

***Dictyostelium discoideum* als
Francisella-Infektionsmodell unter Verwendung
von *F. noatunensis* subsp. *noatunensis***

Dissertation

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

vorgelegt von
Yannick Brenz
aus Bremen

Hamburg, 2016

Die Betreuung der vorliegenden Dissertation wurde von Frau Dr. Monica Hagedorn übernommen. Die experimentellen Arbeiten wurden von Juni 2013 bis Mai 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

Datum der Disputation: 14.10.16

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|------------|
| I. ZUSAMMENFASSUNG | I |
| II. ABSTRACT | III |
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 <i>FRANCISELLA TULARENSIS</i> , DER ERREGER DER TULARÄMIE..... | 1 |
| 1.1.1 Das Bakterium <i>F. tularensis</i> | 1 |
| 1.1.2 Der zelluläre Lebenszyklus von <i>F. tularensis</i> | 4 |
| 1.1.3 Die <i>Francisella</i> -Pathogenitätsinsel codiert für ein T6SS | 6 |
| 1.1.4 <i>Francisella</i> und Eisen | 8 |
| 1.1.5 <i>Francisella</i> -Modellsysteme..... | 9 |
| 1.1.6 <i>F. noatunensis subsp. noatunensis (F.n.n.)</i> als Modell für <i>Francisella</i> | 11 |
| 1.2 <i>D. DISCOIDEUM</i> , EIN MODELLORGANISMUS FÜR INTRAZELLULÄRE PATHOGENE | 12 |
| 1.3 AUTOPHAGIE, EIN ABWEHRMECHANISMUS GEGEN INTRAZELLULÄRE PATHOGENE | 15 |
| 1.4 NRAMP-EISENTRANSPORTER IN MAKROPHAGEN UND <i>DICTYOSTELIUM</i> | 17 |
| 1.5 ZIELSETZUNG | 20 |
| 2 MATERIAL UND METHODEN | 21 |
| 2.1 MATERIALIEN | 21 |
| 2.1.1 Geräte | 21 |
| 2.1.2 Verbrauchsmaterialien | 22 |
| 2.1.3 Chemische und biologische Reagenzien | 23 |
| 2.1.4 Lösungen, Puffer und Medien | 23 |
| 2.1.5 Antikörper | 25 |
| 2.1.6 Antibiotika | 26 |
| 2.1.7 Kits | 26 |
| 2.1.8 Software | 26 |
| 2.2 METHODEN | 27 |
| 2.2.1 Zellbiologie | 27 |
| 2.2.1.1 Kultivierung von <i>Dictyostelium discoideum</i> | 27 |
| 2.2.1.2 Kryokonservierung von <i>D. discoideum</i> | 28 |
| 2.2.1.3 Transfektion von <i>D. discoideum</i> | 28 |
| 2.2.1.4 <i>Dictyostelium</i> Plaque-Test..... | 29 |
| 2.2.1.5 Kultivierung von <i>F.n.n.</i> | 29 |
| 2.2.1.6 Infektion von <i>Dictyostelium</i> mit <i>F.n.n.</i> | 30 |
| 2.2.1.7 Überlebenstest für <i>F.n.n.</i> | 31 |
| 2.2.2 Molekularbiologische Methoden..... | 31 |
| 2.2.2.1 Extraktion von genomischer DNA..... | 31 |
| 2.2.2.2 Extraktion von totaler RNA | 31 |
| 2.2.2.3 Qualitätskontrolle von Nukleinsäuren | 32 |
| 2.2.2.3 Reverse Transkription von mRNA - cDNA-Synthese | 32 |
| 2.2.2.4 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)..... | 32 |
| 2.2.2.4.1 Quantifizierung von Genexpression..... | 33 |
| 2.2.2.4.2 Quantifizierung von <i>F.n.n.</i> -Genomen..... | 33 |
| 2.2.2.5 Klonierung von Plasmiden..... | 35 |
| 2.2.2.5.1 Polymerasekettenreaktion (PCR) | 35 |
| 2.2.2.5.2 Restriktionsverdau | 36 |
| 2.2.2.5.3 Agarosegelelektrophorese..... | 36 |
| 2.2.2.5.4 DNA-Extraktion und -Aufreinigung..... | 36 |
| 2.2.2.5.5 Ligation von DNA-Fragmenten | 37 |
| 2.2.2.5.6 Transformation und Kultivierung von <i>E. coli</i> | 37 |
| 2.2.2.5.7 DNA-Sequenzierung..... | 38 |
| 2.2.2.5.8 Isolierung von Plasmid-DNA..... | 38 |
| 2.2.3 Biochemische Methoden | 38 |
| 2.2.3.1 Proteinextraktion..... | 38 |
| 2.2.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)..... | 38 |
| 2.2.3.3 Immunoblot-Analyse | 39 |
| 2.2.3.4 Immunfluoreszenz-Färbung..... | 40 |

| | |
|--|-------------|
| 2.2.3.5 Durchflusszytometrie | 40 |
| 2.2.4 Mikroskopie | 41 |
| 2.2.4.1 Elektronenmikroskopie (EM) | 41 |
| 2.2.4.1.1 Transmissionselektronenmikroskopie..... | 41 |
| 2.2.4.1.1.1 Chemische Fixierung | 41 |
| 2.2.4.1.1.2 Kryofixierung..... | 42 |
| 2.2.4.1.2 Rasterelektronenmikroskopie | 42 |
| 2.2.4.2 Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie..... | 43 |
| 2.2.4.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie | 43 |
| 2.2.4.4 Lebendzellmikroskopie..... | 44 |
| 2.2.4.5 Bildbearbeitung und -analyse | 45 |
| 2.2.4.6 Quantifizierung von Infektionsrate und Markerassoziation..... | 45 |
| 2.2.5 Statistik und Bioinformatik..... | 45 |
| 3 ERGEBNISSE..... | 47 |
| 3.1 HOHE NUKLEOTIDSEQUENZIDENTITÄT VON VIRULENZFAKTOREN IM GENUS <i>FRANCISELLA</i> | 47 |
| 3.2 <i>D. DISCOIDEUM</i> NUTZT <i>F.N.N.</i> NICHT ALS NAHRUNGSQUELLE..... | 48 |
| 3.3 DIE REPLIKATION VON <i>F.N.N.</i> IN <i>DICTYOSTELIUM</i> IST ABHÄNGIG VON IGLC..... | 49 |
| 3.4 DER INTRAZELLULÄRE LEBENSZYKLUS VON <i>F.N.N.</i> IN <i>DICTYOSTELIUM</i> | 52 |
| 3.4.1 Die Aufnahme von <i>F.n.n.</i> | 52 |
| 3.4.2 <i>F.n.n.</i> entkommt der phagosomalen Reifung abhängig von IglC | 54 |
| 3.4.2.1 Der Verlust von endosomalen Marken ist abhängig von IglC..... | 55 |
| 3.4.2.2 Die Ansäuerung des <i>F.n.n.</i> -Kompartiments ist IglC-unabhängig | 56 |
| 3.4.2.3 <i>F.n.n.</i> Δ IglC wird abgebaut und exozytiert..... | 58 |
| 3.4.3 Die cytosolische Translokation ist abhängig von IglC | 59 |
| 3.4.4 Lektine binden nicht an die potentielle Kapselregion | 61 |
| 3.4.5 Ektopische IglC-Expression komplementiert nicht den attenuierten Phänotyp von <i>F.n.n.</i> Δ IglC..... | 62 |
| 3.5 DIE INTERAKTION VON <i>F.N.N.</i> MIT DER AUTOPHAGIE-MASCHINERIE | 64 |
| 3.5.1 <i>F.n.n.</i> assoziiert mit autophagosomalen Markern | 64 |
| 3.5.2 <i>F.n.n.</i> induziert die Transkription von <i>atg8</i> , aber nicht <i>sqstm1</i> | 66 |
| 3.5.3 Erhöhte Replikation von <i>F.n.n.</i> in Abwesenheit von Autophagie..... | 67 |
| 3.5.4 Erhöhte Replikation in Δ <i>atg1</i> -Zellen durch fehlende cytosolische Degradation.... | 68 |
| 3.6 DER EINFLUSS VON NRAMP1 UND NRAMPB IM <i>DICTYOSTELIUM/F.N.N.</i> - | |
| INFEKTIONSMODELL | 69 |
| 3.6.1 <i>F.n.n.</i> lokalisiert transient in <i>Nramp1</i> -positiven Kompartimenten | 70 |
| 3.6.2 Frühe Herabregulation der Transkription von <i>nramp1</i> und <i>nrampB</i> | 71 |
| 3.6.3 Erhöhte Replikation von <i>F.n.n.</i> in Abwesenheit von <i>Nramp</i> -Transportern | 72 |
| 3.6.4 <i>F.n.n.</i> tritt in den <i>Nramp</i> -Mutanten effizienter aus dem Phagosom aus..... | 73 |
| 3.6.5 Verstärkte Induktion der Eisenakquirierung durch <i>F.n.n.</i> in den <i>Nramp</i> -Mutanten | |
| 74 | |
| 4 DISKUSSION..... | 77 |
| 4.1 <i>F.N.N.</i> BESITZT KONSERVIERTE VIRULENZFAKTOREN | 77 |
| 4.2 <i>DICTYOSTELIUM</i> IST KOMBINIERBAR MIT <i>F.N.N.</i> | 79 |
| 4.3 DIE ROLLE VON IGLC FÜR DAS INTRAZELLULÄRE <i>F.N.N.</i> -WACHSTUM IN <i>DICTYOSTELIUM</i> ... 80 | |
| 4.4 DAS <i>DICTYOSTELIUM/F.N.N.</i> -SYSTEM REKAPITULIERT DEN INTRAZELLULÄREN | |
| INFEKTIONSVERLAUF DES HUMANEN MAKROPHAGENMODELLS..... | 82 |
| 4.4.1 Die Aufnahme von <i>F.n.n.</i> durch <i>Dictyostelium</i> | 82 |
| 4.4.2 Die phagosomale Reifung von <i>F.n.n.</i> in <i>Dictyostelium</i> ist vergleichbar mit <i>F. tularensis</i> in Makrophagen | 85 |
| 4.4.3 Das <i>Dictyostelium/F.n.n.</i> -Modell unterscheidet sich von anderen Amöben | 88 |
| 4.5 DIE KAPSELREGION VON <i>F.N.N.</i> | 90 |
| 4.6 AUTOPHAGIE IST EIN ABWEHRMECHANISMUS GEGEN <i>F.N.N.</i> IN <i>DICTYOSTELIUM</i> | 91 |
| 4.7 NRAMP1 UND NRAMPB TRAGEN ZUR RESISTENZ GEGEN <i>F.N.N.</i> BEI..... | 94 |
| 4.7 AUSBLICK..... | 100 |
| III. ANHANG..... | V |
| IV: ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | VIII |
| V. ABBILDUNGSVERZEICHNIS..... | XI |

| | |
|---|--------------|
| VI. TABELLENVERZEICHNIS..... | XII |
| VII. LITERATURVERZEICHNIS..... | XIII |
| VIII. DANKSAGUNG..... | XXXIV |
| IX. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG..... | XXXV |

I. Zusammenfassung

Bakterien der Gattung *Francisella* sind fakultativ intrazelluläre Bakterien, welche Protisten, Invertebraten und Vertebraten infizieren können. Der Genus kann in zwei Gruppen unterteilt werden: Gruppe 1 wird von *F. tularensis* repräsentiert und infiziert Säugetiere, während Gruppe 2 mit aquatischen Lebensräumen assoziiert ist und vom Fischpathogen *F. noatunensis* vertreten wird. *F. tularensis* verursacht im Menschen die potentiell tödliche Erkrankung Tularämie und nutzt in der Infektion Makrophagen als primäre Zielzellen. Um die Virulenzmechanismen von *Francisella* zu untersuchen, wurden bisher hauptsächlich das Mausmodell und Säugerzelllinien verwendet. Aufgrund von wirtsspezifischen Unterschieden und hohen Sicherheitsanforderungen für Arbeiten mit *Francisella* wurden jedoch zunehmend alternative Modellsysteme entwickelt, um grundlegende und konservierte Aspekte der Wirt-*Francisella*-Interaktion zu analysieren.

In dieser Studie wurde ein genetisch und biochemisch steuerbares Infektionsmodell entwickelt: die Amöbe *Dictyostelium discoideum* kombiniert mit dem Fischpathogen *F. noatunensis* subsp. *noatunensis* (*F.n.n.*). Die *Francisella*-Pathogenitätsinsel ist im Genus konserviert und deutet auf vergleichbare Virulenzmechanismen zwischen fisch- und humanpathogenen *Francisella*-Spezies hin. Nach der Aufnahme über Phagozytose interagiert das *F.n.n.*-enthaltende Kompartiment in *Dictyostelium* mit Endosomen und wird transient angesäuert. Anschließend entkommt *F.n.n.* dem phagolysosomalen Weg durch den Ausbruch ins Cytosol, wo die Bakterien replizieren. Dieser Prozess ist abhängig vom Virulenzfaktor IgIC, einer Komponente des Typ-6-Sekretionssystems (T6SS), und offenbart damit die konservierte Rolle des T6SS für die Virulenz von *Francisella* im *Dictyostelium/F.n.n.*-System. Im Cytosol von *Dictyostelium* interagiert *F.n.n.* mit der autophagosomalen Maschinerie und wird von Ubiquitin und SQSTM1 für die Degradation im Autophagosom markiert. Eine beeinträchtigte Autophagie in *Dictyostelium Δatg1*-Zellen führt zu verstärktem, bakteriellen Wachstum im Cytosol und weist der Autophagie damit eine defensive Rolle gegen *F.n.n.* zu.

Desweiteren wurde der Einfluss der intrazellulären Eisenhomeostase auf *Francisella* im *Dictyostelium/F.n.n.*-System untersucht. In Deletionsmutanten der Nramp1- und NrampB-Eisentransporter tritt *F.n.n.* effizienter aus dem Phagosom ins Cytosol über. Einem erniedrigten Eisengehalt in den Nramp-Mutanten kann *F.n.n.* durch eine

verstärkte Induktion der Gene, die eine Eisenakkumulation bewirken, entgegenwirken. Dies führt zu erhöhtem bakteriellen Wachstum in Abwesenheit der Eisentransporter. Der Einfluss von Nramp1 und NrampB auf die phagosomale Reifung als Ursache für die erhöhte Resistenz bleibt zu ermitteln.

Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass das *Dictyostelium/F.n.n.*-Modell den Infektionsverlauf in Makrophagen rekapituliert, sich aber von anderen Amöben unterscheidet. Dieses simple und leicht zu manipulierende Infektionssystem erlaubt zukünftig die Entwicklung neuer Ansätze um die Interaktion von *Francisella* und Wirtszelle genauer zu charakterisieren.

II. Abstract

The bacterial genus of *Francisella* comprises facultative intracellular pathogens, which can infect protists, invertebrates and vertebrates. They can be classified into two groups: members of group 1 infect mammals and are represented by *F. tularensis*, whereas group 2 is associated with aquatic habitats and represented by *F. noatunensis*. In humans, *F. tularensis* is the etiological agent of the potentially fatal disease tularemia and primarily infects macrophages. Mainly, mammalian cell lines have been used to analyse virulence mechanisms that enable *Francisella* to infect and manipulate various host cell types. However, due to host specific differences and high safety level requirements for *F. tularensis*, alternative model systems are established to investigate basic and conserved aspects of *Francisella*-host cell interactions.

This study describes the establishment of a novel, genetically and biochemically tractable *Francisella* infection model: the amoeba *Dictyostelium discoideum* combined with the fish pathogen *F. noatunensis* subsp. *noatunensis* (*F.n.n.*). The *Francisella* pathogenicity island codes for multiple virulence factors and is conserved within the genus indicating a conserved virulence strategy between fish and human pathogenic species. After uptake via phagocytosis the *F.n.n.*-containing phagosome interacts with the endosomal pathway in *Dictyostelium* and transiently acidifies. *F.n.n.* subsequently escapes phagosomal maturation by escaping into the cytosol, where it replicates. This hallmark of the *Francisella* life cycle depends on the virulence factor IgIC, which is part of a type 6 secretion system (T6SS), and thereby reveals the conserved role of T6SS activity in the *Dictyostelium/F.n.n.* infection model. In the cytosol of *Dictyostelium*, *F.n.n.* interacts with autophagic markers and is labeled by ubiquitin and SQSTM1 for autophagic degradation. If autophagy is impaired ($\Delta atg1$), bacterial growth is increased showing the defensive role of autophagy against *F.n.n.* in *Dictyostelium*. The influence of intracellular iron homeostasis on *Francisella* was investigated in the *Dictyostelium/F.n.n.* system using *nramp1* and *nrampB* deletion mutants. The Nramp1 and NrampB iron transporters facilitate resistance against *F.n.n.* as bacteria can escape phagosomes more efficiently in Nramp knockout mutants. They compensate decreased cytosolic iron levels for growth by an increased induction of iron accumulation genes. However, the influence of Nramp1

and NrampB on phagosomal maturation as the reason for enhanced resistance remains to be elucidated.

Altogether, the *Dictyostelium/F.n.n.* infection model recapitulates the course of infection in macrophages. Importantly, it stands out from other amoeba in which *Francisella* replicates intravacuolarly. This novel infection system using an easily tractable surrogate macrophage allows new approaches to investigate *Francisella*-host cell interactions.

1 Einleitung

1.1 *Francisella tularensis*, der Erreger der Tularämie

1.1.1 Das Bakterium *F. tularensis*

Im Jahr 1911 wurde ein neues bakterielles Pathogen, *Bacterium tularense*, während eines Pest-ähnlichen Krankheitsausbruchs bei Erdhörnchen in Tulare County (Kalifornien, USA) entdeckt (1, 2). Dr. Edward Francis charakterisierte anschließend das klinische Bild des Erregers im Menschen und stellte eine Übertragung des Pathogens durch blutsaugende Insekten und Kontakt zu infizierten Hasenartigen und Nagetieren fest (3, 4). Aufgrund einzigartiger Eigenschaften wurde das Gram-negative, kokkenförmige Bakterium einer neuen Gattung zugeordnet und zu Ehren von Dr. Francis in *Francisella tularensis* umbenannt (5).

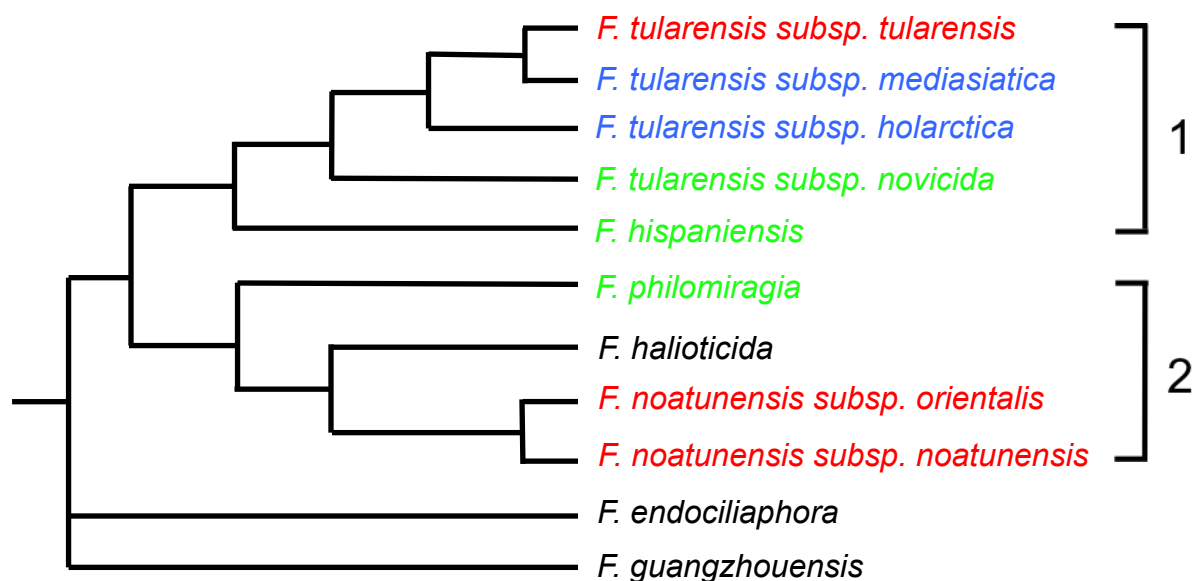


Abbildung 1.1: Phylogenie der Gattung *Francisella*. Die Gattung *Francisella* entstammt einem gemeinsamen marinen Vorfahren und lässt sich in zwei Gruppen einteilen. Gruppe 1 infiziert Säugetiere und andere terrestrische Organismen, während Gruppe 2 mit aquatischen Lebensräumen assoziiert ist. Die Farben implizieren die Virulenz der Bakterien im Menschen (Gruppe 1 und *F. philomiragia*) bzw. Fischen (*F. noatunensis*: hoch (rot), moderat (blau), schwach (grün), keine Infektion bekannt (schwarz) (verändert nach (6)).

Francisella ist die einzige Gattung der Familie *Francisellaceae* und gehört zu den γ -Proteobakterien (7, 8). Nach aktuellen Genomanalysen gibt es sieben *Francisella*-Spezies, welche wiederum in diverse Subspezies unterteilt sind. Die meisten Mitglieder der Gattung lassen sich in zwei Abstammungslinien einordnen und teilen

sich einen marinen Vorfahren (Abb. 1.1). Gruppe 1 infiziert Säugetiere und andere terrestrische Organismen und beinhaltet überwiegend *F. tularensis* Subspezies. Gruppe 2 assoziiert hingegen mit aquatischen Lebensräumen und wird durch *F. noatunensis* repräsentiert (6). Die kürzlich entdeckten Spezies *F. guangzhouensis* und *F. endociliophora* stehen eigenständig außerhalb dieser Gruppen (9, 10).

Das fakultativ, intrazelluläre Bakterium *F. tularensis* ist der Erreger der Tularämie, einer Zoonose, die auch als Hasenpest, Nagerpest, Lemmingfieber oder Hirschfliegenfieber bekannt ist (11). *F. tularensis* lässt sich in vier Subspezies mit unterschiedlicher Virulenz und geographischer Verbreitung unterteilen: *tularensis* (Typ A), *holarctica* (Typ B), *mediasiatica* und *novicida* (12, 13). Lediglich die ersten beiden sind für den Menschen von klinischer Relevanz. Typ A kommt ausschließlich in Nordamerika vor, ist die virulenteste Subspezies und verursacht lebensbedrohliche Krankheitsverläufe in Patienten. Bereits zehn Bakterien dieses Typs führen zu einer Infektion im Menschen (14). Typ B ist in der gesamten nördlichen Hemisphäre verbreitet (15) und zeichnet sich durch eine geringere Virulenz und mildere Krankheitsverläufe aus (16). Für den Menschen von geringer Bedeutung sind die Subspezies *mediasiatica*, welche lediglich vereinzelt in Zentralasien vorkommt (17), und *novicida*, von der global nur einzelne Infektionen in immunsupprimierten Patienten bekannt sind (18, 19).

Als natürliche Wirte dient *F. tularensis* ein großes Spektrum von Vertebraten, wie Säugetiere (vor allem Hasenartige und Nagetiere), Vögel, Amphibien und Fische, über Invertebraten, wie Zecken, Mücken und Bremsen, bis zu Protisten. Eine Übertragung auf den Menschen erfolgt oft über den Kontakt zu infiziertem Fleisch oder die Blutmahlzeit von Arthropoden (Zecken, Mücken). Doch auch durch die Inhalation von Bakterien sowie der Aufnahme von kontaminierter Nahrung oder Wasser ist eine Infektion möglich (20). Des Weiteren wird vermutet, dass Amöben im Wasser als natürliches Reservoir der Bakterien dienen können (21).

In Abhängigkeit von der Infektionsroute und der Subspezies kann Tularämie viele klinische Formen im Menschen annehmen (22). Die klinischen Formen von Tularämie können stark variieren, jedoch treten in den häufigsten Fällen Grippe-ähnliche Symptome, vor allem hohes Fieber, auf. Die häufigste Erkrankungsform ist die ulceroglanduläre Tularämie (80% der Fälle) (23), die meistens durch die Penetration infizierter Arthropoden verursacht wird (24, 25). An der Eintrittsstelle formt sich ein Geschwür, welches mehrere Monate bestehen kann. Die

Sterblichkeitsrate dieser Form ist jedoch gering (< 3%) (26). Die Aufnahme von kontaminierter Nahrung oder Wasser kann zur oropharyngealen oder gastrointestinalen Tularämie führen (27, 28). Mit Symptomen, wie Halsschmerzen und geschwollenen Lymphknoten, verläuft die erste Form meistens milde. Im Darm kann die Symptomatik je nach Infektionsdosis von leichtem Durchfall bis zur Geschwürbildung und anschließendem Tod reichen (22). Die Inhalation von Bakterien über Aerosole oder Staub kann pneumotische Tularämie auslösen (10-20%), welche ohne Behandlung in geschätzten 30-60% der Fälle letal ist (29, 30). Typhoidale oder systemische Tularämie (10% der Fälle) kann als Komplikation aller anderen Formen oder in immunsupprimierten Patienten vorkommen (26, 29). Bei der Tularämie handelt es sich um eine seltene Erkrankung. 2010 wurden lediglich 1531 Fälle in der Türkei (31), 484 in Schweden (32) und 125 in den USA (33) registriert. Ein Großteil der Fälle scheint jedoch nicht diagnostiziert zu werden. So wurde in der durchschnittlichen Bevölkerung Deutschlands mit 3-5 Fällen/Jahr (34) eine Seroprävalenz von 0,23 – 2,3% und bis zu 4% in Waldarbeitern (Nordrhein-Westfalen) festgestellt (35-37).

Tularämie kann mithilfe unterschiedlicher Antibiotika behandelt werden, dazu gehören Streptomycin und Gentamicin (38). Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahrzehnten gibt es keinen zugelassenen Impfstoff gegen *F. tularensis*. In der ehemaligen Sowjetunion konnte durch serielle Passagen des Typ B ein attenuierter Stamm, der *live vaccine strain* (LVS), generiert werden (39). Dieser schützt jedoch nur begrenzt vor einer Infektion mit *F. tularensis* Typ A und ist nicht offiziell zugelassen, da die genetischen Mechanismen, die zu seiner Attenuierung führen, noch nicht vollständig verstanden sind (40, 41). Aufgrund der hohen Virulenz, der einfachen Transmission über Aerosole, der schweren Symptomatik und hohen Mortalität wird *F. tularensis* als BSL3-Organismus und biologischer Kampfstoff klassifiziert (42). Um die außergewöhnlich hohe Virulenz besser zu verstehen und unter Rücksicht der Terror- und Anthraxanschläge 2001 wurde die *Francisella*-Forschung in den letzten 15 Jahren intensiviert (43).

1.1.2 Der zelluläre Lebenszyklus von *F. tularensis*

F. tularensis ist in der Lage in eine Vielzahl von Phagozyten (Makrophagen, dendritische Zellen, Neutrophile) und nicht-phagozytierenden Zelltypen (Hepatozyten, Fibroblasten, Epithelzellen) einzudringen (44-49). Makrophagen bilden die erste Abwehr gegen eindringende Bakterien und dienen gleichzeitig als zentrale Wirtszelle des Bakteriums.

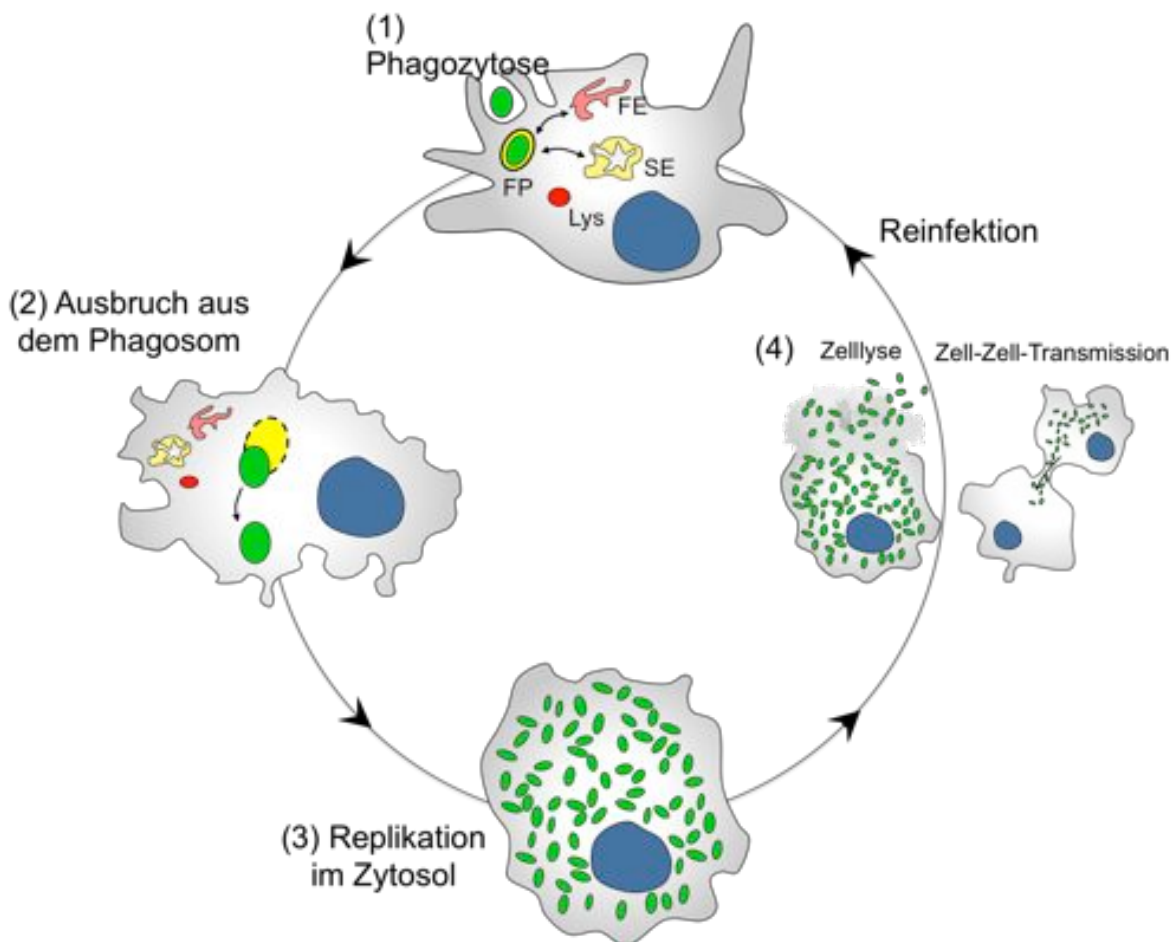


Abbildung 1.2: Der Lebenszyklus von *F. tularensis* in humanen Makrophagen. (1) Nach Aufnahme befindet sich *F. tularensis* in einem Phagosom (FP), welches mit frühen (FE) und späten (SE) Endosomen interagiert, während Lysosomen (Lys) nicht fusionieren. (2) Nach kurzer Zeit bricht das Bakterium aus dem Phagosom aus und repliziert sich extensiv im Cytosol der Wirtszelle (3). (4) Die Übertragung von Bakterien kann entweder durch Zelllyse und anschließende Reinfektion oder mittels direkter Zell-Zell-Transmission erfolgen (verändert nach Celli 2011).

Der Lebenszyklus von *F. tularensis* in Makrophagen beginnt durch die Phagozytose des Bakteriums. Der Opsonierungsstatus des Bakteriums bestimmt den Aufnahmemechanismus und beeinflusst damit den weiteren Infektionsverlauf. So

replizieren sich nicht-opsonisierte *F. tularensis* besser in murinen Makrophagen als opsonierte Bakterien (50). Nach der Aufnahme befindet sich *Francisella* in einem *de novo* Phagosom, welches der phagosomalen Reifung folgt und mit Komponenten des endosomalen Systems interagiert. Nacheinander lokalisieren Marker früher (z.B. *early endosome antigen-1*, EEA-1) und später Endosomen (z.B. *lysosomal-associated membrane protein-1*, LAMP-1) am *Francisella* enthaltenden Phagosom (FEP) (51, 52). Eine Fusion mit Lysosomen wird jedoch verhindert (52, 53). Ein wichtiger Schritt der phagosomalen Reifung ist die Ansäuerung des Phagosoms, welche die Funktion hydrolytischer Enzyme des lysosomalen Weges ermöglichen (54). Die Ansäuerung des FEP durch die Rekrutierung der vakuolären ATPase (V-ATPase) bleibt jedoch umstritten. Während einige Studien eine Blockierung der Ansäuerung und nur geringe Mengen der V-ATPase am FEP feststellten (52, 55), beschrieben andere Untersuchungen eine Azidifizierung und den Erwerb der V-ATPase am Kompartiment (56, 57).

Der Ausbruch aus dem Phagosom ins Cytosol wurde für mehrere *Francisella*-Spezies in verschiedenen Zelltypen beschrieben (51, 52, 56, 58). Je nach Infektionsmodell unterscheidet sich der Zeitpunkt des Austritts aus dem Phagosom und variiert zwischen 1-8 Stunden nach Infektion (hpi) (45, 51, 52, 58, 59). *Francisella* codiert keine Lipidhydrolasen oder Phospholipidasen, welche typischerweise von *Listeria* oder *Shigella* für die Auflösung der Phagosomenmembran verwendet wird (60). Stattdessen exprimiert *Francisella* ein Typ-6-Sekretionssystem (T6SS), dessen Faktoren in der *Francisella*-Pathogenitätsinsel (FPI) codiert werden (siehe 1.1.3) (61). Faktoren der FPI sind essentiell für den Austritt aus dem Phagosom, einem Schlüsselaspekt des Lebenszyklus von *Francisella* und Voraussetzung für die intrazelluläre Replikation. So sind viele Mutanten, welche nicht aus dem Phagosom entkommen können, nicht in der Lage in Makrophagen oder Mäusen zu replizieren (55, 62-68). Aufgrund der Bedeutung des Austritts aus dem Phagosom für die bakterielle Virulenz widmen sich viele Studien der Identifizierung beteiligter Faktoren von Pathogen und Wirtszelle .

Im Cytosol angekommen, repliziert *F. tularensis* rapide innerhalb von 12-24 h (48, 51). Der cytosolischen Replikation von Pathogenen steht die Autophagie entgegen, ein konservierter Abwehrmechanismus des angeborenen Immunsystems (siehe 1.3). Die Rolle der Autophagie in der *Francisella*-Infektion ist vielfältig. So wurde sowohl eine Herabregulation als auch Aktivierung verschiedener Autophagiefaktoren im

Infektionsverlauf beobachtet (69). Autophagie kann sowohl als Abwehrmechanismus cytosolische Bakterien abbauen (70, 71) als auch als Nahrungsquelle durch die Entlassung von Aminosäuren fungieren (72). Zudem wurde die Rückkehr von postreplikativen Bakterien in nicht-abbauende Autophagosomen von murinen Makrophagen beobachtet (51). Am Ende der Replikationsphase induziert *Francisella* die Apoptose der Wirtszelle, woraufhin die Bakterien neue Wirtszellen infizieren können (73). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine direkte Zell-Zell-Übertragung durch Membranfusion (Trogozytose) für die Transmission in J774-Makrophagen verantwortlich ist (74).

Amöben werden als potentiell Reservoir für *Francisella* in der Umwelt diskutiert. Im Labor wurde gezeigt, dass *Francisella* die Amöbenspezies *Acanthamoeba castellanii* und *Hartmannella vermiformis* infizieren und sich in ihnen replizieren kann. Der intrazelluläre Lebenszyklus unterscheidet sich jedoch grundlegend zwischen Amöben und Makrophagen. So transloziert *F. tularensis* in Amöben nicht ins Cytosol sondern repliziert sich ausschließlich in nicht-angesäuerten Vakuolen (75, 76). Zusätzlich bildet *F.t. holarctica* innerhalb von *A. castellanii* Zysten, ein Prozess, der als Überdauerungsstrategie in der Umwelt angesehen wird (77). Für mehrere bakterielle Pathogene wird vermutet, dass Amöben als "Übungsgelände" fungieren könnten, die sie auf eine feindliche Umgebung innerhalb von Säugerwirtszellen vorbereitet (78). Im Gegensatz zu Legionellen ist ein "Trainingseffekt" für *F.t.novicida* in Mäusen jedoch nicht zu beobachten (79, 80).

1.1.3 Die *Francisella*-Pathogenitätsinsel codiert für ein T6SS

Viele Faktoren, die mit dem Ausbruch aus dem Phagosom und der intrazellulären Replikation assoziiert sind, werden in einem Locus codiert, welcher als *Francisella*-Pathogenitätsinsel (FPI) bezeichnet wird (81). Die etwa 30 kb große FPI weist abhängig von der *Francisella*-Spezies 15-17 offene Leseraster auf (siehe Abb. 3.1). Die *F. tularensis* Subspezies *tularensis*, *holarctica* und *mediasiatica* verfügen über zwei Kopien der FPI im Genom, während *F.t.novicida* sowie die restlichen Spezies der Gruppe 2 nur eine Kopie besitzen (82). *F. tularensis*-Deletionsmutanten von fast allen FPI-Gene (*intracellular growth locus* (Igl) A-J; *pathogenicity dependent protein* (*pdp*) A, B, D; *valine-glycine repeat protein* G (*vgrG*), *dotU*) weisen einen attenuierten

Phänotyp in Makrophagen auf (83), der in der Regel mit der Unfähigkeit aus dem Phagosom zu entkommen, assoziiert ist. Der am umfangreichsten charakterisierte Virulenzfaktor ist IgIC (84, 85). Die *igIC*-Deletionsmutante kann nicht aus dem Phagosom entkommen und ist attenuiert in Makrophagen, Mäusen und Amöben (53, 86, 87). Sjöstedt *et al.* zeigten, dass FPI-Deletionsmutanten im Cytosol replizieren konnten und somit der Phagosomenausbruch die entscheidende Aufgabe der FPI-Genprodukte ist (88). Die höchste Transkription weisen FPI-Gene jedoch in der späten cytosolischen Phase auf, so dass eine zusätzliche Rolle im Cytosol nicht ausgeschlossen werden kann (89).

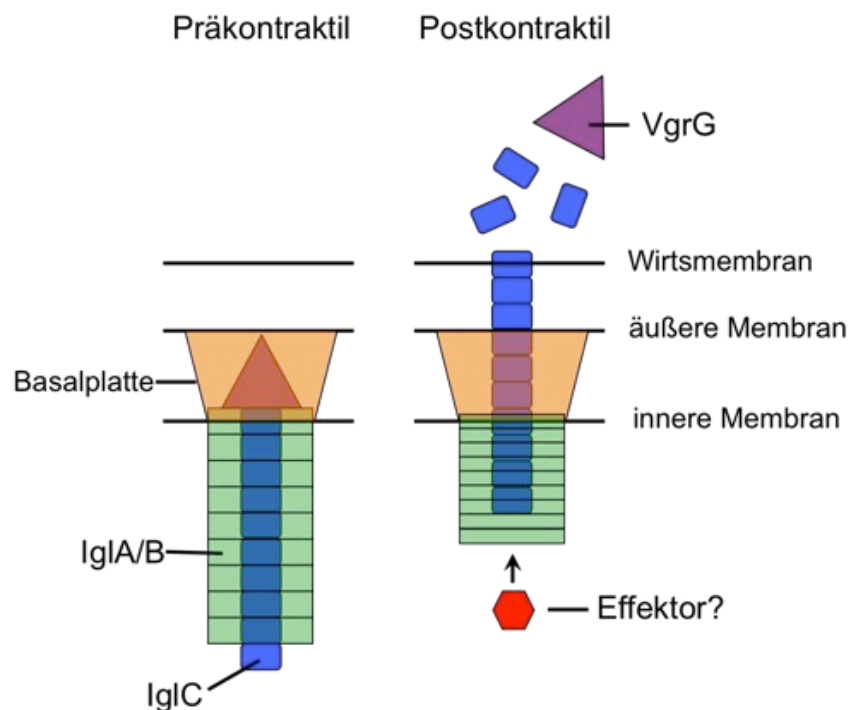


Abbildung 1.3: Modell des *Francisella*-T6SS. IglA/B-Heterodimere sind an einer Basalplatte verankert und bilden eine Röhre, um durch Kontraktion ein IglC-Multimer aus dem Bakterium zu schieben. Eine VgrG-Spitze penetriert die Wirtsmembran und IglC und VgrG werden ins Cytosol der Wirtszelle sekretiert. Ob weitere Effektoren sekretiert werden ist unbekannt.

Die Funktion der meisten FPI-Proteine ist unbekannt, jedoch konnte kürzlich die Identität von IglA-C als elementare Strukturbestandteile des T6SS bestätigt werden (90) (Abb. 1.3). So bilden IglA/IglB-Heteromere eine hohle Röhre, die dem Schwanz von T4-Bakteriophagen ähnelt. Es wird vermutet, dass diese Röhre auf einer vorgefertigten IglC-Röhre assembliert, welche durch Kontraktion der IglA/B-Röhre aus dem Bakterium geschoben wird. An der Spitze befindet sich ein VgrG-Multimer, welches die phagosomale Membran zwecks Proteinsekretion punktiert und

zusammen mit IgIC in die Zelle sekretiert wird (90, 91). Die Sekretion einiger FPI-Faktoren ins Cytosol der Wirtszelle konnte gezeigt werden, jedoch sind keine dazugehörigen Effektormechanismen bekannt. Die Expression von IgIC und anderen T6SS-Faktoren wird im Infektionsverlaufs reguliert, unter anderem durch den Eisengehalt der Umgebung (61).

1.1.4 *Francisella* und Eisen

Sowohl für Wirt als auch Pathogen ist Eisen ein essentieller Cofaktor für enzymatische Prozesse und hat gleichzeitig Auswirkungen auf die bakterielle Pathogenität und die Immunantwort des Wirtes. Die multiple Funktion von Eisen gründet auf dessen Fähigkeit Elektronen für metabolische Prozesse zu transferieren und die Entstehung hochreaktiver Radikale zu katalysieren. Aerobe Organismen regulieren strikt ihre Eisenhomeostase, um die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu verhindern, welche ansonsten wirtseigene Proteine und Lipide schädigen. So sehen sich intrazelluläre Pathogene einer Eisenlimitierung innerhalb der Wirtszelle ausgesetzt. In Organismen kommt Eisen in zwei Formen vor: wasserlösliches Fe^{2+} , welches der Hauptanteil von verfügbarem Eisen im Cytosol ist, und unlösliches Fe^{3+} , welches in Form von Proteinkomplexen gebunden ist. Übliche bakterielle Mechanismen der Eisenaufnahme sind der Transport von Fe^{2+} mittels Transmembrantransporter und die Produktion und Sekretion von Siderophoren, kleinen Eisenchelatoren, die Fe^{3+} binden (92, 93).

In *F. tularensis* ist die Eisenaufnahme abhängig von zwei Mechanismen. 1) Der *Francisella siderophore locus* (*fsl*) codiert für 6 Gene (*fslA-F*), welche an der Biosynthese und dem Transport eines Siderophors, ähnlich Rhizoferrin, beteiligt sind (94). 2) Das Feo-System (*feoA*, *feoB*) besteht in *Francisella* aus einem Transmembrantransporter (*FeoB*) und einem kleinen Protein (*FeoA*) mit unbekannter Funktion und dient der Aufnahme von Fe^{2+} (95). Das *fsl*- und Feo-System komplementieren einander und erst eine Doppeldeletion in *F. tularensis* führt zur Attenuierung in Makrophagen und Mäusen (96). Während das Feo-System ubiquitär im *Francisella*-Genus codiert ist, besitzen nur die humanpathogenen Vertreter der Gruppe 1 das *fsl*-Operon. In frei lebenden, metabolisch kompetenten Spezies (*F. philomiragia*, *F. guangzhouensis*) ist das Siderophor-System schwächer

konserviert. Die fischpathogenen Spezies *F.n.o.* und *F.n.n.* weisen sogar nur eine Siderophor-Synthetase *lucA/C* auf (82). Reguliert werden die Eisentransportergene in *Francisella* und anderen Bakterien durch den Repressor Fur, welcher bei der Anwesenheit von Eisen an die Fur-Box vor dem Gen bindet und die Transkription blockiert. Herrscht jedoch Eisenmangel dissoziiert Fur von der DNA-Bindungsstelle und die Eisen-assoziierten Gene werden aktiviert (97). So werden die *fsI*- und *feo*-Gene unter Eisenmangel und zumindest das *fsI*-Operon während der Infektion von Makrophagen stark hochreguliert (89, 96). Auch eine Regulation von FPI-Genen durch Fur konnte gezeigt werden (97).

Neben der Rolle als Wachstumsfaktor kann Eisen potentiell auch eine Funktion in der Produktion von ROS einnehmen. So kann ungebundenes Eisen die Zersetzung von H_2O_2 zu reaktiven OH- Radikalen katalysieren, auch bekannt als Fenton-Reaktion (98). Lindgren *et al.* zeigten, dass *F.t.tularensis* weniger Eisen als *F.t.holarctica* enthält. Dies korrelierte mit einer höheren Resistenz gegen eine H_2O_2 -induzierte Abtötung im Vergleich zu *F.t.holarctica* (99). Dieser Mechanismus wird häufig im Zusammenhang mit ROS-induzierter Abtötung von Bakterien im Phagosom diskutiert, jedoch konnte bis jetzt keine Fenton-Reaktion in einem Phagosom beobachtet werden (100).

1.1.5 *Francisella*-Modellsysteme

Die Wirt-Pathogen-Interaktion von *Francisella* kann in verschiedenen Infektionsmodellen untersucht werden. Zu Beginn der *Francisella*-Forschung wurden bevorzugt Menschen und Primaten als Modelle für die Untersuchung der bakteriellen Pathogenität verwendet (101, 102). Aus ethischen Gründen werden diese Modelle heutzutage jedoch nur selten eingesetzt. Das Ziel blieb jedoch ein Tiermodell zu entwickeln, welches auf den Infektionsverlauf im Menschen übertragen werden kann. Daraufhin wurden andere Säugetiere wie beispielsweise Kaninchen, Ratten, Meerschweinchen und Mäuse als Tiermodelle entwickelt, welche aufgrund diverser Vor- und Nachteile für verschiedene Fragestellungen eingesetzt werden (103). Aufgrund der relativ geringen Kosten und umfangreichen genetischen Mittel ist die Maus der meist genutzte Modellorganismus. Ein bedeutendes Problem ist jedoch die unterschiedliche Suszeptibilität zu verschiedenen *Francisella*-Stämmen im Vergleich

zum Menschen. Beispielsweise sind Mäuse hoch sensitiv gegen den Impfstamm (LVS) (104) und *F.t.novicida* (105), die keine oder nur geringe Symptome im Menschen verursachen (18, 106).

Studien des intrazellulären Infektionsverlaufs von *F. tularensis* werden in diversen Zelltypen, jedoch typischerweise in humanen und murinen Makrophagen durchgeführt. Zwischen den humanen und murinen Makrophagen existieren jedoch bedeutende Unterschiede, welche eine Übertragbarkeit der Resultate der *Francisella*-Virulenz erschweren. So treten Bakterien in Mausmakrophagen nach der cytosolischen Teilung wieder in eine Vakuole mit autophagosomalen Eigenschaften ein, ein Prozess der im humanen System nicht beobachtet wird (51). Zudem induziert *Francisella* in den beiden Makrophagen-Typen unterschiedliche Zytokinprofile, die zu verschiedenen Immunantworten führen können (105, 107). Die Unterschiede zwischen den etablierten *Francisella*-Systemen führten zusammen mit den hohen Sicherheitsanforderungen für *F. tularensis*-Laborarbeiten (S3) zur Entwicklung alternativer Modellsysteme.

In den letzten Jahren wurden simple biologische Systeme für die Analyse von Wirt-Pathogen-Beziehungen etabliert, unter anderem die Modellorganismen *Caenorhabditis elegans* (108), *Drosophila melanogaster* (109) oder *Dictyostelium discoideum* (110). Diese Systeme erlauben kostengünstige Studien in großem Umfang ohne ethische Bedenken. Eine erste Erleichterung für die *Francisella*-Forschung war die Verwendung der Spezies *F.t.novicida*, die für den Menschen kaum virulent ist, genetisch leicht manipulierbar und unter S2-Bedingungen verwendet werden darf (87). Diese Spezies besitzt eine hohe Homologie zum hoch virulenten *F.t. tularensis* und der Infektionsverlauf der beiden *Francisella*-Spezies gleicht sich in Insektenzellen und humanen Makrophagen. So wurden *Drosophila* und daraus stammende S2-Insektenzellen für das Screening von *Francisella*-Virulenzfaktoren verwendet (111). Zwar wurden gemeinsame, konservierte Virulenzfaktoren zwischen humanen Makrophagen und *Drosophila* identifiziert, jedoch waren viele Faktoren nur für eines der beiden Systeme spezifisch (112, 113). Deshalb ist *Drosophila* eher als Vektormodell zur Untersuchung der Übertragbarkeit von *Francisella* geeignet. Ein weiteres Arthropodenmodell stellen die Larven der Wachsmotte *Galleria mellonella* dar, welche für die Untersuchung von antimikrobiellen Stoffen gegen *F. tularensis* LVS verwendet werden (114). Zudem wurde *G. mellonella* als *in vivo* Modell für *F. philomiragia* beschrieben, wodurch

Studien auch unter S2-Bedingungen möglich sind (115). Nix *et al.* nutzten Hühnerembryonen um die Virulenz von *F. tularensis* LVS und *F.t.novicida* Mutanten in einem *in vivo* System ohne ausgeprägtes Nervensystem zu beurteilen (116).

Für die Untersuchung der Wechselwirkung von *Francisella* und dem Immunsystem hat sich der Zebrafisch (*Dario rerio*) als geeigneter Modellorganismus herausgestellt (117, 118). Denn Zebrafische teilen viele Schlüsselaspekte des angeborenen und adaptiven Immunsystems mit Säugern und dienen somit als ein etabliertes Modell für viele pathogene Bakterien und Viren (119-123). Vor kurzem wurde der Zebrafisch in Kombination mit den aquatischen *Francisella*-Spezies *F.n.orientalis* und *F.n.noatunensis* als *in vivo* Modell etabliert, welches die *Francisella*-Infektion in Säugern rekapituliert (117, 118). Damit konnte die Relevanz von Ersatzpathogenen für das Studium von *Francisella*-Virulenz gezeigt werden. In Kombination mit Ersatzwirten werden Ersatzpathogene zunehmend eingesetzt um Sicherheitsrisiken zu reduzieren, konservierte Mechanismen zu identifizieren und damit etablierte Modelle zu komplementieren.

1.1.6 *F. noatunensis* subsp. *noatunensis* (*F.n.n.*) als Modell für *Francisella*

F. noatunensis Subspezies sind avirulent für Säugetiere (124), verursachen aber in Fischen eine systemische Krankheit namens Francisellose (125). Durch eine hohe Sterblichkeitsrate von bis zu 40% im Kabeljau führt die Infektion mit *F. noatunensis* zu großen ökonomischen Verlusten in der Aquakultur-Industrie (126-130). *F. noatunensis* setzt sich aus den Subspezies *noatunensis* und *orientalis* zusammen, bilden jedoch eine paraphyletische Gruppe (82). *F.n.n.* und *F.n.o.* sind an verschiedene Körpertemperaturen ihres Wirtes angepasst. So infiziert *F.n.o.* "Warmwasser"-Fische, wie den Buntbarsch (*Oreochromis niloticus*), während *F.n.n.* ausschließlich "Kaltwasser"-Fische (Lachs, Kabeljau) befällt (131-133). In seinem natürlichen Wirt, dem Kabeljau, infiziert *F.n.n.* bevorzugt Makrophagen, bildet Granulomata-ähnlichen Strukturen (GAS) und ähnelt damit pathologisch der humanen Tularämie (134). Übereinstimmend mit *F. tularensis* scheint *F.n.n.* in Kabeljau-Leukozyten vom Phagosom ins Cytosol zu wandern (135). Auch das kürzlich etablierte Zebrafischembryo/*F.n.n.*-Modell rekapituliert viele Aspekte der humanpathogenen *Francisella*-Infektion. So verursacht *F.n.n.* in den Embryonen eine

chronische Infektion mit langsamem bakteriellen Wachstum (Generationszeit 43 h). Wie im Menschen infiziert *F.n.n.* vorzugsweise Makrophagen und induziert die Bildung von GAS und eine proinflammatorische Immunantwort (117). Dies bestätigt die Relevanz des Zebrafisch/*Francisella*-Modells als auch von *F.n.n.* als Ersatzpathogen.

1.2 *D. discoideum*, ein Modellorganismus für intrazelluläre Pathogene

Der einfache Eukaryot *D. discoideum* ist ein weit verbreitetes Modellsystem für die Untersuchung bakterieller Pathogene (110) und wurde in dieser Arbeit als Infektionsmodell für *Francisella*-Bakterien etabliert. *Dictyostelium* gehört zur Gruppe der Amoebozoa und lebt als Einzeller in terrestrischen Lebensräumen von den gemäßigten Breiten bis zu den Tropen, wo es sich von Bakterien und Hefen ernährt (136, 137).

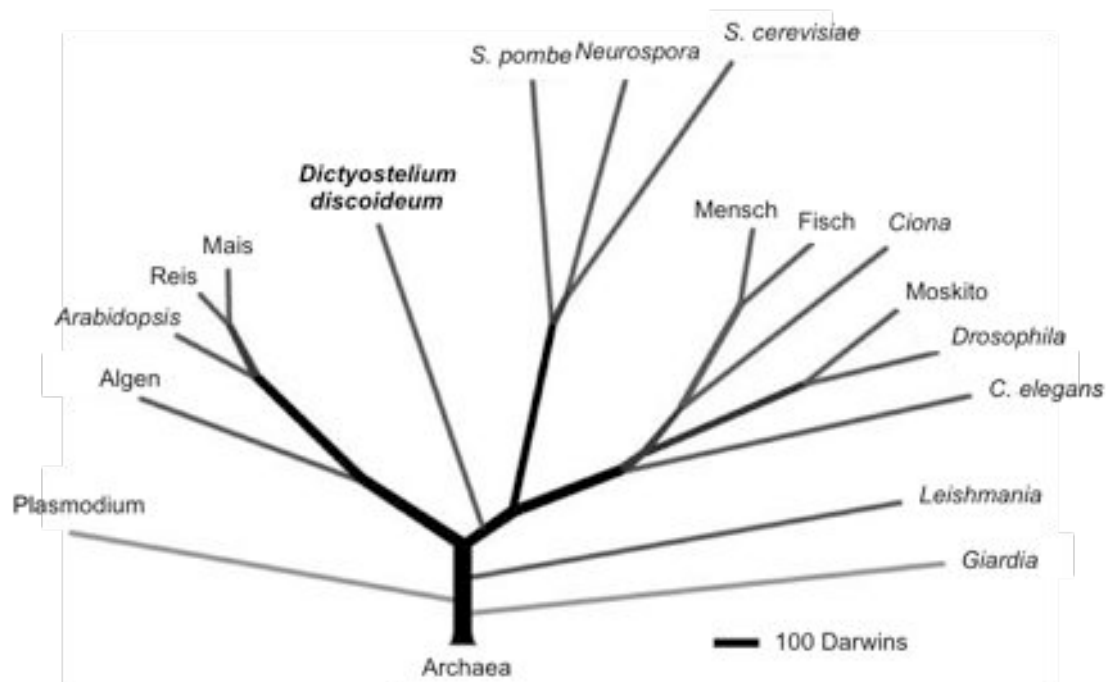


Abbildung 1.4: Phylogenetische Einordnung ausgewählter Eukaryoten auf Grundlage des Proteoms. *Dictyostelium* hat sich nach der Aufspaltung von Pflanzen und Tieren/Pilzen von letzteren abgespalten (138).

Unter Nahrungsmangel aggregieren die vegetativen Zellen und durchlaufen eine Entwicklung zum mehrzelligen Organismus, welcher zwecks Verbreitung und

Überdauerung Sporen produziert (139). Basierend auf Proteom-Analysen hat sich *Dictyostelium* nach der Trennung von Pflanzen und Tieren abgespalten (Abb. 1.4), aber scheint noch eine höhere Diversität des ancestralen Genoms im Vergleich zu Pflanzen, Pilzen und Tieren behalten zu haben (138). *Dictyostelium* besitzt viele evolutionär konservierte Mechanismen, welche es zu einem idealen Modellsystem grundlegender Zellprozesse macht, wie Zellmotilität, Chemotaxis, Zytokinese und Signaltransduktion (140-142). Es bietet eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten für die Untersuchung auf genetischer, molekularer, biochemischer und zellulärer Ebene. Zusätzlich lässt sich *Dictyostelium* im Labor unkompliziert und kostengünstig kultivieren (143, 144). Die Amöbe ist leicht biochemisch und genetisch zu manipulieren. So können integrierende und extrachromosomale Expressionsvektoren in die Zellen gebracht werden und aufgrund des haploiden Genoms lassen sich Deletionsmutanten schnell generieren (145, 146).

Es gibt viele Gründe *Dictyostelium* als Modellmakrophagen für bakterielle Infektionsmodelle zu verwenden. Als professioneller Phagozyt hat *Dictyostelium* immunabwehrähnliche Mechanismen entwickelt um Bakterien zwecks Ernährung aufzunehmen und abzutöten. So wurden sogenannte Sentinel-Zellen entdeckt, die durch das bewegliche Entwicklungsstadium (*slug*) migrieren, pathogene Bakterien phagozytieren und diese Oxidase-abhängig eliminieren können (147, 148). Bei dieser frühen Form der Immunabwehr werfen die Sentinel-Zellen DNA-Netze aus, um die Bakterien einzufangen, ein Prozess den auch Neutrophile nutzen (148, 149). *Dictyostelium* teilt sich viele konservierte Faktoren der Wirt-Pathogen-Interaktion mit Makrophagen bezüglich Phagozytose, phagosomaler Reifung, Aktin-Zytoskelett und Autophagie (150-152). Zusätzlich codiert *Dictyostelium* diverse orthologe Faktoren des angeborenen Immunsystems, wie Toll/Interleukin-1 Rezeptor Protein (TirA) (153), NADPH-Oxidase (154), Cathepsin (155) oder *natural resistance associated macrophage protein 1* (Nramp1) (156).

Inerte Partikel durchlaufen in *Dictyostelium* eine ähnliche Prozessierung, wie in Makrophagen (157). Nach der Aktin-abhängigen Aufnahme durch Phagozytose/Makropinozytose befindet sich das Bakterium in einem *de novo* Phagosom. Sofort lokalisiert p80, ein putativer Kupfer-Transporter und Marker des endosomalen Kompartiments an die phagosomale Membran (158). Innerhalb weniger Sekunden werden kleine endosomale Vesikel zum Phagosom rekrutiert, welche mit VatA, der katalytischen Untereinheit der vakuolären H⁺-ATPase (V-

ATPase), dekoriert sind. Diese fusionieren innerhalb weniger Minuten mit dem Phagosom und der V-ATPase-Komplex transportiert Protonen mittels ATP-Hydrolyse ins Phagosomenlumen. Das Phagosom wird angesäuert (159). Die anschließende Fusion mit Lysosomen führt zur Anreicherung von hydrolysierenden Enzymen, welche durch den niedrigen pH aktiviert werden und Makromoleküle aufspalten und den Partikel verdauen (160, 161). Innerhalb von 2 h wird die V-ATPase mittels Vesikulation vom Phagosom zurückgeholt und ein reneutralisiertes Postlysosom entsteht. Dieses besitzt oft ein größeres Volumen und enthält mehrere Partikel aus vorher separierten Phagosomen. Nach 2-6 h endet die phagosomale Reifung mit der Aktin-abhängigen Exozytose von unverdauten Bestandteilen. Sowohl Postlysosom als auch eine kontinuierliche Exozytose sind spezifisch für *Dictyostelium* und werden nicht in Makrophagen beobachtet (162).

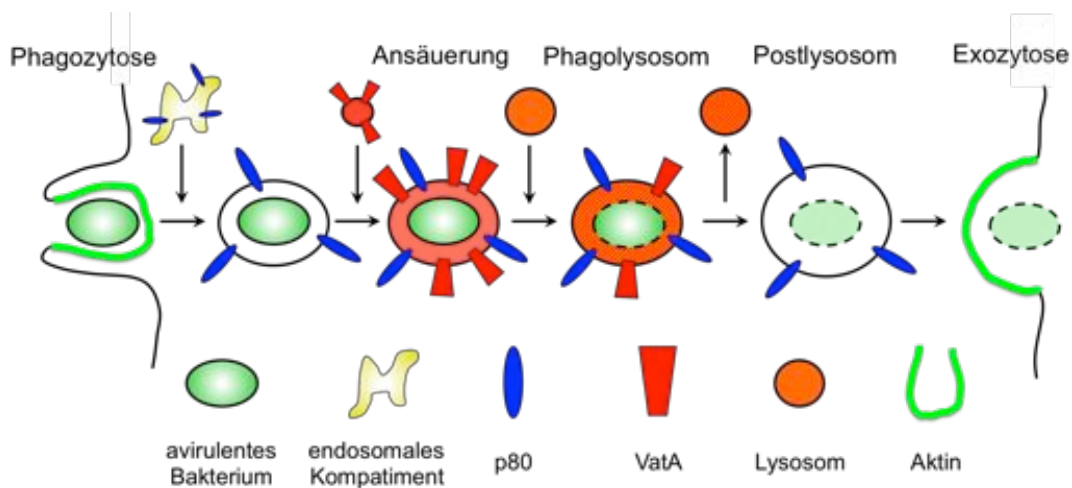


Abbildung 1.5: Phagosomale Reifung avirulenter Bakterien in *Dictyostelium*. Nach der Aktin-abhängigen Phagozytose befindet sich das apathogene Bakterium in einem Phagosom, welches mit dem endosomalen Kompartiment interagiert und endosomale Markerproteine (p80) erwirbt. Direkt nach Aufnahme lokalisiert die V-ATPase über die Fusion kleiner Vesikel an das Phagosom und säuert dieses durch aktives Pumpen von Protonen ins Phagosomenlumen an. Durch die Fusion des Phagosoms mit Lysosomen entsteht ein Phagolysosom, in welchem das Bakterium durch den sauren pH und hydrolysierende Enzyme verdaut wird. Lysosomale Enzyme und V-ATPase werden zurückgewonnen und das Kompartiment reneutralisiert, ein Postlysosom entsteht. Die phagosomale Reifung endet in *Dictyostelium* nach 2-6 h mit der Exozytose von unverdauten Partikeln.

Eine Vielzahl von Bakterien (Tabelle 1.1), die Infektionskrankheiten im Menschen auslösen, können die phagosomale Reifung in *Dictyostelium* beeinflussen und die Amöbe als Wirtszelle nutzen. Damit hat sich der Phagozyt in den letzten 15 Jahren als nützliches Infektionsmodell für die Untersuchung der Virulenz humanpathogener

Bakterien erwiesen. *Dictyostelium* ist besonders für zellbiologische und mikroskopische Studien geeignet, so dass vor allem die Aufnahme des Pathogens, Reifung des Pathogen-enthaltenden Kompartiments und dessen Austritt aus der Zelle analysiert wurden (163). An der Infektion beteiligte Faktoren können sowohl auf der Seiten des Pathogens als auch der Wirtszelle gut untersucht werden. So können bakterielle Virulenzfaktoren leicht durch einen *Dictyostelium*-Wachstumstest auf einem Rasen mutagenisierter Bakterienstämmen identifiziert werden (164). Andererseits lassen sich Deletionsmutanten und Mutagenese-Bibliotheken von *Dictyostelium* einfach generieren und damit der Einfluss von Wirtsfaktoren auf die Infektion untersuchen (145, 165). Einer der identifizierten Abwehrmechanismen von *Dictyostelium* gegen Pathogene ist die Autophagie, welche auch in Makrophagen eine entscheidende Rolle als Teil des angeborenen Immunsystems spielt.

Tabelle 1.1: Bakterien, die *Dictyostelium* erfolgreich infizieren (163)

| Pathogen | Referenz |
|---|-----------------|
| <i>Legionella pneumophila</i> | (166, 167) |
| <i>Mycobacterium avium</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. tuberculosis</i> | (168, 169) |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | (164, 170) |
| <i>Vibrio cholerae</i> | (171) |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | (172) |
| <i>Neisseria meningitidis</i> | (173) |
| <i>Burkholderia cenocepacia</i> | (174) |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | (175) |

1.3 Autophagie, ein Abwehrmechanismus gegen intrazelluläre Pathogene

Autophagie ist ein komplexer, zellulärer Prozess, um cytosolische Komponenten, wie Proteine, Organellen oder pathogene Bakterien, über die Fusion mit Lysosomen zu degradieren (176). Der Prozess kann ungerichtet oder selektiv sein. Die Autophagie (Atg)-Proteine sind evolutionär stark konserviert und können in vielen Spezies, von Hefen bis Säugerzellen, gefunden werden. Der Ablauf der selektiven bzw. kanonischen Autophagie, unterscheidet sich nur geringfügig zwischen *Dictyostelium* und Säugerzellen (150) und ist in Abb. 1.6 dargestellt.

Der Atg1-Proteinkomplex (ähnlich der *Unc-51-like kinase 1* (ULK1) in Säugern) initiiert die Autophagie und ein doppelmembraniger Phagophor entsteht. Im Cytosol wird ein abzubauenendes Cargo mit dem kleinen Protein Ubiquitin markiert. Das Adapterprotein *Sequestosome 1* (SQSTM1) bindet an die ubiquitinierte Zielstruktur und wird wiederum von Atg8 (auch LC3 in Säugern) gebunden, welches über einen Membrananker in der Doppelmembran eines Phagophors lokalisiert ist. Das Phagophor schließt sich und ein Autophagosom entsteht. Durch die Fusion mit Lysosomen wird der Inhalt des Autophagolysosoms durch hydrolytische Enzyme degradiert und Aminosäuren und andere Nährstoffe recycelt (150).

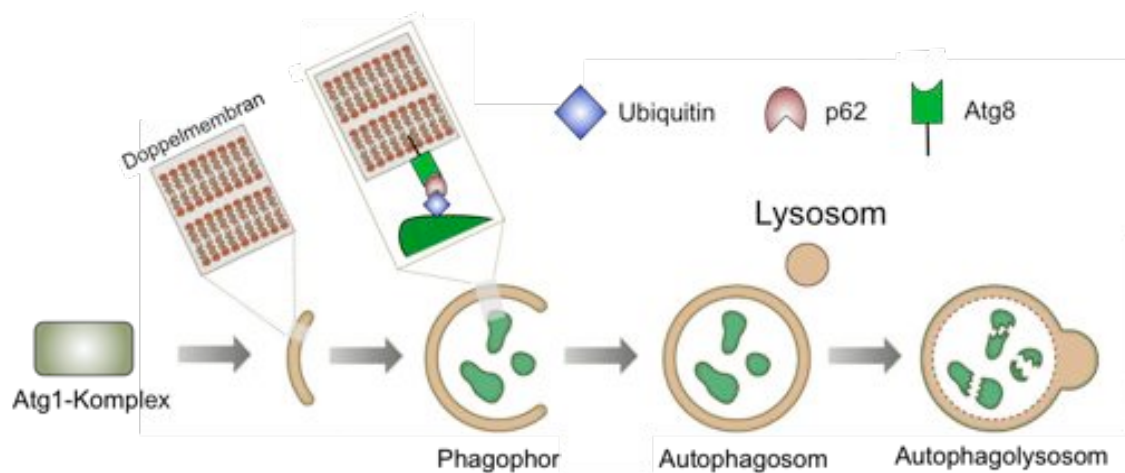


Abbildung 1.6: Vereinfachter Ablauf der selektiven Autophagie in *Dictyostelium*. Der Atg1-Proteinkomplex initiiert die Bildung eines doppelmembranigen Phagophors. Das Protein SQSTM1 fungiert als Adapter zwischen dem ubiquitinierten Cargo im Cytosol und Atg8, welches in der Doppelmembran des Phagophors verankert ist. Nach der Schließung des Phagophors fusioniert das Autophagosom mit Lysosomen und bildet so das degradative Autophagolysosom (verändert nach (150)).

Neben dem Abbau zelleigener Komponenten dient die Autophagie der Degradation intrazellulärer Bakterien (Xenophagie) und ist damit ein wichtiger Teil des angeborenen Immunsystems. Hauptsächlich sind cytosolische Pathogene betroffen, jedoch können diese auch innerhalb beschädigter Kompartimente dem Autophagosom zugeführt werden (177). So kann Autophagie die Zelle vor dem intrazellulären Wachstum von *Salmonella* (178), *Mycobacteria* (177) oder *Streptococcus* (179) schützen. Um diesem Abwehrsystem entgegenzuwirken, haben pathogene Bakterien antagonistische Mechanismen entwickelt: 1) Inhibierung von Autophagie-aktivierenden Signalkaskaden (*Salmonella*) (180), 2) Abbau und

Delokalisation von Atg-Faktoren (*Legionella*) (181), 3) Maskierung der bakteriellen Oberfläche mit Wirtsmaterial (*Shigella*) (182) oder 4) Aktin-basierte Bewegung im Cytosol (*Listeria*) (183). Demgegenüber nutzen einige Bakterien die Autophagie sogar für die Replikation, z.B. als Replikationsnische (*Coxiella burnetii*) (184) oder Nahrungsquelle, indem sie entlassene Aminosäuren konsumieren (*F. tularensis*) (72).

In *Dictyostelium* hat die Autophagie verschiedene Auswirkungen auf die Infektion mit *Legionella*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* oder *M. marinum*. Während sie zum einen eine defensive Aufgabe gegen das intrazelluläre Wachstum von *S. aureus* (185) und *Salmonella* (175) übernimmt, wurde für *Legionella* nur ein kleiner oder kein defensiver Effekt beobachtet (186, 187). Autophagosomale Strukturen werden von *M. marinum* sogar ausgenutzt um eine effiziente Zell-Zell-Transmission zu ermöglichen (188). *Dictyostelium* wurde neben der Autophagie für die Charakterisierung weiterer Resistenz-vermittelnder Faktoren genutzt, wozu auch der Eisentransporter *natural resistance associated macrophage protein 1* (Nramp1) gehört (156).

1.4 Nramp-Eisentransporter in Makrophagen und *Dictyostelium*

Während der bakteriellen Infektion wird die Eisenhomeostase durch die Wirtszelle streng reguliert. Dies liegt den multiplen Funktionen des Eisens zugrunde, welches zum einen essentiell für metabolische Prozesse ist, aber durch die Katalyse von ROS auch toxisch wirken kann (92). Die Familie der Nramp-Proteine transportiert zweiwertige Metallionen und spielt eine wesentliche Rolle bei der Metallionenhomeostase von Bakterien bis zum Menschen. Während die Nramps von Eukaryoten als Transmembranproteine hauptsächlich Fe^{2+} und Mn^{2+} transportieren (189), sind prokaryotische Vertreter meistens Mn^{2+} -Transporter (MntH) (190). Im Vergleich zu Säugetieren besitzen Vertreter der Nramp-Familie eine hohe Proteinsequenzidentität zu *Saccharomyces cerevisiae* (25-29%), Reis (40%) und *Drosophila* (55-57%) (191). In Säugern existieren zwei Nramps: 1) Nramp1 (Slc11A1), welches sich auf die phagosomale Membran von Makrophagen beschränkt (192) und 2) NrampB (Slc11A2), das in der Plasmamembran mehrerer Gewebe lokalisiert ist (193). Nramp1 wurde zuerst in der Maus entdeckt, in der es zur Resistenz gegen Mykobakterien, *Salmonella* und *Leishmania* beiträgt (194-196). Es wird

angenommen, dass Nramp1 durch verschiedene Mechanismen an der Resistenzbildung beteiligt ist. Es transportiert Eisen aus dem Phagosom ins Cytosol und depletiert dadurch den lebenswichtigen Cofaktor aus der potentiellen Replikationsnische des Bakteriums (197). Unabhängig davon fördert Nramp1 die phagosomale Reifung und antibakterielle Aktivität im Phagosom gegen *M. bovis* und *Salmonella* (198-200). Zuletzt fördert die Expression von Nramp1 in Makrophagen proinflammatorische Effektoren, wie TNF α , Stickstoffoxide und Lipocalin-2, welches bakterielle Siderophore bindet und damit eine Eisenquelle für die Bakterien blockiert (201-203).

Für *Francisella* ist über die Rolle von Nramp1 wenig bekannt. In Mäusen ist Nramp1 Teil des *bcg*-Lokus und kommt in zwei allelischen Formen vor: Bcg/Nramp1(resistent) und Bcg/Nramp1(sensitiv) (204), die sich nur in einer Aminosäure unterscheiden. Bcg(r), vermittelt einen resistenten Phänotyp gegen *M. bovis*, *Leishmania* und *Salmonella* und besitzt eine höhere antibakterielle Aktivität gegen *M. bovis* als Träger des Nramp1(s)-Allels, die sensitiv gegenüber den Bakterien sind (205). Demgegenüber sind Bcg(r)-Mäuse sensitiver gegen *F. tularensis* als Bcg(s)-Träger und zeigen damit ein umgekehrtes Bild im Vergleich zu anderen Pathogenen (206). Das Proteom des *Francisella*-enthaltenden Phagosoms unterscheidet sich zwischen beiden Allelformen, weshalb vermutet wird, dass vor allem die frühe, phagosomale Infektionsphase von *F. tularensis* durch den Lokus beeinflusst wird (207).

Das Genom von *Dictyostelium* codiert zwei Nramp-Transporter, Nramp1 und NrampB. Nramp1 ist das Ortholog des Nramp1 aus Säugetieren und wie in Makrophagen am Phagosom oder Makropinosom von *Dictyostelium* lokalisiert (156). Wie in Säugern transportiert Nramp1 in *Dictyostelium*, abhängig von einem V-ATPase-vermittelten Protonengradienten, Fe²⁺ und Mn²⁺ aus dem Phagosom ins Cytosol (197). Kurz nach Ausbildung des Phagosoms wird Nramp1 vom trans-Golgi rekrutiert und dekoriert die phagosomale Membran von apathogenen und pathogenen Bakterien (156). Das Gen wird vorwiegend im vegetativen Einzellstadium transkribiert und nach der Phagozytose und durch Nährstoffentzug herabreguliert (156, 208).

Demgegenüber ist NrampB kein Ortholog des Nramp2 aus Säugern, sondern ähnelt den proteotypischen MntH-Transportern aus α -Proteobakterien, Hefen und Protisten. NrampB ist ausschließlich in der kontraktiven Vakuole von *Dictyostelium* lokalisiert,

einem tubulären Netzwerk, welches in freilebenden Amöben die Osmolarität reguliert. Über die Funktion der kontraktiven Vakuole ist wenig bekannt. Es wird aber vermutet, dass sie als Reservoir oder Ausgang für Fe^{2+} und andere divalente Metallionen dienen könnte, indem diese zurück ins Cytosol transportiert bzw. durch die Fusion mit der Plasmamembran sekretiert werden. NrampB scheint die Eisenhomeostase zwischen Cytosol und kontraktiver Vakuole zu regulieren, indem es Fe^{2+} unabhängig von der V-ATPase ins Cytosol transportiert. Generell ist *Dictyostelium* der bisher einzig bekannte Organismus mit sowohl archetypischen (Säuger) als auch prototypischen (Bakterien, Protisten) Nramp-Transportern (209). Ein Modell der Nramp-Aktivitäten in *Dictyostelium* ist in Abb. 1.5 zusammengefasst.

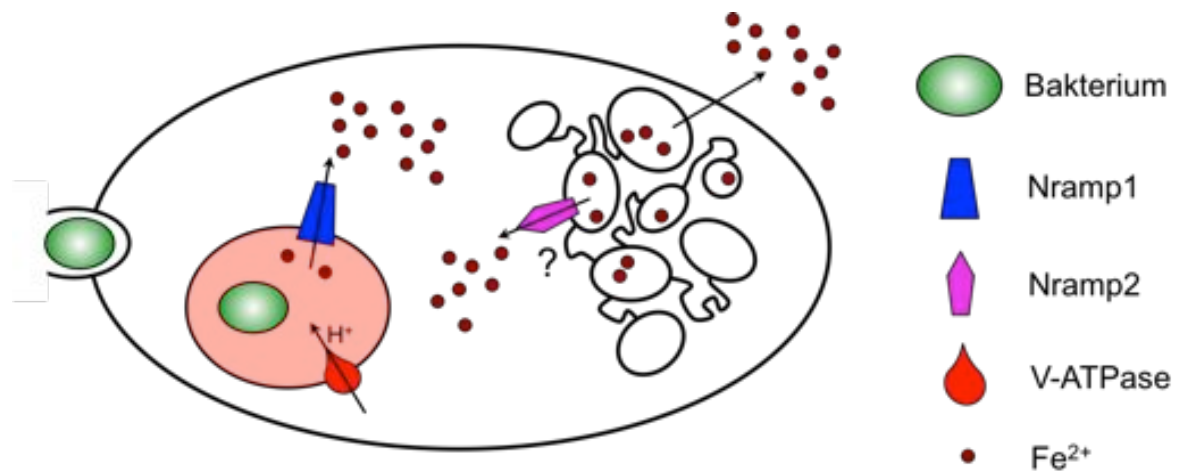


Abbildung 1.7: Lokalisation und Aktivität von Nramp1 und NrampB in *Dictyostelium*. Nach der Aufnahme eines Bakteriums lokalisiert Nramp1 am Phagosom und pumpt Fe^{2+} und Mn^{2+} -Ionen aus dem Phagosomenlumen ins Cytosol. NrampB transportiert dagegen nur Fe^{2+} an der kontraktiven Vakuole, jedoch sind Richtung und Mechanismus unbekannt. Beide Transporter kolokalisieren mit der V-ATPase, jedoch transportiert nur Nramp1 Fe^{2+} abhängig von einem Protonengradienten (verändert nach (210)).

Nramp1 und NrampB sind für den Verdau von nicht-pathogenen Bakterien entbehrlich, jedoch sind die Deletionsmutanten anfälliger für intrazelluläres Wachstum von *Legionella* und, zumindest für Nramp1, auch *M. avium* (156, 209). Die Doppeldeletion scheint sogar einen additiven Effekt auf die Replikation von *Legionella* zu haben. Für das erhöhte Wachstum in $\Delta nramp1$ -Zellen wird der Rückhalt von Fe^{2+} in der Replikationsnische verantwortlich gemacht. Der Grund für eine höhere Suszeptibilität in $\Delta nrampB$ -Zellen ist unklar, jedoch scheint die gestörte Eisenhomeostase in diesen Zelle das bakterielle Wachstum zu begünstigen.

1.5 Zielsetzung

Trotz intensiver Forschung in den letzten 15 Jahren sind die Mechanismen, die zur außerordentlich hohen Virulenz von *Francisella* beitragen, noch wenig verstanden. Etablierte Zell- und Tiermodelle haben viel zum Verständnis der *Francisella*-Infektion beigetragen, jedoch variieren viele Aspekte der Wirt-Pathogen-Interaktion zwischen den Modellen und unterscheiden sich mitunter stark zur Infektion im Menschen. In dieser Arbeit wird *Dictyostelium* mit *F.n.n.* als *Francisella*-Infektionsmodell etabliert, um die vorhandenen Modelle zu komplementieren und evolutionär konservierte Mechanismen der Wirt-Pathogen-Interaktion von *Francisella* zu bestimmen.

Zunächst wurde der intrazelluläre Infektionsverlauf von *F.n.n.* in *Dictyostelium* mit molekularen und mikroskopischen Methoden analysiert und anschließend mit dem humanen Makrophagen/*F. tularensis*-Modell verglichen. Zudem wurde die Rolle des bekannten Virulenzfaktors IglC im *Dictyostelium/F.n.n.*-System bestimmt, um die Relevanz des T6SS in diesem System zu überprüfen.

Die Rolle von Abwehrmechanismen der Wirtszelle wurde als weiteres Ziel im neu etablierten Infektionsmodell näher charakterisiert. Dafür wurde zum einen die Autophagie als bekannter Abwehrmechanismus gegen *Francisella* und andere cytosolische Pathogene untersucht. Zum anderen wurde die Rolle der Nramp-Eisentransporter in der *F.n.n.*-Infektion charakterisiert, da über deren Bedeutung für *Francisella* wenig bekannt ist.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Tabelle 2.1: Geräte

| Gerät | Modell | Hersteller |
|---|---------------------------------|--------------------------------------|
| Agarose-Gelelektrophorese-Kammer | 40-0708 | Peqlab, Erlangen, Deutschland |
| Analysenwaage | Handy H51 | Sartorius, Göttingen, Deutschland |
| Autoklav | 2540 EL | Tuttnauer Systec, Breda, Niederlande |
| Brutschrank (37°C) | B 6060 | Heraeus, Hanau, Deutschland |
| Diamantmesser | ultra 45° | Diatome, Biel, Schweiz |
| Durchflusszytometer | FACSCalibur | BD, Franklin Lakes, USA |
| Einfrühbehälter | Mr. Frosty | Thermo Fisher, Waltham, USA |
| Elektroporator | Eporator | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Energieversorgung | E835 | Consort, Turnhout, Belgien |
| Gefriersubstitutionsmaschine | Balzers FSU 010 | Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein |
| Hand-Klick-Zähler | HT-2 | Upgreen Corporation, Taiwan |
| Hochdruckgefriermaschine | EM HPM100 | Leica, Wien, Österreich |
| Magnetrührer | Combimag RCT | IKA, Staufen, Deutschland |
| Mikroskope | | |
| - Elektronenmikroskope | CM100 | Philips, Eindhoven, Niederlande |
| - Lichtmikroskop | Tecnai Spirit 80 kV | FEI, Hillsboro, USA |
| - Konfokales Laserscanning-Mikroskop (Punkt-Scanner) | CKX41 | Olympus, Hamburg, Deutschland |
| - Konfokales Laserscanning-Mikroskop (Linien-Scanner) | FluoView 1000 | Olympus, Hamburg, Deutschland |
| - Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop | LSM 5 | Zeiss, Oberkochen, Deutschland |
| | cellR Imaging System | Olympus, Hamburg, Deutschland |
| Mikrowelle | R-234 | Sharp, Osaka, Japan |
| pH-Meter | pH Level 1 | inoLab, Weilheim, Deutschland |
| Photometer | BioPhotometer | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Pinzette | Inox Nr.5 | neoLab, Heidelberg, Deutschland |
| Pipetten | P2, P10, P20, P100, P200, P1000 | Gilson, Middleton, USA |
| Pipettierhilfe | Accu-jet pro | Brand GmbH, Wertheim, Deutschland |
| Präzisionswaage | PCB 1000-1 | Kern & Sohn, Balingen, Deutschland |
| Kolbenschüttler | SM-30 | Edmund Bühler GmbH, |

2. Material und Methoden

| | | |
|--------------------------|------------------------------------|--|
| Schüttelinkubator (37°C) | Innova 4400 | Tübingen, Deutschland New Brunswick Scientific |
| Sterilbänke | Kojair 2009 Heraeus Herasafe | Kojair, Vilppula, Finnland Thermo Fisher, Waltham, USA |
| Thermomixer | 5436 | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Thermozykler | Primus 25 | Peqlab, Erlangen, Deutschland |
| Vakuumpumpe | Laboport | KNF, Freiburg, Deutschland |
| Vortexer | VF2 | IKA, Staufen Deutschland |
| Wasserbad | Haake B3 | Artisan Technology, |
| Zählkammer | Neubauer- improved | Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland |
| Zentrifugen | | |
| - Tischkühlzentrifuge | 5810R | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| - Tischkühlzentrifuge | 5417R | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| - Tischzentrifuge | 5415 D | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| - Standzentrifuge | GS-6KR | Eppendorf, Hamburg, Deutschland Beckmann, Krefeld, Deutschland |

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterialien

| Verbrauchsmaterial | Spezifikation | Hersteller/Lieferant |
|---|--|--|
| Aluminium-Plättchen | 6 mm Durchmesser 150 µm Vertiefung | Ted Pella Inc, Redding, USA |
| Deckgläschen | 12 mm, No. 1 | Assistant, Sondheim, Deutschland |
| FACS-Röhrchen | 12 x 75 mm | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Kryo-Röhrchen | 1,5 ml | Thermo Fisher, Waltham, USA |
| Küvetten | Halb-Mikro- Einmalküvette | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Kulturschälchen für Lebendzell-Mikroskopie | µ-Dish 35 mm, µ-Slide 8 well | Ibidi, Martinsried, Deutschland |
| Nadeln | Sterican | Braun, Melsungen, Deutschland |
| Objektträger | 76 x 26 mm | Engelbrecht, Edermünde, Deutschland |
| Parafilm | Parafilm M | Pechiney, Chicago, USA |
| Pasteurpipetten | Glas | Brand, Wertheim, Deutschland |
| Petrischalen | 100 x 15 mm | Thermo Fisher, Waltham, USA |
| Pipettenspitzen | 10 µl/200 µl/1000 µl (einfach/gestopft) | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Reaktionsgefäße | 1,5 µl / 2 µl | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Serologische Pipetten | 5 ml / 10 ml / 25 ml | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Vakuum-Filter | 0,22 µm, 500 ml | TPP, Trasadingen, Schweiz |
| Zellkultur-Flaschen | 25 cm ² Filter Top 75 cm ² Filter Top | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland Greiner, Frickenhausen, Deutschland |
| Zellkultur-Platten | 6-Loch, 24-Loch | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Zellkultur-Schalen | 100 x 20 mm | BD, Franklin Lake, USA |
| Zellulose-Kapillaren | 200 µm Durchmesser | Heinz Schwarz |

| | | |
|---------------------|---------------|----------------------------------|
| Zentrifugenröhrchen | 15 ml / 50 ml | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
|---------------------|---------------|----------------------------------|

2.1.3 Chemische und biologische Reagenzien

Tabelle 2.3: Chemische und biologische Reagenzien

| Chemikalie/Reagenz | Hersteller |
|---|--|
| Agarose | Bio&Sell, Nürnberg, Deutschland |
| Chloroform | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Dimethylsulfoxid | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Dinatriumhydrogenphosphat | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| dNTP-Mix | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Einbett-Medium | Life Technologies, Carlsbad, USA |
| Ethanol (100%) | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Ethidiumbromid (1%) | Biomol, Hamburg, Deutschland |
| Fetales Kälberserum (FKS) | GE Healthcare, Chalfont St. Giles, GB |
| Gelatine | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Glutaraldehyd | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Glycin | |
| HL5-C mit Glukose | Formedium, Hunstanton, USA |
| Hyperladder DNA-Marker | |
| Immersionsöl | |
| Isopropanol | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Kaliumchlorid | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| LB-Agar | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| LB-Medium | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| LightCycler [®] 480 SYBR Green I Mastermix | Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland |
| Methanol | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumacetat | |
| Natriumchlorid | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumhydroxid | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Neutralrot | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Paraformaldehyd (PFA) | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Phusion DNA-Polymerase | NEB, Frankfurt, Deutschland |
| Proteinmarker | Thermo Fisher, Waltham, USA |
| Restriktionsenzyme | NEB, Frankfurt, Deutschland |
| Restriktionsenzym-Puffer | NEB, Frankfurt, Deutschland |
| Rinderblut in Citratlösung | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Salzsäure (37%) | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Sucrose | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Phusion Polymerase | Biomol, Hamburg, Deutschland |
| Tris-HCL | Biomol, Hamburg, Deutschland |
| Triton X-100 | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Trizol | Life Technologies, Carlsbad, USA |

2.1.4 Lösungen, Puffer und Medien

Lösungen, Puffer und Medien wurden mit doppelt deionisiertem Wasser (ddH₂O) angesetzt. Zur Sterilisation wurden hitzunempfindliche Lösungen für 20 min bei

121°C und 2bar autoklaviert und hitzempfindliche Lösungen filtriert (Porengröße 0,22 µm).

Tabelle 2.4: Lösungen, Puffer, Medien

| Lösung, Puffer, Medium | Bestandteile |
|--|---|
| Blockier-/Permeabilisierlösung (IFA/FACS) | 0,5% Fötale Kälberserum (Hitze-inaktiviert) 0,1% Triton-X in PBS |
| Fixierlösung | 4% PFA in PBS, pH 6 bei 4°C lagern |
| PBS-Puffer (<i>Phosphate Buffered Saline</i>) | 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,47 mM KH ₂ PO ₄ in ddH ₂ O, pH 7,4 autoklavieren |
| Sörensen-Puffer | 14,7 mM KH ₂ PO ₄ 1,92 mM Na ₂ HPO ₄ in ddH ₂ O, pH 6 autoklavieren |
| Lämmli-Probenpuffer (2x) | 125 mM Tris-HCl 2% (w/v) SDS 20% (v/v) Glycerol 20 mM DTT 0,0001% (w/v) Bromphenolblau in ddH ₂ O, pH 6,8 |
| SDS-PAGE-Laufpuffer | 0,25 M Tris-HCl 0,5 M Glycerol 1% (w/v) SDS in ddH ₂ O |
| Trenngelpuffer | 1,5 M Tris-HCl 0,4% (w/v) SDS in ddH ₂ O, pH 8,8 |
| Sammelgelpuffer | 0,5 M Tris-HCl 0,4% (w/v) SDS in ddH ₂ O, pH 6,8 |
| HL5-C Medium (<i>Dictyostelium</i>) | 26,55 g HL5-C-Pulver in 1 l ddH ₂ O autoklavieren (Kultur), filtrieren (Mikroskopie) |
| Eugon Broth (<i>Francisella</i>) | 30,4 g Eugon Broth-Pulver in 1 l ddH ₂ O 1 min kochen, autoklavieren |
| LB-Medium (<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i>) | 20 g LB-Pulver in 1 l ddH ₂ O autoklavieren |

2. Material und Methoden

| | |
|---|--|
| Kulturplatten für <i>Francisella</i> | 15 g/l Agar in Eugon Broth, autoklavieren, abkühlen auf 70°C, 5% Rinderblut in Citrat-Lösung hinzugeben, bei 4°C lagern |
| Sörensen-Agar-Platten (<i>Dictyostelium</i>) | 15 g/l Agar in Sörensen-Puffer autoklavieren |
| Kulturplatten für <i>E. coli</i> | 15 g/l Agar in LB-Medium autoklavieren |
| TBS-Puffer (<i>Tris-Buffered Saline</i>) | 50 mM Tris 150 mM NaCl in 1 l ddH ₂ O, pH 7,6 |
| TBS-T-Puffer | 50 mM Tris 150 mM NaCl 0,05% (v/v) Tween20 in 1 l ddH ₂ O, pH 7,6 |
| Entwickler-Lösung 5 ml Lösung A | 0,1 M Tris-HCl, pH 8,6 0,00025% Luminol |
| 0,5 ml Lösung B 1,5 µl H ₂ O ₂ | 0,0011% Hydroxycoumarinsäure in DMSO 35% H ₂ O ₂ in ddH ₂ O |

2.1.5 Antikörper

Tabelle 2.5: Antikörper

| Antigen | Ursprung | Anwendung |
|-----------------|------------------|-----------|
| α-p80 | Maus (Hybridoma) | 1:10 |
| α-VatA | Maus (Hybridoma) | 1:10 |
| α-GFP | Kaninchen | 1:1000 |
| α-GST | Kaninchen | 1:1000 |
| α-Ubiquitin | Maus | 1:1000 |
| α-Atg8 | Kaninchen | 1:1000 |
| α-Maus 488 | Ziege | 1:1000 |
| α-Kaninchen 488 | Ziege | 1:1000 |
| α-Maus 568 | Ziege | 1:1000 |
| α-Kaninchen 568 | Ziege | 1:1000 |

2.1.6 Antibiotika

Tabelle 2.6: Antibiotika

| Antibiotikum | Konzentration | Anwendung |
|-------------------|---------------|---|
| Penicillin | 100 U/ml | <i>Dictyostelium</i> -Kultur |
| Streptomycin | 100 µg/ml | <i>Dictyostelium</i> -Kultur |
| Geneticin (G-418) | 5-30 µg/ml | Selektion von Überexpressionen in <i>Dictyostelium</i> (pDM304) |
| Kanamycin | 15 µg/ml | Selektion von <i>F.n.n.</i> (pKK289) |
| Blasticidin | 5 µg/ml | Selektion von <i>Dictyostelium knockout</i> Zelllinien |
| Ampicillin | 100 µg/ml | Selektion von <i>E.coli</i> |

2.1.7 Kits

Tabelle 2.7: Kits

| Kit | Hersteller | Anwendung |
|--|--|--------------------------------------|
| NucleoSpin Plasmid | Macherey-Nagel, Düren, Deutschland | DNA-Isolation (Mini-Prep) |
| NucleoSpin Bond | Macherey-Nagel, Düren, Deutschland | DNA-Isolation (Midi-Prep) |
| NucleoSpin Gel and PCR Clean-up | Macherey-Nagel, Düren, Deutschland | Aufreinigung von DNA aus Agarose |
| PureLink™ RNA Mini Kit | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA | RNA-Isolation |
| Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA | cDNA-Synthese |
| LightCycler 480 SYBR Green I Master | Roche, Basel, Schweiz | RT-PCR |
| T4 DNA-Ligase | New England Biolabs, Ipswich, USA | Ligation von DNA-Fragmenten |
| PureLink™ DNase | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA | Verdau von DNA bei der RNA-Isolation |

2.1.8 Software

Tabelle 2.8: Software

| Software | Hersteller | Anwendung |
|---------------|-------------------------|------------------------------------|
| Prism v5.0b | GraphPad, LaJolla, USA | Statistik, Auswertung, Darstellung |
| Excel v14.4.6 | Microsoft, Redmond, USA | Berechnung, Auswertung |

| | | |
|------------------|------------------------------------|---|
| FlowJo v10.0.7 | Tree Star, Ashland, USA | Auswertung von FACS-Daten |
| ImageJ v1.49b | National Institutes of Health, USA | Bildbearbeitung |
| Fluoview v1.7b | Olympus, Tokio, Japan | Bildaquisition am Laser-Scanning-Mikroskop (Punktscanner) |
| Xcellence rt 1.2 | Olympus, Tokio, Japan | Bildaquisition am Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop |
| ZEN 2009 | Zeiss, Oberkochen, Deutschland | Bildaquisition am Laser-Scanning-Mikroskop (Linien-scanner) |

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologie

2.2.1.1 Kultivierung von *Dictyostelium discoideum*

In dieser Studie wurde der *D. discoideum* Wildtyp-Stamm Ax2 verwendet, welcher zuerst von Watts und Ashford (1970) beschrieben wurde (211, 212). Ax2-Zellen wurden vom *Dicty Stock Center* an der Northwestern University (Chicago, IL, USA) bezogen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte adhärent in 10 ml autoklaviertem HL5-C-Medium in 10 cm Zellkulturschalen bei 22°C unter sterilen Bedingungen. Um Kontaminationen zu verhindern wurden 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin hinzugefügt. Genetisch modifizierte Zelllinien wurden kontinuierlich mit dem entsprechenden Antibiotikum selektiert. Alle 2-3 Tage wurden die Zellen verdünnt bevor eine volle Konfluenz erreicht wurde. Dazu wurde das Medium abgekippt und die Zellen durch leichtes Klopfen der Kulturschale gegen die Sterilbank abgelöst. Die Zellen wurden in 10 ml frischem HL5-C aufgenommen und nach Bedarf in neue Kulturschalen verteilt.

Tabelle 2.9: Knockout-Zelllinien

| Zelllinie | Merkmale | Bezugsquelle |
|-----------------------|--|--------------|
| Ax2 $\Delta atg1$ | Deletion des Autophagie-Initiationskomplexes Atg1 | (213) |
| Ax2 $\Delta pi3k1$ | Deletion der Phosphoinositid-3-Kinase 1 | (214) |
| Ax2 $\Delta nramp1$ | Deletion des phagosomalen Eisentransporters Nramp1 | (156) |
| Ax2 $\Delta nrampB$ | Deletion des Eisentransporters NrampB | (209) |
| Ax2 $\Delta nramp1/B$ | Doppeldeletion der Eisentransporter Nramp1 und B | (209) |

Tabelle 2.10: Überexprimierende Zelllinien

| Zelllinie | Selektionsmarker ($\mu\text{g/ml}$) |
|-------------------|---------------------------------------|
| Ax2 Ubiquitin-GFP | G-418 (7) |
| Ax2 SQSTM1-GFP | G-418 (7) |
| Ax2 Atg8a-GFP | G-418 (7) |
| Ax2 Nramp1-GFP | G-418 (30) |
| Ax2 NrampB-GFP | G-418 (30) |
| Ax2 IglC-GST | G-418 (10) |

2.2.1.2 Kryokonservierung von *D. discoideum*

Zur Langzeitaufbewahrung von vegetativen *Dictyostelium*-Zellen wurden Zellstabilate in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert. Dafür wurden Zellen bei einer Konfluenz von etwa 80% (2×10^7 Zellen) in HL5-C aufgenommen und abzentrifugiert (500 x g, 5 min, RT). Das Pellet wurde in 1 ml 10% DMSO in HL5-C pro Aliquot aufgenommen und auf Kryoröhrchen verteilt. Diese wurden innerhalb von Einfrierbehältern (McFrosty) für 24 Stunden bei -80°C und anschließend in flüssigem Stickstoff dauerhaft gelagert.

2.2.1.3 Transfektion von *D. discoideum*

Die Transfektion von *Dictyostelium* erfolgte auf Grundlage der Elektroporation. Hierbei wird die Zellmembran durch aufeinanderfolgende, elektrische Impulse permeabilisiert, so dass Fremd-DNA in die Zelle dringen kann. Das Gen von Interesse wurde in einen episomalen Expressionsvektor (pDM314) kloniert.

10-15 μg DNA wurden mittels 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 5,2) und dem 2,5-fachen Volumen 100% Ethanol präzipitiert und für 15 min bei 14000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen (5 min, 14000 rpm), bei RT getrocknet und bis zur Transfektion auf Eis gelagert.

Dictyostelium-Zellen einer 80-90% konfluenten Kulturschale wurden in 1 ml Elektroporationspuffer aufgenommen und für 3 sec bei 6000 rpm abzentrifugiert. Nach zwei weiteren Waschschrritten mit EP-Puffer wurden die Zellen in 100 μl EP-Puffer aufgenommen und zu dem DNA-Pellet gegeben. Die Zellsuspension wurde in eine vorgekühlte Küvette (BTX, 2 mm) übertragen und elektroporiert (250 V, 5 Pulse, Pulslänge: 2 ms, Pulsintervall: 1 sec). Nach einer Inkubation von 5 min auf Eis wurden die Zellen auf zwei Kulturschalen verteilt. Die Selektion transfizierter Zellen

erfolgte nach etwa 24 Stunden mit dem entsprechenden Antibiotikum (siehe Tabelle 2.10). Nach 4-7 Tagen konnten *Dictyostelium*-Kolonien beobachtet werden. Diese wurden mithilfe einer Pipette gepickt und zur Generierung von Klonen in 1ml HL5-C in 24-Loch-Platten vereinzelt.

2.2.1.4 *Dictyostelium* Plaque-Test

Der Plaque-Assay wurde 2001 von Cosson *et al.* entwickelt und wird zur Bestimmung der Virulenz von Bakterien im *Dictyostelium*-System verwendet (164). *Dictyostelium* nutzt nicht-pathogene Bakterien als Nahrungsquelle und formt durch Wachstum Plaques auf einem Bakterienrasen. Virulente Bakterien können nicht als Nahrung genutzt werden und *Dictyostelium* ist nicht in der Lage zu wachsen und Plaques zu bilden. Zur Herstellung des Bakterienrasens wurden 0,5 l *K. aerogenes*- bzw. 2 l *F.n.n.*-Übernachtskultur abzentrifugiert (*K. aerogenes*: 5000 rpm, 10 min, *F.n.n.*: 10000 rpm, 20 min) und zwei Mal mit 20 ml Sørensen-Puffer gewaschen. Das Volumen der Bakteriensuspensionen wurde auf 2-3 ml reduziert, mit 50 *Dictyostelium*-Zellen vermischt und auf Sørensen-Agar-Platten gegeben. Nach 2-4 Tagen konnten *Dictyostelium*-Plaques beobachtet werden.

2.2.1.5 Kultivierung von *F.n.n.*

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *F.n.n.* (NCIMB14265^T) stammen aus dem Labor von Prof. Dr. Hanne Winther-Larsen (Universität Oslo, Norwegen) und wurden aus infiziertem Kabeljau (*Gadus morhua*) isoliert (215). Die Transfektion von *F.n.n.* mit Expressionsvektoren (pKK289::GFP, pKK289::mCherry) sowie die Generierung IglC-Deletionsmutante (Δ IglC) wurde von Elisabeth O. Lampe (Universität Oslo, Norwegen) durchgeführt (216). Alle Schritte der *F.n.n.*-Kultivierung wurde unter sterilen Bedingungen bei 22°C durchgeführt.

Anfänglicher Schritt der Kultivierung von allen *F.n.n.*-Stämmen war die Inokulation von Chocolate-Agar-Platten mit einem 50 µl Aliquot einer *F.n.n.*-Stammkultur. Diese wurden zwecks Langzeitlaufbewahrung bei -80°C gelagert und beinhalteten eine große Menge *F.n.n.*-Koloniematerial in 10% Milchemulsion. Nach 2 Tagen bei 22°C bildete *F.n.n.* einen weißlichen Biofilm, welcher zwischen Tag 2-7 nach Animpfung für die Inokulation von Flüssigkulturen verwendet werden konnte. Für die

Flüssigkultur wurde eine halb volle Impfschlinge des Biofilms in 10-20 ml EB-Medium in einem 50 ml Erlenmeyerkolben aufgenommen und schüttelnd (100 rpm) inkubiert. Zusätzlich wurden 2 mM FeCl₃ und im Fall von transgenen Stämmen 15 µg/ml Kanamycin hinzugefügt.

2.2.1.6 Infektion von *Dictyostelium* mit *F.n.n.*

Mindestens 16 Stunden vor Infektion wurden *Dictyostelium*-Zellen in 15 ml HL5-C ohne Antibiotika in 25 oder 75 cm² Zellkulturflaschen ausgesät (Konfluenz 30-60%). Eine *F.n.n.*-Vorkultur wurde 24 Stunden vor Infektion auf OD₆₀₀=0,1 verdünnt, so dass sich die Bakterien zum Zeitpunkt der Infektion in der exponentiellen Wachstumsphase befanden (ideal: OD₆₀₀=1). Für die Infektion wurde eine *multiplicity of infection* (MOI) 30 oder 60 gewählt, welches bei 6-7 x 10⁷ Zellen in einer konfluenten Zellkulturflasche 1,9 x 10⁹ bzw. 3.8 x 10⁹ Bakterien entspricht. Die entsprechende Menge *F.n.n.*-Flüssigkultur wurde abzentrifugiert (5000 x g, 5 min), mit 1 ml HL5-C gewaschen und in 1 ml HL5-C aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde zusammen mit 24 ml frischem HL5-C auf die *Dictyostelium*-Zellen gegeben und für 30 min bei 100 rpm zentrifugiert, um die Aufnahme der Bakterien zu synchronisieren. Als Startpunkt der Infektion wurde der Beginn der Zentrifugation festgelegt (0 hpi). Sollten frühere Zeitpunkte als 30 min analysiert werden, wurde eine MOI 300 bei 500 x g für 5 min verwendet. Nach Zentrifugation wurden die Zellen für eine effizientere Phagozytose 5 min ruhend inkubiert und anschließend 5 Mal mit 10 (75 cm²) bzw. 5 ml (25 cm²) HL5-C gewaschen. Die Zellen wurden abgelöst, in 20 (75 cm²) bzw. 5 ml (25 cm²) HL5-C aufgenommen und die Zellzahl/ml mittels CasyCounter oder Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für die Analyse folgender Zeitpunkte wurden je nach benötigter Zellanzahl verschiedene Zellzahlen abhängig von Zeitpunkt und Gefäß ausgesät (siehe Tabelle 2.11).

Tabelle 2.11: Ausgesäte Zellzahlen während der Infektion

| Zeitpunkt (hpi) | Gefäß | Zellzahl | Volumen (ml) |
|-----------------|--------------------|-------------------|--------------|
| 2, 4, 6 | 6-Loch-Platte | 2×10^6 | 3 |
| | 10 cm-Kulturschale | 1×10^7 | 10 |
| 24 | 6-Loch-Platte | 1×10^6 | 3 |
| | 10 cm-Kulturschale | $4,5 \times 10^6$ | 3 |
| 48 | 6-Loch-Platte | $0,3 \times 10^6$ | 3 |
| | 10 cm-Kulturschale | 2×10^6 | 10 |

2.2.1.7 Überlebenstest für *F.n.n.*

Um das Überleben von exozytierten *F.n.n.* zu untersuchen, wurden *Dictyostelium*-Zellen und extrazelluläre *F.n.n.* zu den Zeitpunkten 1, 3, 6 und 24 hpi in 10 ml HL5-C aufgenommen. 1 ml Zellsuspension wurde abzentrifugiert (500 x g, 3 min, RT) und Überstand inklusive exozytierter *F.n.n.* und Zellpellet getrennt. Der Überstand wurde abzentrifugiert (5000 x g, 5 min, RT) und das bakterielle Pellet in 100 µl HL5-C aufgenommen. Es wurde eine 1:50 Verdünnungsreihe in HL5-C angefertigt von denen 20 µl auf eine Chocolate-Agar-Platte pipettiert wurden. Nach 5-7 Tagen konnte das Wachstum von überlebenden, exozytierten Bakterien beobachtet werden.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Extraktion von genomischer DNA

Die Extraktion von genomischer DNA erfolgte mit dem High Pure PCR Template Preparation Kit von Roche anhand der vom Hersteller vorgegebenen Anweisungen für kultivierte Zellen (*Dictyostelium*) bzw. Bakterien (*F.n.n.*). Dafür wurden $1-2 \times 10^7$ *Dictyostelium*-Zellen bzw. $1-2 \times 10^9$ Bakterien abzentrifugiert (500 x g, 5 min bzw. 5000 x g, 5 min).

2.2.2.2 Extraktion von totaler RNA

Die gesamte RNA von *Dictyostelium* bzw. *F.n.n.* wurde mithilfe des PureLink™ RNA Mini Kits gemäß des vom Hersteller empfohlenen Protokolls extrahiert mit folgenden

Modifikationen. $1-5 \times 10^7$ *Dictyostelium*-Zellen bzw. $1-2 \times 10^9$ Bakterien wurden abzentrifugiert, in 1 ml Trizol resuspendiert und für 5 min bei RT bis zur vollständigen Lyse inkubiert. Um eine DNA-Kontamination zu verhindern, wurde eine On-Column PureLink™ DNase I Behandlung durchgeführt.

2.2.2.3 Qualitätskontrolle von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit von isolierten Nukleinsäuren wurde mittels NanoDrop überprüft. Die Reinheit von RNA wurde zusätzlich mittels SYBR Green qPCR überprüft, um die Kontamination mit DNA auszuschließen. Dafür wurden 5 ng RNA als Template mit Primern des Gens der Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*gapdh*) verwendet.

2.2.2.3 Reverse Transkription von mRNA - cDNA-Synthese

Die Generierung von cDNA aus totaler RNA erfolgte mit dem Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit von Roche gemäß den Anweisungen des Herstellers. Für jede Amplifikation wurden 1 µg RNA in einem Reaktionsvolumen von 20 µl verwendet. Synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.2.4 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die qPCR kombiniert die Amplifikation von spezifischen DNA-Abschnitten mit der Quantifizierung des entsprechenden PCR-Produktes. Die Fluoreszenzemission des in doppelsträngiger DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green ist proportional zur Menge des PCR-Produktes und wird nach jedem PCR-Zyklus in Echtzeit detektiert. Eine relative Quantifizierung des Transkripts von Interesse kann durch den Vergleich mit einem Haushaltsgen, hier *gapdh*, erreicht werden. Als *template* wurde sowohl genomische DNA zur Quantifizierung von *F.n.n.*-Genomen als auch synthetisierte cDNA zur Messung der Genexpression verwendet. Sequenzen der genspezifischen Primer sind in Tabelle 2.12 aufgelistet.

Tabelle 2.12: Primersequenzen für qPCR

| Primer | Labor# | Zielgen | 5'-3' Sequenz |
|--------------------|--------|-------------------|-------------------------------|
| Atg8a_fwd | 111 | <i>Dd_atg8a</i> | CTCCAAGATCAGATGCACCA |
| Atg8a_rev | 112 | <i>Dd_atg8a</i> | GCAGCAGTTGGTGGGATAGT |
| SQSTM1_fwd | 117 | <i>Dd_sqstm1</i> | TTGAAAATCGCACAACCAAC |
| SQSTM1_rev | 118 | <i>Dd_sqstm1</i> | AGGAACCCTTTGGAATGACA |
| gapdh_fwd | 7 | <i>Dd_gapdh</i> | GGTTGTCCCAATTGGTATTAATGG |
| gapdh_rev | 8 | <i>Dd_gapdh</i> | CCGTGGGTTGAATCATATTTGAAC |
| <i>F.n.n.</i> _fwd | 228 | GI: 390432597 | TGAGTTGGTAACCATTGATTGTACATAGT |
| <i>F.n.n.</i> _rev | 229 | GI: 390432597 | CGAGTACCTGGTGGGAGAAAGA |
| Nramp1_fwd | 96 | <i>Dd_nramp1</i> | GGTATCAGTTTTTCGCTAAAGGATT |
| Nramp1_rev | 97 | <i>Dd_nramp1</i> | CGAGCATTGACCAGCACTAA |
| NrampB_fwd | 313 | <i>Dd_nrampB</i> | TGGTAGTGTGGTGAAATCAAGA |
| NrampB_rev | 314 | <i>Dd_nrampB</i> | TCTGACAATTCGGTTACTTGA |
| fopA_fwd | 267 | <i>Fnn_fopA</i> | AGAGATGTTTCAGGTGAGTGC |
| fopA_rev | 268 | <i>Fnn_fopA</i> | ATGTTAGTACCTGCTCTACCC |
| polA_fwd | 269 | <i>Fnn_polA</i> | AGCTGGAAGTGGTCGTAATCA |
| polA_rev | 270 | <i>Fnn_polA</i> | ATCAGCATCTTCAGCAGCATA |
| ftsZ_fwd | 271 | <i>Fnn_ftsZ</i> | TACCATACTCAGCGGCTTTC |
| ftsZ_rev | 272 | <i>Fnn_ftsZ</i> | GCGCCTGTAGTTGCTGAAGT |
| iglC_fwd | 226 | <i>Fnn_iglC</i> | TAGGCGTATAAACTGGCTGC |
| iglC_rev | 227 | <i>Fnn_iglC</i> | TGCTATAGAAGGCGGAGAGG |
| feoA_fwd | 321 | <i>Fnn_feoA</i> | TTCATAATTGCTCTGTCGCATAC |
| feoA_rev | 322 | <i>Fnn_feoA</i> | CATTTCTCACACTGACTTGGC |
| fur_fwd | 325 | <i>Fnn_fur</i> | GCACCTTAGTCCTGATGATGT |
| fur_rev | 326 | <i>Fnn_fur</i> | GAGTCGGCTTATTATTCCTGCT |
| lucA/C_fwd | 319 | <i>Fnn_iucA/C</i> | ACCCCTATACTTTGGCTGTACT |
| lucA/C_rev | 320 | <i>Fnn_iucA/C</i> | TCCTCAGATTCTCCACATAGACT |

2.2.2.4.1 Quantifizierung von Genexpression

Für die Quantifizierung von Genexpression bzw. mRNA-Leveln in *Dictyostelium* oder *F.n.n.* wurden Zellen, wie in 2.2.2.4.1 beschrieben, entnommen und RNA isoliert. Es folgte die Synthese von cDNA (2.2.2.3). Die qPCR erfolgte mit dem LightCycler® 480 SYBR Green Master Mix unter Verwendung des RotorGene 3000 (Corbett Life Science) mit 72-Proben-Rotor.

2.2.2.4.2 Quantifizierung von *F.n.n.*-Genomen

Das intrazelluläre Wachstum von *F.n.n.* während der Infektion wurde unter anderem durch die Quantifizierung von *F.n.n.*-Genomen mittels qPCR bestimmt. Zu den angegebenen Zeitpunkten des Infektionsverlaufs wurden extrazelluläre Bakterien

durch fünf- (1 hpi) bzw. zweimaliges (4, 24, 48 hpi) Waschen der Ein-Zellschicht mit HL5-C entfernt. Die genomische DNA infizierter Zellen wurde wie beschrieben isoliert und 5 µl als *template* in einer 20 µl Reaktion verwendet (Tabelle 2.13).

Tabelle 2.13: Reaktionskomponenten der *F.n.n.*-spezifischen qPCR

| Komponente | Reaktionsvolumen |
|-------------------|------------------|
| Master Mix (2x) | 10 µl |
| sense Primer | 0,5 µl |
| anti-sense Primer | 0,5 µl |
| cDNA (5 ng) | 5 µl |
| H ₂ O | ad 20 µl |

Die Amplifikation wurde mit dem LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master Mix (Roche) in einer Lightcycler[®] 480 qPCR Maschine (Roche) unter folgenden Bedingungen durchgeführt (Tabelle 2.14).

Tabelle 2.14: Reaktionsbedingungen der *F.n.n.*-spezifischen qPCR

| Phase | Temperatur | Zeit |
|--|------------|---------------|
| Aktivierung der <i>hot start</i> -Polymerase | 95°C | 5 min |
| Zyklen (45) | | |
| Denaturierung | 95°C | 10 sec |
| Primerhybridisierung | 60°C | 10 sec |
| Elongation | 72°C | 10 sec |
| Schmelzkurvenanalyse | 95°C | 1 min |
| | 67 – 95°C | 8 sec/Schritt |

Die Analyse von qPCR-Daten erfolgte mit der LightCycler[®] 480 Software v1.5 von Roche. Der *cycle of threshold* (Ct) beschreibt den Punkt an dem die Amplifikation erstmalig exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt, wodurch eine zuverlässige Quantifizierung möglich wird. Die Menge von *F.n.n.*-Genomen wurde durch die Relation von *F.n.n.*-Genomen zu *Dictyostelium*-Genomen berechnet, welche durch die Ct-Werte eines hypothetischen Gens von *F.n.n.* (217) bzw. *gapdh* (*Dictyostelium*) bestimmt werden. Hier wurde vorausgesetzt, dass pro Zelle bzw. Bakterium eine Kopie des jeweiligen Gens auf genomischer Ebene vorliegt. Die relative Menge von *F.n.n.*-Genomen wurde mithilfe der Δ Ct-Methode berechnet (Δ Ct = Ct (*gapdh*) – Ct (*F.n.n.*)). Durch die Multiplikation der relativen Menge von *F.n.n.*-Genomen mit dem Wachstumsfaktor von *Dictyostelium* (Zellzahl/ml) konnte die Anzahl von *F.n.n.*-Genomen pro Volumen bestimmt werden.

2.2.2.5 Klonierung von Plasmiden

2.2.2.5.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mittels Polymerasekettenreaktion lassen sich bekannte DNA-Abschnitte unter Verwendung Zielsequenz-spezifischer Primerpaare vervielfältigen. Aufeinanderfolgende Amplifikationszyklen bestehen aus folgenden Schritten deren genauer Ablauf in Tabelle 2.15 aufgezeigt ist: *Denaturierung* der doppelsträngigen DNA, Hybridisierung der spezifischen Primer an der Zielsequenz und Elongation der Sequenz durch die DNA-Polymerase. Die Amplifizierung erfolgte entweder mit der Go Taq für analytische Ansätze oder der *Phusion High Fidelity* Polymerase für weitere Klonierungsarbeiten. PCR-Reaktionskomponenten sind in Tabelle 2.16 aufgelistet.

Tabelle 2.15: Reaktionsverlauf der präparativen PCR

| Phase | GoTaq | | Phusion HF | |
|----------------------------|------------|-----------|------------|-----------|
| | Temperatur | Zeit | Temperatur | Zeit |
| Erste Denaturierung | 95°C | 2 min | 98°C | 30 sec |
| Denaturierung | 95°C | 30 sec | 98°C | 10 sec |
| Primerhybridisierung (30x) | 55°C | 30 sec | 55°C | 30 sec |
| Elongation | 68°C | 30 sec/kb | 72°C | 30 sec/kb |
| Finale Elongation | 68°C | 5 min | 72°C | 5 min |
| Lagerung | 4°C | ∞ | 4°C | ∞ |

Tabelle 2.16: Reaktionskomponenten der präparativen PCR

| Komponente | Go Taq | Phusion High Fidelity |
|---------------------------|------------------|-----------------------|
| Reaktionspuffer | 5 µl (10 x) | 10 µl (5 x) |
| dNTPs (10 mM) | 1 µl | 1 µl |
| Sense Primer (10 µM) | 2,5 µl | 2,5 µl |
| Anti-sense Primer (10 µM) | 2,5 µl | 2,5 µl |
| Polymerase | 0,25 µl (1,25 U) | 0,5 µl (1 U) |
| <i>template</i> DNA | 50-200 ng | 50-200 ng |
| H ₂ O | ad 50 µl | ad 50 µl |

2.2.2.5.2 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen erkennen und schneiden spezifisch DNA-Sequenzen. Dadurch lassen sich Fremd-DNA in Plasmide einfügen und der Erfolg dessen analysieren. Die Reaktionskomponenten sind in Tabelle 2.17 aufgelistet und besaßen ein Volumen von 50 µl für einen präparativen Ansatz oder 20 µl für einen analytischen Verdau. Der Verdau wurde für 1 h bei 37°C durchgeführt.

2.17: Reaktionskomponenten eines Restriktionsverdaus

| Komponente | Analyse | Präparation |
|---------------------------|--------------|-------------|
| Restriktionspuffer (10 x) | 2 µl | 5 µl |
| Restriktionsenzym 1 | 0,2 µl (2 U) | 1 µl (10 U) |
| Restriktionsenzym 2 | 0,2 µl (2 U) | 1 µl (10 U) |
| BSA (2 mg/ml) (optional) | 2 µl | 5 µl |
| DNA | 1 µg | 10 µg |
| H ₂ O | ad 20 µl | ad 50 µl |

2.2.2.5.3 Agarosegelelektrophorese

Mittels Agarosegelelektrophorese lassen sich DNA-Fragmente und Plasmide ihrer Größe nach auftrennen und optional aufreinigen. Dabei ist die Geschwindigkeit der DNA-Fragmente durch das Agarosegel proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Dadurch wandern kleine, negativ geladene DNA-Moleküle schneller als große DNA-Fragmente zur positiven Anode. Das Agarosegel (1% Agarose in TAE-Puffer) wurde mit 0,1 µg/ml des interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid versetzt um DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen. Vor der Beladung des Gels wurden die DNA-Proben mit Ladungspuffer (5 x) versetzt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in TAE-Puffer unter einer Spannung von 8-12 V/cm für 30-60 min.

2.2.2.5.4 DNA-Extraktion und -Aufreinigung

Die Bande des gewünschten DNA-Fragments wurde mit einem Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten und die DNA mit dem *GeneJET Gel Extraction Kit* (Thermo Scientific) gemäß den Anleitungen des Hersteller aufgereinigt.

2.2.2.5.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Das Einbringen von DNA-Fragmenten in Plasmide wurde durch das Enzym Ligase erreicht, welches passende Restriktionsschnittstellen von Fragment und Plasmid miteinander verbindet. Plasmid und *insert* wurden für 60 min mit den passenden Restriktionsenzymen bei 37°C verdaut. Für jede Ligation wurden 100 ng verdautes Plasmid verwendet und die Menge insert nach folgender Formel berechnet: $100 \text{ ng Plasmid} \cdot \text{Größe Insert (kb)} \cdot 3 / \text{Größe Plasmid (kb)} = x \text{ ng Insert}$. Ligationen wurden mit dem T4 Ligation Kit von Thermo Scientific über Nacht bei 4°C oder für 15 min bei RT durchgeführt. Die Komponenten eines 10 µl Reaktionsvolumen sind in Tabelle 2.18 aufgelistet.

Tabelle 2.18: Reaktionskomponenten einer Ligation

| Komponente | Menge |
|--------------------|--------------|
| Ligasepuffer (10x) | 1 µl |
| T4 Ligase | 1 µl (400 U) |
| insert | x µg |
| Plasmid | 100 ng |
| H ₂ O | ad 10 µl |

2.2.2.5.6 Transformation und Kultivierung von *E.coli*

Dem *E. coli*-Stamm XL10 Gold wurde mittels Calciumchlorid-Behandlung chemische Kompetenz und damit die Fähigkeit Plasmid-DNA aufzunehmen verliehen. 50 µl kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und 1-3 µg Plasmid-DNA oder 5-10 µl Ligationsansatz hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis erfolgte ein Hitzeschock der Zellen im Wasserbad (42°C, 1 min) gefolgt von einer erneuten Inkubation auf Eis für 3 min. Den Bakterien wurden 900 µl LB-Medium hinzugefügt, gefolgt von 1 h Schütteln bei 37°C. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (1 min, 5000 x g), in 100 µl LB aufgenommen und auf LB-Platten (+ 100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen. Nach einer Inkubation bei 37°C für 16 h wurden einzelne *E. coli*-Kolonien gepickt und in 3 ml Übernachtskulturen kultiviert, um den Erfolg der Transformation zu überprüfen. *E. coli*-Flüssigkulturen in LB-Medium wurden bei 37°C schüttelnd (180 rpm) inkubiert.

2.2.2.5.7 DNA-Sequenzierung

Um eine korrekte Sequenz des zu klonierenden Konstruktes zu garantieren, wurde eine Sequenzierung des *inserts* von der Firma SeqLab Sequence Laboratories GmbH in Göttingen durchgeführt.

2.2.2.5.8 Isolierung von Plasmid-DNA

Um die Transformation von *E. coli* zu überprüfen, wurde Plasmid-DNA in kleinem Maßstab mithilfe des NucleoSpin[®] Plasmid Kits gemäß den Anweisungen des Herstellers isoliert. Dafür wurden 2 ml von 3 ml Übernachtskulturen von *E. coli* XL1 Klonen verwendet.

Um größere Mengen Plasmids für die Transformation von *Dictyostelium* zu isolieren, wurde das Nucleobond[®] Plasmid PC100 Kit verwendet. Dafür wurden 100 ml LB_{Amp} mit Übernachtskulturen transformierter *E. coli*-Klone angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert und die DNA nach den Anweisungen des Herstellers isoliert.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Proteinextraktion

1×10^6 *Dictyostelium*-Zellen wurden abzentrifugiert (500 x g, 5 min), mit 1 ml Sörensen-Puffer gewaschen und in 2x Lämmli-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden für 5 min bei 95°C inkubiert. Zum Beladen des Polyacrylamidgels wurden 20 µl der Proben verwendet.

2.2.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die SDS-PAGE wird zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Masse in einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel verwendet. Dies geschieht unter denaturierenden Bedingungen unter Verwendung eines elektrischen Feldes. Proteinextrakte wurden wie in 2.2.3.1 beschrieben behandelt und zusammen mit 5 µl prestained PageRuler[®] Proteinmarker (10 – 170 kDa) für eine folgende Immunoblot-Analyse auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Proteinauftrennung erfolgte in 1x

Laufpuffer bei 25 mA pro Gel. Die Komponenten von Sammel- und Trenngel sind in Tabelle 2.19 aufgelistet.

2.19: Komponenten von Sammel- und Trenngel für SDS-PAGE

| Komponente | Sammelgel | Trenngel |
|---------------------|-----------|----------|
| Puffer | 1,25 ml | 2,5 ml |
| ddH ₂ O | 3,05 ml | 3,4 ml |
| 30% Akrylamid | 0,65 ml | 4 ml |
| 25% APS-Stammlösung | 25 µl | 50 µl |
| TEMED | 5 µl | 5 µl |

2.2.3.3 Immunoblot-Analyse

Die Immunoblot-Analyse dient der spezifischen Detektion von denaturierten Proteinen durch Antikörper nach der Größenauftrennung mittels SDS-PAGE. Dem geht der Proteintransfer vom Polyacrylamidgel auf eine Blotmembran durch ein elektrisches Feld voraus. Der Transfer wurde mit dem *Tank-Blot*-System durchgeführt deren Komponenten zuerst mit Transferpuffer equilibriert wurden. Die Proteine wurden bei 400 mA ($\approx 25 \text{ mA/cm}^2$) für höchstens 1 h auf die Nitrocellulosemembran übertragen. Zur Blockierung freier Proteinbindungsstellen wurde die Membran für 1 h mit 5% Milchemulsion in TBS-Puffer auf einem Orbital-Schüttler inkubiert. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper (α -GST: 1 µg/ml bzw. 1:1000) erfolgte über Nacht schüttelnd bei 4°C in 2,5% Milchemulsion in TBS-T-Puffer. Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit TBS-T-Puffer für jeweils 5 min bei RT entfernt. Der zweite Antikörper (1:5000), gekoppelt mit einer *horseradish peroxidase* (HRP), wurde für 1 h bei RT in 2,5% Milchemulsion (TBS-T) mit der Blotmembran inkubiert. Nach wiederholtem dreimaligen Waschen mit TBS-T-Puffer wurde die Membran für 2 min in 5,5 ml Entwicklerlösung inkubiert und anschließend vorsichtig abgetupft. Ein Röntgenfilm wurde für 10 sec - 5 min im Dunkeln auf die Membran gelegt, um die Chemilumineszenz durch darauffolgende Entwicklung des Films sichtbar zu machen.

2.2.3.4 Immunfluoreszenz-Färbung

Die Analyse von Infektionsrate und Markerassoziation auf Einzel-Zellebene während der Infektion erfolgte über die Immunfluoreszenz-Analyse fixierter Zellen. Dafür wurden ca. 1×10^6 infizierte Zellen zum entsprechenden Zeitpunkt in 24-Loch-Platten auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen zentrifugiert (500 x g, 1 min). Nach einer zusätzlichen Adhäsionszeit von 5-10 min erfolgte die Fixierung mit 500 μ l 4% PFA in Sörensen-Puffer für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Fixierte Proben wurden in PBS bei 4°C gelagert. Durch die Inkubation der Deckgläschen in 500 μ l Blockier-/Permeabilisierungslösung in der 24-Loch-Platte für 20 min wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert und die Zellen permeabilisiert. Zur Bindung des ersten Antikörpers (Verdünnungen in Block-/Perm-Lösung siehe 3.1.5) wurden die Deckgläschen mit der Zellseite auf 30 μ l Tropfen überführt und 1 h inkubiert. Die Deckgläschen wurden einzeln durch das Eintauchen in PBS von ungebundenen Antikörpern befreit und anschließend auf einem 30 μ l Tropfen des zweiten Antikörpers im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Waschen der Deckgläschen mit PBS wurden diese mit der Zellseite auf einen Tropfen Einbettmedium gelegt, welches über Nacht bei RT aushärtete.

2.2.3.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie basiert auf der Detektion von optischen Signalen einzelner Zellen, die einen Laserstrahl passieren. Dabei lassen sich Größe und Granularität der Zelle durch das Vorwärts- bzw. Seitwärtsstreulicht bestimmen. Zusätzlich können einzelne Zellen in gemischten Populationen charakterisiert werden, indem mit Fluorochromen gekoppelte Antikörper sowohl extra- als auch intrazelluläre Antigene binden. Diesem Prinzip folgend wurde in dieser Arbeit der Infektionsverlauf und das intrazelluläre Wachstum von *F.n.n.* in *Dictyostelium* durch die Antikörperfärbung von GFP-exprimierenden, intrazellulären *F.n.n.* verfolgt. Durch die Intensität der Fluoreszenzemission ließen sich dadurch infizierte und nicht-infizierte *Dictyostelium*-Zellen unterscheiden und sowohl Infektionsrate als auch Bakterienlast/Zelle in hohem Durchlauf bestimmen (siehe Abb. 3.3 F).

An entsprechenden Zeitpunkten der Infektion wurden ca. 1×10^6 Zellen entnommen, abzentrifugiert und mit 250 μ l 4% PFA in Sörensen-Puffer für 1 h bei RT fixiert. Mit 500 μ l 100mM Glycin in PBS wurde die Fixierung innerhalb von 5 min gestoppt und

die Zellen abzentrifugiert. Durch die Inkubation in 500 µl Block-/Perm-Lösung für 20 min wurden die Zellen blockiert und permeabilisiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen mit 50 µl Primärantikörper-Lösung (1:1000 α-GFP in Block-/Perm-Lösung) für 1 h bei RT inkubiert und daraufhin zweimal mit 2 ml Block-/Perm-Lösung gewaschen. Die Zellen wurden in 50 µl Sekundärantikörper-Lösung (1:1000 α-Kaninchen in Block-/Perm-Lösung) für 1 h bei RT inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen und in 200-400 µl PBS resuspendiert für die folgende durchflusszytometrische Analyse.

2.2.4 Mikroskopie

2.2.4.1 Elektronenmikroskopie (EM)

Elektronenmikroskope erreichen eine deutlich höhere Auflösung (0,1 nm) als Lichtmikroskope (200 nm) und sind daher besser geeignet um intra- und extrazelluläre Ultrastrukturen von Organismen oder Zellen darzustellen. Intrazelluläre Strukturen werden mittels Transmission abgebildet bei der Elektronen detektiert werden, die, gelenkt durch elektromagnetische Felder, die Probe passieren. Bei der Rasterelektronenmikroskopie wird die Oberfläche des Objektes durch den Elektronenstrahl rasterförmig abgescannt. In beiden Methoden wird ein Bild durch die Wechselwirkungen bzw. Ablenkung der Elektronen durch das Präparat erzeugt.

2.2.4.1.1 Transmissionselektronenmikroskopie

2.2.4.1.1.1 Chemische Fixierung

Die Einbettung und Analyse von chemisch fixierten Proben erfolgte in der elektronenmikroskopischen Einrichtung des BNITM. Infizierte Zellen wurden im adhären Zustand mit 2% PFA / 0,25% GA in HL5-C für 2 h bei RT fixiert und anschließend mit 10 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 1 ml 0,25% GA/PBS überschichtet, mithilfe eines Zellschabers vom Schalenboden gekratzt und bei 4°C gelagert. Im weiteren Verlauf wurde H₂O bei der Kontrastierung mit Uranylacetat benutzt. Das Zellpellet wurde zweimal 5 min mit H₂O gewaschen (500 x g, 3 min) und 30 min in 1% OsO₄ in H₂O im Dunkeln inkubiert. Nach zwei erneuten Waschschritten mit H₂O erfolgte eine Inkubation in 2% Uranylacetat/H₂O für 30 min. Die Proben wurden durch 70 / 80 / 90 / 3x100% Ethanol für jeweils 10 min dehydriert

und erst für 30 min schüttelnd in 50% Epon/Ethanol und anschließend über Nacht in 70% Epon/Ethanol inkubiert. Nach drei Inkubationsschritten von je 3 h in 100% Epon erfolgte die Polymerisation für 48 h bei 60°C.

2.2.4.1.1.2 Kryofixierung

Die Kryofixierung und anschließende elektronenmikroskopische Analyse wurde in der EM-Einrichtung der Universität Oslo durchgeführt. Infizierte, adhärenzte Zellen wurden zum entsprechenden Zeitpunkt in HL5-C resuspendiert und abzentrifugiert (500 x g, 2 min). Das Zellpellet wurde in einer geringen Menge Medium aufgenommen und mittels Kapillarkräfte in eine Zellulosekapillare ($\varnothing = 200 \mu\text{m}$) überführt. Diese wurde in kleine Stücke zerschnitten und in mit 1-Hexadecan befüllte Aluminium-Planchetten ($\varnothing = 6 \text{ mm}$, Vertiefung: $150 \mu\text{m}$) transferiert. Die Proben wurden in einem Leica EM HPM100 Hochdruckgefriersystem kryofixiert. Die Gefriersubstitution wurde nach Leonidova *et al.* durchgeführt indem das in den Proben enthaltene Wasser durch Aceton ersetzt wurde (218). Dafür wurden die Proben innerhalb eines Gefriersubstitutionsapparates (Balzers FSU 010, Bal-Tec) für 8 h bei -90°C, 6 h bei -60°C und 4 h bei -40°C in 1% OsO₄/Aceton schrittweise erwärmt. Daraufhin wurden die Proben 1 h auf Eis gelagert, mit Aceton gewaschen und für 1 h in 1% Uranylacetat auf Eis inkubiert. Proben wurden stufenweise mit Epoxidharz (15, 33, 50, 80, 100%) über zwei Tage bei RT inkubiert. Alternativ für anschließende Antikörperbindung wurden die Proben erst mit 0,5% GA/H₂O für 30 min bei 4°C chemisch fixiert, mit H₂O gewaschen und mit LR White (50, 100%) über 10 h infiltriert. Schlussendlich wurden die Proben über Nacht bei 70°C polymerisiert. Mit einem 45° Diamantmesser (Diatome) wurden ca. 70 nm Schnitte angefertigt, welche ohne zusätzliche Kontrastierung mit dem CM100 Transmissionselektronenmikroskop (Philips) analysiert wurden. Bilder wurden digital mit einer Quemesa TEM CCD Kamera aufgenommen und mit der iTEM software v5.1 (Olympus) bearbeitet.

2.2.4.1.2 Rasterelektronenmikroskopie

Um die Aufnahme von Bakterien durch *Dictyostelium* und damit verbundene Ultrastrukturen sichtbar zu machen, wurden rasterelektronische Aufnahmen dieses

Prozesses angefertigt. Dafür wurden 1×10^6 *Dictyostelium*-Zellen auf Deckgläschen gesät und *F.n.n.* (MOI 300) mit 500 x g für 3 min auf die Einzell-Schicht zentrifugiert. Die Deckgläschen wurden sofort in 2,5% GA/Sörensen + 1% Saccharose transferiert und darin gelagert. Anschließende Arbeiten und Analysen wurden an der Universität Ulm durchgeführt. Die Proben wurden graduell mit einer Propanol-Verdünnungsreihe dehydriert und mit Kohlenstoffdioxid einer Kritisch-Punkt-Trocknung unterzogen. Die Zellen wurden anschließend rotierend mittels Elektronenstrahl-Evaporation mit Platin-Kohlenstoff in einer Balzers 300 Gefrierbruch-Maschine (Bal-Tec) beschichtet. Die mikroskopische Analyse erfolgte in einem Feldemission-Rasterelektronenmikroskop (Hitachi S-5200) bei einer Spannung von 10 kV unter Verwendung des sekundären Elektronensignals (219).

2.2.4.2 Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie

Die Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie basiert auf der Anregung von Fluorophoren mit Licht spezifischer Wellenlängen, die mittels entsprechender Filtersätze erzeugt werden. Bei der Weitfeldmikroskopie wird die Fluoreszenzemission eines großen Teils der Probe über eine Kamera detektiert, wodurch viel Bildinformation in kurzer Zeit gesammelt werden kann. In dieser Arbeit wurde das Fluoreszenzmikroskop IX81 von Olympus für einen Teil der Quantifizierung von Immunfluoreszenz-Färbungen sowie der Lebendzell-Mikroskopie verwendet. Ausgestattet war das Inversmikroskop mit einem Olympus 100x UPlanSApo Ölimmersionsobjektiv (N.A. 1,4), Filtersätzen für GFP (Exzitation: 470/22 nm, Emission: 512 nm) und RFP (Exzitation: 555/20 nm, Emission: 630 nm) sowie einem MT20-I-Beleuchtungssystem mit Xenonbrenner.

2.2.4.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Im Gegensatz zur konventionellen Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie wird bei einem Konfokalmikroskop die Fluoreszenzexzitation und -emission mithilfe einer Lochblende (*pinhole*) fokussiert und dadurch die Bildinformation einer fokalen Ebene des Präparates detektiert. In dieser Arbeit wurden Punktscanner und Linienscanner verwendet, welche das punkt- bzw. linienförmige abscannen der Probe mit einem fokussierten Laserstrahl erlauben. Das Punktscanner-System bestand aus einem Olympus IX81 Inversmikroskop, ausgestattet mit einem Olympus 100 x UPlanSApo

Ölimmersionsobjektiv (N.A. 1,4) und wurde für die Analyse von Immunfluoreszenz-Färbungen verwendet. Je nach Fluorophor und Protein betrug die eingesetzte Laserintensität 1-20% und die Beschleunigungsspannung des Photovervielfachers 600-900 mV. Aufnahmen wurden mit einer Auflösung von 1024 x 1024 dpi (*dots per inch*), 5-10 x elektronischem Zoom, einer Geschwindigkeit von 8-10 $\mu\text{s}/\text{Pixel}$ und mit 2 oder 3-facher Mittelung (*Kalman*) angefertigt. Das Linienscanner-System LSM5 von Zeiss wurde überwiegend zur Quantifizierung der Lebendzellmikroskopie verwendet. In Kombination mit dem Colibri-Filtersystem wurden ebenfalls Immunfluoreszenz-Färbungen mit dem LSM5 analysiert. Bei dem Colibri-System handelt es sich um eine Kombination von LED-Lichtquelle und Vierfach-Filtersystem, welches die Betrachtung der Probe in mehreren, übereinandergelagerten Fluoreszenzspektren erlaubt. Ausgestattet war das LSM5 mit dem Zeiss 100 x Plan-Apochromat Ölimmersionsobjektiv (N.A. 1,4), einem Diodenlaser (488 nm), einem diodengepumpten Festkörperlaser (DPSS, 559 nm) und der Software Zen 2009. Abhängig von Fluorophor und Protein wurden Aufnahmen mit 1-5% Laserintensität, 1024 x 1024 dpi Auflösung, 0,7-1,2 elektronischem Zoom, 1 Airy Unit (AU) Lochblendenöffnung, 2,5-7,5 $\mu\text{s}/\text{Pixel}$ Scangeschwindigkeit und einer elektronischen Signalverstärkung (*gain*) von 25-35 angefertigt. Die Anregungsintensität der LED-Lichtquelle im Colibri-Systems betrug 20-30% bei 470 nm und 80-100% bei 530 nm.

2.2.4.4 Lebendzellmikroskopie

Die Lebendzellmikroskopie wurde entweder am Weitfeldmikroskop (Exozytose von *F.n.n. $\Delta igI C$*) oder am Linienscanner (Autophagie-Marker, Neutralrot) durchgeführt. Dafür wurden infizierte Zellen 10-30 min vor dem entsprechenden Zeitpunkt in filtriertem HL5-C aufgenommen und in "35 mm μ -dish" oder "8 well μ -Slide" Kulturschalen mit Polymerboden gesät. Schwach fluoreszente Zelllinien wurden 16 h vorher mit filtriertem HL5-C inkubiert, um das autofluoreszente Signal von autoklaviertem HL5-C in Vesikeln von *Dictyostelium* zu minimieren. Für die Beladung von infizierten Zellen mit Neutralrot (Stammlösung: 62 μM) wurde kurz vor dem entsprechenden Zeitpunkt eine 1:100 verdünnte Neutralrot-Lösung in filtriertem HL5-C für 1 min zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden daraufhin einmal mit HL5-C gewaschen und umgehend analysiert.

2.2.4.5 Bildbearbeitung und -analyse

Die Bildaufnahmen von Weitfeldmikroskop, Punktscanner und Linienscanner wurden im oif- (Olympus) bzw. lsm-Format (Zeiss) in das Bildbearbeitungsprogramm ImageJ importiert. Dort wurden Bilder zugeschnitten, Fluoreszenzkanäle fusioniert und getrennt, Falschfarben zugewiesen und Helligkeit und Kontrast des gesamten Bildes angepasst. Der Aussagegehalt der Aufnahmen wurde durch die Bearbeitung nicht verändert.

2.2.4.6 Quantifizierung von Infektionsrate und Markerassoziation

Infektionsraten und Assoziationen von Markern mit *F.n.n.* wurden überwiegend mit dem Zeiss LSM5 und in geringem Maße mit dem Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop quantifiziert. Es wurden mindestens 3 unabhängige biologische Replika (n) ausgewertet. Für die Bestimmung von Infektionsrate und Markerassoziation wurden mindestens 100 *Dictyostelium*-Zellen bzw. 100 Bakterien gezählt, falls nicht anders angegeben. Infizierte Zellen wurden durch die Einteilung in die Kategorien 1-3, 4-6 und >6 *F.n.n./Zelle* näher charakterisiert. Als positive Assoziation von *F.n.n.* mit p80 und VatA wurden ausschließlich vom Marker komplett dekorierte Membranen gezählt. Mehrere Bakterien in einem p80- oder VatA-positiven Vesikel wurden als mehrere assoziierte Bakterien gewertet. Die Assoziation von Ubiquitin, SQSTM1 und Atg8a galt nur in Form von länglichen oder vollständig umschließenden Anlagerungen als positiv. Einzelne, punktförmige GFP-Signale, welche angrenzend zum Bakterium lokalisierten, wurden als negativ gewertet.

2.2.5 Statistik und Bioinformatik

Quantifizierungen und statistische Analysen wurden mit GraphPad Prism v5.0b durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte der Messdaten einschließlich des Standardfehlers (SEM: *Standard Error of the Mean*), falls nicht anders angegeben. Die statistische Relevanz von zwei Datensätzen wurde mittels *unpaired student's t-test* ermittelt. Der Signifikanzvergleich mehrerer Gruppen wurde mittels einfacher ANOVA durchgeführt. Signifikanzkriterien wurden folgendermaßen festgelegt: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)

Die Generation von Primersequenzen erfolgte mit Primer3 (<http://primer3.ut.ee>) sowie unter Verwendung des OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) von Integrated DNA Technologies, um Sekundärstrukturen zu identifizieren.

Die Similarität von Sequenzdaten wurde mithilfe der Clustal Omega Software (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) von EMBL-EBI miteinander verglichen und Sequenzsuchen mittels BLAST-Algorithmus (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) durchgeführt.

Die Analyse des Genoms von *F. noatunensis* nach Fur-Bindesequenzen wurde von Dr. Stephan Lorenzen am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin durchgeführt. Mithilfe eines mit Pearl (R) geschriebenen Programmes wurde die Genomsequenz von *F.n.o.* Toba 04 (ID: 11764) nach der Fur-Box innerhalb von 50 bp vor dem Startcodon jedes Gens durchsucht. Es wurden Fehlpaarungen von 8 oder 6 (Anhang 1) bp zugelassen.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde *Dictyostelium discoideum* als neues Modellsystem für die *Francisella*-Infektion unter Verwendung der Spezies *Francisella noatunensis* subsp. *noatunensis* (*F.n.n.*) untersucht. Dafür wurde der Infektionsverlauf und der Einfluss von bakteriellen Virulenz- und Wirtsfaktoren analysiert. Ein Teil der Ergebnisse wurde 2015 von Lampe, Brenz *et al.* veröffentlicht (216).

Der intrazelluläre Infektionsverlauf von *F.n.n.* wurde im *Dictyostelium*-System untersucht und mit dem etablierten Makrophagen/*F. tularensis*-Modell verglichen. Dabei wurde die Rolle des Virulenzfaktors IgIC bezüglich bakterieller Replikation und phagosomaler Reifung charakterisiert. Des Weiteren wird der Einfluss von Autophagie als potentiell Abwehrmechanismus der Wirtszelle gegen eine *Francisella*-Infektion beschrieben. Dafür wurde die Interaktion von *F.n.n.* mit autophagosomalen Faktoren bestimmt sowie der Infektionsverlauf in einer Autophagie-Deletionsmutante analysiert. Im letzten Abschnitt wurde die Rolle der wirtseigenen Eisentransporter Nramp1 und NrampB während der Infektion mit *F.n.n.* untersucht. Dafür wurde die Interaktion von *F.n.n.* mit den Eisentransportern, der Infektionsverlauf und die transkriptionelle Antwort der Bakterien in Nramp-Deletionsmutanten analysiert.

3.1 Hohe Nukleotidsequenzidentität von Virulenzfaktoren im Genus *Francisella*

Obwohl pathogene *Francisella*-Spezies ein großes Spektrum von Wirtsspezies befallen, haben Genomanalysen viele Gemeinsamkeiten zwischen Mitgliedern der Gattung ergeben. Der *Francisella*-Genus zeigt eine hohe Similarität des Kerngenoms und alle Mitglieder codieren eine Vielzahl von Virulenzfaktoren in einem bestimmten Locus, der *Francisella*-Pathogenitätsinsel (FPI) (81, 82). Um zu untersuchen, wie konserviert die FPI-Faktoren zwischen den *Francisella*-Spezies sind, wurde die Sequenz der FPI-Gene zwischen klinisch relevanten *Francisella*-Stämmen verglichen. Abb. 1 zeigt die Orientierung und Sequenzähnlichkeit von FPI-Genen auf Nukleotidebene innerhalb der Gattung *Francisella* im Vergleich zu *F.n.n.* Mit 89-99% weist *F.n.n.* die höchste Ähnlichkeit zu den nahe verwandten Spezies *F.n.o.* und *F. philomiragia* auf. Die Similarität zu *F.t.novicida* (U112), *F.t.holarctica* (LVS) und

F.t.tularensis (SCHU S4), welche Säugetiere infizieren, ist mit 54-86% zwar geringer, weist aber dennoch eine hohe Homologie auf. So besitzen u.a. die Gene *intracellular growth locus* (*igl*) A-D die höchste Sequenzidentität zwischen den Spezies, was auf eine stark konservierte Funktion dieser Gene unabhängig vom Wirtsorganismus schließen lässt. Im Vergleich zum Humanpathogen *F. tularensis* SCHU S4 verfügen *F.n.n.*, *F.n.orientalis* und *F. philomiragia* jedoch nicht über die FPI-Gene *pdpC* und *pdpE*. Prinzipiell lässt die hohe Sequenzhomologie der Pathogenitätsinsel vergleichbare Rollen der entsprechenden Virulenzfaktoren zwischen fisch- und humanpathogenen *Francisella*-Spezies vermuten.

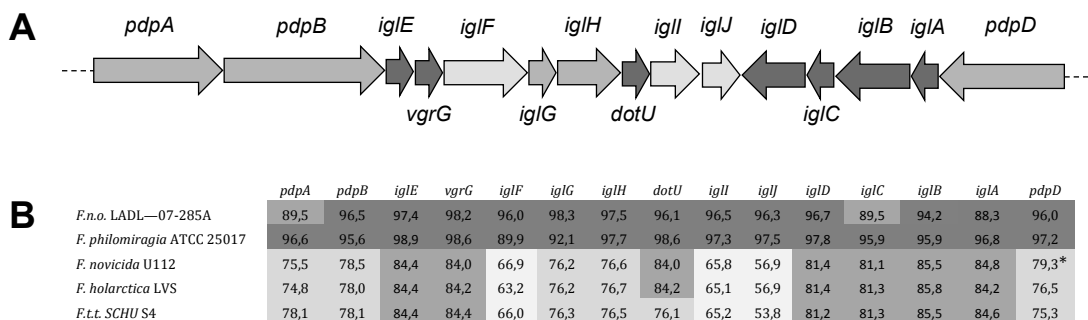


Abbildung 3.1: Sequenzvergleich der FPI-Gene der Gattung *Francisella*. (A, B) Dargestellt ist die Orientierung der FPI-Gene (A) und die Nukleotidähnlichkeit (B) von FPI-Genen relevanter *Francisella*-Spezies zu *F.n.n.* nach paarweisem Vergleich. Die Grauschattierungen zeigen die Sequenzähnlichkeit mit dunkelgrau als höchste Similarität. * Gensequenz ist unterbrochen

3.2 D. discoideum nutzt *F.n.n.* nicht als Nahrungsquelle

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass *Dictyostelium* ein nützliches System für die Bestimmung und Analyse von bakteriellen Virulenzmechanismen ist und mit Säuger-Wirtssystemen korreliert. Entsprechend widerstehen viele humanpathogene Bakterien der Prädation durch *Dictyostelium*, unter anderem *Legionella pneumophila*, *Vibrio cholerae* und *Pseudomonas aeruginosa* (164, 171, 220). Bakterielle Prädation kann durch das Ausplattieren von *Dictyostelium*-Zellen auf einem Bakterienrasen analysiert werden. Erfolgreiche Prädation wird durch das Auftreten von Plaques durch fressende und sich teilende *Dictyostelium*-Zellen auf dem Rasen angezeigt. Die Abwesenheit von Plaques deutet auf bakterielle Virulenz durch die Vermeidung der Tötung oder das aktive Töten der Amöben hin.

Abbildung 3.2 A zeigt die Entstehung von Plaques auf der apathogenen Spezies *Klebsiella aerogenes* nach 5 Tagen. Dagegen formte *Dictyostelium* keine Plaques auf *F.n.n.* wt (Abb. 3.2 B). Unerwarteterweise bildeten sich auch auf dem avirulenten Stamm *F.n.n.* $\Delta igIC$ keine Plaques (Abb. 3.2 C). Fehlendes *Dictyostelium*-Wachstum auf *F.n.n.* $\Delta igIC$ könnte durch ineffiziente Aufnahme oder Verdau der Bakterien durch *Dictyostelium* begründet sein. Diese Ergebnisse zeigen, dass *F.n.n.* von *Dictyostelium* im Gegensatz zu *K. aerogenes* nicht als Nahrungsquelle genutzt werden kann und möglicherweise eine Virulenz gegenüber *Dictyostelium* besitzt.

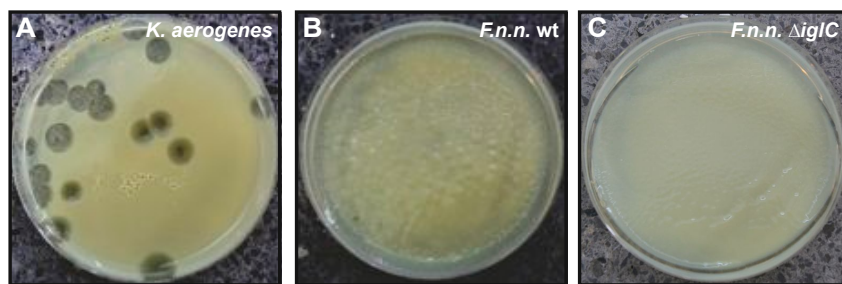


Abbildung 3.2: Plaque-Formierung von *Dictyostelium* (216). Die Fähigkeit von *Dictyostelium* auf einem Bakterienrasen zu wachsen, wurde durch das Ausplattieren von 50 *Dictyostelium*-Zellen mit entsprechenden Bakterien auf Sørensen-Agar-Platten bestimmt. Die Bildung von Plaques wurde nach 5 Tagen auf *K. aerogenes* beobachtet, jedoch nicht auf *F.n.n.* wt (B) und $\Delta igIC$ (C).

3.3 Die Replikation von *F.n.n.* in *Dictyostelium* ist abhängig von *IgIC*

Intrazelluläre Replikation ist ein Schlüsselattribut der Virulenz von *Francisella* in Makrophagen und anderen phagozytierenden Wirtszellen (221). Mehrere Studien in diversen Modellsystemen zeigten ein eingeschränktes, intrazelluläres Wachstum von *Francisella* in Abwesenheit des Virulenzfaktors *Intracellular growth locus C* (*IgIC*). *IgIC* ist ein essentieller Faktor für den Ausbruch aus der phagosomalen Reifung, ein Prozess der entscheidend für den Verbleib von *Francisella* innerhalb der Wirtszelle ist (53, 76, 86, 222). Deswegen wurde eine *F.n.n.*-Deletionsmutante (*F.n.n.* $\Delta igIC$) generiert (216) und dessen intrazellulärer Schicksal mit dem Wildtyp verglichen.

Um die bakterielle Replikation zu verfolgen, wurden *F.n.n.* wt und $\Delta igIC$ mit einem GFP codierenden Plasmid transformiert. Abb. 3.3 A zeigt, dass die Deletion von *igIC* sowie die Expression von GFP keine Auswirkungen auf das Wachstum von *F.n.n.* *in vitro* hat. Zudem konnte gezeigt werden, dass *F.n.n.* sich nicht im HL5-C-Medium der

Dictyostelium-Zellen repliziert. Damit kann extrazelluläres, bakterielles Wachstum nicht zur intrazellulären Bakterienlast beitragen.

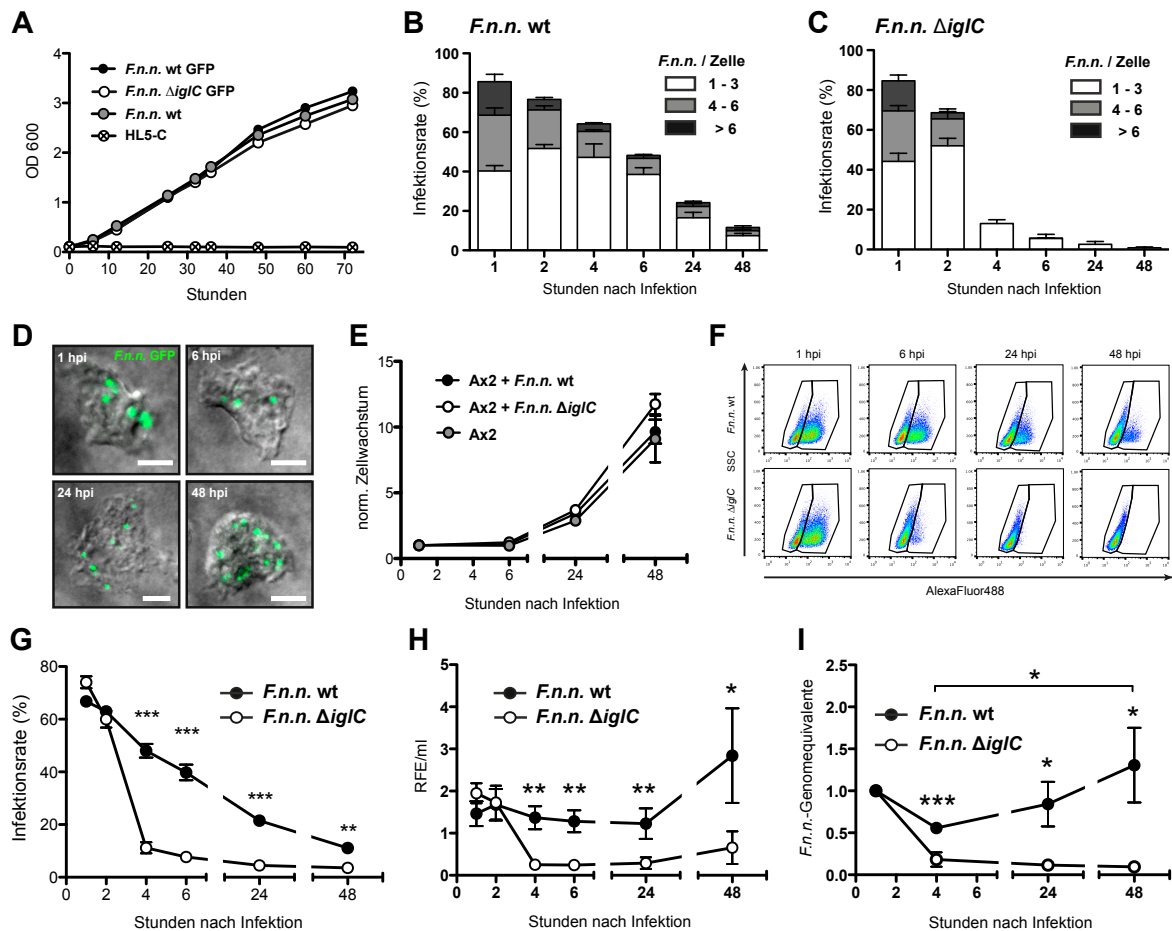


Abbildung 3.3: Infektionsverlauf von *F.n.n.* wt und Δ iglC in *Dictyostelium* (216). (A) Das Wachstum von *F.n.n.* wt GFP (schwarz), *F.n.n.* Δ iglC GFP (weiß) und *F.n.n.* wt (grau) in EB-Medium sowie *F.n.n.* wt GFP in HL5-C-Medium (Kreuz) wurde in Schüttelkultur über 72 h miteinander verglichen ($n=2 \pm$ SEM). (B, C) Mittels Fluoreszenz-Mikroskopie wurde die Anzahl von *F.n.n.* wt GFP (B) und Δ iglC GFP (C) in fixierten *Dictyostelium*-Zellen bestimmt ($n=3-6 \pm$ SEM). Weiß: 1-3, hellgrau: 4-6, dunkelgrau: >6 *F.n.n.*/Zelle. (D) Repräsentative Micrographen von mit *F.n.n.* wt infizierten Zellen sind als Überlagerung von Durchlicht- und grünem Kanal dargestellt. (E) Normalisiertes Wachstum von *F.n.n.* wt und Δ iglC infizierten sowie nicht-infizierten *Dictyostelium*-Zellen über 48 hpi. (F) Repräsentative Dotplots von *F.n.n.* wt (obere Reihe) und Δ iglC (untere Reihe) infizierten Zellen zu den Zeitpunkten 1, 6, 24 und 48 hpi nach durchflusszytometrischer Analyse. Die mittels Durchflusszytometrie ermittelten Infektionsraten von *F.n.n.* wt (schwarz) und Δ iglC (weiß) sind in (G) dargestellt ($n=7 \pm$ SEM). (H, I) Die Bakterienlast mit *F.n.n.* wt (schwarz) und *F.n.n.* Δ iglC (weiß) infizierter Zellen wurde über 48 hpi mittels Durchflusszytometrie (H) und qPCR (I) bestimmt. (H) $n=8 \pm$ SEM, (I) $n=4 \pm$ SEM. Der statistische Vergleich zweier Zeitpunkte erfolgte mittels t-Test. * $p=0,05$, ** $p=0,01$, *** $p=0,001$

Um die Aufnahme von *F.n.n.* durch *Dictyostelium* zu synchronisieren, wurden die Bakterien mit einer *multiplicity of infection* (MOI) 30 auf eine Ein-Zellschicht von *Dictyostelium* zentrifugiert. Anschließend wurde die Anzahl von Bakterien pro Zelle bis zu 48 hpi mittels Fluoreszenz-Mikroskopie ausgezählt. Abb. 3.3 B zeigt eine

graduelle Abnahme der Infektionsrate mit *F.n.n.* wt infizierter Zellen von 86% (1 hpi) auf 12% (48 hpi). In der frühen Phase der Infektion (1-6 hpi) nahm der Anteil infizierter Zellen mit mehr als 3 *F.n.n.*/Zelle von 53% auf 20% ab. Jedoch stieg dieser Anteil in der späten Phase auf 32% (24 hpi) und 37% (48 hpi) an. Unter Berücksichtigung einer Generationszeit von adhärennten *Dictyostelium*-Zellen von etwa 14,5 h (Abb. 3.3 E) lassen diese Ergebnisse auf eine intrazelluläre Replikation von *F.n.n.* wt schließen. Abb. 3.3 D zeigt repräsentative Beispiele mit *F.n.n.* wt infizierter Zellen im Infektionsverlauf. Die Infektionsrate von *F.n.n.* $\Delta igIC$ (Abb. 3.3 C) war zu Beginn mit 86% gleich dem wt, sank jedoch nach 4 hpi rapide ab (wt: 64%, $\Delta igIC$: 13%). In der späten Infektionsphase verschwanden $\Delta igIC$ -Bakterien beinahe vollständig aus der *Dictyostelium*-Kultur angezeigt durch die niedrigen Infektionsraten nach 24 (3,5%) und 48 hpi (0,6%). Das Wachstum von *Dictyostelium* wurde durch die Infektion nicht beeinflusst (Abb. 1 E). Die Bakterien scheinen also weder eine zytotoxische Wirkung auf *Dictyostelium* zu haben, noch zum Platzen ihrer Wirtszelle nach erfolgreicher Replikation zu führen.

Neben der Fluoreszenz-Mikroskopie wurde die quantitative Durchflusszytometrie verwendet, um eine größere Anzahl infizierter Zellen quantifizieren zu können. So zeigten die Analysen mit Durchflusszytometer und Fluoreszenz-Mikroskopie vergleichbare Infektionsraten für *F.n.n.* wt und $\Delta igIC$ (Abb. 3.3 F, G). Unter Einbeziehung des *Dictyostelium*-Zellwachstums (Zellen/ml) und der mittleren grünen Fluoreszenz/infizierter Zelle konnte auf die bakterielle Fluoreszenz/ml Zellkultur geschlossen werden. Damit ließ sich die relative Menge der bakteriellen Fluoreszenz (Relative Fluoreszenz-Einheiten (RFE)/ml) über die Zeit verfolgen. Für *F.n.n.* wt konnte eine Verdoppelung der bakteriellen Fluoreszenz innerhalb von 48 hpi beobachtet werden (Abb. 3.3 H). Demgegenüber fiel das Fluoreszenzsignal von *F.n.n.* $\Delta igIC$ nach 4 hpi rapide ab und blieb niedrig im Infektionsverlauf. Diese Resultate bestätigen die Mikroskopie-Ergebnisse und deuten wiederum auf eine intrazelluläre Replikation der Bakterien in Abhängigkeit vom Virulenzfaktor *IgIC* hin.

Neben der Replikation ist ein Größenwachstum der Bakterien eine Möglichkeit für die Zunahme des Fluoreszenzsignals. Um dies auszuschließen, wurde die Anzahl von *F.n.n.*-Genomen in Relation zu *Dictyostelium*-Genomen während der Infektion mit einer *F.n.n.*-spezifischen qPCR bestimmt (Abb. 3.3 I). Nach einer anfänglichen, leichten Reduktion von *F.n.n.* wt-Genomen nach 4hpi nahm deren Menge bis 48 hpi um das 2,3-fache signifikant zu. Dagegen sank der Anteil von Genomen von *F.n.n.*

$\Delta igIC$ nach 4 hpi drastisch ab und blieb konstant gering. Zusammenfassend wurde in diesem Abschnitt mit drei verschiedenen Methoden gezeigt, dass *F.n.n.* wt sich in *Dictyostelium* als Wirtszelle repliziert und dieser Vorgang abhängig vom Virulenzfaktor IgIC ist.

3.4 Der intrazelluläre Lebenszyklus von *F.n.n.* in *Dictyostelium*

Der intrazelluläre Lebenszyklus von *Francisella* ist in mehreren Modellsystemen studiert worden. Obwohl die Kinetik je nach Modell variiert, ist die Aufnahme durch Phagozytose, Interaktion mit dem endosomalen Kompartiment und die Replikation im Cytosol in den meisten Systemen zu beobachten (221). In mehreren Studien wurde *Dictyostelium* erfolgreich als Modell für die Untersuchung von grundlegenden Aspekten des intrazellulären Infektionsverlaufs verwendet, wie Aufnahme, phagosomale Reifung und Austritt des Pathogens (163). In diesem Abschnitt sollte der intrazelluläre Lebenszyklus von *F.n.n.* in *Dictyostelium* untersucht werden. Dafür wurde neben der Aufnahme von *F.n.n.*, die phagosomale Reifung und der Ort der Replikation analysiert. Mithilfe der $\Delta igIC$ -Deletionsmutante wurde die Abhängigkeit dieser Prozesse von dem Virulenzfaktor IgIC überprüft und mit dem humanen Makrophagen/*F. tularensis*-System verglichen.

3.4.1 Die Aufnahme von *F.n.n.*

Die Aufnahme von Bakterien durch *Dictyostelium* kann durch Phagozytose (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*) oder Makropinozytose (*L. pneumophila*) erfolgen und ist abhängig von Aktinpolymerisation (223). In diesem Abschnitt sollte der Aufnahmevorgang von *F.n.n.* mittels Lebendzell- und Rasterelektronenmikroskopie (SEM) beobachtet und näher charakterisiert werden. Zudem wurde die *F.n.n.*-Aufnahme mit einer *Dictyostelium*-Mutante charakterisiert, die Makropinozytose-gehemmt ist (*Ax2* $\Delta pi3k1$) (214).

Für die Lebendzellmikroskopie wurden mCherry exprimierende *F.n.n.* wt zu *Dictyostelium*-Zellen gegeben, deren *actin binding domain* (ABD) vom Aktinvernetzenden Protein ABP-120 mit GFP markiert ist (224). Die Einzelbilder in Abb. 3.4 A, B offenbaren die Aufnahme eines Bakteriums durch eine mit Aktin markierte Struktur, einem Phagozytosebecher. Dieser bildete sich entweder vor

(Abb. 3.4 A) oder nach Kontakt (Abb. 3.4 B) des Bakteriums mit der Oberfläche von *Dictyostelium*. Nach der Aufnahme befand sich das Bakterium in einem Aktin-assoziierten Kompartiment dessen Aktinmantel nach kurzer Zeit verschwand. Demgegenüber wiesen nach unbestimmter Zeit aufgenommene Bakterien noch oft einen schwachen Aktinmantel auf (Abb. 3.4 C, C').

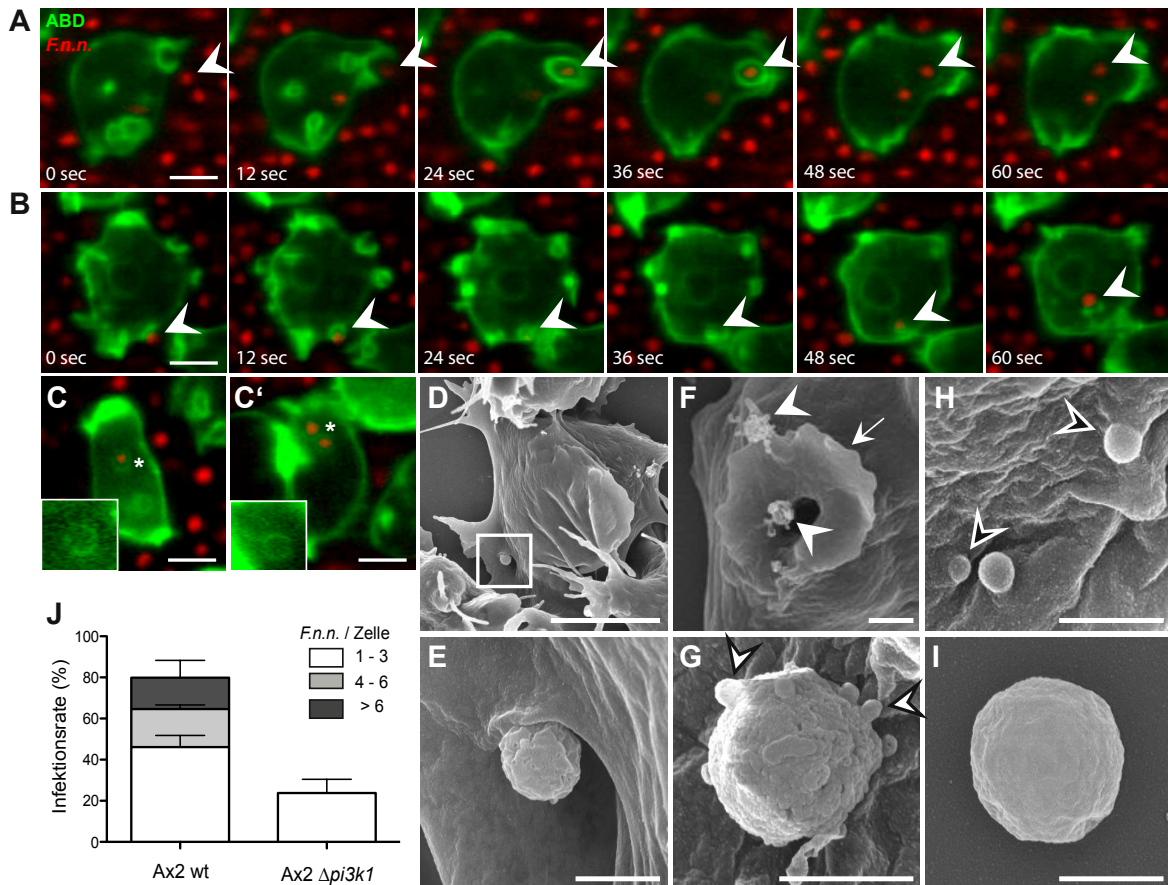


Abbildung 3.4: Die Aufnahme von *F.n.n.* (A-B) Nach Zugabe von *F.n.n.* wt mCherry (MOI 30, rot) wurden ABD-GFP (grün) exprimierende Zellen mittels konfokaler Fluoreszenz-Mikroskopie beobachtet. Dargestellt ist die Bildung eines Phagozytosebeckers vor (A) und nach (B) Kontakt von *F.n.n.* mit der Oberfläche von *Dictyostelium*. (C, C') zeigen *F.n.n.* umgeben von ABD-GFP nach unbestimmter Zeit innerhalb der Zelle. Die Einschübe zeigen Vergrößerungen des grünen Kanals von mit einem Sternchen markierten Regionen. (D-I) zeigen Aufnahmen der Rasterelektronenmikroskopie von *Dictyostelium* und *F.n.n.* kurz nach der Zentrifugation. Bakterien wurden entweder eng von einer Membran umschlossen (D, E) oder waren mit einem Phagozytosebecher (Pfeil) assoziiert (G). Nahaufnahmen zeigen einzelne Bakterien mit (G) und ohne (I) Zellkontakt. OMV-ähnlich Strukturen fusionieren mit der Plasmamembran von *Dictyostelium* (H). (J) Ax2 wt und $\Delta pi3k1$ -Zellen wurden mit *F.n.n.* wt (MOI 60) infiziert, fixiert und die Bakterienlast am Fluoreszenz-Mikroskop bestimmt (n=3 \pm SEM). Weiß: 1-3, hellgrau: 4-6, dunkelgrau: >6 *F.n.n.*/Zelle. Maßstäbe: 5 μ m (A, B, C, D), 1 μ m (F), 500 nm (E, G, I), 250 nm (H). Weißer Pfeilkopf: *F.n.n.*, Stern: *F.n.n.* mit Aktinmantel, Pfeil: Phagozytosebecher, weißer Pfeilkopf mit schwarzem Rand: OMVs an *F.n.n.*, schwarzer Pfeilkopf mit weißem Rand: fusionierende OMVs.

Für die Ultrastrukturanalyse wurde *F.n.n.* wt für 4 min auf *Dictyostelium*-Zellen zentrifugiert und der Vorgang umgehend mittels GA-Fixierung abgestoppt. Die SEM-Bilder zeigen eine mögliche Aufnahme von *F.n.n.* in Abb. 3.3 D-I. Während Abb. 3.3 D und E eine enge Assoziation von *F.n.n.* mit einer umschließenden Membran am Rand der Zelle zeigt, ist in Abb. 3.3 F die Assoziation von zwei Bakterien mit einem großen Phagozytosebecher auf der Zelloberseite zu beobachten. Bakterien mit Zellkontakt wiesen sowohl eine glatte Oberfläche als auch häufig bläschen- und stäbchenförmige Oberflächenstrukturen auf (Abb. 3.4 G). Dabei könnte es sich um *outer membrane vesicles* (OMVs) und Nanoröhren handeln, welche *F.n.n.* *in vitro* produziert und Virulenzfaktoren enthalten (225). Membranstrukturen mit der Größe und Oberflächenstruktur von OMVs fusionierten mit der Plasmamembran von *Dictyostelium* (Abb. 3.4 H). Einzelne *F.n.n.* ohne Zellkontakt in derselben Präparation zeigten diese Vesikel nicht oder nur in geringem Maß (Abb. 3.4 I).

Um zwischen Makropinozytose und Phagozytose zu unterscheiden, wurde die *F.n.n.*-Aufnahme in Ax2 $\Delta pi3k$ -Zellen untersucht. Diese Deletionsmutante besitzt eine verringerte Makropinozytoserate, während ihre Fähigkeit zur Phagozytose unbeeinträchtigt bleibt (214). Bei 1 hpi zeigten $\Delta pi3k$ -Zellen im Vergleich zu wt-Zellen eine deutlich geringere Infektionsrate und nie mehr als 3 Bakterien/Zelle (Abb. 3.4 J). Diese Ergebnisse zeigen, dass *F.n.n.* abhängig von Aktin und möglicherweise durch Makropinozytose aufgenommen wird. Zusätzlich könnten von *F.n.n.* abgesonderte OMVs und Nanotubes bei der Aufnahme und für die Virulenz eine Rolle spielen.

3.4.2 *F.n.n.* entkommt der phagosomalen Reifung abhängig von IgIC

Nach der Phagozytose durch Makrophagen befindet sich *F. tularensis* in einem Phagosom, welches anfänglich der phagosomalen Reifung folgt und mit dem endosomalen Kompartiment interagiert. Ob eine Ansäuerung des Kompartiments stattfindet, ist umstritten. Kurz nach Aufnahme verliert *F. tularensis* die endosomalen Marker, bricht aus dem Phagosom aus und repliziert im Cytosol. IgIC ist ein essentieller Faktor für die cytosolische Translokation, die entscheidend für den Verbleib von *Francisella* innerhalb der Wirtszelle ist. In diesem Abschnitt sollte untersucht werden, ob *F.n.n.* der phagosomalen Reifung ins Cytosol entkommt und ob dieser Vorgang von IgIC abhängig ist.

3.4.2.1 Der Verlust von endosomalen Marken ist abhängig von IgIC

Um eine Interaktion von *F.n.n.* enthaltenden Phagosomen mit dem endosomalen System zu zeigen, wurden Endosomen infizierter *Dictyostelium*-Zellen mit colloidalen Goldpartikeln (Durchmesser: 5 nm) beladen und deren Lokalisation mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) bestimmt. Die Abbildungen 3.5 A, B zeigen, dass Phagosomen mit *F.n.n.* wt als auch $\Delta igIC$ nach 1 hpi Goldpartikel enthielten. Die anfängliche Fusion von *F.n.n.*-enthaltenden Phagosomen (FEP) mit Endosomen scheint damit unabhängig von IgIC stattzufinden.

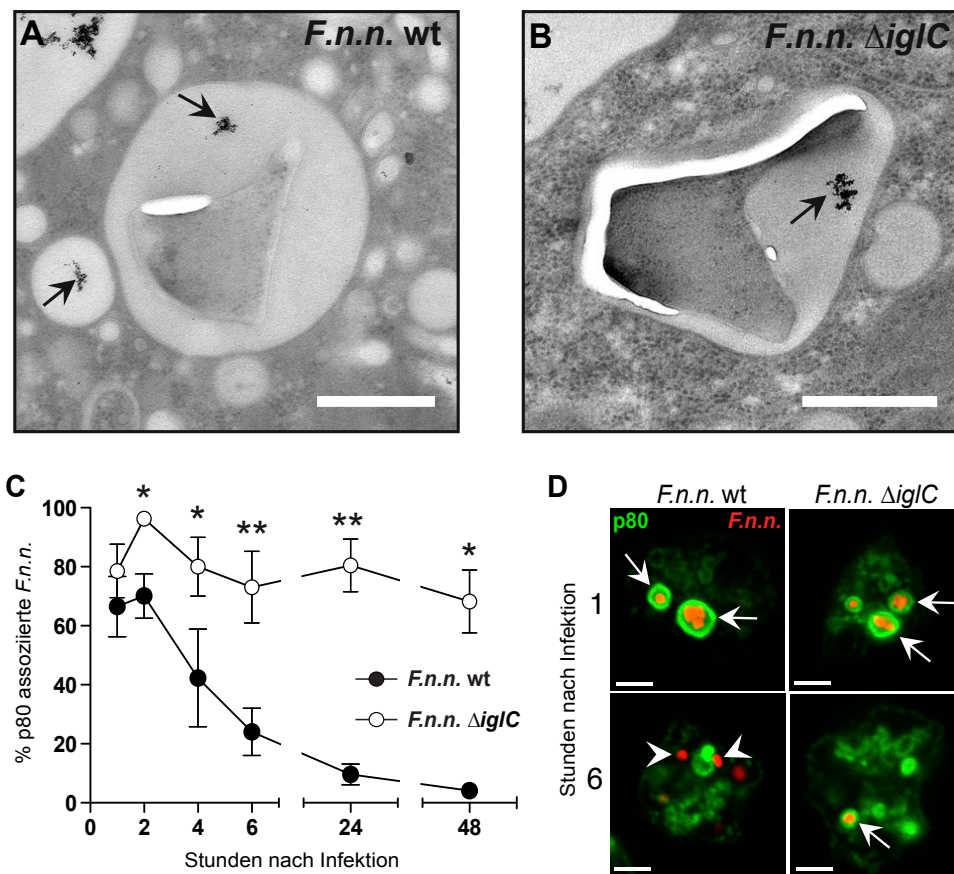


Abbildung 3.5: Interaktion von *F.n.n.* wt und $\Delta igIC$ mit dem endosomalen System (216). (A, B) Mittels TEM wurde die Fusion von *F.n.n.* wt (A) und $\Delta igIC$ (B) enthaltenden Phagosomen mit endosomalen 5 nm BSA-Goldpartikeln (schwarzer Pfeil) zum Zeitpunkt 1 hpi untersucht. (C) Quantifizierung der p80-Assoziation von *F.n.n.* wt und $\Delta igIC$ enthaltenden Phagosomen von 1 bis 48 hpi. (D) zeigt repräsentative Mikrographen von p80-positiven (weißer Pfeil) und p80-negativen (Pfeilkopf) Bakterien zu den Zeitpunkten 1 und 6 hpi. Statistische Analyse per t-Test: * $p=0,05$, ** $p=0,01$

Zusätzlich wurde die Assoziation von *F.n.n.* wt- und $\Delta igIC$ -enthaltenden Phagosomen mit p80, einem putativen Kupfertransporter und Markerprotein später Endosomen

(158), im Infektionsverlauf analysiert. Infizierte Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten fixiert und nach der Immunfluoreszenzfärbung am Fluoreszenz-Mikroskop analysiert. Beide *F.n.n.*-Stämme zeigten eine hohe Assoziation mit p80 nach 1 hpi (wt: 67%, $\Delta igIC$: 79%) (Abb. 3.5 C, D). Der Anteil p80-positiver wt Bakterien nahm ab 4 hpi graduell auf 12% (6 hpi) und 4% (48 hpi) ab. Demgegenüber war die Assoziation von *F.n.n.* $\Delta igIC$ enthaltenden Phagosomen mit p80 bereits ab 2 hpi signifikant zum wt erhöht und blieb im Laufe der Infektion konstant. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse eine Interaktion von *F.n.n.* mit dem endosomalen System, dem *F.n.n.* jedoch abhängig von IgIC entkommen kann.

3.4.2.2 Die Ansäuerung des *F.n.n.*-Kompartiments ist IgIC-unabhängig

Die Ansäuerung des Phagosoms ist ein grundlegender Prozess in der Wirtsabwehr gegen intrazelluläre Pathogene. Ob das Phagosom der humanpathogenen Spezies *F. tularensis* azidifiziert wird, variiert je nach Modellsystem und Versuchsdurchführung (52-55). Die phagosomale Ansäuerung und deren Abhängigkeit von IgIC im *Dictyostelium/F.n.n.*-System wurde durch die Assoziation von VatA und Neutralrot mit *F.n.n.* untersucht. Die Anwesenheit von VatA, der katalytischen Untereinheit der V-ATPase, an der Vakuole ist ein Hinweis für eine angesäuerte und potentiell bakterizide Umgebung für das enthaltene Bakterium (226). Neutralrot ist ein membrangängiger, pH-sensitiver Farbstoff, der innerhalb der Zelle nur in angesäuerten Kompartimenten rot fluoresziert (156).

Für die Analyse der VatA-Assoziation am FEP wurden *Dictyostelium*-Zellen mit *F.n.n.* wt bzw. $\Delta igIC$ infiziert, fixiert und die Immunfluoreszenzfärbung am Fluoreszenz-Mikroskop analysiert. *F.n.n.* wt und $\Delta igIC$ zeigten eine vergleichbare Assoziation mit VatA von >90% bis 15 mpi, welche für beide Stämme mit vergleichbarer Kinetik bis 2 hpi absank (Abb. 3.6 A, B). Im Gegensatz zum konstanten Verlust von VatA am Phagosom von wt-Bakterien, stieg der Anteil VatA-positiver $\Delta igIC$ -Bakterien ab 4 hpi wieder an und blieb danach konstant. In Abb. 3.6 C sind repräsentative Aufnahmen von *F.n.n.* wt und $\Delta igIC$ infizierten Zellen zu den Zeitpunkten 1 und 6 hpi dargestellt. VatA folgte in beiden *F.n.n.*-Stämmen unabhängig von IgIC der typischen V-ATPase-Dynamik in *Dictyostelium*, jedoch konnten nur wt-Bakterien dem VatA-positiven Kompartiment dauerhaft entkommen.

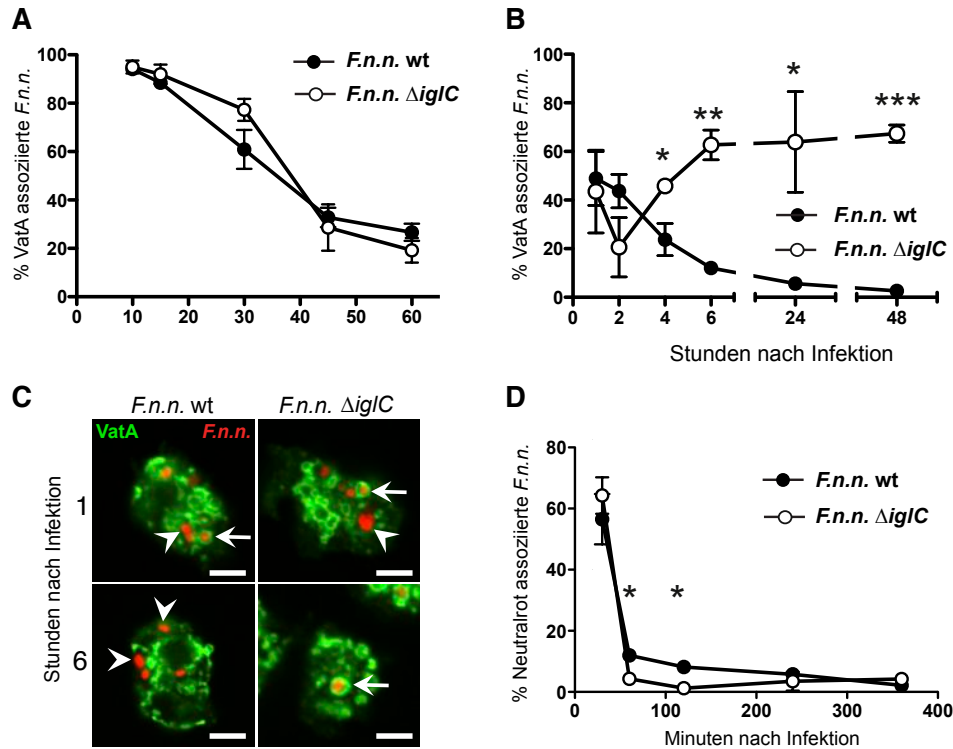


Abbildung 3.6: Assoziation von VatA und Neutralrot mit dem FEP (216). (A, B) Die Assoziation von VatA mit *F.n.n. wt* (schwarz) und *ΔiglC* (weiß) wurde früh in der Infektion (10-60 mpi, (A)) und zu von 1 bis 48 hpi (B) mittels Fluoreszenz-Mikroskopie quantifiziert (A: n=3-5 ±SEM, B: n=3 ±SEM). (C) zeigt repräsentative Fluoreszenzaufnahmen mit VatA-positiven (Pfeil) und VatA-negativen (Pfeilkopf) Bakterien zu den Zeitpunkten 1 und 6 hpi. (D) Die Assoziation von wt (schwarz) und *ΔiglC* (weiß) Bakterien mit dem pH-sensitiven Farbstoff Neutralrot wurde mittels konfokaler Fluoreszenz-Mikroskopie lebender Zellen quantifiziert (n=3 ±SEM). Maßstab: 2 µm. Der statistische Vergleich zweier Zeitpunkte erfolgte mittels t-Test. * p=0,05, ** p=0,01, *** p=0,001

Die alleinige Assoziation von VatA ist nur ein Anzeichen von Ansäuerung des Kompartiments, da die assoziierte V-ATPase auch inaktiv oder nicht komplett assembliert sein kann. Alternativ wurden mit *F.n.n. wt* und *ΔiglC* infizierte Zellen mit dem pH-sensitiven Farbstoff Neutralrot inkubiert und anschließend mittels Lebendzellmikroskopie beobachtet. Direkt nach der Aufnahme (30 mpi) befanden sich 60% der wt- und *ΔiglC*-Bakterien in einem Neutralrot-positiven Phagosom (Abb. 3.6 D). Beide Stämme verloren den Ansäuerungsmarker mit vergleichbarer Kinetik, *F.n.n. ΔiglC* schien der Ansäuerung sogar schneller zu entkommen. Im Kontrast zur VatA-Assoziation zeigte Neutralrot keine erneute Ansäuerung von *ΔiglC* Bakterien nach 2 hpi.

3.4.2.3 *F.n.n.* $\Delta igIC$ wird abgebaut und exozytiert

Die phagosomale Reifung in *Dictyostelium* endet mit der Exozytose des aufgenommenen Partikels oder Bakteriums (Gotthardt 2002). Dabei wird Exozytose von einer impulsartigen Assoziation F-Aktins um den Partikel begleitet (Clarke 2010). Aufgrund dessen wurden *Dictyostelium*-Zellen, welche einen rot fluoreszierenden Aktin-Marker (lifeact-RFP) exprimieren, mit grün fluoreszierenden *F.n.n.* wt bzw. $\Delta igIC$ infiziert. Mittels Lebendzellmikroskopie wurde das Schicksal der Bakterien innerhalb der Zelle über mehrere Stunden verfolgt.

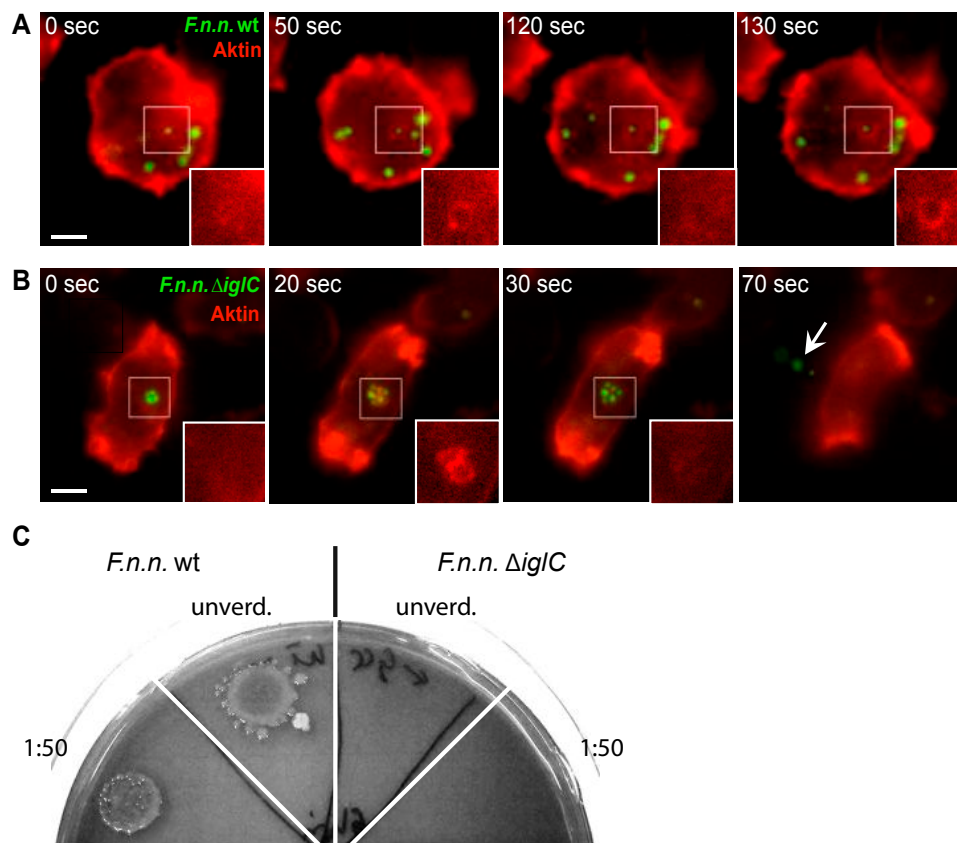


Abbildung 3.7: Abbau und Exozytose von *F.n.n.* $\Delta igIC$ (216). (A, B) Lifeact-RFP exprimierende Zellen wurden mit *F.n.n.* wt (obere Reihe) und $\Delta igIC$ (untere Reihe) infiziert und die Assoziation von Bakterien und Aktin ab 19 hpi (wt) (A) und 2 hpi ($\Delta igIC$) (B) mittels Lebendzellmikroskopie beobachtet. Gezeigt werden ausgewählte Einzelbilder. Der Region der *F.n.n.*/Aktin-Interaktion wurde markiert (weißes Quadrat) und vergrößert am rechten, unteren Bildrand dargestellt. Pfeil: exozytierte *F.n.n.* (C) Der Überstand von *F.n.n.* wt oder $\Delta igIC$ infizierten *Dictyostelium*-Zellen wurde nach 3, 6 und 24 hpi abgenommen und 10 μ l unverdünnt oder 1:50 auf eine Chocolate-Agar-Platte aufgetragen. Dargestellt ist eine repräsentative Aufnahme zum Zeitpunkt 6 hpi.

19 hpi wurde *F.n.n.* wt gleichmäßig verteilt in der Zelle beobachtet und zeigte nur vereinzelt eine transiente Assoziation mit F- Aktin (Abb. 3.7 A). Demgegenüber wurden $\Delta ig/C$ Bakterien zwischen 2-4 hpi oft als Cluster in einem Kompartiment gefunden und häufig exozytiert, begleitet von einem starken F-Aktinstoß an der Austrittsstelle. In diesem Zeitraum zeigten wt Bakterien nur vereinzelt ähnliche Cluster und Exozytoseprozesse.

Um zu überprüfen, ob exozytierte Bakterien die phagosomale Reifung überleben, wurde der Zellüberstand nach 3, 6 und 24 hpi unverdünnt und 1:50 verdünnt auf Chocolate-Agar-Platten (+15 µg/ml Kanamycin) inkubiert und auf *F.n.n.*-Wachstum überprüft (Abb 3.7 C). Zwei unabhängige Experimente zeigten, dass die exozytierten wt-Bakterien diesen Vorgang überlebten und zu allen Zeitpunkten Kolonien bildeten, während exozytierte *F.n.n.* $\Delta ig/C$ nicht anwachsen konnte. Zusammengefasst zeigen diese Beobachtungen, dass *F.n.n.* der phagosomalen Reifung entkommt, welche in Abwesenheit von IgIC zur Abtötung und Exozytose der Bakterien führt.

3.4.3 Die cytosolische Translokation ist abhängig von IgIC

Ein Schlüsselattribut der Virulenz von *Francisella* ist der IgIC-abhängige Ausbruch aus dem degradativen Phagosom ins Cytosol der Wirtszelle (221). Um die subzelluläre Lokalisation von *F.n.n.* wt und $\Delta ig/C$ in *Dictyostelium* zu bestimmen, wurde eine elektronenmikroskopische Analyse der Ultrastruktur an den Zeitpunkten 1, 4 und 24 hpi durchgeführt. Mit *F.n.n.* wt und $\Delta ig/C$ infizierte *Dictyostelium*-Zellen wurden unter Hochdruck kryofixiert und mittels Gefriersubstitution aufgearbeitet, um die Ultrastruktur bestmöglich zu präservieren.

Die Aufnahmen in Abb. 3.8 A, B zeigen, dass *F.n.n.* wt nach 1 hpi in Vakuolen mit klar definierter Membran lokalisiert. Nach 4 und 24 hpi waren die meisten wt-Bakterien ohne umgebende Membran im Cytosol zu finden (Abb. 3.8 C, D). Cytosolische Bakterien zeigten eine helle Aura, die aus schwach kontrastiertem Material zu bestehen schien und möglicherweise die Kapsel des Bakteriums darstellt. Nach 24 hpi waren wt-Bakterien im Cytosol zusätzlich von hellen, granulären Strukturen ohne Membran umgeben, welche in der gesamten Zelle verteilt waren. Dabei könnte es sich um den ubiquitär vorkommenden Glukose-Speicherstoff Glykogen handeln. Der Wechsel von *F.n.n.* wt ins Cytosol wurde nicht quantifiziert,

aber der subjektive Eindruck war, dass er deutlich mit dem Aufenthalt der Bakterien in p80-positiven Kompartimenten korrelierte.

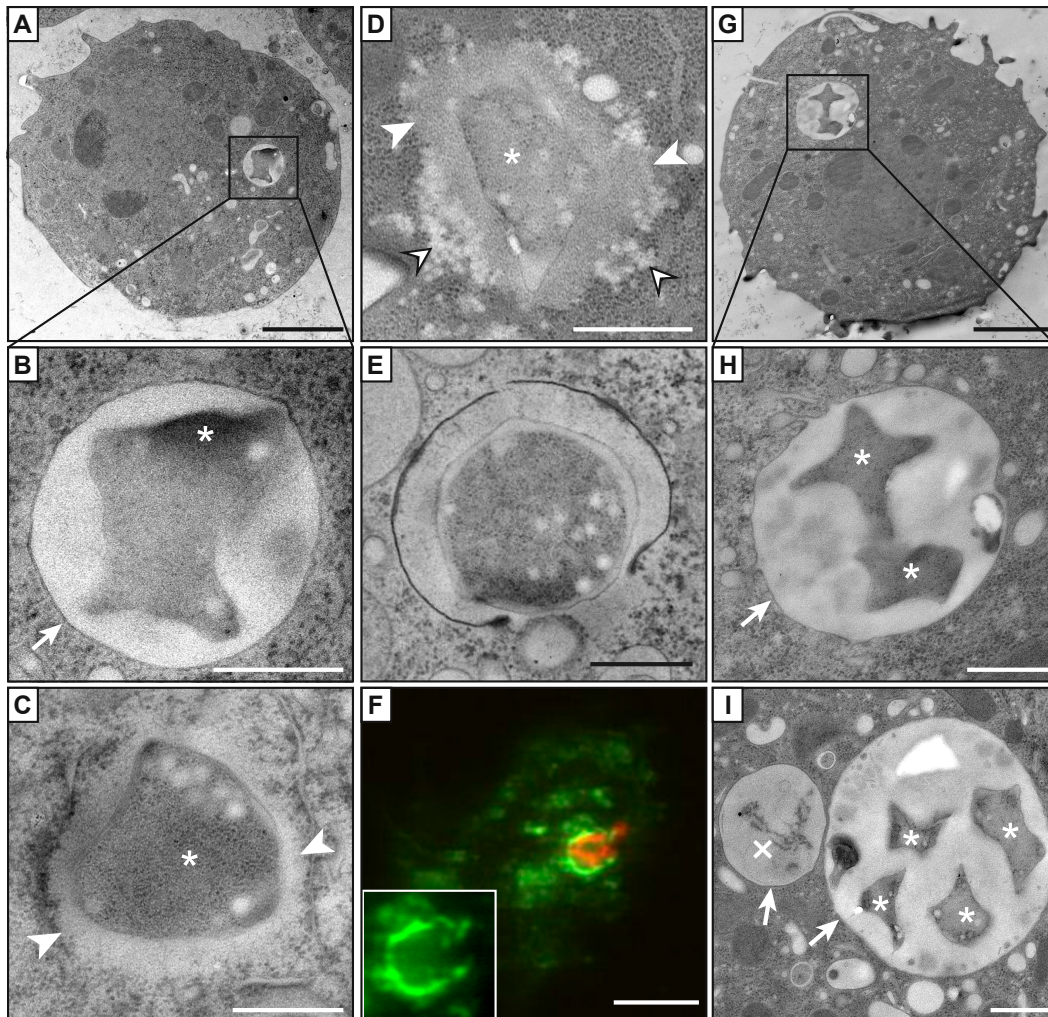


Abbildung 3.8: Cytosolische Translokation von *F.n.n.* (216). Um die intrazelluläre Lokalisation von *F.n.n.* zu bestimmen, wurden infizierte Zellen mittels HPF fixiert und am TEM untersucht. **(A-D)** zeigen repräsentative Aufnahmen von Zellen infiziert mit *F.n.n.* wt zu den Zeitpunkten 1 (A, B), 4 (C) und 24 (D) hpi. **(E, F)** Der Aufenthalt von *F.n.n.* wt in rupturierenden Kompartimenten konnte mittels HPF-TEM (E) und Immunfluoreszenz-Färbung (F) dargestellt werden. **(G-I)** Repräsentative TEM-Aufnahmen von Zellen infiziert mit *F.n.n.* \DeltaiglC nach 1 (G, H) und 4 (I) hpi. Stern: intaktes Bakterium, Kreuz: verdautes Bakterium, Pfeil: *F.n.n.*-umschließende Membran, weißer Pfeilkopf: elektronenhelle Region cytosolischer *F.n.n.*, umrandeter Pfeilkopf: Glykogen-ähnliche Granula. Maßstäbe: 2 μ m (A, G), 500 nm (B-E, H, I), 5 μ m (F).

F.n.n. wt-Bakterien konnten sowohl mittels TEM als auch Fluoreszenz-Mikroskopie innerhalb von rupturierenden Kompartimenten beobachtet werden (Abb. 3.8 E, F). Im Gegensatz zum wt wurde *F.n.n.* \DeltaiglC ausschließlich in unbeschädigten Vakuolen beobachtet (Abb. 3.8 G-I), entweder einzeln oder als akkumulierte oder verdaute

Bakterien. Diese Ergebnisse zeigen, dass *F.n.n.* abhängig von IgIC aus dem Phagosom ins Cytosol entkommt und rekapituliert damit das Makrophagenmodell. Zudem wurde im Cytosol eine potentielle bakterielle Kapsel beobachtet, die im nächsten Abschnitt näher charakterisiert werden sollte.

3.4.4 Lektine binden nicht an die potentielle Kapselregion

In elektronenmikroskopischen Analysen von intrazellulären *F. tularensis* wurde eine Kapselregion beschrieben, die aus Polysacchariden besteht und zur Virulenz des Bakteriums beiträgt (227-229). Um die elektronenhelle Region um cytosolische *F.n.n.* als Kapsel zu identifizieren, wurde eine alternative Probenprozessierung verwendet und infizierte Zellen chemisch fixiert und mittels Ethanol dehydriert. Zudem wurde überprüft, ob mit Gold-gekoppelte Lektine gegen häufige Kohlenhydrate bakterieller Kapseln an diese Region binden.

Die elektronenmikroskopische Analyse chemisch fixierter Proben zeigt helle Bereiche sowohl um phagosomale als auch cytosolische wt-Bakterien (Abb. 3.9 A, B). Diese Areale scheinen jedoch nicht kontrastarmes Material, wie in Abb. 3.8 C, D, zu enthalten. Stattdessen ähneln sie dem Epoxidharz außerhalb der Zelle und beinhalten wahrscheinlich kein zelluläres Material. Dies deutet darauf hin, dass wasserlösliches Material, z.B. Polysaccharide, durch die Ethanol-Dehydrierung bei Raumtemperatur aus der Probe gelöst wurden.

Spezifische Lektine für Mannose (RCL1), Galaktose (ECL/MPL), Glukose (ConA), N-Acetylgalaktosamine (ECL/MPL), N-Acetylglukosamine (WGA/MAL1) und Sialinsäure (WGA/MAL1) enthaltende Kohlenhydrate banden nicht an die Kapselregion (Abb. 3.9 C-H). WGA und ConA markierten, wie von Ryter *et al.* beschrieben, die Phagosomen von *Dictyostelium*, jedoch nicht spezifisch das Bakterium (230). Schlussendlich lassen die Ultrastrukturanalysen eine bakterielle Kapsel um phagosomale und cytosolische *F.n.n.* vermuten, jedoch konnten kapsuläre Kohlenhydrate nicht mittels Lektinen nachgewiesen werden.

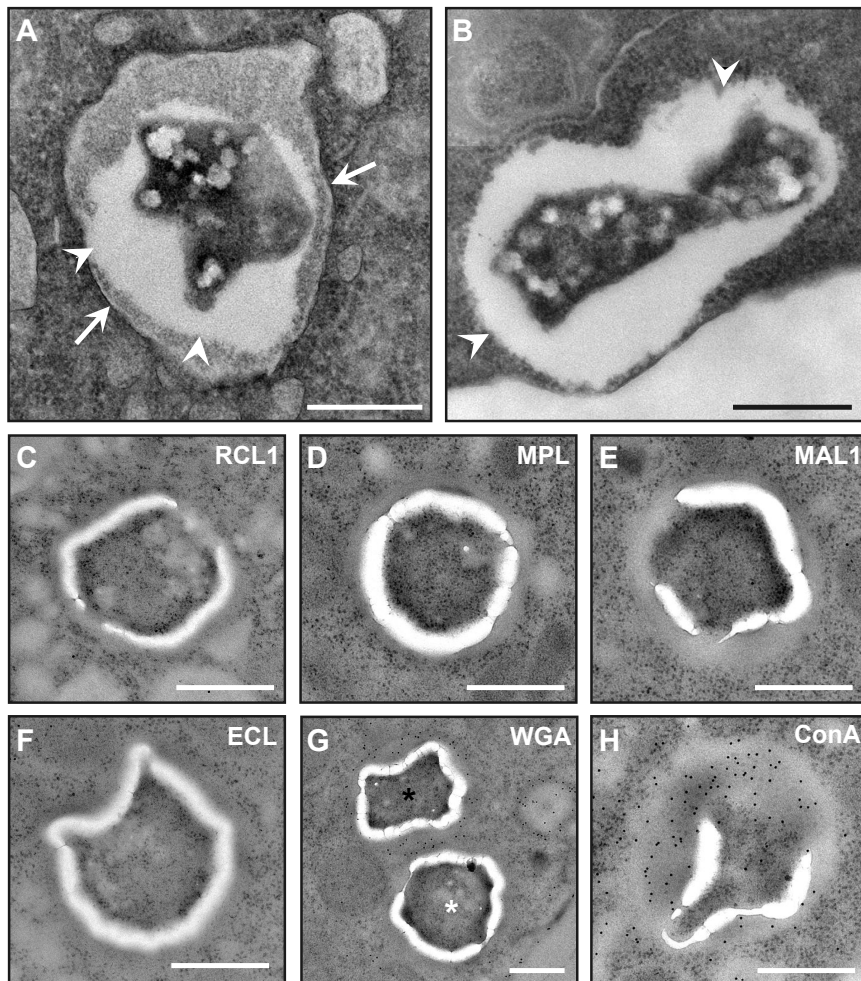


Abbildung 3.9: Charakterisierung der Kapselregion um *F.n.n.* (216). (A, B) Mit *F.n.n.* wt infizierte Zellen wurden 1 (A) und 4 (B) hpi mit PFA/GA chemisch fixiert und am TEM analysiert. Pfeile zeigen die phagosomale Membran und Pfeilköpfe die elektronenhellen Areale um phagosomale und cytosolische *F.n.n.* (C-H) Ultradünnschnitte von *F.n.n.* wt infizierten Zellen wurden mit folgenden biotinylierten Lektinen gefärbt: *Ricinus communis* Agglutinin 1 (RCL1) (C), *Maclura pomifera* Lektin (MPL) (D), *Maackia amurensis* Lektin 1 (MAL1) (E), *Erythrina cristagalli* Lektin (ECL) (F), *wheat germ* Agglutinin (WGA) (G), Concanavalin A (ConA) (H). Goldpartikel zeigen die Phagosomen-spezifische Bindung von WGA und ConA an. Schwarzer Stern: *F.n.n.* im Phagosom, weißer Stern: *F.n.n.* im Cytosol.

3.4.5 Ektopische IgIC-Expression komplementiert nicht den attenuierten Phänotyp von *F.n.n.* Δ igIC

Dictyostelium wurde in früheren Studien erfolgreich verwendet, um die Funktion von bakteriellen Virulenzfaktoren durch deren ektopische Expression in der Wirtszelle näher zu charakterisieren (231, 232). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die ektopische Expression von IgIC in *Dictyostelium* den attenuierten Phänotyp von *F.n.n.* Δ igIC trans-komplementieren kann.

Für die Expression des Virulenzfaktors IgIC in *Dictyostelium* wurde das entsprechende Gen in den extrachromosomalen Expressionsvektor pDM314 mit N-terminalem GST-Marker kloniert. Die erfolgreiche Transformation von *Dictyostelium* wurde durch die Antikörperfärbung von GST im Western-Blot nachgewiesen (Abb. 3.10 A). Aufgereinigtes GST (26 kDa) wurde als Positivkontrolle verwendet. Sowohl *Dictyostelium*-Klone (KI.1, KI.2) als auch eine gemischte Zellpopulation (Mix) unterschieden sich nicht deutlich im Expressionslevel des IgIC-GST-Fusionsproteins (49 kDa). Für weitere Experimente wurde Klon 1 der IgIC-GST exprimierenden Zellen verwendet.

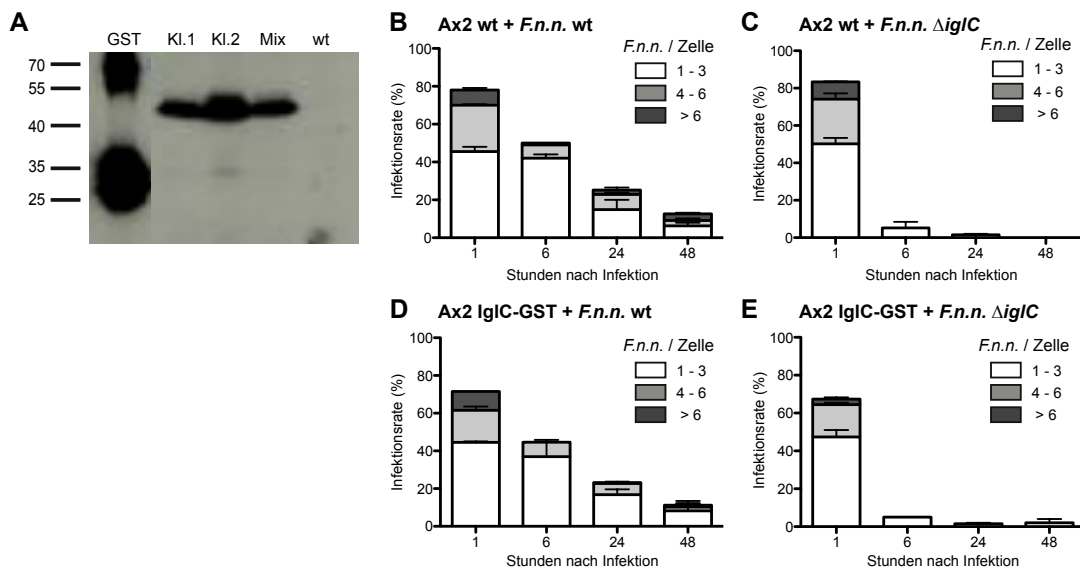


Abbildung 3.10: *F.n.n.*-Infektionsverlauf bei ektopischer Expression von IgIC in *Dictyostelium*. (A) Western-Blot-Analyse der IgIC-GST-Expression in transformierten *Dictyostelium*-Klonen (KI.1, KI.2) und einer gemischten Transformantenkultur (Mix). Aufgereinigtes GST wurde als Positiv- und Ax2 wt-Zellen als Negativkontrolle verwendet. (B-E) Ax2 wt bzw. IgIC-GST exprimierende Zellen wurden mit *F.n.n.* wt (B, D) und Δ igIC (C, E) infiziert und die Bakterienlast fixierter Zellen per Fluoreszenz-Mikroskopie quantifiziert. Weiß: 1-3, hellgrau: 4-6, dunkelgrau: >6 *F.n.n.*/Zelle.

Wt und IgIC-GST exprimierende *Dictyostelium*-Zellen wurden mit *F.n.n.* wt und Δ igIC infiziert und die Anzahl von Bakterien/Zelle mittels Fluoreszenz-Mikroskopie bestimmt. In *Dictyostelium* wt-Zellen wiesen *F.n.n.* wt und Δ igIC die bekannten Infektionsraten auf (Abb. 3.10 B, C). In *Dictyostelium* IgIC-GST war keine Änderung der Bakterienlast weder von wt- noch von Δ igIC-Bakterien im Vergleich zu Ax2 wt-Zellen zu beobachten (Abb. 3.10 D, E). Die ektopische Expression von IgIC im Cytosol komplementiert damit weder den Δ igIC-Phänotyp noch verstärkt sie das Wachstum von wt-Bakterien durch die zusätzliche Menge des Virulenzfaktors. Dies

deutet auf eine lokale Funktion von IgIC im Phagosom hin und nicht auf eine generelle Rolle als Wachstumsfaktor im Cytosol.

3.5 Die Interaktion von *F.n.n.* mit der Autophagie-Maschinerie

Pathogene Bakterien, die sich im Cytosol aufhalten, müssen sich mit dem autophagosomalen System ihrer Wirtszelle auseinandersetzen. Die Autophagie kann *F. tularensis* abhängig vom Modellsystem degradieren oder als Nährstoffquelle zum Wachstum der Bakterien beitragen (70-72). Die Komponenten der klassischen Makroautophagie sind in *Dictyostelium* stark konserviert und wurden bereits in der Infektion mit *Salmonella* und *Legionella* näher charakterisiert (175, 187). Um bisherige Konzepte zu komplementieren, sollte in diesem Abschnitt die Rolle der Autophagie im *Dictyostelium/F.n.n.*-System untersucht und mit dem Makrophagen-Modell verglichen werden.

3.5.1 *F.n.n.* assoziiert mit autophagosomalen Markern

Pathogene Bakterien werden u.a. von Ubiquitin und dem Adapterprotein SQSTM1 für die Degradation in Atg8-positiven Autophagosomen markiert (176). Um die Assoziation von *F.n.n.* mit diesen Markern zu untersuchen, wurden *Dictyostelium*-Zelllinien, welche eines der folgenden GFP markierten Proteine exprimieren, mit *F.n.n.* wt mCherry infiziert: Ubiquitin, welches Substrate im Cytosol für den autophagosomalen Abbau markiert, SQSTM1, ein Ubiquitin-bindendes Adapterprotein und Atg8, das für die Formung von autophagosomalen Membranen benötigt wird. Die Assoziation der Bakterien mit den entsprechenden Markern wurde mittels Lebendzellmikroskopie quantifiziert (Abb 3.11 A-D).

Während der frühen Phase der Infektion (1-6 hpi) blieb der Anteil von *F.n.n.*, die mit den Markerproteinen assoziiert waren, unter 3%. In der späten Phase (24 hpi) stieg der Anteil Ubiquitin- und SQSTM1-assoziiierter Bakterien auf 5 bzw. 9% an. Dagegen blieb die Assoziation mit Atg8 auf einem niedrigen und konstanten Level von 1-2% während der gesamten Infektion.

Ultradünnschnitte von infizierten Zellen nach 1 hpi zeigten Bakterien mit der Cytosol-spezifischen Kapselregion, die von einer Membran umschlossen waren (Abb. 3.11 E). Die im Kompartiment enthaltenen ribosomalen Strukturen lassen vermuten, dass es sich um ein Autophagosom handelt. Es ist keine für Autophagosomen

charakteristische Doppelmembran zu erkennen, jedoch ist diese bei kryofixierten Proben häufig nicht zu sehen. Zudem kann eine phagosomale Membran ausgeschlossen werden, da ConA, spezifisch für phagosomale Membranen, nicht an diese Struktur binden konnte (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen eine Markierung von *F.n.n.* mit Ubiquitin und SQSTM1 für die Degradation in Autophagosome. Der überwiegende Teil der Bakterien wird in der späten Phase ab 24 hpi, dem Zeitpunkt der bakteriellen Replikation im Cytosol, von den degradativen Markern gebunden. Jedoch scheint nur ein geringer Anteil SQSTM1-positiver *F.n.n.* in Autophagosomen zu enden.

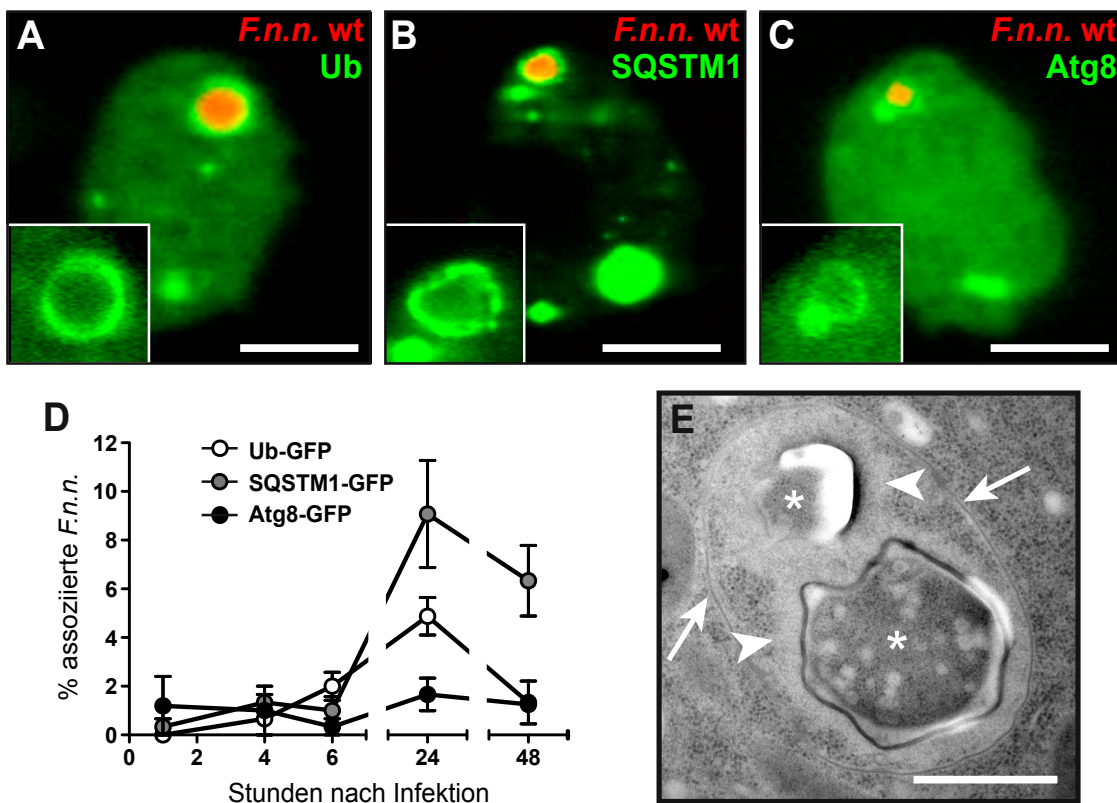


Abbildung 3.11: Assoziation von *F.n.n.* mit autophagosomalen Markern (216). (A-D) *Dictyostelium*-Zellen, welche mit GFP fusionierte Marker der Autophagie-Maschinerie exprimierten, wurden mit *F.n.n.* wt mCherry infiziert. Dargestellt sind repräsentative Mikrographen von positiven Assoziationen von *F.n.n.* mit Ubiquitin (A), SQSTM1 (B) und Atg8 (C) zum Zeitpunkt 24 hpi sowie deren Quantifizierung mittels Lebendzellmikroskopie von 1-48 hpi (D). (E) TEM-Aufnahme nach HPF zeigt ehemals cytosolische *F.n.n.* wt (1 hpi) umschlossen von einer Membran zusammen mit ribosomalen Strukturen. Pfeilkopf: elektronenhelle Region cytosolischer *F.n.n.*, Pfeil: Autophagosomen-ähnliche Membran. Maßstäbe: 5 μ m (A-C), 500 nm (E).

3.5.2 *F.n.n.* induziert die Transkription von *atg8*, aber nicht *sqstm1*

Für *F. tularensis* wurde in Makrophagen sowohl eine Herabregulation mehrerer Autophagie-Gene (69, 233) als auch eine Induktion auf Proteinebene beobachtet (234). Die Datenlage ist jedoch dürftig und deckt nur einzelne Zeitpunkte ab. Um zu untersuchen, welchen Einfluss *F.n.n.* auf die Autophagie in *Dictyostelium* hat, wurde die relative mRNA Menge von *atg8* und *sqstm1* zu verschiedenen Zeitpunkten im Infektionsverlauf mittels RT-PCR gemessen. Verglichen wurde die mRNA-Menge zu einer nicht-infizierten Mock-Kontrolle.

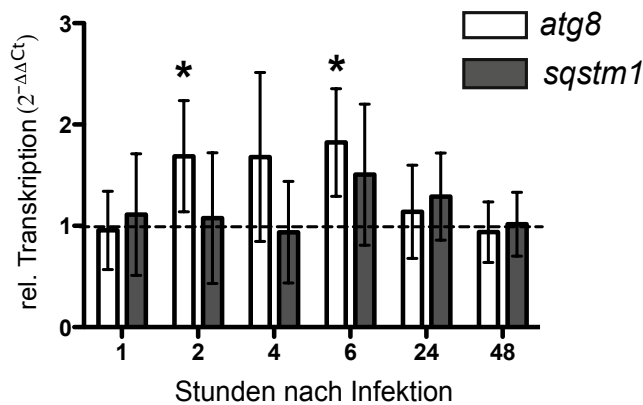


Abbildung 3.12: Relative mRNA-Level von *atg8* und *sqstm1* im Infektionsverlauf (216). Die relative Menge von RNA autophagosomaler Gene (*sqstm1*, *atg8*) wurde mittels RT-PCR gemessen. Dafür wurden Ax2 wt-Zellen mit *F.n.n.* wt infiziert und RNA zu den gegebenen Zeitpunkten isoliert. Dargestellt ist die relative Veränderung der mRNA-Menge in infizierten Zellen im Vergleich zur Mock-Kontrolle (nicht-infiziert, gestrichelte Linie) von 5 unabhängigen Experimenten \pm SD.

In der frühen Infektionsphase zeigten infizierte Zellen leicht erhöhte mRNA-Mengen (1,5-2-fach) von *atg8* im Vergleich zur Mock-Kontrolle (Abb. 3.12). In der späten Phase fielen die *atg8* mRNA-Level auf das Niveau nicht-infizierter Zellen zurück. Die Menge von *sqstm1* mRNA war zu den Zeitpunkten 6 und 24 hpi leicht erhöht, aber nicht signifikant. Erhöhte mRNA-Level von *atg8* lassen auf eine gesteigerte Genexpression und damit Aktivierung der Autophagie in der frühen Infektionsphase schließen.

3.5.3 Erhöhte Replikation von *F.n.n.* in Abwesenheit von Autophagie

Um die Funktion der Autophagie im *Dictyostelium/F.n.n.*-System zu untersuchen, wurde eine Atg1-Deletionsmutante (*Ax2 Δatg1*) verwendet. Atg1 (Ulk1/2) ist eine Schlüsselkomponente des Initiationskomplexes der kanonischen Autophagie-Maschinerie, die in der Atg1-Deletionsmutante stark beeinträchtigt ist (235). *Ax2 wt* und $\Delta atg1$ -Zellen wurden mit *F.n.n.* wt infiziert und die Bakterienlast über 48 h mittels Mikroskopie und Durchflusszytometrie bestimmt.

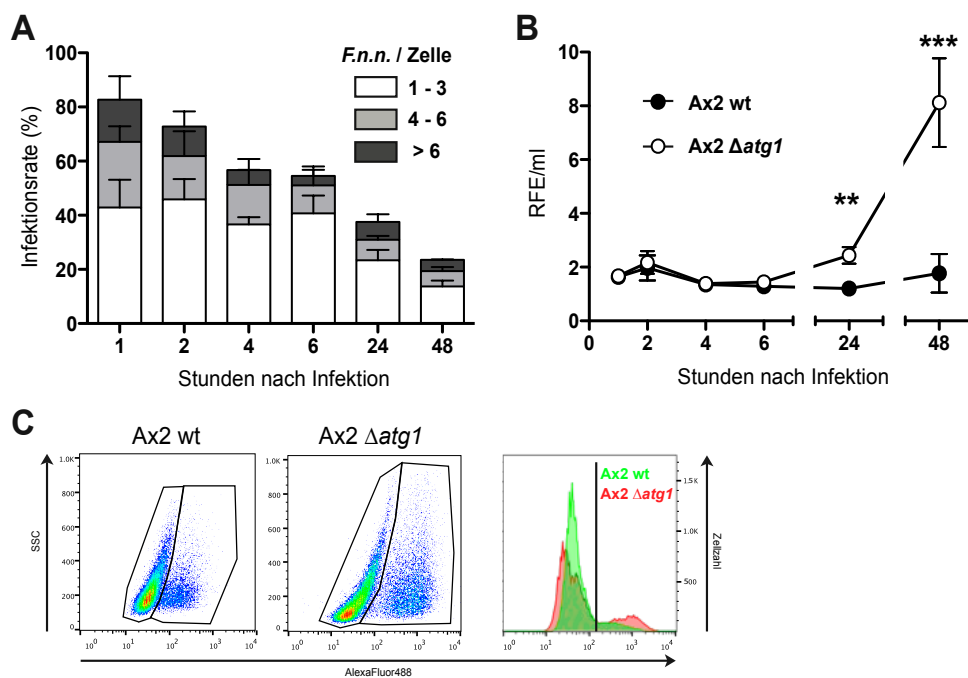


Abbildung 3.13: Infektionsverlauf von *F.n.n.* in *Ax2 Δatg1*-Zellen (216). (A, B) *Ax2 wt*- und $\Delta atg1$ -Zellen wurden mit *F.n.n.* wt infiziert und die intrazelluläre Bakterienlast mittels Fluoreszenz-Mikroskopie (n=3 \pm SEM) (A) und Durchflusszytometrie (n=6-13 \pm SEM) (B) bestimmt. (C) Repräsentative Dotplots zeigen einen Vergleich der grünen Fluoreszenzintensität infizierter *w.t.* und $\Delta atg1$ -Zellen bei 48 hpi sowie deren überdeckte Histogramme (*w.t.*: grün, $\Delta atg1$: rot). Der statistische Vergleich von zwei Zeitpunkten wurde mit dem t-Test durchgeführt: ** p=0,01, ***p=0,001

Die Zählung von Bakterien/Zelle mittels Fluoreszenz-Mikroskop zeigte, dass *Ax2 Δatg1*-Zellen nach 1 hpi mit 82,7% eine ähnliche Infektionsrate wie *Ax2 wt*-Zellen (86%, vgl. Abb. 3.3 C) besitzen (Abb. 3.13 A). Die graduelle Abnahme der Infektionsraten bis 6 hpi unterschied sich nicht signifikant zwischen beiden Zelllinien (*w.t.*: 47,2% \pm 5,8%, $\Delta atg1$: 54,6% \pm 14,8%). In der späten Infektionsphase zeigten $\Delta atg1$ -Zellen im Vergleich zum *w.t.* jedoch höhere Infektionsraten (24 hpi: 37,6%

$\pm 7,9\%$ vs. $24\% \pm 3,9\%$ ($p=0,12$); 48 hpi: $23,5\% \pm 1,7\%$ vs. $11,7\% \pm 2,1\%$ ($p=0,005$)) und Anteil von Zellen mit > 3 *F.n.n.*/Zelle (24 hpi: $37,5\%$ vs. 32% , 48 hpi: $41,6\%$ vs. 37%). Die durchflusszytometrische Analyse des Infektionsverlaufs ließ ein höheres *F.n.n.*-Wachstum in $\Delta atg1$ -Zellen als im wt ab 24 hpi erkennen (Abb. 3.13 B). Dies war neben höheren Infektionsraten auch durch eine erhöhte grüne Fluoreszenz infizierter $\Delta atg1$ -Zellen, also mehr *F.n.n.*/Zelle, bedingt (Abb. 3.13 C). Die stärkere Replikation von *F.n.n.* in Abwesenheit der Autophagie lässt somit vermuten, dass es sich in *Dictyostelium* bei der Autophagie um einen Abwehrmechanismus gegen *F.n.n.* handelt

3.5.4 Erhöhte Replikation in $\Delta atg1$ -Zellen durch fehlende cytosolische Degradation

Es wird diskutiert, ob Autophagie auch Auswirkungen auf die phagosomale Reifung besitzt (236, 237). Um eine veränderte Phagosomenreifung in $\Delta atg1$ -Zellen als Grund für das erhöhte *F.n.n.*-Wachstum auszuschließen, wurde die Assoziation von *F.n.n.* mit p80, VatA und Ubiquitin zwischen wt und $\Delta atg1$ -Zellen verglichen. Dafür wurden infizierte Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten fixiert und nach der entsprechenden Immunfluoreszenzfärbung am Fluoreszenz-Mikroskop analysiert.

In beiden Zelllinien zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Assoziation von *F.n.n.* mit p80 und VatA (Abb. 3.14 A, B). Ein erhöhtes bakterielles Wachstum in $\Delta atg1$ -Zellen durch eine höhere Ausbruchrate oder geringere Ansäuerung des Phagosoms ist damit unwahrscheinlich. Stattdessen stieg in $\Delta atg1$ -Zellen die Assoziationsrate von *F.n.n.* mit Ubiquitin progressive von 3% (6 hpi) auf 27% (24 hpi) und schließlich 51% (48 hpi) an, während sie in wt-Zellen konstant unter 3% lag (Abb. 3.14 C). Zudem sammelten sich Bakterien in $\Delta atg1$ -Zellen oft innerhalb von Ubiquitinaggregaten (Abb. 3.14 D). Diese Ergebnisse zeigen, dass nicht die frühe phagosomale Phase für das verstärkte *F.n.n.*-Wachstum in $\Delta atg1$ -Zellen verantwortlich ist, sondern die fehlende Degradation von ubiquitinierten Bakterien im Cytosol.

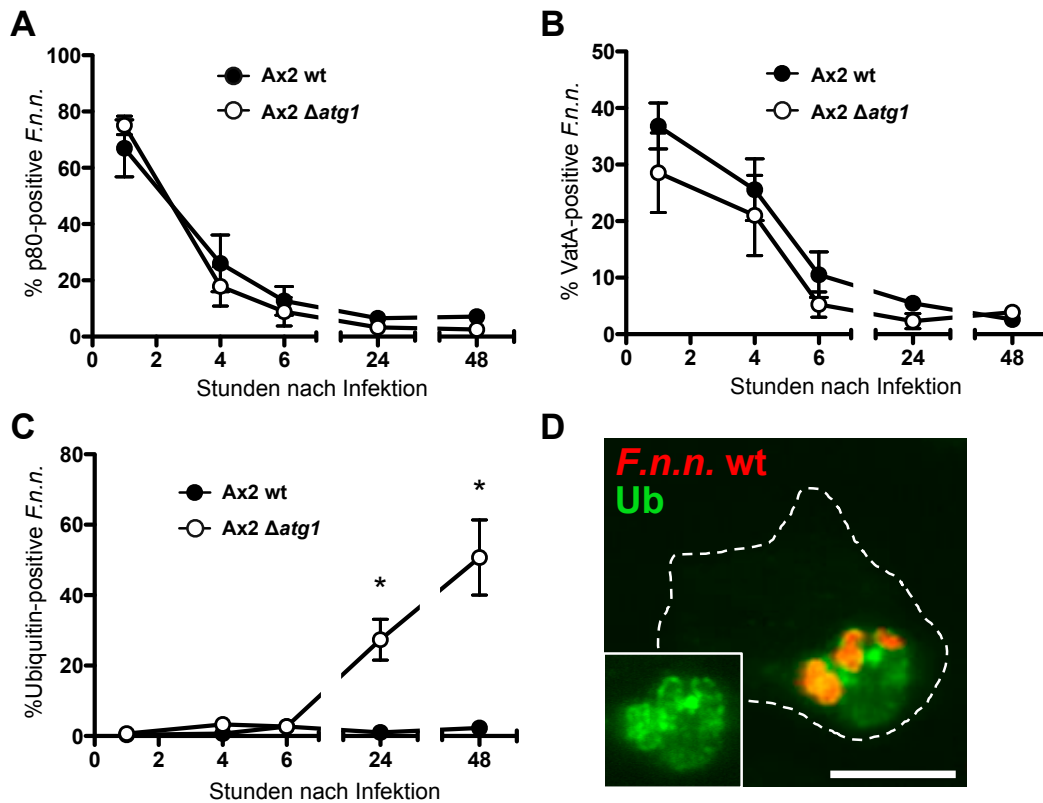


Abbildung 3.14: Phagosomale Reifung und Ubiquitinierung von *F.n.n.* in *Ax2 $\Delta atg1$* -Zellen (216). (A-C) Die Assoziation von p80 (A), VatA (B) und Ubiquitin (C) mit *F.n.n. wt* wurde in infizierten *Ax2 wt*- und $\Delta atg1$ -Zellen per Immunfluoreszenzfärbung quantifiziert und miteinander verglichen ($n=3-4 \pm SEM$). (D) Repräsentativer Mikrograph von ubiquitinierten, aggregierten Bakterien. Maßstab: 5 μm . Die statistische Analyse wurde mit dem t-Test durchgeführt: * $p=0,05$

3.6 Der Einfluss von Nramp1 und NrampB im *Dictyostelium/F.n.n.*-Infektionsmodell

Eisen ist ein wichtiger Cofaktor für enzymatische Prozesse sowohl für pathogene Bakterien als auch für Wirtszellen. Die Nramp-Familie transportiert Metallionen (vor allem Fe^{2+} und Mn^{2+}) und ist weit verbreitet und konserviert von Bakterien bis zum Menschen (189). Nramp1 trägt im Phagosom von Makrophagen durch die Regulierung der Eisenhomeostase zur Resistenz gegen intrazelluläre Pathogene bei (194-196). Das *Dictyostelium*-Genom verfügt über zwei Nramp-Transporter: Nramp1, ein Ortholog des Nramp1 von Säugern, welches Fe^{2+} und Mn^{2+} vom Phagosom ins Cytosol transportiert, sowie NrampB, das bakteriellen Mangantransportern (MntH) ähnelt, Fe^{2+} transportiert und ausschließlich in der kontraktiven Vakuole lokalisiert ist (156, 209).

Da zur Bedeutung von Nramp1 und der Eisenhomeostase während der Infektion mit *Francisella* wenig bekannt ist (206, 207), sollte die Rolle von Nramp1 und NrampB im *Dictyostelium/F.n.n.*-System untersucht werden. Dafür wurden zum einen die Lokalisation und Transkription der Eisentransporter während der Infektion analysiert. Zudem wurde der Infektionsverlauf und Austritt aus dem Phagosom in den Einzel-Deletionsmutanten von Nramp1 und NrampB sowie der Doppel-Deletionsmutante untersucht. Schließlich wurde die transkriptionelle Antwort von *F.n.n.*-Genen der Eisenakquisition auf die gestörte Eisenhomeostase in den Nramp-Mutanten mit der wt-Situation verglichen

3.6.1 *F.n.n.* lokalisiert transient in Nramp1-positiven Kompartimenten

Um die Lokalisation der Transmembranproteine Nramp1 und NrampB während der Infektion zu bestimmen, wurden *Dictyostelium*-Zellen, die GFP-Fusionsproteine von Nramp1 und NrampB exprimieren, mit mCherry exprimierenden *F.n.n.* wt und $\Delta igIC$ -Bakterien infiziert. Die Assoziation von Nramp-Transportern und Bakterium wurde mittels Lebenszellmikroskopie in der frühen Phase der Infektion (0,5-6 hpi) bestimmt.

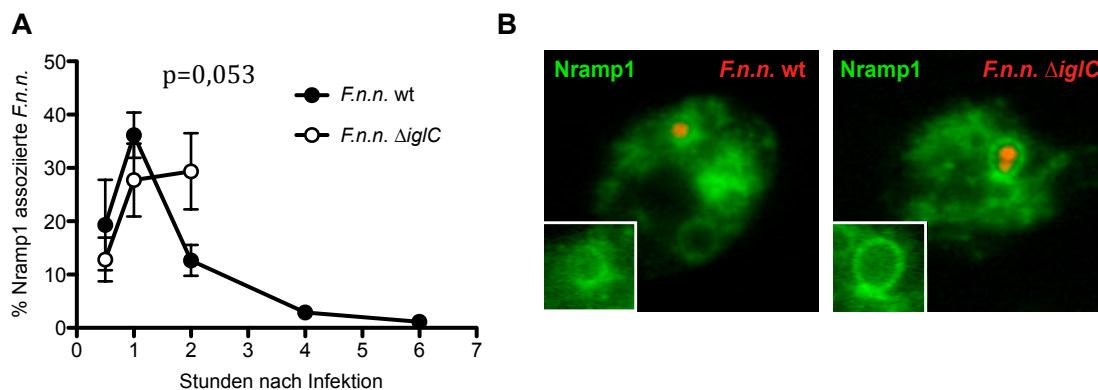


Abbildung 3.15: Assoziation von *F.n.n.* wt und $\Delta igIC$ mit Nramp1-GFP. (A) Quantifizierung der Lokalisation von Nramp1-GFP am Phagosom von *F.n.n.* wt und $\Delta igIC$ ($n=3 \pm SEM$). **(B)** Repräsentative Mikrographen von Nramp1-positiven Bakterien bei 1 hpi mit Vergrößerungen des Nramp1-positiven Phagosoms im grünen Kanal. Statistik: t-Test

F.n.n. wt und $\Delta igIC$ zeigten einen vergleichbaren Anteil Nramp1-positiver Bakterien, welcher von 19% bzw. 13% (30 mpi) auf 36% bzw. 28% (1 hpi) anstieg (Abb. 3.15 A, B). *F.n.n.* wt entkam dem Nramp-positiven Kompartiment nach 2 hpi, während die Nramp1-Assoziation der avirulente Mutante konstant blieb bis nicht mehr genug

Bakterien für eine Quantifizierung vorhanden waren. Demgegenüber wurde keine Assoziation von *F.n.n.* mit NrampB-GFP beobachtet (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen, dass *F.n.n.* den Abtransport von Nramp1 in Abhängigkeit von IgIC bewirkt.

3.6.2 Frühe Herabregulation der Transkription von *nramp1* und *nrampB*

Um zu testen, ob die Transkription von *nramp1* und *nrampB* durch *F.n.n.* beeinflusst wird, wurden Ax2 wt-Zellen mit *F.n.n.* wt infiziert. In der frühen Infektionsphase (0,5 und 3 hpi) wurde die RNA infizierter Zellen isoliert und die relative mRNA-Menge der *nramp*-Gene mittels RT-PCR bestimmt. Als Phagozytosekontrolle (PK) wurden 1 µm große Latexkügelchen und als Mock-Kontrolle nicht-infizierte Ax2 wt-Zellen verwendet.

Die Messungen zeigen eine Herabregulation der mRNA-Level von *nramp1* durch *F.n.n.* im Vergleich zur Mock- (signifikant) und Phagozytosekontrolle (Trend) zu beiden Zeitpunkten (Abb. 3.16 A). Für *nrampB* wurden nur direkt nach der Aufnahme der Bakterien (0,5 hpi) erniedrigte mRNA-Level gemessen (Abb. 3.16 B). Diese Ergebnisse lassen eine Herabregulation der Transkription von *nramp1* und *nrampB* durch *F.n.n.* vermuten, jedoch sind die Unterschiede zu inerten Partikeln gering.

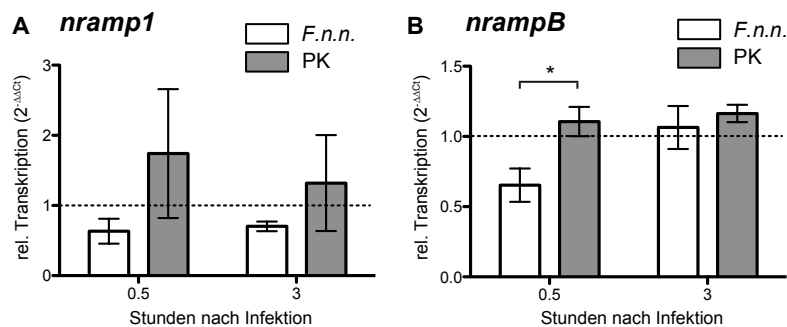


Abbildung 3.16: Relative mRNA-Mengen von *nramp1* und *nrampB* in der frühen Infektionsphase. (A, B) Dargestellt ist die relative mRNA-Menge von *nramp1* (A) und *nrampB* (B) von *F.n.n.* infizierten Zellen (weiß) und der Phagozytosekontrolle (PK, grau) zu den Zeitpunkten 0,5 und 3 hpi in Relation zur nicht-infizierten Mock-Kontrolle ($n=3 \pm SD$). Die statistische Analyse erfolgte mithilfe des t-Tests: * $p=0,05$.

3.6.3 Erhöhte Replikation von *F.n.n.* in Abwesenheit von Nramp-Transportern

Die Inaktivierung von Nramp1 in Makrophagen oder Mäusen führt zu einer höheren Suszeptibilität gegenüber Mykobakterien, Leishmanien und *Salmonella* (194-196). Studien in *Dictyostelium* offenbarten, dass die Deletion von *nramp1* und *nrampB* eine erhöhte Replikation von *Legionella* und, zumindest für *nramp1*, von *M. avium* zur Folge hat (156, 209). Die Einzel- und Doppeldelentionsmutanten von Nramp1 und NrampB wurden genutzt, um die Rolle der Nramp-Transporter in der *Francisella*-Infektion im *Dictyostelium*/*F.n.n.*-System zu untersuchen. Dafür wurden Ax2 wt-, $\Delta nramp1$ -, $\Delta nrampB$ - und $\Delta nramp1/B$ -Zellen mit *F.n.n.* wt infiziert und die Bakterienlast mittels Fluoreszenz-Mikroskopie und Durchflusszytometrie bestimmt.

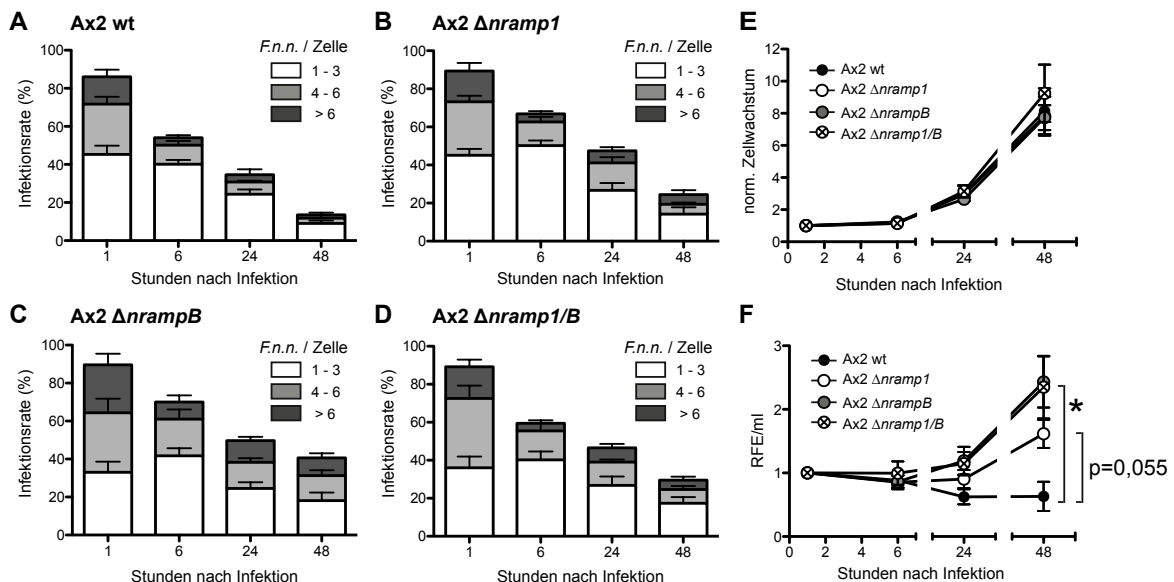


Abbildung 3.17: Infektionsverlauf von *F.n.n.* in Nramp-Deletionsmutanten. (A-D) Ax2 wt-Zellen und Nramp-Deletionsmutanten wurden mit *F.n.n.* wt infiziert und die Bakterienlast in wt (A), $\Delta nramp1$ (B), $\Delta nrampB$ (C) und $\Delta nramp1/B$ (D) zu den Zeitpunkten 1, 6, 24 und 48 hpi mittels Fluoreszenz-Mikroskopie bestimmt. Weiß: 1-3, hellgrau: 4-6, dunkelgrau: >6 *F.n.n.*/Zelle. **(E)** Normalisierte Wachstumsraten von adhärenierten wt-Zellen und Nramp-Mutanten über 48 hpi. **(F)** Die bakterielle Fluoreszenz in wt-Zellen und Deletionsmutanten wurde durchflusszytometrisch im Infektionsverlauf (1-48 hpi) gemessen. Der statistische Vergleich erfolgte mittels einfachem ANOVA mit anschließendem Bonferroni-Test: * $p=0,05$.

Abb. 3.17 A-D zeigen ähnliche Infektionsraten von wt-Zellen und Deletionsmutanten zum Zeitpunkt 1 hpi. Lediglich $\Delta nrampB$ -Zellen scheinen *F.n.n.* geringfügig besser aufgenommen zu haben. Die Zellgröße und damit Aufnahmeoberfläche von adhärenierten $\Delta nrampB$ -Zellen schien leicht erhöht zu sein, was vermutlich zur höheren Aufnahme der Bakterien geführt hat. Nach einer vergleichbaren Ausscheidung von

F.n.n. nach 6 hpi, zeigen die Deletionsmutanten im Vergleich zum wt erhöhte Infektionsraten in der späten Infektionsphase ab 24 hpi. Zum Zeitpunkt 48 hpi waren sowohl die Infektionsraten (wt: 13,6% \pm 3,8%, $\Delta nramp1$: 24,5% \pm 1,9%, $\Delta nrampB$: 40,7% \pm 7,8%, $\Delta nramp1/B$: 29,6% \pm 3,5%) als auch der Anteil von Zellen mit > 3 *F.n.n.*/Zelle (wt: 20,4% \pm 12,5%, $\Delta nramp1$: 44,7% \pm 11,6%, $\Delta nrampB$: 57,4% \pm 6,7%, $\Delta nramp1/B$: 41,3% \pm 9,9%) der Nramp-Mutanten im Vergleich zum wt erhöht.

Mit einem vergleichbaren Zellwachstum aller Zelllinien (Abb. 3.17 E) deuten diese Ergebnisse auf eine erhöhte *F.n.n.*-Replikation in den Nramp-Deletionsmutanten hin. Ein eventueller Exozytosedefekt der Mutanten ist höchstwahrscheinlich nicht für eine höhere Bakterienlast zum Anfang der Replikationsphase verantwortlich. Die Differenz von Infektionsraten und Zellen mit > 3 *F.n.n.*/Zelle unterschied sich zwischen 1 und 6 hpi nicht signifikant zwischen den Zelllinien, d.h. zwischen 1 und 6 hpi werden ähnlich viele Bakterien von allen Zelllinien exozytiert.

Die durchflusszytometrische Analyse des Infektionsverlaufs (Abb. 3.17 F) bestätigte die Auszählungen am Fluoreszenz-Mikroskop. Während *F.n.n.* in den wt-Zellen in diesen Experimenten eher persistierte, nahm die bakterielle Fluoreszenz in den Nramp-Mutanten deutlich zu. Zusammenfassend wurde durch zwei Methoden gezeigt, dass die Nramp-Transporter im *Dictyostelium/F.n.n.*-System zur Resistenz gegen *Francisella* beitragen.

3.6.4 *F.n.n.* tritt in den Nramp-Mutanten effizienter aus dem Phagosom aus

Neben der cytosolischen Replikation ist der Ausbruch aus der bakteriziden Umgebung des Phagosoms ein wichtiger Faktor für die Virulenz von *Francisella*. Deswegen wurde die Dauer des Aufenthalts von *F.n.n.* in einem p80-positiven Kompartiment zwischen wt-Zellen und den Nramp-Mutanten verglichen und als Maß für den phagosomalen Ausbruch verwendet.

Die Auszählung der p80-Assoziation von *F.n.n.* am Fluoreszenz-Mikroskop zeigte, dass sich der Anteil von p80-positiven *F.n.n.* direkt nach der Aufnahme (1 hpi) mit 80-90% nicht zwischen den Zelllinien unterschied (Abb. 3.18). An den Zeitpunkten 6 und 24 hpi befanden sich jedoch weniger Bakterien in einem p80-positiven Kompartiment in den Nramp-Deletionsmutanten als in wt-Zellen.

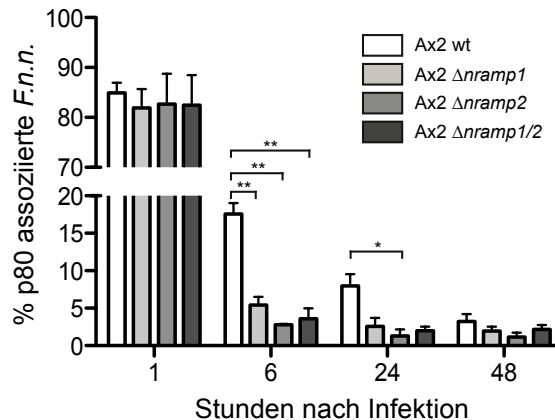


Abbildung 3.18: p80-Assoziation des FEP in Nrapm-Deletionsmutanten. Die Assoziation von p80 mit *F.n.n.* wt wurde in infizierten wt-Zellen und den Nrapm-Deletionsmutanten zu den Zeitpunkten 1, 6, 24 und 48 hpi nach einer Immunfluoreszenzfärbung bestimmt ($n=3 \pm SEM$). Einfacher ANOVA mit Bonferroni-Test: * $p=0,05$, ** $p=0,01$.

Diese Ergebnisse deuten auf einen schnelleren Austritt von *F.n.n.* aus dem Phagosom in den Nrapm-Deletionsmutanten hin. Da *F.n.n.* schneller der degradativen Umgebung des Phagosoms entkommt, könnte ein höherer Anteil lebendiger Bakterien die Replikationsphase im Cytosol erreichen und zum Wachstum beitragen.

3.6.5 Verstärkte Induktion der Eisenakquirierung durch *F.n.n.* in den Nrapm-Mutanten

Nrapm1 und NrapmB sind für die Eisenhomeostase in *Dictyostelium* verantwortlich und ihre Deletion führt zu einem verringerten Eisengehalt innerhalb der Zellen (209). Trotzdem ist *F.n.n.* in der Lage effizient im Cytosol der Nrapm-Mutanten zu replizieren. In diesem Abschnitt wurden durch Eisenmangel regulierte Gene von *F.n.n.* identifiziert und die Regulierung ausgewählter Gene mittels RT-PCR im Infektionsverlauf analysiert. Zudem wurde untersucht, ob *F.n.n.* auf den verringerten Eisengehalt in den Nrapm-Mutanten mit einer Anpassung der Eisenakquisition reagiert.

Durch Eisenmangel beeinflusste Gene werden in *Francisella* vom Transkriptionsfaktor Fur kontrolliert, welcher an eine 19 bp große, konservierte Bindesequenz bis zu 200 bp vor dem Startcodon des kontrollierten Gens bindet (97). Da das Genom von *F.n.n.* nicht annotiert ist, wurde stattdessen im Genom von *F.n.o.*

3. Ergebnisse

zunächst nach Fur-Bindesequenzen mit bis zu 8 Nukleotidfehlpaarungen in Regionen bis zu 200 bp vor dem Startcodon von offenen Leserastern gesucht. Die bioinformatische Analyse identifizierte 1496 und 1020 potentielle Fur-Boxen in Vorwärts- bzw. Rückwärtsrichtung von geschätzten 1595 Genen (238). Oft überlappten jedoch bis zu fünf Sequenzen vor einem Gen. Eine Erhöhung der Stringenz auf höchstens 6 Fehlpaarungen ergab insgesamt 83 potentielle Fur-Boxen in beiden Leserastern, deren dazugehörige Gene in Anhang 1 aufgelistet sind. Hervorzuheben sind Gene von Sekretionssystemen des Typ-1 (OOM_1211), Typ-2 (*secB*) und Typ-6 (*iglC*), zur Abwehr von oxidativem Stress (*ruvA*, *uvrA*, *msrA/B*) sowie des Feo-Eisentransportsystems (*feoA*). Daneben wurden Gene identifiziert, die für die Virulenz anderer Pathogene eine Rolle spielen oder Virulenz-assoziierte Domänen besitzen (*serC* (239), OOM_0490 (240), OOM_1001 (241), OOM_0258 (242)).

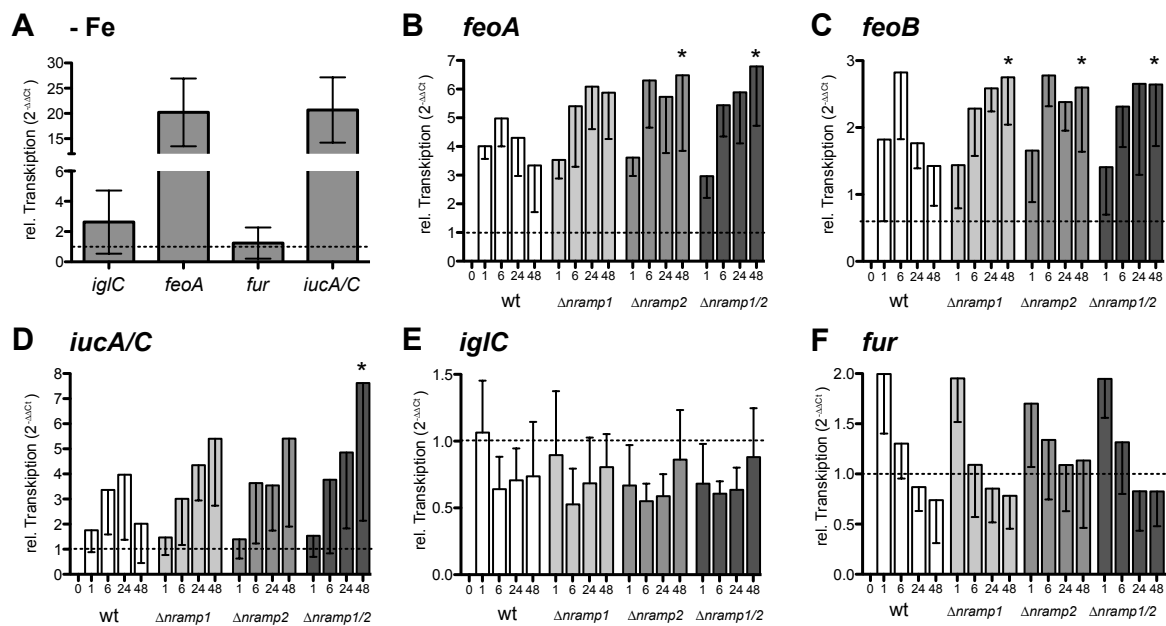


Abbildung 3.19: Transkription von Eisen-assoziierten *F.n.n.*-Genen unter Eisenmangel und in den Nramp-Deletionsmutanten. (A) Die relative Gentranskription von *F.n.n.*-Genen mit vorgelagerter Fur-Box (*iglC*, *feoA*, *fur*, *iucA/C*) wurde unter Eisenmangel (+2,2' Bipyridyl) und in regulär kultivierten Bakterien (+ 2 mM FeCl₃) mittels RT-PCR gemessen (n=2-4 ±SD). (B-F) Ax2 wt-Zellen wurden mit *F.n.n.* wt infiziert, die RNA bei 1, 6, 24 und 48 hpi isoliert und die rel. Transkription von *feoA* (B), *feoB* (C), *iucA/C* (D), *iglC* (E) und *fur* (F) mittels RT-PCR analysiert. *In vitro* kultivierte *F.n.n.* (+ 2 mM FeCl₃) wurden als Mock-Kontrolle verwendet (n=3 ±SD). Die statistische Analyse für jeden Zeitpunkt wurde mit einem einfachen ANOVA und anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt: * p=0,05.

Anschließend wurde experimentell mittels RT-PCR ermittelt, welche Eisen-assoziierten Gene in *F.n.n.* durch Eisenmangel reguliert werden. Dafür wurde *F.n.n.*

unter Zugabe des Eisenchelators 2,2'-Bipyridyl kultiviert und anschließend die Transkription von Genen analysiert, die potentiell für die Eisenakquisition verantwortlich sind: *feoA*, als Teil des unter Bakterien weit verbreiteten Feo-Eisentransportsystems, *iucA/C*, das eine Fe³⁺ bindende Siderophore-Synthetase codiert sowie *fur* und *iglC*. Als etablierte Haushaltsgene dienen *ftsZ*, *polA* und *fopA* (243). Als Mock-Kontrolle wurden regulär kultivierte Bakterien unter Zugabe von 2 mM FeCl₃ verwendet. Die RT-PCR-Analyse zeigte eine etwa 20-fache Hochregulierung von *feoA* und *iucA/C* (Abb. 3.19 A). Die Transkription von *iglC* war lediglich leicht erhöht, während *fur* durch den Eisenmangel nicht beeinflusst wurde.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob *F.n.n.* seine Eisenakquirierung im Infektionsverlauf auf Transkriptionsebene reguliert und damit auf den Eisenmangel in den Nramp-Deletionsmutanten reagiert. Dafür wurden wt-Zellen und Nramp-Mutanten mit *F.n.n.* wt infiziert und die Transkription von *feoA*, *feoB*, *iucA/C*, *iglC* und *fur* in *F.n.n.* mittels RT-PCR gemessen (Abb. 3.19 B-F). In wt-Zellen wurde *feoA* im gesamten Infektionsverlauf induziert mit einem Höhepunkt bei 6 hpi. Auch die Transkription von *feoB* und *iucA/C* wurde in wt-Zellen induziert und erreichte seinen Höhepunkt nach 6 und 24 hpi. Im Gegensatz dazu sank die Transkription der Eisenassoziierten Gene in den Nramp-Mutanten nicht nach 48 hpi wieder ab, sondern stieg konstant an oder blieb erhöht. Der Virulenzfaktor *iglC* zeigte überraschenderweise eine leichte Herabregulation der mRNA-Level im Infektionsverlauf und keine Unterschiede zwischen den Zelllinien. Die Transkription des negativ regulierenden Transkriptionsfaktors *fur* wurde gegenläufig zu den von ihm kontrollierten Genen reguliert. So stieg die Transkription von *fur* kurz nach der Infektion an und fiel im Laufe der Infektion mit zwischen den Zelllinien ähnlicher Kinetik ab.

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass *F.n.n.* die Transkription von Genen zur Eisenakkumulation (*feoA*, *feoB*, *iucA/C*) im Laufe der Infektion hochreguliert. Die Induktion von *feoB* und *iucA/C* ab 6 hpin deutet auf einen Eisenmangel von Bakterien nach dem Übergang ins Cytosol hin. Während die Transkription von Eisentransportern in wt-Zellen ab 48 hpi wieder absank, stiegen diese in den Nramp-Mutanten progressiv an. *F.n.n.* ist damit in der Lage dem Eisenmangel im Cytosol der Nramp-Mutanten durch eine verstärkte Eisenaufnahme auszugleichen. Die Transkription von *iglC* erschien dagegen in der cytosolischen Phase leicht herabreguliert und unterschied sich nicht zwischen wt-Zellen und Nramp-Mutanten.

4 Diskussion

Die Wirt-Pathogen-Interaktion des Humanpathogens *F. tularensis* ist immer noch kaum verstanden und unterstreicht damit den Bedarf nach grundlegender Forschung in einfachen Infektionsmodellen. In dieser Arbeit wurde *Dictyostelium* mit dem Bakterium *F. noatunensis* subsp. *noatunensis* (*F.n.n.*) als Infektionsmodell etabliert, um fundamentale und konservierte Virulenzmechanismen zu untersuchen. Es wurde gezeigt, dass *F.n.n.* in *Dictyostelium* den Infektionsverlauf von *F. tularensis* in humanen Makrophagen rekapituliert und der FPI-Faktor IglC eine vergleichbare Rolle für die Virulenz in *F.n.n.* spielt. Durch die Interaktion von *F.n.n.* mit dem autophagosomalen System ließ sich die Autophagie als Abwehrmechanismus gegen cytosolische *Francisella*-Bakterien nachweisen. Des Weiteren konnte den Nramp-Eisentransportern der Wirtszelle eine Beteiligung an der Resistenz gegenüber *F.n.n.* zugeordnet werden. Zunächst werden die Übereinstimmungen des *Dictyostelium/F.n.n.*-Systems mit dem Makrophagenmodell und seine Relevanz als neues Infektionsmodell für *Francisella* diskutiert. Des Weiteren wird der Einfluss von Autophagie und Nramp-Transportern als Wirtsabwehrmechanismen auf den Verlauf der *Francisella*-Infektion erläutert.

4.1 *F.n.n.* besitzt konservierte Virulenzfaktoren

Viele Virulenzfaktoren von *Francisella* sind in der *Francisella*-Pathogenitätsinsel (FPI) lokalisiert (61). Diese codiert ein Typ-6-Sekretionssystem (T6SS), welches in mehreren Infektionsmodellen zum Ausbruch aus dem Phagosom beiträgt (51, 52, 56, 85). *F.n.n.* codiert 15 der bis zu 17 FPI-Gene, deren Anzahl je nach Spezies variiert. Ein Sequenzvergleich von *F.n.n.* mit Genomen klinisch relevanter Stämme anderer *Francisella*-Spezies zeigt eine hohe Konservierung der FPI-Gene innerhalb der gesamten Gattung (Abb. 3.1). Die höchste Sequenzähnlichkeit zu *F.n.n.* weisen die nächsten verwandten Spezies *F.n.o* und *F. philomiragia* auf. Im gesamten Genus ähnelten sich die Gene am stärksten, deren Produkte die Kernkomponenten des T6SS bilden (*intracellular growth locus* (*igl*) *A-E*, *valine-glycine repeat G* (*vgrG*) und *dotU*) (63). Der Sequenzvergleich weist auf eine konservierte Aufgabe des T6SS für die Virulenz aller Mitglieder des *Francisella*-Genus hin. Die Sekretion von Effektoren durch das T6SS ist ein verbreiteter Virulenzmechanismus unter pathogenen

Bakterien, wie *Vibrio cholerae* (171), *Salmonella* (244), *Pseudomonas* (245) und *Francisella* (90). Generell unterscheidet sich jedoch das T6SS von *Francisella* und anderen Pathogenen und teilt sich nur wenige gemeinsame Faktoren (246). Zudem ist für *Francisella* bisher kein sekretierter Faktor einem Effektormechanismus zugeordnet. *Dictyostelium* wurde bereits erfolgreich für die Untersuchung von Effektormechanismen des *V. cholerae*-T6SS genutzt (247). Das *Dictyostelium/F.n.n.*-System könnte somit ebenfalls zur weiteren Charakterisierung des *Francisella*-T6SS beitragen.

Die humanpathogenen Subspezies von *F. tularensis* besitzen im Gegensatz zu den aquatischen Spezies und *F.t.novicida* eine zusätzliche Kopie der FPI. Diese haben sie wahrscheinlich nach der Abspaltung vom freilebenden, marinen Vorfahren erworben (82). Der Besitz von zwei FPI-Kopien ist aber wahrscheinlich funktional redundant, da die Deletion von einem von zwei FPI-Genen in *F. tularensis* nicht zu verminderter Virulenz führt (48, 248). Andere Studien deuten hingegen indirekt an, dass beide Kopien eines FPI-Gens nötig sind für vollständige Pathogenität (249, 250). Für *F.n.n.* scheint die Anzahl von FPI-Kopien für die Virulenz nicht entscheidend zu sein, da diese Spezies trotz einer FPI für Fische hoch infektiös ist und einen lethalen Krankheitsverlauf auslösen kann (134). Dass die FPI-Genosis verantwortlich für die Speziesbarriere und Avirulenz im Menschen ist, kann nicht ausgeschlossen werden, ist aber unwahrscheinlich. Für die experimentelle Praxis stellt lediglich eine FPI-Kopie in *F.n.n.* einen Vorteil dar, da Deletionsmutanten einfacher erzeugt werden können als in *F. tularensis*.

Sequenzanalysen haben viele Gemeinsamkeiten zwischen den fisch- und humanpathogenen *Francisella*-Spezies gezeigt und lassen auf eine Vielzahl von konservierten Genen schließen, die vermutlich mit der Virulenz der Gattung assoziiert sind. So wird vermutet, dass *Francisella* bereits vor der Aufspaltung in fisch- und säugerpathogene Spezies eine pathogene Lebensweise aufwies (82). Die Verwendung von *F.n.n.* als Ersatzpathogen kann somit entscheidend zur Untersuchung von konservierten Virulenzmechanismen in der *Francisella*-Infektion beitragen. Man darf jedoch nicht außer Acht lassen, dass fisch- und humanpathogene Spezies auch für ihre Gruppe einzigartige Gene besitzen. Fisch- und humanpathogene Vertreter codieren jeweils 305 bzw. 233 einmalige Gene, die sich durch eine unterschiedliche Lebensweise entwickelt haben (251).

4.2 *Dictyostelium* ist kombinierbar mit *F.n.n.*

In den letzten 15 Jahren hat eine Vielzahl von Infektionsmodellen zum Verständnis der Wirt-Pathogen-Interaktion in der *Francisella*-Infektion beigetragen. Sowohl Tier- als auch Zellmodelle weisen jedoch mitunter große wirtsspezifische Unterschiede auf (siehe 1.1.5). Zusammen mit der hohen Infektiosität von *Francisella* führten diese modellspezifischen Unterschiede zur Entwicklung von grundlegenden Modellen. Diese kombinierten Ersatzpathogene, wie *F.t.novicida* oder *F.noatunensis*, mit einfach zu manipulierenden Wirtsorganismen (*Drosophila*, Zebrafisch) (112, 117, 118). Damit sollten konservierte Mechanismen der Wirt-Pathogen-Interaktion unabhängig von der Wirtsspezifität untersucht werden.

Diese Studie beschreibt die Etablierung des professionellen Phagozyten *Dictyostelium* in Kombination mit dem Ersatzpathogen *F.n.n.* als neues, simples *Francisella*-Infektionsmodell. *Dictyostelium* wurde in den letzten 15 Jahren als effizientes Modellsystem für die Untersuchung der Infektion intrazellulärer Bakterien etabliert. Der einfache Eukaryot teilt sich mit Makrophagen viele Homologien bezüglich Pathogen-assoziiierter Prozesse (siehe 1.2). Zusammen mit einem großen Spektrum molekularer, biochemischer und genetischer Methoden, macht dies *Dictyostelium* zu einem gut geeigneten Modellmakrophagen. *Dictyostelium* überlebt nicht bei einer Umgebungstemperatur über 27°C und ist deswegen in der Regel nicht mit humanpathogenen Bakterien kompatibel. Mögliche Optionen, um dies zu umgehen, sind einerseits ein breites Temperaturspektrum des Bakteriums (*Legionella*: 37°C in Makrophagen, 25°C in *Dictyostelium*) (167) oder der Gebrauch eines nahe verwandten Ersatzpathogens (*Mycobacterium marinum* statt *M. tuberculosis*) (168). *Dictyostelium* und *F.n.n.* besitzen beide eine optimale Wachstumstemperatur von 22°C und eignen sich damit für eine kombinierte Kultivierung (252, 253). Ob eine Kombination von *Dictyostelium* mit *F.n.o.* (Optimum: 28°C) oder humanpathogenen *Francisella*-Spezies (Optimum: 37°C) möglich ist, muss noch untersucht werden (254, 255). Ozanic *et al.* beobachteten intrazelluläres Wachstum von *F.t.novicida* in *Dictyostelium* bei 27°C (80), eine Temperatur die jedoch über dem Temperaturoptimum von *Dictyostelium* liegt und Wirtsprozesse einschränken könnte. Auch die Kombination von *Dictyostelium* mit *F.t. tularensis* und *holarctica* wären möglich, da diese *in vitro* noch bei 25°C wachsen können (254).

4.3 Die Rolle von IgIC für das intrazelluläre *F.n.n.*-Wachstum in *Dictyostelium*

Es wurde gezeigt, dass humanpathogene Bakterien die gleichen Virulenzfaktoren für die Infektion von Makrophagen nutzen, die sie auch resistent gegenüber der Prädation und der Abtötung durch *Dictyostelium* machen (167, 171, 256, 257). Um zu testen, ob eine Bakterienspezies für *Dictyostelium* virulent ist und welche Faktoren dafür essentiell sind, wird ein sogenannter Plaque-Test durchgeführt. Dieser macht sich die Unfähigkeit *Dictyosteliums* auf pathogenen Bakterien zu wachsen zunutze. Dadurch konnten Faktoren identifiziert werden, die vor der Aufnahme oder dem Verdau schützen oder eine zytotoxische Wirkung auf *Dictyostelium* haben (164).

In dieser Studie war *Dictyostelium* unfähig auf *F.n.n.* Wildtyp-Bakterien (wt) zu wachsen und Plaques zu bilden (Abb. 3.2). Demgegenüber wuchsen die Zellen auf *Klebsiella aerogenes*, einem Bakterium, das die Amöbe als Nahrung nutzt. Dies lässt vermuten, dass *F.n.n.* für *Dictyostelium* pathogen ist. Demgegenüber ist *Dictyostelium* unfähig auf der avirulenten *F.n.n.* Δ *igIC*-Mutante Plaques zu bilden. Das bedeutet, dass IgIC entweder durch andere Virulenzfaktoren kompensiert wird oder *Dictyostelium* die *Francisella*-Bakterien generell nicht aufnehmen oder verdauen kann. Genauso ist *Dictyostelium* auch nicht in der Lage auf anderen apathogenen Stämmen, wie *M. smegmatis* oder avirulenten Mutanten von *Aeromonas hydrophila*, zu wachsen (258, 259). Die Zugabe vom Nahrungsbakterium *K. aerogenes* zu *F.n.n.* und dessen Mutanten könnte die Wachstumsbedingungen zugunsten *Dictyosteliums* beeinflussen (259). Somit könnte der Plaque-Test zukünftig die Identifizierung von apathogenen Mutanten ermöglichen.

Die intrazelluläre Replikation des Pathogens ist eine Voraussetzung für ein relevantes Infektionsmodell, so dass in dieser Studie das Wachstum von *F.n.n.* in *Dictyostelium* nachgewiesen werden sollte. Klassischerweise wird bakterielle Replikation durch die Zählung lebender Bakterien über Kolonie-formende Einheiten (KFE) ermittelt. Diese Methode ist im *Dictyostelium/F.n.n.*-System jedoch erfolglos geblieben, da weder eine Detergenz-vermittelte noch mechanische Lyse der Zellen zu einer zuverlässigen Bildung von *F.n.n.*-Einzelkolonien führte. Stattdessen wurde bakterielle Replikation mittels Fluoreszenz-Mikroskopie, Durchflusszytometrie und quantitativer PCR untersucht (Abb. 3.3). Eine Einschränkung dieser Methoden ist jedoch, dass sie im Gegensatz zu KFEs nicht den Anteil lebender und toter Bakterien

in den Zellen angibt. Mit der Fluoreszenz-Mikroskopie wurde gezeigt, dass *F.n.n.* wt von *Dictyostelium* aufgenommen wird und erfolgreich in den Zellen persistiert. Zwar sanken die Infektionsraten aufgrund des *Dictyostelium*-Wachstums, die Zunahme des Anteils von Zellen mit >3 Bakterien ließ jedoch auf eine intrazelluläre Replikation von *F.n.n.* schließen. Dieses Ergebnis wurde durch Durchflusszytometrie und qPCR bestätigt, welche eine leichte, absolute Zunahme der Bakterienlast über 48 h hinweg feststellten. *F.n.n.* wächst nicht im *Dictyostelium*-Medium (HI5-C) und trägt damit nicht durch die Replikation und Aufnahme extrazellulärer Bakterien zur intrazellulären Bakterienlast bei. Die Replikationsgeschwindigkeit von *F.n.n.* in *Dictyostelium* stimmt damit mit dem embryonalen Zebrafischmodell überein, in welchem eine Generationszeit von 43 h für *F.n.n.* bestimmt wurde (117).

Im Gegensatz zu *F.n.n.* wt konnte die IglC-Deletionsmutante nicht intrazellulär replizieren und zeigte einen starken Abfall der Bakterienlast ab 4 hpi. Dieser Phänotyp konnte wiederholt durch alle drei Messmethoden nachgewiesen werden. *F.n.n. ΔiglC* repliziert auch in Zebrafischembryonen nicht effizient, ein Effekt, der durch die Wiedereinführung von *iglC* komplementiert werden konnte und somit genspezifisch ist (216). Die IglC-Deletion hatte keine Auswirkungen auf das bakterielle Wachstum *in vitro*, was bedeutet, dass kein gestörter Metabolismus in der Mutante für den attenuierten Phänotyp verantwortlich ist. In allen bekannten *Francisella*-Infektionsmodellen (Amöben, Insektenzellen, Makrophagen, Epithelzellen, Fische, Mäuse) weisen *Francisella*-Bakterien ohne IglC einen Defekt für intrazelluläres Wachstum auf (76, 86, 216, 222, 260). Somit konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass IglC auch im *Dictyostelium/F.n.n.*-System seine universelle Aufgabe ausübt und *F.n.n.* eine ähnliche Virulenzstrategie verwendet wie die humanpathogenen Spezies.

IglC ist ein struktureller Bestandteil des *Francisella*-T6SS, welches von einem Viertel aller Gram-negativen Bakterien codiert ist (261). Neben *Francisella* nutzen viele pathogene Bakterien ein T6SS als konservierten Virulenzfaktor für die Replikation innerhalb der Wirtszelle. Weitere Studien deuten jedoch darauf hin, dass das T6SS nicht innerhalb der Wirtszelle agiert. Zusätzlich wurde ein Einfluss auf die interbakterielle Konkurrenz unter freilebenden Bakterien (262), das Unterscheiden von Selbst und Fremd (263, 264) und den Schutz vor der Prädation durch Amöben beobachtet (171). So schützt das T6SS von *V. cholerae* vor der Prädation durch *Dictyostelium*, ist jedoch nicht essentiell für die Infektion im Mausmodell (171, 265).

Auch für *F.n.n.* könnte das T6SS eine Rolle in der marinen Umwelt spielen. Freilebende *Francisella*-Spezies bilden Biofilme und geraten dabei höchstwahrscheinlich in interbakterielle Konkurrenz (266, 267). *F. philomiragia* bildet Biofilme in Gegenwart von *Acanthamoeba castellanii* und infiziert die Amöbe (267). Die Durchsetzung gegen andere Bakterien im Biofilm und anschließende Infektion mariner, phagozytischer Eukaryoten könnte die Übertragung auf Fische in aquatischen Lebensräumen begünstigen. Beispielsweise werden marine Ciliaten von *F. endociliaphora* infiziert (268). Zusammenfassend wurde gezeigt, dass *F.n.n.* in *Dictyostelium* abhängig vom konservierten Virulenzfaktor IgIC repliziert (Abb. 3.3) und damit die Rolle des T6SS-Faktors in Säugersystemen rekapituliert. Eine zusätzliche Rolle für IgIC ist außerhalb der Wirtszelle für das marin lebende Bakterium ebenfalls möglich.

4.4 Das *Dictyostelium/F.n.n.*-System rekapituliert den intrazellulären Infektionsverlauf des humanen Makrophagenmodells

Der intrazelluläre Lebenszyklus von *Francisella* in Makrophagen ist charakterisiert durch Phagozytose, Interaktion mit dem endosomalen System, Ausbruch aus dem Phagosom und Replikation im Cytosol (221). In dieser Studie wurde gezeigt, dass das *Dictyostelium/F.n.n.*-System die Schlüsselaspekte des *Francisella*-Lebenszyklus in Makrophagen rekapituliert und damit ein nützliches Infektionsmodell für die Wirt-Pathogen-Interaktion von *Francisella* darstellt. Zudem wurde durch die Verwendung der IgIC-Deletionsmutante die Relevanz des T6SS als essentieller Virulenzfaktor im *Dictyostelium*-Modell bestätigt. Im folgenden Abschnitt wird der Lebenszyklus von *Francisella* in *Dictyostelium* sowie dessen Abhängigkeit von IgIC diskutiert und mit dem Infektionsverlauf in Makrophagen und Amöben verglichen.

4.4.1 Die Aufnahme von *F.n.n.* durch *Dictyostelium*

Es wird angenommen, dass *Dictyostelium* ähnlich Makrophagen mehrere Rezeptoren und Mechanismen besitzt, um Bakterien spezifisch zu erkennen und aufzunehmen (147, 269). Wie in Makrophagen ist die Aufnahme in *Dictyostelium* abhängig von einer Rekonstruktion des Aktin-Zytoskeletts (270). In dieser Studie wurde die Aufnahme von *F.n.n.* durch *Dictyostelium* mittels Mikroskopie beobachtet

und mithilfe einer Makropinozytose-defizienten Deletionsmutante ($\Delta pi3k$) näher charakterisiert (Abb. 3.4).

Die Aufnahme von *F.n.n.* durch *Dictyostelium* wurde in Zellen beobachtet, die ein Fusionsprotein aus GFP und der Aktin-bindenden Domäne (ABD) des Aktin- vernetzenden Proteins ABP-120 (224) exprimieren (Abb. 3.4). *F.n.n.* wurde Aktin- abhängig aufgenommen mit der Bildung des Phagozytosebecher vor oder nach Kontakt des Bakterium mit der Zelloberfläche. Es könnte sich also sowohl um eine rezeptorvermittelte als auch unspezifische Aufnahme handeln. Direkt nach der Aufnahme wurde eine schnelle Auflösung des Aktinmantels um das Bakterium beobachtet. In anderen Zellen blieben nach unbestimmter Zeit aufgenommene *F.n.n.* weiterhin mit Aktin assoziiert, wenn auch in schwächerem Maße. Bei dem Aktinmantel könnte es sich um einen von *Francisella* induzierten Mechanismus handeln. Andere intrazelluläre Pathogene nutzen Aktin zum Schutz ihrer Replikationsnische vor der Fusion mit Endosomen und Lysosomen und unterbinden damit die phagosomale Reifung. Am Mykobakterienkompartiment blockiert F-Aktin die Rekrutierung der V-ATPase und damit die Ansäuerung des Kompartiments und anschließende Abtötung des Bakteriums (271). Die Aktinassemblierung am *Legionella*-enthaltenden Phagosom blockiert die Fusion mit Lysosomen, wie es auch für eine käfigartige Aktinstruktur um *Salmonella* vermutet wird (272, 273). *F.n.n.* könnte diesen Mechanismus nutzen, um sich während der phagosomalen Phase vor dem lysosomalen Abbau zu schützen. Ein Effektor, der *F.n.n.* dafür zur Verfügung stehen könnte, ist VgrG. Dieses Protein punktiert als "Speerspitze" des T6SS die phagosomale Membran und wird anschließend zusammen mit anderen FPI-Faktoren ins Cytosol der Wirtszelle sekretiert (63, 91). In *Dictyostelium* ist eine VgrG-Effektordomäne von *V. cholerae* in der Lage Aktin zu vernetzen (274), ein Mechanismus, der zur Pathogenität von *V. cholerae* in Mäusen beiträgt (275). Eine Aktinvernetzung durch sekretiertes VgrG könnte den Aktinmantel aufbauen und die weitere phagosomale Reifung blockieren. Um zu untersuchen, ob dieser Prozess von *F.n.n.* T6SS-vermittelt induziert wird, müsste die Aktin-Assoziation von *F.n.n.* $\Delta iglC$ mit wt-Bakterien früh in der Infektion verglichen werden.

Die Ultrastruktur des *F.n.n.*-Aufnahmeprozesses wurde mittels Rasterelektronen- mikroskopie untersucht (Abb. 3.4). Aufnahmen zeigten Bakterien sowohl in einer flachen Membranregion von Membran umschlossen als auch assoziiert mit Phagozytosebechern. *F.n.n.*-Bakterien mit Kontakt zu *Dictyostelium* zeigten von ihrer

Oberfläche ausgehende rundliche und längliche Ausstülpungen, die auch um sie herum auf der *Dictyostelium*-Oberfläche lokalisierten. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um *outer membrane vesicles* (OMVs) und Nanoröhren, die von *F.n.n.* und anderen Gram-negativen Bakterien gebildet werden (225, 276). *F.n.n.* ohne Zellkontakt zeigten derartige Strukturen nicht oder nur in geringerem Ausmaß. OMVs werden von der Oberfläche abgesondert und stellen einen potentiellen Virulenzfaktor-Transportmechanismus dar. Die Vesikel können durch die Fusion mit der Plasmamembran oder über endozytotische Wege in die Zielzelle eindringen (277, 278). Entsprechend wurden in dieser Studie Membranstrukturen mit der Größe und Struktur von OMVs beobachtet, die mit der Plasmamembran von *Dictyostelium* fusionierten. Die OMVs von *F.n.n.*, *F. philomiragia* und *F.t.novicida* enthalten mehrere mit Virulenz assoziierte Faktoren. IgC ist das häufigste Protein in *F.n.n.* OMVs und ist mit anderen FPI-Proteinen in den OMVs aller drei Spezies detektiert worden (225, 279, 280). Die Rolle von *F.n.n.* OMVs für die Aufnahme und Virulenz von *Francisella* in *Dictyostelium* bleibt zu untersuchen. OMVs von *F.n.n.* könnten isoliert und mit *Dictyostelium* inkubiert werden, um eventuelle Auswirkungen auf die Phagozytoserate und phagosomale Reifung zu analysieren. Durch die ektopische Expression von bekannten OMV-Faktoren in *Dictyostelium* könnten die Proteine identifiziert werden, die zur Virulenz von *Francisella* über OMV-Transport beitragen. *Dictyostelium* nimmt Bakterien entweder über Phagozytose oder Makropinozytose auf (270). Die Inaktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) inhibiert Makropinozytose und Phagozytose von großen Partikeln, jedoch nicht die Phagozytose von ca. 1 µm großen Bakterien, wie *E. coli* (281-283). Die drastisch verminderte Aufnahme von *F.n.n.* in $\Delta pi3K1$ -Zellen in dieser Studie weist auf eine Aufnahme der Bakterien durch Makropinozytose hin (Abb. 3.4). Peracino *et al.* zeigten, dass auch *L. pneumophila* von *Dictyostelium* durch Makropinozytose aufgenommen wird (223). Die Autoren verwendeten jedoch eine Deletionsmutante aller PI3Ks ($\Delta pi3k1-5$) und führten weitere Experimente unter Bedingungen mit verminderter Makropinozytose durch. Um die Makropinozytose als Hauptaufnahmeprozess für *F.n.n.* zu bestätigen, sollten weitere Versuche mit den von Peracino *et al.* verwendeten Konditionen und Zelllinien durchgeführt werden. Makropinozytose benötigt keine Bindung des Partikels zur Zelloberfläche (284), so dass der $\Delta pi3K1$ -Phänotyp schlussendlich eine nicht-selektive Aufnahme von *F.n.n.* unterstützt.

4.4.2 Die phagosomale Reifung von *F.n.n.* in *Dictyostelium* ist vergleichbar mit *F. tularensis* in Makrophagen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *F.n.n.* in *Dictyostelium* vergleichbare Schlüsselaspekte der phagosomalen Reifung durchläuft wie *F. tularensis* in humanen Makrophagen. Beide *Francisella*-Spezies interagieren in ihren Zellmodellen mit dem endosomalen System und akkumulieren transient die V-ATPase am Phagosom. Anschließend entkommen sie aus dem Phagosom ins Cytosol, wo sie replizieren. Dieser Prozess ist in beiden Systemen abhängig vom Virulenzfaktor IglC, welcher damit im Genus *Francisella* als evolutionär konserviert betrachtet werden kann.

Kurz nach der Aufnahme (1 hpi) interagiert das *F.n.n.*-enthaltende Phagosom (FEP) unabhängig von IglC mit Endosomen, erkennbar an über Endosomen gelieferte Goldpartikel im Phagosom (Abb. 3.5). Besser quantifizieren lässt sich die endosomale Interaktion durch die Assoziation des Phagosoms mit p80, einem putativen Kupfertransporter und endosomalen Markerprotein (158). Ab 2 hpi verliert *F.n.n.* abhängig von IglC den endosomalen Marker fast vollständig bis 6 hpi. Übereinstimmend nimmt die Assoziation von *F. tularensis* mit Markern von frühen (EEA-1) und späten (LAMP-1) Endosomen in Makrophagen als Folge des Austritts aus dem Phagosom ab (51, 52). Die Kinetik dieses Prozesses schwankt zwischen 1-8 hpi und variiert je nach Infektionsmodell (45, 51, 52, 58, 59). Elektronenmikroskopische Analysen zwischen 1-4 hpi zeigten in dieser Studie den Ausbruch von *F.n.n.* aus dem *Dictyostelium*-Phagosom mit einer zur p80-Assoziation korrelierenden Kinetik. p80 könnte damit ein geeigneter Membranmarker des FEP sein und auf den Anteil phagosomaler und cytosolische Bakterien schließen lassen.

Ein wichtiger Schritt der phagosomalen Reifung ist die progressive Ansäuerung des Phagosoms durch die Aktivität der V-ATPase, wodurch die optimale Umgebung für lysosomale Hydrolasen geschaffen wird (54). Pathogene Bakterien, wie *Legionella* oder Mykobakterien, vermeiden aktiv die Ansäuerung ihres Kompartiments und blockieren somit die Reifung zum Phagolysosom (285, 286). Die Datenlage zur Ansäuerung des *F. tularensis*-Phagosoms bleibt widersprüchlich und sollte mit dieser Studie komplementiert werden.

In *Dictyostelium* wurde die Ansäuerung des FEP durch die Lokalisation von VatA, der katalytischen Untereinheit der V-ATPase, und dem pH-sensitiven Farbstoff Neutralrot quantifiziert (Abb. 3.6). Die Lokalisation beider Marker zeigte eine transiente Ansäuerung des FEP bis 2 hpi an. Der Verlust der Azidifizierungsmarker wird jedoch

nicht aktiv von *F.n.n.* reguliert, sondern stimmt mit der endogenen Dynamik der V-ATPase am Phagosom von inerten Partikeln in *Dictyostelium* überein. Nach der Wiedergewinnung der V-ATPase vom Phagosom reneutralisiert das Kompartiment und unverdaute Partikel werden ab 2 h nach Aufnahme exozytiert (162). Im Gegensatz zum *F.n.n. wt* akquiriert die IgIC-Mutante nach 4 hpi wieder VatA. Dies könnte zum einen durch eine Reassoziierung des Markers oder die Wiederaufnahme von exozytierten Δ igIC-Bakterien ab 2-3 hpi erklärt werden. In diesem Zeitraum erfolgte jedoch keine erneute Ansäuerung des Δ igIC-Phagosoms. Dies zeigt, dass die Lokalisation einer Protonenpumpen-Untereinheit nur ein Indikator der Ansäuerung ist und die VatA-Assoziierung mit einem pH-sensitiven Farbstoff bestätigt werden sollte.

In einigen Studien wurde eine aktive Blockierung und limitierte Ansäuerung des *F. tularensis*-enthaltenden Phagosoms beobachtet (52, 55). Demgegenüber zeigten andere Studien eine Akquirierung der V-ATPase und die Ansäuerung des Phagosoms (56, 57). Zusätzliche Kontroversen wurden durch Studien geschaffen, die der Ansäuerung eine Rolle beim optimalen Ausbruch aus dem Phagosom zusprachen (56, 57), während Clemens *et al.* keinen Einfluss des pH-Wertes auf den Phagosomenaustritt beobachten konnte (287). Eine mögliche Erklärung für diese Differenzen ist eine unterschiedliche Aufnahme der Bakterien. So werden opsonisierte Bakterien nicht angesäuert, während nicht-opsonisierte Bakterien in azidifizierten Phagosomen zu finden sind. *F.n.n.* wird durch *Dictyostelium* nicht Serum-vermittelt aufgenommen. Übereinstimmend entspricht die Reifung des FEP der nicht-opsonisierter Bakterien mit einer transienten Ansäuerung ohne aktive Regulierung durch das Bakterium.

Am Ende der phagosomalen Reifung in *Dictyostelium* steht die Abtötung und Aktin-abhängige Exozytose der verdauten Partikel (162). Während der Großteil von Δ igIC-Bakterien begleitet von Aktin exozytiert wurde, interagierten wt-Bakterien nur transient mit Aktin und wurden weitaus weniger exozytiert (Abb. 3.7). Zudem wuchsen exozytierte wt-Bakterien im Gegensatz zur Δ igIC-Mutante auf Chocolate-Agar-Platten wieder an und überlebten damit die phagosomale Reifung. Dies deutet auf eine zusätzliche Funktion von IgIC bei der Blockierung des lysosomalen Abbaus von *F.n.n.* hin. So blockieren auch andere intravakuoläre Bakterien die Fusion mit Lysosomen zur Etablierung einer Replikationsnische, wie *Legionella* oder *Salmonella* (288, 289). Die Untersuchung lysosomaler Marker (z.B. Cathepsin D (155), LvsB

(290)) am Phagosom von *F.n.n.* wt und $\Delta igIC$ mittels Immunfluoreszenzfärbung wäre nötig, um eine mögliche IgIC-abhängige Blockierung von Lysosomen zu bestätigen.

Um die Lokalisation von intrazellulären Bakterien zuverlässig bestimmen zu können, ist eine Ultrastrukturanalyse mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) unabdingbar. TEM-Aufnahmen zeigten, dass *F.n.n.* wie *F. tularensis* in Makrophagen abhängig von IgIC ins Cytosol von *Dictyostelium* transloziert (Abb. 3.8). Während ab 1 hpi ein Großteil der Bakterien noch von einer intakten Phagosomenmembran umgeben war, zeigten erste FEP bereits rupturierte Membranen. Ab 4 hpi war ein Großteil der wt-Bakterien im Cytosol lokalisiert, während die IgIC-Mutante sich zwischen 1-4 hpi ausnahmslos innerhalb vakuolärer Strukturen aufhielt. Die Aufnahmen zeigen $\Delta igIC$ -Bakterien zum Zeitpunkt 4 hpi innerhalb eines großräumigen Kompartiments bei dem es sich wahrscheinlich um ein Postlysosom handelt (161). Das verdaute Bakterium im angrenzenden Kompartiment bestätigt den Verdau der IgIC-Mutante (Abb. 3.7). Zusammen mit den Ergebnissen dieser Studie (siehe Abb. 3.3, 3.5) bestätigen die EM-Aufnahmen für IgIC die in *Francisella* konservierte Funktion beim Ausbruch aus dem Phagosom ins Cytosol.

Die gescheiterte Komplementation des $\Delta igIC$ -Phänotyps durch die ektopische Expression von IgIC in *Dictyostelium* bestätigt dessen ans Phagosom gebundene Funktion. Die ektopische Expression von IgIC unter einem Aktinpromoter im Cytosol von *Dictyostelium* hat keine Auswirkungen auf *F.n.n.* $\Delta igIC$ im Phagosom und verstärkte nicht das Wachstum von wt-Bakterien im Cytosol. Dies korreliert mit den Studien von Sjöstedt *et al.*, die durch die Mikroinjektion von *F. tularensis* FPI-Mutanten ins Cytosol zeigen konnten, dass Produkte der FPI-Gene keinen Einfluss auf das cytosolische Wachstum haben (88). Beide Experimente unterstreichen die Phagosom-gebundene Funktion von IgIC als Teil des *Francisella*-T6SS. Damit ist die Bezeichnung *Intracellular growth locus C* irreführend, da es sich um keinen Wachstumsfaktor handelt. Im Gegensatz dazu lässt die erhöhte Transkription von *igIC* und anderen FPI-Genen in der späten Replikationsphase im Cytosol eine zusätzliche Funktion des T6SS im Cytosol vermuten (89). Hierbei handelt es sich jedoch um Daten aus murinen Makrophagen, in denen *F. tularensis* im Gegensatz zum humanen System nach der Replikation in eine Vakuole eintritt. Somit könnte es sich um eine modellspezifische Pathogenantwort handeln, die in anderen Zelltypen keine Bedeutung besitzt.

4.4.3 Das *Dictyostelium/F.n.n.*-Modell unterscheidet sich von anderen Amöben

Der Lebenszyklus von *F.n.n.* in *Dictyostelium* ist vergleichbar mit dem humanen Makrophagen-Modell, unterscheidet sich jedoch grundlegend vom Lebenszyklus in anderen Amöben (Abb. 4.1). Es wird vermutet, dass aquatische Amöben in der Umwelt ein *Francisella*-Reservoir darstellen und die Ansteckung über kontaminiertes Wasser vermitteln. Entsprechend ist *Francisella* in der Lage in *A. castellanii* und *Hartmannella vermiformis* zu replizieren (21, 76). Im Gegensatz zu anderen Wirtszellen treten *F.t.holarctica* bzw. *F.t.novicida* jedoch nicht aus dem Phagosom der Amöben aus sondern replizieren intravakuolär. In den Studien von Santic *et al.* erfüllte IgIC keine Rolle beim Ausbruch aus dem Phagosom sondern stattdessen als intravakuolärer Wachstumsfaktor. Zusammen mit der Zystenbildung in *A. castellanii* wird vermutet, dass dies der Überdauerung in der Umwelt dient (76, 77). Für *L. pneumophila* und Mykobakterien wurde gezeigt, dass Amöben als "Trainingsgelände" fungieren können und intraamöbales Wachstum eine gesteigerte Virulenz in Makrophagen und Mäusen verursacht (291-293). Grund dafür ist ein ähnlicher Lebenszyklus in Amöben und Makrophagen sowie die Verwendung der gleichen Virulenzfaktoren (294). Demgegenüber wurde für *F.t.novicida* eine verminderte Pathogenität in Mäusen nach deren Infektion mit *F.t.n.*-enthaltenden *A. castellanii* beobachtet. Es wird angenommen, dass die unterschiedlichen Virulenzmechanismen von *Francisella* in beiden Zelltypen keinen "Trainingseffekt" entstehen lassen (80). Eine Rolle von Amöben als natürliches Reservoir für *Francisella* muss also überdacht werden. Johansson *et al.* stellten bei der Untersuchung von *F. tularensis*-Patientenisolaten in Schweden fest, dass einige Isolate innerhalb von 15 Jahren keine einzige Mutation erworben hatten. Dies wäre durch eine extreme langsame Replikationsrate zu erklären, die *Francisella* durch den Eintritt in eine (nahezu) inaktive Phase erreichen könnte (295). Diese Ruhephase ist jedoch konträr zur rapiden Replikation in Amöben und findet wahrscheinlich ohne einen Wirt statt.

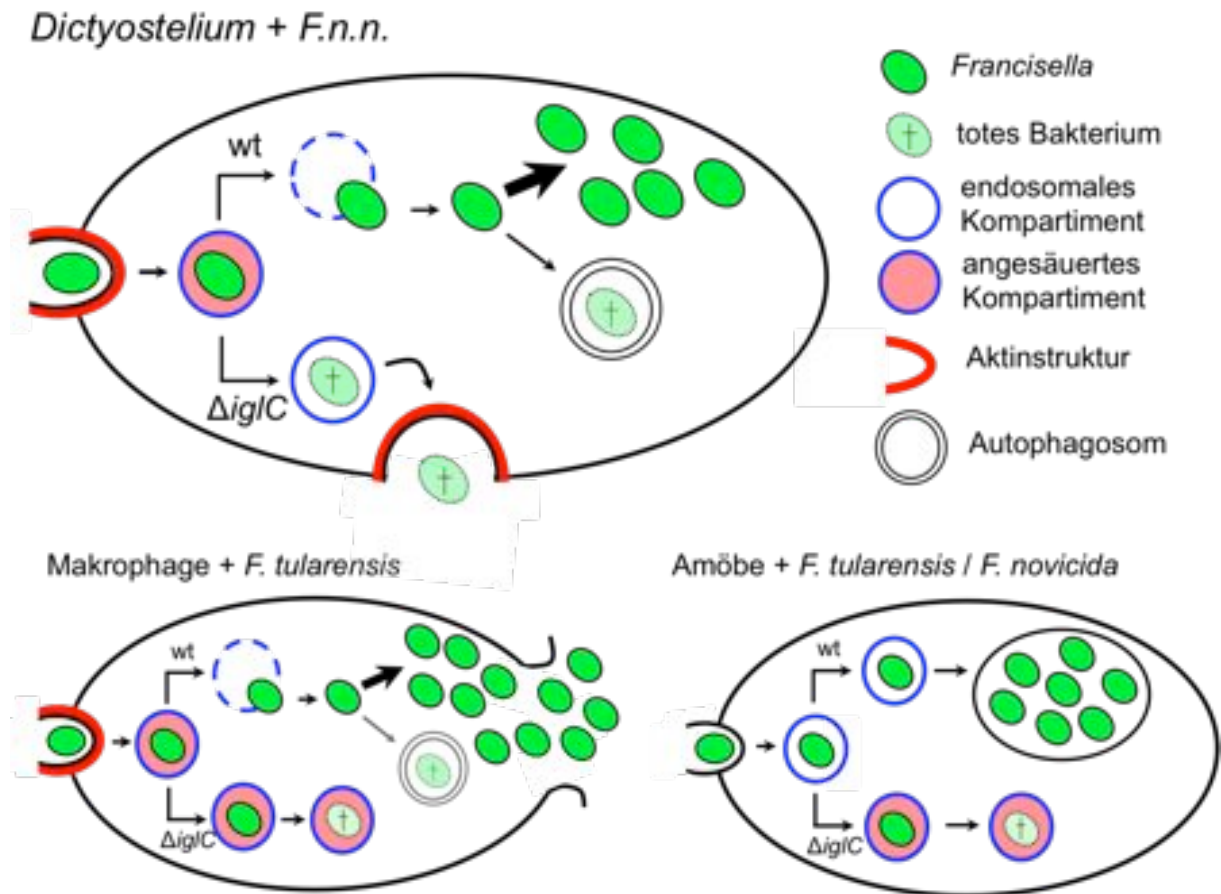


Abbildung 4.1: Der Infektionsverlauf von *Francisella* in *Dictyostelium* im Vergleich zu humanen Makrophagen und anderen Amöben. *Dictyostelium* und Makrophagen phagozytieren *Francisella*-Bakterien und formen ein *de novo* Phagosom mit endosomalen Eigenschaften. Nach der transienten Ansäuerung des Kompartiments entkommen wt-Bakterien in der frühen Infektionsphase ins Cytosol. Avirulente \DeltaiglC -Bakterien werden im Phagosom abgetötet. In *Dictyostelium* wird das Phagolysosom anschließend reneutralisiert und die toten Bakterien exozytiert. In beiden Wirtszellen repliziert *Francisella* im Cytosol, wo ein geringer Anteil mittels Autophagie abgebaut wird (siehe 4.5). In den Amöben *H. vermiformis* und *A. castellanii* (nicht gezeigt) weicht der Infektionsverlauf von *Francisella* ab. Das Phagosom wird nicht angesäuert und die Bakterien translozieren nicht ins Cytosol, sondern replizieren intravakuolär. *F.t.novicida* induziert in *A. castellanii* sogar die Formation von Zysten zwecks Überdauerung.

Abbildung 4.1 vergleicht den Lebenszyklus von *Francisella* in *Dictyostelium* mit humanen Makrophagen und der Amöbe *H. vermiformis*. Die ähnlichen Virulenzstrategien von *Francisella* in *Dictyostelium* und Makrophagen könnten auf eine Rolle *Dictyosteliums* als natürliches *Francisella*-Reservoir hinweisen. Ob die humanpathogenen Spezies einen ähnlichen Lebenszyklus in *Dictyostelium* durchlaufen und damit einem "Trainingseffekt" ausgeliefert sind, bleibt jedoch zu bestimmen. Bedeutender ist, dass die Suszeptibilität von *Dictyostelium* für *F.n.n.* und

der dem Säugersystem ähnliche Infektionsverlauf die evolutionär konservierten Mechanismen zwischen *Dictyostelium* und Säugerphagozyten hervorhebt.

4.5 Die Kapselregion von *F.n.n.*

Die Ultrastrukturanalyse mittels Kryofixierung erlaubte eine zuverlässige Untersuchung der *F.n.n.*-Morphologie innerhalb der Zelle mit minimaler Artefaktbildung. Der Vergleich von chemisch und kryofixierten Proben zeigte, dass intrazelluläre *F.n.n.* polymorph sind (Abb. 3.8, 3.9). Umgeben waren cytosolische Bakterien in kryofixierten Proben von einer elektronen-transparenten Aura, bei der es sich wahrscheinlich um eine bakterielle Kapsel handelt (Abb. 3.8). Eine elektronenhelle, kapselartige Struktur um *F. tularensis* wurde zuerst von Hood *et al.* mittels TEM beobachtet und in mehreren *in vitro* und *in vivo* Studien als Virulenzfaktor beschrieben (227-229, 296). Die Bildung der Polysaccharid-Kapsel, welche außer dem O-Antigen keine weiteren Lipopolysaccharid (LPS)-Strukturen aufweist, scheint konserviert zwischen *F. tularensis* Stämmen zu sein (297). Auch chemisch fixierte Proben zeigten um phagosomale und cytosolische *F.n.n.* einen elektronenhellen Bereich, der wahrscheinlich durch das Herauslösen von wasserlöslichem Material (z.B. Polysaccharide) bei der Ethanol-Dehydrierung entstanden ist (Abb. 3.9). Die potentielle Kapsel entsteht also nicht erst im Cytosol. Es konnten keine gängigen Kohlenhydrate bakterieller Kapseln in der elektronenhellen Aura um *F.n.n.* durch die Bindung verschiedener Lektine identifiziert werden. Dagegen waren Lektine in der Lage Phagosomen-spezifische Kohlenhydrate von *Dictyostelium* zu binden und könnten somit die Unterscheidung von phagosomalen und cytosolischen Bakterien in der TEM zukünftig erleichtern. Die Kohlenhydratkomponenten der Kapsel unterscheiden sich zwischen den *Francisella*-Spezies. So enthält die Kapsel von *F. tularensis* SCHU S4 Mannose und Rhamnose, während die LVS-Kapsel sich aus Mannose, Glukose und Galaktose zusammensetzt (227, 228). Zudem besitzt *F.n.n.* als marine Spezies höchstwahrscheinlich vollkommen andere Anforderungen an seine Kapsel als Schnittstelle zur Umwelt. Die Abwesenheit der getesteten Zucker ist also vermutlich durch Speziesunterschiede zu erklären. Endgültigen Aufschluss über die Anwesenheit einer Kapsel würde die Generierung einer kapsellosen Mutante und anschließende EM-Analyse geben. So wurden mehrere für die Kapselsynthese verantwortliche Gene in *F. tularensis* entdeckt (298), von denen beispielsweise *waaY* und *wbtI* als Homologe in *F.n.n.*

codiert werden. Durch die Infektion von *Dictyostelium* mit Deletionsmutanten dieser Gene könnte auch die Bedeutung der Kapsel für die Virulenz von *F.n.n.* untersucht werden. Die Kapsel könnte die Aufnahme des Bakteriums inhibieren oder fördern und die Abtötung durch den Wirt im Phagosom oder Cytosol blockieren.

Zum Zeitpunkt 24 hpi wiesen cytosolische Bakterien helle, granuläre Strukturen an der Kapselregion auf (Abb. 3.8). Dabei handelt es sich vermutlich um den Glukose-Speicherstoff Glykogen, welcher im Cytosol vieler Zelltypen vorkommt. *F.n.n.* besitzt wie alle anderen *Francisella*-Spezies eine Glykogenphosphorylase sowie weitere Enzyme der Glykolyse. *F.n.n.* könnte den Speicherstoff damit potentiell zu Glukose und weiter zu Energie umwandeln. Damit könnte Glykogen eine potenzielle Energiequelle im Cytosol für replizierende *F.n.n.* sein. Demgegenüber wurde keine spezifische Assoziation mit Mitochondrien (299), endoplasmatischem Retikulum (300) oder Autophagosomen (72) als mögliche Nährstofflieferanten cytosolischer Bakterien beobachtet. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der Ultrastrukturanalyse auf eine Polysaccharid-Kapsel um polymorphe *F.n.n.* hin, deren Zusammensetzung und Bedeutung für die Virulenz von *F.n.n.* noch bestimmt werden müssen.

4.6 Autophagie ist ein Abwehrmechanismus gegen *F.n.n.* in *Dictyostelium*

Autophagie ist ein zentraler Prozess des angeborenen Immunsystems bei der Abwehr gegen intrazelluläre Pathogene. Innerhalb der Zelle aktivieren Bakterien den Abwehrmechanismus durch Pathogen-assoziierte molekulare Muster, Toxine oder sekretierte Effektormoleküle. Viele Bakterien haben jedoch Strategien entwickelt, um dem autophagosomalen Abbau zu entkommen oder ihn zum eigenen Vorteil zu manipulieren (siehe 1.3). Als evolutionär konservierter Prozess ist die Autophagie in *Dictyostelium* vollständig vorhanden und wurde in der Amöbe bereits in der Infektion mit *L. pneumophila* (301), *Salmonella* (175), *Staphylococcus aureus* (185) und *M. marinum* (188) charakterisiert. Die Funktion der Autophagie in *Dictyostelium* korrelierte in diesen Studien mit Makrophagen.

In dieser Studie wurde die Rolle der Autophagie im *Dictyostelium/F.n.n.*-System untersucht und die Bedeutung dieses Mechanismus für *Francisella* zwischen Makrophagen- und *Dictyostelium*-Modell verglichen. Ein geringer Anteil von *F.n.n.* wurde in *Dictyostelium* via Ubiquitin und SQSTM1 für den degradativen Abbau in

Autophagosomen markiert (Abb. 3.11). Die höchste Assoziation mit beiden Markern lag bei 24 hpi, ein Zeitpunkt an dem die meisten Bakterien cytosolisch vorliegen und Replikation stattfindet. Demgegenüber blieb der Anteil Atg8-positiver *F.n.n.* im gesamten Infektionsverlauf konstant gering. In der Replikationsphase wurde kein Wiedereintritt der Bakterien in ein Atg8-positives Kompartiment beobachtet, wie es für *F. tularensis* in murinen Makrophagen festgestellt wurde (51). Die Divergenz zwischen SQSTM1- und Atg8-positiven *F.n.n.* lässt eine gewisse Blockierung des autophagosomalen Abbaus der Bakterien vermuten. Es ist jedoch zu beachten, dass *Dictyostelium* zwei Atg8-Paraloge, Atg8a und Atg8b, exprimiert und ihre Assoziation am Autophagosom höchst dynamisch ist und nicht vollständig überlappt (302). Damit könnte die Quantifizierung nur einer Atg8-Form nicht alle Autophagosomen berücksichtigen und der Anteil Atg8-positiver *F.n.n.* in dieser Studie zu gering ausfallen. Auch *F. tularensis* assoziiert in geringem Maß (2-5%) mit Ubiquitin, SQSTM1 und dem Adapterprotein *neighbor of BRCA1* (NBR1). Das Bakterium blockiert die Weiterführung in Autophagosomen, da nur 30% aller SQSTM1-positiven Bakterien mit Atg8 assoziieren und verhindert damit den Abbau im Autophagolysosom (71).

Um zu untersuchen, ob *F.n.n.* die Autophagie direkt beeinflusst, wurden die mRNA-Level von *atg8a* und *sqstm1* im Infektionsverlauf mittels RT-PCR analysiert (Abb. 3.12). Mit *F.n.n.* infizierte *Dictyostelium*-Zellen wiesen leicht erhöhte Mengen *atg8* mRNA von 2-6 hpi auf. Ab 24 hpi konnten hingegen keine Unterschiede zur Mock-Kontrolle festgestellt werden. Auch die *sqstm1*-Transkription war geringfügig zwischen 6 und 24 hpi erhöht, jedoch nicht signifikant. Transkriptionsanalysen von *F. tularensis* infizierten humanen Monozyten zeigten dagegen eine Herabregulation von Autophagie-assoziierten Genen für die Nukleation (*beclin1*) und Elongation (u.a. *atg5*, *atg12*) des Autophagosoms (69). Demgegenüber waren *atg8A* und *atg8B* erhöht. Dies impliziert möglicherweise, dass *atg8* kein repräsentatives Gen zur Darstellung der Autophagie-Aktivität ist. Des Weiteren ist die Datenlage zur Regulation der Autophagie-Gene in Makrophagen durch *F. tularensis* ungenügend. Die Mikroarray-Analyse der Autophagie-Gene wurde nur zum Zeitpunkt 24 hpi durchgeführt und berücksichtigt damit nicht die frühe Infektionsphase mit dem Ausbruch aus dem Phagosom und dem Beginn der *Autophagie/Francisella*-Interaktion. Gemäß zeigten Proteomanalysen eine Induktion der autophagosomalen Maschinerie kurz nach Aufnahme der Bakterien und beweisen damit, dass sich die

Interaktion von *Francisella* und Wirtszelle im Infektionsverlauf ändert (234). Um ein Gesamtbild der Autophagie-Genregulation im gesamten Infektionsverlauf zu bekommen, sollte die Transkription weiterer Atg-Faktoren im *Dictyostelium/F.n.n.*-System zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert werden. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse eine Interaktion von *F.n.n.* mit der Autophagie-Maschinerie, welche dem humanen Makrophagenmodell ähnelt.

Um den Einfluss der Autophagie auf den Infektionsverlauf im *Dictyostelium/F.n.n.*-System zu untersuchen, wurde das *F.n.n.*-Wachstum in Zellen mit beeinträchtigter Autophagie ($\Delta atg1$) beobachtet (Abb. 3.13). Sowohl Mikroskopie als auch Durchflusszytometrie zeigten eine erhöhte Replikation von *F.n.n.* in Abwesenheit von Autophagie und offenbarten damit eine defensive Rolle der Autophagie gegen *F.n.n.* Für *F. tularensis* kann die Autophagie je nach Modellsystem verschiedene Auswirkungen haben. In murinen Makrophagen werden nur Replikations-defiziente Bakterien mittels Autophagie abgebaut und die Deletion von Atg5 hat keine Auswirkungen auf die Replikation (71). Dagegen ist das bakterielle Wachstum in embryonalen Mausfibroblasten in Abwesenheit von Atg5 erhöht, während eine Atg5-unabhängige Autophagie gleichzeitig essentielle Aminosäuren liefert und die Replikation von *F. tularensis* fördert (72). Die relativ geringe Atg8-Assoziation von *F.n.n.* lässt eine teilweise Blockierung des autophagosomalen Abbaus vermuten. Im Gegensatz zum Humanpathogen ist *F.n.n.* jedoch nicht in der Lage die Degradation in Autophagolysosomen in *Dictyostelium* vollständig zu unterdrücken. *Francisella* könnte die Fähigkeit Autophagie zu unterdrücken oder auszunutzen mit der Infektion von Säugetieren erworben haben. Somit wäre es interessant zu untersuchen, welche Rolle die Autophagie im Zebrafischmodell einnimmt und ob *F.n.n.* diese blockieren kann. Die langsame Replikationsgeschwindigkeit von *F.n.n.* in Zebrafischembryos (Generationszeit: 43 h) könnte, ähnlich wie in *Dictyostelium*, durch einen geringen aber konstanten Abbau in Autophagosomen bedingt sein (117).

In der Literatur wird diskutiert, ob Autophagie die phagosomale Reifung beeinflusst (236, 237). Um auszuschließen, dass eine veränderte phagosomale Reifung in $\Delta atg1$ -Zellen für das erhöhte *F.n.n.*-Wachstum verantwortlich ist, wurde die p80-, VatA- und Ubiquitin-Assoziation mit *F.n.n.* in der Deletionsmutante untersucht. Die Abwesenheit von Autophagie hatte keine Auswirkungen auf die p80- und VatA-Assoziation des *F.n.n.*-Kompartiments, so dass weder der phagosomale Ausbruch noch die Ansäuerung in $\Delta atg1$ -Zellen verändert waren. Zudem unterschieden sich

wt- und $\Delta atg1$ -Zellen nicht in der Aufnahme und Exozytose von Bakterien, da beide eine vergleichbare Bakterienlast zwischen 1-6 hpi aufwiesen. Eine erhöhte Anzahl lebender, cytosolischer *F.n.n.* zu Beginn der Replikationsphase ab 6 hpi ist somit nicht für das erhöhte Wachstum in $\Delta atg1$ -Zellen verantwortlich. Demgegenüber nahm die Anzahl ubiquitinerter *F.n.n.* in $\Delta atg1$ -Zellen ab 24 hpi progressiv zu. Dies zeigt, dass cytosolische Bakterien im *atg1*-Mutanten tatsächlich nicht mehr in Autophagosomen gelangen können und somit effizienter replizieren. Zudem zeigt es, dass der Grund für den geringen Anteil Ubiquitin- und SQSTM1-positiver *F.n.n.* eine konstitutive Degradation der Bakterien sein kann. Die Strategie von *M. marinum*, das sich vor der Autophagie mittels Abwurf von Oberflächenproteinen (*shedding*) schützt (303), scheint auf *F.n.n.* nicht zuzutreffen. Das O-Antigen in der Kapsel von *F. tularensis* trägt zur Vermeidung von Autophagie in Makrophagen bei (304). Wie zuvor diskutiert, scheinen die Kapseln von *F. tularensis* und *F.n.n.* sich in ihrer Zusammensetzung zu unterscheiden (4.4) und damit möglicherweise auch in ihrer Fähigkeit Autophagie zu vermeiden.

Die Induktion von Autophagie durch Medikamente wird wirksam gegen Pathogene eingesetzt, z.B. Tat-Beclin1 gegen Arboviren (305) oder Statine gegen *M. tuberculosis* (306). Die bakterizide Wirkung von Autophagie im *Dictyostelium/F.n.n.*-System bestätigt diesen Abwehrmechanismus als mögliches Therapieziel gegen *Francisella*. Eine anti-bakterielle Wirkung des Autophagie-induzierenden Wirkstoffs, AR-12, gegen *F. tularensis* konnte bereits *in vitro* und *in vivo* in Mäusen nachgewiesen werden (70, 307). Der Mechanismus ist weitestgehend unbekannt, aber richtet sich vermutlich gegen nicht-replizierende Bakterien am Anfang und Ende des Infektionszyklus, wenn die Bakterien sich in vakuolären Strukturen aufhalten. Die Entwicklung eines Autophagie-induzierenden Wirkstoffs im *Dictyostelium*-System könnte viel zum Verständnis der Pathogen/Autophagie-Interaktion für *Francisella* und andere Pathogene beitragen.

4.7 Nramp1 und NrampB tragen zur Resistenz gegen *F.n.n.* bei

Prinzipiell ist Eisen sowohl für den Wirt als auch für bakterielle Erreger ein essentieller Cofaktor für enzymatische Reaktionen und wird vom Wirt während der Infektion straff reguliert (92). Säuger reagieren auf Infektionen durch Hypoferrämie, dem Absenken des Eisengehalt in der extrazellulären Flüssigkeit und im Blutplasma

(308). Dieser Prozess wurde auch bei der Tularämie in Menschen beobachtet (309). In Makrophagen ist der Eisen- und Mangantransporter Nramp1 ausschließlich im Phagosom lokalisiert und vermittelt Resistenz gegenüber mehreren intrazellulären Pathogenen, wie *M. tuberculosis*, *L. pneumophila* und Leishmanien (194-196). Über den Einfluss der Eisenhomeostase und die damit verbundene Relevanz von Nramp-Transportern auf cytosolische Bakterien ist wenig bekannt. Deswegen sollte in dieser Arbeit die Rolle von Nramp1 und NrampB für *Francisella* im *Dictyostelium/F.n.n.*-System charakterisiert wurde.

In *Dictyostelium* wird Nramp1, wie das Makrophagen-Ortholog, zum Phagosom bzw. Makropinosom rekrutiert (156). Auch das FEP rekrutiert Nramp1 progressiv bis 1 hpi und verliert es ab 2 hpi zügig (Abb. 3.15). Ab 4 hpi ist kaum noch eine Assoziation des Eisentransporters mit dem FEP zu beobachten. Der Verlust von Nramp1 ist IgIC-abhängig, da der Anteil Nramp1-positiver *F.n.n.* Δ igIC ab 1 hpi konstant bleibt. Ab 4 hpi waren jedoch nicht genügend intrazelluläre Δ igIC-Bakterien für eine zuverlässige Quantifizierung vorhanden. *F.n.n.* scheint somit aktiv den Abtransport von Nramp1 zu bewirken. *L. pneumophila* verfolgt in *Dictyostelium* dagegen eine andere Strategie und Nramp1 bleibt über 24 hpi konstant am Phagosom lokalisiert (223). Die Autoren vermuten, dass der Abtransport der V-ATPase und die Reneutralisierung des *Legionella*-Kompartiments zur Umkehr der Transportrichtung von Nramp1 führen. *Legionella* würde damit essentielles Eisen in seiner Replikationsnische behalten, während dies für cytosolisch wachsende *Francisella* keine Rolle spielt.

NrampB ist in *Dictyostelium* an der kontraktilen Vakuole lokalisiert und reguliert synergistisch mit Nramp1 die Eisenhomeostase der Zelle (209). In dieser Studie lokalisierte NrampB nicht am FEP und konnte auch von Peracino *et al.* nicht an TRITC-Dextran-positiven Makropinosomen beobachtet werden (209). Damit scheinen die kontraktile Vakuole und der endolysosomale Weg nicht in direktem Austausch miteinander zu stehen. NrampB hat in seiner Transporterfunktion somit keinen direkten Einfluss auf die Umgebung von *F.n.n.* innerhalb des Phagosoms.

Die Aufnahme von *F.n.n.* führt zu einer Absenkung der Menge von *nramp1*-mRNA in der frühen Infektionsphase im Vergleich zur Mock- und Phagozytosekontrolle (Abb. 3.16). Sillo *et al.* stellten mittels Mikroarray- und Northernblotanalyse eine Herabregulation von *nramp1* mRNA-Leveln durch die Phagozytose von *E. coli* fest (208). Abweichende Ergebnisse für die Phagozytosekontrolle zwischen dieser Studie und Sillo *et al.* könnten durch den Unterschied zwischen *E. coli* und inerten Partikeln,

sowie in der Verwendung verschiedener Messmethoden liegen. Ob *F.n.n.* die Transkription von *nramp1* als pathogenes Bakterium aktiv herunterreguliert oder der Effekt generell durch die Aufnahme von Bakterien ausgelöst wird, lässt sich damit nicht bestimmen. Eine verringerte Expression würde jedoch mit dem oben diskutierten Abtransport übereinstimmen und würde eine geringere Nramp1-Aktivität am Phagosom bewirken. Auch *L. pneumophila* reguliert die Transkription von *nramp1* im Infektionsverlauf herab, vermutlich um den Transport von Eisen aus seinem Kompartiment zu unterdrücken (156). Des Weiteren ist jedoch bekannt, dass Nramp1 die antibakterielle Aktivität im Phagosom von *Salmonella* und *M. bovis* in Makrophagen fördert (198-200). Die Herabregulation von Nramp1 könnte also dem Überleben von *F.n.n.* im Phagosom durch die Behinderung der phagosomalen Reifung dienen.

Im Gegensatz zu *nramp1* ist *nrampB* bei der genomweiten Analyse nicht als ein durch Phagozytose oder Kultivierung mit *E. coli* reguliertes Gen identifiziert worden (208). Auch durch *F.n.n.* wird *nrampB* lediglich direkt nach der Aufnahme (0,5 hpi) geringfügig herabreguliert und bleibt anschließend unverändert.

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Nramp-Transporter auf die *Francisella*-Infektion in *Dictyostelium* besitzen, wurde der *F.n.n.*-Infektionsverlauf in $\Delta nramp1$ - und $\Delta nrampB$ -Zellen sowie der Doppelmutante $\Delta nramp1/B$ untersucht. Das *F.n.n.*-Wachstum war in allen Nramp-Deletionsmutanten im Vergleich zum wt erhöht und zeigt damit eine Beteiligung der Nramp-Transporter an der Resistenz gegenüber *Francisella*. Auch *L. pneumophila* und *M. avium* weisen eine höhere Replikation in Abwesenheit von Nramp1 und, zumindest für *L. pneumophila*, von NrampB auf. Diese Pathogene replizieren im Gegensatz zu *F.n.n.* jedoch intravakuolär (156, 209) und besitzen in ihrer Replikationsphase vollkommen andere Ansprüche an ihre Umgebung. *F.n.n.* besitzt hingegen zwei zelluläre Phasen, so dass Nramp1 und NrampB Einfluss auf phagosomale und cytosolische Bakterien haben könnten. Damit übereinstimmend fördert Nramp1 zum einen die phagosomale Reifung und reguliert die Verfügbarkeit von Eisen im Phagosom und im Cytosol (197). Im Kompartiment replizierende Bakterien kontrolliert Nramp1 wahrscheinlich durch den Export von Eisen aus dem Phagosom (156, 209). *F.n.n.* wird *in vitro* jedoch mit einem Überfluss von Eisen kultiviert und hat für seine kurze phagosomale Phase damit genügend Eisen in intrazellulären Speichern eingelagert. Ganz im Gegenteil kann ein zu hoher Eisenanteil der Bakterien im Phagosom sogar antibakteriell wirken, da es als Teil der

Fenton-Reaktion die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) katalysieren kann. *F.t.tularensis* ist aufgrund seines niedrigeren Eisengehaltes weniger anfällig für H₂O₂-induzierte Abtötung im Phagosom als der schwach pathogene LVS (99). Abgesehen von der Beeinflussung des Eisengehalts im Phagosoms ist Nramp1 an der phagosomalen Reifung mehrerer Pathogene beteiligt. Der Eisentransporter führt zu einer verstärkten Ansäuerung und Fusion des Phagosoms mit Lysosomen während der Infektion mit Mykobakterien und *Salmonella* (198, 199, 310). Zudem fördert die Nramp1-Expression an der Membran des *Salmonella*-Kompartiments die Zugänglichkeit für neu formierte Endosomen und fördert damit die phagosomale Reifung (200). Die Bakterien werden durch Nramp1 also einer bakteriziden Umgebung ausgeliefert.

Um zu überprüfen, ob die phagosomale Reifung von *F.n.n.* durch die Nramps beeinflusst wird, wurde die p80-Assoziation und damit der Anteil ausbrechender Bakterien bestimmt (Abb. 3.19). Zum Zeitpunkt 6 hpi waren in den Nramp-Mutanten weniger Bakterien mit p80 als im wt assoziiert, was auf einen beschleunigten Austritt aus dem Phagosom hinweist. Der Grund dafür ist wahrscheinlich ein höherer Anteil lebender Bakterien, die in der Lage sind ins Cytosol zu wandern. Eine Untersuchung der Ansäuerung und proteolytischen Aktivität in den Nramp-Deletionsmutanten könnte zeigen, ob die Eisentransporter zur bakteriziden Aktivität im FEP beitragen. Dies wäre möglich durch die Fluoreszenzmessung von phagozytierten Latexkugeln, welche mit pH- oder Protease-sensitiven Fluorophoren gekoppelt sind. Des Weiteren könnte die Analyse der VatA- und Neutralrot-Assoziation am Phagosom mögliche Auswirkungen der Nramps auf die phagosomale Reifung von *F.n.n.* aufzeigen. Da NrampB nicht am Phagosom lokalisiert, scheint die Eisenhomeostase innerhalb der Zelle indirekt Einfluss auf die phagosomale Reifung zu besitzen. Dies würde auch das erhöhte Wachstum von *Legionella* in Δ nrampB-Zellen erklären, das die Autoren lediglich mit einer Beeinflussung grundlegender Zellprozess durch die gestörte Eisenhomeostase erklärten (209).

F.n.n. ist in der Lage effizient im Cytosol der Nramp-Mutanten zu replizieren, obwohl diese einen verringerten zellulären Eisengehalt aufweisen (209). Deswegen wurde mittels RT-PCR untersucht, ob *F.n.n.* mit der Hochregulation seiner Eisentransporter die eisenreduzierte Umgebung in den Nramp-Mutanten ausgleichen kann. Da aquatische *Francisella*-Spezies nicht über das typische *fsI*-Eisentransportsystem von humanpathogenen Vertretern verfügen (82), mussten andere Faktoren zur

Eisenakkumulation gesucht werden. Durch bioinformatische Analysen wurden Gene identifiziert, die eine Bindesequenz des Transkriptionsfaktors Fur vor dem Startcodon aufweisen, eine Fur-Box (97). Da das Genom von *F.n.n.* nicht annotiert ist, wurden Fur-regulierte Gene in der nahe verwandten Spezies *F.n.o.* identifiziert. Neben bekannten Genen zur Eisenakquisition (*feoA*) wiesen auch Gene von FPI-Faktoren (*iglC*, *iglE*, *pdpA*), Typ-1- und Typ-2-Sekretionssystemen und Oxidationsstress (*uvrB*, *msrA/B*) eine Fur-Box auf (Anhang 1). Damit werden die Virulenz und der Schutz vor ROS-induziertem Oxidationsstress in *F.n.n.* vermutlich durch den Eisengehalt der Umgebung reguliert.

Unter Eisenmangel wurden *feoA* und *iucA/C* stark hochreguliert (Abb. 3.18) Diese Gene codieren für Faktoren des Feo-Systems zur Aufnahme von Fe^{2+} (*feoA*) (95), bzw. eine Siderophor-Synthetase zur Bindung von Fe^{3+} (*iucA/C*) (238). *iglC* wurde im Gegensatz zu den Ergebnissen von Brudal *et al.* nur leicht hochreguliert, was auf leichte Abweichungen der Kultivierungsbedingungen zurückzuführen sein könnte (243). Die Transkription des negativ regulierenden Transkriptionsfaktors Fur wurde in *F.n.n.* übereinstimmend mit *F. tularensis* nicht durch Eisenlimitierung beeinflusst (97). Die Infektion von *Dictyostelium* zeigte, dass Gene der Eisenakquisition (*feoA*, *feoB*, *iucA/C*) in *F.n.n.* während der Infektion hochreguliert werden. Die mRNA-Level von *feoB* und *iucA/C* waren erst ab 6 hpi signifikant erhöht und deuten damit auf einen Eisenmangel und eine verstärkte Eisenaufnahme im Cytosol zwecks Replikation hin. Während die Transkription der Eisentransporter ab 48 hpi abnahm, stieg diese in den Nramp-Mutanten progressiv an. *F.n.n.* reagiert somit auf die erniedrigten Eisenlevel im Cytosol der Mutanten und kann sie durch eine verstärkte Hochregulation der Eisenaufnahme kompensieren und effizient replizieren.

Die Transkription des FPI-Gens *iglC* wird im Übergang zur cytosolischen Phase leicht herabreguliert und unterscheidet sich nicht zwischen den Zelllinien. Wehrly *et al.* beobachteten ein ähnliches Profil mit der niedrigsten *iglC*-Transkription in der frühen cytosolischen Phase (89). Entsprechend wird vermutet, dass ein aktives T6SS im Cytosol durch die Induktion von wirtsvermittelter Abtötung nachteilig für das Bakterium sein könnte (88).

Die Transkription von *fur* wird in allen Zelllinien im Infektionsverlauf herunterreguliert und korreliert negativ mit den Eisentransportern. Dies bestätigt die Funktion von Fur in *F.n.n.* als negativem Transkriptionsfaktor von Genen der Eisenakquirierung. Gleichzeitig jedoch wurde *fur* in phagosomalen Bakterien kurz nach der Infektion im

Vergleich zur *in vitro* Kultivierung hochreguliert. Fur wird vom Transkriptionsfaktor OxyR aktiviert (311), der die oxidative Stressantwort reguliert und durch die Aktivierung von Genen antioxidativer Proteine zum Überleben von *F. tularensis* und anderen Pathogenen beiträgt (312, 313). Die ROS-Abwehr wird wiederum von Fur in diversen Bakterienspezies aktiviert (314-316). Beispielsweise induziert Fur indirekt die Transkription der Fe-Superoxiddismutase (FeSOD) in *E. coli* (317, 318) und der Stickstoffmonoxid-Reduktase (*norB*) in *Neisseria* zum Schutz gegen reaktive Stickstoffspezies (319, 320). Die Produktion von ROS im FEP könnte somit die Transkription von *fur* induziert haben, welches dann zum Schutz vor ROS beiträgt. Zukünftig könnte eine Untersuchung der ROS-Schutzgene in *F.n.n.* mittels RT-PCR die ROS-verbundene Interaktion zwischen *Francisella* und Wirtszelle näher charakterisieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit über die mögliche Funktion der Nramp-Transporter im *Dictyostelium/F.n.n.*-System sind in Abbildung 4.2 zusammengefasst. Die erhöhte Replikation von *F.n.n.* in den $\Delta nramp1$ - und $\Delta nrampB$ -Zellen korreliert mit einem effizienteren Austritt der Bakterien ins Cytosol, wo sie durch eine verstärkte Induktion des Eisentransports effizient wachsen können. Übereinstimmend mit anderen intrazellulären Bakterien fördert Nramp1 vermutlich die phagosomale Reifung des FEP, woraufhin *F.n.n.* Nramp1 aktiv vom Kompartiment abtransportiert und dessen Transkription herabreguliert. Eine Fusion mit Endosomen und Lysosomen könnte in $\Delta nramp1$ -Zellen somit vermindert sein. Auch eine gestörte Eisenhomeostase in $\Delta nrampB$ -Zellen könnte Einfluss auf die Wirtsabwehr im Phagosom haben. Da die Doppeldeletionsmutante keinen additiven Effekt aufzeigt, könnte derselbe Mechanismus für die erhöhte *F.n.n.*-Replikation verantwortlich sein.

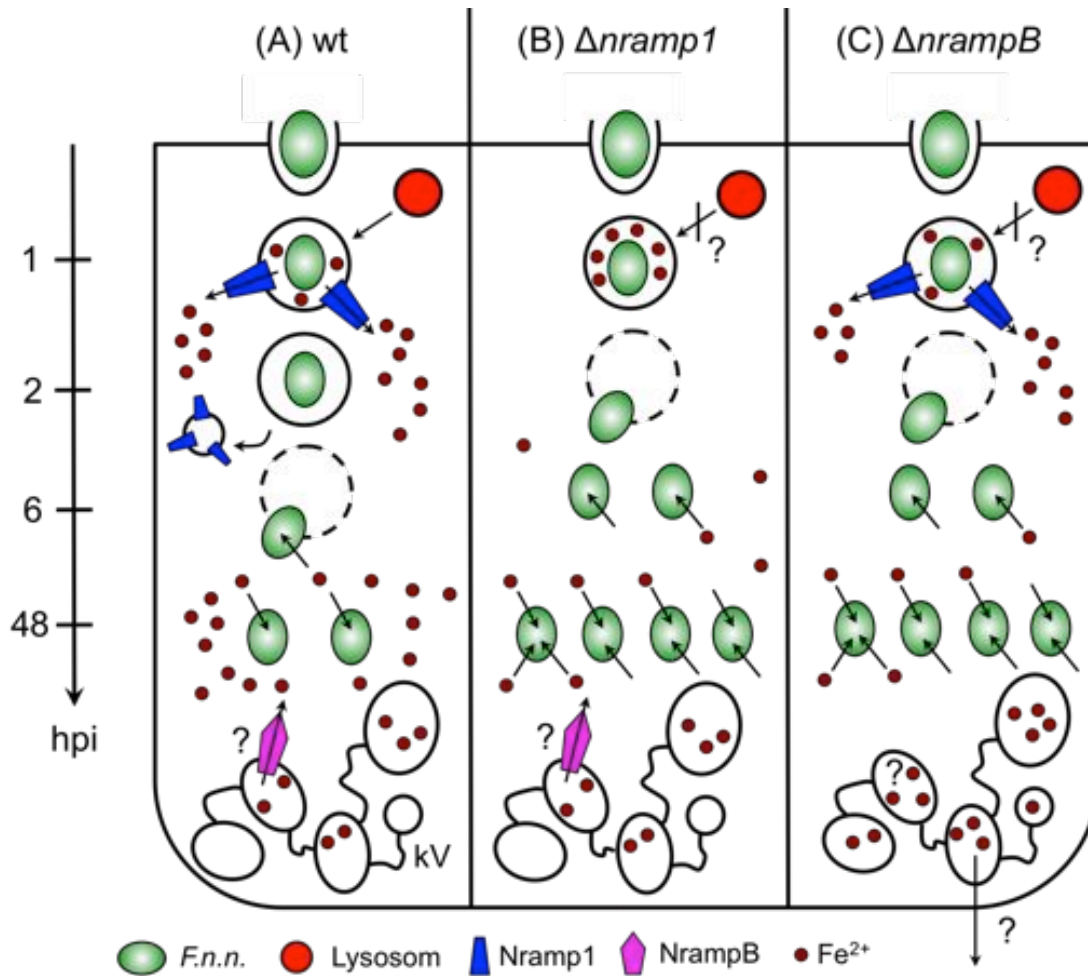


Abbildung 4.2: Modell zur Rolle der Nramp-Transporter im *F.n.n.*-Infektionsverlauf. (A) Nramp1 wird in wt-Zellen nach einer transienten Akkumulation vom FEP abtransportiert. Nach dem Austritt ins Cytosol induziert *F.n.n.* die Transkription von Eisentransportern. (B) In $\Delta nramp1$ -Zellen ist der Eisenexport aus dem Phagosom unterdrückt und der cytosolische Eisengehalt ist verringert (197, 209). *F.n.n.* tritt in Abwesenheit von Nramp1 effizienter aus dem Phagosom aus und kann durch eine verstärkte Induktion der Eisenakkumulation effizient im Cytosol replizieren. (C) Auch in $\Delta nrampB$ -Zellen tritt *F.n.n.* schneller ins Cytosol über und gleicht den erniedrigten Eisengehalt im Cytosol durch eine erhöhte Transkription von Eisentransportern aus. Aufgrund des ungestörten Exports von Fe^{2+} aus dem Phagosom wird Eisen in den eisenreduzierten $\Delta nrampB$ -Zellen vielleicht in der kontraktilen Vakuole gespeichert oder verstärkt ausgeschieden. Der effizientere Ausbruch aus dem Phagosom in den Nramp-Mutanten deutet auf eine fördernde Rolle der Nramps bei der Ansäuerung des Phagosoms und Fusion mit Lysosomen hin. Die Funktion von NrampB in der kontraktilen Vakuole und der Einfluss einer gestörten Eisenhomeostase ist jedoch noch weitestgehend unbekannt.

4.7 Ausblick

Die Wirt/Pathogen-Interaktion von *Francisella* wurde bisher hauptsächlich von der Seite des Pathogens analysiert und viele Virulenzfaktoren wurden mittels *Francisella*-Mutantenscreenings identifiziert (48, 112, 321). Der Einfluss von Wirtsfaktoren lässt sich in Makrophagen nur umständlich bestimmen. Deswegen existiert bis jetzt

lediglich ein RNAi-Screening nach Wirtsfaktoren in *Drosophila*, welches die Wirtsspezifität diverser Faktoren offenbarte (322). *Dictyostelium* ist aufgrund der leichten Generierung und hohen Verfügbarkeit von Deletionsmutanten über das *Dictyostelium Stock Center* (143) sehr gut für die Identifizierung und Charakterisierung von beteiligten Wirtsfaktoren geeignet. Eine simple Methode für die Generierung einer *Dictyostelium*-Mutanten-Bibliothek ist die *restriction enzyme-mediated integration* (REMI)-Mutagenese (165). REMI-Mutanten mit besonders hohem bakteriellen Wachstum könnten mittels Roboter-basierter Mikroskopie identifiziert und anschließend als Deletionsmutanten näher charakterisiert werden.

Für diese Studie ist es wichtig den Mechanismus der Nramp-vermittelten Resistenz näher zu charakterisieren. Viele Studien weisen auf eine Förderung der phagosomalen Reifung durch Nramp1 hin (198-200). Deswegen sollte die phagosomale Reifung in den Nramp-Deletionsmutanten und die Assoziation von Azidifizierungsmarkern, wie Vata und Neutralrot, mit dem FEP analysiert werden. Über den Mechanismus der NrampB-vermittelten Resistenz gegen intrazelluläre Bakterien ist noch nichts bekannt. Es wäre interessant, mehr über den Einfluss der zellulären Eisenhomeostase auf die phagosomale Reifung von *Francisella* in *Dictyostelium* herauszufinden. Hier wäre das Eisen-sensitive Fluorophor Calcein ein nützliches Werkzeug um mehr über die Lokalisation von Eisen während der *Francisella*-Infektion und in der NrampB-Mutante zu erfahren.

Die beobachtete Aktinassemblierung um das Phagosom von *F.n.n.* weist auf eine Aktin-vermittelte Blockierung der phagosomalen Reifung hin, wie sie auch für Mykobakterien beobachtet wurde. Dieser Prozess ist abhängig vom Aktinpolymerisator *Wiskott-Aldrich syndrome protein and SCAR homolog* (WASH) und könnte auch bei *Francisella* zur Blockierung von Lysosomen oder dem Abtransport der V-ATPase führen (271). Um dies für *F.n.n.* zu untersuchen, muss eine genauere Quantifizierung von Aktin am FEP durchgeführt und die Auswirkungen einer Aktindepolymerisation durch Latrunkulin auf die Infektion untersucht werden. Zudem könnte die Lokalisation von WASH am FEP und die Untersuchung des Infektionsverlaufs in der WASH-Deletionsmutante mehr über eine mögliche Rolle von Aktin-Polymerisation für *Francisella* verraten.

Schlussendlich sollten mit dem *Dictyostelium/F.n.n.*-System charakterisierte Mechanismen in Makrophagen mit *F. tularensis* bestätigt werden. Das Zebrafischmodell öffnet als gut charakterisiertes *in vivo* Modell Möglichkeiten, um in

Dictyostelium identifizierte Virulenz- und Abwehrfaktoren in Anwesenheit eines Immunsystems zu analysieren. Das Ziel ist es konservierte Aspekte der Wirt-*Francisella*-Interaktion zu identifizieren und damit der Bekämpfung sowohl der Tularämie als auch der Francisellose im Fisch zu dienen.

III. Anhang

| Gennummer | Genname | Protein | Proteindomäne |
|-----------|--------------|---|---|
| 0029 | | Orotidine 5'-Phosphatdecarboxylase | |
| 0051 | | Unbekannt | |
| 0057 | | Unbekannt | |
| 0083 | <i>lepA</i> | Elongationsfaktor 4 | |
| 0099 | <i>secB</i> | Preprotein Translokase SecB | |
| 0125 | | 4-2-C-Methyl-D-Erythritol-Kinase | |
| 0176 | | Unbekannt | |
| 0209 | <i>rpsB</i> | 30S ribosomales Protein S2 | |
| 0258 | <i>argG</i> | Argininosuccinat-Synthase | |
| 0304 | <i>ubiG</i> | 3-O-Methyltransferase/2-Octaprenyl-6-hydroxy Phenol-Methylase | |
| 0311 | | ABC-Transporter | MlaF, ABC-Transporter und ATPase |
| 0317 | | Unbekannt | Lipoprotein-Bindung |
| 0332 | | Chorismat-Mutase | AroH |
| 0351 | <i>tauE</i> | Sulfit-Exporter | TauE/SafE |
| 0360 | | Transkriptionsregulator np20 | <i>Helix-turn-Helix</i> -Domäne |
| 0428 | <i>ribF</i> | Riboflavin-Kinase/FMN-Adenylyltransferase | FAD-Synthetase, Riboflavin-Kinase |
| 0449 | <i>metG</i> | Methionyl-tRNA-Synthetase | |
| 0452 | | Beta-Lactamase-ähnliches Protein | Metallo-beta-Lactamase |
| 0487 | <i>rsmE</i> | 16S rRNA-Methyltransferase | |
| 0490 | | Mammalian cell entry-Protein | MlaD, ABC-Transporter Mce, <i>mammalian cell entry</i> -Domäne |
| 0506 | | Phosphoribosylformylglycinamidin-Synthase | |
| 0590 | | Sensorprotein QseC | Histidin-Kinase-ähnliche ATPase |
| 0656 | | Drug:H ⁺ -Antiporter | Bcr/CflA-Domäne MFS-Transporter |
| 0663 | | Unbekannt | |
| 0685 | <i>feoA</i> | Feo-Eisentransporter | FeoA-Domäne |
| 0687 | <i>groES</i> | Chaperon | Chapron 10kDa-Untereinheit |
| 0747 | <i>lpxB</i> | Lipid-A-Disaccharide-Synthase | Glykosyltransferase |
| 0781 | | Arginase | TolB |

III. Anhang

| | | | |
|------|---------------|--|-------------------------------------|
| 0804 | | 3-Oxoacyl-Synthase | |
| 0813 | | Zucker-Transamin/Perosamin-Synthase | WbqC-ähnliche Domäne |
| 0842 | <i>gppA</i> | Guanosin-5'-Triphosphat, 3'-diphosphat-Diphosphatase | |
| 0849 | | small-conductance Mechanosensitiver Kanal | MscS-Domäne |
| 0853 | | Unbekannt | |
| 0858 | <i>lysE</i> | Homoserin/Threonin-Effluxprotein | LysE-Typ Translokator |
| 0863 | | ArsR-Familie Transkriptionsfaktor | |
| 0873 | <i>nusB</i> | Transkription-Antiterminationsfaktor | |
| 0912 | | Unbekannt | YCII-Domäne |
| 0933 | <i>iglC</i> | <i>Intracellular growth locus C</i> | |
| 0942 | <i>iglE</i> | <i>Intracellular growth locus E</i> | |
| 0944 | <i>pdpA</i> | Pathogenicity determinant protein A | |
| 1001 | | DsbA/Com1-ähnliches Protein | DsbG, Protein-Disulfid Isomerase |
| 1003 | <i>msrA/B</i> | Methionin-Sulfoxid-Reduktase B/A | SelR-Domäne PMSR-Domäne |
| 1099 | <i>lpxH</i> | UDP-2,3-diacetylglucosamin-Hydrolase | YbbF/LpxH-Metallophosphatase-Domäne |
| 1140 | | 3-Dehydroquinat-Dehydratase | DHQase-Domäne |
| 1144 | | Mechanosensitiver Ionenkanal | MscS-Domäne |
| 1211 | | HlyD-Sekretionsprotein | HlyD |
| 1228 | | Unbekannt | |
| 1247 | | Leucyl-Aminopeptidase | |
| 1253 | <i>uvrA</i> | Excinuklease ABC, Untereinheit A | |
| 1260 | | DNA-3-methyladenin-Glycosylase | |
| 1276 | <i>ushA</i> | 2', 3'-zyklisches Nukleotid 2'-Phosphodiesterase | |
| 1343 | | Unbekannt | |
| 1355 | <i>ruvA</i> | <i>Holliday junction</i> ATP-abhängige DNA-Helikase | |
| 1400 | | Unbekannt | |
| 1412 | | H2MP-like-1, Putative (NiFe) Hydrogenase | |
| 1442 | <i>serC</i> | Phosphoserin-Aminotransferase | |
| 1444 | <i>yceA</i> | Rhodanase-Sulfurtransferase | |
| 1468 | | Syringopeptin-Synthetase C | |
| 1507 | | Nitrilase | |
| 1512 | | Alkaline Phosphatase | Dipeptid/Tripeptid-Permease-Domäne |
| 1514 | | Glutathion-Reduktase | |

| | | | |
|------|------------|--|------------------------|
| 1548 | | Deoxycytidin-Triphosphat Deaminase | |
| 1577 | | Cystein-Desulfurase | |
| 1607 | <i>rpe</i> | Ribulosephosphat 3-Epimerase | |
| 1624 | | Glycosyltransferase | |
| 1626 | | Dehalogenase-ähnliche Hydrolase | HAD-ähnliche Domäne |
| 1704 | | Apolipoprotein N- Acetyltransferase | |
| 1716 | | Glycoprotease | |
| 1746 | | <i>Mammalian taste receptor protein</i> (TAS2R) | |
| 1786 | | Unbekannt | |

IV. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|---|
| α | anti |
| Δ | delta (Deletion) |
| °C | Grad Celsius |
| μm | Mikrometer |
| Abb. | Abbildung |
| ABD | Aktin-bindende Domäne |
| AF | AlexaFluor |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| Atg | <i>autophagy related gene</i> |
| AU | Pinhole-Radius (<i>Airy Unit</i>) |
| bzw. | beziehungsweise |
| cDNA | <i>complementary DNA</i> |
| cm | Zentimeter |
| Ct | <i>Cycle of threshold</i> |
| ddH ₂ O | doppelt destilliertes Wasser |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| Dpi | Punkte pro Inch (<i>dots per inch</i>) |
| DPSS | Diodengepumpter Festkörperlaser (<i>diode pumped solid state</i>) |
| DTT | Dithiothreitol |
| EEA-1 | <i>early endosome antigen-1</i> |
| EM | Elektronenmikroskopie |
| <i>et al.</i> | <i>et alteri</i> (und die jeweils anderen) |
| EP | Elektroporation |
| FACS | Durchflusszytometrie (<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>) |
| FEP | <i>F.n.n.</i> -enthaltendes Phagosom |
| FKS | fetales Kälberserum |
| <i>F.n.n.</i> | <i>Francisella noatunensis</i> subsp. <i>noatunensis</i> |
| <i>F.n.o</i> | <i>Francisella noatunensis</i> subsp. <i>orientalis</i> |
| FPI | Francisella-Pathogenitätsinsel |
| <i>F.t.</i> | <i>Francisella tularensis</i> |
| Fur | <i>ferric uptake regulator</i> |
| fwd | <i>forward</i> |
| g | Gramm |
| GA | Glutaraldehyd |
| Gapdh | Glyceraldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase |
| GFP | Grün fluoreszierende Protein |
| GST | Glutathion-S-Transferase |
| h | Stunden |
| hpi | Stunden nach Infektion (<i>hours post infection</i>) |
| HPF | Hochdruckgefrieren (<i>high pressure freezing</i>) |
| IFA | Immunfluoreszenz-Assay |
| Igl | <i>intracellular growth locus</i> |
| kb | Kilobasenpaare |
| kDa | Kilodalton |
| KFE | Kolonie-formende Einheiten |
| l | Liter |
| Lamp-1 | <i>lysosomal-associated membrane protein-1</i> |

 IV. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|---|
| LB | <i>Lysogeny broth</i> |
| LVS | <i>life vaccine strain</i> |
| LvsB | <i>Large volumesphere B</i> |
| M | Molar |
| mA | Milliampere |
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| MOI | multiplicity of infection |
| mRNA | <i>messenger</i> Ribonukleinsäure |
| ms | Millisekunden |
| mV | Millivolt |
| n | Anzahl der Experimente |
| N.A. | Numerische Apertur |
| NBR1 | <i>neighbor of BCRA1</i> |
| nm | Nanometer |
| nM | Nanomolar |
| Nramp | <i>natural resistance-associated macrophage protein</i> |
| OMV | <i>outer membrane vesicle</i> |
| p | Signifikanz (<i>probability</i>) |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>) |
| Pdp | <i>pathogenicity determinant protein</i> |
| Pi3k | Phosphoinositid-3-Kinase |
| pH | negative dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration |
| PFA | Paraformaldehyd |
| OD | optische Dichte |
| qPCR | quantitative Polymerase-Kettenreaktion |
| REMI | <i>restriction enzyme-mediated integration</i> |
| rev | <i>reverse</i> |
| RFP | Rot fluoreszierendes Protein |
| RNAi | RNA-Interferenz |
| ROS | reaktive Sauerstoffspezies |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>) |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | Reverse Transkription-PCR |
| SEM | Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>) |
| SD | Standardabweichung (<i>standard deviation</i>) |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| SEM | Rasterelektronenmikroskopie (<i>scanning electron microscopy</i>) |
| SQSTM1 | <i>Sequestome1</i> |
| T6SS | Typ-6-Sekretionssystem |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA-Puffer |
| TBS | Tris-gepufferte Salzlösung (<i>Tris buffered saline</i>) |
| TEM | Transmissionselektronenmikroskopie |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| TirA | <i>Toll/Interleukin-1 receptor domain containing protein</i> |
| TRITC | Tetramethylrhodamine |
| U | katalytische Aktivität (<i>units</i>) |
| UV | Ultraviolettstrahlung |
| VatA | vakuoläre ATP-Synthase katalytische Untereinheit A |

IV. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|--|
| V-ATPase | vakuoläre ATPase |
| VgrG | <i>valine-glycine repeat G</i> |
| WASH | <i>Wiskott-Aldrich syndrome protein and SCAR homolog</i> |
| wt | Wildtyp |
| x g | Gravitationskraft |
| z.B. | zum Beispiel |

V. Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Abbildung 1.1: Phylogenie der Gattung <i>Francisella</i> | 1 |
| Abbildung 1.2: Der Lebenszyklus von <i>F. tularensis</i> in humanen Makrophagen | 4 |
| Abbildung 1.3: Modell des <i>Francisella</i> -T6SS | 7 |
| Abbildung 1.4: Phylogenetische Einordnung ausgewählter Eukaryoten auf Grundlage des Proteoms | 12 |
| Abbildung 1.5: Phagosomale Reifung avirulenter Bakterien in <i>Dictyostelium</i> | 14 |
| Abbildung 1.6: Vereinfachter Ablauf der selektiven Autophagie in <i>Dictyostelium</i> | 16 |
| Abbildung 1.7: Lokalisation und Aktivität von Nramp1 und NrampB in <i>Dictyostelium</i> | 19 |
| Abbildung 3.1: Sequenzvergleich der FPI-Gene der Gattung <i>Francisella</i> | 48 |
| Abbildung 3.2: Plaque-Formierung von <i>Dictyostelium</i> | 49 |
| Abbildung 3.3: Infektionsverlauf von <i>F.n.n.</i> wt und $\Delta igIC$ in <i>Dictyostelium</i> | 50 |
| Abbildung 3.4: Die Aufnahme von <i>F.n.n.</i> | 53 |
| Abbildung 3.5: Interaktion von <i>F.n.n.</i> wt und $\Delta igIC$ mit dem endosomalen System | 55 |
| Abbildung 3.6: Assoziation von Vata und Neutralrot mit dem FEP | 57 |
| Abbildung 3.7: Abbau und Exozytose von <i>F.n.n.</i> $\Delta igIC$ | 58 |
| Abbildung 3.8: Cytosolische Translokation von <i>F.n.n.</i> | 60 |
| Abbildung 3.9: Charakterisierung der Kapselregion um <i>F.n.n.</i> | 62 |
| Abbildung 3.10: <i>F.n.n.</i> -Infektionsverlauf bei ektopischer IgIC-Expression in <i>Dictyostelium</i> | 63 |
| Abbildung 3.11: Assoziation von <i>F.n.n.</i> mit autophagosomalen Markern | 65 |
| Abbildung 3.12: Relative mRNA-Level von <i>atg8</i> und <i>sqstm1</i> im Infektionsverlauf | 66 |
| Abbildung 3.13: Infektionsverlauf von <i>F.n.n.</i> in Ax2 $\Delta atg1$ -Zellen | 67 |
| Abbildung 3.14: Phagosomale Reifung und Ubiquitinierung von <i>F.n.n.</i> in Ax2 $\Delta atg1$ -Zellen | 69 |
| Abbildung 3.15: Assoziation von <i>F.n.n.</i> wt und $\Delta igIC$ mit Nramp1-GFP | 70 |
| Abbildung 3.16: Relative mRNA-Mengen von <i>nramp1</i> und <i>nrampB</i> in der frühen Infektionsphase | 71 |
| Abbildung 3.17: Infektionsverlauf von <i>F.n.n.</i> in Nramp-Deletionsmutanten | 72 |
| Abbildung 3.18: p80-Assoziation des FEP in Nramp-Deletionsmutanten | 74 |
| Abbildung 3.19: Transkription von Eisen-assoziierten <i>F.n.n.</i> -Genen der Eisenakkumulation unter Eisenmangel und in Nramp-Deletionsmutanten | 75 |
| Abbildung 4.1: Der Infektionsverlauf von <i>Francisella</i> in <i>Dictyostelium</i> im Vergleich zu humanen Makrophagen und anderen Amöben | 89 |
| Abbildung 4.2: Modell zur Rolle der Nramp-Transporter im <i>F.n.n.</i> -Infektionsverlauf | 100 |

VI. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Bakterien, die *Dictyostelium* erfolgreich infizieren

Tabelle 2.1: Geräte

Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.3 Chemische und biologische Reagenzien

Tabelle 2.4: Lösungen, Puffer und Medien

Tabelle 2.5: Antikörper

Tabelle 2.6: Antikörper

Tabelle 2.7: Kits

Tabelle 2.8: Software

Tabelle 2.9: Knockout-Zelllinien

Tabelle 2.10: Überexprimierende Zelllinien

Tabelle 2.11: Verwendete Zellzahlen während der Infektion

Tabelle 2.12: Primersequenzen für die qPCR

Tabelle 2.13: Reaktionskomponenten der *F.n.n.*-spezifischen qPCR

Tabelle 2.14: Reaktionsbedingungen der *F.n.n.*-spezifischen qPCR

Tabelle 2.15: Reaktionsverlauf der präparativen PCR

Tabelle 2.16: Reaktionskomponenten der präparativen PCR

Tabelle 2.17: Reaktionskomponenten des Restriktionsverdau

Tabelle 2.18: Reaktionskomponenten einer Ligation

Tabelle 2.19: Komponenten von Sammel- und Trenngel für SDS-PAGE

VII. Literaturverzeichnis

1. **McCoy GW.** 1911. A plague-like disease in rodents. *Publ. Health Bull.* **43**:53-71.
2. **McCoy GW, Chapin CW.** 1912. Bacterium tularensis the cause of a plague-like disease of rodents. *Publ. Health Bull.* **53**:17-23.
3. **Francis E.** 1921. Tularemia. I. The occurrence of tularemia in nature as a disease of man. *Publ. Health Rep.* **36**:1731-1753.
4. **Francis E, Mayne B, Lake GC.** 1922. Tularemia Francis 1921: A new disease of man. *Hyg. Lab. Bull.* **130**:1-87.
5. **Olsufiev NG, Emelyanova OS, Dunayeva TN.** 1959. Comparative study of strains of *B. tularensis* in the old and new world and their taxonomy. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* **3**:138-149.
6. **Sjodin A, Svensson K, Ohrman C, Ahlinder J, Lindgren P, Duodu S, Johansson A, Colquhoun DJ, Larsson P, Forsman M.** 2012. Genome characterisation of the genus *Francisella* reveals insight into similar evolutionary paths in pathogens of mammals and fish. *BMC Genomics* **13**:268.
7. **Gao B, Mohan R, Gupta RS.** 2009. Phylogenomics and protein signatures elucidating the evolutionary relationships among the Gammaproteobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**:234-247.
8. **Forsman M, Sandstrom G, Sjostedt A.** 1994. Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. *Int J Syst Bacteriol* **44**:38-46.
9. **Gu Q, Li X, Qu P, Hou S, Li J, Atwill ER, Chen S.** 2015. Characterization of *Francisella* species isolated from the cooling water of an air conditioning system. *Braz J Microbiol* **46**:921-927.
10. **Sjodin A, Ohrman C, Backman S, Larkeryd A, Granberg M, Lundmark E, Karlsson E, Nilsson E, Vallesi A, Tellgren-Roth C, Stenberg P, Thelaus J.** 2014. Complete Genome Sequence of *Francisella endociliophora* Strain FSC1006, Isolated from a Laboratory Culture of the Marine Ciliate *Euplotes raikovi*. *Genome Announc* **2**.
11. **Morner T.** 1992. The ecology of tularaemia. *Rev Sci Tech* **11**:1123-1130.
12. **Champion MD, Zeng Q, Nix EB, Nano FE, Keim P, Kodira CD, Borowsky M, Young S, Koehrsen M, Engels R, Pearson M, Howarth C, Larson L, White J, Alvarado L, Forsman M, Bearden SW, Sjostedt A, Titball R, Michell SL, Birren B, Galagan J.** 2009. Comparative genomic characterization of *Francisella tularensis* strains belonging to low and high virulence subspecies. *PLoS Pathog* **5**:e1000459.
13. **Svensson K, Larsson P, Johansson D, Bystrom M, Forsman M, Johansson A.** 2005. Evolution of subspecies of *Francisella tularensis*. *J Bacteriol* **187**:3903-3908.
14. **McCrumm FR.** 1961. Aerosol Infection of Man with *Pasteurella Tularensis*. *Bacteriol Rev* **25**:262-267.
15. **Vogler AJ, Birdsell D, Price LB, Bowers JR, Beckstrom-Sternberg SM, Auerbach RK, Beckstrom-Sternberg JS, Johansson A, Clare A, Buchhagen JL, Petersen JM, Pearson T, Vaissaire J, Dempsey MP, Foxall P, Engelthaler DM, Wagner DM, Keim P.** 2009. Phylogeography of *Francisella tularensis*: global expansion of a highly fit clone. *J Bacteriol* **191**:2474-2484.

16. **Jounio U, Renko M, Uhari M.** 2010. An outbreak of holarctica-type tularemia in pediatric patients. *Pediatr Infect Dis J* **29**:160-162.
17. **Sandstrom G, Sjostedt A, Forsman M, Pavlovich NV, Mishankin BN.** 1992. Characterization and classification of strains of *Francisella tularensis* isolated in the central Asian focus of the Soviet Union and in Japan. *J Clin Microbiol* **30**:172-175.
18. **Brett ME, Respicio-Kingry LB, Yendell S, Ratard R, Hand J, Balsamo G, Scott-Waldron C, O'Neal C, Kidwell D, Yockey B, Singh P, Carpenter J, Hill V, Petersen JM, Mead P.** 2014. Outbreak of *Francisella novicida* bacteremia among inmates at a louisiana correctional facility. *Clin Infect Dis* **59**:826-833.
19. **Whipp MJ, Davis JM, Lum G, de Boer J, Zhou Y, Bearden SW, Petersen JM, Chu MC, Hogg G.** 2003. Characterization of a novicida-like subspecies of *Francisella tularensis* isolated in Australia. *J Med Microbiol* **52**:839-842.
20. **Keim P, Johansson A, Wagner DM.** 2007. Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*. *Ann N Y Acad Sci* **1105**:30-66.
21. **Abd H, Johansson T, Golovliov I, Sandstrom G, Forsman M.** 2003. Survival and Growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Applied and Environmental Microbiology* **69**:600-606.
22. **Ellis J, Oyston PC, Green M, Titball RW.** 2002. Tularemia. *Clin Microbiol Rev* **15**:631-646.
23. **Moran GJ, Mount J.** 2003. Update on emerging infections: news from the Centers for Disease Control and Prevention. *Ann Emerg Med* **41**:148-151.
24. **Rossow H, Ollgren J, Klemets P, Pietarinen I, Saikku J, Pekkanen E, Nikkari S, Syrjala H, Kuusi M, Nuorti JP.** 2014. Risk factors for pneumonic and ulceroglandular tularaemia in Finland: a population-based case-control study. *Epidemiol Infect* **142**:2207-2216.
25. **Ohara Y, Sato T, Homma M.** 1998. Arthropod-borne tularemia in Japan: clinical analysis of 1,374 cases observed between 1924 and 1996. *J Med Entomol* **35**:471-473.
26. **Evans ME, Gregory DW, Schaffner W, McGee ZA.** 1985. Tularemia: a 30-year experience with 88 cases. *Medicine (Baltimore)* **64**:251-269.
27. **Stewart SJ.** 1996. Tularemia: association with hunting and farming. *FEMS Immunol Med Microbiol* **13**:197-199.
28. **Tarnvik A, Sandstrom G, Sjostedt A.** 1996. Epidemiological analysis of tularemia in Sweden 1931-1993. *FEMS Immunol Med Microbiol* **13**:201-204.
29. **Gill V, Cunha BA.** 1997. Tularemia pneumonia. *Semin Respir Infect* **12**:61-67.
30. **Cowley SC.** 2009. Editorial: Proinflammatory cytokines in pneumonic tularemia: too much too late? *J Leukoc Biol* **86**:469-470.
31. **Gurcan S.** 2014. Epidemiology of tularemia. *Balkan Med J* **31**:3-10.
32. **Desvars A, Furberg M, Hjertqvist M, Vidman L, Sjostedt A, Ryden P, Johansson A.** 2015. Epidemiology and ecology of tularemia in Sweden, 1984-2012. *Emerg Infect Dis* **21**:32-39.
33. **Nelson C, Kugeler K, Petersen J, Mead P.** 2013. Tularemia - United States, 2001-2010. *Mmwr-Morbidity and Mortality Weekly Report* **62**:963-966.
34. **Hofstetter I, Eckert J, Splettstoesser W, Hauri AM.** 2006. Tularaemia outbreak in hare hunters in the Darmstadt-Dieburg district, Germany. *Euro Surveill* **11**:E060119 060113.
35. **Jenzora A, Jansen A, Ranisch H, Lierz M, Wichmann O, Grunow R.** 2008. Seroprevalence study of *Francisella tularensis* among hunters in Germany. *FEMS Immunol Med Microbiol* **53**:183-189.

36. **Jurke A, Bannert N, Brehm K, Fingerle V, Kempf VA, Kompf D, Lunemann M, Mayer-Scholl A, Niedrig M, Nockler K, Scholz H, Splettstoesser W, Tappe D, Fischer SF.** 2015. Serological survey of Bartonella spp., Borrelia burgdorferi, Brucella spp., Coxiella burnetii, Francisella tularensis, Leptospira spp., Echinococcus, Hanta-, TBE- and XMR-virus infection in employees of two forestry enterprises in North Rhine-Westphalia, Germany, 2011-2013. *Int J Med Microbiol* **305**:652-662.
37. **Splettstoesser WD, Piechotowski I, Buckendahl A, Frangoulidis D, Kaysser P, Kratzer W, Kimmig P, Seibold E, Brockmann SO.** 2009. Tularemia in Germany: the tip of the iceberg? *Epidemiol Infect* **137**:736-743.
38. **Enderlin G, Morales L, Jacobs RF, Cross JT.** 1994. Streptomycin and alternative agents for the treatment of tularemia: review of the literature. *Clin Infect Dis* **19**:42-47.
39. **Tigertt WD.** 1962. Soviet Viable Pasteurella-Tularensis Vaccines - Review of Selected Articles. *Bacteriological Reviews* **26**:354-&.
40. **Saslaw S, Eigelsbach HT, Prior JA, Wilson HE, Carhart S.** 1961. Tularemia vaccine study. II. Respiratory challenge. *Arch Intern Med* **107**:702-714.
41. **Saslaw S, Eigelsbach HT, Wilson HE, Prior JA, Carhart S.** 1961. Tularemia vaccine study. I. Intracutaneous challenge. *Archives of internal medicine* **107**:689-701.
42. **Maurin M.** 2015. Francisella tularensis as a potential agent of bioterrorism? *Expert Rev Anti Infect Ther* **13**:141-144.
43. **Oyston PC, Sjostedt A, Titball RW.** 2004. Tularaemia: bioterrorism defence renews interest in Francisella tularensis. *Nat Rev Microbiol* **2**:967-978.
44. **Clemens DL, Horwitz MA.** 2007. Uptake and intracellular fate of Francisella tularensis in human macrophages. *Ann N Y Acad Sci* **1105**:160-186.
45. **McCaffrey RL, Allen LA.** 2006. Francisella tularensis LVS evades killing by human neutrophils via inhibition of the respiratory burst and phagosome escape. *J Leukoc Biol* **80**:1224-1230.
46. **Ben Nasr A, Haithcoat J, Masterson JE, Gunn JS, Eaves-Pyles T, Klimpel GR.** 2006. Critical role for serum opsonins and complement receptors CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) in phagocytosis of Francisella tularensis by human dendritic cells (DC): uptake of Francisella leads to activation of immature DC and intracellular survival of the bacteria. *J Leukoc Biol* **80**:774-786.
47. **Hall JD, Craven RR, Fuller JR, Pickles RJ, Kawula TH.** 2007. Francisella tularensis replicates within alveolar type II epithelial cells in vitro and in vivo following inhalation. *Infect Immun* **75**:1034-1039.
48. **Qin A, Mann BJ.** 2006. Identification of transposon insertion mutants of Francisella tularensis tularensis strain Schu S4 deficient in intracellular replication in the hepatic cell line HepG2. *BMC Microbiol* **6**:69.
49. **Fujita H, Watanabe Y, Sato T, Ohara Y, Homma M.** 1993. The entry and intracellular multiplication of Francisella tularensis in cultured cells: its correlation with virulence in experimental mice. *Microbiol Immunol* **37**:837-842.
50. **Geier H, Celli J.** 2011. Phagocytic receptors dictate phagosomal escape and intracellular proliferation of Francisella tularensis. *Infect Immun* **79**:2204-2214.
51. **Checroun C, Wehrly TD, Fischer ER, Hayes SF, Celli J.** 2006. Autophagy-mediated reentry of Francisella tularensis into the endocytic compartment after cytoplasmic replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:14578-14583.
52. **Clemens DL, Lee BY, Horwitz MA.** 2004. Virulent and avirulent strains of Francisella tularensis prevent acidification and maturation of their phagosomes

- and escape into the cytoplasm in human macrophages. *Infect Immun* **72**:3204-3217.
53. **Santic M, Molmeret M, Klose KE, Jones S, Kwaik YA.** 2005. The *Francisella tularensis* pathogenicity island protein IglC and its regulator MglA are essential for modulating phagosome biogenesis and subsequent bacterial escape into the cytoplasm. *Cell Microbiol* **7**:969-979.
 54. **McNeil PL, Tanasugarn L, Meigs JB, Taylor DL.** 1983. Acidification of phagosomes is initiated before lysosomal enzyme activity is detected. *J Cell Biol* **97**:692-702.
 55. **Bonquist L, Lindgren H, Golovliov I, Guina T, Sjostedt A.** 2008. MglA and Igl proteins contribute to the modulation of *Francisella tularensis* live vaccine strain-containing phagosomes in murine macrophages. *Infect Immun* **76**:3502-3510.
 56. **Chong A, Wehrly TD, Nair V, Fischer ER, Barker JR, Klose KE, Celli J.** 2008. The early phagosomal stage of *Francisella tularensis* determines optimal phagosomal escape and *Francisella* pathogenicity island protein expression. *Infect Immun* **76**:5488-5499.
 57. **Santic M, Asare R, Skrobonja I, Jones S, Abu Kwaik Y.** 2008. Acquisition of the vacuolar ATPase proton pump and phagosome acidification are essential for escape of *Francisella tularensis* into the macrophage cytosol. *Infect Immun* **76**:2671-2677.
 58. **Golovliov I, Baranov V, Krocova Z, Kovarova H, Sjostedt A.** 2003. An attenuated strain of the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* can escape the phagosome of monocytic cells. *Infect Immun* **71**:5940-5950.
 59. **Santic M, Molmeret M, Abu Kwaik Y.** 2005. Modulation of biogenesis of the *Francisella tularensis* subsp. *novicida*-containing phagosome in quiescent human macrophages and its maturation into a phagolysosome upon activation by IFN- γ . *Cell Microbiol* **7**:957-967.
 60. **Larsson P, Oyston PC, Chain P, Chu MC, Duffield M, Fuxelius HH, Garcia E, Halltorp G, Johansson D, Isherwood KE, Karp PD, Larsson E, Liu Y, Michell S, Prior J, Prior R, Malfatti S, Sjostedt A, Svensson K, Thompson N, Vergez L, Wagg JK, Wren BW, Lindler LE, Andersson SG, Forsman M, Titball RW.** 2005. The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. *Nat Genet* **37**:153-159.
 61. **Nano FE, Schmerk C.** 2007. The *Francisella* pathogenicity island. *Ann N Y Acad Sci* **1105**:122-137.
 62. **Barker JR, Chong A, Wehrly TD, Yu JJ, Rodriguez SA, Liu J, Celli J, Arulanandam BP, Klose KE.** 2009. The *Francisella tularensis* pathogenicity island encodes a secretion system that is required for phagosome escape and virulence. *Mol Microbiol* **74**:1459-1470.
 63. **Broms JE, Meyer L, Lavander M, Larsson P, Sjostedt A.** 2012. DotU and VgrG, core components of type VI secretion systems, are essential for *Francisella* LVS pathogenicity. *PLoS One* **7**:e34639.
 64. **Lindgren H, Golovliov I, Baranov V, Ernst RK, Telepnev M, Sjostedt A.** 2004. Factors affecting the escape of *Francisella tularensis* from the phagolysosome. *Journal of medical microbiology* **53**:953-958.
 65. **Schmerk CL, Duplantis BN, Howard PL, Nano FE.** 2009. A *Francisella novicida* pdpA mutant exhibits limited intracellular replication and remains associated with the lysosomal marker LAMP-1. *Microbiology* **155**:1498-1504.

66. **Brotcke A, Weiss DS, Kim CC, Chain P, Malfatti S, Garcia E, Monack DM.** 2006. Identification of MglA-regulated genes reveals novel virulence factors in *Francisella tularensis*. *Infection and immunity* **74**:6642-6655.
67. **Tempel R, Lai XH, Crosa L, Kozlowicz B, Heffron F.** 2006. Attenuated *Francisella novicida* transposon mutants protect mice against wild-type challenge. *Infect Immun* **74**:5095-5105.
68. **Weiss DS, Brotcke A, Henry T, Margolis JJ, Chan K, Monack DM.** 2007. In vivo negative selection screen identifies genes required for *Francisella* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:6037-6042.
69. **Cremer TJ, Amer A, Tridandapani S, Butchar JP.** 2009. *Francisella tularensis* regulates autophagy-related host cell signaling pathways. *Autophagy* **5**:125-128.
70. **Chiu HC, Soni S, Kulp SK, Curry H, Wang D, Gunn JS, Schlesinger LS, Chen CS.** 2009. Eradication of intracellular *Francisella tularensis* in THP-1 human macrophages with a novel autophagy inducing agent. *J Biomed Sci* **16**:110.
71. **Chong A, Wehrly TD, Child R, Hansen B, Hwang S, Virgin HW, Celli J.** 2012. Cytosolic clearance of replication-deficient mutants reveals *Francisella tularensis* interactions with the autophagic pathway. *Autophagy* **8**:1342-1356.
72. **Steele S, Brunton J, Ziehr B, Taft-Benz S, Moorman N, Kawula T.** 2013. *Francisella tularensis* harvests nutrients derived via ATG5-independent autophagy to support intracellular growth. *PLoS Pathog* **9**:e1003562.
73. **Santic M, Pavokovic G, Jones S, Asare R, Kwaik YA.** 2010. Regulation of apoptosis and anti-apoptosis signalling by *Francisella tularensis*. *Microbes Infect* **12**:126-134.
74. **Steele S, Radlinski L, Taft-Benz S, Brunton J, Kawula TH.** 2016. Trophocytosis-associated cell to cell spread of intracellular bacterial pathogens. *Elife* **5**.
75. **Abd H, Johansson T, Golovliov I, Sandstrom G, Forsman M.** 2003. Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* **69**:600-606.
76. **Santic M, Ozanic M, Semic V, Pavokovic G, Mrcic V, Kwaik YA.** 2011. Intra-Vacuolar Proliferation of *F. Novicida* within *H. Vermiformis*. *Front Microbiol* **2**:78.
77. **El-Etr SH, Margolis JJ, Monack D, Robison RA, Cohen M, Moore E, Rasley A.** 2009. *Francisella tularensis* type A strains cause the rapid encystment of *Acanthamoeba castellanii* and survive in amoebal cysts for three weeks postinfection. *Appl Environ Microbiol* **75**:7488-7500.
78. **Molmeret M, Horn M, Wagner M, Santic M, Abu Kwaik Y.** 2005. Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol* **71**:20-28.
79. **Al-Quadan T, Price CT, Abu Kwaik Y.** 2012. Exploitation of evolutionarily conserved amoeba and mammalian processes by *Legionella*. *Trends Microbiol* **20**:299-306.
80. **Ozanic M, Marecic V, Abu Kwaik Y, Santic M.** 2015. The Divergent Intracellular Lifestyle of *Francisella tularensis* in Evolutionarily Distinct Host Cells. *PLoS Pathog* **11**:e1005208.
81. **Nano FE, Zhang N, Cowley SC, Klose KE, Cheung KK, Roberts MJ, Ludu JS, Letendre GW, Meierovics AI, Stephens G, Elkins KL.** 2004. A *Francisella tularensis* pathogenicity island required for intramacrophage growth. *J Bacteriol* **186**:6430-6436.
82. **Sjödin, Svensson, Öhrman, Ahlinder, Lindgren, Duodu, Johansson, Colquhoun, Larsson, Forsman.** 2012. Genome characterisation of the genus

- Francisella reveals insight into similar evolutionary paths in pathogens of mammals and fish. *BMC Genomics* 2012, **12**:1471-2164.
83. **de Bruin OM, Duplantis BN, Ludu JS, Hare RF, Nix EB, Schmerk CL, Robb CS, Boraston AB, Hueffer K, Nano FE.** 2011. The biochemical properties of the Francisella pathogenicity island (FPI)-encoded proteins IglA, IglB, IglC, PdpB and DotU suggest roles in type VI secretion. *Microbiology* **157**:3483-3491.
 84. **Golovliov I, Ericsson M, Sandstrom G, Tarnvik A, Sjostedt A.** 1997. Identification of proteins of Francisella tularensis induced during growth in macrophages and cloning of the gene encoding a prominently induced 23-kilodalton protein. *Infect Immun* **65**:2183-2189.
 85. **Golovliov I, Sjostedt A, Mokrievich A, Pavlov V.** 2003. A method for allelic replacement in Francisella tularensis. *FEMS Microbiology Letters* **222**:273-280.
 86. **Golovliov I, Sjostedt A, Mokrievich A, Pavlov V.** 2003. A method for allelic replacement in Francisella tularensis. *FEMS microbiology letters* **222**:273-280.
 87. **Lauriano CM, Barker JR, Yoon SS, Nano FE, Arulanandam BP, Hassettt DJ, Klose KE.** 2004. MglA regulates transcription of virulence factors necessary for Francisella tularensis intraamoebae and intramacrophage survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:4246-4249.
 88. **Meyer L, Broms JE, Liu X, Rottenberg ME, Sjostedt A.** 2015. Microinjection of Francisella tularensis and Listeria monocytogenes reveals the importance of bacterial and host factors for successful replication. *Infect Immun* **83**:3233-3242.
 89. **Wehrly TD, Chong A, Virtaneva K, Sturdevant DE, Child R, Edwards JA, Brouwer D, Nair V, Fischer ER, Wicke L, Curda AJ, Kupko JJ, 3rd, Martens C, Crane DD, Bosio CM, Porcella SF, Celli J.** 2009. Intracellular biology and virulence determinants of Francisella tularensis revealed by transcriptional profiling inside macrophages. *Cell Microbiol* **11**:1128-1150.
 90. **Clemens DL, Ge P, Lee BY, Horwitz MA, Zhou ZH.** 2015. Atomic structure of T6SS reveals interlaced array essential to function. *Cell* **160**:940-951.
 91. **Broms JE, Meyer L, Sun K, Lavander M, Sjostedt A.** 2012. Unique substrates secreted by the type VI secretion system of Francisella tularensis during intramacrophage infection. *PLoS One* **7**:e50473.
 92. **Schaible UE, Kaufmann SH.** 2004. Iron and microbial infection. *Nat Rev Microbiol* **2**:946-953.
 93. **Dlouhy AC, Outten CE.** 2013. The iron metallome in eukaryotic organisms. *Met Ions Life Sci* **12**:241-278.
 94. **Sullivan JT, Jeffery EF, Shannon JD, Ramakrishnan G.** 2006. Characterization of the siderophore of Francisella tularensis and role of fslA in siderophore production. *J Bacteriol* **188**:3785-3795.
 95. **Thomas-Charles CA, Zheng H, Palmer LE, Mena P, Thanassi DG, Furie MB.** 2013. FeoB-mediated uptake of iron by Francisella tularensis. *Infect Immun* **81**:2828-2837.
 96. **Perez N, Johnson R, Sen B, Ramakrishnan G.** 2016. Two parallel pathways for ferric and ferrous iron acquisition support growth and virulence of the intracellular pathogen Francisella tularensis Schu S4. *Microbiologyopen* **5**:453-468.
 97. **Deng K, Blick RJ, Liu W, Hansen EJ.** 2006. Identification of Francisella tularensis genes affected by iron limitation. *Infect Immun* **74**:4224-4236.

98. **Hiraishi H, Terano A, Ota S, Mutoh H, Razandi M, Sugimoto T, Ivey KJ.** 1991. Role for iron in reactive oxygen species-mediated cytotoxicity to cultured rat gastric mucosal cells. *Am J Physiol* **260**:G556-563.
99. **Lindgren H, Honn M, Salomonsson E, Kuoppa K, Forsberg A, Sjostedt A.** 2011. Iron content differs between *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* and subspecies *holarctica* strains and correlates to their susceptibility to H₂O₂-induced killing. *Infect Immun* **79**:1218-1224.
100. **Soldati T, Neyrolles O.** 2012. Mycobacteria and the intraphagosomal environment: take it with a pinch of salt(s)! *Traffic* **13**:1042-1052.
101. **Eigelsbach HT, Downs CM.** 1961. Prophylactic effectiveness of live and killed tularemia vaccines. I. Production of vaccine and evaluation in the white mouse and guinea pig. *Journal of immunology* **87**:415-425.
102. **Mc CF, Jr., Snyder MJ, Woodward TE.** 1957. Studies on human infection with *Pasteurella tularensis*; comparison of streptomycin and chloramphenicol in the prophylaxis of clinical disease. *Trans Assoc Am Physicians* **70**:74-79; discussion 79-80.
103. **Lyons CR, Wu TH.** 2007. Animal models of *Francisella tularensis* infection. *Francisella Tularensis: Biology, Pathogenicity, Epidemiology, and Biodefense* **1105**:238-265.
104. **Fortier AH, Slayter MV, Ziemba R, Meltzer MS, Nacy CA.** 1991. Live vaccine strain of *Francisella tularensis*: infection and immunity in mice. *Infect Immun* **59**:2922-2928.
105. **Kieffer TL, Cowley S, Nano FE, Elkins KL.** 2003. *Francisella novicida* LPS has greater immunobiological activity in mice than *F. tularensis* LPS, and contributes to *F. novicida* murine pathogenesis. *Microbes Infect* **5**:397-403.
106. **Hornick RB, Eigelsbach HT.** 1966. Aerogenic immunization of man with live Tularemia vaccine. *Bacteriol Rev* **30**:532-538.
107. **Bolger CE, Forestal CA, Italo JK, Benach JL, Furie MB.** 2005. The live vaccine strain of *Francisella tularensis* replicates in human and murine macrophages but induces only the human cells to secrete proinflammatory cytokines. *J Leukoc Biol* **77**:893-897.
108. **Balla KM, Troemel ER.** 2013. *Caenorhabditis elegans* as a model for intracellular pathogen infection. *Cell Microbiol* **15**:1313-1322.
109. **Panayidou S, Ioannidou E, Apidianakis Y.** 2014. Human pathogenic bacteria, fungi, and viruses in *Drosophila*: disease modeling, lessons, and shortcomings. *Virulence* **5**:253-269.
110. **Bozzaro S.** 2013. The model organism *Dictyostelium discoideum*. *Methods Mol Biol* **983**:17-37.
111. **Santic M, Akimana C, Asare R, Kouokam JC, Atay S, Abu Kwaik Y.** 2009. Intracellular fate of *Francisella tularensis* within arthropod-derived cells. *Environmental Microbiology* **11**:1473-1481.
112. **Ahlund MK, Ryden P, Sjostedt A, Stoven S.** 2010. Directed screen of *Francisella novicida* virulence determinants using *Drosophila melanogaster*. *Infect Immun* **78**:3118-3128.
113. **Asare R, Akimana C, Jones S, Abu Kwaik Y.** 2010. Molecular bases of proliferation of *Francisella tularensis* in arthropod vectors. *Environ Microbiol* **12**:2587-2612.

114. **Aperis G, Fuchs BB, Anderson CA, Warner JE, Calderwood SB, Mylonakis E.** 2007. *Galleria mellonella* as a model host to study infection by the *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Microbes Infect* **9**:729-734.
115. **Propst CN, Pylypko SL, Blower RJ, Ahmad S, Mansoor M, van Hoek ML.** 2016. *Francisella philomiragia* Infection and Lethality in Mammalian Tissue Culture Cell Models, *Galleria mellonella*, and BALB/c Mice. *Front Microbiol* **7**:696.
116. **Nix EB, Cheung KK, Wang D, Zhang N, Burke RD, Nano FE.** 2006. Virulence of *Francisella* spp. in chicken embryos. *Infect Immun* **74**:4809-4816.
117. **Brudal E, Ulanova LS, E OL, Rishovd AL, Griffiths G, Winther-Larsen HC.** 2014. Establishment of three *Francisella* infections in zebrafish embryos at different temperatures. *Infect Immun* **82**:2180-2194.
118. **Vojtech LN, Sanders GE, Conway C, Ostland V, Hansen JD.** 2009. Host immune response and acute disease in a zebrafish model of *Francisella* pathogenesis. *Infect Immun* **77**:914-925.
119. **Meeker ND, Trede NS.** 2008. Immunology and zebrafish: spawning new models of human disease. *Dev Comp Immunol* **32**:745-757.
120. **Trede NS, Langenau DM, Traver D, Look AT, Zon LI.** 2004. The use of zebrafish to understand immunity. *Immunity* **20**:367-379.
121. **Lin B, Chen S, Cao Z, Lin Y, Mo D, Zhang H, Gu J, Dong M, Liu Z, Xu A.** 2007. Acute phase response in zebrafish upon *Aeromonas salmonicida* and *Staphylococcus aureus* infection: striking similarities and obvious differences with mammals. *Mol Immunol* **44**:295-301.
122. **Sanders GE, Batts WN, Winton JR.** 2003. Susceptibility of zebrafish (*Danio rerio*) to a model pathogen, spring viremia of carp virus. *Comp Med* **53**:514-521.
123. **Swaim LE, Connolly LE, Volkman HE, Humbert O, Born DE, Ramakrishnan L.** 2006. *Mycobacterium marinum* infection of adult zebrafish causes caseating granulomatous tuberculosis and is moderated by adaptive immunity. *Infect Immun* **74**:6108-6117.
124. **Mikalsen J, Olsen AB, Rudra H, Moldal T, Lund H, Djonne B, Bergh O, Colquhoun DJ.** 2009. Virulence and pathogenicity of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* for Atlantic cod, *Gadus morhua* L., and laboratory mice. *J Fish Dis* **32**:377-381.
125. **Colquhoun DJ, Duodu S.** 2011. *Francisella* infections in farmed and wild aquatic organisms. *Vet Res* **42**:47.
126. **Birkbeck TH, Bordevik M, Froystad MK, Baklien A.** 2007. Identification of *Francisella* sp. from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Chile. *Journal of fish diseases* **30**:505-507.
127. **Jeffery KR, Stone D, Feist SW, Verner-Jeffreys DW.** 2010. An outbreak of disease caused by *Francisella* sp. in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* at a recirculation fish farm in the UK. *Dis Aquat Organ* **91**:161-165.
128. **Kamaishi T, Miwa S, Goto E, Matsuyama T, Oseko N.** 2010. Mass mortality of giant abalone *Haliotis gigantea* caused by a *Francisella* sp. bacterium. *Diseases of aquatic organisms* **89**:145-154.
129. **Mauel MJ, Soto E, Moralis JA, Hawke J.** 2007. A piscirickettsiosis-like syndrome in cultured Nile tilapia in Latin America with *Francisella* spp. as the pathogenic agent. *J Aquat Anim Health* **19**:27-34.
130. **Olsen AB, Mikalsen J, Rode M, Alfjorden A, Hoel E, Straum-Lie K, Haldorsen R, Colquhoun DJ.** 2006. A novel systemic granulomatous inflammatory disease in farmed Atlantic cod, *Gadus morhua* L., associated with a bacterium belonging to the genus *Francisella*. *J Fish Dis* **29**:307-311.

131. **Nylund A, Ottem KF, Watanabe K, Karlsbakk E, Krossoy B.** 2006. *Francisella* sp. (Family Francisellaceae) causing mortality in Norwegian cod (*Gadus morhua*) farming. *Arch Microbiol* **185**:383-392.
132. **Soto E, McGovern-Hopkins K, Klinger-Bowen R, Fox BK, Brock J, Antonio N, Waal Z, Rushton S, Mill A, Tamaru CS.** 2013. Prevalence of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in cultured tilapia on the island of Oahu, Hawaii. *J Aquat Anim Health* **25**:104-109.
133. **Birkbeck TH, Bordevik M, Froystad MK, Baklien A.** 2007. Identification of *Francisella* sp. from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Chile. *J Fish Dis* **30**:505-507.
134. **Olsen AB, Mikalsen J, Rode M, Alfjorden A, Hoel E, Straum-Lie K, Haldorsen R, Colquhoun DJ.** 2006. A novel systemic granulomatous inflammatory disease in farmed Atlantic cod, *Gadus morhua* L., associated with a bacterium belonging to the genus *Francisella*. *Journal of fish diseases* **29**:307-311.
135. **Furevik A, Pettersen EF, Colquhoun D, Wergeland HI.** 2011. The intracellular lifestyle of *Francisella noatunensis* in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) leucocytes. *Fish Shellfish Immunol* **30**:488-494.
136. **Cavender JC.** 1973. Geographical Distribution of Acrasieae. *Mycologia* **65**:1044-1054.
137. **Cavender JC, Raper KB.** 1968. Occurrence and Distribution of Acrasieae in Forests of Subtropical and Tropical America. *American Journal of Botany* **55**:504-&.
138. **Eichinger L, Pachebat JA, Glockner G, Rajandream MA, Sugang R, Berriman M, Song J, Olsen R, Szafranski K, Xu Q, Tunggal B, Kummerfeld S, Madera M, Konfortov BA, Rivero F, Bankier AT, Lehmann R, Hamlin N, Davies R, Gaudet P, Fey P, Pilcher K, Chen G, Saunders D, Sodergren E, Davis P, Kerhornou A, Nie X, Hall N, Anjard C, Hemphill L, Bason N, Farbrother P, Desany B, Just E, Morio T, Rost R, Churcher C, Cooper J, Haydock S, van Driessche N, Cronin A, Goodhead I, Muzny D, Mourier T, Pain A, Lu M, Harper D, Lindsay R, Hauser H, et al.** 2005. The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **435**:43-57.
139. **Chisholm RL, Firtel RA.** 2004. Insights into morphogenesis from a simple developmental system. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**:531-541.
140. **Bosgraaf L, Van Haastert PJ.** 2002. A model for cGMP signal transduction in *Dictyostelium* in perspective of 25 years of cGMP research. *J Muscle Res Cell Motil* **23**:781-791.
141. **Fisher PR, Merkl R, Gerisch G.** 1989. Quantitative analysis of cell motility and chemotaxis in *Dictyostelium discoideum* by using an image processing system and a novel chemotaxis chamber providing stationary chemical gradients. *J Cell Biol* **108**:973-984.
142. **Zang JH, Cavet G, Sabry JH, Wagner P, Moores SL, Spudich JA.** 1997. On the role of myosin-II in cytokinesis: division of *Dictyostelium* cells under adhesive and nonadhesive conditions. *Mol Biol Cell* **8**:2617-2629.
143. **Fey P, Dodson RJ, Basu S, Chisholm RL.** 2013. One stop shop for everything *Dictyostelium*: dictyBase and the Dicty Stock Center in 2012. *Methods Mol Biol* **983**:59-92.
144. **Fey P, Kowal AS, Gaudet P, Pilcher KE, Chisholm RL.** 2007. Protocols for growth and development of *Dictyostelium discoideum*. *Nature Protocols* **2**:1307-1316.

145. **Faix J, Kreppel L, Shaulsky G, Schleicher M, Kimmel AR.** 2004. A rapid and efficient method to generate multiple gene disruptions in *Dictyostelium discoideum* using a single selectable marker and the Cre-loxP system. *Nucleic Acids Res* **32**:e143.
146. **Veltman DM, Akar G, Bosgraaf L, Van Haastert PJ.** 2009. A new set of small, extrachromosomal expression vectors for *Dictyostelium discoideum*. *Plasmid* **61**:110-118.
147. **Chen G, Zhuchenko O, Kuspa A.** 2007. Immune-like phagocyte activity in the social amoeba. *Science* **317**:678-681.
148. **Zhang X, Zhuchenko O, Kuspa A, Soldati T.** 2016. Social amoebae trap and kill bacteria by casting DNA nets. *Nat Commun* **7**:10938.
149. **Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A.** 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**:1532-1535.
150. **Calvo-Garrido J, Carilla-Latorre S, Kubohara Y, Santos-Rodrigo N, Mesquita A, Soldati T, Golstein P, Escalante R.** 2010. Autophagy in *Dictyostelium*: genes and pathways, cell death and infection. *Autophagy* **6**:686-701.
151. **Boulais J, Trost M, Landry CR, Dieckmann R, Levy ED, Soldati T, Michnick SW, Thibault P, Desjardins M.** 2010. Molecular characterization of the evolution of phagosomes. *Mol Syst Biol* **6**:423.
152. **de Hostos EL.** 2008. A brief history of the coronin family. *Subcell Biochem* **48**:31-40.
153. **Snyder ML, Fink M, Weichseldorfer M, White T, Berlett M, Stephens K, Shaw E, Zapf A.** 2014. *Dictyostelium discoideum* TirA mediates signaling in response to bacterial prey. *Molecular Biology of the Cell* **25**.
154. **Lardy B, Bof M, Aubry L, Paclet MH, Morel F, Satre M, Klein G.** 2005. NADPH oxidase homologs are required for normal cell differentiation and morphogenesis in *Dictyostelium discoideum*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1744**:199-212.
155. **Journet A, Chapel A, Jehan S, Adessi C, Freeze H, Klein G, Garin J.** 1999. Characterization of *Dictyostelium discoideum* cathepsin D. *J Cell Sci* **112** (Pt **21**):3833-3843.
156. **Peracino B, Wagner C, Balest A, Balbo A, Pergolizzi B, Noegel AA, Steinert M, Bozzaro S.** 2006. Function and mechanism of action of *Dictyostelium* Nramp1 (Slc11a1) in bacterial infection. *Traffic* **7**:22-38.
157. **Duhon D, Cardelli J.** 2002. The regulation of phagosome maturation in *Dictyostelium*. *J Muscle Res Cell Motil* **23**:803-808.
158. **Ravanel K, de Chasse B, Cornillon S, Benghezal M, Zulianello L, Gebbie L, Letourneur F, Cosson P.** 2001. Membrane sorting in the endocytic and phagocytic pathway of *Dictyostelium discoideum*. *Eur J Cell Biol* **80**:754-764.
159. **Clarke M, Kohler J, Arana Q, Liu T, Heuser J, Gerisch G.** 2002. Dynamics of the vacuolar H(+)-ATPase in the contractile vacuole complex and the endosomal pathway of *Dictyostelium* cells. *J Cell Sci* **115**:2893-2905.
160. **Cardelli JA, Richardson J, Miars D.** 1989. Role of acidic intracellular compartments in the biosynthesis of *Dictyostelium* lysosomal enzymes. The weak bases ammonium chloride and chloroquine differentially affect proteolytic processing and sorting. *J Biol Chem* **264**:3454-3463.
161. **Rupper A, Grove B, Cardelli J.** 2001. Rab7 regulates phagosome maturation in *Dictyostelium*. *J Cell Sci* **114**:2449-2460.

162. **Clarke M, Maddera L, Engel U, Gerisch G.** 2010. Retrieval of the vacuolar H-ATPase from phagosomes revealed by live cell imaging. *PLoS One* **5**:e8585.
163. **Bozzaro S, Eichinger L.** 2011. The professional phagocyte *Dictyostelium discoideum* as a model host for bacterial pathogens. *Curr Drug Targets* **12**:942-954.
164. **Cosson P, Zulianello L, Join-Lambert O, Faurisson F, Gebbie L, Benghezal M, Van Delden C, Curty LK, Kohler T.** 2002. *Pseudomonas aeruginosa* virulence analyzed in a *Dictyostelium discoideum* host system. *J Bacteriol* **184**:3027-3033.
165. **Kuspa A.** 2006. Restriction enzyme-mediated integration (REMI) mutagenesis. *Methods Mol Biol* **346**:201-209.
166. **Hagele S, Kohler R, Merkert H, Schleicher M, Hacker J, Steinert M.** 2000. *Dictyostelium discoideum*: a new host model system for intracellular pathogens of the genus *Legionella*. *Cell Microbiol* **2**:165-171.
167. **Solomon JM, Isberg RR.** 2000. Growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*: a novel system for genetic analysis of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol* **8**:478-480.
168. **Hagedorn M, Soldati T.** 2007. Flotillin and RacH modulate the intracellular immunity of *Dictyostelium* to *Mycobacterium marinum* infection. *Cell Microbiol* **9**:2716-2733.
169. **Skriwan C, Fajardo M, Hagele S, Horn M, Wagner M, Michel R, Krohne G, Schleicher M, Hacker J, Steinert M.** 2002. Various bacterial pathogens and symbionts infect the amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Int J Med Microbiol* **291**:615-624.
170. **Pukatzki S, Kessin RH, Mekalanos JJ.** 2002. The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:3159-3164.
171. **Pukatzki S, Ma AT, Sturtevant D, Krastins B, Sarracino D, Nelson WC, Heidelberg JF, Mekalanos JJ.** 2006. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:1528-1533.
172. **Benghezal M, Fauvarque MO, Tournebize R, Froquet R, Marchetti A, Bergeret E, Lardy B, Klein G, Sansonetti P, Charette SJ, Cosson P.** 2006. Specific host genes required for the killing of *Klebsiella* bacteria by phagocytes. *Cell Microbiol* **8**:139-148.
173. **Colucci AM, Peracino B, Tala A, Bozzaro S, Alifano P, Bucci C.** 2008. *Dictyostelium discoideum* as a model host for meningococcal pathogenesis. *Med Sci Monit* **14**:BR134-140.
174. **Aubert DF, Flannagan RS, Valvano MA.** 2008. A novel sensor kinase-response regulator hybrid controls biofilm formation and type VI secretion system activity in *Burkholderia cenocepacia*. *Infect Immun* **76**:1979-1991.
175. **Jia K, Thomas C, Akbar M, Sun Q, Adams-Huet B, Gilpin C, Levine B.** 2009. Autophagy genes protect against *Salmonella typhimurium* infection and mediate insulin signaling-regulated pathogen resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:14564-14569.
176. **Huang J, Brumell JH.** 2014. Bacteria-autophagy interplay: a battle for survival. *Nat Rev Microbiol* **12**:101-114.
177. **Watson RO, Manzanillo PS, Cox JS.** 2012. Extracellular *M. tuberculosis* DNA targets bacteria for autophagy by activating the host DNA-sensing pathway. *Cell* **150**:803-815.

178. **Birmingham CL, Smith AC, Bakowski MA, Yoshimori T, Brumell JH.** 2006. Autophagy controls Salmonella infection in response to damage to the Salmonella-containing vacuole. *J Biol Chem* **281**:11374-11383.
179. **Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, Yamamoto A, Yamaguchi H, Kamimoto T, Nara A, Funao J, Nakata M, Tsuda K, Hamada S, Yoshimori T.** 2004. Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. *Science* **306**:1037-1040.
180. **Tattoli I, Sorbara MT, Vuckovic D, Ling A, Soares F, Carneiro LA, Yang C, Emili A, Philpott DJ, Girardin SE.** 2012. Amino acid starvation induced by invasive bacterial pathogens triggers an innate host defense program. *Cell Host Microbe* **11**:563-575.
181. **Choy A, Dancourt J, Mugo B, O'Connor TJ, Isberg RR, Melia TJ, Roy CR.** 2012. The Legionella effector RavZ inhibits host autophagy through irreversible Atg8 deconjugation. *Science* **338**:1072-1076.
182. **Ogawa M, Yoshimori T, Suzuki T, Sagara H, Mizushima N, Sasakawa C.** 2005. Escape of intracellular Shigella from autophagy. *Science* **307**:727-731.
183. **Yoshikawa Y, Ogawa M, Hain T, Yoshida M, Fukumatsu M, Kim M, Mimuro H, Nakagawa I, Yanagawa T, Ishii T, Kakizuka A, Sztul E, Chakraborty T, Sasakawa C.** 2009. *Listeria monocytogenes* ActA-mediated escape from autophagic recognition. *Nat Cell Biol* **11**:1233-1240.
184. **Beron W, Gutierrez MG, Rabinovitch M, Colombo MI.** 2002. *Coxiella burnetii* localizes in a Rab7-labeled compartment with autophagic characteristics. *Infect Immun* **70**:5816-5821.
185. **Pflaum K, Gerdes K, Yovo K, Callahan J, Snyder ML.** 2012. Lipopolysaccharide induction of autophagy is associated with enhanced bactericidal activity in *Dictyostelium discoideum*. *Biochem Biophys Res Commun* **422**:417-422.
186. **Otto GP, Wu MY, Clarke M, Lu H, Anderson OR, Hilbi H, Shuman HA, Kessin RH.** 2003. Macroautophagy is dispensable for intracellular replication of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*. *Molecular Microbiology* **51**:63-72.
187. **Tung SM, Unal C, Ley A, Pena C, Tunggal B, Noegel AA, Krut O, Steinert M, Eichinger L.** 2010. Loss of *Dictyostelium* ATG9 results in a pleiotropic phenotype affecting growth, development, phagocytosis and clearance and replication of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol* **12**:765-780.
188. **Gerstenmaier L, Pilla R, Herrmann L, Herrmann H, Prado M, Villafano GJ, Kolonko M, Reimer R, Soldati T, King JS, Hagedorn M.** 2015. The autophagic machinery ensures nonlytic transmission of mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**:E687-692.
189. **Nevo Y, Nelson N.** 2006. The NRAMP family of metal-ion transporters. *Biochim Biophys Acta* **1763**:609-620.
190. **Papp-Wallace KM, Maguire ME.** 2006. Manganese transport and the role of manganese in virulence. *Annu Rev Microbiol* **60**:187-209.
191. **Cellier M, Prive G, Belouchi A, Kwan T, Rodrigues V, Chia W, Gros P.** 1995. Nramp defines a family of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:10089-10093.
192. **Searle S, Bright NA, Roach TIA, Atkinson PGP, Barton CH, Meloen RH, Blackwell JM.** 1998. Localisation of Nramp1 in macrophages: modulation with activation and infection. *Journal of Cell Science* **111**:2855-2866.

193. **Canonne-Hergaux F, Gruenheid S, Ponka P, Gros P.** 1999. Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. *Blood* **93**:4406-4417.
194. **Plant JE, Blackwell JM, O'Brien AD, Bradley DJ, Glynn AA.** 1982. Are the Lsh and Ity disease resistance genes at one locus on mouse chromosome 1? *Nature* **297**:510-511.
195. **Vidal SM, Malo D, Vogan K, Skamene E, Gros P.** 1993. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell* **73**:469-485.
196. **Vidal S, Tremblay ML, Govoni G, Gauthier S, Sebastiani G, Malo D, Skamene E, Olivier M, Jothy S, Gros P.** 1995. The Ity/Lsh/Bcg locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the Nramp1 gene. *J Exp Med* **182**:655-666.
197. **Buracco S, Peracino B, Cinquetti R, Signoretto E, Vollero A, Imperiali F, Castagna M, Bossi E, Bozzaro S.** 2015. Dictyostelium Nramp1, which is structurally and functionally similar to mammalian DMT1 transporter, mediates phagosomal iron efflux. *J Cell Sci* **128**:3304-3316.
198. **Govoni G, Canonne-Hergaux F, Pfeifer CG, Marcus SL, Mills SD, Hackam DJ, Grinstein S, Malo D, Finlay BB, Gros P.** 1999. Functional expression of Nramp1 in vitro in the murine macrophage line RAW264.7. *Infect Immun* **67**:2225-2232.
199. **Hackam DJ, Rotstein OD, Zhang W, Gruenheid S, Gros P, Grinstein S.** 1998. Host resistance to intracellular infection: mutation of natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) impairs phagosomal acidification. *J Exp Med* **188**:351-364.
200. **Jabado N, Cuellar-Mata P, Grinstein S, Gros P.** 2003. Iron chelators modulate the fusogenic properties of Salmonella-containing phagosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:6127-6132.
201. **Barton CH, Whitehead SH, Blackwell JM.** 1995. Nramp transfection transfers Ity/Lsh/Bcg-related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on oxidative burst and nitric oxide pathways. *Mol Med* **1**:267-279.
202. **Fritsche G, Dlaska M, Barton H, Theurl I, Garimorth K, Weiss G.** 2003. Nramp1 functionality increases inducible nitric oxide synthase transcription via stimulation of IFN regulatory factor 1 expression. *J Immunol* **171**:1994-1998.
203. **Fritsche G, Nairz M, Libby SJ, Fang FC, Weiss G.** 2012. Slc11a1 (Nramp1) impairs growth of Salmonella enterica serovar typhimurium in macrophages via stimulation of lipocalin-2 expression. *J Leukoc Biol* **92**:353-359.
204. **Malo D, Vogan K, Vidal S, Hu J, Cellier M, Schurr E, Fuks A, Bumstead N, Morgan K, Gros P.** 1994. Haplotype mapping and sequence analysis of the mouse Nramp gene predict susceptibility to infection with intracellular parasites. *Genomics* **23**:51-61.
205. **Gros P, Skamene E, Forget A.** 1981. Genetic control of natural resistance to Mycobacterium bovis (BCG) in mice. *J Immunol* **127**:2417-2421.
206. **Kovarova H, Hernychova L, Hajduch M, Sirova M, Macela A.** 2000. Influence of the bcg locus on natural resistance to primary infection with the facultative intracellular bacterium Francisella tularensis in mice. *Infect Immun* **68**:1480-1484.
207. **Kovarova H, Halada P, Man P, Golovliov I, Krocova Z, Spacek J, Porkertova S, Necasova R.** 2002. Proteome study of Francisella tularensis live vaccine strain-containing phagosome in Bcg/Nramp1 congenic macrophages: resistant allele

- contributes to permissive environment and susceptibility to infection. *Proteomics* **2**:85-93.
208. **Sillo A, Bloomfield G, Balest A, Balbo A, Pergolizzi B, Peracino B, Skelton J, Ivens A, Bozzaro S.** 2008. Genome-wide transcriptional changes induced by phagocytosis or growth on bacteria in *Dictyostelium*. *BMC Genomics* **9**:291.
209. **Peracino B, Buracco S, Bozzaro S.** 2013. The Nramp (Slc11) proteins regulate development, resistance to pathogenic bacteria and iron homeostasis in *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Sci* **126**:301-311.
210. **Bozzaro S, Buracco S, Peracino B.** 2013. Iron metabolism and resistance to infection by invasive bacteria in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Front Cell Infect Microbiol* **3**:50.
211. **Ashworth JM, Watts DJ.** 1970. Metabolism of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* grown in axenic culture. *Biochem J* **119**:175-182.
212. **Watts DJ, Ashworth JM.** 1970. Growth of myxameobae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem J* **119**:171-174.
213. **King JS, Gueho A, Hagedorn M, Gopaldass N, Leuba F, Soldati T, Insall RH.** 2013. WASH is required for lysosomal recycling and efficient autophagic and phagocytic digestion. *Mol Biol Cell* **24**:2714-2726.
214. **Hoeller O, Bolourani P, Clark J, Stephens LR, Hawkins PT, Weiner OD, Weeks G, Kay RR.** 2013. Two distinct functions for PI3-kinases in macropinocytosis. *J Cell Sci* **126**:4296-4307.
215. **Mikalsen J, Olsen AB, Tengs T, Colquhoun DJ.** 2007. *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* subsp. nov., isolated from farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**:1960-1965.
216. **Lampe EO, Brenz Y, Herrmann L, Repnik U, Griffiths G, Zingmark C, Sjostedt A, Winther-Larsen HC, Hagedorn M.** 2016. Dissection of *Francisella*-Host Cell Interactions in *Dictyostelium discoideum*. *Appl Environ Microbiol* **82**:1586-1598.
217. **Duodu S, Larsson P, Sjodin A, Soto E, Forsman M, Colquhoun DJ.** 2012. Real-time PCR assays targeting unique DNA sequences of fish-pathogenic *Francisella noatunensis* subspecies *noatunensis* and *orientalis*. *Dis Aquat Organ* **101**:225-234.
218. **Leonidova A, Pierroz V, Rubbiani R, Lan YJ, Schmitz AG, Kaech A, Sigel RKO, Ferrari S, Gasser G.** 2014. Photo-induced uncaging of a specific Re(I) organometallic complex in living cells. *Chemical Science* **5**:4044-4056.
219. **Hagedorn M, Rohde KH, Russell DG, Soldati T.** 2009. Infection by tubercular mycobacteria is spread by nonlytic ejection from their amoeba hosts. *Science* **323**:1729-1733.
220. **Hasselbring BM, Patel MK, Schell MA.** 2011. *Dictyostelium discoideum* as a model system for identification of *Burkholderia pseudomallei* virulence factors. *Infect Immun* **79**:2079-2088.
221. **Celli J, Zahrt TC.** 2013. Mechanisms of *Francisella tularensis* intracellular pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* **3**:a010314.
222. **Law HT, Sriram A, Fevang C, Nix EB, Nano FE, Guttman JA.** 2014. IglC and PdpA are important for promoting *Francisella* invasion and intracellular growth in epithelial cells. *PLoS One* **9**:e104881.
223. **Peracino B, Balest A, Bozzaro S.** 2010. Phosphoinositides differentially regulate bacterial uptake and Nramp1-induced resistance to *Legionella* infection in *Dictyostelium*. *J Cell Sci* **123**:4039-4051.

224. **Pang KM, Lee E, Knecht DA.** 1998. Use of a fusion protein between GFP and an actin-binding domain to visualize transient filamentous-actin structures. *Curr Biol* **8**:405-408.
225. **Brudal E, Lampe EO, Reubsaet L, Roos N, Hegna IK, Thrane IM, Koppang EO, Winther-Larsen HC.** 2015. Vaccination with outer membrane vesicles from *Francisella noatunensis* reduces development of francisellosis in a zebrafish model. *Fish Shellfish Immunol* **42**:50-57.
226. **Liu T, Mirschberger C, Chooback L, Arana Q, Dal Sacco Z, MacWilliams H, Clarke M.** 2002. Altered expression of the 100 kDa subunit of the *Dictyostelium* vacuolar proton pump impairs enzyme assembly, endocytic function and cytosolic pH regulation. *J Cell Sci* **115**:1907-1918.
227. **Bandara AB, Champion AE, Wang X, Berg G, Apicella MA, McLendon M, Azadi P, Snyder DS, Inzana TJ.** 2011. Isolation and mutagenesis of a capsule-like complex (CLC) from *Francisella tularensis*, and contribution of the CLC to *F. tularensis* virulence in mice. *PLoS One* **6**:e19003.
228. **Hood AM.** 1977. Virulence factors of *Francisella tularensis*. *J Hyg (Lond)* **79**:47-60.
229. **Lindemann SR, Peng K, Long ME, Hunt JR, Apicella MA, Monack DM, Allen LA, Jones BD.** 2011. *Francisella tularensis* Schu S4 O-antigen and capsule biosynthesis gene mutants induce early cell death in human macrophages. *Infect Immun* **79**:581-594.
230. **Ryter A, Hellio R.** 1980. Electron-microscope study of *Dictyostelium discoideum* plasma membrane and its modifications during and after phagocytosis. *J Cell Sci* **41**:75-88.
231. **Finsel I, Ragaz C, Hoffmann C, Harrison CF, Weber S, van Rahden VA, Johannes L, Hilbi H.** 2013. The *Legionella* effector RidL inhibits retrograde trafficking to promote intracellular replication. *Cell Host Microbe* **14**:38-50.
232. **Vlahou G, Schmidt O, Wagner B, Uenlue H, Dersch P, Rivero F, Weissenmayer BA.** 2009. *Yersinia* outer protein YopE affects the actin cytoskeleton in *Dictyostelium discoideum* through targeting of multiple Rho family GTPases. *BMC Microbiol* **9**:138.
233. **Butchar JP, Cremer TJ, Clay CD, Gavrilin MA, Wewers MD, Marsh CB, Schlesinger LS, Tridandapani S.** 2008. Microarray analysis of human monocytes infected with *Francisella tularensis* identifies new targets of host response subversion. *PLoS One* **3**:e2924.
234. **Hartlova A, Link M, Balounova J, Benesova M, Resch U, Straskova A, Sobol M, Philimonenko A, Hozak P, Krocova Z, Gekara N, Filipp D, Stulik J.** 2014. Quantitative proteomics analysis of macrophage-derived lipid rafts reveals induction of autophagy pathway at the early time of *Francisella tularensis* LVS infection. *J Proteome Res* **13**:796-804.
235. **Tekinay T, Wu MY, Otto GP, Anderson OR, Kessin RH.** 2006. Function of the *Dictyostelium discoideum* Atg1 kinase during autophagy and development. *Eukaryot Cell* **5**:1797-1806.
236. **Cemma M, Grinstein S, Brumell JH.** 2016. Autophagy proteins are not universally required for phagosome maturation. *Autophagy* doi:10.1080/15548627.2016.1191724:1-7.
237. **Sanjuan MA, Dillon CP, Tait SW, Moshiah S, Dorsey F, Connell S, Komatsu M, Tanaka K, Cleveland JL, Withoff S, Green DR.** 2007. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* **450**:1253-1257.

238. **Sridhar S, Sharma A, Kongshaug H, Nilsen F, Jonassen I.** 2012. Whole genome sequencing of the fish pathogen *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* Toba04 gives novel insights into *Francisella* evolution and pathogenicity. *BMC Genomics* **13**:598.
239. **Challacombe JF, Stubben CJ, Klimko CP, Welkos SL, Kern SJ, Bozue JA, Worsham PL, Cote CK, Wolfe DN.** 2014. Interrogation of the *Burkholderia pseudomallei* genome to address differential virulence among isolates. *PLoS One* **9**:e115951.
240. **Clark LC, Seipke RF, Prieto P, Willemse J, van Wezel GP, Hutchings MI, Hoskisson PA.** 2013. Mammalian cell entry genes in *Streptomyces* may provide clues to the evolution of bacterial virulence. *Sci Rep* **3**:1109.
241. **Ha UH, Wang Y, Jin S.** 2003. DsbA of *Pseudomonas aeruginosa* is essential for multiple virulence factors. *Infect Immun* **71**:1590-1595.
242. **Lakhal-Naouar I, Jardim A, Strasser R, Luo S, Kozakai Y, Nakhasi HL, Duncan RC.** 2012. *Leishmania donovani* argininosuccinate synthase is an active enzyme associated with parasite pathogenesis. *PLoS Negl Trop Dis* **6**:e1849.
243. **Brudal E, Winther-Larsen HC, Colquhoun DJ, Duodu S.** 2013. Evaluation of reference genes for reverse transcription quantitative PCR analyses of fish-pathogenic *Francisella* strains exposed to different growth conditions. *BMC Res Notes* **6**:76.
244. **Blondel CJ, Jimenez JC, Leiva LE, Alvarez SA, Pinto BI, Contreras F, Pezoa D, Santiviago CA, Contreras I.** 2013. The type VI secretion system encoded in *Salmonella* pathogenicity island 19 is required for *Salmonella enterica* serotype Gallinarum survival within infected macrophages. *Infect Immun* **81**:1207-1220.
245. **Hachani A, Lossi NS, Hamilton A, Jones C, Bleves S, Albesa-Jove D, Filloux A.** 2011. Type VI secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*: secretion and multimerization of VgrG proteins. *J Biol Chem* **286**:12317-12327.
246. **Filloux A, Hachani A, Bleves S.** 2008. The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology* **154**:1570-1583.
247. **Miyata ST, Kitaoka M, Brooks TM, McAuley SB, Pukatzki S.** 2011. *Vibrio cholerae* requires the type VI secretion system virulence factor VasX to kill *Dictyostelium discoideum*. *Infect Immun* **79**:2941-2949.
248. **Kawula TH, Hall JD, Fuller JR, Craven RR.** 2004. Use of transposon-transposase complexes to create stable insertion mutant strains of *Francisella tularensis* LVS. *Applied and environmental microbiology* **70**:6901-6904.
249. **Maier TM, Casey MS, Becker RH, Dorsey CW, Glass EM, Maltsev N, Zahrt TC, Frank DW.** 2007. Identification of *Francisella tularensis* Himar1-based transposon mutants defective for replication in macrophages. *Infect Immun* **75**:5376-5389.
250. **Su J, Yang J, Zhao D, Kawula TH, Banas JA, Zhang JR.** 2007. Genome-wide identification of *Francisella tularensis* virulence determinants. *Infect Immun* **75**:3089-3101.
251. **Sridhar, Sharma, Kongshaug, Nilsen, Jonassen.** 2012. Whole genome sequencing of the fish pathogen *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* Toba04 gives novel insights into *Francisella* evolution and pathogenicity. *BMC Genomics* **13**:1471-2164.

252. **Mikalsen J, Olsen AB, Tengs T, Colquhoun DJ.** 2007. *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* subsp. nov., isolated from farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Int J Syst Evol Microbiol* **57**:1960-1965.
253. **Zada-Hames IM, Ashworth JM.** 1978. The cell cycle during the vegetative stage of *Dictyostelium discoideum* and its response to temperature change. *J Cell Sci* **32**:1-20.
254. **Payne MP, Morton RJ.** 1992. Effect of culture media and incubation temperature on growth of selected strains of *Francisella tularensis*. *J Vet Diagn Invest* **4**:264-269.
255. **Soto E, Hawke JP, Fernandez D, Morales JA.** 2009. *Francisella* sp., an emerging pathogen of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in Costa Rica. *Journal of fish diseases* **32**:713-722.
256. **Andrews HL, Vogel JP, Isberg RR.** 1998. Identification of linked *Legionella pneumophila* genes essential for intracellular growth and evasion of the endocytic pathway. *Infect Immun* **66**:950-958.
257. **Solomon JM, Leung GS, Isberg RR.** 2003. Intracellular replication of *Mycobacterium marinum* within *Dictyostelium discoideum*: efficient replication in the absence of host coronin. *Infect Immun* **71**:3578-3586.
258. **Froquet R, Cherix N, Burr SE, Frey J, Vilches S, Tomas JM, Cosson P.** 2007. Alternative host model to evaluate *Aeromonas* virulence. *Appl Environ Microbiol* **73**:5657-5659.
259. **Froquet R, Lelong E, Marchetti A, Cosson P.** 2009. *Dictyostelium discoideum*: a model host to measure bacterial virulence. *Nat Protoc* **4**:25-30.
260. **Read A, Vogl SJ, Hueffer K, Gallagher LA, Happ GM.** 2008. *Francisella* genes required for replication in mosquito cells. *J Med Entomol* **45**:1108-1116.
261. **Boyer F, Fichant G, Berthod J, Vandenbrouck Y, Attree I.** 2009. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics* **10**:104.
262. **Schwarz S, West TE, Boyer F, Chiang WC, Carl MA, Hood RD, Rohmer L, Tolker-Nielsen T, Skerrett SJ, Mougous JD.** 2010. Burkholderia type VI secretion systems have distinct roles in eukaryotic and bacterial cell interactions. *PLoS Pathog* **6**:e1001068.
263. **Alteri CJ, Himpfl SD, Pickens SR, Lindner JR, Zora JS, Miller JE, Arno PD, Straight SW, Mobley HL.** 2013. Multicellular bacteria deploy the type VI secretion system to preemptively strike neighboring cells. *PLoS Pathog* **9**:e1003608.
264. **Wenren LM, Sullivan NL, Cardarelli L, Septer AN, Gibbs KA.** 2013. Two independent pathways for self-recognition in *Proteus mirabilis* are linked by type VI-dependent export. *MBio* **4**.
265. **Williams SG, Varcoe LT, Attridge SR, Manning PA.** 1996. *Vibrio cholerae* Hcp, a secreted protein coregulated with HlyA. *Infect Immun* **64**:283-289.
266. **Soto E, Halliday-Simmonds I, Francis S, Kearney MT, Hansen JD.** 2015. Biofilm formation of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*. *Vet Microbiol* **181**:313-317.
267. **Verhoeven AB, Durham-Colleran MW, Pierson T, Boswell WT, Van Hoek ML.** 2010. *Francisella philomiragia* biofilm formation and interaction with the aquatic protist *Acanthamoeba castellanii*. *Biol Bull* **219**:178-188.
268. **Schrallhammer M, Schweikert M, Vallesi A, Verni F, Petroni G.** 2011. Detection of a novel subspecies of *Francisella noatunensis* as endosymbiont of the ciliate *Euplotes raikovi*. *Microb Ecol* **61**:455-464.

269. **Nasser W, Santhanam B, Miranda ER, Parikh A, Juneja K, Rot G, Dinh C, Chen R, Zupan B, Shaulsky G, Kuspa A.** 2013. Bacterial discrimination by dictyostelid amoebae reveals the complexity of ancient interspecies interactions. *Curr Biol* **23**:862-872.
270. **Cardelli J.** 2001. Phagocytosis and macropinocytosis in Dictyostelium: phosphoinositide-based processes, biochemically distinct. *Traffic* **2**:311-320.
271. **Kolonko M, Geffken AC, Blumer T, Hagens K, Schaible UE, Hagedorn M.** 2014. WASH-driven actin polymerization is required for efficient mycobacterial phagosome maturation arrest. *Cell Microbiol* **16**:232-246.
272. **Akhter A, Caution K, Abu Khweek A, Tazi M, Abdulrahman BA, Abdelaziz DH, Voss OH, Doseff AI, Hassan H, Azad AK, Schlesinger LS, Wewers MD, Gavrillin MA, Amer AO.** 2012. Caspase-11 promotes the fusion of phagosomes harboring pathogenic bacteria with lysosomes by modulating actin polymerization. *Immunity* **37**:35-47.
273. **Meresse S, Unsworth KE, Habermann A, Griffiths G, Fang F, Martinez-Lorenzo MJ, Waterman SR, Gorvel JP, Holden DW.** 2001. Remodelling of the actin cytoskeleton is essential for replication of intravacuolar Salmonella. *Cell Microbiol* **3**:567-577.
274. **Pukatzki S, Ma AT, Revel AT, Sturtevant D, Mekalanos JJ.** 2007. Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:15508-15513.
275. **Ma AT, Mekalanos JJ.** 2010. In vivo actin cross-linking induced by Vibrio cholerae type VI secretion system is associated with intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:4365-4370.
276. **Beveridge TJ.** 1999. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol* **181**:4725-4733.
277. **Bomberger JM, Maceachran DP, Coutermarsh BA, Ye S, O'Toole GA, Stanton BA.** 2009. Long-distance delivery of bacterial virulence factors by Pseudomonas aeruginosa outer membrane vesicles. *PLoS Pathog* **5**:e1000382.
278. **Parker H, Chitcholtan K, Hampton MB, Keenan JI.** 2010. Uptake of Helicobacter pylori outer membrane vesicles by gastric epithelial cells. *Infect Immun* **78**:5054-5061.
279. **McCaig, Koller, Thanassi.** 2013. Production of Outer Membrane Vesicles and Outer Membrane Tubes by Francisella novicida. *Journal of Bacteriology* **195**:1120–1132.
280. **Pierson T, Matrakas D, Taylor YU, Manyam G, Morozov VN, Zhou W, van Hoek ML.** 2011. Proteomic characterization and functional analysis of outer membrane vesicles of Francisella novicida suggests possible role in virulence and use as a vaccine. *J Proteome Res* **10**:954-967.
281. **Peracino B, Borleis J, Jin T, Westphal M, Schwartz JM, Wu L, Bracco E, Gerisch G, Devreotes P, Bozzaro S.** 1998. G protein beta subunit-null mutants are impaired in phagocytosis and chemotaxis due to inappropriate regulation of the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* **141**:1529-1537.
282. **Zhou K, Pandol S, Bokoch G, Traynor-Kaplan AE.** 1998. Disruption of Dictyostelium PI3K genes reduces [32P]phosphatidylinositol 3,4 bisphosphate and [32P]phosphatidylinositol trisphosphate levels, alters F-actin distribution and impairs pinocytosis. *J Cell Sci* **111 (Pt 2)**:283-294.

283. **Dormann D, Weijer G, Dowler S, Weijer CJ.** 2004. In vivo analysis of 3-phosphoinositide dynamics during Dictyostelium phagocytosis and chemotaxis. *J Cell Sci* **117**:6497-6509.
284. **Hacker U, Albrecht R, Maniak M.** 1997. Fluid-phase uptake by macropinocytosis in Dictyostelium. *J Cell Sci* **110 (Pt 2)**:105-112.
285. **Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russell DG.** 1994. Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* **263**:678-681.
286. **Xu L, Shen X, Bryan A, Banga S, Swanson MS, Luo ZQ.** 2010. Inhibition of host vacuolar H⁺-ATPase activity by a Legionella pneumophila effector. *PLoS Pathog* **6**:e1000822.
287. **Clemens DL, Lee BY, Horwitz MA.** 2009. Francisella tularensis phagosomal escape does not require acidification of the phagosome. *Infect Immun* **77**:1757-1773.
288. **Horwitz MA.** 1983. The Legionnaires' disease bacterium (Legionella pneumophila) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J Exp Med* **158**:2108-2126.
289. **Meresse S, Steele-Mortimer O, Finlay BB, Gorvel JP.** 1999. The rab7 GTPase controls the maturation of Salmonella typhimurium-containing vacuoles in HeLa cells. *EMBO J* **18**:4394-4403.
290. **Kypri E, Schmauch C, Maniak M, De Lozanne A.** 2007. The BEACH protein LvsB is localized on lysosomes and postlysosomes and limits their fusion with early endosomes. *Traffic* **8**:774-783.
291. **Brieland JK, Fantone JC, Remick DG, LeGendre M, McClain M, Engleberg NC.** 1997. The role of Legionella pneumophila-infected Hartmannella vermiformis as an infectious particle in a murine model of Legionnaire's disease. *Infect Immun* **65**:5330-5333.
292. **Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS.** 1994. Growth of Legionella pneumophila in Acanthamoeba castellanii enhances invasion. *Infect Immun* **62**:3254-3261.
293. **Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS, Bermudez LE.** 1997. Interaction of Mycobacterium avium with environmental amoebae enhances virulence. *Infect Immun* **65**:3759-3767.
294. **Segal G, Shuman HA.** 1999. Legionella pneumophila utilizes the same genes to multiply within Acanthamoeba castellanii and human macrophages. *Infect Immun* **67**:2117-2124.
295. **Johansson A, Larkeryd A, Widerstrom M, Mortberg S, Myrtannas K, Ohrman C, Birdsell D, Keim P, Wagner DM, Forsman M, Larsson P.** 2014. An outbreak of respiratory tularemia caused by diverse clones of Francisella tularensis. *Clin Infect Dis* **59**:1546-1553.
296. **Sandstrom G, Lofgren S, Tarnvik A.** 1988. A capsule-deficient mutant of Francisella tularensis LVS exhibits enhanced sensitivity to killing by serum but diminished sensitivity to killing by polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* **56**:1194-1202.
297. **Apicella MA, Post DM, Fowler AC, Jones BD, Rasmussen JA, Hunt JR, Imagawa S, Choudhury B, Inzana TJ, Maier TM, Frank DW, Zahrt TC, Chaloner K, Jennings MP, McLendon MK, Gibson BW.** 2010. Identification, characterization and immunogenicity of an O-antigen capsular polysaccharide of Francisella tularensis. *PLoS One* **5**:e11060.

298. **Rowe HM, Huntley JF.** 2015. From the Outside-In: The *Francisella tularensis* Envelope and Virulence. *Front Cell Infect Microbiol* **5**:94.
299. **Dolezal P, Aili M, Tong J, Jiang JH, Marobbio CM, Lee SF, Schuelein R, Belluzzo S, Binova E, Mousnier A, Frankel G, Giannuzzi G, Palmieri F, Gabriel K, Naderer T, Hartland EL, Lithgow T.** 2012. *Legionella pneumophila* secretes a mitochondrial carrier protein during infection. *PLoS Pathog* **8**:e1002459.
300. **Abu Kwaik Y, Bumann D.** 2013. Microbial quest for food in vivo: 'nutritional virulence' as an emerging paradigm. *Cell Microbiol* **15**:882-890.
301. **Otto GP, Wu MY, Kazgan N, Anderson OR, Kessin RH.** 2004. *Dictyostelium* macroautophagy mutants vary in the severity of their developmental defects. *J Biol Chem* **279**:15621-15629.
302. **Matthias J, Messling S, Eichinger L.** 2016. The two *Dictyostelium* autophagy eight proteins, ATG8a and ATG8b, associate with the autophagosome in succession. *Eur J Cell Biol* **95**:15-25.
303. **Collins CA, De Maziere A, van Dijk S, Carlsson F, Klumperman J, Brown EJ.** 2009. Atg5-independent sequestration of ubiquitinated mycobacteria. *PLoS Pathog* **5**:e1000430.
304. **Case ED, Chong A, Wehrly TD, Hansen B, Child R, Hwang S, Virgin HW, Celli J.** 2014. The *Francisella* O-antigen mediates survival in the macrophage cytosol via autophagy avoidance. *Cell Microbiol* **16**:862-877.
305. **Shoji-Kawata S, Sumpter R, Leveno M, Campbell GR, Zou Z, Kinch L, Wilkins AD, Sun Q, Pallauf K, MacDuff D, Huerta C, Virgin HW, Helms JB, Eerland R, Tooze SA, Xavier R, Lenschow DJ, Yamamoto A, King D, Lichtarge O, Grishin NV, Spector SA, Kaloyanova DV, Levine B.** 2013. Identification of a candidate therapeutic autophagy-inducing peptide. *Nature* **494**:201-206.
306. **Parihar SP, Guler R, Khutlang R, Lang DM, Hurdayal R, Mhlanga MM, Suzuki H, Marais AD, Brombacher F.** 2014. Statin therapy reduces the mycobacterium tuberculosis burden in human macrophages and in mice by enhancing autophagy and phagosome maturation. *J Infect Dis* **209**:754-763.
307. **Hoang KV, Curry H, Collier MA, Borteh H, Bachelder EM, Schlesinger LS, Gunn JS, Ainslie KM.** 2016. Needle-Free Delivery of Acetalated Dextran-Encapsulated AR-12 Protects Mice from *Francisella tularensis* Lethal Challenge. *Antimicrob Agents Chemother* **60**:2052-2062.
308. **Lokken KL, Tsolis RM, Baumler AJ.** 2014. Hypoferremia of infection: a double-edged sword? *Nat Med* **20**:335-337.
309. **Pekarek RS, Bostian KA, Bartelloni PJ, Calia FM, Beisel WR.** 1969. The effects of *Francisella tularensis* infection on iron metabolism in man. *Am J Med Sci* **258**:14-25.
310. **Frehel C, Canonne-Hergaux F, Gros P, De Chastellier C.** 2002. Effect of Nramp1 on bacterial replication and on maturation of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes in bone marrow-derived mouse macrophages. *Cell Microbiol* **4**:541-556.
311. **Zheng M, Doan B, Schneider TD, Storz G.** 1999. OxyR and SoxRS regulation of fur. *J Bacteriol* **181**:4639-4643.
312. **Daugherty A, Suvarnapunya AE, Runyen-Janecky L.** 2012. The role of oxyR and soxRS in oxidative stress survival in *Shigella flexneri*. *Microbiol Res* **167**:238-245.
313. **Ma Z, Russo VC, Rabadi SM, Jen Y, Catlett SV, Bakshi CS, Malik M.** 2016. Elucidation of a mechanism of oxidative stress regulation in *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Mol Microbiol* doi:10.1111/mmi.13426.

314. **da Silva Neto JF, Braz VS, Italiani VC, Marques MV.** 2009. Fur controls iron homeostasis and oxidative stress defense in the oligotrophic alpha-proteobacterium *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Res* **37**:4812-4825.
315. **Jittawuttipoka T, Sallabhan R, Vattanaviboon P, Fuangthong M, Mongkolsuk S.** 2010. Mutations of ferric uptake regulator (*fur*) impair iron homeostasis, growth, oxidative stress survival, and virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Arch Microbiol* **192**:331-339.
316. **Pellicciari S, Vannini A, Roncarati D, Danielli A.** 2015. The allosteric behavior of Fur mediates oxidative stress signal transduction in *Helicobacter pylori*. *Front Microbiol* **6**:840.
317. **Dubrac S, Touati D.** 2000. Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: functional analysis of the *sodB* promoter. *J Bacteriol* **182**:3802-3808.
318. **Dubrac S, Touati D.** 2002. Fur-mediated transcriptional and post-transcriptional regulation of FeSOD expression in *Escherichia coli*. *Microbiology* **148**:147-156.
319. **Anjum MF, Stevanin TM, Read RC, Moir JW.** 2002. Nitric oxide metabolism in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* **184**:2987-2993.
320. **Isabella V, Wright LF, Barth K, Spence JM, Grogan S, Genco CA, Clark VL.** 2008. cis- and trans-acting elements involved in regulation of *norB* (*norZ*), the gene encoding nitric oxide reductase in *Neisseria gonorrhoeae*. *Microbiology* **154**:226-239.
321. **Llewellyn AC, Jones CL, Napier BA, Bina JE, Weiss DS.** 2011. Macrophage replication screen identifies a novel *Francisella* hydroperoxide resistance protein involved in virulence. *PLoS One* **6**:e24201.
322. **Akimana C, Al-Khodor S, Abu Kwaik Y.** 2010. Host factors required for modulation of phagosome biogenesis and proliferation of *Francisella tularensis* within the cytosol. *PLoS One* **5**:e11025.

VIII. Danksagung

Ich möchte Dr. Monica Hagedorn dafür danken, dass ich meine Doktorarbeit in ihrem Labor anfertigen durfte und für die Vergabe des spannenden Themas. Ich danke ihr für die Betreuung meines Projektes, ihre Unterstützung und vielen Ideen.

Prof. Dr. Christian Lohr danke ich für das zweite Gutachten dieser Dissertation. Prof. Dr. Egbert Tannich und Prof. Dr. Iris Bruchhaus danke ich für die Übernahme des Koreferats und die Mitbetreuung meiner Arbeit.

Ich danke unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. Hanne Winther-Larsen und Elisabeth Lampe von der Universität Oslo für die tollen Aufenthalte in Norwegen und erlernte Expertise in der Handhabung von *Francisella*. Gareth Griffiths und Urska Repnik aus der Abteilung Elektronenmikroskopie der Universität Oslo möchte ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit und anregenden Diskussionen danken.

Lilli Gerstenmaier, Ulrike Fröhlke, Ann-Kathrin Tilly, Rachel Pilla, Katharina Höhn und Martin Rudolf danke ich für die tolle Zusammenarbeit, anregenden Diskussionen und das Korrekturlesen. Ich danke Denise Ohnezeit für die Hilfe im Labor, Hendrik Herrmann für die elektronenmikroskopischen Arbeiten am BNI und der Arbeitsgruppe von Paul Walther an der Universität Ulm für die rasterelektronenmikroskopischen Arbeiten. Allen jetzigen und ehemaligen Kollegen danke ich für die entspannte Zusammenarbeit und erholsamen Kaffeepausen im Keller.

Ich danke meinen tollen Freunden aus Hamburg für ihre Unterstützung abseits der Arbeit, das Interesse und die Fragen, die mich in manche Erklärungsnot brachten.

Meiner Familie danke ich für die andauernde Unterstützung und das ungebrochene Vertrauen in mich.

IX. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift **“*Dictyostelium discoideum* als *Francisella*-Infektionsmodell unter Verwendung von *F. noatunensis* subsp. *noatunensis*”** selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen als Hilfsmittel verwendet habe.

Die Arbeit ist darüber hinaus keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt worden.

Hamburg, den