten Mechanismen der Autophagie als auch die ESCRT-Maschinerie in *D. discoideum* vorhanden sind, liegt es nahe, dass auch Amphisomen in diesem Modellorganismus existieren. Sowohl die Rekrutierung und Aktivierung der autophagosomalen, als auch der ESCRT-Proteine erfolgt über eine Bindung an ubiquitinierte Zielmoleküle^{246,197}. Die spezifische Ubiquitin-Anreicherung an austretenden Bakterien im Vergleich zu zytoplasmatischen Bakterien (Abb. 3.4) könnten ein Indiz für ein mögliches Bindungsmuster beider Mechanismen sein. Eine Vielzahl von Überlappungen zwischen MVB-Biogenese und Autophagie existieren^{291,292} und machen eine Interaktion als Membranreparatursystem in diesem Infektionsmodell möglich.

Um den Einfluss der ESCRT-Maschinerie auf die Bildung von Ejektosomen zu untersuchen, wurden die Deletionsmutanten *alix-* und *tsg101-* im Vergleich zum Wildtypen charakterisiert. Alix ist ein wichtiges Adapterprotein für die Rekrutierung der ESCRT-III- und Vps4-Komplexe an verletzte Membranregionen¹⁹⁴. Tsg101 ist Teil des ESCRT-I-Komplexes und bindet einerseits ubiquitinierte Zielmoleküle, und interagiert andererseits mit dem Adapterprotein Alix^{194,197}. In Hinblick auf die Bildung von Ejektosomen scheinen die ESCRT-Proteine keine entscheidende Rolle zu spielen, da die Deletionen unterschiedlicher Faktoren zu keiner signifikanten Veränderung in der Anzahl der Ejektosomen im Vergleich zum Wildtypen führte (Abb. 3.17). Während Alix für die Rekrutierung der für die Plasmamembranreparatur verantwortlichen ESCRT-Faktoren in Säugerzellen notwendig ist, konnte zwar eine Akkumulation von Tsg101 an verwundeten Membranen beobachtet werden, jedoch ist die Rolle von Tsg101 als Teil des ESCRT-Maschinerie assoziierten Reparatursystems nicht vollständig geklärt¹⁹⁴. Die deutliche Akkumulation von ESCRT-Proteinen wie Alix an der polaren Struktur austretender Mykobakterien (Abb. 3.15) lässt vermuten, dass die ESCRT-Maschinerie als Teil eines Plasmamembranreparaturmechanismus dazu beitragen könnte, dass die Wirtszellen beim nicht-lytischen Austritt der Bakterien intakt

bleiben. Ein Beitrag der ESCRT-Maschinerie bei der Ausbildung der Ejektosomstruktur konnte ausgehend von den vorliegenden Daten nicht nachgewiesen werden. Auch schon bei defekter Autophagie-Maschinerie in *atg1*- Zellen konnte gezeigt werden, dass die Faktoren der Autophagie, die an der vakuolären Membran akkumulieren, nicht an der Ausbildung, sondern an der Funktion von Ejektosomen beteiligt sind.

Schon vorhergehende Experimente konnten zeigen, dass der späte phagosomale Marker p80 während der gesamten Replikationsphase der Bakterien am bakteriellen Kompartiment akkumuliert⁶⁴. Um herauszufinden, ob die Deletion des ESCRT-Faktors Tsg101 und die Deletion von Tsg101 in Kombination mit Atg1 eine Auswirkung während der bakteriellen Replikation im phagosomalen Kompartiment hat, wurde die p80 Akkumulation quantifiziert. Eine reduzierte p80 Akkumulation an bakteriellen Kompartimenten konnte vor allem in der Doppelmutante *atg1-/tsg101*- beobachtet werden. Auch in *tsg101*- Zellen wurde eine deutliche, wenn auch bislang nicht signifikante, Reduktion festgestellt (Abb. 3.16). Vermutlich brechen die Bakterien aufgrund der Deletion zu einem früheren Zeitpunkt aus dem mykobakteriellen Kompartiment ins Zellinnere aus. Möglicherweise könnte der Ausbruch zu einem früheren Zeitpunkt als wildtypische Bakterien zu einer verstärkten Bildung von Ejektosomen zu diesem Zeitpunkt führen. Diese Vermutung ist allerdings bislang nicht belegbar. Auch eine verstärkte Replikation in den Deletionsmutanten könnte dazu führen, dass Bakterien früher aus dem Kompartiment ins Zytoplasma gelangen. Außerdem müssten auch *atg1*- Zellen als Kontrolle mitgeführt werden, um auszuschließen, dass die verminderte p80 Akkumulation und eine mögliche verstärkte Replikation nicht auf die defekte Autophagie-Maschinerie zurück zu führen ist. Welche Funktion der ESCRT-Maschinerie in Hinblick auf die Aufrechterhaltung des nicht-lytischen Austrittsmechanismus von *M. marinum* zukommt, bleibt noch zu untersuchen.

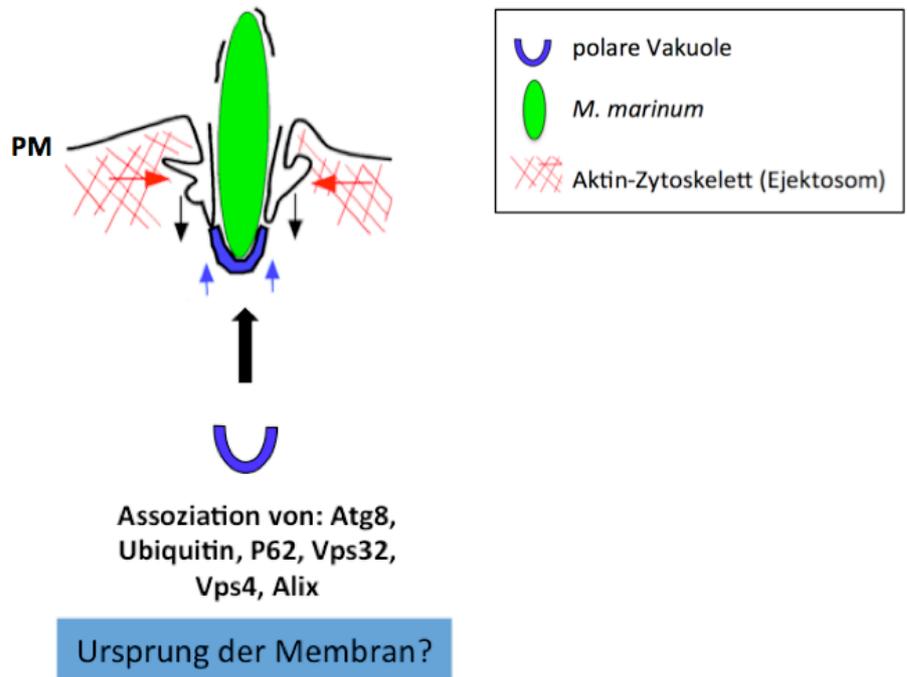
Das Wissen über Interaktion von Pathogenen wie *M. marinum* mit zellulären Systemen des Wirts, wie Autophagie oder ESCRT-Maschinerie, wächst kontinuierlich. Die in dieser Studie nachgewiesene unerwartete Interaktion beider Systeme zeigt die Komplexität der Wirt-Pathogen Interaktion. Sowohl Wirt als auch Pathogen haben im Laufe der Evolution ein Gleichgewicht an Virulenz- und Abwehrmechanismen entwickelt, das von Vorteil für beide Organismen ist.

Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine nicht-intakte Autophagie-Maschinerie zu einer verminderten Zell-Zell-Übertragung der Mykobakterien, einer verstärkten Permeabilität der Membran und in Folge zum Zelltod der Wirtszellen führt. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde vermutet, dass die beobachtete autophagosomale Vakuole am Pol der Bakterien als eine Art Abdichtung der Plasmamembran fungiert, um die durch den Ausbruch der Mykobakterien verursachte Wunde in der Membran zu schließen. Die Akkumulation von Proteinen der Autophagie (Atg8, Ubiquitin, SQSTM1) als auch der ESCRT-Maschinerie (Vps32, Alix) an der vakuolären Struktur am Pol der Bakterien weisen auf eine Beteiligung beide Mechanismen an der nicht-lytischen Ausschleusung der Mykobakterien hin. Aufgrund der Vielzahl von Überlappungen zwischen MVB-Biogenese und Autophagie^{291,292} scheint eine Interaktion der beiden Maschinerien als Membranreparatursystem in diesem Infektionsmodell möglich. Allerdings steht der Beweis einer funktionellen Interaktion von Autophagie und der ESCRT-Maschinerie als Plasmamembranreparatursystem beim nicht-lytischen Austritt von *M. marinum* aus *D. discoideum* noch aus.

Eine bekannte Interaktion von Autophagosomen und MVBs ist eine Hybridstruktur, bekannt als Amphisom²⁸³ (Abb. 4.2). Da bisher gezeigt werden konnte, dass sowohl autophagosomale als auch ESCRT-Proteine an der in dieser Arbeit beschriebenen polaren Vakuole austretender Bakterien akkumulieren, erscheint eine Amphisom-Struktur als potenzieller Ursprung der polaren Vakuole möglich. Zusätzliche Untersuchungen der Beteiligung von endosomalen Markern, wie Rab5, Rab7, p80, Markern des Golgi-Apparats (z.B. Golvesin²⁹³) oder des endoplasmatischen Retikulums (ER)'s (z.B. Calreticulin und Calnexin²⁹⁴) könnten weiteren Aufschluss über die beobachtete polare Membranstruktur geben (Abb. 4.2).

A



B

möglicher Ursprung der Membran

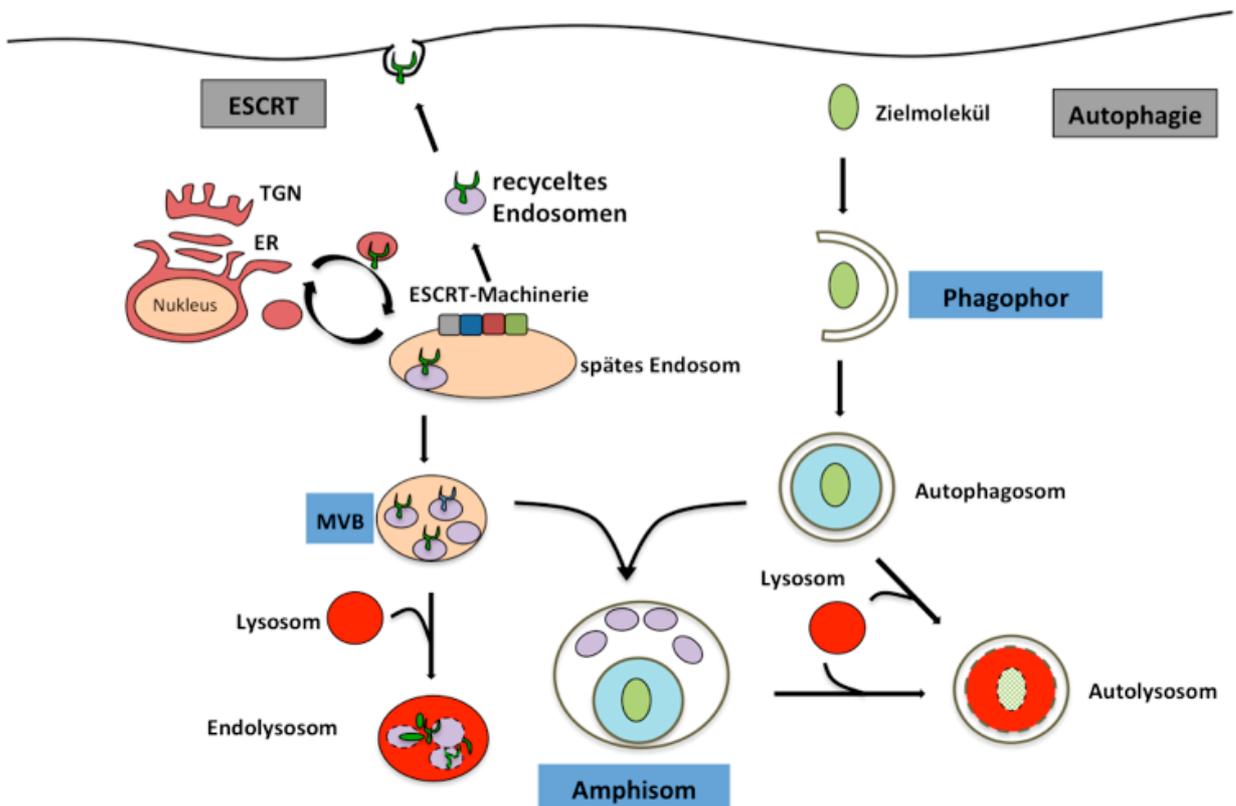


Abb. 4.2: Schematische Darstellung des möglichen Ursprungs der beobachteten Vakuole am Pol von Ejektosom-assoziierten Mykobakterien

(A) Sowohl autophagosomale als auch ESCRT-Faktoren akkumulieren am distalen Pol von Ejektosom-assoziierten Mykobakterien. (B) zeigt mögliche Quellen für Membranen, die sowohl ESCRT-Maschinerie-Marker aufweisen als auch autophagosomale Marker. Während Marker der ESCRT-Maschinerie an endosomalen Strukturen wie bei der Formation von multivesikulären Körperchen (MVB) zu finden sind oder aber an der Membran von zu recycelten Endosomen, können autophagosomale Marker an verschiedenen Stadien der autophagosomalen Reifung lokalisieren. Eine Akkumulation von Markern beider Mechanismen ist auf der Amphisom-Membran (ein Fusionskompartiment aus MVB und Autophagosom) zu beobachten.

Mit Hilfe von Co-Lokalisationsstudien von ESCRT- und autophagosomalen Faktoren an der vakuolären Struktur in derselben Zelle könnte eine Interaktion der beiden Mechanismen untersucht werden (Abb. 4.3). Sowohl auf lichtmikroskopischer Ebene als auch mittels EM sollten die Faktoren an der polaren Vakuole untersucht werden. Mittels *fluorescence resonance energy transfer* (FRET)-Technik²⁹⁵ könnte außerdem ermittelt werden, ob eine funktionelle Interaktion zwischen Autophagie- und ESCRT-Proteinen vorliegt. Nachdem gezeigt werden konnte, dass das Adapterprotein Alix, Vps32 als Teil des ESCRT-III-Komplexes und der Disassemblierungskomplex Vps4 am nicht-lytischen Ausschleusungsprozess von *M. marinum* lokalisieren, bleibt eine mögliche Beteiligung weiterer ESCRT-Komplexe, wie z.B. der ESCRT-0- und ESCRT-I-Komplex zu untersuchen. Sowohl das Protein Tom1²⁹⁶ (Vorläufer der ESCRT-0-Maschinerie) in *D. discoideum* als auch Proteine der ESCRT-II-Familie sind evolutionär konserviert und könnten im *D. discoideum*/*M. marinum*-Modellsystem analysiert werden. Die Lokalisation der GFP-markierten Überexpressionskonstrukte könnte mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie auf eine Akkumulation am Ejektosom untersucht werden. Des Weiteren stellt sich die Frage, ob es sich bei der beobachteten Akkumulation der ESCRT-Proteine um eine spezifisch Anreicherung am austretenden Bakterium handelt oder ob auch intrazelluläre Bakterien eine Anreicherung aufweisen.

Durch Entfernen bestimmter Faktoren der autophagosomalen (*atg1-*, *atg5-*, *atg6-* *atg7-*, *sqstm1-*) und ESCRT-Maschinerie (*alix-*, *tsg101-*) konnte deren Einfluss auf den nicht-lytischen Austritt durch das Ejektosom untersucht werden. So wie in Zellen ohne intakte Autophagie-Maschinerie (*atg1-*) konnte in *knockout*-Zelllinien der ESCRT-Faktoren kein signifikanter Unterschied in der Bildung von Ejektosomen im Vergleich zu wildtypischen Zellen beobachtet werden. Um die Rolle der ESCRT-Proteine bei der Verbreitung der Bakterien bzw. die Funktionalität des Ejektosoms zu untersuchen, müssen ESCRT-*knockout*-Zelllinien mittels Transmissions-Assay charakterisiert werden. Der Einfluss von ESCRT-Faktoren auf die Rekrutierung der autophagosomalen Maschinerie (in Form einer Atg8-

Akkumulation) sollte in den ESCRT-*knockout*-Zellen mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie eingehender untersucht werden (Abb. 4.3).

Auch bei der Regulation der Autophagie scheint der ESCRT-Maschinerie eine zentrale Bedeutung zu zukommen. In Säugerzellen konnte gezeigt werden, dass der Verlust von Genen der ESCRT-Maschinerie zu einer verstärkten Anreicherung von Autophagosomen führt²⁹⁷⁻²⁹⁹. Es wird vermutet, dass die ESCRT-Maschinerie für den Fusionsprozess von Autophagosomen mit Lysosomen und Endosomen benötigt wird, so dass eine nicht-funktionelle ESCRT-Maschinerie zu einer verstärkten Akkumulation von Autophagosomen führen könnte³⁰⁰. Mittels EM könnte im *M. marinum*/*D. discoideum* Modellsystem untersucht werden, ob eine Deletion der ESCRT-Maschinerie zu einer verstärkten Autophagosomen-Akkumulation am Ejektosom führt und der ESCRT-Maschinerie damit eine regulatorische Funktion bei der mykobakteriellen Transmission zukommt.

Der Mechanismus der Plasmamembranreparatur in Zusammenhang mit der Autophagie- und ESCRT-Maschinerie ist bislang ungeklärt und bleibt zu untersuchen. Unmittelbar nach Behandlung mit dem permeabilisierenden Detergenz Digitonin erfolgt, sowohl in Säugerzellen¹⁹³ als auch in *D. discoideum* (Jason King, Universität Sheffield, UK, nicht publiziert), eine Rekrutierung von Proteinen des ESCRT-III-Komplexes an die verwundeten Stellen der Membran. Der ESCRT-vermittelte Reparaturprozess der Plasmamembran scheint somit ein konservierter Mechanismus zu sein. Um herauszufinden, ob weitere ESCRT-Faktoren, wie Vps4 oder des ESCRT-0, ESCRT-I oder ESCRT-II-Komplexes, an dieser Art von Reparaturmechanismus in *D. discoideum* beteiligt sind, sollten weitere Experimente mit Digitonin durchgeführt werden (Abb. 4.3).

Die Lokalisation der ATPase Vps4 unterscheidet sich maßgeblich von anderen untersuchten ESCRT-Faktoren, Alix und Vps32. Vps4 lokalisiert nicht am Pol des Bakteriums, sondern direkt an der Ejektosom-Struktur. Vps4 könnte möglicherweise die Energie für den ESCRT-involvierten Mechanismus zur Reparatur von Wunden in der Plasmamembran beim Ausbruch von Mykobakterien liefern. Mit Hilfe von Lokalisationsexperimenten einer dominant-negative Mutante von Vps4, die keine Funktionalität mehr aufweist, könnten Erkenntnisse über die Funktion dieses Faktors in Hinblick auf den Reparaturmechanismus in *D. discoideum* gewonnen werden (Abb. 4.3).

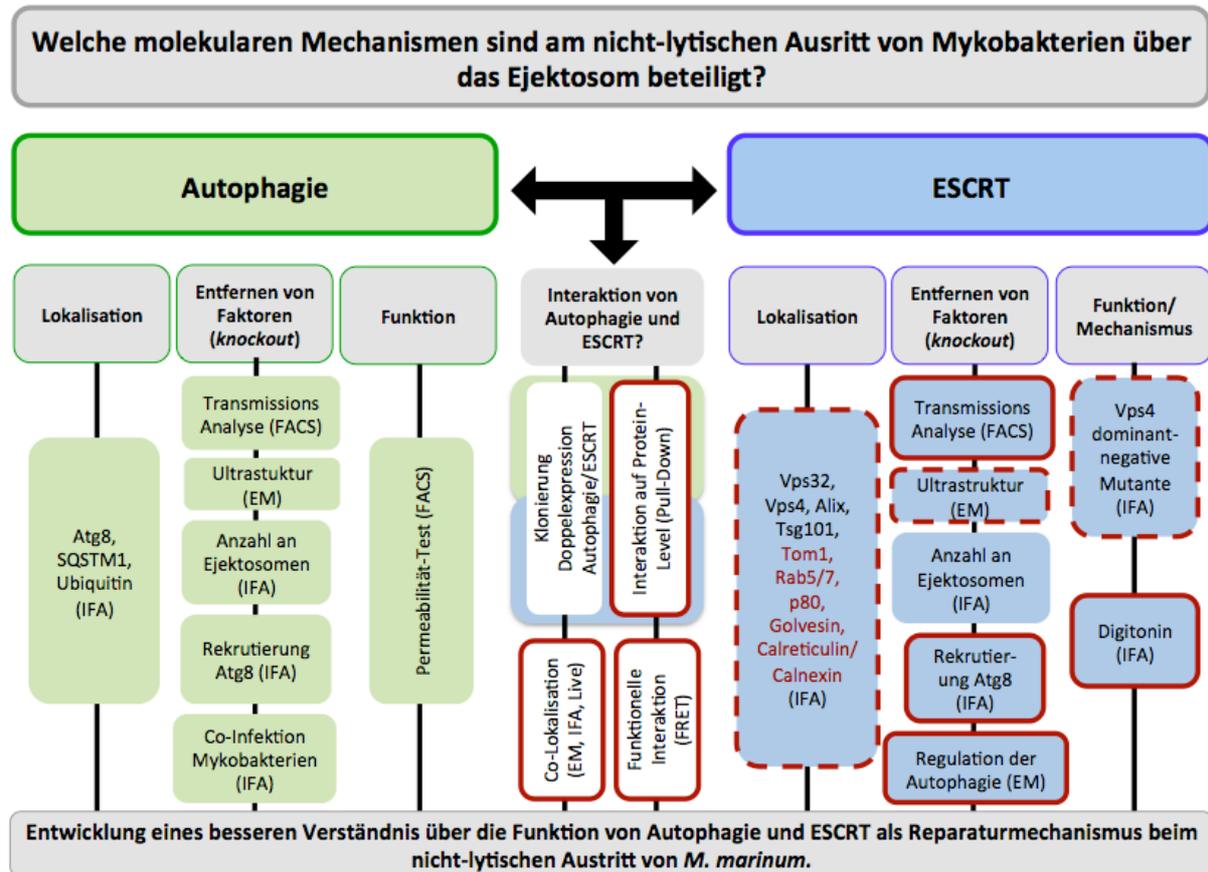


Abb. 4.3: Überblick über vorhergehende und geplante Experimente

Die grundlegende Fragestellung dieser Arbeit war welche molekularen Mechanismen dem nicht-lytischen Austritt von Mykobakterien über das Ejektosom zugrunde liegen. Sowohl die Autophagie (grün) als auch die ESCRT-Maschinerie (blau) sind am Austrittsmechanismus beteiligt. Die Lokalisation, die Untersuchungen von *knockout*-Zellen (Entfernen bestimmter Faktoren) und die jeweilige Funktion der Autophagie bzw. der ESCRT-Maschinerie wurden in unterschiedlichen Experimenten untersucht. Auch eine Interaktion zwischen den beiden Mechanismen soll anhand verschiedener Versuche analysiert werden. Versuche, die schon durchgeführt wurden, sind nicht umrandet. Die rot-umrandeten Versuche sind noch ausstehende Experimente. Die gestrichelte rote Linie bedeutet, dass mit diesen Untersuchungen schon begonnen wurde, jedoch noch keine aussagekräftigen Resultate erzielt werden konnten.

VI. Literaturverzeichnis

1. WHO | Global tuberculosis report 2015. auf http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
2. Hagedorn, M., Rohde, K. H., Russell, D. G. & Soldati, T. Infection by Tubercular Mycobacteria Is Spread by Nonlytic Ejection from Their Amoeba Hosts. *Science* (80-.). **323**, 1729–1733 (2009).
3. Koch, R. Über die Ätiologie der Tuberkulose. 1). (1882).
4. Sulis, G., Roggi, A., Matteelli, A. & Raviglione, M. C. Tuberculosis: epidemiology and control. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* **6**, e2014070 (2014).
5. Glaziou, P., Floyd, K. & Raviglione, M. Global burden and epidemiology of tuberculosis. *Clin. Chest Med.* **30**, 621–36, vii (2009).
6. Zaman, K. Tuberculosis: a global health problem. *J. Health. Popul. Nutr.* **28**, 111–3 (2010).
7. Murray, M., Oxlade, O. & Lin, H.-H. Modeling social, environmental and biological determinants of tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **15 Suppl 2**, S64–70 (2011).
8. Andrews, J. R., Basu, S., Dowdy, D. W. & Murray, M. B. The epidemiological advantage of preferential targeting of tuberculosis control at the poor. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **19**, 375–80 (2015).
9. Pawlowski, A., Jansson, M., Sköld, M., Rottenberg, M. E. & Källenius, G. Tuberculosis and HIV co-infection. *PLoS Pathog.* **8**, e1002464 (2012).
10. Getahun, H., Gunneberg, C., Granich, R. & Nunn, P. HIV infection-associated tuberculosis: the epidemiology and the response. *Clin. Infect. Dis.* **50 Suppl 3**, S201–7 (2010).
11. Saunders, B. M. & Cooper, A. M. Restraining mycobacteria: Role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunol. Cell Biol.* **78**, 334–341 (2000).
12. Saunders, B. M. & Britton, W. J. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunol. Cell Biol.* **85**, 103–11 (2007).
13. Gilsdorf, A. *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2014. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch* (2015). doi:10.1016/j.khinf.2014.09.017
14. Flynn, J. L. & Chan, J. Tuberculosis: latency and reactivation. *Infect. Immun.* **69**, 4195–201 (2001).
15. Berner, R. u. a. *DGPI Handbuch*. (Georg Thieme Verlag, 2013). doi:10.1055/b-002-57156
16. Brändli, O. The clinical presentation of tuberculosis. *Respiration.* **65**, 97–105 (1998).
17. Boehme, C. C. u. a. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N. Engl. J. Med.* **363**, 1005–15 (2010).
18. Lawn, S. D. u. a. Advances in tuberculosis diagnostics: the Xpert MTB/RIF assay and future prospects for a point-of-care test. *Lancet. Infect. Dis.* **13**, 349–61 (2013).
19. Weyer, K. u. a. Rapid molecular TB diagnosis: Evidence, policy making and global implementation of Xpert MTB/RIF. *Eur. Respir. J.* **42**, 252–271 (2013).
20. Zumla, A., Nahid, P. & Cole, S. T. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 388–404 (2013).
21. Zumla, A. u. a. Tuberculosis treatment and management--an update on treatment regimens, trials, new drugs, and adjunct therapies. *Lancet. Respir. Med.* **3**, 220–34 (2015).

22. Calmette, A. Preventive Vaccination Against Tuberculosis with BCG. *Proc. R. Soc. Med.* **24**, 1481–1490 (1931).
23. Trunz, B. B., Fine, P. & Dye, C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet* **367**, 1173–1180 (2006).
24. Russell, D. G., Barry, C. E. & Flynn, J. L. Tuberculosis: what we don't know can, and does, hurt us. *Science* **328**, 852–6 (2010).
25. Black, G. F. *u. a.* BCG-induced increase in interferon-gamma response to mycobacterial antigens and efficacy of BCG vaccination in Malawi and the UK: two randomised controlled studies. *Lancet (London, England)* **359**, 1393–401 (2002).
26. Verma, I. & Grover, A. Antituberculous vaccine development: a perspective for the endemic world. *Expert Rev. Vaccines* **8**, 1547–53 (2009).
27. Smith, N. H., Gordon, S. V, de la Rua-Domenech, R., Clifton-Hadley, R. S. & Hewinson, R. G. Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 670–81 (2006).
28. Hershberg, R. *u. a.* High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography. *PLoS Biol.* **6**, e311 (2008).
29. Russell, D. G. The evolutionary pressures that have molded *Mycobacterium tuberculosis* into an infectious adjuvant. *Curr. Opin. Microbiol.* **16**, 78–84 (2013).
30. Russell, D. G. *u. a.* *Mycobacterium tuberculosis* wears what it eats. *Cell Host Microbe* **8**, 68–76 (2010).
31. Sturgill-Koszycki, S. *u. a.* Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* **263**, 678–81 (1994).
32. Vergne, I., Chua, J. & Deretic, V. Brief Definitive Report Tuberculosis Toxin Blocking Phagosome Maturation Inhibits a Novel Ca²⁺/Calmodulin-PI3K hVPS34 Cascade. *J. Exp. Med. J. Exp. Med* **08653700**, 653–659 (2003).
33. Rohde, K., Yates, R. M., Purdy, G. E. & Russell, D. G. *Mycobacterium tuberculosis* and the environment within the phagosome. *Immunol. Rev.* **219**, 37–54 (2007).
34. Chen, M., Gan, H. & Remold, H. G. A mechanism of virulence: virulent *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv, but not attenuated H37Ra, causes significant mitochondrial inner membrane disruption in macrophages leading to necrosis. *J. Immunol.* **176**, 3707–16 (2006).
35. Jordao, L. & Vieira, O. V. Tuberculosis: New Aspects of an Old Disease. *Int. J. Cell Biol.* **2011**, 1–13 (2011).
36. Frieden, T. R., Sterling, T. R., Munsiff, S. S., Watt, C. J. & Dye, C. Tuberculosis. *Lancet (London, England)* **362**, 887–99 (2003).
37. Ramakrishnan, L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 352–66 (2012).
38. Alatas, F. *u. a.* Vascular endothelial growth factor levels in active pulmonary tuberculosis. *Chest* **125**, 2156–9 (2004).
39. Russell, D. G., Cardona, P.-J., Kim, M.-J., Allain, S. & Altare, F. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat. Immunol.* **10**, 943–948 (2009).
40. Russell, D. G. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 39–47 (2007).
41. Algood, H. M. S., Lin, P. L. & Flynn, J. L. Tumor necrosis factor and chemokine interactions in the formation and maintenance of granulomas in tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* **41 Suppl 3**, S189–93 (2005).

42. Kindler, V., Sappino, A. P., Grau, G. E., Piguet, P. F. & Vassalli, P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell* **56**, 731–40 (1989).
43. Roach, D. R. *u. a.* TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J. Immunol.* **168**, 4620–7 (2002).
44. Kaplan, G. *u. a.* Mycobacterium tuberculosis growth at the cavity surface: a microenvironment with failed immunity. *Infect. Immun.* **71**, 7099–108 (2003).
45. Miyake, Y. *u. a.* C-type lectin MCL is an FcR γ -coupled receptor that mediates the adjuvanticity of mycobacterial cord factor. *Immunity* **38**, 1050–62 (2013).
46. Ishikawa, E. *u. a.* Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. *J. Exp. Med.* **206**, 2879–88 (2009).
47. Yamasaki, S. *u. a.* Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells. *Nat. Immunol.* **9**, 1179–88 (2008).
48. Hestvik, A. L. K., Hmama, Z. & Av-Gay, Y. Mycobacterial manipulation of the host cell. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 1041–1050 (2005).
49. Armstrong, J. A. & Hart, P. D. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. *J. Exp. Med.* **142**, 1–16 (1975).
50. Abdallah, A. M. *u. a.* Type VII secretion--mycobacteria show the way. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 883–91 (2007).
51. Simeone, R., Bottai, D. & Brosch, R. ESX/type VII secretion systems and their role in host-pathogen interaction. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 4–10 (2009).
52. Buczynski, G., Bush, J., Zhang, L., Rodriguez-Paris, J. & Cardelli, J. Evidence for a recycling role for Rab7 in regulating a late step in endocytosis and in retention of lysosomal enzymes in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Biol. Cell* **8**, 1343–60 (1997).
53. Deretic, V., Via, L. E., Fratti, R. A. & Deretic, D. Mycobacterial phagosome maturation, rab proteins, and intracellular trafficking. *Electrophoresis* **18**, 2542–7 (1997).
54. Fratti, R. A., Backer, J. M., Gruenberg, J., Corvera, S. & Deretic, V. Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J. Cell Biol.* **154**, 631–44 (2001).
55. Xu, S. *u. a.* Intracellular trafficking in Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium-infected macrophages. *J. Immunol.* **153**, 2568–78 (1994).
56. Clemens, D. L. & Horwitz, M. A. Characterization of the Mycobacterium tuberculosis phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J. Exp. Med.* **181**, 257–70 (1995).
57. Hestvik, A. L. K., Hmama, Z. & Av-Gay, Y. Mycobacterial manipulation of the host cell. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 1041–50 (2005).
58. Pethe, K. *u. a.* Isolation of Mycobacterium tuberculosis mutants defective in the arrest of phagosome maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 13642–13647 (2004).
59. Walburger, A. *u. a.* Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science* **304**, 1800–4 (2004).
60. Orme, I. M. The mouse as a useful model of tuberculosis. *Tuberculosis* **83**, 112–115 (2003).
61. Bozzaro, S. & Eichinger, L. The professional phagocyte *Dictyostelium discoideum* as a model host for bacterial pathogens. *Curr. Drug Targets* **12**, 942–54 (2011).
62. Pozos, T. C., Ramakrishnan, L. & Ramakrishnan, L. New models for the study of Mycobacterium-host interactions. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 499–505 (2004).

63. Ramakrishnan, L. Using *Mycobacterium marinum* and its hosts to study tuberculosis. *Curr. Sci.* **86**, 82–92 (2004).
64. Hagedorn, M. & Soldati, T. Flotillin and RacH modulate the intracellular immunity of *Dictyostelium* to *Mycobacterium marinum* infection. *Cell. Microbiol.* **9**, 2716–33 (2007).
65. Solomon, J. M., Leung, G. S. & Isberg, R. R. Intracellular Replication of *Mycobacterium marinum* within *Dictyostelium discoideum*: Efficient Replication in the Absence of Host Coronin. *Infect. Immun.* **71**, 3578–3586 (2003).
66. Stamm, L. M. & Brown, E. J. *Mycobacterium marinum*: The generalization and specialization of a pathogenic mycobacterium. *Microbes Infect.* **6**, 1418–1428 (2004).
67. Cirillo, J. D., Falkow, S., Tompkins, L. S. & Bermudez, L. E. Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect. Immun.* **65**, 3759–67 (1997).
68. LINELL, F. & NORDEN, A. *Mycobacterium balnei*, a new acid-fast bacillus occurring in swimming pools and capable of producing skin lesions in humans. *Acta Tuberc. Scand. Suppl.* **33**, 1–84 (1954).
69. CLARK, H. F. & SHEPARD, C. C. EFFECT OF ENVIRONMENTAL TEMPERATURES ON INFECTION WITH MYCOBACTERIUM MARINUM (BALNEI) OF MICE AND A NUMBER OF POIKILOthermic SPECIES. *J. Bacteriol.* **86**, 1057–69 (1963).
70. Tønjum, T., Welty, D. B., Jantzen, E. & Small, P. L. Differentiation of *Mycobacterium ulcerans*, *M. marinum*, and *M. haemophilum*: mapping of their relationships to *M. tuberculosis* by fatty acid profile analysis, DNA-DNA hybridization, and 16S rRNA gene sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 918–25 (1998).
71. Gao, L.-Y. *u. a.* Requirement for *kasB* in *Mycobacterium mycolic acid* biosynthesis, cell wall impermeability and intracellular survival: implications for therapy. *Mol. Microbiol.* **49**, 1547–63 (2003).
72. Dionne, M. S., Ghori, N. & Schneider, D. S. *Drosophila melanogaster* is a genetically tractable model host for *Mycobacterium marinum*. *Infect. Immun.* **71**, 3540–50 (2003).
73. Via, L. E. *u. a.* Effects of cytokines on mycobacterial phagosome maturation. *J. Cell Sci.* **111 (Pt 7)**, 897–905 (1998).
74. SHEPARD, C. C. Growth characteristics of tubercle bacilli and certain other mycobacteria in HeLa cells. *J. Exp. Med.* **105**, 39–48 (1957).
75. Myrvik, Q. N., Leake, E. S. & Wright, M. J. Disruption of phagosomal membranes of normal alveolar macrophages by the H37Rv strain of *Mycobacterium tuberculosis*. A correlate of virulence. *Am. Rev. Respir. Dis.* **129**, 322–8 (1984).
76. McDonough, K. A., Kress, Y. & Bloom, B. R. Pathogenesis of tuberculosis: interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. *Infect. Immun.* **61**, 2763–73 (1993).
77. van der Wel, N. *u. a.* *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell* **129**, 1287–98 (2007).
78. Derrick, S. C. & Morris, S. L. The ESAT6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression. *Cell. Microbiol.* **9**, 1547–1555 (2007).
79. Davis, J. M. & Ramakrishnan, L. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell* **136**, 37–49 (2009).
80. Byrd, T. F., Green, G. M., Fowlston, S. E. & Lyons, C. R. Differential growth characteristics and streptomycin susceptibility of virulent and avirulent *Mycobacterium tuberculosis* strains in a novel fibroblast-mycobacterium microcolony

- assay. *Infect. Immun.* **66**, 5132–9 (1998).
81. Castro-Garza, J., King, C. H., Swords, W. E. & Quinn, F. D. Demonstration of spread by *Mycobacterium tuberculosis* bacilli in A549 epithelial cell monolayers. *FEMS Microbiol. Lett.* **212**, 145–149 (2002).
 82. Mahairas, G. G., Sabo, P. J., Hickey, M. J., Singh, D. C. & Stover, C. K. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J. Bacteriol.* **178**, 1274–82 (1996).
 83. Talbot, E. A., Williams, D. L. & Frothingham, R. PCR identification of *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 566–9 (1997).
 84. Kearns, A. M. *u. a.* Rapid identification of *Mycobacterium bovis* BCG by the detection of the RD1 deletion using a multiplex PCR technique. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **3**, 635–8 (1999).
 85. Majlessi, L. *u. a.* Influence of ESAT-6 secretion system 1 (RD1) of *Mycobacterium tuberculosis* on the interaction between mycobacteria and the host immune system. *J. Immunol.* **174**, 3570–9 (2005).
 86. Brodin, P., Rosenkrands, I., Andersen, P., Cole, S. T. & Brosch, R. ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors? *Trends Microbiol.* **12**, 500–8 (2004).
 87. Tan, T., Lee, W. L., Alexander, D. C., Grinstein, S. & Liu, J. The ESAT-6/CFP-10 secretion system of *Mycobacterium marinum* modulates phagosome maturation. *Cell. Microbiol.* **8**, 1417–29 (2006).
 88. Berthet, F. X., Rasmussen, P. B., Rosenkrands, I., Andersen, P. & Gicquel, B. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology* **144** (Pt 1), 3195–203 (1998).
 89. Pallen, M. J. The ESAT-6/WXG100 superfamily -- and a new Gram-positive secretion system? *Trends Microbiol.* **10**, 209–12 (2002).
 90. Hsu, T. *u. a.* The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 12420–5 (2003).
 91. Stanley, S. A., Raghavan, S., Hwang, W. W. & Cox, J. S. Acute infection and macrophage subversion by *Mycobacterium tuberculosis* require a specialized secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 13001–6 (2003).
 92. Stanley, S. A., Johndrow, J. E., Manzanillo, P. & Cox, J. S. The Type I IFN response to infection with *Mycobacterium tuberculosis* requires ESX-1-mediated secretion and contributes to pathogenesis. *J. Immunol.* **178**, 3143–52 (2007).
 93. Gao, L.-Y. *u. a.* A mycobacterial virulence gene cluster extending RD1 is required for cytolysis, bacterial spreading and ESAT-6 secretion. *Mol. Microbiol.* **53**, 1677–93 (2004).
 94. Guinn, K. M. *u. a.* Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **51**, 359–70 (2004).
 95. Volkman, H. E. *u. a.* Tuberculous granuloma formation is enhanced by a mycobacterium virulence determinant. *PLoS Biol.* **2**, e367 (2004).
 96. Pozos, T. C., Ramakrishnan, L. & Ramakrishnan, L. New models for the study of *Mycobacterium*-host interactions. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 499–505 (2004).
 97. Tobin, D. M. & Ramakrishnan, L. Comparative pathogenesis of *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell. Microbiol.* **10**, 1027–1039 (2008).
 98. Kessin, R. H. *Dictyostelium: Evolution, Cell Biology, and the Development of Multicellularity*. (Cambridge University Press, 2001). auf

- <<https://books.google.com/books?id=rm7wHyUYSiAC&pgis=1>>
99. Raper, K. B. Dictyostelium discoideum, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *J. Agric. Res.* **50**, 135–147 (1935).
 100. King, J. S. & Insall, R. H. Chemotaxis: finding the way forward with Dictyostelium. *Trends Cell Biol.* **19**, 523–30 (2009).
 101. Weijer, C. J. Collective cell migration in development. *J. Cell Sci.* **122**, 3215–23 (2009).
 102. Robinson, D. N. & Spudich, J. A. Mechanics and regulation of cytokinesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 182–8 (2004).
 103. Chisholm, R. L. & Firtel, R. A. Insights into morphogenesis from a simple developmental system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 531–41 (2004).
 104. Eichinger, L. *u. a.* The genome of the social amoeba Dictyostelium discoideum. *Nature* **435**, 43–57 (2005).
 105. Eichinger, L. Revamp a model-status and prospects of the Dictyostelium genome project. *Curr. Genet.* **44**, 59–72 (2003).
 106. Glöckner, G. *u. a.* Sequence and analysis of chromosome 2 of Dictyostelium discoideum. *Nature* **418**, 79–85 (2002).
 107. Williams, J. G., Noegel, A. A. & Eichinger, L. Manifestations of multicellularity: Dictyostelium reports in. *Trends Genet.* **21**, 392–8 (2005).
 108. Kreppel, L. *u. a.* dictyBase: a new Dictyostelium discoideum genome database. *Nucleic Acids Res.* **32**, D332–3 (2004).
 109. Bozzaro, S., Bucci, C. & Steinert, M. Phagocytosis and host-pathogen interactions in Dictyostelium with a look at macrophages. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **271**, 253–300 (2008).
 110. Cosson, P. & Soldati, T. Eat, kill or die: when amoeba meets bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 271–6 (2008).
 111. Duhon, D. & Cardelli, J. The regulation of phagosome maturation in Dictyostelium. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **23**, 803–8 (2002).
 112. Greub, G. & Raoult, D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 413–33 (2004).
 113. Hägele, S. *u. a.* Dictyostelium discoideum: a new host model system for intracellular pathogens of the genus Legionella. *Cell. Microbiol.* **2**, 165–71 (2000).
 114. Solomon, J. M., Rupper, A., Cardelli, J. A. & Isberg, R. R. Intracellular growth of Legionella pneumophila in Dictyostelium discoideum, a system for genetic analysis of host-pathogen interactions. *Infect. Immun.* **68**, 2939–47 (2000).
 115. Cosson, P. *u. a.* Pseudomonas aeruginosa virulence analyzed in a Dictyostelium discoideum host system. *J. Bacteriol.* **184**, 3027–33 (2002).
 116. Skriwan, C. *u. a.* Various bacterial pathogens and symbionts infect the amoeba Dictyostelium discoideum. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**, 615–24 (2002).
 117. Pukatzki, S., Kessin, R. H. & Mekalanos, J. J. The human pathogen Pseudomonas aeruginosa utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba Dictyostelium discoideum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 3159–64 (2002).
 118. Pukatzki, S. *u. a.* Identification of a conserved bacterial protein secretion system in Vibrio cholerae using the Dictyostelium host model system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 1528–1533 (2006).
 119. Lampe, E. O. *u. a.* Dissection of Francisella-Host Cell Interactions in Dictyostelium discoideum. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**, 1586–98 (2015).
 120. Christine L. Cosma, David R. Sherman & Ramakrishnan, L. The Secret Lives of the Pathogenic Mycobacteria. (2003). auf

- <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.micro.57.030502.091033?url_ver=Z39.88-2003&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&journalCode=micro>
121. Rohde, K. H., Abramovitch, R. B. & Russell, D. G. Mycobacterium tuberculosis Invasion of Macrophages: Linking Bacterial Gene Expression to Environmental Cues. *Cell Host Microbe* **2**, 352–364 (2007).
 122. Solomon, J. M., Leung, G. S. & Isberg, R. R. Intracellular replication of Mycobacterium marinum within Dictyostelium discoideum: Efficient replication in the absence of host coronin. *Infect. Immun.* **71**, 3578–3586 (2003).
 123. Jordao, L., Bleck, C. K. E., Mayorga, L., Griffiths, G. & Anes, E. On the killing of mycobacteria by macrophages. *Cell. Microbiol.* **10**, 529–48 (2008).
 124. Smith, J. u. a. Evidence for pore formation in host cell membranes by ESX-1-secreted ESAT-6 and its role in Mycobacterium marinum escape from the vacuole. *Infect. Immun.* **76**, 5478–87 (2008).
 125. Somesh, B. P., Neffgen, C., Iijima, M., Devreotes, P. & Rivero, F. Dictyostelium RacH regulates endocytic vesicular trafficking and is required for localization of vacuolin. *Traffic* **7**, 1194–212 (2006).
 126. Klionsky, D. J. u. a. A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes (2nd edition). *Autophagy* **7**, 1273–94 (2011).
 127. Feng, Y., He, D., Yao, Z. & Klionsky, D. J. The machinery of macroautophagy. *Cell Res.* **24**, 24–41 (2014).
 128. Klionsky, D. J. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 931–7 (2007).
 129. Calvo-Garrido, J. u. a. Autophagy in Dictyostelium: genes and pathways, cell death and infection. *Autophagy* **6**, 686–701 (2010).
 130. Huang, J. & Brumell, J. H. Bacteria-autophagy interplay: a battle for survival. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 101–14 (2014).
 131. Pankiv, S. u. a. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy*[S]. *J. Biol. Chem.* **282**, 24131–24145 (2007).
 132. von Muhlinen, N., Thurston, T., Ryzhakov, G., Bloor, S. & Randow, F. NDP52, a novel autophagy receptor for ubiquitin-decorated cytosolic bacteria. *Autophagy* **6**, 288–9 (2010).
 133. Kirkin, V. u. a. A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol. Cell* **33**, 505–16 (2009).
 134. Wild, P. u. a. Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth. *Science* **333**, 228–33 (2011).
 135. Arroyo, D. S. u. a. Autophagy in inflammation, infection, neurodegeneration and cancer. *Int. Immunopharmacol.* **18**, 55–65 (2014).
 136. Klionsky, D. J. u. a. How Shall I Eat Thee? *Autophagy* **3**, 413–416 (2014).
 137. Murrow, L. & Debnath, J. Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: implications for cell injury and human disease. *Annu. Rev. Pathol.* **8**, 105–37 (2013).
 138. Schmid, D. & Münz, C. Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity* **27**, 11–21 (2007).
 139. Shahnazari, S. & Brumell, J. H. Mechanisms and consequences of bacterial targeting by the autophagy pathway. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 68–75 (2011).

140. Chen, Y. & Klionsky, D. J. The regulation of autophagy - unanswered questions. *J. Cell Sci.* **124**, 161–70 (2011).
141. Itakura, E. & Mizushima, N. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy* **6**, 764–776 (2014).
142. Hayashi-Nishino, M. *u. a.* A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1433–7 (2009).
143. Itakura, E., Kishi, C., Inoue, K. & Mizushima, N. Beclin 1 Forms Two Distinct Phosphatidylinositol 3-Kinase Complexes with Mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol. Biol. Cell* **19**, 5360–5372 (2008).
144. Parzych, K. R. & Klionsky, D. J. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 460–73 (2014).
145. Klionsky, D. J. *u. a.* A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell* **5**, 539–45 (2003).
146. Tekinay, T., Wu, M. Y., Otto, G. P., Anderson, O. R. & Kessin, R. H. Function of the Dictyostelium discoideum Atg1 kinase during autophagy and development. *Eukaryot. Cell* **5**, 1797–806 (2006).
147. Krick, R., Tolstrup, J., Appelles, A., Henke, S. & Thumm, M. The relevance of the phosphatidylinositolphosphat-binding motif FRRGT of Atg18 and Atg21 for the Cvt pathway and autophagy. *FEBS Lett.* **580**, 4632–8 (2006).
148. Obara, K., Sekito, T., Niimi, K. & Ohsumi, Y. The Atg18-Atg2 complex is recruited to autophagic membranes via phosphatidylinositol 3-phosphate and exerts an essential function. *J. Biol. Chem.* **283**, 23972–23980 (2008).
149. Nair, U., Cao, Y., Xie, Z. & Klionsky, D. J. Roles of the lipid-binding motifs of Atg18 and Atg21 in the cytoplasm to vacuole targeting pathway and autophagy. *J. Biol. Chem.* **285**, 11476–88 (2010).
150. Suzuki, K., Kubota, Y., Sekito, T. & Ohsumi, Y. Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells* **12**, 209–18 (2007).
151. Mizushima, N., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 107–32 (2011).
152. Xie, Z. & Klionsky, D. J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1102–9 (2007).
153. Geng, J. & Klionsky, D. J. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. „Protein modifications: beyond the usual suspects“ review series. *EMBO Rep.* **9**, 859–64 (2008).
154. Kirisako, T. *u. a.* Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J. Cell Biol.* **147**, 435–46 (1999).
155. Ichimura, Y. *u. a.* A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* **408**, 488–92 (2000).
156. Tattoli, I. *u. a.* Amino acid starvation induced by invasive bacterial pathogens triggers an innate host defense program. *Cell Host Microbe* **11**, 563–75 (2012).
157. Shin, D.-M. *u. a.* Mycobacterium tuberculosis eis regulates autophagy, inflammation, and cell death through redox-dependent signaling. *PLoS Pathog.* **6**, e1001230 (2010).
158. Kim, K. H. *u. a.* Mycobacterium tuberculosis Eis protein initiates suppression of host immune responses by acetylation of DUSP16/MKP-7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 7729–34 (2012).
159. Shahnazari, S., Namolovan, A., Mogridge, J., Kim, P. K. & Brumell, J. H. Bacterial toxins can inhibit host cell autophagy through cAMP generation. *Autophagy* **7**, 957–65 (2011).

160. Ogawa, M. *u. a.* Escape of intracellular Shigella from autophagy. *Science* **307**, 727–31 (2005).
161. Mostowy, S. *u. a.* p62 and NDP52 proteins target intracytosolic Shigella and Listeria to different autophagy pathways. *J. Biol. Chem.* **286**, 26987–95 (2011).
162. Mostowy, S. *u. a.* Entrapment of Intracytosolic Bacteria by Septin Cage-like Structures. *Cell Host Microbe* **8**, 433–444 (2010).
163. Dortet, L. *u. a.* Recruitment of the major vault protein by InlK: a Listeria monocytogenes strategy to avoid autophagy. *PLoS Pathog.* **7**, e1002168 (2011).
164. Yoshikawa, Y. *u. a.* Listeria monocytogenes ActA-mediated escape from autophagic recognition. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1233–40 (2009).
165. Birmingham, C. L. *u. a.* Listeria monocytogenes evades killing by autophagy during colonization of host cells. *Autophagy* **3**, 442–51
166. Rich, K. A., Burkett, C. & Webster, P. Cytoplasmic bacteria can be targets for autophagy. *Cell. Microbiol.* **5**, 455–68 (2003).
167. Py, B. F., Lipinski, M. M. & Yuan, J. Autophagy limits Listeria monocytogenes intracellular growth in the early phase of primary infection. *Autophagy* **3**, 117–25 (2007).
168. Dong, N. *u. a.* Structurally distinct bacterial TBC-like GAPs link Arf GTPase to Rab1 inactivation to counteract host defenses. *Cell* **150**, 1029–41 (2012).
169. Choy, A. *u. a.* The Legionella effector RavZ inhibits host autophagy through irreversible Atg8 deconjugation. *Science* **338**, 1072–6 (2012).
170. Lerena, M. C. & Colombo, M. I. Mycobacterium marinum induces a marked LC3 recruitment to its containing phagosome that depends on a functional ESX-1 secretion system. *Cell. Microbiol.* **13**, 814–35 (2011).
171. Romagnoli, A. *u. a.* ESX-1 dependent impairment of autophagic flux by Mycobacterium tuberculosis in human dendritic cells. *Autophagy* **8**, 1357–70 (2012).
172. Schnaith, A. *u. a.* Staphylococcus aureus subvert autophagy for induction of caspase-independent host cell death. *J. Biol. Chem.* **282**, 2695–706 (2007).
173. Mestre, M. B., Fader, C. M., Sola, C. & Colombo, M. I. α -hemolysin is the factor responsible for the activation of the autophagic pathway in Staphylococcus aureus infected cells. **6**, 110–125 (2010).
174. Mestre, M. B. & Colombo, M. I. cAMP and EPAC are key players in the regulation of the signal transduction pathway involved in the α -hemolysin autophagic response. *PLoS Pathog.* **8**, e1002664 (2012).
175. Gutierrez, M. G. *u. a.* Autophagy induction favours the generation and maturation of the Coxiella-replicative vacuoles. *Cell. Microbiol.* **7**, 981–93 (2005).
176. Berón, W., Gutierrez, M. G., Rabinovitch, M. & Colombo, M. I. Coxiella burnetii localizes in a Rab7-labeled compartment with autophagic characteristics. *Infect. Immun.* **70**, 5816–21 (2002).
177. Romano, P. S., Gutierrez, M. G., Berón, W., Rabinovitch, M. & Colombo, M. I. The autophagic pathway is actively modulated by phase II Coxiella burnetii to efficiently replicate in the host cell. *Cell. Microbiol.* **9**, 891–909 (2007).
178. Vázquez, C. L. & Colombo, M. I. Coxiella burnetii modulates Beclin 1 and Bcl-2, preventing host cell apoptosis to generate a persistent bacterial infection. *Cell Death Differ.* **17**, 421–38 (2010).
179. Fine, K. L. *u. a.* Involvement of the autophagy pathway in trafficking of Mycobacterium tuberculosis bacilli through cultured human type II epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **14**, 1402–14 (2012).

180. Watson, R. O., Manzanillo, P. S. & Cox, J. S. Extracellular M. tuberculosis DNA targets bacteria for autophagy by activating the host DNA-sensing pathway. *Cell* **150**, 803–15 (2012).
181. Wang, W., Sacher, M. & Ferro-Novick, S. TRAPP stimulates guanine nucleotide exchange on Ypt1p. *J. Cell Biol.* **151**, 289–96 (2000).
182. Manzanillo, P. S. *u. a.* The ubiquitin ligase parkin mediates resistance to intracellular pathogens. *Nature* **501**, 512–6 (2013).
183. Seto, S., Tsujimura, K. & Koide, Y. Coronin-1a inhibits autophagosome formation around Mycobacterium tuberculosis-containing phagosomes and assists mycobacterial survival in macrophages. *Cell. Microbiol.* **14**, 710–27 (2012).
184. Collins, C. A. *u. a.* Atg5-independent sequestration of ubiquitinated mycobacteria. *PLoS Pathog.* **5**, e1000430 (2009).
185. Wollert, T. & Hurley, J. H. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* **464**, 864–9 (2010).
186. Gruenberg, J. & Stenmark, H. The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 317–23 (2004).
187. Russell, M. R. G., Nickerson, D. P. & Odorizzi, G. Molecular mechanisms of late endosome morphology, identity and sorting. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 422–8 (2006).
188. Piper, R. C. & Katzmann, D. J. Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 519–47 (2007).
189. Lindås, A.-C., Karlsson, E. A., Lindgren, M. T., Ettema, T. J. G. & Bernander, R. A unique cell division machinery in the Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 18942–6 (2008).
190. Ettema, T. J. & Bernander, R. Cell division and the ESCRT complex: A surprise from the archaea. *Commun. Integr. Biol.* **2**, 86–8 (2009).
191. Votteler, J. & Sundquist, W. I. Virus budding and the ESCRT pathway. *Cell Host Microbe* **14**, 232–41 (2013).
192. Carlton, J. G. & Martin-Serrano, J. Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science* **316**, 1908–12 (2007).
193. Jimenez, A. J. *u. a.* ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. *Science* **343**, 1247136 (2014).
194. Scheffer, L. L. *u. a.* Mechanism of Ca²⁺-triggered ESCRT assembly and regulation of cell membrane repair. *Nat. Commun.* **5**, 5646 (2014).
195. Saksena, S. & Emr, S. D. ESCRTs and human disease. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 167–72 (2009).
196. Wollert, T., Wunder, C., Lippincott-Schwartz, J. & Hurley, J. H. Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature* **458**, 172–7 (2009).
197. Raiborg, C. & Stenmark, H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* **458**, 445–52 (2009).
198. Hurley, J. H. & Hanson, P. I. Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 556–66 (2010).
199. Hurley, J. H. The ESCRT complexes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **45**, 463–87 (2010).
200. Peel, S., Macheboeuf, P., Martinelli, N. & Weissenhorn, W. Divergent pathways lead to ESCRT-III-catalyzed membrane fission. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 199–210 (2011).
201. Babst, M., Katzmann, D. J., Estepa-Sabal, E. J., Meerloo, T. & Emr, S. D. Escrt-III. *Dev. Cell* **3**, 271–282 (2002).
202. Stuchell-Brereton, M. D. *u. a.* ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases. *Nature* **449**, 740–4 (2007).

203. Babst, M. The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J.* **17**, 2982–2993 (1998).
204. Babst, M., Davies, B. A. & Katzmann, D. J. Regulation of Vps4 during MVB sorting and cytokinesis. *Traffic* **12**, 1298–305 (2011).
205. Carlton, J. G., Agromayor, M. & Martin-Serrano, J. Differential requirements for Alix and ESCRT-III in cytokinesis and HIV-1 release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 10541–6 (2008).
206. Morita, E. *u. a.* Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *EMBO J.* **26**, 4215–27 (2007).
207. Fisher, R. D. *u. a.* Structural and biochemical studies of ALIX/AIP1 and its role in retrovirus budding. *Cell* **128**, 841–52 (2007).
208. McCullough, J., Fisher, R. D., Whitby, F. G., Sundquist, W. I. & Hill, C. P. ALIX-CHMP4 interactions in the human ESCRT pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 7687–91 (2008).
209. Strack, B., Calistri, A., Craig, S., Popova, E. & Göttlinger, H. G. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* **114**, 689–99 (2003).
210. Usami, Y., Popov, S. & Göttlinger, H. G. Potent rescue of human immunodeficiency virus type 1 late domain mutants by ALIX/AIP1 depends on its CHMP4 binding site. *J. Virol.* **81**, 6614–22 (2007).
211. Zhai, Q., Landesman, M. B., Robinson, H., Sundquist, W. I. & Hill, C. P. Structure of the Bro1 domain protein BROX and functional analyses of the ALIX Bro1 domain in HIV-1 budding. *PLoS One* **6**, (2011).
212. Steinhardt, R. A., Bi, G. & Alderton, J. M. Cell membrane resealing by a vesicular mechanism similar to neurotransmitter release. *Science* **263**, 390–3 (1994).
213. Joaquina, A. *u. a.* ESCRT Machinery Is Required for Plasma Membrane Repair.pdf. (2014). doi:10.1126/science.1247136
214. Watts, D. J. & Ashworth, J. M. Growth of myxameobae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem. J.* **119**, 171–4 (1970).
215. WILLIAMS, K. L., KESSIN, R. H. & NEWELL, P. C. Genetics of Growth in Axenic Medium of the Cellular Slime Mould *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **247**, 142–143 (1974).
216. Williams, K. L. Characterization of Dominant Resistance to Cobalt Chloride in *DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM* and Its Use in Parasexual Genetic Analysis. *Genetics* **90**, 37–47 (1978).
217. King, J. S. *u. a.* WASH is required for lysosomal recycling and efficient autophagic and phagocytic digestion. *Mol. Biol. Cell* **24**, 2714–26 (2013).
218. Otto, G. P., Wu, M. Y., Kazgan, N., Anderson, O. R. & Kessin, R. H. Macroautophagy is required for multicellular development of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* **278**, 17636–45 (2003).
219. Otto, G. P., Wu, M. Y., Kazgan, N., Anderson, O. R. & Kessin, R. H. Macroautophagy is required for multicellular development of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* **278**, 17636–45 (2003).
220. Mattei, S. *u. a.* Dd-Alix, a conserved endosome-associated protein, controls *Dictyostelium* development. *Dev. Biol.* **279**, 99–113 (2005).
221. Veltman, D. M., Akar, G., Bosgraaf, L. & Van Haastert, P. J. M. A new set of small, extrachromosomal expression vectors for *Dictyostelium discoideum*. *Plasmid* **61**, 110–8 (2009).
222. Talaat, A. M., Reimschuessel, R., Wasserman, S. S. & Trucksis, M. Goldfish, *Carassius*

- auratus, a novel animal model for the study of *Mycobacterium marinum* pathogenesis. *Infect. Immun.* **66**, 2938–42 (1998).
223. Abdallah, A. M. *u. a.* Type VII secretion — mycobacteria show the way. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 883–891 (2007).
224. Riedl, J. *u. a.* Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat. Methods* **5**, 605–7 (2008).
225. Mamiatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. & Engel, J. Molecular cloning—A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1982, 545 S., 42 \$. *Acta Biotechnol.* **5**, 104–104 (1985).
226. Gerstenmaier, L. *u. a.* The autophagic machinery ensures nonlytic transmission of mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1423318112– (2015). doi:10.1073/pnas.1423318112
227. Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y. & Ohsumi, Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 458–67 (2009).
228. Johansen, T. & Lamark, T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* **7**, 279–96 (2011).
229. Mizushima, N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 132–9 (2010).
230. Otto, G. P., Wu, M. Y., Kazgan, N., Anderson, O. R. & Kessin, R. H. Dictyostelium macroautophagy mutants vary in the severity of their developmental defects. *J. Biol. Chem.* **279**, 15621–9 (2004).
231. Chan, E. Y. & Tooze, S. A. Evolution of Atg1 function and regulation. *Autophagy* **5**, 758–765 (2009).
232. Scarlatti, F., Maffei, R., Beau, I., Ghidoni, R. & Codogno, P. Non-canonical autophagy: an exception or an underestimated form of autophagy? *Autophagy* **4**, 1083–5 (2008).
233. Scarlatti, F., Maffei, R., Beau, I., Codogno, P. & Ghidoni, R. Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. *Cell Death Differ.* **15**, 1318–29 (2008).
234. Polson, H. E. J. *u. a.* Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy* **6**, 506–22 (2010).
235. King, J. S., Veltman, D. M. & Insall, R. H. The induction of autophagy by mechanical stress. *Autophagy* **7**, 1490–9 (2011).
236. Stamm, L. M. *u. a.* *Mycobacterium marinum* Escapes from Phagosomes and Is Propelled by Actin-based Motility. *J. Exp. Med.* **198**, 1361–1368 (2003).
237. Pym, A. S., Brodin, P., Brosch, R., Huerre, M. & Cole, S. T. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol. Microbiol.* **46**, 709–17 (2002).
238. Cosma, C. L., Sherman, D. R. & Ramakrishnan, L. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 641–76 (2003).
239. Carlsson, F., Joshi, S. A., Rangell, L. & Brown, E. J. Polar localization of virulence-related Esx-1 secretion in mycobacteria. *PLoS Pathog.* **5**, e1000285 (2009).
240. Carlsson, F. *u. a.* Host-detrimental role of Esx-1-mediated inflammasome activation in mycobacterial infection. *PLoS Pathog.* **6**, e1000895 (2010).
241. Gutierrez, M. G. *u. a.* Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* **119**, 753–66 (2004).
242. Nakagawa, I. Autophagy Defends Cells Against Invading Group A Streptococcus.

- Science* (80-.). **306**, 1037–1040 (2004).
243. Jia, K. *u. a.* Autophagy genes protect against *Salmonella typhimurium* infection and mediate insulin signaling-regulated pathogen resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 14564–14569 (2009).
244. Huang, J. & Brummell, J. H. Bacteria-autophagy interplay: a battle for survival. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 101–14 (2014).
245. Slobodkin, M. R. & Elazar, Z. The Atg8 family: multifunctional ubiquitin-like key regulators of autophagy. *Essays Biochem* **55**, 51–64 (2013).
246. Shaid, S., Brandts, C. H., Serve, H. & Dikic, I. Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death Differ.* **20**, 21–30 (2012).
247. Hershko, A. & Ciechanover, A. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425–79 (1998).
248. Bjørkøy, G. *u. a.* p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell Biol.* **171**, 603–14 (2005).
249. Jung, C. H. *u. a.* ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol. Biol. Cell* **20**, 1992–2003 (2009).
250. Hosokawa, N. *u. a.* Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1-Atg13-FIP200 Complex Required for Autophagy. *Mol. Biol. Cell* **20**, 1981–1991 (2009).
251. Ganley, I. G. *u. a.* ULK1·ATG13·FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J. Biol. Chem.* **284**, 12297–12305 (2009).
252. Cheong, H., Lindsten, T., Wu, J., Lu, C. & Thompson, C. B. Ammonia-induced autophagy is independent of ULK1/ULK2 kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 11121–6 (2011).
253. Florey, O., Kim, S. E., Sandoval, C. P., Haynes, C. M. & Overholtzer, M. Autophagy machinery mediates macroendocytic processing and entotic cell death by targeting single membranes. *Nat. Cell Biol.* **13**, 1335–43 (2011).
254. Lai, S.-C. & Devenish, R. J. LC3-Associated Phagocytosis (LAP): Connections with Host Autophagy. *Cells* **1**, 396–408 (2012).
255. Martinez, J. *u. a.* Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (LC3)-associated phagocytosis is required for the efficient clearance of dead cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 17396–401 (2011).
256. Liang, C. *u. a.* Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat. Cell Biol.* **10**, 776–87 (2008).
257. Monastyrska, I. *u. a.* An autophagy-independent role for LC3 in equine arteritis virus replication. *Autophagy* **9**, 164–74 (2013).
258. Reggiori, F. *u. a.* Coronaviruses Hijack the LC3-I-positive EDEMosomes, ER-derived vesicles exporting short-lived ERAD regulators, for replication. *Cell Host Microbe* **7**, 500–8 (2010).
259. Al-Younes, H. M. *u. a.* Autophagy-independent function of MAP-LC3 during intracellular propagation of *Chlamydia trachomatis*. *Autophagy* **7**, 814–28 (2011).
260. Obara, K., Sekito, T., Niimi, K. & Ohsumi, Y. The Atg18-Atg2 complex is recruited to autophagic membranes via phosphatidylinositol 3-phosphate and exerts an essential function. *J. Biol. Chem.* **283**, 23972–80 (2008).
261. Obara, K., Noda, T., Niimi, K. & Ohsumi, Y. Transport of phosphatidylinositol 3-phosphate into the vacuole via autophagic membranes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes to Cells* **13**, 537–547 (2008).

262. Thurston, T. L. M., Wandel, M. P., von Muhlinen, N., Foeglein, A. & Randow, F. Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature* **482**, 414–8 (2012).
263. Cummings, R. D. & Liu, F.-T. Galectins. (2009). auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1944/>
264. Seibenhener, M. L., Geetha, T. & Wooten, M. W. Sequestosome 1/p62--more than just a scaffold. *FEBS Lett.* **581**, 175–9 (2007).
265. Pankiv, S. *u. a.* p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* **282**, 24131–45 (2007).
266. Birmingham, C. L., Smith, A. C., Bakowski, M. A., Yoshimori, T. & Brumell, J. H. Autophagy controls Salmonella infection in response to damage to the Salmonella-containing vacuole. *J. Biol. Chem.* **281**, 11374–83 (2006).
267. Idone, V. *u. a.* Repair of injured plasma membrane by rapid Ca²⁺-dependent endocytosis. *J. Cell Biol.* **180**, 905–14 (2008).
268. McNeil, P. L., Vogel, S. S., Miyake, K. & Terasaki, M. Patching plasma membrane disruptions with cytoplasmic membrane. *J. Cell Sci.* **113 (Pt 1)**, 1891–902 (2000).
269. Tam, C. *u. a.* Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. *J. Cell Biol.* **189**, 1027–38 (2010).
270. Reddy, A., Caler, E. V & Andrews, N. W. Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell* **106**, 157–69 (2001).
271. Starr, T. *u. a.* Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the Brucella intracellular cycle. *Cell Host Microbe* **11**, 33–45 (2012).
272. Bird, S. W., Maynard, N. D., Covert, M. W. & Kirkegaard, K. Nonlytic viral spread enhanced by autophagy components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 13081–6 (2014).
273. Jackson, W. T. *u. a.* Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol.* **3**, e156 (2005).
274. Delpeut, S., Rudd, P. A., Labonté, P. & von Messling, V. Membrane Fusion-Mediated Autophagy Induction Enhances Morbillivirus Cell-to-Cell Spread. *J. Virol.* **86**, 8527–8535 (2012).
275. Robinson, S. M. *u. a.* Coxsackievirus B exits the host cell in shed microvesicles displaying autophagosomal markers. *PLoS Pathog.* **10**, e1004045 (2014).
276. Chen, Y.-H. *u. a.* Phosphatidylserine vesicles enable efficient en bloc transmission of enteroviruses. *Cell* **160**, 619–30 (2015).
277. Starr, T. *u. a.* Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the Brucella intracellular cycle. *Cell Host Microbe* **11**, 33–45 (2012).
278. Ullery, J. C., Tarango, M., Roth, C. C. & Ibey, B. L. Activation of autophagy in response to nanosecond pulsed electric field exposure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **458**, 411–7 (2015).
279. Babiychuk, E. B., Monastyrskaya, K., Potez, S. & Draeger, A. Blebbing confers resistance against cell lysis. *Cell Death Differ.* **18**, 80–9 (2011).
280. Yumura, S., Hashima, S. & Muranaka, S. Myosin II does not contribute to wound repair in Dictyostelium cells. *Biol. Open* **3**, 966–73 (2014).
281. Jaiswal, J. K. *u. a.* S100A11 is required for efficient plasma membrane repair and survival of invasive cancer cells. *Nat. Commun.* **5**, 3795 (2014).
282. Davies, B. A. *u. a.* Coordination of substrate binding and ATP hydrolysis in Vps4-mediated ESCRT-III disassembly. *Mol. Biol. Cell* **21**, 3396–408 (2010).
283. Gordon, P. B. & Seglen, P. O. Prelysosomal convergence of autophagic and endocytic

- pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **151**, 40–7 (1988).
284. Berg, T. O., Fengsrud, M., Strømhaug, P. E., Berg, T. & Seglen, P. O. Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. *J. Biol. Chem.* **273**, 21883–92 (1998).
285. Dunn, W. A. Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol.* **4**, 139–43 (1994).
286. Gordon, P. B., Høyvik, H. & Seglen, P. O. Prelysosomal and lysosomal connections between autophagy and endocytosis. *Biochem. J.* **283** (Pt 2, 361–9 (1992).
287. Shintani, T. & Klionsky, D. J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* **306**, 990–5 (2004).
288. Fader, C. M. & Colombo, M. I. Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell Death Differ.* **16**, 70–8 (2009).
289. Klionsky, D. J., Eskelinen, E.-L. & Deretic, V. Autophagosomes, phagosomes, autolysosomes, phagolysosomes, autophagolysosomes... wait, I'm confused. *Autophagy* **10**, 549–51 (2014).
290. Griffiths, R. E. *u. a.* Maturing reticulocytes internalize plasma membrane in glycophorin A-containing vesicles that fuse with autophagosomes before exocytosis. *Blood* **119**, 6296–306 (2012).
291. Baixauli, F., LÃ³pez-OtÃ¡n, C. & Mittelbrunn, M. Exosomes and Autophagy: Coordinated Mechanisms for the Maintenance of Cellular Fitness. *Front. Immunol.* **5**, 403 (2014).
292. Ponpuak, M. *u. a.* Secretory autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* **35**, 106–116 (2015).
293. Schneider, N. *u. a.* Golvesin-GFP fusions as distinct markers for Golgi and post-Golgi vesicles in Dictyostelium cells. *Biol. Cell* **92**, 495–511 (2000).
294. Müller-Taubenberger, A. *u. a.* Calreticulin and calnexin in the endoplasmic reticulum are important for phagocytosis. *EMBO J.* **20**, 6772–82 (2001).
295. Clegg, R. M. Fluorescence resonance energy transfer. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 103–110 (1995).
296. Blanc, C. *u. a.* Dictyostelium Tom1 participates to an ancestral ESCRT-0 complex. *Traffic* **10**, 161–71 (2009).
297. Filimonenko, M. *u. a.* Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *J. Cell Biol.* **179**, 485–500 (2007).
298. Lee, J.-A., Beigneux, A., Ahmad, S. T., Young, S. G. & Gao, F.-B. ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr. Biol.* **17**, 1561–7 (2007).
299. Rusten, T. E. *u. a.* ESCRTs and Fab1 regulate distinct steps of autophagy. *Curr. Biol.* **17**, 1817–25 (2007).
300. Rusten, T. E. & Stenmark, H. How do ESCRT proteins control autophagy? *J. Cell Sci.* **122**, 2179–83 (2009).

VII. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Dr. Monica Hagedorn dafür danken, dass ich in Ihrem Labor dieses spannende Thema verfolgen durfte. Ich danke Ihr für die Betreuung meines Projektes und Ihre Unterstützung, sowie das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei Prof. Dr. Christian Lohr bedanke ich mich für die Übernahme des Co-Referats und das Interesse an meiner Arbeit.

Unseren Kooperationspartnern Dr. Jason King und Prof. Dr. Thierry Soldati möchte ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die konstruktiven Gespräche danken.

Yannick Brenz, Ulrike Fröhlke, Dr. Ann-Kathrin Tilly und Dr. Katharina Höhn danke ich für die tolle Zusammenarbeit, die vielen anregenden Diskussionen und das Korrekturlesen. Der gesamten Arbeitsgruppe, allen jetzigen Kollegen und auch den ehemaligen, danke ich für die schöne gemeinsame Zeit im Labor, beim Mittagessen oder unseren Kaffee-Runden im Keller. Auch bei den lieben Kollegen aus den benachbarten Laboren bedanke ich mich für ihre Hilfsbereitschaft und Freundschaft.

Ich danke meinen wundervollen Freunden für ihre Freundschaft und Unterstützung in allen Lebenslagen. Sven, ich danke dir für dein großes Vertrauen in meine Fähigkeiten, deine Geduld und deine Liebe.

Meiner liebsten Familie danke ich für all die motivierenden Gespräche, das große Vertrauen, die unablässige Unterstützung und Liebe.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift **„Untersuchungen der molekularen Mechanismen des Austritts von intrazellulären Bakterien am Beispiel des *Mycobakterium marinum* – *Dictyostelium discoideum* Modellsystems“** selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen als Hilfsmittel verwendet habe.

Die Arbeit ist darüber hinaus keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt worden.

Hamburg, April 2016