

ESCRT in der Makrophageninfektion durch *Rhodococcus equi*

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Thomas Arndt Haubenthal

aus

Würzburg

Bonn 2023

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter/ Betreuer: Prof. Dr. Albert Haas
2. Gutachter: PD Dr. Gregor Kirfel

Tag der Promotion: 15.12.2023

Erscheinungsjahr: 2024

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1. Das Immunsystem.....	1
1.2. Phagozytose.....	1
1.3. Der Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT).....	4
1.4. Autophagie	6
1.5. Lysosomale Speicherkrankheiten	8
1.6. Intrazelluläre Pathogene.....	9
1.7. Die Spezies <i>Rhodococcus</i>	11
1.7.1. <i>Rhodococcus equi</i>	12
1.7.2. <i>R. equi</i> s Virulenzplasmide	13
1.7.3. Das Virulenz-assoziierte Protein A (VapA).....	13
1.8. Die <i>R. equi</i> -enthaltende Vakuole (RCV)	14
1.9. Ziel der Arbeit.....	16
2. Material und Methoden	18
2.1. Material	18
2.1.1. Geräte	18
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	18
2.1.3. Chemikalien und Reagenzien	19
2.1.4. Medien.....	22
2.1.5. Lösungen und Puffer	26
2.2. Methoden	33
2.2.1. Zellkultur	33
2.2.2. Bakterienstämme.....	35
2.2.3. Infektion von Makrophagen.....	39
2.2.4. Molekularbiologische Methoden.....	43
2.2.5. Biochemische Methoden	52

2.2.6. Erweiterte mikroskopische Methoden	57
2.2.7. Statistik.....	59
3. Ergebnisse	60
3.1. Proteomanalyse gereinigter VCVs und BCVs.....	60
3.1.1. Validierung ausgewählter Proteine mittels Western Blot.....	64
3.1.2. Neutraler pH-Wert führt zur Degradation von Cathepsin B, D und F in Lysosomen	66
3.2. Die intrazelluläre Vermehrung von <i>R. equi</i> ist ESCRT-0, ESCRT-III- und Vps4- abhängig und ESCRT-I-unabhängig	67
3.2.1. Chmp3 und Vps4 lokalisieren an und in RCVs.....	67
3.2.2. ESCRT-0, ESCRT-III und Vps4 begünstigen die intrazelluläre Vermehrung von <i>R. equi</i>	68
3.3. Die limitierende RCV-Membran bleibt während der <i>R. equi</i> Infektion weitestgehend intakt	71
3.3.1. Intrazelluläre Vermehrung von <i>R. equi</i> ist abhängig von einer intakten RCV- Membran	72
3.3.2. Intrazelluläre Vermehrung von <i>R. equi</i> ist von Makroautophagie-unabhängig	78
3.4. Die Bildung von intravakuolären Vesikeln (IVVs) erfolgt ESCRT-abhängig.....	81
3.4.1. MG132-Behandlung verringert die intrazelluläre Vermehrung von <i>R. equi</i>	81
3.4.2. Die Zusammensetzung und Anzahl an IVVs ist Vps4-abhängig.....	83
3.4.3. Zytoplasmatisches GFP gelangt Vps4-abhängig und ATG5-unabhängig in die RCV	86
3.5. IVVs werden teilweise an der RCV-Membran gebildet.....	89
3.6. Die intrazelluläre Vermehrung von <i>R. equi</i> ist IVV- und cholesterolabhängig.....	90
3.6.1. In U18666A-behandelten Makrophagen verringern virulente <i>R. equi</i> stark die Cholesterolkonzentration in RCVs	97
3.6.2. <i>Cross-Talk</i> zwischen Virulenzplasmid und Chromosom ist entscheidend für intrazellulären Cholesterolmetabolismus.....	98
3.7. Spezielle Preadaptationen von <i>R. equi</i> wirken mit VapA während der Makrophageninfektion	102

4. Diskussion	108
4.1. pH-Neutralisierung verändert das Proteom von Phagolysosomen	108
4.2. Die intrazelluläre Lokalisation der ESCRT-Maschinerie gibt Aufschluss über die potentielle Funktion	112
4.3. <i>R. equi</i> benötigt eine intakte RCV-Membran für intrazelluläre Vermehrung	113
4.4. Ursprünge der IVVs	118
4.5. <i>R. equi</i> verwendet IVVs als bevorzugte Nahrung	122
4.6. Der intrazelluläre Cholesterolmetabolismus von <i>R. equi</i> ist abhängig vom Virulenzplasmid (von <i>virR</i> und <i>virS</i>)	125
4.7. Die Wachstumstemperatur von <i>R. equi</i> beeinflusst die anschließende Makrophageninfektion	129
4.8. Das Bakterium <i>R. defluvii</i> ist potentiell pathogen	131
4.9. Schlussfolgerung und Modell	133
5. Zusammenfassung	137
6. Literaturverzeichnis	139
7. Anhang	165
Publikationsliste	176
Danksagung	177

Abkürzungsverzeichnis

3-MA	3-Methyladenin	CORVET	<i>class C homologs in vacuole/endosome tethering</i>
AAA	<i>ATPases associated with diverse cellulare activities</i>	dest	destilliert
Ac	Acetat	DIC	Durchlicht
AF	AlexaFluor	DMSO	Dimethylsulfoxid
AIDS	Akquiriertes Immun-Defizienz-Syndrom	DMSZ	Deutsches Ministerium für Mikroorganismen und Zellkultur
AMP	antimikrobielle Peptide	DN	dominant-negativ
ASC	<i>apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>	EE	frühes Endosom
ATG	Autophagy-assoziiertes Gen	EEA1	<i>early endosome associated protein 1</i>
BafA1	Bafilomycin A1	EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
BafV	BafA1-enthaltende Vakuole	EGFP	verstärktes GFP
BHI	Hirn-Herz Bouillon	EGFR	EGF-Rezeptor
BMDM	Knochenmarksmakrophagen	ELISA	<i>Enzyme-Liked Immunosorbent Assay</i>
BSA	Bovines Serumalbumin	ER	Endoplasmatisches Retikulum
bzw.	beziehungsweise	ESCRT	<i>endosomal sorting complex required for transport</i>
ca.	circa	FCS	fetales Kälberserum
Cat	Cathepsin	dest	destilliert
CCV	<i>Coxiella</i> -enthaltende Vakuole	DIC	Durchlicht
CFU	Kolonie-bildende Einheiten	DMSO	Dimethylsulfoxid
Chmp	<i>charged multivesicular body protein</i>	DMSZ	Deutsches Ministerium für Mikroorganismen und Zellkultur
ChoE	Cholesteroxidase E	DN	dominant-negativ
CLEM	Korrelative Licht-und Elektronenmikroskopie	EE	frühes Endosom
CMA	Chaperon-vermittelte Autophagie	EEA1	<i>early endosome associated protein 1</i>
CoA	Coenzym A	EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor

Abkürzungsverzeichnis

EGFP	verstärktes GFP	LAMP1	Lysosomen-assoziiertes Membranprotein 1
ELISA	<i>Enzyme-Liked Immunosorbent Assay</i>	LBPA	<i>lysobiphosphatidic acid</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum	LDH	Laktatdehydrogenase
ESCRT	<i>endosomal sorting complex required for transport</i>	LDL	low density lipoprotein
et al.	et alli	LE	spätes Endosom
FCS	fetales Kälberserum	LIPA	<i>lysosomal acidic lipase</i>
FcγR	Fcγ Rezeptor	LLO	Listeriolysin O
fw	forwärts	LMP	<i>low melting point</i>
Gal	Galektin	LPS	Lipopolysaccharid
GALC	β-Galaktosylceramidase	LSR	Lysosomale Speicherkrankheit
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor	LT	LysoTracker
GFP	grün fluoreszierendes Protein	Lys	Lysosom
GPN	Gly-Phe-β-naphthylamide	M	Molar
h	Stunde	MCC	Methylcitratzyklus
HD-PTP	<i>his domain protein tyrosine phosphatase</i>	min	Minute
Hgs	<i>hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate</i>	MM	Minimal Salz Medium
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus	MMP	Methylmalonylweg
HOPS	<i>homotypic fusion and vacuolar protein sorting</i>	MS/Ac	Minimal Salz Medium supplementiert mit Acetat
IFN	Interferon	mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
IL	Interleukin	MVB	<i>multivesicular body</i>
ILV	intraluminäre Vesikel	MΦ	Makrophage
IVV	intravakuläre Vesikel	n.m.	nicht messbar
LAM	Lipoarabinomannan	n.s.	nicht signifikant

Abkürzungsverzeichnis

NLRP3	<i>nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing receptor protein 3</i>	PI3K	PI3-Kinase
NPC	Niemann-Pick Typ C	<i>orf</i>	<i>open reading frame</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte absorbierend bei 600 nm	PI3P	PI3-Phosphat
LC3	<i>light chain 3</i>	PIC	Protease-Inhibitor-Cocktail
p.i.	post Infektion	PNS	postnukleärer Überstand
PAI	Pathogenitätsinsel	Procat	Procathepsin
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster	PRR	<i>pattern-recognition receptors</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>	RCV	<i>Rhodococcus equi</i> -enthaltende Vakuole
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>	red.	reduziert
RNF	<i>RING finger protein</i>	rev	revers
rVapA	rekombinantes VapA	RT	Raumtemperatur
SCV	<i>Salmonella</i> -enthaltende Vakuole	TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor
siRNA	<i>small interfering RNA</i>	Tsg101	<i>tumor susceptibility gene 101</i>
SLIC	Sequenz- und Ligation-unabhängiges Clonieren	u.a.	unter anderem
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>	ün	über Nacht
Stam	<i>signal transducing adapter molecule</i>	VapA	Virulenz-assoziiertes Protein A
T4SS	Typ-4-Sekretionssystem	v-ATPase	vakuolär Typ H ⁺ -ATPase
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie	VCV	VapA-enthaltende Vakuole
TFEB	Transkriptionsfaktor EB	Vps	<i>vacuolar protein sorting-associated protein</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion	WB	Western Blot
PFA	Paraformaldehyd	Wt	Wildtyp
PI3	Phosphatidylinositol-3	YFP	gelb fluoreszierendes Protein

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem

Um sich vor eindringenden Mikroorganismen zu schützen, haben Säugetiere im Verlauf der Evolution ein Immunsystem entwickelt. Man unterscheidet zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Teil des Immunsystems, wobei das angeborene Immunsystem die erste Verteidigungslinie darstellt (Riera Romo et al., 2016). Zum angeborenen Immunsystem gehört u.a. die Haut, bestehend aus Epithelschichten mit *tight junctions* und strukturellen Proteinen, die eine physikalische Barriere für Erreger darstellt (Proksch et al., 2008). Darüber hinaus ist die Haut mit einer Sekretschicht überzogen, die antimikrobielle Peptide (AMPs) und mikrobizide Moleküle wie Lysozym enthält (Riera Romo et al., 2016). Kommt es dennoch zum Eindringen von Mikroorganismen in den Wirt wird eine schnelle und unspezifische Immunantwort benötigt. Diese beinhaltet humorale und zelluläre Komponenten. Ein wichtiger Teil der Immunantwort ist das Komplementsystem, das aus mehr als 30 zellassozierten Proteinen und Serumproteinen besteht (Tosi, 2005). Durch einige Proteolyse- und Aktivierungsereignisse erfolgt die Markierung von Mikroorganismen für die Phagozytose, die Rekrutierung von Phagozyten und die Lyse der Erreger (Tosi, 2005). Professionelle Phagozyten nehmen nicht nur die Mikroorganismen auf und bauen diese ab, sondern aktivieren Zellen des adaptiven Immunsystems durch Zytokinsekretion und Antigenpräsentation (Jutras & Desjardins, 2005). Somit bilden die Phagozyten eine Schnittstelle zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. Zu den Zellen des adaptiven Immunsystems zählen Lymphozyten. Diese brauchen länger, um initial aktiviert zu werden. Infiziert derselbe Erreger allerdings ein zweites Mal den Wirt ist die Immunantwort spezifischer, stärker und schneller (Nicholson, 2016).

1.2. Phagozytose

Phagozytose ist ein zellulärer Prozess, der die Aufnahme und den Abbau von Partikeln, die größer als 0,5 μm sind, vermittelt (Freeman & Grinstein, 2014). Sie beinhaltet wirtsfremde Substanzen, Mikroorganismen und apoptotische Zellen. Phagozytose findet nahezu in allen Zelltypen statt und ist für die Homöostase des Gewebes entscheidend (Uribe-Querol & Rosales, 2020). Allerdings phagozytieren nur bestimmte Zellarten hochgradig effizient (professionelle Phagozyten), zu denen zum Beispiel die myeloischen Zellen wie neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und dendrische Zellen zählen (Uribe-Querol & Rosales, 2020).

Der gesamte Prozess der Phagozytose lässt sich in vier Phasen unterteilen: (1) Erkennung des Partikels über Rezeptoren, (2) die Phagosomenbildung an der Plasmamembran, (3) die

Reifung des Phagosoms und letztendlich (4) der Abbau der phagozytierten Fracht (Levin et al., 2016).

Für die erste Phase (Erkennung) besitzen beispielsweise Makrophagen Oberflächenrezeptoren, die direkt *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), wie Lipopolysaccharide, Peptidoglykane oder Flagelline erkennen und dadurch Phagozytose induzieren (Mogensen, 2009). Diese Rezeptoren werden daher *pattern-recognition receptors* (PRRs) genannt. Manche dieser PRRs initiieren direkt die Phagozytose. Zu ihnen gehören C-Typ-Lektine Rezeptoren wie Dectin-1, Mincle oder DC-SIGN (Uribe-Querol & Rosales, 2020). Andere PRRs wie die Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs) erkennen auch PAMPs, initiieren aber nicht direkt die Phagozytose, sondern *primen* die Zelle nur. Das bedeutet, dass TLRs durch PAMP-Bindung eine intrazelluläre Signalkaskade aktivieren, die zur Aktivierung von phagozytischen Rezeptoren wie Integrinen führt und so die Phagozytose initiiert (Freeman & Grinstein, 2014; Uribe-Querol & Rosales, 2020). Außerdem werden durch die Aktivierung der TLRs proinflammatorischen Zytokinen wie TNF α , IL-6 oder IFN γ exprimiert und freigesetzt (Kumar et al., 2009). Pathogene können zudem durch Opsonisierung für die Phagozytose markiert werden. Dafür binden wirtseigene Proteine, einschließlich Antikörpermoleküle (IgG) und Proteine des Komplementsystems, an Mikroorganismen, die dadurch von Fc γ Rezeptoren (Fc γ R, binden Fc-Teil von IgG) bzw. Komplementrezeptoren (*complement receptors*; CRs) erkannt und phagozytiert werden (Dustin, 2016; Uribe-Querol & Rosales, 2020).

Sobald ein Partikel durch Phagozytoserezeptoren erkannt wird, werden unterschiedlichste Signaltransduktionswege aktiviert und die zweite Phase, die Aufnahme, initiiert. Das führt zur lokalen Ansammlung weiterer Rezeptoren, die an die Fracht binden, zur lokalen Polymerisation von F-Aktin und zur Bildung einer phagozytischen Tasse (Groves et al., 2008; Jaumouillé & Grinstein, 2016; Vorselen et al., 2020). Letztendlich wird das Partikel vollständig von einem Teil der Plasmamembran umschlossen und in das Zellinnere abgeschnürt (Jaumouillé & Grinstein, 2016). Dadurch wird ein neues Organell gebildet, das die Membranzusammensetzung der Plasmamembran und das Lumen des extrazellulären Mediums besitzt: das Phagosom. Nach erfolgter Abschnürung wird die dritte Phase der Phagozytose, die Phagosomenreifung, initiiert. Dabei bezeichnet Phagosomenreifung den schrittweisen Übergang von einem Phagosom in ein degeneratives Phagolysosom durch sukzessive Fusions- und Fissionsereignisse und ähnelt dabei der Endosomenreifung (Gray & Botelho, 2017; Haas, 2007; Uribe-Querol & Rosales, 2020). Dieser Prozess ist vektoriell, das heißt frühe Phagosomen fusionieren nicht direkt mit Lysosomen zu einem Phagolysosom (Jeschke & Haas, 2016).

Zu Beginn der Phagosomenreifung akquiriert das neu gebildete Phagosom die frühendosomalen Markerproteine Rab20, Rab5 und das *Early Endosome Antigen-1* (EEA1). EEA1 vermittelt dabei über die *soluble NSF attachment receptor* (SNARE)-Proteine Syntaxin 6 und Syntaxin 13 die Fusion zwischen Rab5-assoziierten Membranen (Gray & Botelho, 2017). Es resultiert eine Ansäuerung des frühen Phagosomenlumens (pH 6,0–6,5) und die Lokalisierung der Markerproteine Rab5 und EEA1 auf der Phagosomenmembran (Lee et al., 2020).

Um phagozytierte Rezeptoren oder andere Fracht, die nicht zum Abbau vorgesehen ist, zu recyceln, bilden sich aus dem frühen Phagosom sogenannte Recyclingendosomen, die mit Hilfe von Rab4 und Rab 11 die Fracht zurück an die Plasmamembran transportieren (Maxfield & McGraw, 2004). Gleichzeitig findet homotypische Fusion zwischen frühen Endosomen/Phagosomen durch den *class C homologs in vacuole/endosome tethering* (CORVET) Komplex statt (van der Beek et al., 2019).

Im weiteren Verlauf der Phagosomenreifung findet der Übergang von Rab5-positiven (frühen) Phagosomen zu Rab7-positiven (späten) Phagosomen statt. Dazu wird Rab5 durch seinen *guanine nucleotide exchange factor* (GEF) Rabex-5 am frühen Phagosom aktiviert und bindet den Effektor Rabaptin-5, der die Rabex-5 Aktivität weiter stimuliert (Fairn & Grinstein, 2012). Dadurch entsteht ein positiver *Feedbackloop*. Rab5 rekrutiert und aktiviert die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), die PI3-Phosphat (PI3P) auf der zytosolischen Seite des frühen Phagosoms generiert (Fairn & Grinstein, 2012). Durch PI3P binden zahlreiche Proteine wie EEA1 oder Hgs (ESCRT-0) und werden aktiviert (Fairn & Grinstein, 2012). Zudem regt Rab5 die Rekrutierung von GTP-geladenem (aktiviertem) Rab7 über den CORVET Komplex an (Fairn & Grinstein, 2012). Späte Phagosomen rekrutieren die vakuoläre ATPase (v-ATPase) auf ihre Membran, was zum weiteren Ansäuern des Phagosomenlumens (pH 5,0–6,0) führt (Saftig & Klumperman, 2009). In diesem Stadium der Reifung ist das Phagosom negativ für EEA1 und Rab5 (Levin et al., 2016). Durch Fusion mit Golgi-Vesikel gelangen Vorläufer der lysosomalen Hydrolasen, wie beispielsweise Cathepsine, in das Lumen später Phagosomen, die durch das saure Milieu in enzymatisch-aktive Proteine prozessiert werden (Levin et al., 2016). Des Weiteren können durch den *Endosomal Sorting Complex Required for Transport* (ESCRT) Vesikel an Membranen später Endosomen-/Phagosomen gebildet werden, die sich in das Lumen der Kompartimente abschnüren (Piper & Katzmann, 2007). Kompartimente, die viele dieser intraluminellen Vesikel (ILVs) enthalten, werden *Multivesicular Bodies* (MVBs) genannt (siehe 1.3 Der *Endosomal Sorting Complex Required for Transport* (ESCRT)) (Babst, 2011).

Im letzten Schritt der Reifung fusioniert ein spätes Phagosom mit einem Lysosom und bildet ein degeneratives Phagolysosom. Dafür bindet Rab2 (spätes Phagosom) über den *homotypic*

fusion and vacuolar protein sorting (HOPS) Komplex an Arl8 (Lysosom) und bringt so die beiden Kompartimente in räumliche Nähe (Schleinitz et al., 2023). Einmal gebunden, wird HOPS vermutlich für die Fusion der beiden Kompartimente über SNARE Proteine (Syntaxin 7, Vti1b oder Syntaxin 8 mit Vamp8 oder Vamp7) benötigt (Schleinitz et al., 2023). Nach erfolgreicher Fusion dissoziiert Rab7 von der Phagolysosomenmembran, die anschließend LAMP1-, LAMP2- und Arl8-positiv ist (Schleinitz et al., 2023). Charakteristisch für Phagolysosomen ist ein saurer pH-Wert von 4,0 bis 5,5 und die in diesem Milieu katalytisch aktiven Enzyme wie Glykosidasen, Lipasen, Nukleasen und vor allem Proteasen wie Cathepsine (Saftig & Klumperman, 2009). Des Weiteren befindet sich auf Phagolysosomenmembranen der NADPH Oxidasekomplex, der für die Produktion von reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) verantwortlich ist (Haas, 2007). Auch der lysosomale Ionengradient ist unverzichtbar für die intraluminale Ansäuerung, Hydrolasenstabilität und den Abbau von Makromolekülen. Über die lysosomalen Ionen wird u.a. die Lysosomenbiogenese und die Lysosomenhomöostase gesteuert (Ballabio & Bonifacino, 2020).

Makrophagen verwenden erfolgreich abgetötete phagozytierte Partikel bzw. Mikroorganismen für ihre eigene Biosynthese (Rocher & Furuta, 2015). Des Weiteren werden antigene Peptide, die durch saure Hydrolasen des Phagolysosoms generiert werden, über MHC-Klasse-II Rezeptoren zur Plasmamembran transportiert und dort zur Antigenpräsentation an CD4⁺ T-Zellen transferiert (Rocher & Furuta, 2015).

1.3. Der Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT)

Die Membranen eukaryotischer Zellen sind hochdynamisch und vollziehen ständiges *Remodeling* durch Prozesse wie Ausstülpfen, Einstülpfen, Abschnüren, Tubulation, Fusion und Fission. Diese dynamischen Prozesse sind essentiell für die allgemeine Vitalität der Zellen und aller zellulären Funktionen. Dabei kann das *Remodeling* der Membranen in zwei Richtungen stattfinden, wodurch entweder Zytosol enthaltende oder Zytosol freie Vesikel bzw. Tuben resultieren. Für das Abschnüren von Membranen nach innen (zytosolenthaltend) wird eine heteromultimerische Proteinmaschinerie, der *Endosomal Sorting Complex Required for Transport* (ESCRT), benötigt. Die ESCRT-Maschinerie wird in vier funktionelle Komplexe unterteilt: ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II und ESCRT-III (Vietri et al., 2020). Um zelluläre Proteine der Degradation zuzuführen, werden diese initial mit dem ~8,5 kDa Protein Ubiquitin posttranslational markiert. Durch Monoubiquitinierung oder die Bildung unterschiedlicher Polyubiquitinketten (K48- oder K63-Ketten) werden die Proteine markiert, sodass sie entweder proteasomal oder endolysosomal degradiert werden (Clague & Urbé, 2010; Swatek & Komander, 2016). ESCRT-0, bestehend aus Stam und Hgs, bindet an ubiquitinierte Rezeptoren auf Endosomenmembranen, die auf diese Weise für den lysosomalen Abbau

markiert wurden (Bache, Brech et al., 2003). Über Hgs bindet ESCRT-0 an das ESCRT-I Protein Tsg101 (Bache et al., 2003; Katzmann et al., 2001; Lu et al., 2003). Der längliche ESCRT-I Komplex wiederum bindet über Vps28 an das ESCRT-II Protein Eap45 (Langelier et al., 2006). ESCRT-III besteht aus Oligomeren oder Polymeren kleiner α -helikaler Chmp Proteine, von denen Chmp4-Paraloge die abundantesten Komponenten des Komplexes sind (Teis et al., 2008). Über Eap20 und Chmp6 interagieren ESCRT-II und ESCRT-III miteinander (Langelier et al., 2006). Die ESCRT-III Proteine bilden membranbindenden Spiralen, die essentiell für die Deformation von Membranen und die Bildung von Vesikel sind. In Zusammenspiel mit Vps4, einer *ATPase Associated with diverse cellular Activities* (AAA-ATPase), werden die gebildeten Vesikel letztendlich von der Membran abgeschnürt (Abbildung 1) (Adell et al., 2016). Neben diesem kanonischen Weg, der integrale Membrankomponenten in intraluminale Vesikel (ILVs) sortiert und diese dem lysosomalen Abbau zuführt, ist ESCRT an vielfältigen weiteren membrandeformierenden Prozessen der Zelle beteiligt: der Zytokinese, der Exosomenbiogenese, der Autophagie und der Plasma-, Endosomen- und Lysosomenmembranreparatur (Vietri et al., 2020). Obwohl in diesen Prozessen nicht immer alle ESCRT-Subkomplexe benötigt werden bzw. die Funktion einzelner ESCRT-Subkomplexe und Proteine durch andere Proteine substituiert werden kann, benötigt die ESCRT-abhängige Membranabschnürung immer ESCRT-III und Vps4 (Vietri et al., 2020).

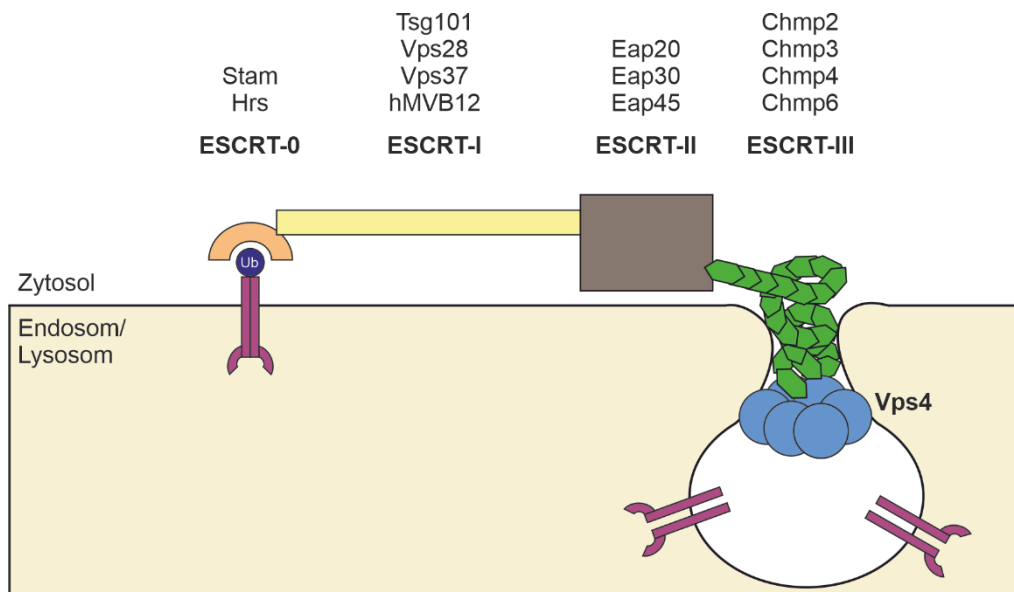


Abbildung 1: Der Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT). Der ESCRT-Komplex besteht aus vier heteromultimetrischen Subkomplexen: ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II und ESCRT-III. ESCRT-0 erkennt ubiquitinierte Frachtproteine, die über ESCRT-I und ESCRT-II an ESCRT-III vermittelt werden. ESCRT-III stülpt die Membran in das Lumen der Endosomen ein und bildet so ein Vesikel, in welches das Frachtprotein verpackt wird. Über die AAA-ATPase Vps4 wird letztendlich das Vesikel abgeschnürt und in das Lumen der Endosomen freigesetzt. Adaptiert nach Vietri et al., 2020.

Das Sortieren an den Endosomen ist entscheidend für die zelluläre Proteostase, die Endosomenreifung, die Lysosomenfunktion und das Zell-Signaling. Hierbei spielt die ESCRT-Maschinerie nicht nur direkt beim Sortieren der Proteine eine wichtige Rolle, sondern vielmehr auch in der Biogenese von ILVs in *Multivesicular Endosomes* (MVBs). Fracht, die in die ILVs sortiert werden soll, wird über Lysin 63 Polyubiquitinierung markiert und wie oben beschrieben aufgenommen (Huang et al., 2006). Die Ubiquitinierung ist hierbei entscheidend, weswegen Ubiquitinligasen und deubiquitinierende Enzyme wichtige Regulatoren sind (Vietri et al., 2020). Allerdings findet auch Ubiquitin-, ESCRT-0 und ESCRT-I unabhängiges *Sorting* in ILVs über das Protein Alix statt (Dores et al., 2012). Durch die genetische und biochemische Analyse von *vacuolar protein sorting* (vps)-Mutanten in *Saccharomyces cerevisiae*, beschrieben Katzmann et al. (2001) zum ersten Mal den ESCRT-Komplex und brachten ihn in Zusammenhang mit dem Sortieren von endosomalen Rezeptoren in MVBs. Bis heute ist die ILV-Biogenese der am besten charakterisierte ESCRT-abhängige Prozess, sowohl in der Hefe (Katzmann et al., 2001; Schäfer et al., 2020; Teis et al., 2010), als auch in der Säugerzelle (z.B.: Bache et al., 2003; Christ et al., 2016).

Eine weitere wichtige Funktion von ESCRT ist die Lysosomenmembranreparatur (Skowyra et al., 2018). Bereits kleine Löcher in der Lysosomenmembran führen zum Austreten von Hydrolasen ins Zytosol. Daher muss diese Reparatur schnell erfolgen, um negative Auswirkungen auf die Zelle zu vermeiden. In diversen Studien wurde gezeigt, dass an induzierte Löcher der Lysosomenmembran ESCRT-III rekrutiert wird (Jia et al., 2020; Vietri et al., 2020). Einen entscheidenden Einfluss auf die Rekrutierungsgeschwindigkeit von Chmp4b an die Membranlöcher hat dabei Tsg101 (ESCRT-I). Des Weiteren verhindert eine Depletion der beiden ESCRT-I assoziierten Proteine Alix und Tsg101 die Rekrutierung von ESCRT-III vollständig an beschädigte Lysosomen (Radulovic et al., 2018; Skowyra et al., 2018). Werden Löcher in der Lysosomenmembran nicht ESCRT-abhängig repariert, wie beispielsweise bei einer Tsg101 und Alix Depletion, wird das gesamte Organell über Lysophagie, eine bestimmte Form der Autophagie, abgebaut (Radulovic et al., 2018).

Neben den wichtigen Funktionen für die Zelle nutzen aber auch einige Viren (Hepatitis B Virus und HIV) oder Mikroorganismen (siehe 1.6 Intrazelluläre Pathogene) die wirtseigene ESCRT-Maschinerie, um sich intrazellulär zu vermehren und auszubreiten (Lambert et al., 2007; Langelier et al., 2006).

1.4. Autophagie

Autophagie (aus dem Griechischen, „auto“ selbst „phagy“ essen“) ist ein konservierter katabolischer zellulärer Abbauprozess, der essentiell für die Energie- und

Nährstoffhomöostase der Zelle ist. Dabei unterscheidet man einen selektiven und einen nicht-selektiven Abbauprozess (Khandia et al., 2019). Einer der Hauptregulatoren der Autophagie ist die *target of rapamycin* (TOR) Kinase (*mammalian* TOR, mTOR, in Säugern), die in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren oder ausreichend Nährstoffen die nicht-selektive Autophagie inhibiert. Umgekehrt wird durch Hungerstress oder Rapamycin (mTOR Inhibitor) die Autophagiemaschinerie aktiviert (Levine & Kroemer 2008; He & Klionsky 2009). Selektive Autophagie ist u.a. am Abbau beschädigter Organellen beteiligt (Khandia et al., 2019). Da Autophagie ein essentieller zellulärer Prozess ist, hat eine Dysfunktion diverse pathologische Konsequenzen, wie Neurodegeneration, Pathogenhypervirulenz und Tumorprogression (Khandia et al., 2019).

Man unterscheidet drei Arten von Autophagie: (1) Makroautophagie, (2) Chaperon-vermittelte Autophagie (*Chaperone-mediated autophagy*, CMA) und (3) Mikroautophagie.

Makroautophagie wird durch die Assemblierung des *Unc51-like autophagy activating kinase 1* (Ulk1) Komplexes initiiert, der sich auch unter nährstoffreichen Bedingungen bilden kann (Feng et al., 2014). Unter autophagieinduzierenden Bedingungen wird der Ulk1 Komplex aktiviert, der AMBRA1 phosphoryliert und dadurch den PI3K Komplex aktiviert (Griffey & Yamamoto, 2022). Beclin 1, die Kernkomponente des PI3K Komplexes, ist dabei für die Membrannukleation entscheidend (McKnight & Zhenyu, 2013). ATG5, ein zentrales Protein der Autophagiemaschinerie (zusammengefasst in Ye et al., 2018), komplexiert mit ATG12 und ATG16 und wird an die preautophagosomale Struktur (PAS) rekrutiert. Der ATG5-ATG12-ATG16 Komplex assoziiert mit der äußeren Membran des Phagophores und verhindert so die Fusion des unreifen Vesikels mit Lysosomen (Khandia et al., 2019).

Anschließend bindet *light chain 3* (LC3) an das Phagophor und wird durch ATG4, ATG7 und ATG3 in LC3-II prozessiert (Glick et al., 2010). LC3-II lokalisiert auf beiden Seiten der Autophagosomenmembran (Innen- und Außenseite). Durch die lokale *de novo* Biosynthese von Phospholipiden vergrößert sich die Phagophorenmembran, die letztendlich als Doppelmembran die Fracht umschließt (Schütter et al., 2020). Die verschiedenen ATG-Komplexe dissoziieren während der Reifung des Autophagosoms von der Membran, wohingegen LC3-II über den kompletten Reifungsprozess auf dem Autophagosom lokalisiert (Glick et al., 2010; He & Klionsky 2009). Daher wird LC3-II als molekularer Marker für Autophagosomen verwendet. Die äußere Membran des gereiften Autophagosoms fusioniert abschließend mit Lysosomen zu einem Autolysosom, wodurch die Fracht (noch von der inneren Membran umgeben) durch die im sauren Milieu aktiven Hydrolasen (Lipasen, Proteasen, Glykosidasen) abgebaut wird (He & Klionsky, 2009).

Die CMA ist eine selektive Form der Autophagie, die zytoplasmatische Proteine für den lysosomalen Abbau erkennt und internalisiert (Sahu et al., 2011; Tekirdag & Cuervo, 2018). Die CMA beginnt mit der Erkennung eines Pentapeptidmotives der Substratproteine durch Hsc70 (Khandia et al., 2019). Hsc70 transferiert diese Proteine an den zytosolischen Rest von LAMP2a (Cuervo & Dice 1996). Nach erfolgter Bindung werden die Proteine entfaltet und nacheinander in das Lumen des Lysosoms transportiert (Salvador et al., 2000).

Die Lysophagie ist eine Form der Makroautophagie, die für den selektiven Abbau beschädigter Lysosomen verantwortlich ist. Falls Löcher in der Lysosomenmembran nicht über die ESCRT-Maschinerie repariert werden können, gelangt das zytoplasmatische Protein Galektin 3 in das Innere der Lysosomen und bindet dort an die β -Galaktoside der Membranninnenseite. Durch die Rekrutierung von TRIM16 an Gal3 wird der lysosomale Abbau via Makroautophagie induziert (Jia et al., 2020; Radulovic et al., 2018). Ähnlich wie Lysosomen werden auch beschädigte Mitochondrien oder Peroxisomen selektiv über Mitophagie (Le Guerroué et al., 2017) bzw. Pexophagie (Germain & Kim, 2020) abgebaut .

Eine besondere Form der Autophagie ist die Mikroautophagie, die im Vergleich zur Makroautophagie oder der CMA bislang meist in Hefe und wenig in Säugerzellen untersucht wurde. Dabei wird zwischen einer selektiven und einer nicht-selektiven Mikroautophagie unterschieden (Wang et al., 2022). Zytoplasmatische Fracht wie *Lipid Droplets* oder glykolytische Enzyme werden auf drei unterschiedliche Arten aufgenommen: (1) über eine Ausstülpung der Lysosomenmembran, (2) über eine Einstülpung der Lysosomenmembran, (3) eine Einstülpung der späten Endosomenmembran (Oku & Sakai, 2018). Bislang wurde Mikroautophagie in Säugerzellen meist an Endosomen beschrieben, als Prozess für den Rezeptorabbau oder den Abbau zytosolischer Proteine (Mejlvang et al., 2018; Sahu et al., 2011; Wang et al., 2022). Durch Lee et al. (2000) wurde erstmals Mikroautophagie am Lysosom gezeigt. Diese Mikroautophagie unterscheidet sich mechanistisch allerdings stark von der ESCRT-abhängigen Mikroautophagie der Endosomen, da hierbei autophagieassoziierte Proteine involviert sind (C. Lee et al., 2020). Kurz darauf wurde aber auch eine ESCRT-abhängige Form der Mikroautophagie zum Abbau von lysosomalen Membranproteinen beschrieben (W. Zhang et al., 2021).

1.5. Lysosomale Speicherkrankheiten

Neben dem essentiellen Abbau phagozytierter oder autophagozytierter Fracht spielt das Lysosom im Cholesterolmetabolismus der Zelle ebenfalls eine entscheidende Rolle. Der Großteil des zellulären Bedarfs an Cholesterol wird über die rezeptorvermittelte Endozytose von *low-density lipoprotein* (LDL) Cholesterol auf der Plasmamembran gedeckt. Am Ende des

endozytischen Weges, im Lysosom, werden Cholesterylester des LDLs hydrolysiert und freies Cholesterol über das Protein Niemann-Pick Typ C2 (NPC2) gebunden (Ikonen & Zhou, 2021). NPC2 transferiert Cholesterol an die N-terminale Domäne des transmembranösen Proteins NPC1 (Ikonen & Zhou, 2021). Von dort wird Cholesterol weiter transportiert. Die meisten Studien haben sich auf die LDL-Aufnahme und die Biosynthese fokussiert, wohingegen die Mechanismen des intrazellulären Cholesterol-*Traffickings* zwischen unterschiedlichen Organellen und der Plasmamembran bislang nicht vollständig verstanden werden (Pipalia et al., 2017). Nach dem Transfer an die Plasmamembran kann ungebundenes Cholesterol zwischen den beiden Seiten der Plasmamembran wechseln, wobei Cholesterol auf der exoplasmatischen Seite von cholesterolbindenden Sonden erkannt wird (Ikonen & Zhou, 2021). Die Akkumulierung von Cholesterol auf der Plasmamembran führt zur Aktivierung der Aster/GramD Proteine, die den Übergang von Cholesterol der Plasmamembran auf die ER-Membran regulieren (Ferrari et al., 2020; Naito et al., 2019). Übermäßiges Cholesterol in der ER-Membran wird durch SOAT1/ACAT1 in Cholesterylester umgewandelt und in *Lipid Droplets* gelagert (Ikonen & Zhou, 2021).

Dysfunktionen im intrazellulären Cholesterol-*Trafficking* sind verantwortlich für mehr als 50 humane Krankheiten wie beispielsweise Alzheimer (Koh & Cheung, 2006). Eine seltene, aber fatale lysosomale Speicherkrankheit ist die vererbare NPC Krankheit, die sich durch neuronale Degeneration, Hepatosplenomegalie und Effekte in anderen Organen äußert (Vanier, 2015). Aufgrund der Mutationen in NPC1 und NPC2 akkumulieren Cholesterol und Sphingolipide in den Lysosomen der NPC-Patienten, was zu einem veränderten Protein- und Lipid-*Traffickings* führt (Rosenbaum & Maxfield, 2012). Obwohl NPC-defiziente Zellen viel Cholesterol im Lysosom besitzen, ist das Cholesterollevel der Plasmamembran reduziert (Sokol et al., 1988). Dieser Phänotyp, d.h. Cholesterolakkumulation im Lysosom, kann mit Hilfe der pharmakologischen Substanz U18666A induziert werden, welche NPC1 inhibiert (Koh & Cheung, 2006). Durch das veränderte Cholesterol-*Trafficking* der Zelle führt eine U18666A Behandlung ebenfalls zur Inhibierung der MVB-Bildung, weswegen U18666A auch als MVB-Inhibitor bezeichnet wird (Elgner et al., 2016).

1.6. Intrazelluläre Pathogene

Im Laufe der Zeit haben Mikroorganismen unterschiedlichste Mechanismen evolviert, durch die sie der lysosomalen Degradation entkommen und intrazellulär replizieren. Das erreichen sie, indem sie die Phagosomenreifung in einem prephagolysosomalen Stadium anhalten, die Phagosomenreifung reprogrammieren, das Phagolysosom umbauen oder aus dem Phagosom ausbrechen (Haas, 2007).

Das Gram-positive Pathogen *Listeria monocytogenes* induziert die Aufnahme in eine Wirtszelle hauptsächlich über die Bakterienoberflächenproteine InlA und InlB. InlA/B binden an Rezeptoren der Wirtszelle, induzieren die Aktinrekrutierung, den Umbau der Plasmamembran und letztendlich die Aufnahme des Bakteriums in ein Phagosom (Pizarro-Cerdá & Cossart, 2019). Abhängig vom Zelltyp werden phagozytierte *L. monocytogenes* direkt zur Lamina propria transportiert (Epithelzellen, genauer Becherzellen) bzw. brechen aus dem Phagosom aus und replizieren im Zytosol (Makrophagen) (Nikitas et al., 2011; Pizarro-Cerdá & Cossart, 2019). Für das Ausbrechen aus dem Phagosom benötigt das Pathogen das porenbildende Toxin Listeriolysin O (LLO), das cholesterolabhängig Löcher in der Phagosomenmembran induziert, und die Phospholipide PlcA und PlcB (Birmingham et al., 2008; Gründling et al., 2003). Die Gene, die für diese Virulenzfaktoren codieren (*hlyA* für LLO), liegen in einer Pathogenitätsinsel. Die LLO-abhängige Porenbildung führt zudem dazu, dass das Phagosom nicht ansäuert und die Ca^{2+} -Konzentration des Kompartimentes sinkt, was die Phagosomenreifung verlangsamt und die Fusion mit Lysosomen inhibiert (Shaughnessy et al., 2006). Durch die Löcher in der Phagosomenmembran gelangt *L. monocytogenes* an zytosolisches Glucose-1-Phosphat, welches das Bakterium als Kohlenstoffquelle für die intrazelluläre Replikation verwendet. Außerdem führt der Kontakt mit dem Zytosol dazu, dass das Pathogen durch das Bakterienoberflächenprotein ActA zusammen mit den Wirtsproteinen Arp2/3 Aktin-Filamente polymerisiert (Welch et al., 2019). Durch die wachsenden Aktin-Filamente bewegt sich *L. monocytogenes* intrazellulär fort, durchbricht die Plasmamembran und infiziert umliegende Zellen (Pizarro-Cerdá & Cossart 2019). Andere Pathogene, die ebenfalls auf das Ausbrechen aus dem Phagosom angewiesen sind, sind u.a. *Shigella flexneri* oder *Francisella tularensis* (Haas, 2007).

Das Pathogen *Chlamydia trachomatis* verhindert den intrazellulären Abbau auf eine andere Weise. In der Zelle interagiert das Bakterium schnell mit den Transportrouten von Sphingomyelin-Vesikel zwischen Golgi und der Plasmamembran, akquiriert Sphingomyelin und Cholesterol zum Phagoendosom und generiert sich auf diese Weise eine Replikationsnische, die Inklusion (Haas, 2007).

Das Gram-negative Bakterium *Coxiella burnetii*, Auslöser des Q-Fiebers, ist ein besonderes Pathogen, insofern als *C. burnetii* auf die Phagosom-Lysosom-Fusion angewiesen ist, um im sauren Milieu des Kompartiments zu replizieren. Daher verhindert eine gestörte Phagosomenreifung, beispielsweise durch nicht-funktionales Rab5 oder Rab7, die intrazelluläre Vermehrung des Pathogens (McDonough et al., 2013). Einmal im Phagolysosom angekommen, begünstigt der saure pH-Wert den Metabolismus des Bakteriums und aktiviert dessen Typ-4-Sekretionssystem (T4SS), über das ca. 150 Effektoren in die Wirtszelle freigesetzt werden (Thomas et al., 2020). Mit Hilfe dieser Effektoren wird die *Coxiella-*

enthaltende Vakuole (*Coxiella-containing vacuole*, CCV) in ein ausgedehntes Organell umgebaut (Padmanabhan et al., 2020). Obwohl sich dieses Kompartiment stark von typischen Lysosomen unterscheidet, beispielsweise in ihrer Größe oder durch den hohen Cholesterolgehalt der CCV-Membran, lokalisieren typische lysosomale Markerproteine wie LAMP1, LAMP2 oder v-ATPase an der CCV (Howe et al., 2003; Howe & Heinzen, 2006). Des Weiteren ist *Coxiella* auf die Integrität der CCV für die intrazelluläre Replikation angewiesen, die durch die ESCRT-abhängige Membranreparatur aufrechterhalten wird (Radulovic et al., 2018).

Das Gram-positive Bakterium *Mycobacterium tuberculosis* entlässt über sein T7SS Effektoren, die die Phagosomenreifung inhibieren, wodurch die Bakterien in einem Phagoendosom residieren (Mittal et al., 2018). Das sezernierte Heterodimer EsxA/EsxB wird in einer leicht sauren Umgebung gespalten, sodass EsxA zusammen mit PDIM Poren in der Phagosomenmembran bildet (De Jonge et al., 2007; Quigley et al., 2017). Durch die Poren gelangen die Effektoren EsxG und EsxH in das Wirtszytosol, von denen EsxH dort direkt mit dem ESCRT-0 Faktor Hgs interagiert und dadurch die weitere Phagosomenreifung inhibiert (Mehra et al., 2013). Außerdem werden die entstehenden Poren zu einem frühen Zeitpunkt in der Infektion durch die ESCRT-Maschinerie (ESCRT-I, ESCRT-III und Vps4- abhängig) repariert, um für *M. tuberculosis* eine geschützte Replikationsnische zu generieren (Mittal et al., 2018; López-Jiménez et al., 2018). Wenigen Stunden nach der Makrophageninfektion durch *M. tuberculosis*, führt die steigende Konzentration an EsxG-EsxH im Zytosol dazu, dass die ESCRT-Maschinerie behindert und nicht mehr an die Löcher der Phagosomenmembran rekrutiert wird (Mittal et al., 2018). Dadurch gelangt *M. tuberculosis* in Kontakt mit dem Zytosol und somit auch an Nährstoffe.

1.7. Die Spezies *Rhodococcus*

Rhodococcus spp. wurde das erste Mal 1891 durch Wilhelm Zopf beschrieben und umfasst heutzutage mindestens 57 obligat aerobe, nicht-motile, Gram-positive Bakterien, die zu den Actinomyceten zählen (Bell et al., 1998; Gürtler et al., 2004; Vázquez-Boland & Meijer, 2019; Zopf, 1891). Ähnlich wie *mycobacteria* oder *cornyebacteria* zeichnen sich *rhodococci* durch ihre mykolsäureenthaltende lipidreiche Zellmembran aus, wodurch die Bakterien eine hohe Toleranz gegenüber sauren Umgebungen besitzen (Gürtler et al., 2004). Je nach Stamm erscheinen Rhodokokken kokken- oder stäbchenförmig und bilden zum Teil auch myzelartige Filamente aus (Bell et al., 1998). Rhodokokken kommen an den unterschiedlichsten Orten in der Umwelt vor, wie dem Boden, den Abwässern oder Fäzes (Gürtler et al., 2004). In den Fokus der gegenwärtigen Forschung tritt vor allem *Rhodococcus equi* als pathogener Vertreter dieser Gattung.

1.7.1. *Rhodococcus equi*

Zum ersten Mal beschrieben wurde *R. equi* 1923 von H. Magnusson, damals als *Corynebacterium equi* (Magnusson, 1923). 1977 wurde *R. equi* dem Genus *Rhodococcus* zugeordnet (Goodfellow & Alderson, 1977) und 2022 schlugen Sangal et al. die Umbenennung des Genus in *Prescotella equi* vor. Von dieser Umbenennung wären neben *R. equi* auch dessen nächster Verwandter *R. defluvii* (*Prescotella defluvii*), sowie *R. agglutinans* (*Prescotella agglutinans*), *R. soli* (*Prescotella soli*) und *R. subtropicus* (*Prescotella subtropicus*) betroffen (Sangal et al., 2022).

R. equi ist ein fakultativ intrazelluläres Bakterium, das weltweit in Böden zu finden ist (Prescott, 1991). Vor allem in der Tiermedizin ist *R. equi* bekannt, da es bei jungen Pferdefohlen im Alter bis zu vier Monaten eine schwere Bronchopneumonie verursachen kann (von Bargen & Haas, 2009). Aber auch für immunkomprimierte Menschen, wie AIDS-Patienten, stellt das Pathogen eine ernstzunehmende Bedrohung mit Tuberkulose-ähnlichen Symptomen dar (Vázquez-Boland & Meijer, 2019). Darüber hinaus wurde *R. equi* in Schweinen, Rindern, Ziegen und Hunden nachgewiesen (Prescott, 1991).

Das Bakterium bevorzugt für das *in vitro* Wachstum eine Temperatur von 30 – 37 °C und einen alkalischen pH-Wert (Hughes & Sulaiman, 1987; Prescott, 1991). Auf Agarplatten aus Wachstumsmedium bildet *R. equi* schleimige, unregelmäßig runde Kolonien, die mit fortschreitender Inkubation ihre Farbe von weiß zu lachsrosa ändern (Prescott, 1991). Zusätzlich zum 5 Mb großen Genom besitzen manche *R. equi* eines von mehreren Virulenzplasmiden (Letek et al., 2010).

R. equi besitzt zahlreiche Gene zur Lipid-Metabolisierung, die es mit anderen Rhodokokken teilt. Allerdings metabolisiert *R. equi* aufgrund der fehlenden Komponenten des Phosphotransferasesystems und fehlender Zuckertransporter keine Kohlenhydrate (Vázquez-Boland et al., 2013). Das Pathogen synthetisiert Aminosäuren *de novo* und wächst in Anwesenheit von anorganischem Stickstoff, organische Säuren, Fettsäuren oder Thiamin. Dabei bevorzugt *R. equi* als Kohlenstoffquelle kurzkettige organische Säuren (Acetat, Laktat, Butyrat, Succinat, Fumerat, Malat, aber nicht Pyrovat) oder Fettsäuren (Palmitat, langkettige fettsäureenthaltende Lipide) (Letek et al., 2010). Aufgrund der chromosomal-codierten Mono- und Dicarboxylattransporter, Lipasen, Fettsäure β -Oxidationsenzyme, Acetyl-CoA Synthetasen, Acetyl-CoA Dehydrogenasen und Enoyl-CoA Isomerasen, scheint *R. equi* Kohlenstoff durch Lipide zu gewinnen (Letek et al., 2010). Eine Mutation der Isocitratlyase (*aceA*), die für das *in vitro* Wachstum auf Fettsäuren essentiell ist, führt zum Wachstumsdefekt von *R. equi* in Makrophagen (Wall et al., 2005). Für das Wachstum des Bakteriums in cholesterolphaltigen Medium wurden *supA* und *supB* als Teil des *mce4* Operons identifiziert (van der Geize, 2008). Eine Deletion von *supAB* hat allerdings keine Auswirkung auf die

intrazelluläre Replikation des Pathogens in Humanmakrophagen-artigen Zellen (Letek et al., 2010; van der Geize et al., 2007, 2008).

Zusammen sind diese metabolischen Vorlieben von *R. equi* hervorragend für das (Über-) Leben in einer Umgebung mit vielen Membranlipiden und wenig Aminosäuren, Zucker und Sauerstoff abgestimmt (Vazquez-Boland et al., 2013).

1.7.2. *R. equi* Virulenzplasmide

Die Virulenz von *R. equi* in Fohlen oder in Mausmodellen ist an das 80 kb große Virulenzplasmid pVAPA gekoppelt (Hondalus & Mosser, 1994; Takai et al., 1993). Bakterien, die das Plasmid nicht tragen, sind weder zytotoxisch, noch pathogen, noch vermehren sich intrazellulär (Giguère et al., 1999). Das Plasmid lässt sich in drei funktionelle Regionen unterteilen: (1) Plasmidreplikation, (2) Konjugation und Partitionierung sowie (3) Pathogenität (Takai et al., 2000). Dabei wurde die Pathogenitätsinsel (PAI) vermutlich über horizontalen Gentransfer erworben, da diese Region von zwei Insertionselementen begrenzt ist. In der PAI sind neun Virulenz-assoziierte Proteine (Vaps) codiert, von denen allerdings nur *vapA*, *-C*, *-D*, *-E*, *-G* und *-H* funktionell sind (Letek et al., 2008). Die anderen drei Gene (*vapF*, *-I* und *-X*) liegen degeneriert vor (Letek et al., 2008). Von den unterschiedlichen Vaps ist vor allem VapA für die Virulenz von *R. equi* entscheidend (Takai et al., 1991).

Insgesamt wurden bislang drei *R. equi* Virulenzplasmide entdeckt, die für die Pathogenese in Pferden, Schweinen bzw. Rindern verantwortlich sind: pVAPA, pVAPB und pVAPN (Ocampo-Sosa et al., 2007; Valero-Rello et al., 2015). pVAPA und pVAPB sind Varianten desselben zirkulären Replikons, die sich in ihrer PAI Struktur unterscheiden, wohingegen pVAPN ein nicht verwandtes lineares Plasmid mit einer spezifischen PAI ist (Letek et al., 2008; MacArthur et al., 2017; Valero-Rello et al., 2015).

1.7.3. Das Virulenz-assoziierte Protein A (VapA)

Das 17 kDa große Virulenz-assoziierte Protein A (VapA) ist das einzige Virulenzprotein, das für die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* unabdingbar ist (Takai et al., 1991). Trotz der Exportsequenz wird VapA im Vergleich zu VapC, *-D* und *-E* *in vitro* nicht sezerniert, sondern bleibt auf der Bakterienoberfläche gebunden (B. A. Byrne et al., 2001; Takai et al., 1992). Allerdings konnte in Infektionsexperimenten VapA sowohl im Lumen der *Rhodococcus equi*-enthaltenden Vakuole (RCV), als auch auf der limitierenden Membran der RCV nachgewiesen werden (von Bargen et al., 2019; Wright et al., 2018).

Verschiedene Umwelteinflüsse, wie eine Temperatur von 37 °C, ein saurer pH-Wert ($\leq 6,5$), oxidativer Stress und eine geringe Ionenkonzentration (Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+}) induzieren die VapA

Expression (Benoit et al., 2002; Ren & Prescott, 2003; Takai et al., 1996). Dabei scheint allerdings die Temperatur der wichtigste Einflussfaktor zu sein. *In vitro* wurde gezeigt, dass erst, wenn die VapA Expression aufgrund der Temperatur (37 °C) induziert wird, ein saurer pH-Wert eine verstärkte Expression begünstigt (Takai et al., 1996). Dennoch kann die VapA Expression auch bei 30 °C induziert werden, einer Temperatur, bei der normalerweise kein VapA exprimiert wird, z.B. während der Inkubation einer Flüssigkultur in Plastikröhrchen oder in Makrophagen, die bei 30°C experimentell infiziert wurden (Hansen et al., 2022, Haubenthal et al., 2023).

Transkriptionell wird die VapA Expression über ein Operon bestehend aus fünf Genen (*virR*, *icgA*, *vapH*, *orf7* und *virS*) reguliert. *Orf4* codiert für VirR, einen LysR-Typ Transkriptionsregulator, der temperatur- und pH-abhängig die Expression der nachfolgenden Gene und *vapA* reguliert (Russell et al., 2004). Das *orf8* codierte VirS ist ein Antwort-Regulator eines Zwei-Komponenten-Systems, dessen virulenzassoziierte Sensor kinase (MprB) chromosomal codiert ist (MacArthur et al., 2011). Die Überexpression von VirS führt bei gleichzeitiger *virR*-Deletion zur Expression der *vap* Gene auf wildtypisches Niveau (Kakuda et al., 2015). Somit ist VirS für die Transkription der *vap* Gene und VirR für die Transkriptionsantwort auf Temperatur und pH-Wert verantwortlich (Coulson et al., 2015; Kakuda et al., 2015; MacArthur et al., 2011). Beide Gene, *virR* und *virS*, sind für eine wildtypische VapA Expression notwendig. Zudem hängt auch die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* entscheidend von den beiden Genen ab. Erst durch die Expression von VirR und VirS replizieren konstitutiv *vapA*-exprimierende avirulente *R. equi* intrazellulär (Coulson et al., 2015). Zudem beeinflussen VirR und VirS die Expression von 18 % der chromosomalen Gene, die für Transportprozesse, Energieproduktion und zellulären Metabolismus von entscheidender Bedeutung sind (Coulson et al., 2015).

1.8. Die *R. equi*-enthaltende Vakuole (RCV)

R. equi gelangt über Inhalation in die Lunge des Wirts und wird dort von den alveolaren Makrophagen phagozytiert. Die Aufnahme in die Makrophagen wird dabei hauptsächlich über den CR3 Rezeptor Mac-1 vermittelt (Mosser & Hondalus, 1996). Alternativ erkennt der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor die α -d-Manopyronosereste des Lipoarabinomannan (LAM) auf der Bakterienoberfläche entweder direkt oder über Mannosebindeproteine und induziert die Phagozytose des Bakteriums (Garton et al., 2002; Meijer & Prescott, 2004). Die beiden Aufnahmewege begünstigen die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi*. Erfolgt die Phagozytose der Bakterien nach Antikörper-Opsonisierung über den Fc-Rezeptor, setzen die Makrophagen vermehrt IFN γ frei, woraus eine erhöhte Todesrate der intrazellulären Bakterien resultiert (Darrah et al., 2000).

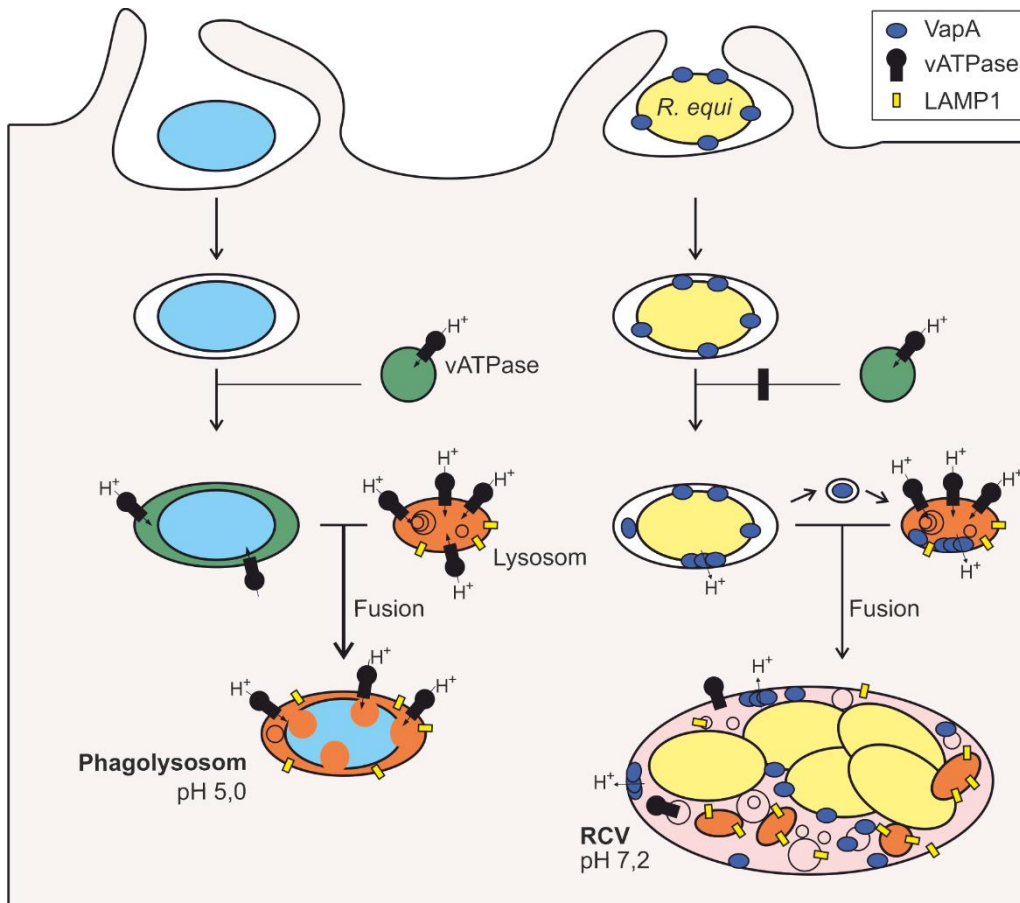


Abbildung 2: Schematische Darstellung der RCV-Reifung. Partikel oder avirulente *R. equi* werden vom Makrophagen phagozytiert, akquirieren während der Reifung die v-ATPase, fusionieren mit Lysosomen und werden letztendlich im Phagolysosom degradiert. Hingegen setzen virulente *R. equi* nach erfolgter Phagozytose VapA von der Bakterienoberfläche frei, das an die Phagosomenmembran bindet und die Akquirierung der v-ATPase verhindert. VapA wird auch in Lysosomen transportiert, wo es die Membran permeabilisiert und den Protonengradienten zum Kollabieren bringt. Obwohl Lysosomen mit der RCV fusionieren und ihren Inhalt freisetzen, bleibt die RCV pH-Wert neutral. In der RCV, die voller interner Membranen und Vesikel ist, replizieren die Bakterien bis es zur Nekrose des Makrophagen kommt. Adaptiert nach von Bargaen et al., 2019.

Nach erfolgter Phagozytose reift das Phagosom zunächst normal heran. Zuerst akquiriert das Phagosom die typischen frühen Markerproteine TfR, Rab5, PI(3)P und EEA1 und mit fortschreitender Reifung späte Markerproteine wie Rab7, LAMP1 und *lysobiphosphatidic acid* (LBPA) (Fernandez-Mora et al., 2005; von Bargaen & Haas, 2009). Im Gegensatz zur typischen Phagosomenreifung säuern die *R. equi* enthaltenden Phagosomen nur kurz und schwach an, da das bakterielle VapA protonendurchlässige Löcher in der Phagosomenmembran bildet und einen Anteil der v-ATPase ausschließt (von Bargaen et al., 2019). Bereits wenige Stunden nach Infektion etabliert sich daher eine pH-neutrale *R. equi*-enthaltende Vakuole (RCV), die kaum v-ATPase auf der Membran trägt und zudem negativ für die lysosomale Hydrolase D ist (Fernandez-Mora et al., 2005; von Bargaen et al., 2019). Mit fortschreitender Infektionsdauer (24 h) schwillt die RCV stark zu einem vesikel- und membrangefüllten Kompartiment an, das

fast kein LAMP1 auf der limitierenden Membran trägt, aber reichlich LAMP1-positive Vesikel in ihrem Innern (Fernandez-Mora et al., 2005; Hondalus & Mosser, 1994; von Bargen et al., 2019; Wright et al., 2018). In dieser geschützten Umgebung replizieren virulente *R. equi* nach einer anfänglichen Lag-Phase bis es letztendlich zur Nekrose des Makrophagen kommt (Abbildung 2) (Hondalus & Mosser, 1994; Lührmann et al., 2004; Zink et al., 1987). Lange wurde die RCV aufgrund ihres neutralen pH-Werts und der fehlenden lysosomalen Enzyme für ein atypisches spätes Phagosom gehalten, wobei man mittlerweile von einem atypischen Phagolysosom ausgeht (Haubenthal et al., 2023; Toyooka et al., 2005).

Im Gegensatz zu pVAPA-positiven *R. equi* sind avirulente *R. equi* nach erfolgter Phagozytose nicht in der Lage, die Ansäuerung des Phagosoms zu inhibieren und werden daher abgebaut (Hondalus & Mosser, 1994). Allerdings vermehren sich avirulente *R. equi* intrazellulär, wenn das Phagolysosom pharmakologisch durch Bafilomycin A1, einem Inhibitor der v-ATPase, oder durch rekombinantes VapA (rVapA) pH-neutralisiert wird (von Bargen et al., 2019; Haubenthal et al., 2023). Somit scheint die Ansäuerungshemmung der Schlüssel zur intrazellulären Vermehrung von *R. equi* zu sein (Toyooka et al., 2005).

1.9. Ziel der Arbeit

Obwohl die RCV bereits als atypisches Phagolysosom charakterisiert wurde (Haubenthal et al., 2023), ist bislang noch nicht verstanden, wie sich diese markante Vakuole im Verlauf einer Makrophageninfektion von *R. equi* etabliert und wie die RCV mit anderen Organellen interagiert. Um das zu verstehen, ist es wichtig, die Proteinzusammensetzung der Pathogenvakuole zu kennen. In vorangegangenen Arbeiten wurden bereits intakte *R. equi*-enthaltende Phagosomen zu einem frühen Zeitpunkt in der Infektion aufgereinigt (Fernandez-Mora et al., 2005). Allerdings ist die Aufreinigung intakter RCVs zu einem fortgeschrittenen Infektionszeitpunkt bislang nicht möglich. Daher sollten rVapA-induzierte Vakuolen, als Annäherung an RCVs, auf deren Proteinzusammensetzung untersucht werden. Durch rVapA bilden sich Vakuolen, die stark den charakteristischen Pathogenvakuolen ähneln und in denen avirulente *R. equi* replizieren (Hansen, Haubenthal, Reiter, Kniewel, Bosse-plois, Niemann, Bargen, & Haas, 2023; Wright et al., 2018). Auch durch BafA1, einem Inhibitor der v-ATPase, wird die intrazelluläre Vermehrung avirulenter *R. equi* begünstigt (von Bargen et al., 2019). Daher sollte das Proteom von gereinigten Phagolysosomen aus rVapA- und BafA1-behandelten Makrophagen miteinander verglichen werden.

Auffällig in der Proteomanalyse war, dass sich die Proteine der ESCRT-Maschinerie in den VapA-induzierten Vakuolen anreicherten. Da ESCRT bei verschiedenen intrazellulären Bakterien, wie beispielsweise dem *R. equi*-verwandten Actinomyces *M. tuberculosis* für die Pathogenese kritisch ist (Mittal et al., 2018), sollte in dieser Arbeit die Rolle von ESCRT in der

intrazellulären Vermehrungsverhalten von *R. equi* untersucht werden. Dabei sollte näher der Einfluss von ESCRT auf die Aufrechterhaltung der RCV-Membranintegrität, aber auch auf die Bildung interner Vesikel beleuchtet werden. Zudem war es von Interesse, die Nährstoffe, die dem Pathogen in der RCV zur Verfügung stehen und die es für eine erfolgreiche Vermehrung metabolisiert, zu identifizieren.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Bechergläser, Erlenmeyerkolben und Glasflaschen	Schott-Duran
BioPhotometer Plus	Eppendorf
Dounce Dura-grind (Homogenisator)	Zinsser Analytic
DynaMag2 Magnetständer	Invitrogen
Elektrophoreseeinheit SE250 Mighty Small II	Hoefer
Fluoreszenzmikroskop Axio Observer.Z1 mit ApoTome.2	Zeiss
Gel Doc XR	Biorad
Inkubator (CO ₂)	Binder
Inkubator	Binder
Kühlzentrifuge Avanti J-25	Beckman Coulter
Kühlzentrifuge Universal 320	Hettich
Magnetständer	Applied Biosystems
MicroPulser Electroporator	Biorad
Mikrotiterplatten-Lesegerät FLx800	BioTek
NanoPhotometer NP80	Implen
Nanofilm TEM stainer	Nanofilm technology GmbH
pH-Meter FiveEasy Plus	Mettler Toledo
Spektrophotometer Genesys 20	Thermo Hybaid
Spinning Disc Mikroskop	Zeiss
Tank-Blot	Hoefer Inc
Thermocycler T3000	Biometra
Thermoheizschüttler	Heap Labor Consult
Tischzentrifuge Mikro 20	Hettich
Transmissionselektronenmikroskop (TEM), Model Verios	FEI
TrayCell Küvette	Hellma
Ultraschallprozessor UP100H	Hielscher Ultraschalltechnik
Ultrazentrifuge Optima L-XP 80	Beckman Coulter
Ultrazentrifuge Optima MAX-XP	Beckman Coulter

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Chromatographiesäulen (5 ml)	Thermo Fisher
Dialyseschlauch (MWCO: 3500 Da)	Roth
Elektroporationsküvette (0,2 cm)	Biozym

Elektroporationsküvette (0,4 cm)	Biozym
Deckgläschen (Ø 12 mm)	Epredia
Kanülen	Braun
Kryoröhrchen (1,6, 2 ml)	Sarstedt
Kupfer Grids (100 Maschen mit Piololfilm)	Plano GmbH
Mehrzweckbecher 125 ml mit Deckel	Sarstedt
Objektträger	Epredia
Nitrozellulose	Roth
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen (2, 200, 1000 µl)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Röntgenfilme	Fujifilm
Serologische Pipetten (10 ml, 25 ml)	Sarstedt
Spritzen (1 ml, 10 ml, 50 ml)	B. Braun
Sterilfilter (0,2 µm Porengröße)	Whatman
VivaSpin 20	Sartorius
Ultrazentrifugenröhrchen (1,5 ml)	Beckman Coulter
Zellkulturplatten (24-Well)	Sarstedt
Zellkulturschalen (100 mm)	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Whatman Paper	Roth
µ-Dishes 35 mm	Ibidi

2.1.3. Chemikalien und Reagenzien

In dieser Arbeit wurde auf die Auflistung standardmäßig verwendeter Chemikalien verzichtet. Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich, Carl Roth oder Fisher Scientific in analytischer Reinheit (p.a.) bezogen.

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete pharmakologische Substanzen

Pharmakologische Substanz	Wirkung	Stock	Arbeitskonzentration	Hersteller/ Art.-Nr.
Bafilomycin A1	Inhibitor der v-ATPase	400 mM in DMSO	40 nM	Sigma Aldrich; B1793
Imipramin HCl	Inhibitor der Cholesteryl-Esterifizierung	50 mg/ml in H ₂ O	50 mM	ChemCruz / sc-207753

Glycyl-L-phenylalanin-2-naphthylamid (GPN)	Transiente Permeabilisierung der Lysosomenmembranen	300 mM in DMSO	300 µM	Bachem / K-1325
MG132	Proteasom Inhibitor	25 mM in DMSO	0,4 µM	PeptaNova / 3175-v
Rapamycin	mTOR Inhibitor	200 mM in DMSO	200 nM	Calbiochem/ 553211
U18666A	NPC1-Inhibitor	10 mg/ml in DMSO	2 µg/ml	ChemCruz / sc-203306

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete fluoreszente Farbstoffe und Konjugate

Fluoreszenzfarbstoff-/konjugate	Hersteller	Arbeitskonzentration
Bodipy TM FL C ₁₆ (Bodipy Palmitat)	Invitrogen	100 µM
BSA-5(6) -Carboxytetramethylrhodamin	Eigene Herstellung	100 µg/ml
Filipin III	ChemCruz	50 µg/ml
FM 4-64	Invitrogen	4 µg/ml
LysoTracker Red DND-99	Invitrogen	200 µM
SYTO13	Invitrogen	1 µM
SYTO40	Invitrogen	5 µM

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete primäre Antikörper

Antikörper	Typ	Spezies	Quelle	Verdünnung
Alix	monoklonal	Maus	Santa Cruz sc-271975	1:1000 WB
Arl8ab	monoklonal	Maus	Santa Cruz sc-398635	1:1000 WB
ATG5	monoklonal	Maus	Santa Cruz sc-133158	1:1000 WB
Cathepsin B	monoklonal	Maus	Santa Cruz sc-365558	1:1000 WB
Cathepsin D	monoklonal	Ziege	Santa Cruz sc-6487	1:1000 WB
Cathepsin F	polyklonal	Kaninchen	Mybiosource MBS821406 0	1:1000 WB

Material und Methoden

Chmp3	monoklonal	Maus	Santa Cruz sc-166361	1:100 IF 1:1000 WB
Galectin 3	monoklonal	Kaninchen	Santa Cruz sc-23938	1:100 IF 1:1000 WB
GAPDH	monoklonal	Maus	Invitrogen MA5 15738	1:1000 WB
Hgs	polyklonal	Kaninchen	ProteinTech 10390-1-AP	1:1000 WB
LAMP1 (N-Terminal) Hybridoma Überstand	monoklonal	Ratte	Eigene Herstellung	1:2 IF 1:2 WB
LBPA Hybridoma Überstand	monoklonal	Maus	Labor Grünberg	1:20 IF
LC3	monoklonal	Maus	Medical & Biological Laboratories M152-3	1:100
NPC1	monoklonal	Kaninchen	Novus Biologicals 1318A	1:1000 WB
Tsg101	monoklonal	Maus	Santa Cruz sc-7964	1:1000 WB
VapA	monoklonal	Maus	Santa Cruz sc-390576	1:100 IF 1:1000 WB
Vps4	monoklonal	Kaninchen	Sigma SAB4200025	1:100 IF 1:1000 WB

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete sekundäre Antikörper

Antikörper	Antigen	Spezies	Quelle	Verdünnung
AlexaFluor488	Kaninchen	Ziege	Invitrogen A11034	1:200
AlexaFluor555	Maus	Ziege	Invitrogen A21424	1:200
Texas Red	Kaninchen	Ziege	Invitrogen T2767	1:100
AlexaFluor555	Ratte	Ziege	Invitrogen A21434	1:200

AlexaFluor647	Kaninchen	Ziege	Invitrogen A21245	1:200
AlexaFluor647	Maus	Ziege	Invitrogen A21236	1:200
AlexaFluor647	Ratte	Ziege	Invitrogen A48265	1:200

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete siRNAs

Murines Zielgen	Sequenz	Quelle
Hgs	AGUACAAGGUGGUCCAGGAtt	Ambion/Life Technologies s67517
Tsg101	GCGUUAUCGAGGUAAUUAUAtt	Ambion/Life Technologies
Alix	GUACCUCAGUCUAUACUUAtt	Ambion/Life Technologies s71368
Chmp3	GCUGGUUAAUGAAUGGUCAtt	Ambion/Life Technologies
Vps4a	GAACAUACGGUGGAAUGAUtt	Ambion/Life Technologies s100252
Vps4b	CGAAGAUUUGAGAAACGUAtt	Ambion/Life Technologies s73810
Scrambled siRNA universal negative control		Sigma-Aldrich SIC001

2.1.4. Medien

2.1.4.1. Medien für die Zellkultur

Medium zur Kultivierung von RAW264.7 Makrophagen und J774E Makrophagen. Im Folgenden als Komplettmedium bezeichnet.

DMEM <i>high glucose</i> (PAN)	500 ml
FCS (hitzeinaktiviert) (PAN)	50 ml
GlutaMAX (Gibco)	5 ml

Medium zum Auftauen von RAW264.7 Makrophagen und J774E Makrophagen

DMEM <i>high glucose</i> (PAN)	500 ml
FCS (hitzeinaktiviert) (PAN)	50 ml
Penicillin / Streptomycin (Gibco)	5 ml
GlutaMAX (Gibco)	5 ml

Medium zur Kultivierung von Knochenmarksmakrophagen aus C57BL/6 J Mäusen

DMEM Komplettmedium

DMEM <i>high glucose</i> (PAN)	500 ml
FCS (hitzeinaktiviert) (PAN)	50 ml
HEPES 1M (pH 7,0)	5 ml
GlutaMAX (Gibco)	5 ml

BMM Φ Medium

DMEM <i>high glucose</i> (PAN)	315 ml
FCS (hitzeinaktiviert) (PAN)	50 ml
Pferdeserum (hitzeinaktiviert) (HyClone)	25 ml
L929 Überstand	100 ml
Hepes (pH 7,0) 1M	5 ml
GlutaMAX (Gibco)	5 ml

Infektionsmedium

DMEM Komplettmedium	45 ml
BMM Φ Medium	5 ml

2.1.4.2. Medien für die Kultivierung von Bakterien

Brain heart infusion (BHI) Medium

BHI (Becton Dickinson)	37 g/l
in destilliertem Wasser	

Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium 15 g/l Agar Agar hinzugefügt.

BHI für kompetente Zellen (BHIFCC) (adaptiert nach Sekizaki et al., 1998)

BHI (Becton Dickinson)	37 g/l
Glukose	0,4 % (w/v)
Glycerin	1 % (v/v)
Tween 80	0,2 % (w/v)
Glycin	2 % (w/v)
in destilliertem Wasser	

LB Medium (Lennox)

LB (Becton Dickinson)	20 g/l
In destilliertem Wasser	

Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium 15 g/l Agar_Agar (Roth) hinzugefügt. Für die Herstellung von ½ LB- Agarplatten wurde die halbe Menge LB (10 g/l) verwendet.

Minimal-Salz-Medium (adaptiert nach Ashour & Hondalus, 2003)

KH ₂ PO ₄	16,5 mM
K ₂ HPO ₄	30 mM
(NH ₄)SO ₄	78 mM
MgSO ₄	1 mM
Natriumcitrat	0,85 mM
Natriumacetat (optional)	100 mM
Thiaminhydrochlorid (steril filtriert, nach dem autoklavieren)	0,1 mM

Minimal-Salz-Medium supplementiert mit Cholesterol (nach van der Geize et al., 2008)

KH ₂ PO ₄	4,65 g/l
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	1,5 g/l
Natriumacetat	2 g/l
NH ₄ Cl	3 g/l
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1 g/l

Das Medium wurde autoklaviert. Anschließend wurde das Medium mit 0,5 g/l Cholesterol versetzt und für 30 min sonifiziert, um das Cholesterol zu lösen. Dann wurde dem Medium

1 ml/l Vishniac-Lösung (steril filtriert) und 40 mg/l Thiaminhydrochlorid (steril filtriert) hinzugegeben.

Psi Medium (für chemisch kompetente *E. coli*)

Hefeextrakt	5 g
Trypton	20 g
MgCl ₂	5 g
destilliertes Wasser	auf 1 l
Der pH wurde mit KOH auf 7,6 eingestellt	

Alle Bakterienmedien wurden vor der Verwendung autoklaviert. Falls benötigt, wurde dem Medium, nachdem es auf 60 °C abgekühlt war, Antibiotikum (steril filtriert) in den folgenden Konzentrationen hinzugefügt:

Vishniac Lösung (modifiziert nach Vishniac & Santer, 1957)

EDTA (10 g/l) und ZnSO₄ x 7H₂O (4,4 g/l) wurden in ddH₂O gelöst und mit 2 M KOH auf pH 8,0 eingestellt. Anschließend wurden folgende Chemikalien in der angegebenen Reihenfolge zugegeben:

CaCl ₂ x 2H ₂ O	1,47 g/l
MnCl ₂ x 7H ₂ O	1 g/l
FeSO ₄ x 7H ₂ O	1 g/l
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4H ₂ O	0,22 g/l
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,315 g/l
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,32 g/l
ddH ₂ O	auffüllen

Der pH wurde erst auf 6,0 und für die Lagerung auf pH 4,0 eingestellt. Die Lösung wurde sterilfiltriert (0,2 µm Filter) und im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

Tabelle 6. Verwendete Antibiotika Konzentrationen bei *R. equi* und *E. coli*

Antibiotikum	Konzentration für <i>R. equi</i>	Konzentration für <i>E. coli</i>
Ampicillin		100 µg/ml (A,F)
Apramycin	100 µg/ml (A), 50 µg/ml (F)	
Hygromycin B	100 µg/ml (A), 50 µg/ml (F)	
Kanamycin		100 µg/ml (A,F)

A = Agarplatte, F = Flüssigkultur

2.1.5. Lösungen und Puffer

Ammoniumchlorid-Lösung (Quenchingpuffer)

NH ₄ Cl	50 mM
in PBS	

Coomassie Blau Lösung

Coomasie R250	1 g
Methanol	300 ml
Essigsäure	50 ml
ddH ₂ O	650 ml

Die Lösung wurde auf dem Magnetrührer für 2 h gerührt.

Dialysepuffer

EDTA	10 mM
in PBS	

Enhanced Chemiluminescence (ECL) Lösung

Lösung A

Tris pH 8,5 (1M)	5 ml
Destilliertes Wasser	45 ml
p-Cumarsäure (90 mM)	110 µl
Luminol (250 mM)	250 µl

Lösung B

H ₂ O ₂ (30 %)	100 µl
Destilliertes Wasser	900 µl

Pro 1 ml Lösung A wurden 3 µl von Lösung B gemischt. Anschließend wurde der zu untersuchende Blot für 2 min mit Lösung A+B inkubiert.

Elektroporationspuffer

K ₂ HPO ₄	2 mM
Saccharose	10 % (w/v)
Glycerin (optional)	15 % (v/v)

Formaldehyd (16 %)

Paraformaldehyd	16 g
PBS (pH 7,4)	100 ml

Paraformaldehyd wurde im Wasserbad (70 °C) unter stetigem Rühren und durch die tropfenweise Zugabe von 1 M KOH gelöst.

Die Formaldehydlösung wurde aliquotiert bei -20 °C gelagert.

Formaldehyd (4 %)

Formaldehyd 16 %	3 ml
PBS	9 ml

Glycerin (50 %)

Glycerin	50 %
In sterilem destilliertem Wasser	

Homogenisierungspuffer (HB)

Saccharose	250 mM
HEPES	20 mM
In sterilem destilliertem Wasser	

Der pH wurde mit KOH auf pH 7,2 eingestellt.

Karnovsky Fixans

Formaldehyd (16 %)	4 %
Glutaraldehyd (8 %)	2 %
In PBS	

MES Puffer

MgCl ₂	1,5 mM
KCl	50 mM
Saccharose	250 mM
EGTA	0,5 mM
MES	20 mM

Der pH wurde mit HCl auf pH 5,0 eingestellt und mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Mowiol

Glycerin	6 g
Mowiol 4-88	2,4 g
Inkubation für 1 h bei RT unter stetigem Rühren	
Destilliertes Wasser	6 ml
Inkubation für 1 h bei RT unter stetigem Rühren	
Tris/HCl (0,2 M, pH 8,5)	12 ml

Die Lösung wurde für 2 h bei 50 °C unter gelegentlichem Rühren (alle 20 min für 2 min) inkubieren. Dann wurde sie für 15 min bei 5000 x g zentrifugieren, aliquotiert und die Aliquots bei -20°C eingefroren.

PBS (pH 7,4)

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	4,3 mM
KH ₂ PO ₄	1,47 mM
In destilliertem Wasser	

Der pH wurde mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

PBST

PBS	1 x
Tween 20	0,1 % (v/v)

PIPES Puffer

MgCl ₂	1,5 mM
KCl	50 mM
Saccharose	250 mM
EGTA	0,5 mM
PIPES	20 mM

Der pH wurde mit KOH auf pH 7,0 eingestellt.

Ponceau S

Ponceau S (Roth)	0,1 % (w/v)
Essigsäure	5 % (v/v)
In destilliertem Wasser	
Lagerung unter Lichtausschluss	

Puffer zur Reinigung von Histidin-markiertem VapA

2x BASE

HEPES	200 mM
NaCl	1 M
Glycerin	10 % (v/v)
In destilliertem Wasser	

Lysepuffer

2x BASE	50 % (v/v)
Imidazol	10 mM
β-Mercaptoethanol	10 mM
Complete Proteaseinhibitor (Roche)	1 x
In destilliertem Wasser	

Waschpuffer I (pH 8,0)

2x BASE	50 % (v/v)
Imidazol	40 mM
Triton X-100	2 % (v/v)
In destilliertem Wasser	

Waschpuffer II (pH 8,0)

2x BASE	50 % (v/v)
Imidazol	40 mM
In destilliertem Wasser	

Elutionspuffer (pH 8,0)

2x BASE	50 % (v/v)
Imidazol	300 mM
In destilliertem Wasser	

Radioimmunoprecipitation-Assay (RIPA)-Puffer

Tris/HCl (pH 8)	50 mM
NaCl	150 mM
Triton X-100	1 % (v/v)
Natriumdesoxycholat	0,5 % (w/v)
SDS	0,1 % (w/v)
Complete Proteaseinhibitor (Roche)	1 x
In destilliertem Wasser	

SDS-PAGE Lösungen

Sammelgel (4 %)

Destilliertes Wasser	3,6 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (40 %, 37,5:1)	630 µl
Tris/HCl 1,5 M (pH 6,8)	630 µl

SDS (10 %)	50 µl
APS (10 %)	50 µl
TEMED	5 µl

Trenngel (12 %)

Destilliertes Wasser	5,5 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (40 %, 37,5:1)	3,7 µl
Tris/HCl 1,5 M (pH 8,8)	3,1 µl
SDS (10 %)	125 µl
APS (10 %)	125 µl
TEMED	15 µl

SDS Laufpuffer (1x)

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 % (w/v)
In destilliertem Wasser	

SDS Probenpuffer (5x)

Tris/HCl (pH6,8)	60 mM
Glycerin	25 % (v/v)
SDS	2 % (w/v)
β-Mercaptoethanol	5 % (v/v)
Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
In destilliertem Wasser	

Transferpuffer (10x)

Tris	250 mM
Glycin	1,92 M
SDS	0,1 % (w/v)
In destilliertem Wasser	

Transferpuffer (1x)

Transferpuffer (10x)	200 ml
Methanol	200 ml
Destilliertes Wasser	Auf 2 l

Trichloressigsäure (TCA) (50 %)

Trichloressigsäure (TCA)	50 % (v/v)
In destilliertem Wasser	
Lagerung bei -20 °C	

Tris Acetat EDTA (TAE) (50x)

Tris	242 g
Eisessig	57,1 ml
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	100 ml
Destilliertes Wasser	Auf 1 l

TAE (1x)

TAE (50 x)	20 ml
Destilliertes Wasser	Auf 1 l

Transformationspuffer chemisch kompetenter *E. coli*

Transformationspuffer I

Kaliumacetat	30 mM
RbCl ₂	100 mM
CaCl ₂ x 2H ₂ O	10 mM
MnCl ₂	50 mM
Glycerin	15 % (v/v)

Mit Essigsäure wurde der pH auf 5,8 eingestellt und mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde der Puffer steril filtriert (0,2 µm)

Transformationspuffer II

MOPS	10 mM
RbCl ₂	10 mM

CaCl₂ x 2H₂O

75 mM

Glycerin

15 % (v/v)

Mit NaOH wurde der pH auf 6,5 eingestellt und mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde der Puffer steril filtriert (0,2 µm)

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

2.2.1.1. Zelllinien

Name	Beschreibung	Quelle	Referenz
RAW264.7	Murine Makrophagen-ähnliche Zelllinie aus einem Abelson-Maus-Leukämie-Virus- induzierten Tumor	H. Hilbi (Universität Zürich, Schweiz)	Raschke et al., 1978
RAW264.7 GFP-LAMP1	RAW264.7 stabile Expression von EGF-LAMP-1	Michael Hensel (Universität Osnabrück, Deutschland)	Krieger et al., 2014
RAW264.7 ATG5 KD	stabiler ATG5 Knockdown in RAW264.7	Cynthia Leifer (Cornell University, USA)	Hasan et al., 2016
J774E	Murine Makrophagen-ähnliche Zelllinie mit hoher Mannose-6-phosphat Rezeptor Expression	Stahl P., Universität Washington, USA	Fiani et al., 1998
C57BL/6J Makrophagen	Isolierte Knochenmarksmakrophagen aus C57BL/6J Mäusen	U. Schaible, Forschungszentrum Brostel. Deutschland	Herbst et al., 2011

2.2.1.2. Kultivierung von RAW264.7 und J774E

Die murinen Makrophagen Zelllinien J774E und RAW264.7 wurden in 10 cm Zellkulturschalen mit jeweils 10 ml DMEM Komplettmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden alle drei Tage in einem Verhältnis von 1:5 (J774E) bzw. 1:2 (RAW264.7) subkultiviert. Dazu wurde das alte Zellmedium verworfen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in frischem DMEM-Komplettmedium mit einem sterilen Zellschaber abgelöst. Die Zellsuspension wurde auf neue sterile Zellkulturschalen verteilt und mit DMEM-Komplettmedium auf 10 ml aufgefüllt.

2.2.1.3. Kultivierung von C57BL/6J Knochenmarksmakrophagen

Die Kryostocks der Knochenmarksmakrophagen wurden bei 37 °C im Wasserbad schnell aufgetaut und in 9 ml DMEM Komplettmedium ohne Antibiotikum überführt. Die Zellen wurden

bei 470 x g für 5 min bei 4 °C pelletiert und anschließend zweimal mit DMEM Kompletmedium ohne Antibiotikum gewaschen. Nach dem ersten Waschen wurde die Zellzahl bestimmt (siehe 2.2.1.4.) und nach dem zweiten Waschen das Pellet in 1 ml Infektionsmedium resuspendiert. Anschließend wurden für Infektionsversuche $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung einer 24-Well Platte auf Glasplättchen in Infektionsmedium ausgesät und bis zur Verwendung, aber maximal für fünf Tage, bei 37 °C inkubiert. Dadurch, dass die Zellen nicht in reinem Knochenmarksmedium kultiviert wurden, proliferierten sie nicht weiter.

2.2.1.4. Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde das Medium der adhärennten Makrophagen verworfen, einmal mit PBS gewaschen und anschließend in 2 ml PBS mit einem sterilen Zellschaber abgelöst. Von der Zellsuspension wurden 10 µl in eine Neubauer Zählkammer überführt und die Zellen in vier Großquadraten gezählt. Die Zellzahl pro ml wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Gezählte Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Großquadrate}} \times \text{Kammerkonstante} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}}$$

$$\text{Kammervolumen} = 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \text{ µl}$$

$$\text{Kammerkonstante} = \frac{1 \text{ ml}}{\text{Kammervolumen (0,1 µl)}} = 10000 = 10^4$$

2.2.1.5. Einfrieren und Auftauen von Makrophagen

Für die Langzeitlagerung der Makrophagen wurden diese in 10 % DMSO weggefroren. Die Makrophagen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend in 2 ml PBS mit einem Zellschaber von der Platte gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, bei 160 x g für 5 Min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml FCS mit 10 % DMSO gelöst und in Kryoröhrchen überführt. Diese wurden in einer Mr. Frosty™ Gefrierbox (Thermo Fisher Scientific) über Nacht bei -80 °C gelagert und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt.

Für die Kultivierung der eingefrorenen Makrophagen wurden die Kryoröhrchen bei 37 °C für 2 min im Wasserbad aufgetaut und in 9 ml PBS überführt. Die Zellen wurden bei 160 x g pelletiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in frischem, vorgewärmtem Kompletmedium gelöst und in eine neue 10 cm Platte überführt. Die Zellen wurden anschließen wie in Abschnitt 2.2.1.2. beschrieben kultiviert.

2.2.2. Bakterienstämme

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung	Quelle	Referenz
<i>R. equi</i> 103+	Isolat aus der Fohlenlunge, pVAPA-positiver Stamm	J. F. Prescott (Universität Guelph, Kanada)	de la Peña-Moctezuma & Prescott, 1995
<i>R. equi</i> 103-	Isogenes, pVAPA-negatives Derivat von 103+	J. F. Prescott (Universität Guelph, Kanada)	de la Peña-Moctezuma & Prescott, 1995
<i>R. equi</i> 103+ $\Delta vapA$	103+ mit einer Deletion für <i>vapA</i> auf pVAPA	M. Polidori (dieses Labor)	Polidori, 2007
<i>R. equi</i> 103+ $\Delta choE$	103+ mit einer chromosomalen Deletion für <i>choE</i>	J. F. Prescott (Universität Guelph, Kanada)	Pei et al., 2006
<i>R. equi</i> 103+ pCharge3-Turbo635	103+, der den fluoreszenten Reporter 635 (DsRed-Derivat) exprimiert	Philipp Hansen (dieses Labor)	Hansen, 2020
<i>R. equi</i> 103+ $\Delta vapA$ pYUB415	103+ $\Delta vapA$ transformiert mit pYUB415-Leervektor	Philipp Hansen (dieses Labor)	Hansen, 2020
<i>R. equi</i> 103- pYUB415	103- transformiert mit pYUB415-Leervektor	Philipp Hansen (dieses Labor)	Hansen, 2020
<i>R. equi</i> 103- pYUB415- <i>orf4-orf8</i>	103- transformiert mit pYUB415, das die <i>open reading frames orf4</i> und <i>orf8</i> des <i>R. equi</i> 103+ Virulenzplasmides direkt hintereinander unter der Kontrolle des <i>orf4</i> Promotors enthält		Diese Arbeit
<i>R. equi</i> 103+ pSMT3-M	103+ transformiert mit pSMT3-M Leervektor		Diese Arbeit
<i>R. equi</i> 103- pSMT3-M	103- transformiert mit pSMT3-M Leervektor		Diese Arbeit

Material und Methoden

<i>R. equi</i> 103+ pSMT3-M-LLO	103+ transformiert mit pSMT3-M, das hinter dem hsp60 Promotor für <i>hlyA</i> aus <i>L. monocytogenes</i> codiert		Diese Arbeit
<i>R. equi</i> RE1	Isolat aus der Fohlenlunge pVAPA-positiver Stamm		Van der Geize, 2008
<i>R. equi</i> RE1 Δ <i>supAB</i>	RE1 Stamm mit einer chromosomalen Deletion der Cholesteroltransporter <i>supA</i> und <i>supB</i> pVAPA-positiver Stamm		Van der Geize, 2008
<i>R. defluvii</i> Ca11	Isolat aus einem Bioreaktor für Abwasseraufbereitung	DSMZ	Kämpfer et al., 2014 DSM45893
“ <i>R. defluvii</i> Ca11” humanes Isolat	Isolat aus der Lunge eines AIDS Patienten in Mailand	M. Guffanti (San Raffaele Wissenschaftsinstitut, Mailand, Italien)	Canetti et al., 2019
<i>L. monocytogenes</i>	Pathogenes Isolat	Universität Würzburg	
<i>L. monocytogenes</i> Δ <i>hlyA</i>	<i>L. monocytogenes</i> mit einer Deletion für <i>hlyA</i>	Universität Würzburg	Cossart et al., 1989
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET28a-VapA	Zur rekombinanten Expression von VapA-His ₆ , ohne Sekretionssequenz	K. von Bargen (dieses Labor)	Rofe et al., 2017
<i>E. coli</i> NEB5 α	DH5 α Derivat, Klonierungsstamm	New England Biolabs	C2987

2.2.2.1. Kultivierung von *Escherichia coli*

E. coli wurde auf LB-Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die bewachsenen Platten wurden anschließend für maximal vier Wochen bei 4 °C gelagert. Für Experimente wurde eine LB-Flüssigkultur mit einer Einzelkolonie angeimpft, die anschließend bei 37 °C und 200 Upm inkubiert wurde. Zum Ernten der Bakterien wurde die Suspension für 5 min bei 7000 x g pelletiert und einmal mit PBS gewaschen.

2.2.2.2. Kultivierung von *Rhodococcus spp.*

Die Kultivierung von *Rhodococcus spp.* erfolgte routinemäßig auf BHI-Agarplatten bei 30°C, um keine Expression der Virulenzgene zu induzieren. Die bewachsenen Platten wurden anschließend für maximal vier Wochen bei 4 °C gelagert. Für Infektionsexperimente und Wachstumskurven wurden Rhodokokken in BHI-Medium in Glasröhrchen angeimpft. Die Flüssigkulturen wurden experimentabhängig bei 30 °C (keine Expression der Virulenzgene) oder 37 °C (Expression der Virulenzgene) bei 200 Upm über Nacht inkubiert. Unmittelbar vor dem Experiment wurden die Bakterien bei 7000 x g für 4 min pelletiert und einmal mit PBS gewaschen, bevor über die OD₆₀₀ die Bakterienzahl bestimmt wurde (Abschnitt 2.2.2.4.).

Für Experimente mit *R. defluvii* wurden die BHI-Flüssigkulturen bei 30 °C und 200 Upm über Nacht inkubiert, da das Bakterium bei 37 °C kaum wächst. In Experimenten, in denen *R. equi* und *R. defluvii* verglichen wurden, wurden auch *R. equi* in BHI-Flüssigkulturen bei 30 °C und 200 Upm über Nacht kultiviert.

2.2.2.3. Kultivierung von *L. monocytogenes*

Die Kultivierung von *L. monocytogenes* erfolgte routinemäßig auf LB-Agarplatten bei 37 °C. Die bewachsenen Platten wurden anschließend für maximal vier Wochen bei 4 °C gelagert. Für Infektionsexperimente wurde eine Vorkultur in LB-Medium mit einer Einzelkolonie in Glasröhrchen angeimpft und bei 37 °C und 200 Upm über Nacht inkubiert. Unmittelbar vor dem Experiment wurden die Bakterien bei 7000 x g für 4 min pelletiert und einmal mit PBS gewaschen, bevor über die OD₆₀₀ die Bakterienzahl bestimmt wurde (Abschnitt 2.2.2.4.).

2.2.2.4. Bestimmung der Bakterienzahl

Für die Bestimmung der Bakterienzahl in einer Bakterien suspension wurde die optische Dichte (OD) bei 600 nm gemessen. Die OD₆₀₀ der Bakterien suspension bzw. einer geeigneten Verdünnung der Bakterien suspension wurde mittels Spektrophotometer bestimmt. Eine OD₆₀₀ von 1 entspricht dabei folgenden Bakterienzahlen:

<i>Rhodococcus equi</i>	1 OD ₆₀₀ = 1,5 x 10 ⁸ Bakterien
<i>Rhodococcus defluvii</i>	1 OD ₆₀₀ = 1,5 x 10 ⁸ Bakterien
<i>Listeria monocytogenes</i>	1 OD ₆₀₀ = 2,0 x 10 ⁸ Bakterien
<i>Escherichia coli</i>	1 OD ₆₀₀ = 2,0 x 10 ⁸ Bakterien

2.2.2.5. Einfrieren; Lagern und Auftauen von Bakterien

Für die Langzeitlagerung von Bakterien wurden die Bakterien über Nacht bei 37 °C (30 °C für *R. equi* und *R. defluvii*) und 200 Upm inkubiert. 600 µl der Bakteriensuspension wurde am darauffolgenden Tag mit 400 µl sterilem 50 %-igem Glycerol gemischt, in ein Kryoröhrchen überführt und bei -80 °C gelagert.

Zur Rekultivierung gefrorener Bakterien wurde mit einer sterilen Impföse gefrorenes Material aus dem Kryoröhrchen entnommen und auf einer vorgewärmten BHI-Agarplatte ausgestrichen. Diese wurde für ein bis zwei Tage bei 30 °C oder 37 °C inkubiert.

2.2.2.6. Wachstumskinetik in Flüssigmedium

Für die Bestimmung einer Wachstumskinetik wurden Bakterienvorkulturen aus Einzelkolonien in BHI- oder in Minimal-Salz-Medium mit 100 mM Acetat (MS/Ac) angeimpft und über Nacht bei 30 °C oder 37 °C und 200 Upm inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Vorkulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 (MS/Ac) oder 0,05 (BHI) verdünnt. Die Hauptkulturen wurden bei 30 °C oder bei 37 °C für 24 h und 200 Upm inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die OD₆₀₀ mittels Spektrophotometer bestimmt.

2.2.2.7. Herstellung von Bakterienüberständen

In 30 ml BHI-Medium wurden *R. equi* bzw. *L. monocytogenes* über Nacht bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Jeweils 2 ml der Kulturen wurden am nächsten Tag für die Herstellung von SDS-Proben für die Bestimmung des VapA-Proteinlevels verwendet. Dazu wurden die Bakterien pelletiert, der Überstand verworfen und in 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert und bei 95 °C für 5 min denaturiert.

Um Listeriolysin O aus Bakteriensuspensionen zu fällen, wurden 30 ml von *R. equi* bzw. *L. monocytogenes* über Nacht Kulturen mittels VivoSpin20 bei 4000 Upm und 4 °C auf 1 ml aufkonzentriert und davon die OD₆₀₀ bestimmt. Dieser Überstand wurde entweder für einen Hämolyse-Assay (2.2.2.8.) verwendet oder mittels TCA gefällt (2.2.5.9.)

2.2.2.8. Hämolyse-Assay

Für den Hämolyse-Assay wurde defibriniertes Schafsblut (Thermo Scientific Oxoid SR0051C) frisch vorbereitet. Dazu wurde 1 ml des Blutes bei 3.000 rpm für 2 min bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Blut wurde in 1 ml PBS (pH-Wert 6,5) vorsichtig resuspendiert, anschließend erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um eine 2 %-ige Erythrozytenlösung zu erhalten, wurden 100 µl des Blutes mit 4,9 ml PBS (pH-Wert 6,5) gemischt.

Die aufkonzentrierten Bakterienkulturüberstände (2.2.2.7.) wurden mit 100 mM DTT versehen (Endkonzentration 1 mM) und für 15 min bei 37 °C inkubiert, um Sulfhydrylgruppen freizuschalten.

In einer 96-Well Rundbodenplatte wurden in jede Vertiefung 50 µl PBS (pH-Wert 6,5) vorgelegt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe (immer 1:2 verdünnt) von den Kulturüberständen in den Wells angefertigt, bis eine Verdünnung von 1:1024 erreicht wurde. Als Positivkontrolle wurde anstatt des Kulturüberstandes 20 % Triton X-100 in H₂O und als Negativkontrolle PBS (pH-Wert 6,5) verwendet. In jede Vertiefung wurden 50 µl der 2 %-igen Erythrozytenlösung zugegeben. Dann wurde die Platte für 60 min bei 37 °C inkubiert.

2.2.3. Infektion von Makrophagen

2.2.3.1. Intrazelluläre Vermehrung von Bakterien

Makrophagen wurden in einer Zelldichte von $1,0 \times 10^5$ (RAW264.7) oder $1,5 \times 10^5$ (C57BL/6J) Zellen pro Well in einer 24-Well Platte ausgesät und über Nacht inkubiert. Dabei wurden die Makrophagen für Fluoreszenzmikroskopie auf Deckgläschen (Ø 12 mm) und Makrophagen für Lebendbakterienzahls Bestimmung (CFU) ohne Deckgläschen ausgesät. Vor der Infektion wurden die Makrophagen einmal mit vorgewärmtem Kompletmedium gewaschen und mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 3 (oder MOI 1 bei C57BL/6 Makrophagen) infiziert. Um die Infektion zu synchronisieren, wurden die Zellen für 2 min bei 160 x g zentrifugiert (Startpunkt der Infektion) und für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Makrophagen dreimal mit PBS gewaschen, um extrazelluläre Bakterien zu entfernen und in frischem DMEM Kompletmedium mit 3 µg/ml Vancomycin inkubiert. Zwei und 24 h nach Infektionsbeginn wurden die Makrophagen dreimal mit PBS gewaschen und entweder mit Formaldehyd fixiert (Immunfluoreszenz und mikroskopische Auswertung) oder weiterverwendet um die Lebendbakterienzahl zu bestimmen (CFUs).

2.2.3.2. Fixierung von Makrophagen

Die infizierten Makrophagen wurden 2 h und 24 h nach Infektionsbeginn dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 300 µl 4 % Formaldehyd für 15 min und 37 °C fixiert. Zu Entfernung von Formaldehydresten wurden die Proben mit 50 mM NH₄Cl in PBS für 30 min bei RT inkubiert. Abschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen.

2.2.3.3. Mikroskopische Bestimmung der intrazellulären bakteriellen Vermehrung

Zur Visualisierung der Bakterien wurden die fixierten und gequenchten Präparate mit 1 µM des DNA Farbstoffs SYTO13 in PBS für 10 min bei RT gefärbt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Proben auf Objektträgern in Mowiol eingebettet und über Nacht unter Lichtausschluss bei RT getrocknet. Die Objektträger wurden bis zur mikroskopischen Analyse im Dunkeln aufbewahrt. Mittels Axio Observer.Z1 (Zeiss, 10x Okulare, Plan-Achromat 63x/1,40; 100x/1,40, Ölimmersionsojektive) wurde die Zahl der intrazellulären Bakterien in 50 infizierten Makrophagen zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. Da eine exakte Bestimmung der Bakterienzahl bei großer Bakterienzahl nicht möglich war, wurden Makrophagen, die mehr als 20 Bakterien beinhalteten, der Wert 21 zugeordnet. Außerdem wurden die Proben auf robuste Vermehrung, d.h. auf den Anteil der Zellen, die mehr als 9 Bakterien beinhalteten, untersucht (nach Hondalus & Mosser, 1994).

2.2.3.4. Bestimmung der intrazellulären bakteriellen Vermehrung durch CFUs

Um die Lebendbakterienzahl zu bestimmen wurden die Proben zu den angegebenen Zeitpunkten (2 h und 24 h nach Infektionsbeginn) dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Makrophagen mit 0,1 % Triton in H₂O für 2 min bei RT lysiert. Es wurde eine Verdünnungsreihe (jeweils Faktor 10 Verdünnung) in H₂O angefertigt. Von jeder Verdünnung wurden 100 µl auf eine ½ LB-Agarplatte ausplattiert. Die Platten wurden für 24 h bei 37 °C inkubiert und anschließend die CFUs bestimmt.

2.2.3.5. Infektion der Makrophagen in Anwesenheit von rVapA

Für Infektionen in Anwesenheit von rVapA wurden die Makrophagen, wie unter Abschnitt 2.2.3.1., beschrieben ausgesät. Am Tag der Infektion wurde aliquotiertes rVapA aufgetaut und für 2 min bei 4 °C und 22000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration bestimmt (Abschnitt 2.2.5.6.) Anschließend wurde 10 µg/ml rVapA enthaltendes Medium hergestellt und sterilfiltriert (0,2 µm). Die Infektion der Makrophagen wurde analog zu Abschnitt 2.2.3.1. durchgeführt.

Sowohl bei der Infektion selbst, als auch nach dem Mediumwechsel, wurde rVapA enthaltendes Medium verwendet.

2.2.3.6. Infektion der Makrophagen in Anwesenheit pharmakologischer Substanzen

BafA1 (40 nM) war für die gesamte Dauer der Infektionen von Makrophagen wie in Abschnitt 2.2.3.1 im DMEM Komplettmedium enthalten.

Bei Infektionsversuchen, in denen andere pharmakologische Substanzen verwendet wurden, erfolgten erst das Aussäen der Makrophagen und die Infektion dieser wie in Abschnitt 2.2.3.1. beschrieben bzw. in Kombination mit rVapA wie in Abschnitt 2.2.3.5. beschrieben. Um sicher zu stellen, dass die intrazellulären Bakterien im phagozytischen Weg im Phago lysosom ankommen, wurde erst zum Zeitpunkt 2 h nach Infektionsbeginn ein erneuter Mediumwechsel durchgeführt. Das DMEM Komplettmedium mit 3 µg/ml Vancomycin wurde mit einzelnen pharmakologischen Substanzen bzw. deren Lösemittel (DMSO oder EtOH) komplementiert. Dabei wurden die in Tabelle 1 angegebenen Endkonzentrationen der jeweiligen Substanzen verwendet.

2.2.3.7. Markierung von Lysosomen mit BSA-Rhodamin

Um die Lysosomen der Makrophagen mit BSA-Rhodamin zu markieren, wurden RAW264.7 Makrophagen, wie in Abschnitt 2.2.3.1. beschrieben, in 24-Well Platten ausgesät und mittels Puls-Chase Protokoll gefärbt. 8 h nach dem Aussäen wurde das Zellmedium durch DMEM/+FCS/+G Medium mit 100 µg/ml BSA-Rhodamin ersetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert (*Pulse*). Am nächsten Tag wurden das Medium verworfen, die Makrophagen zwei Mal mit je 1 ml PBS gewaschen und mit DMEM Komplettmedium für weitere 2 h inkubiert (*Chase*). Anschließend konnten die Zellen für Infektionsversuche verwendet werden.

2.2.3.8. LysoTracker Färbung saurer Kompartimente

Um saure Kompartimente intrazellulär identifizieren zu können, wurde LysoTracker Red DND-99 verwendet. Dadurch, dass LysoTracker (LT) aus einem an eine schwache Base gekoppelten Fluorophor besteht, liegt die Sonde bei neutralem pH nur schwach protoniert vor und ist dadurch membranpermeabel. Gelangt LT in ein saures Kompartiment, kommt es zur Protonierung und somit zum Verlust der Membranpermeabilität, was zur selektiven Akkumulation von LT in sauren Organellen führt. Um die Ansäuerung von RCVs oder VAVs zu untersuchen wurden RAW264.7 Makrophagen, wie in Abschnitt 2.2.3.1., beschrieben ausgesät und infiziert. Zum Zeitpunkt 1,5 h und nach. 23,5 h der Infektion wurde das Medium durch Komplettmedium mit 200 nM LT Red DND-99 und 1 µM SYTO13 ersetzt und die Zellen

für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Makrophagen dreimal mit PBS gewaschen und die Präparate auf 5 mg/ml *low melting point* (LMP) Agarose in PBS eingebettet. Die Proben wurden für 5 min unter Lichtausschluss bei RT gehärtet und direkt am Axio Observer.Z1 Mikroskop (Zeiss, 10x Okulare, Plan-Achromat 63x/1,40, Ölimmersionsobjektive) analysiert. Von 50 infizierten Makrophagen wurden jeweils die RCVs auf die An- bzw. Abwesenheit eines LT-Signals untersucht.

2.2.3.9. Fluoreszente *Tracer* bei fortgeschrittener Infektion

Ob Makrophagen zu einem fortgeschrittenen Infektionszeitpunkt noch in der Lage sind zu phagozytieren, wurde mittels fluoreszenter *Tracer* (FM4-64, BSA-Rhodamin, BodipyTM FL C₁₆) untersucht. Dazu wurden Makrophagen wie in Abschnitt 2.2.3.1. beschrieben ausgesät und infiziert. 21 h nach Infektionsbeginn fand ein Mediumwechsel zu DMEM Komplettmedium +3 µg/ml Vancomycin + *Tracer* (Konzentrationen siehe Tabelle 1) statt. Nach 1 h *Pulse* wurden die Makrophagen dreimal mit PBS gewaschen und für weitere 2 h mit DMEM Komplettmedium + 3 µg/ml Vancomycin inkubiert (*Chase*). Die infizierten Makrophagen wurden unter Lichtausschluss wie in Abschnitt 2.2.3.2. fixiert bzw. 2.2.3.11. immungefärbt.

2.2.3.10. Induktion von lysosomalen Membranläsionen durch GPN

Um Läsionen in den Lysosomenmembranen zu induzieren, wurden ausgesäte und bereits infizierte Makrophagen verwendet (siehe Abschnitt 2.2.3.1.), bei denen 13 min vor Infektionsende ein Mediumwechsel zu DMEM Komplettmedium + 300 µM GPN vollzogen wurde. Die Makrophagen wurden bis zum Infektionsende bei 37 °C inkubiert und anschließend fixiert und immungefärbt (Abschnitt 2.2.3.2. bzw. 2.2.3.11.).

2.2.3.11. Antikörperfärbung fixierter Präparate für die Fluoreszenzmikroskopie

Die auf Deckgläschen fixierten und gequenchten Zellpräparate wurden zuerst für 10 min in 0,1 % Triton/PBS permeabilisiert und anschließend für 1 h in 5 % Ziegen Serum/ PBS blockiert. Im Anschluss wurden die Proben mit dem primären Antikörper bzw. einer Kombination aus primären Antikörpern (Verdünnung siehe Tabelle 3) in 5 % Ziegen Serum/PBS für mindestens 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Präparate mit dem sekundären fluoreszenten Antikörper bzw. Antikörpern in 5 % Ziegen Serum/PBS für 1 h inkubiert (Verdünnung siehe Tabelle 4). Abschließend wurden die Proben dreimal mit PBS gewaschen, die DNA mit 1 µM SYTO13 bzw. 5 µM SYTO40 in PBS gefärbt, erneut dreimal in PBS gewaschen und auf Mowiol eingebettet.

2.2.3.12. Filipin-III Färbung fixierter Zellpräparate für die Fluoreszenzmikroskopie

Um die Anreicherung von freiem Cholesterol in Makrophagen zu untersuchen, wurde der Farbstoff Filipin-III verwendet. Dazu wurden fixierte Zellpräparate, wie in Abschnitt 2.2.3.2. beschrieben verwendet. Diese wurden mittels Antikörper fluoreszent gefärbt (Abschnitt 2.2.3.11.) und abschließend wurde, anstatt einer DNA, eine Filipin-III Färbung mit 50 µM Filipin III/PBS für 40 min unter Lichtausschluss durchgeführt. Die Präparate wurden anschließend auf Mowiol eingebettet.

2.2.4. Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1. Verwendete Primer

Name	Sequenz
16S_rRNA_rev	5'-GGAAGGAAACCCACACCTAGC-3'
16S_rRNA-fw	5'-GATAAGCCTGGGAAACTGGGTC-3'
16S_rRNA_equifw	5'-GATATGAGCTCCTGTTCGCATG-3'
16S_rRNA_defluviifw	5'-CCTTGGACTGCATGGTTCTTGG-3'
LLO forward BamHI	5'-TAAGGGATCCATGAAGACCCTCCACAAG-3'
LLO reverse	5'-ACGTTCTCGGCTCGATGATCCCC-3'
ORF4_FW_Xbal	5'-AACAAAAAGCAGACGTATCTAGAGAGTTGGTC AGGACCTGAGGG-3'
ORF4_RV	5'-CTCCTCACTCCTGTCGCTGAACCTAGGCGCC CTCTTGTC-3'
ORF8_FW	5'-GTTTCAGCGACAGGAGTGAGG -3'
ORF8_RV_Xbal	5'-AGCTAGCTTCAGACGTGTCTAGAGATTAATGC CGTGGCCCTGC -3'

2.2.4.2. Kolonie Polymerase-Kettenreaktion (Kolonie PCR)

Um *R. equi* von *R. defluvii* zu unterscheiden, wurde ein PCR-basierter Assay verwendet, der die 16S rDNA Sequenzen unterscheidet. Die Bakterien wurden bei 30 °C auf BHI Agarplatten wachsen gelassen. Für die Kolonie PCR wurden Einzelbakterienkolonien in 50 µl sterilem ddH₂O resuspendiert, für 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend bei 17000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für die PCR als Template verwendet. Primer von Eurofins wurden in allen PCR Ansätzen verwendet. Dabei wurde stets derselbe reverse Primer (16S_rRNA_rev) verwendet. In Kombination mit dem Primer 16S_rRNA-fw wird für *R. equi* ein 679 bp und für *R. defluvii* ein 675 bp Produkt amplifiziert. In Kombination mit dem 16S_rRNA_equifw primer wird bei *R. equi* ein 646 bp Fragment amplifiziert, wobei kein

Amplikon für *R. defluvii* resultiert. Umgekehrt wird mit dem Primer 16S_rRNA_defluviifw bei *R. defluvii* ein 642 bp Fragment amplifiziert, wohingegen *R. equi* kein Amplikon aufweist.

Template (in H ₂ O)	5 µl
Primer forward (10 µM)	0,75 µl
Primer reverse (10 µM)	0,75 µl
5x FIREPol® Master Mix Ready to Load	5 µl
H ₂ O	13,5µl
Gesamt	25 µl

Phase	Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklus
1	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1x
2	Denaturierung	95 °C	1 min	30 x
	Anlagerung	52 °C	1 min	
	Elongation	72 °C	45 sek	
3	Finale Elongation	72 °C	10 min	1x
4	Ende	4 °C	∞	

2.2.4.3. Klonierung von pSMT3-LLO

2.2.4.3.1. PCR

Als Template wurde pMA:VapA_upstream-LLO (Gekauft von *Lifetechnologies*; Anhang 1) verwendet, das neben *hlyA* (codonoptimiert für *R. equi*; Anhang 2) einen mycobakteriellen *hsp60* und einen *vapA* Promotor enthält (Plasmidkarte und Sequenz von codonoptimierter *hlyA*-Sequenz befinden sich im Appendix). Da der GC-Anteil der zu amplifizierenden Sequenz hoch ist, wurde die Q5 Polymerase (NEB) mit GC Enhancer verwendet.

Template (in H ₂ O)	2 µl (50 ng)
Primer forward (10 µM)	2,5 µl
Primer reverse (10 µM)	2,5 µl
5x Q5 Reaktionspuffer	10 µl
dNTPs (20 nM)	0,5 µl
Q5 Polymerase	0,5 µl
GC Enhancer	10 µl
H ₂ O	22 µl
Gesamt	50 µl

Phase	Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklus
1	Initiale Denaturierung	98 °C	30 sek	1x
2	Denaturierung	98 °C	10 sek	30 x
	Anlagerung	68 °C	30 sek	
	Elongation	72 °C	1:30 min	
3	Finale Elongation	72 °C	2 min	1x
4	Ende	4 °C	∞	

2.2.4.3.2. Restriktionsverdau

Die amplifizierte DNA und der Leervektor pSMT3-M (*addgene*) wurden mit den Restriktionsenzyme BamHI und EcoRV nach Herstellerangaben des Fermentas Fast Digest Kits verdaut. Die Reaktion wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Die restriktionsverdaute DNA wurde durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt (Abschnitt 2.2.4.5.), die Banden auf einem UV-Tisch ausgeschnitten und die DNA mittels NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Machery & Nagel) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Der verdaute Vektor (1 µg) wurde mit FastAP thermosensitiver alkaliner Phosphatase für 15 min bei 37 °C behandelt.

Die gereinigte DNA wurde für den folgenden Ligationsansatz (Absatz 2.2.4.3.3.) verwendet.

2.2.4.3.3. Ligation

Linearer Vektor	100 ng
PCR Produkt	33 ng
T4 DNA Ligase Puffer	2 µl
50 % PEC 4000	2 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
H ₂ O	auffüllen auf
Gesamt	20 µl

Der Ligationsansatz wurde für 10 min bei RT inkubiert und anschließen in hitzekompetente Bakterien transformiert.

2.2.4.4. Klonierung von pYUB415-*orf4-orf8* durch SLIC (*Sequence and ligation independent cloning*)

Eine *R. equi* 103+ Einzelbakterienkolonien wurde in 50 µl sterilem ddH₂O resuspendiert, für 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend bei 17000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für die PCR als Template verwendet.

Template (in H ₂ O)	5 µl
Primer forward (10 µM)	0,75 µl
Primer reverse (10 µM)	0,75 µl
5x FIREPol® Master Mix Ready to Load	5 µl
H ₂ O	13,5µl
Gesamt	25 µl

Phase	Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklus
1	Initiale Denaturierung	98 °C	30 sek	1x
2	Denaturierung	98 °C	10 sek	30 x
	Anlagerung	56 °C	30 sek	
	Elongation	72 °C	1:10 min	
3	Finale Elongation	72 °C	5 min	1x
4	Ende	4 °C	∞	

Die Sequenz des Amplikons ist in Anhang 3 aufgelistet.

Die amplifizierte DNA und der Leervektor pYUB415 (Addgene) wurden mit dem Restriktionsenzyme XbaI nach Herstellerangaben des Fermentas Fast Digest Kits verdaut. Die Reaktion wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Die restriktionsverdaute DNA wurde durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt (Abschnitt 2.2.4.5.), die Banden auf einem UV-Tisch ausgeschnitten und die DNA mittels NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Machery & Nagel) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Der verdaute Vektor (1 µg) wurde mit FastAP thermosensitiver alkaliner Phosphatase für 15 min bei 37 °C behandelt.

Vektor	100 ng
Amplikon (orf4)	300 ng
Amplikon (orf8)	300 ng
BSA (10x)	1 µl
Buffer #2 (10x)	1 µl
T4 Polymerase	0,5 µl
H ₂ O	auf
Gesamt	10 µl

Dabei stammten BSA (10x) und Buffer #2 (10x) von New England Biolabs.

Der Reaktionsansatz wurde für 2,5 min bei RT und anschließend für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 5 µl für die Transformation in *E. coli* DH5α (2.2.4.9.1.) verwendet.

2.2.4.5. Agarosegel-Elektrophorese

Nach vollendeter PCR wurden die Proben mit 5 µl 6x DNA Ladepuffer versetzt und auf ein Midori Green (Nippon Genetics Europe, Verwendung gemäß Herstellerangaben) enthaltendes 1 % (w/v) Agarosegel geladen. Bei 100 V wurden die Proben für 30 min aufgetrennt und mittels Gel Doc Imaging System analysiert.

2.2.4.6. Herstellung hitzekompetenter *E. coli*.

Mit einer Einzelkolonie von *E. coli* DH5α oder *E. coli* BL21 wurden 3 ml Psi-Medium inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 200 Upm geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 100 ml Psi-Medium mit 0,5 ml der Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,5 bei 37 °C und 200 Upm inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienkultur für 10 min in Eiswasser gekühlt. Die Bakterien wurden für 5 min bei 5000 x g und 4 °C pelletiert und in eiskaltem TfbI (40 % des Pelletvolumens) resuspendiert. Die Zellen wurden für 15 min auf Eis inkubiert und für 10 min bei 2000 x g und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde in eiskaltem TfbII (2 % des Pelletvolumens) resuspendiert und in vorgekühlten 2 ml Schraubdeckelgefäßen aliquotiert (50 µl/ Aliquot). Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.4.7. Herstellung elektrokompetenter *R. equi*

Mit einer Einzelkolonie von *R. equi* wurden 10 ml BHI Medium angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 200 Upm inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 100 ml BHIFCC (BHI *For Competent*

Cells) mit einer OD_{600} von 0,1 angeimpft und bei 30 °C und 200 Upm bis zu einer OD_{600} von 0,6-0,8 inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde für 9 min in einem 50 °C-warmen Wasserbad erhitzt und anschließend direkt in einem Eiswasserbad abgekühlt. Die Bakterien wurden für 15 min bei 8965 x g und 4 °C pelletiert. Das Bakterienpellet wurde viermal mit 30 ml eiskalten Elektroporationspuffer gewaschen und schließlich in 2 ml eiskalten Elektroporationspuffer mit 15 %(v/v) Glycerin resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden aliquotiert (100 µl/Aliquot), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert

2.2.4.8. Verwendete Plasmide

Tabelle 8. In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Gen	Vektor-Rückgrat	Resistenz	Beschreibung	Referenz
	pEYFP-C1	Kanamycin	Expression eines YFP	Lambert et al., 2007
Chmp3	pEYFP-C1	Kanamycin	Expression eines dominant-negativen Chmp3 aufgrund der Fusion mit EYFP	Lambert et al., 2007
	pDsRed-N1	Kanamycin	Expression eines DsRed	Lambert et al., 2007
Chmp4b	pDsRed-N1	Kanamycin	Expression eines dominant-negativen Chmp4 aufgrund der Fusion mit DsRed	Lambert et al., 2007
Hgs	pEGFP-C2	Kanamycin	Expression eines dominant-negativen Hgs aufgrund der Fusion mit EGFP	Janvier et al., 2011
	pSMT3-M	Hygromycin	Leervektor, enthält einen <i>hsp60</i> Promotor	Carroll et al., 2010
<i>vapA</i> :LLO	pMA	Hygromycin	Enthält für <i>R. equi</i> codonoptimiertes <i>hlyA</i> , unter der Kontrolle eines <i>vapA</i> Promotors	Diese Arbeit
LLO	pSMT3-M	Hygromycin	Enthält für <i>R. equi</i> codonoptimiertes <i>hlyA</i> , unter der Kontrolle eines <i>hsp60</i> Promotors	Diese Arbeit
	pYUB415	Hygromycin	<i>Mycobacterium-Escherichia coli</i> Shuttle Plasmid	Giguère et al., 1999
<i>orf4-orf8</i>	pYUB415	Hygromycin	pYUB415 mit <i>orf4</i> und <i>orf8</i> aus pVAPA von <i>R. equi</i> 103	Diese Arbeit
Vps4	pEGFP-N1	Kanamycin	Expression eines Vps4-GFP Fusionsproteins	Tu et al., 2010
Vps4 K173Q	pEGFP-N1	Kanamycin	Expression eines dominant-negativen Vps4-GFP Fusionsproteins; Punktmutation in der Aminosäure 173; Defizient in der ATP Bindung	Tu et al., 2010

2.2.4.9. Transformation von Bakterien

2.2.4.9.1. Hitzeschocktransformation in *E. coli*

Kompetent *E. coli* DH5 α oder *E. coli* BL21 wurden für 10 min auf Eis aufgetaut und mit <100 ng Plasmid-DNA durch leichtes schnippen gemischt. Die Zellen wurden für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 40 sek im Wasserbad bei 42 °C hitzegeschockt. Die Bakterien wurden für 2 min auf Eis abgekühlt und anschließend mit 1 ml LB-Medium gemischt. Die Bakterien wurden für 1 h bei 37 °C und 1000 Upm auf einem Schüttelblock inkubiert. Danach wurden die transformierten Bakterien auf Selektionsagarplatten (LB + Antibiotikum) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.4.9.2. Elektroschocktransformation in *R. equi*

Elektrokompetente *R. equi* wurden für 10 min auf Eis aufgetaut und in eine vorgekühlte 2 mm Elektroporationsküvette (Biozym) pipettiert. Die Bakterien wurden mit 2 μ g Plasmid-DNA gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien in der Küvette mittels Micropulser (BioRad) und dem Programm EC2 mit einem 2,5 kV Puls elektroporiert. Die Bakterien wurden direkt nach dem Puls mit 1 ml eiskaltem BHI-Medium verdünnt und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension in ein 13 ml Schnappdeckel-Röhrchen überführt und für 1 h bei 30 °C und 200 Upm inkubiert. Die Bakterien wurden auf BHI-Agarplatten (+ Antibiotikum) zur Selektion ausplattiert und für zwei Tage bei 30 °C inkubiert.

2.2.4.10. Mini Plasmidisolation

E. coli Einzelkolonien wurden in 3 ml LB-Medium (+Antibiotikum) angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 Upm inkubiert. Die Bakterienkultur wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, für 1 min bei 16,250 x g pelletiert und der Überstand verworfen. Für die Mini-Präparation von Plasmiden aus den Bakterienpellets wurde anschließend das NucleoSpin Plasmid EasyPure Kit (Marchery & Nagel) entsprechend der Herstelleranleitung verwendet. Die Plasmide wurden in 50 μ l destilliertem und nukleasefreiem Wasser eluiert. Von den gereinigten Plasmiden wurde die DNA-Konzentration mittels NanoPhotometer bestimmt, bevor diese bei -20 °C gelagert wurden.

2.2.4.11. Endotoxinfreie (EF) Plasmidisolation

Für eine Plasmidextraktion wurde mit einer *E. coli* Einzelkolonie zunächst eine 3 ml Vorkultur (LB-Medium + entsprechendes Antibiotikum) angeimpft und bei 37 °C und 200 Upm über Nacht inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurde eine 300 ml Hauptkultur (LB-Medium +

entsprechendes Antibiotikum) angeimpft und bei 37 °C und 200 Upm über Nacht inkubiert. Die Kultur wurde bei 5790 x g und 4 °C für 10 min pelletiert (in Avanti J-25 mit JA-10 Rotor). Zur Plasmidisolierung wurde das NucleoBond® Xtra Maxi EF Kit (Marchery & Nagel) entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Das erhaltene Plasmidpellet wurde anschließend in 200 µl endotoxinfreiem Wasser gelöst. Die DNA Konzentration wurde mittels NanoPhotometer bestimmt, bevor das Plasmid bei -20 °C gelagert wurde.

2.2.4.12. Sequenzierung

Gereinigte Plasmide wurden bei der Eurofins Genomics sequenziert und die Sequenzen mit FinchTV (Biologie Software, v2020-2023) analysiert.

2.2.4.13. Transfektion von RAW264.7 Makrophagen mit Plasmiden

Um RAW264.7 Makrophagen mit zuvor isolierten endotoxinfreien Plasmiden (Abschnitt 2.2.4.11) mittels Lipofectamine® LTX & PLUS Reagenz (Invitrogen) zu transfizieren, wurden 8×10^4 RAW264.7 Makrophagen pro Vertiefung in eine 24-Well Platte ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das alte Medium durch frisches DMEM Komplettmedium getauscht. Für die Transfektion wurde in einem Reaktionsgefäß pro Reaktionsansatz 50 µl OptiMEM Medium mit 4 µl Lipofectamine® LTX Reagenz gemischt. In einem separaten Reaktionsgefäß wurden 250 µl OptiMEM Medium mit 5 µg DNA (0,5-5 µg/µl) und 5 µl PLUS Reagenz gemischt. Anschließend wurden jeweils 50 µl der verdünnten DNA mit 50 µl der verdünnten Lipofectamine® LTX Reagenz vereint und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 50 µl des DNA-Lipid-Komplexes pro Vertiefung zu den Makrophagen gegeben und für 18 - 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Makrophagen für Infektionsversuche verwendet.

2.2.4.14. Transfektion von RAW264.7 Makrophagen mit siRNA

RAW264.7 und J774E Zellen wurden mittels Elektroporation mit siRNA (*small interfering RNA*) transfiziert. Vor dem Tag der Transfektion wurden die Makrophagen 1:2 (RAW264.7) bzw. 1:3 (J774E) gesplittet, sodass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 50-70 % aufwiesen. Die Makrophagen wurden zweimal mit PBS gewaschen, in 2 ml PBS mittels sterilem Gummischaber abgelöst und die Zellzahl wie in Abschnitt 2.2.1.4. beschrieben bestimmt. Pro Transfektionsansatz wurden 4×10^6 Zellen verwendet. Das entsprechende Volumen der Zellsuspension wurde bei 160 x g für 5 min pelletiert und in 100 µl OptiMEM Medium pro Reaktionsansatz aufgenommen. In einer 4 mm Küvette (Biozym, Art.-Nr.: 748052) wurde zuerst 1 µl einer 40 µM siRNA vorgelegt, anschließend 100 µl der Zellsuspension blasenfrei

überführt und für 3 min bei RT inkubiert. Um die Membran zu elektroporieren wurden anschließend zwei 1000 V Pulse (je 0,5 ms) mit 5 sek Pause zwischen den Pulsen mit dem BioRad Gene Pulser Xcell abgegeben. Nach den Pulsen wurde die Zellsuspension in 8 ml vorgewärmtes DMEM Komplettmedium überführt (entspricht einer Zellzahl von 5×10^5 Zellen/ml). Für Infektionsversuche wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung einer 24-Well Platte auf Deckgläschen (12 mm) ausgesät. Um den *Knockdown* am nächsten Tag biochemisch zu überprüfen, wurden 2×10^6 Zellen in einer 10 cm Schale ausgesät.

2.2.5. Biochemische Methoden

2.2.5.1. Affinitätsreinigung rekombinanter His₆-markierter Proteine

Für die Expression von rekombinantem His₆-markierten VapA wurden *E. coli* BL21(DE3)pLysS Bakterien verwendet, die das Plasmid pET28a-VapA beinhalten. Mit einer Einzelkolonie wurden 20 ml LB-Medium (+ 100 µg/ml Kanamycin) angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 Upm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Vorkultur in 2 x 500 ml LB Medium (+ 100 µg/ml Kanamycin) in jeweils 2 L Erlenmeyerkolben verdünnt (1:50) und bis zu einer OD₆₀₀ von 1–1,5 (ca. 4 h) bei 37 °C und 200 Upm inkubiert. Anschließend wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Bakterienkulturen für weitere 4 h inkubiert. Danach wurden die Erlenmeyerkolben auf Eis abgekühlt (auf 4 °C), in Beckmann Becher überführt und für 10 min bei 5790 x g und 4 °C zentrifugiert (in Avanti J-25 mit JA-10 Rotor). Die Bakterienpellets wurden in eiskaltem PBS resuspendiert, in 50 ml Zentrifugenröhrchen vereint und für 10 min bei 9072 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Nassgewicht der Pellets bestimmt. Die Pellets wurden anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die gefrorenen Pellets wurden auf Eis aufgetaut (ca. 30 min) und in 4 ml/g Pellet Lysepuffer mit einer serologischen Pipette resuspendiert. Nach Zugabe von 1 mg/ml Lysozym wurde die Bakteriensuspension für 30 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde für 6 x 60 sek (mit jeweils 60 sek Pause) Ultraschall behandelt, um die DNA zu fragmentieren. Das Lysat wurde auf 2 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und für 30 min bei 17000 x g und 4 °C zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde durch einen 0,45 µm Partikelfilter filtriert. Von dem geklärten Lysat und allen weiteren Reinigungsschritten wurden jeweils 100 µl zur Analyse entnommen und eingefroren.

Die Affinitätsreinigung erfolgte mit Nickel-NTA-Agarose (Protino Ni-NTA, Macherey & Nagel). Dazu wurden 2 ml Ni-NTA-Agarose Suspension (entspricht 1 ml Ni-NTA-Agarose) in einem Zentrifugationsröhrchen bei 500 x g und 4 °C sedimentiert und einmal mit 10 ml Lysepuffer (ohne Lysozym) gewaschen. Das geklärte Lysat wurde mit der gewaschenen Ni-NTA-Agarose für 1 h bei 4 °C in einem Rotator inkubiert. Bei allen folgenden Wasch- und Elutionsschritten

wurde darauf geachtet, dass die Ni-NTA nicht trockenfällt. Die Suspension wurde in eine Chromatographiesäule gefüllt und durch Gravitation leerlaufen gelassen. Die Säule wurde erst dreimal mit je einem Säulenvolumen Waschpuffer I und anschließend dreimal mit je einem Säulenvolumen Waschpuffer II gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden mit 6 x 1 ml Elutionspuffer von der Säule eluiert und anschließend deren Proteinkonzentration mittels Bradfordassay (Abschnitt 2.2.5.6) bestimmt. Die Fraktionen mit den höchsten Konzentrationen wurden vereint. Um ein Ausfallen der Proteine zu verhindern, wurde das vereinte Eluat bei einer Konzentration von ≥ 10 mg/ml mit Elutionspuffer verdünnt. Anschließend wurde das vereinte Eluat für 2 h gegen 2 L 10 mM EDTA/PBS bei 4 °C dialysiert (Dialyseschlauch MWKO 3500), um das Imidazol zu entfernen bzw. gelöste Nickelionen, die ein Ausfallen der Proteine begünstigen, zu komplexieren. Anschließend wurde der Dialysepuffer gegen 2 L PBS ausgetauscht. Das Eluat wurde anschließend über Nacht bei 4 °C weiter dialysiert. Am nächsten Tag wurde der Dialysepuffer erneut gegen 2 L PBS ausgetauscht und für weitere 2 h bei 4 °C inkubiert. Die dialysierte Proteinlösung wurde für 10 min bei 17000 x g und 4 °C zentrifugiert, um ausgefallene Proteine zu entfernen. Der Überstand wurde abgenommen, dessen Proteinkonzentration mittels Bradfordassay (Abschnitt 2.2.5.6) bestimmt, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aliquots wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.5.2. Magnetische Lysosomenisolierung

Für die Isolierung von Lysosomen wurden RAW264.7 bzw. J774E Makrophagen in 10 cm Platten kultiviert. Um ausreichend gereinigte Lysosomen für drei SDS Gele zu erhalten, wurden pro Ansatz zehn Platten verwendet. Sobald die Schalen 80 % konfluent waren, wurden die Lysosomen mittels *Pulse/Chase* Protokoll mit Ferrofluid markiert. Pro 10 cm Platte wurden 10 µl Ferrofluid mit 90 µl PBS gemischt und für 30 sek ultrabeschallt, um Aggregate des Ferrofluids zu lösen. Anschließend wurde das Ferrofluid mit einem 0,2 µm Filter sterilfiltriert und in DMEM Medium mit Glutamin überführt. Das Medium der Platten wurde durch 3 ml des Ferrofluid-enthaltenden Mediums getauscht und für 30 min bei 37 °C inkubiert (*Pulse*). Daraufhin wurde die Ferrofluidlösung von der Platte abgesaugt und die Platte zweimal mit 4 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde frisches DMEM Komplettmedium zugegeben und für 2 h bei 37 °C inkubiert (*Chase*). Das Ferrofluid befand sich nun in den Lysosomen der Makrophagen. Nun wurde zu den Makrophagen rekombinantes VapA (10 µg/ml) bzw. 40 nM BafA1 in DMEM Komplettmedium zugegeben. Nach 18-stündiger Behandlung wurde das Medium verworfen, die Zellen in 2 ml kaltem PBS mit einem Zellschaber von den Platten gelöst und in einem 50 ml Röhrchen gesammelt. Die Makrophagen wurden 7 min bei 160 x g und 4 °C pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden erst in 20 ml 5 mM EDTA/PBS und danach in 20 ml HB Puffer gewaschen. Das Pellet wurde in 1 ml HB Puffer mit

1x Proteaseinhibitorcocktail gelöst. Die Makrophagen wurden im Dounce Homogenisator mit 18 Stößen homogenisiert. Das Homogenat wurde gesammelt und bei 2000 Upm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der PNS (*post nuclear supernatant*, befindet sich in der oberen Phase) abgenommen. Für SDS-Proben wurden 100 µl in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Das Pellet wurde erneut in 1 ml HB Puffer gelöst und zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem PNS vereint. Um die Lysosomen aus dem PNS zu isolieren, wurden je 1 ml des PNS auf 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt, diese in einen Magnetständer (DynaMag2 Magnetständer, Invitrogen) gestellt und auf einer Wippe liegend für 30 min bei 4 °C inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und die Lysosomen, die sich an der Wand des Reaktionsgefäßes befanden, vereint. Anschließend wurde die Proteinmenge des PNS und der Lysosomen mittels Bradfordassay (Abschnitt 2.2.5.6) bestimmt. Lysosomen wurden entweder bei -80 °C (Inkubation mit Bakterien, Inkubation bei unterschiedlichem pH) oder zusammen mit dem PNS bei -20 °C (Western Blot Analyse) bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.5.3. Zytosolisierung aus RAW264.7

Die Isolierung von Zytosol aus RAW264.7 Makrophagen wurde steril durchgeführt. Die RAW264.7 Makrophagen von 20 10 cm Platten (je 80 – 90 % Zelldichte) wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend in 2 ml PBS mit einem sterilen Zellschaber abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Reaktionsröhrchen überführt und bei 160 x g und 4 °C für 5 min pelletiert. Das Pellet wurde anschließend in 20 ml HB Puffer gewaschen und der Überstand verworfen. Um eine möglichst hohe Proteinkonzentration zu erhalten, wurde das Pellet in 500 µl HB Puffer gelöst, anschließend in einen sterilen Dounce Homogenisator überführt und mit 18 Stößen homogenisiert. Die Suspension wurde in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt und bei 40000 x g und 4 °C für 1 h zentrifugiert. Während der Ultrazentrifugation wurden die Zelltrümmer und Organellen (Pellet) vom Zytosol (Überstand) getrennt. Das Zytosol wurde abgenommen, die Proteinkonzentration bestimmt und in Aliquots (40 µg / max. 4 µl) in flüssig Stickstoff schockgefroren. Die Aliquots wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.5.4. Markierung von BSA mit Rhodamin

Durch Reaktion von 5(6)-Carboxytetramethylrhodamin N-Hydroxysuccinimidylester (Rhodamin-NHS) mit den primären Aminen von Bovinem Serumalbumin (BSA), wurde BSA mit Rhodamin markiert. Dazu wurde zuerst Rhodamin-NHS hergestellt, indem 11,6 mM 5(6)-Carboxytetramethylrhodamin, 65 mM N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (EDAC) und 90 mM N-Hydroxysuccinimid in 2,4 ml Dimethylformamid (DMF)

gelöst und für 2 h bei RT unter Lichtausschluss auf einem Wippschüttler inkubiert wurden. Anschließend wurde Rhodamin-NHS mit 5 mg/ml BSA in 0,1 M NaHCO₃ gemischt und für weitere 2 h bei RT unter Lichtausschluss auf dem Wippschüttler inkubiert. Durch Zugabe von 100 µl 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8) wurde die Reaktion gestoppt, da Tris wie BSA über primäre Amine nicht reagiertes Rhodamin-NHS bindet. Um nicht gebundenes Rhodamin zu entfernen, wurde die Lösung bei 4 °C über Nacht gegen PBS dialysiert. Die dialysierte BSA-Rhodamin-Lösung wurde sterilfiltriert (0,2 µm) und bei 4 °C unter Lichtausschluss gelagert.

2.2.5.5. Herstellung von RIPA-Zelllysaten

Um die gesamte Proteinmenge von RAW264.7 Makrophagen zu untersuchen, ggf. nach siRNA Transfektion (Abschnitt 2.2.4.14.), wurden RAW264.7 Makrophagen in 10 cm Schalen kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Makrophagen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS mit einem Gummischaber abgelöst. Die Zellen wurden bei 22000 x g und RT für 1 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 30 - 80 µl RIPA-Lysepuffer resuspendiert. Die Proben wurden für 30 min auf Eis inkubiert und alle 10 min mit einem Vortex gemischt. Im Anschluss wurden die Lysate bei 22000 x g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der proteinenthaltende Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration mit durch einen Bradford Assay (Abschnitt 2.2.5.6.) bestimmt.

2.2.5.6. Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford Assay

Die Proteinkonzentrationen wurde nach der Bradford Methode mit dem Bio Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate ermittelt. Dazu wurden in Halbmikroküvetten je 799 µl destilliertes Wasser vorgelegt, in welches 1 µl der zu untersuchenden Lösung pipettiert wurde. Zu den Verdünnungen wurden 200 µl des Bradford-Reagenzes hinzugegeben, die Lösungen gemischt und für 10 min bei RT abgedunkelt inkubiert. Anschließend wurde die Stärke des Farbumschlags durch Messung der Absorption bei 595 nm bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde dann durch die Division des Absorptionswertes durch den Faktor 0,05 (entspricht der Steigung der BSA-Kalibriergeraden) errechnet.

2.2.5.7. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) separiert. Die Proben wurden mit 5 x Probenpuffer (Laemmli) zu einer 1x Konzentration gemischt, anschließend für 10 min bei 95 °C im Heizblock denaturiert und das kondensierte Wasser (im Deckel des Reaktionsgefäß) runtergefugt. Die Proben wurden in ein Polyacrylamidgel (4 %

Sammelgel und 10-15 % Trenngel, je nach Proteingröße) geladen und bei 90 V (Sammelgel) bzw. 120 V (Trenngel) für 30 min bzw. 120 min elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend entweder mit Comassie-Blau gefärbt, um die Gesamtheit an Proteinen zu analysieren, oder weiterverwendet für Western-Blot.

2.2.5.8. Western Blot

Nach erfolgter SDS-PAGE, wurden mittels Tank-Blot-Verfahren die Proteine bei 300 mA für 1,5 h auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Um das verbleibende Methanol zu entfernen, wurde anschließend die Membran mit destilliertem Wasser gewaschen. Durch eine Ponceau S Färbung wurde der erfolgreiche Transfer der Proteine überprüft und anschließend mit destilliertem Wasser wieder herausgewaschen. Alle folgenden Schritte wurden auf einer 2D- Wippe durchgeführt. Die Membran wurde anschließend für 1 h mit 5 % Milchpulver/PBST blockiert und über Nacht mit einem primären Antikörper (Tabelle 3) in 5 % Milchpulver/PBST bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit PBST gewaschen, für 1 h mit dem entsprechenden sekundären Antikörper in 5 % Milchpulver/PBST inkubiert und erneut dreimal für 10 min mit PBST gewaschen. Zur Detektion der markierten Proteine wurde der Blot mit eigens hergestellter ECL für 2 min inkubiert. Das Signal wurde in der Dunkelkammer auf Röntgenfilme übertragen und entwickelt. Zur Auswertung der Signalintensitäten wurde der Blot gescannt und mit dem Gel-Analyse Werkzeug der Software Fiji/ImageJ (Schindelin et al., 2012) ausgewertet.

2.2.5.9. TCA-Fällung

Um Listeriolysin O aus Bakteriensuspensionen zu fällen, wurden aufkonzentrierten Bakterienkulturüberstände (2.2.2.7.) verwendet, die einer OD₆₀₀ von 9 entsprachen. Dem Überstand wurden 25 % (v/v) eiskalte 50 %-ige TCA hinzugegeben, 30 sek gevortext und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 4 °C und 22000 x g pelletiert. Die Pellets wurden in 500 µl eiskaltem Aceton p.a. resuspendiert und erneut für 15 min bei 4 °C und 22000 x g zentrifugiert. Die Überstände wurde verworfen und die Pellets für 10 min bei 50 °C getrocknet. Anschließend wurden die Pellets in 85 µl 1x SDS-Probenpuffer und 5 µl 1M Tris/Base resuspendiert (10 µl entspricht 1 OD₆₀₀) und bei 95 °C für 10 min denaturiert. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.5.10. *In vitro* Inkubation von gereinigten Lysosomen

Um den Einfluss von pH auf die Stabilität lysosomaler Proteine in-vitro zu untersuchen, wurden analog zu Abschnitt 2.2.5.2. Lysosomen magnetisch isoliert. 40 µg gereinigte Lysosomen

wurden erst in 100 µl MES (pH 5) bzw. PIPES (pH-Wert 7) Puffer für 5 h bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 22000 x g und 4 °C für 1 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 40 µl 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Proben wurden bei 95 °C für 10 min denaturiert und anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

2.2.5.11. Zytotoxizitätsassay (LDH-Assay)

Für den Zytotoxizitätsassay wurden $1,5 \times 10^5$ RAW264.7 Makrophagen in einer 24-Well Platte ausgesät und über Nacht inkubiert und mit *R. equi* mit einer MOI 3 bzw. MOI 30 (Abschnitt 2.2.3) infiziert. Dabei wurde die Zytotoxizität über die Laktat-Dehydrogenase (LDH) Freisetzung der Makrophagen zu den Zeitpunkten 2 h und 24 h nach Infektionsbeginn bestimmt. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden je 800 µl der Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt, für 5 min bei 7000 x g zentrifugiert und anschließend je 600 µl in neue Reaktionsgefäße überführt. Um die maximale LDH-Freisetzung zu den jeweiligen Zeitpunkten zu ermitteln, wurden unbehandelte Makrophagen lysiert, indem die Kulturüberstände verworfen und sie mit 110 µl einer 2 %-igen Triton X-100 Lösung (in H₂O) für 2 min bei RT inkubiert wurden.

Von jeder Probe wurden 100 µl des Überstands in eine Vertiefung einer 96-Well Platte transferiert. Dabei wurden für die Negativkontrolle 100 µl reines Kulturmedium verwendet. In jede Vertiefung wurden 100 µl der Reaktionslösung (112,5 µl LDH-Dye-Lösung und 2,5 µl Catalyst-Lösung) zugegeben, die Platte für 10 min unter Lichtausschluss inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von je 50 µl 1M HCl pro Vertiefung abgestoppt. Die Absorptionen der Proben wurden bei 450 nm im Microplate Fluorescence Reader FLx800 gemessen. Die Zytotoxizität wurde wie folgt bestimmt:

$$\text{Zytotoxizität [\%]} = \frac{(\text{Messwert Probe} - \text{Messwert Negativkontrolle}) \times 100}{(\text{Messwert Positivkontrolle} - \text{Messwert Negativkontrolle})}$$

2.2.6. Erweiterte mikroskopische Methoden

2.2.6.1. Lebendzell-Mikroskopie

Um infizierte RAW264.7 Makrophagen lebend fluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen, wurden 2×10^5 RAW264.7 oder RAW264.7 GFP-LAMP1 Makrophagen auf µ-Platten (Ibidi) ausgesät und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Makrophagen mit *R. equi* 103+ pCharge3-Turbo635 (MOI 3) für 30 Minuten (ohne Zentrifugation) bei 37 °C infiziert. Anschließend wurden die Makrophagen dreimal mit 1 ml PBS gewaschen und für die verbleibende Infektionsdauer mit DMEM Komplettmedium + 3 µg/ml Vancomycin inkubiert. Die Makrophagen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mit dem Carl Zeiss Spinning Disc

mikroskopisch untersucht. Dabei befanden sich die infizierten Makrophagen bei 5 % CO₂ und 37 °C.

2.2.6.2. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

RAW264.7 Makrophagen wurden für die Herstellung von elektronenmikroskopischen Präparaten in 10 cm Platten kultiviert (eine Schale entspricht einer Probe) und entweder mit 10 µg/ml rVapA oder 40 nM BafA1 behandelt oder mit virulenten oder avirulenten *R. equi* infiziert. Die Makrophagen wurden mit einer MOI 3 in 2 ml DMEM Komplettmedium für 30 min bei 37 °C infiziert (ohne Zentrifugation) und anschließend zweimal mit 4 ml PBS gewaschen. Die Makrophagen wurden bis zum Zeitpunkt 24 h p.i. in 8 ml DMEM Komplettmedium inkubiert. Für die Behandlung der Zellen mit U18666A oder DMSO, wurde das Medium 2 h nach Infektionsbeginn gegen 8 ml 2 µg/ml U18666A-enthaltendes Komplettmedium bzw. dem äquivalenten Volumen DMSO-enthaltenden Komplettmedium ausgetauscht und bis zum Zeitpunkt 24 h nach Infektionsbeginn inkubiert. Anschließend wurde das Medium verworfen, die Makrophagen zweimal mit 4 ml PBS gewaschen, in 2 ml PBS mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Makrophagen wurden bei 800 x g pelletiert, das Zellpellet in 300 µl Karnovsky Reagenz resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 1 h bei Raumtemperatur fixiert. Die fixierten Makrophagen wurden bei 800 x g pelletiert, in 1 ml PBS gewaschen, erneut pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden bei 37 °C im Wasserbad für 5 min erwärmt, bevor das Pellet in einem Pelletvolumen (50 µl) 2 % (w/v) LMP-Agarose in PBS (+Mg²⁺/Ca²⁺) resuspendiert und für weitere 2 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert wurde. Anschließend wurden die Makrophagen bei 14000 x g für 2 min pelletiert und die Agarose über Nacht bei 4 °C ausgehärtet.

Das feste Agarose-Zellpellet wurde in 3 x 3 x 3 mm Würfel geschnitten, in ein Glasschnappdeckelröhrchen überführt und für 30 min in 1 % Osmium Lösung (in ddH₂O) kontrastiert. Für die folgenden Schritte wurde stets darauf geachtet, dass die Zellpellets nicht trockenfallen, um die Struktur der Präparate zu erhalten. Die Zellen wurden zweimal mit PBS und zweimal ddH₂O gewaschen. Anschließend wurde eine Entwässerungsreihe bei Raumtemperatur durchgeführt (30 % EtOH, 5 min; 50 % EtOH, 5 min, 70 % EtOH, 10 min, 70 % EtOH, 10 min, 90 % EtOH, 5 min, 100 % EtOH, 10 min, 100 % EtOH, 10 min, 100 % Molekularsieb-EtOH, 10 min, 100 % Molekularsieb-EtOH, 10 min, 100 % Propylenoxid, 10 min, 100 % Propylenoxid, 10 min). Parallel dazu wurde Epon nach Herstellerangaben (Epoxy Embedding Medium Kit, Sigma Aldrich) angesetzt. Die entwässerten Zellen wurden erst für 30 min mit 1:2 Epon-Propylenoxid und anschließend über Nacht in 2:3 Epon-Propylenoxid inkubiert. Außerdem wurden Böden mit Epon+DPM30 in Silikonformen gegossen und über

Nacht bei 60 °C ausgehärtet. Am nächsten Tag wurde das Epon der Präparate verworfen und die Zellen mit frisch angesetzttem Epon+DPM30 für 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellwürfel im vorderen Drittel der ausgehärteten Böden platziert und mit Epon-DPM30 überschichtet. Die Präparate wurden für 72 h bei 60 °C ausgehärtet.

Die fertigen Präparate wurden getrimmt und mittels Leica UC6 Diatome mit einem Diamantmesser (Diatomie, 3 mm, 45 °) auf 68-70 nm dicke Scheiben geschnitten. Die Schnitte wurden in 100-Maschen Kupfer-Grids mit Pioloform-Film überführt und mit einem Nanofilm TEM stainer (Nanofilm technology GmbH) mit Uranylacetat nachkontrastiert. Die Proben wurden mit einem FEI Verios 460L Elektronenmikroskop mit STEM III Detektor analysiert.

2.2.6.3. Quantifizierung der Vesikelgrößen über TEM Aufnahmen

Um die Vesikelgröße der intraluminalen Vesikel der RCV zu quantifizieren, wurden TEM-Aufnahmen mit der Software paint.net (Version 2023) analysiert. Damit wurden pixelgenau die Durchmesser der einzelnen Vesikel bestimmt und entsprechend ihrer Größe sortiert (< 80 nm oder ≥ 80 nm und < 200nm oder ≥ 200 nm)

2.2.7. Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit GraphPad Prism 6. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Der Unterschied zweier Proben wurde auf ihre Signifikanz mit einem ungepaarten heteroskedatischen t-Test untersucht. Die p-Werte wurden entweder exakt oder wie folgt angegeben:

$p \leq 0,05$	*
$p \leq 0,01$	**
$p \leq 0,001$	***

3. Ergebnisse

3.1. Proteomanalyse gereinigter VCVs und BCVs

Avirulente *R. equi* vermehren sich intrazellulär nach pH-Neutralisierung der Phagolysosomen (von Bargen et al., 2019). Eine Hemmung der Ansäuerung kann dabei durch Zugabe von rekombinantem VapA (rVapA), aber auch durch Behandlung mit dem v-ATPase-Inhibitor Bafilomycin A1 (BafA1) erreicht werden (von Bargen et al., 2019). Um zu untersuchen, ob eine pH-Neutralisation zu morphologischen Veränderungen der Phagolysosomen führt, wurden RAW264.7 Makrophagen mit rVapA oder BafA1 behandelt und mittels TEM untersucht (Abbildung 3, Anhang 4).

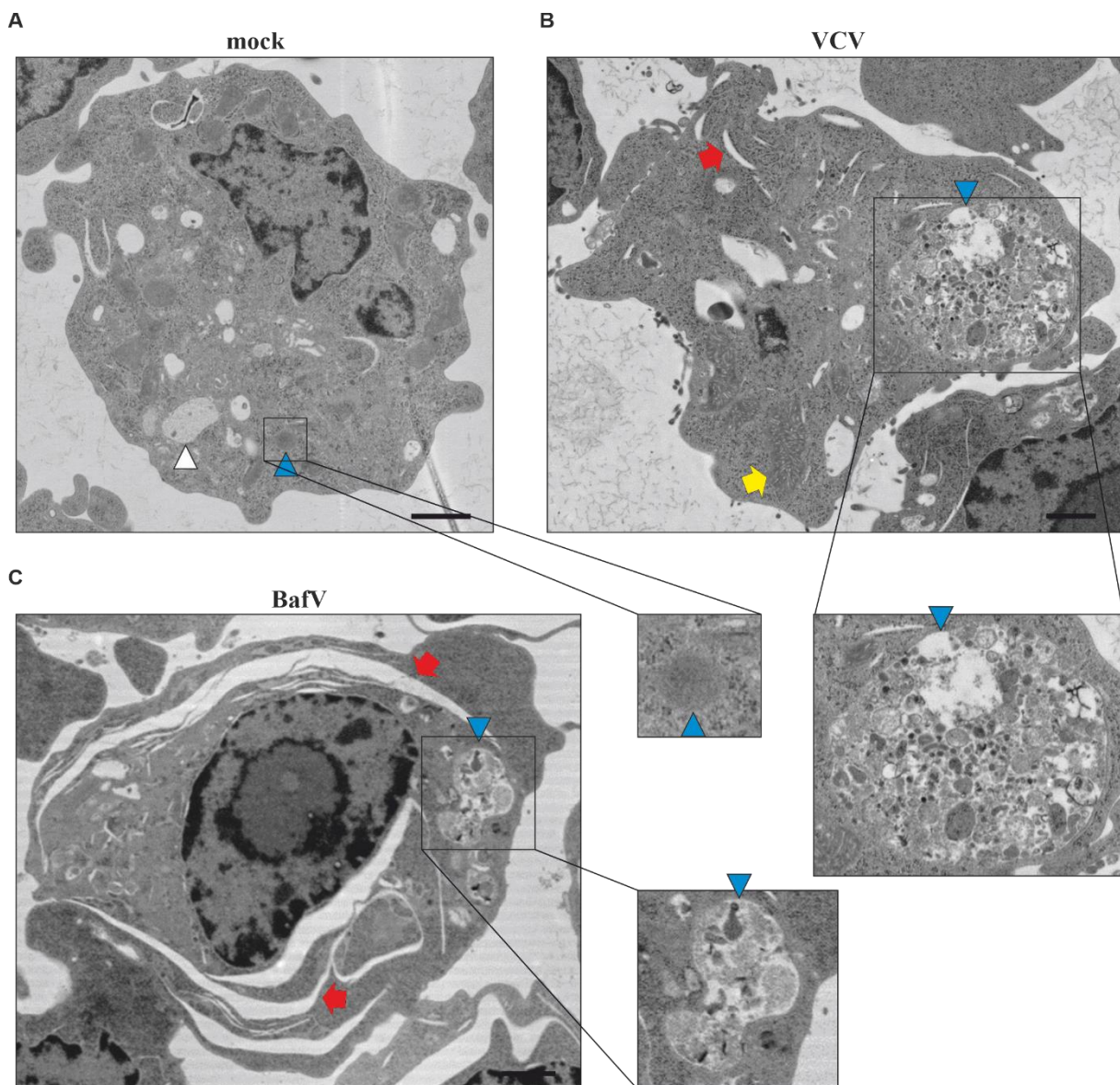


Abbildung 3: Behandlung mit rVapA oder BafA1 führen in RAW264.7 zu Vergrößerung der Phagolysosomen mit heterogenen IVVs. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten von (A) unbehandelten RAW264.7 Makrophagen oder nach 18-stündiger Behandlung mit (B) 10 µg/ml rVapA oder (C) 40 nM BafA. Die blaue Pfeilspitze zeigt auf Phagolysosomen, die weiße Pfeilspitze auf MVBs, der rote Pfeil auf ER-Stress und der gelbe

Pfeil auf ein geschwollenes Mitochondrium. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen aus zwei unabhängigen Experimenten. Maßbalken: 1 μm .

Unbehandelte Makrophagen (Abbildung 3A) enthielten neben den ca. 500 nm großen Lysosomen (blaue Pfeilspitze) auch MVBs (weiße Pfeilspitze) mit einem Durchmesser von 600 – 1000 nm. Die ILVs der MVBs hatten einen Durchmesser von ca. 80 nm. Die Behandlung mit rVapA (Abbildung 3B) führte zu einer starken Vergrößerung der Phagolysosomen [VapA-enthaltende Vakuolen (VCVs)] auf ca. 4 μm Durchmesser. Sie enthielten intravakuoläre Vesikel (IVVs), die sich nicht nur in ihrer Größe (60 – 800 nm), sondern auch in ihrer Morphologie und Elektronendichte unterschieden. Neben den VCVs waren im Zellquerschnitt wenige bis keine weiteren Lysosomen vorhanden, jedoch führte die Behandlung mit rVapA zu ER-Stress (roter Pfeil) und Mitochondrienschwellung (gelber Pfeil). Die Behandlung der Makrophagen mit BafA1 (Abbildung 3C) führte ebenfalls zu einer Vergrößerung der Phagolysosomen (1 - 1,5 μm Durchmesser) und zu einer Anhäufung von IVVs unterschiedlicher Größe und Form in BafA1-induzierten Vakuolen (BafVs). Im Gegensatz zur Behandlung mit rVapA führte die Zugabe von BafA1 zu einem stark gestressten ER (roter Pfeil), aber nicht zu geschwollenen Mitochondrien. VCVs und BafVs waren also in ihrer Morphologie und Zusammensetzung ähnlich (unterschiedliche IVVs), unterschieden sich aber deutlich von den Lysosomen.

Um diese Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten weiter zu untersuchen, wurden Lysosomen, VCVs und BafVs 6 h bzw. 18 h nach Behandlungsbeginn isoliert. Der Zeitpunkt 6 h sollte den frühen Zeitpunkt einer *R. equi*-Infektion simulieren, zu dem pathogene *R. equi* den phagolysosomalen pH-Wert bereits für ca. 4 h mittels VapA neutralisiert haben (von Bargen et al., 2019). Zu diesem Zeitpunkt wäre das Phagolysosom jedoch noch nicht vergrößert und die Bakterien hätten noch nicht repliziert (Fernandez-Mora et al., 2005). 18 h nach der Behandlung sollte den Zeitpunkt einer fortgeschrittenen Infektion mit *R. equi* simulieren, zu dem sich die Bakterien bereits vermehrt und die RCV vergrößert hätten (Vail et al., 2021). Die isolierten Kompartimente (Lysosomen, VCV, BafV) wurden anschließend in Zusammenarbeit mit Mirella Scraa und Frank Schmidt einer Proteomanalyse unterzogen.

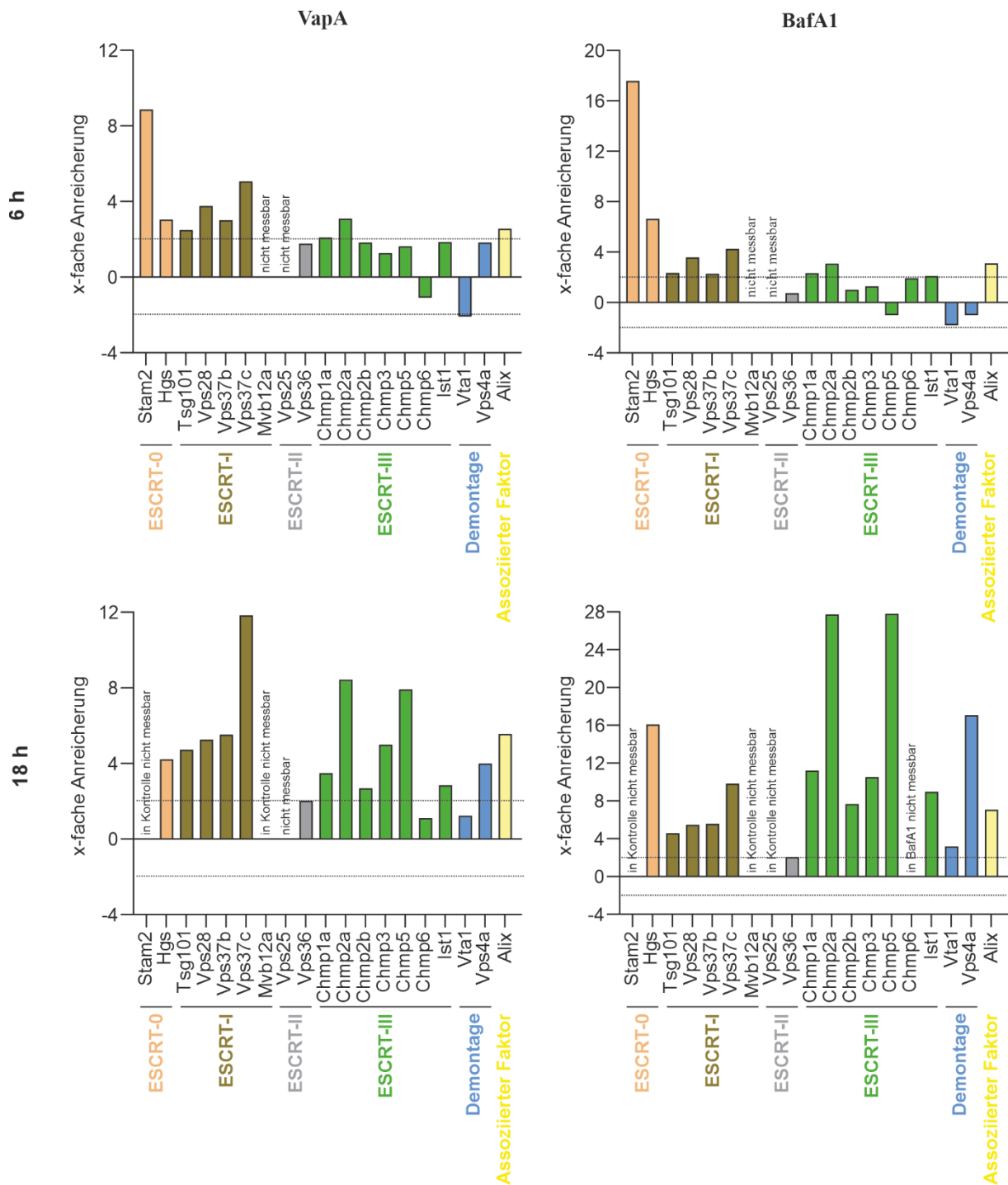


Abbildung 4: Proteine des ESCRT-Komplexes sind an VCVs bzw. BafVs angereichert. Proteomanalyse von unbehandelten Phagolysosomen, VCVs (10 µg/ml rVapA) und BafVs (40 nM BafA1) aus RAW264.7 Makrophagen. Die Phagosomenisolierung erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten. Dargestellt ist die x-fache Veränderung der ESCRT-Proteinmengen aus VCVs bzw. BafVs gegenüber unbehandelten Phagolysosomen zu den angegebenen Zeitpunkten. Eine unauffällige An- bzw. Abreicherung hat einen Wert zwischen -2 und 2 (gestrichelter Bereich).

Interessanterweise wurde in der Proteomanalyse eine Gruppe von Proteinen angereichert, die potentiell an der Bildung der zuvor beschriebenen IVVs von VCVs bzw. BafVs beteiligt sein könnten, aber auch vielfältige andere Funktionen im gesamten endozytischen Weg und an Lysosomen (Vietri et al., 2021) besitzen: die ESCRT-Proteine (Abbildung 4). Dabei wurden an

VCVs und an BafVs nahezu alle Proteine des ESCRT-Komplexes von 6 h bis 18 h nach Behandlungsbeginn angereichert. Besonders stark angereichert waren die ESCRT-III-assoziierten Proteine Chmp2a, Chmp3 und Chmp5 sowie das für den Abbau des ESCRT-Komplexes notwendige Protein Vps4a. Bereits nach 6 h waren die Proteine des ESCRT-0-Komplexes Stam2 und Hgs, aber auch die Proteine des ESCRT-I-Komplexes Tsg101, Vps28, Vps37b und Vps37c sowie der ESCRT-I-assoziierte Faktor Alix durch die rVapA- bzw. BafA1-Behandlung gegenüber der Kontrolle angereichert. Eine weitere Anreicherung der ESCRT-0 und -I Proteine erfolgte zum Zeitpunkt 18 h. Lediglich die ESCRT-II assoziierten Proteine Vps25 und Vps36 wurden durch beide Behandlungen nicht angereichert (Zeitpunkt 6 h) bzw. konnten zum Zeitpunkt 18 h kaum (unterer Detektionsbereich der Massenspektrometrie) detektiert werden. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass trotz unterschiedlicher Behandlung (rVapA oder BafA1) die gleichen ESCRT-Proteine zu den verschiedenen Zeitpunkten in den gereinigten Kompartimenten angereichert werden und dass die Anreicherung nach 18 h immer größer ist als nach 6 h.

Im Gegensatz zur Anreicherung der ESCRT-Proteine konnte massenspektrometrisch eine starke Abreicherung der Cathepsine auf den gereinigten VCVs und BafVs beobachtet werden (Abbildung 5). Bereits nach 6 h waren alle neun detektierten Cathepsine sowohl auf den VCVs als auch auf den BafVs deutlich reduziert. Besonders deutlich war die Abnahme bei Cathepsin F, das zu diesem Zeitpunkt bereits um den Faktor 54 (VCV) bzw. 194 (BafV) gegenüber der Kontrolle abgereichert war. Nach 18 h Behandlung mit rVapA bzw. BafA1 waren alle Cathepsine mit Ausnahme von Cathepsin L1 in den gereinigten Phagosomomen in geringerer Menge vorhanden als zum Zeitpunkt 6 h. Im Vergleich zur Kontrolle war Cathepsin F nach 18 h Behandlung am stärksten reduziert. Wie bei den ESCRT-Proteinen beeinflussten die verschiedenen Behandlungen (rVapA bzw. BafA1) die Abreicherung der Cathepsine gleichermaßen.

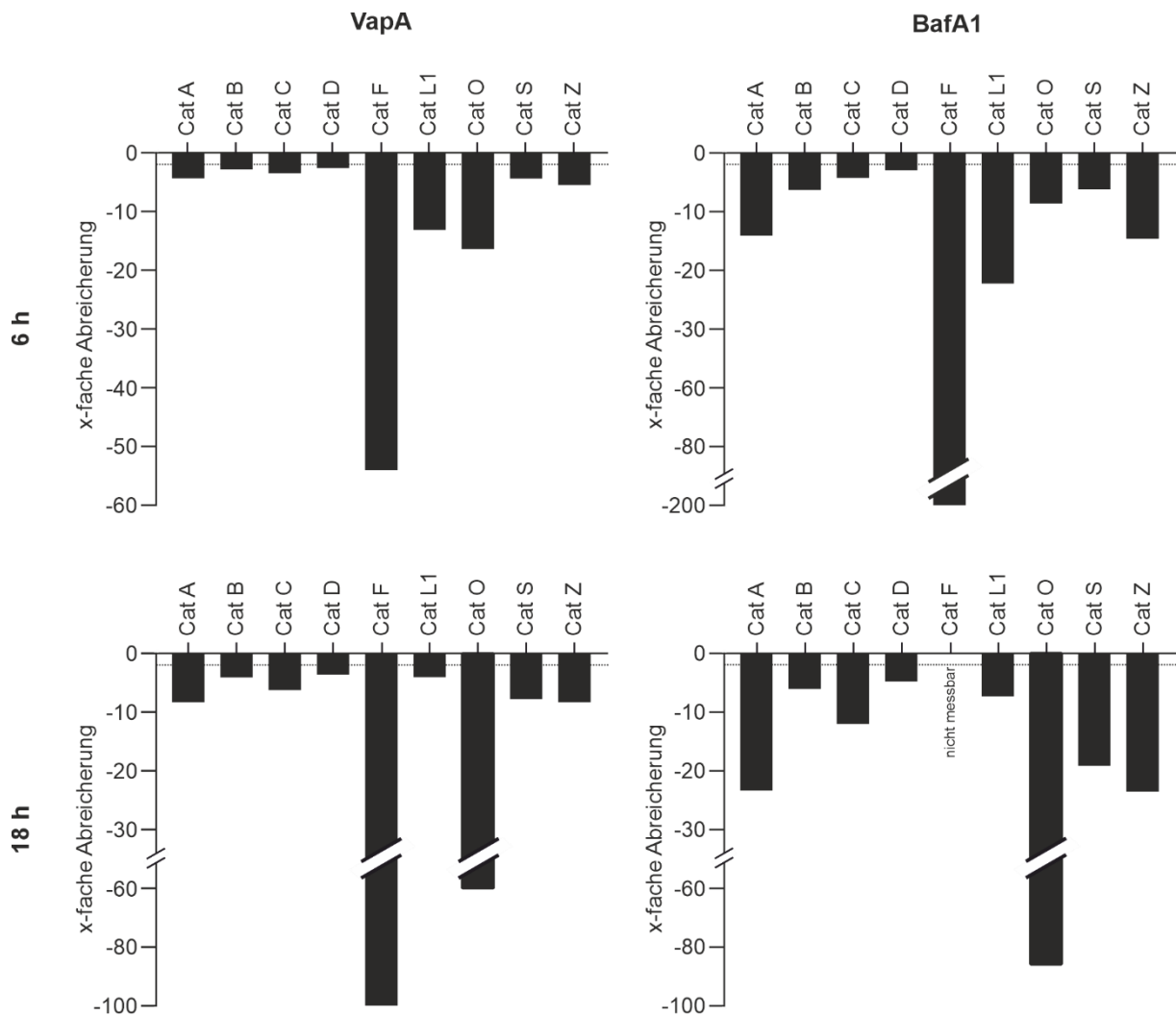


Abbildung 5: Cathepsine sind an VCVs bzw. BafVs stark angereichert. Proteomanalyse von unbehandelten Phagosomolysosomen, VCVs (10 µg/ml rVapA) und BafVs (40 nM BafA1) aus RAW264.7 Makrophagen. Die Phagosomenisolierung erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten. Dargestellt ist die x-fache Veränderung der Cathepsin-Proteinmengen aus VCVs bzw. BafVs gegenüber unbehandelten Phagosomolysosomen zu den angegebenen Zeitpunkten. Eine unauffällige An- bzw. Abreicherung hat einen Wert zwischen -2 und 2 (gestrichelter Bereich).

3.1.1. Validierung ausgewählter Proteine mittels Western Blot

Zur Validierung der massenspektrometrischen Daten wurden aus J774E Makrophagen mittels Pulse/Chase Protokoll unbehandelte Lysosomen oder VCVs bzw. BafVs isoliert. Mittels Western Blot wurden die Proteinmengen von Hgs (ESCRT-0), Tsg101 (ESCRT-I), Alix (ESCRT I assoziierter Faktor), Chmp3 (ESCRT-III) und Vps4 (Demontage) untersucht. Darüber hinaus wurden die Lysosomenmembranproteine LAMP1 und NPC1, die lysosomale Proteasen Cathepsin B und die GTPase Arl8, die in der Fusion zwischen späten Endosomen und Lysosomen essentiell ist und dabei auf Lysosomenmembranen lokalisiert, untersucht. Weiterhin wurde der lysosomale Schadensmarker Galektin 3 (Gal3) analysiert (Abbildung 6).

Ergebnisse

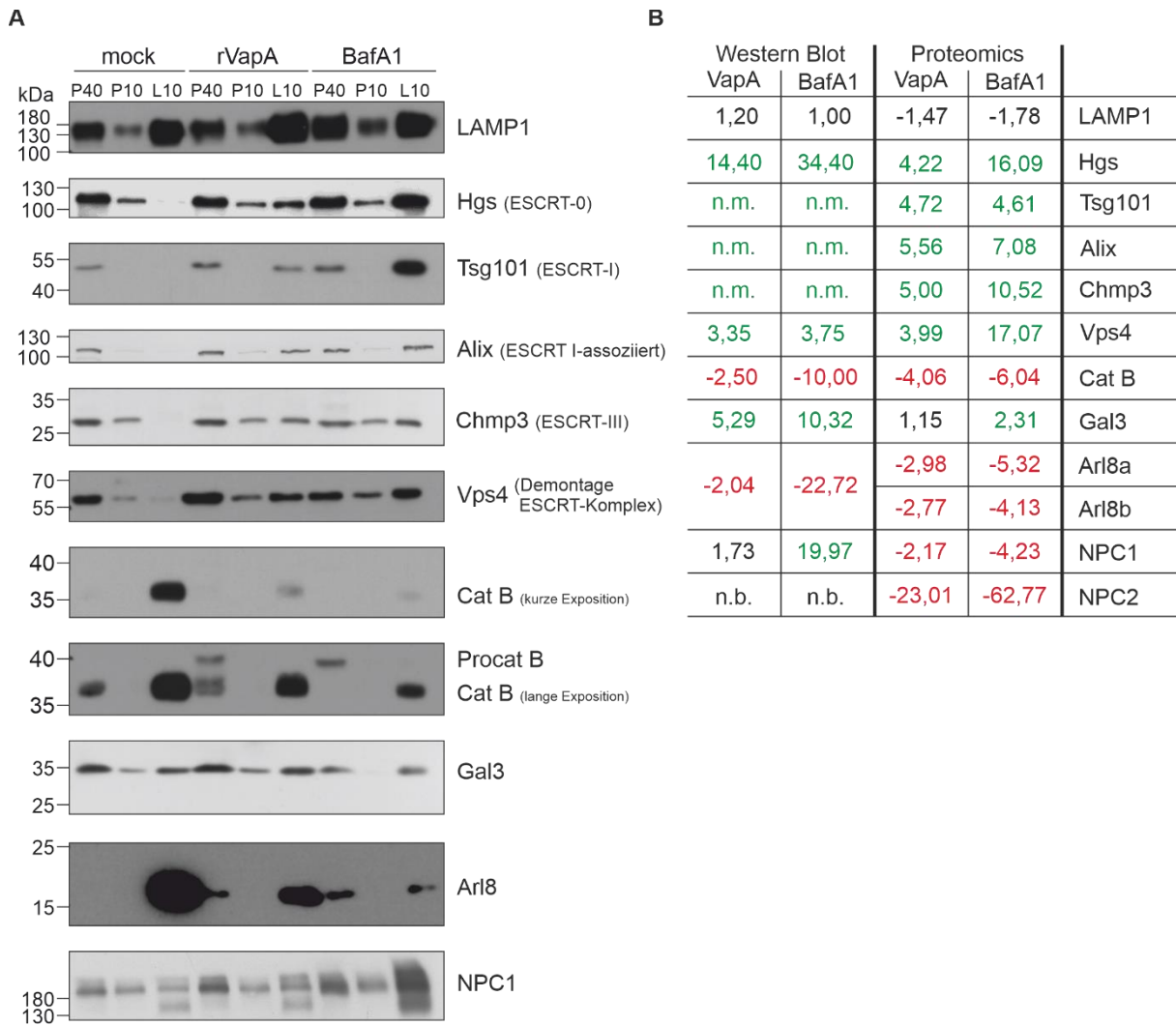


Abbildung 6: Validierung der Proteomanalyse mittels Western Blot. (A) Immunblots von gereinigten Phagolysosomen, VCVs und BafVs aus J774E Makrophagen. Die Makrophagen wurden für 18 h mit 10 µg/ml rVapA oder 40 nM BafA1 behandelt. Die SDS-Proben von NPC1 wurden mit PIC (5x) versetzt und für 20 min bei 37 °C denaturiert. Pro Spur wurden 40 µg (40) oder 10 µg (10) Proteinprobe aufgetragen. Dargestellt sind repräsentative Blots aus drei unabhängigen Experimenten. **(B)** Vergleich der L10-Bandenintensitäten der Immunblots mit der massenspektrometrischen Analyse von gereinigten VCVs, BafVs bzw. Lysosomen. Dargestellt sind jeweils die Quotienten aus gereinigten VCVs (rVapA) bzw. BafVs (BafA1) und der unbehandelten Kontrolle (mock). n.m., nicht messbar, da keine Bande in der Kontrolle vorhanden war; n.b., nicht bestimmt, da nicht im Immunblot untersucht; grüne Zahlen zeigen eine Anreicherung und rote Zahlen eine Abreicherung der jeweiligen Proteine an. Cat, Cathepsin; Gal, Galektin; L, Phagolysosom; P, *post nuclear supernatant*; Procat, Procathepsin.

LAMP1, das häufig als lysosomales Markerprotein verwendet wird, wurde in den untersuchten Proben gleichermaßen exprimiert (Vergleich P40) und in Übereinstimmung mit der Proteomanalyse nicht auffällig auf Phagolysosomen angereichert. Arl8 wurde erwartungsgemäß selektiv auf Phagolysosomen angereichert. Bemerkenswert war, dass sowohl in der Proteomanalyse als auch in den Immunblots deutlich weniger Arl8 auf VCVs und BafVs zu finden war, was auf eine verminderte Fusion zwischen späten Endosomen und VCVs bzw. BafVs hindeuten könnte. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wurden die

untersuchten ESCRT-Proteine in VapA- bzw. BafA1-behandelten Makrophagen gleich stark exprimiert und in Übereinstimmung mit der Proteomanalyse in VCVs bzw. BafVs angereichert. Immunblots gegen Gal3 zeigten, dass das Protein in allen drei Proben gleich stark exprimiert und in Phagolysosomen angereichert wurde. In der massenspektrometrischen Analyse hingegen war Gal3 nicht (VCVs) oder nur geringfügig (BafVs) angereichert. In der Proteomanalyse waren die lysosomalen Proteine NPC1 und NPC2 in VCVs und BafVs stark angereichert. Im Gegensatz dazu zeigte die Quantifizierung der NPC1-Immunblots keine Abreicherung und für BafVs sogar eine Anreicherung. Die lysosomale Hydrolase Cathepsin B war in den Lysosomen stark angereichert. Da Cathepsin B im PNS kaum vorhanden war, deutete dies auf eine fast ausschließliche Lokalisation in den Lysosomen hin. Die Behandlung der Makrophagen mit rVapA bzw. BafA1 führte zum Nachweis von Procathepsin B (MW = 43 kDa) im PNS, was auf eine gestörte Reifung des Enzyms hindeutete. Die Abreicherung von Cathepsin B in gereinigten VCVs bzw. BafVs im Western Blot und in der Proteomanalyse war aufgrund der geringen Proteinstabilität bei neutralem pH-Wert nicht weiter verwunderlich, wie im Folgenden näher untersucht wird.

3.1.2. Neutraler pH-Wert führt zur Degradation von Cathepsin B, D und F in Lysosomen

Sowohl in der Massenspektrometrie (Abbildung 5) als auch im Western Blot (Abbildung 6) war eine deutliche Abreicherung der Cathepsine B, D und F zu erkennen. Um zu untersuchen, ob der Verlust der Cathepsine durch eine VapA- bzw. BafA1-induzierte pH-Neutralisation hervorgerufen wird, wurden magnetisch gereinigte Phagolysosomen (unbehandelt) aus J774E Makrophagen *in vitro* bei einem sauren pH-Wert von 5,0 bzw. einem neutralen pH-Wert von 7,0 inkubiert und anschließend im Western Blot analysiert (Abbildung 7).

Alle drei untersuchten Cathepsine waren in gereinigten Lysosomen gegenüber dem PNS angereichert. Neben der katalytisch aktiven Form von Cathepsin D (MW = 28 kDa) waren sowohl Procathepsin D (MW = 46 kDa) als auch die intermediäre Form von Cathepsin D (MW = 43 kDa) in gereinigten Kompartimenten angereichert. Die Inkubation bei physiologischem lumenalem pH-Wert der Lysosomen (pH 5) führte zu den höchsten Proteinmengen von Cathepsin B, D und F.

Die Inkubation bei saurem pH-Wert reduzierte die Proteinmenge von Procathepsin D stark, während die Proteinmenge der intermediären Form nur wenig reduziert wurde. Im Gegensatz dazu führte die Inkubation bei neutralem pH-Wert zu einem fast vollständigen Verlust von Cathepsin B und F. Bei einem pH-Wert von 7 blieb die Proteinmenge von Procathepsin D und der intermediären Form von Cathepsin D unverändert, und auch die Menge an vollständig prozessiertem Cathepsin D nahm leicht ab. Die Tatsache, dass ein neutraler pH-Wert zu einer Abnahme der Proteinmengen von Cathepsin B und F führte, war vermutlich auch der Grund

für die Abnahme dieser beiden Proteine in den unbehandelten Proben. Diese wurden auf Eis gelagert, jedoch in HB-Puffer mit einem pH-Wert von 7,2. Erwartungsgemäß zeigte sich eine pH-abhängige Stabilität der Cathepsine B, D und F, wobei Cathepsin B und F bei neutralem pH-Wert weniger stabil waren als Cathepsin D.

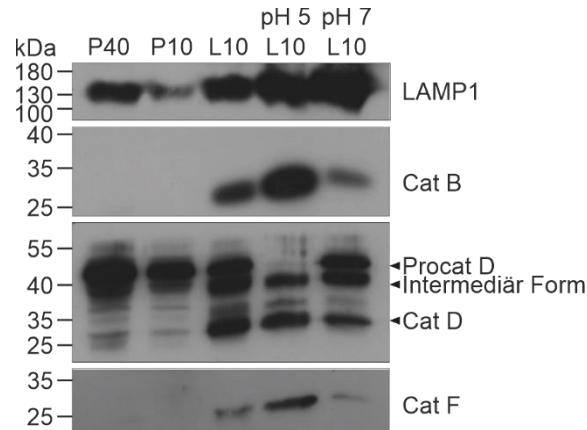


Abbildung 7: Die Proteinstabilitäten von Cathepsin B und F sind pH-sensitiv. Immunblots von isolierten Lysosomen aus J774E Makrophagen, die bei den angegebenen pH-Werten inkubiert wurden. Aufgetragen sind 40 μ g (40) oder 10 μ g (10) Protein. Dargestellt sind repräsentative Immunblots aus zwei unabhängigen Experimenten. Cat, Cathepsin; Procat, Procathepsin; P, PNS; L, Lysosomen.

3.2. Die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* ist ESCRT-0, ESCRT-III- und Vps4-abhängig und ESCRT-I-unabhängig

3.2.1. Chmp3 und Vps4 lokalisieren an und in RCVs

Nachdem sowohl massenspektrometrisch als auch biochemisch eine starke Anreicherung von Chmp3 und Vps4 in VCVs nachgewiesen werden konnte, blieb zu untersuchen, ob diese beiden Proteine auch in RCVs vermehrt vorkommen.

Dazu wurden RAW264.7 Makrophagen mit virulenten *R. equi* infiziert und 24 h nach Infektion (p.i.) die Lokalisation von Chmp3 bzw. Vps4 mittels Immunfluoreszenz untersucht. Zusätzlich zu den ESCRT-assoziierten Proteinen wurde LAMP1 immunfluoreszenzgefärbt (Abbildung 8). LAMP1 befindet sich normalerweise auf der limitierenden Membran von Phagolysosomen. Im Gegensatz dazu ist das Membranprotein fast ausschließlich im Lumen von RCVs lokalisiert (von Bargen et al., 2019, Wright et al., 2018), was charakteristisch für diese speziellen Phagolysosomen ist. Daher wurde hier die charakteristische Lokalisation von LAMP1 zur Identifizierung von RCVs verwendet. Fast das gesamte LAMP1 der Makrophagen wurde in den pathogenhaltigen Vakuolen angereichert. Überraschenderweise lokalisierten die ESCRT-Proteine Chmp3 (Abbildung 8A) und Vps4 (Abbildung 8B) nicht nur auf der limitierenden Membran (weiße Pfeilköpfe), sondern auch im Lumen der RCVs. Darüber hinaus kolokalisierten LAMP1 und Chmp3 teilweise und LAMP1 und Vps4 an einigen Stellen in der

RCV (weiße Pfeile). In der Vakuole lokalisierte Vps4 hauptsächlich an LAMP1-negativen Stellen.

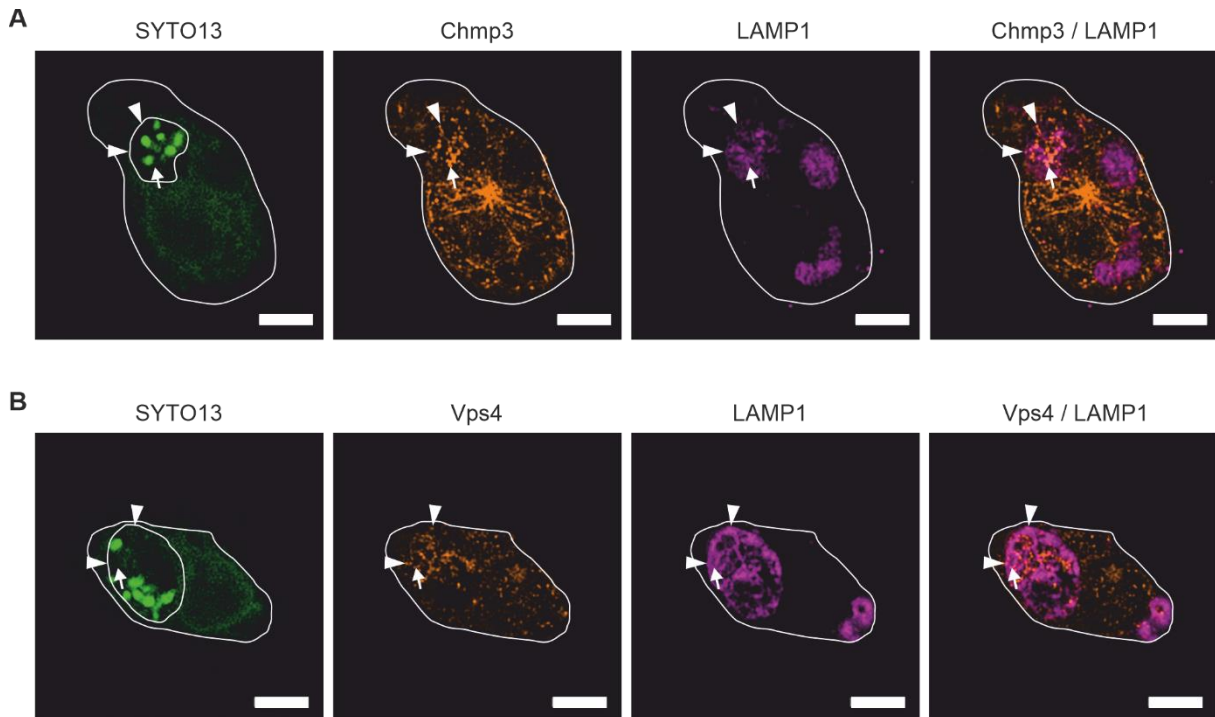


Abbildung 8: Chmp3 und Vps4 sind in und auf der RCV lokalisiert. Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *R. equi* 103+ infizierten RAW264.7 Makrophagen. Es wurden LAMP1 und (A) Chmp3 oder (B) Vps4 wurden durch Immunfluoreszenz markiert. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen aus zwei unabhängigen Experimenten. Maßbalken: 5 μ m. Die Pfeilköpfe zeigen Kolokalisation von Chmp3 bzw. Vps4 mit der limitierenden RCV-Membran und die Pfeile Kolokalisation der ESCRT-Proteine mit LAMP1 im Lumen der RCVs.

3.2.2. ESCRT-0, ESCRT-III und Vps4 begünstigen die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi*

Um ihre zellulären Funktionen zu erfüllen, werden ESCRT-Proteine selektiv an verschiedenen Organellen (Endosomen, Lysosomen) oder an die Plasmamembran rekrutiert (zusammengefasst in Vietri et al., 2020). Die Lokalisierung von Chmp3 und Vps4 an und in RCVs in Makrophagen war daher wahrscheinlich nicht zufällig, sondern deutete auf eine Rolle von ESCRT während einer Infektion mit *R. equi* hin. Da nicht immer alle ESCRT-Subkomplexe in den verschiedenen ESCRT-abhängigen zellulären Prozessen benötigt werden, wurde im Folgenden der Einfluss einzelner Schlüsselproteine der Subkomplexe auf die intrazelluläre Proliferation von *R. equi* untersucht.

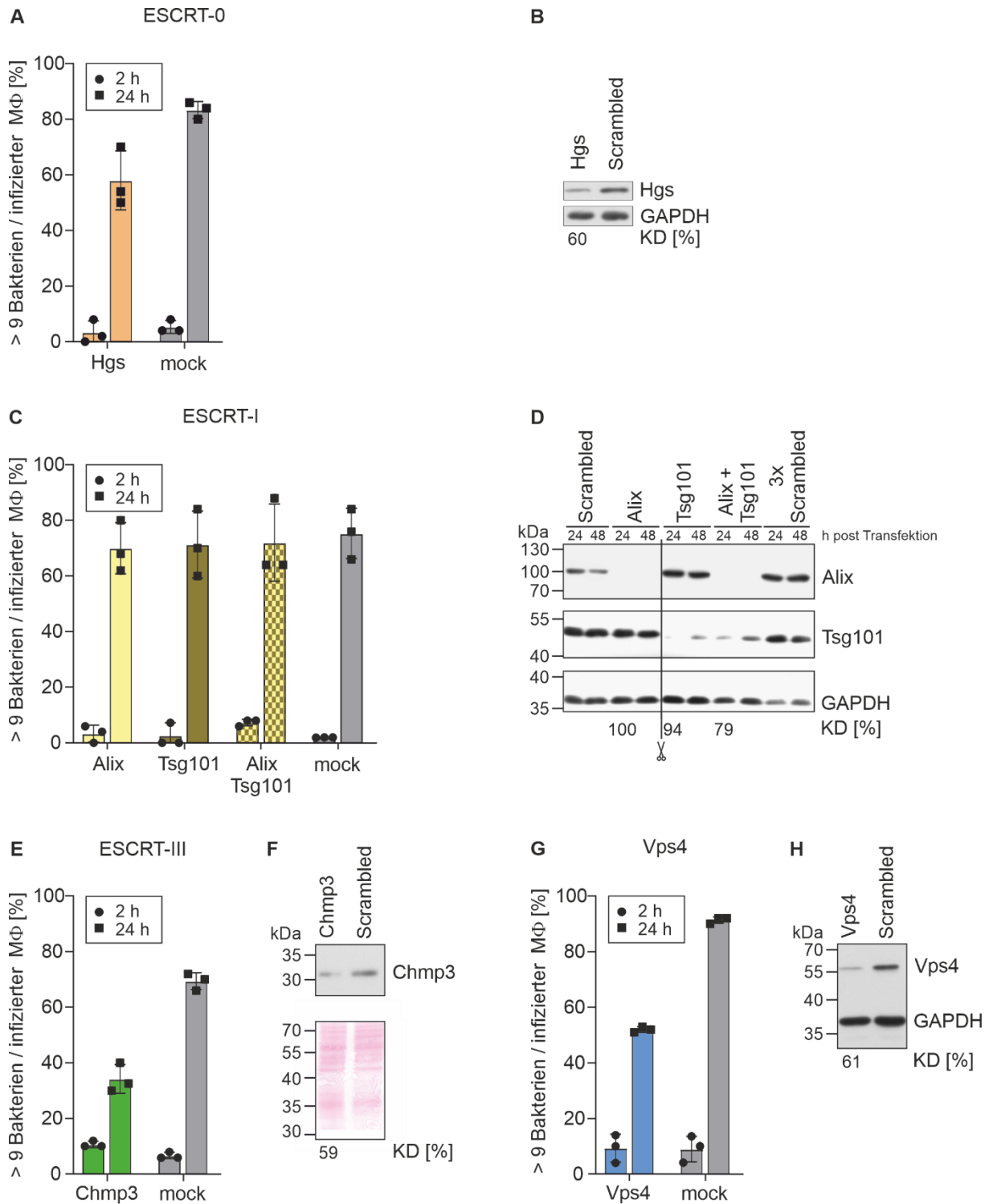


Abbildung 9: ESCRT-0, ESCRT-III oder Vps4 Knockdowns reduzieren die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi*. Intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* 103+ in siRNA-transfizierten RAW264.7 Makrophagen. Transfektion mit siRNAs gegen (A, B) ESCRT-0 (Hgs), (C, D) ESCRT-I (Tsg101) und ESCRT-I assoziierten Faktor (Alix), (E, F) ESCRT-III (Chmp3) und (G, H) Vps4. Der *Knockdown* wurde mittels Immunblot (B, D, F, H) kontrolliert und quantifiziert und die robuste Vermehrung zu den angegebenen Zeitpunkten (A, C, E, G) bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Blots, Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Die Unterabbildungen (A und B) wurden in Zusammenarbeit mit Tobias Dummin (AG Haas, Universität Bonn) und die Unterabbildungen (C und D) in Zusammenarbeit mit Alexandra Nesterova (AG Haas, Universität Bonn) erstellt.

Dazu wurde die Genexpression einzelner ESCRT-Faktoren mittels RNAi in RAW264.7 Makrophagen herunterreguliert („*Knockdown*“), die anschließend mit *R. equi* 103+ infiziert wurden (Abbildung 9). Der *Knockdown* wurde 24 h nach siRNA Transfektion (entspricht dem Startpunkt der Infektion) mittels Western Blot quantifiziert. Dabei wurde mit allen verwendeten siRNAs mindestens eine 59 % verringerte Proteinmenge erreicht (Abbildung 9). In Makrophagen mit einem Hgs *Knockdown* war die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* um ein Drittel verringert (Abbildung 9A). Durch die Reduzierung des Chmp3- (Abbildung 9E) bzw. Vps4- (Abbildung 9G) Proteinlevels war die intrazelluläre Vermehrung von 103+ um die Hälfte verringert. Obwohl die Expression der ESCRT-I Proteine Tsg101 und Alix (fast) vollständig herunterreguliert wurde (Abbildung 9D), beeinflussten die einzelnen *Knockdowns* nicht die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* (Abbildung 9C). Auch bei einem kombinierten *Knockdown* von Tsg101 und Alix blieb die robuste Vermehrung von *R. equi* gegenüber der Kontrolle unverändert.

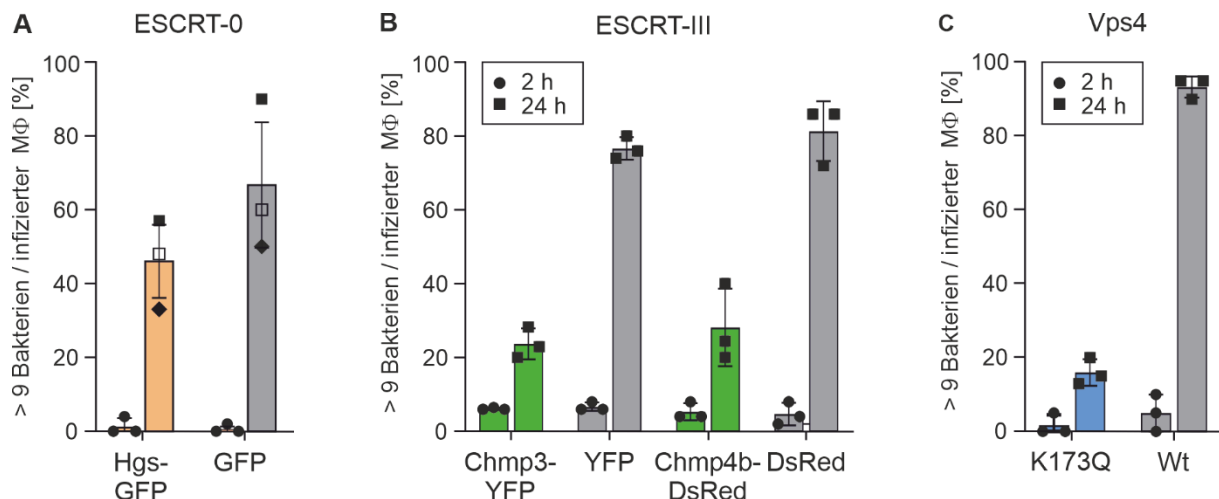


Abbildung 10: Intrazelluläre *R. equi* Replikation wird durch dominant-negative ESCRT-III Proteine oder dominant-negatives Vps4a verringert. Intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* 103+ in RAW264.7 Makrophagen, die mit Plasmiden codierend für dominant-negative (DN) ESCRT-Proteine transfiziert wurden. Expression von wildtypischen (Wt) Proteinen bzw. Fluoreszenzproteinen und DN (A) Hgs, (B) Chmp3 oder Chmp4b und (C) Vps4 (K173Q). Die robuste Vermehrung wurde in jeweils 20 - 50 transfizierten Makrophagen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Unterabbildung (A) wurde in Zusammenarbeit mit Tobias Dummin (AG Haas, Universität Bonn) erstellt.

Es zeigte sich, dass vor allem ESCRT-III und Vps4 das intrazelluläre Vermehrungsverhalten von *R. equi* beeinflussten. ESCRT-0 hatte wenig und ESCRT-I keinen Einfluss auf das Reproduktionsverhalten. Um diese Beobachtung weiter zu untersuchen und den temporären und meist unvollständigen Effekt von siRNA-Transfektionen zu umgehen, wurden dominant-negative (DN) fluoreszenzgekoppelte ESCRT-Proteine in RAW264.7 Makrophagen überexprimiert. Die Makrophagen wurden mit *R. equi* 103+ infiziert und die robuste Vermehrung bestimmt (Abbildung 10). Da der *Knockdown* von Tsg101 bzw. Alix über die

gesamte Dauer des vorangegangenen Infektionsexperiments fast vollständig vorhanden war (Abbildung 9D), wurde an dieser Stelle auf die Expression eines DN-Tsg101 bzw. DN-Alix verzichtet. Die Überexpression eines EGFP-gekoppelten Hgs führt zu einem dominant-negativen Effekt des ESCRT-0 Proteins (Janvier et al., 2011). Daher diente hier der Leervektor als Negativkontrolle. Verglich man die Werte der einzelnen Replikate miteinander, replizierten intrazelluläre *R. equi* durch DN-Hgs stets weniger als in der Kontrolle (Abbildung 10A).

Wie auch bei Hgs, führt die Fusion der ESCRT-III-Faktoren Chmp3 und Chmp4b mit einem fluoreszierenden Protein (eYFP bzw. DsRed) zu einem dominant-negativen Effekt der ESCRT-Proteine (Lambert et al., 2007). Es zeigte sich, dass dominant-negatives Chmp3 bzw. Chmp4b die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* stark verringerte (Abbildung 10B). Um den Einfluss des dominant-negativen Effekts der AAA-ATPase Vps4 untersuchen zu können, wurde eine Variante des Proteins mit einer Punktmutation (K173Q) in der ATP-Bindestelle verwendet (Tu et al., 2010). Die Überexpression von Vps4 K173Q führte zu einer stark verringerten intrazellulären Vermehrung von *R. equi* (Abbildung 10C).

Diese Daten deuten darauf hin, dass intrazelluläre *R. equi* für eine erfolgreiche Replikation auf die Funktionalität von ESCRT-III und Vps4 angewiesen sind. Im Gegensatz dazu reduziert Hgs (ESCRT 0) die intrazelluläre Vermehrung des Pathogens nur geringfügig und ESCRT-I überhaupt nicht.

3.3. Die limitierende RCV-Membran bleibt während der *R. equi* Infektion weitestgehend intakt

Eine der vielfältigen Funktionen von ESCRT ist die Reparatur kleiner Löcher in Lysosomenmembranen (Skowyra et al., 2018). Bei großen Membranläsionen, die nicht durch ESCRT repariert werden können, wird ESCRT-abhängig Lysophagie, eine bestimmte Form der Autophagie, induziert (Radulovic et al., 2018). Darüber hinaus führen große Membranläsionen zum Kontakt der Bakterien mit antimikrobiellen Peptiden des Zytosols. Dass der ESCRT-abhängige Reparaturmechanismus essentiell für das intrazelluläre Überleben von Pathogenen ist, konnte u.a. bereits für *C. burnetii* (Radulovic et al., 2018) oder *S. enterica* (Göser et al., 2019) gezeigt werden. Daraus ergaben sich zwei Fragen: (1) Welche Auswirkungen haben RCV-Membranläsionen und der Kontakt mit dem Zytosol auf *R. equi* und (2) tritt der intrazelluläre Vermehrungsdefekt von virulenten *R. equi* bei einem ESCRT-III oder Vps4 *Knockdown* aufgrund von nicht reparierten Membranschäden auf?

3.3.1. Intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* ist abhängig von einer intakten RCV-Membran

3.3.1.1. Vermehrung von *R. equi* ist in Glutathion-enthaltendem Zytosol verringert

Zuerst wurde der Frage nach dem antimikrobiellen Effekt des Zytosols und dessen Einfluss auf die Vermehrung von *R. equi* nachgegangen. Dazu wurde Zytosol aus RAW264.7 Makrophagen mittels Ultrazentrifugation isoliert. Das isolierte Zytosol wurde weiter in einem *in vitro* Vermehrungsexperiment verwendet, indem über CFUs die Vermehrung von *R. equi* 103+ und 103- bestimmt wurde. Da Zytosol intrazellulär stark reduzierend vorliegt (Ray et al., 2009), wurde der reduzierende Charakter in diesem Experiment durch die Zugabe von Glutathion und L-Cystein simuliert.

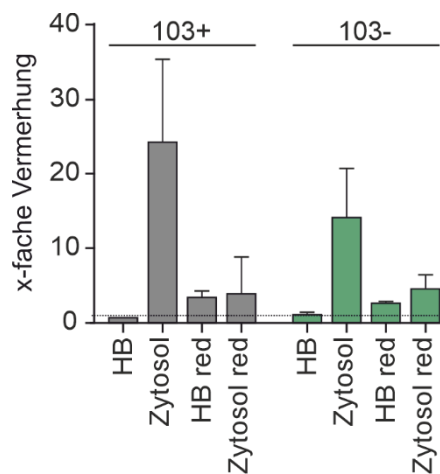


Abbildung 11: Das Wachstum von *R. equi* ist in Glutathion-enthaltendem gereinigtem Zytosol verringert. *In vitro* Vermehrung von *R. equi* in gereinigtem Zytosol aus RAW264.7 Makrophagen. Dargestellt ist der Quotient aus den Bakterienkolonien zum Zeitpunkt 24 h und 0 h (x-fache Vermehrung). Mittelwerte und Standardabweichungen stammen aus drei unabhängigen Experimenten. red, enthält 2 mM L-Cystein, 20 mM Glutathion.

Die 24-stündige Inkubation von *R. equi* 103+ und 103- in HB-Medium führte zu einer Reduktion der Bakterienzahl. Im Gegensatz dazu vermehrten sich die Bakterien stark, wenn sie in zytosolhaltigem Medium ohne L-Cystein und Glutathion („reduzierende Bedingungen“) inkubiert wurden. Enthielt das HB-Medium zusätzlich L-Cystein und Glutathion, vermehrten sich die Bakterien nur geringfügig. Das Vorhandensein von Zytosol im Reaktionsansatz spielte keine Rolle.

3.3.1.2. Charakterisierung des Listeriolysin O-exprimierenden Stammes *R. equi* (LLO)

Da sich *R. equi* bis zur Nekrose der Makrophagen in den Phago lysosomen repliziert (Lührmann et al., 2004), kommt das Bakterium nicht mit den antimikrobiellen Peptiden (AMPs) im Zytosol in Kontakt. Um den zuvor beobachteten Einfluss des Zytosols auf die Vermehrung von *R. equi* *in vivo* zu untersuchen, musste *R. equi* dazu gebracht werden, seine

Replikationsnische zu verlassen. Andere Pathogene können aus dem Phagolysosom durch die Expression eines porenbildenden Toxins, wie beispielsweise Listeriolysin O (LLO) von *L. monocytogenes* entkommen (Birmingham et al., 2008). LLO wird durch das *hlyA* Gen kodiert (Gründling et al., 2003). Um auch *R. equi* 103+ mit *hlyA* auszustatten, wurden die Bakterien mit einem *hlyA*-tragenden pSMT3-M transformiert (siehe 2.2.4.3.). Die Expression von *hlyA* wird dabei durch einen *hsp60* Promotor reguliert.

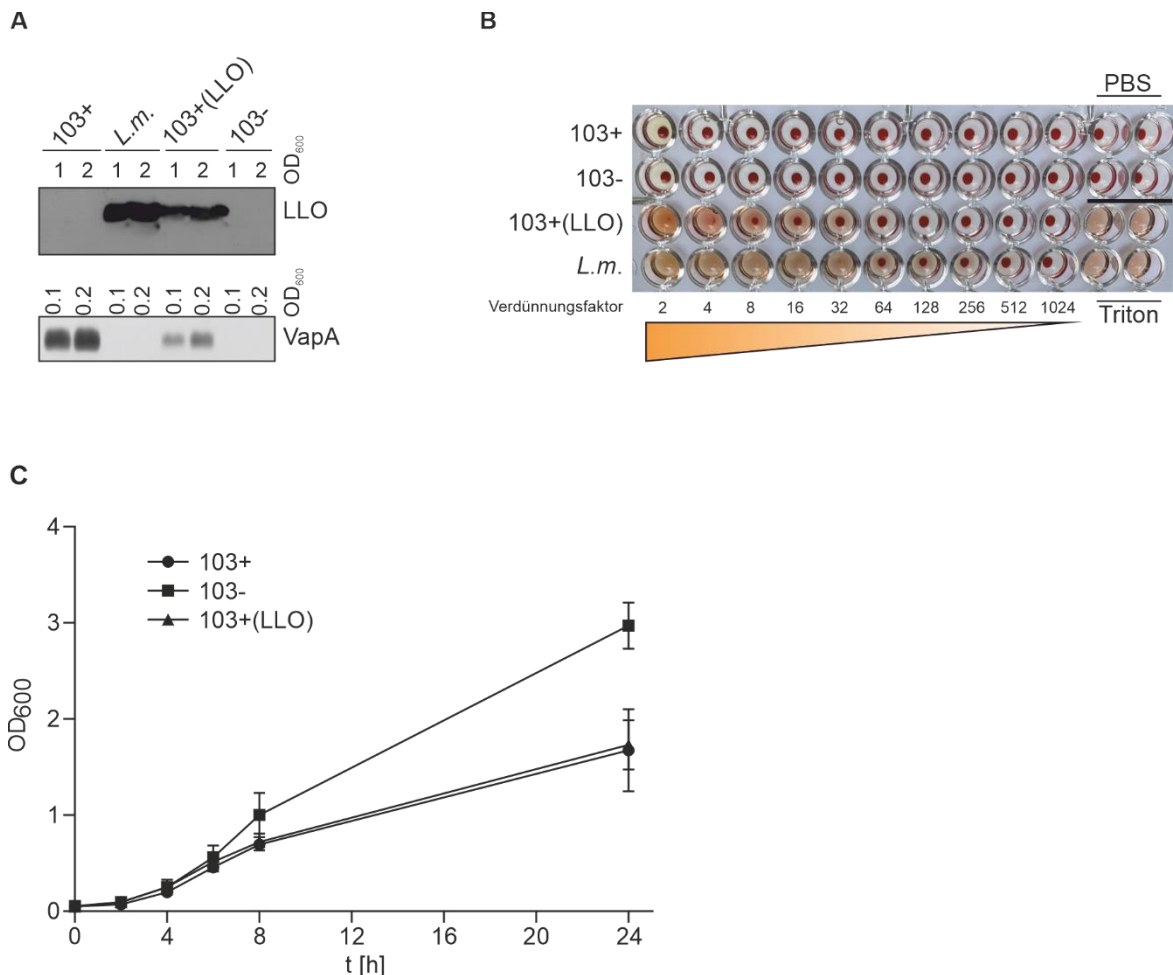


Abbildung 12: *R. equi* 103+(LLO) exprimiert LLO und VapA und ist hämolytisch. (A) Expressionskontrolle von LLO und VapA mittels Immunblot aus Kulturüberständen der angegebenen Bakterien. Abgebildet sind repräsentative Blots aus zwei unabhängigen Experimenten. (B) Hämolyse Assay mit den unter (A) verwendeten Überständen. (C) Wachstumskinetik der angegebenen Bakterienstämme in BHI Medium. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

Zur Expressionskontrolle von LLO bzw. VapA wurden Bakterienüberstände aus den Schüttelkulturen von *R. equi* 103+, 103+ (LLO), 103- und *L. monocytogenes* aufkonzentriert und mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt bzw. die Bakterienpellets direkt für die biochemische Analyse verwendet (Abbildung 12A). *R. equi* 103+(LLO) exprimierte nur halb so viel LLO wie *L. monocytogenes*. Die VapA-Expression in *R. equi* 103+(LLO) war im Vergleich zum Wildtypstamm um ein Drittel reduziert während *L. monocytogenes* und *R. equi* 103-

erwartungsgemäß VapA-negativ waren. Die Verwendung der Überstände in einem Hämolysetest zeigte außerdem, dass *R. equi* 103+(LLO) und *L. monocytogenes*, im Gegensatz zu wildtypischen *R. equi*, hämolytisch waren (Abbildung 12B).

Um für die folgenden Vermehrungsversuche auszuschließen, dass *R. equi* 103+ aufgrund der LLO-Expression schlechter wächst als wildtypische *R. equi* 103+, wurden Wachstumskurven von *R. equi* 103+, 103+(LLO) und 103- erstellt (Abbildung 12C). Dabei zeigte sich, dass innerhalb der ersten 8 h alle drei Bakterienstämme gleich gut wuchsen. Am Endpunkt der Messung (24 h) wiesen die VapA exprimierenden *R. equi* die gleiche OD₆₀₀ auf, die signifikant unter der OD₆₀₀ von *R. equi* 103- lag.

3.3.1.3. LLO-induzierte Löcher in der RCV-Membran führen zum Sterben von *R. equi*

Um im Folgenden das intrazelluläre Wachstumsverhalten von 103+(LLO) zu untersuchen, wurden RAW264.7 Makrophagen mit und ohne rVapA infiziert. Die intrazelluläre Vermehrung wurde entweder lichtmikroskopisch (Abbildung 13A und B) oder mittels CFUs (Abbildung 13C) bestimmt. Das Maß für eine robuste Vermehrung wurde ausschließlich in diesem Experiment auf >14 Bakterien pro infiziertem Makrophagen angehoben, da *R. equi* 103+(LLO) eine stark erhöhte MOI (6,4) zu Beginn der Infektion aufwies. Die beiden pVAPA-tragenden Stämme vermehrten sich gleich stark und die Zugabe von rVapA beeinflusste die Vermehrung nicht. Sowohl 103+ als auch 103+(LLO) bildeten im Verlauf der Infektion charakteristische RCVs, d.h. stark vergrößerte Vakuolen, aus (Abbildung 13B).

Die Vermehrungsbestimmung mittels CFUs (Abbildung 13C) zeigte, dass sich nur *R. equi* 103+ vermehrte. Die Zugabe von rVapA verbesserte die Vermehrung von 103+. Im Gegensatz zur mikroskopischen Vermehrungsbestimmung (Abbildung 13A) wurde *R. equi* 103+(LLO) auch in Gegenwart von rVapA abgetötet (Abbildung 13C).

Berücksichtigt man, dass Glutathion und L-Cystein das Wachstum von *R. equi* im isolierten Zytosol (reduzierende Umgebung des Zytosols) verringerten, könnte es sein, dass *R. equi* 103+(LLO) mit dem Makrophagenzytosol in Kontakt kommt und dadurch stirbt. Wenn Bakterien oder Viren in das Wirtszytosol gelangen, wird rasch die Expression von Interferon β (IFN β), einem Typ-I-Interferone des angeborenen Immunsystems, induziert (Uma M. Nagarajan, 2011). In der Folge kommt es zur Sekretion von IFN β (Lambert et al., 2007; McCaffrey et al., 2004). Extrazelluläres IFN β eignet sich daher als Indikator für den Bakterien-Zytosol-Kontakt. Um nun zu untersuchen, ob der zuvor beobachtete Wachstumsdefekt (Abbildung 13C) von *R. equi* 103+(LLO) während der 24-stündigen Infektion auf den Kontakt mit dem Makrophagenzytosol zurückzuführen sein könnte, wurde in Kooperation mit Dr. Olaf Utermöhlen (Universität Köln, Deutschland) ein IFN β ELISA durchgeführt (Abbildung 13D).

Dazu wurde der Kulturüberstand von *L. monocytogenes* bzw. *R. equi* infizierten J774E Makrophagen 6 h bzw. 24 h nach Infektionsbeginn verwendet. Die Behandlung der Makrophagen mit Lipopolysaccharid (LPS) aus *Salmonella* oder die Makrophageninfektion durch *L. monocytogenes* führte zu einer gleich hohen IFN β -Konzentration. Im Gegensatz dazu wurde kein IFN β von Makrophagen freigesetzt, wenn diese mit *L. monocytogenes* Δ hlyA, die nicht aus dem Phagosom ausbrechen können (Beauregard et al., 1997), infiziert waren. Da sich *L. monocytogenes* bereits nach ca. 40 min (de Chastellier & Berche, 1994) und *R. equi* erst nach ca. 8 h (von Bargaen et al., 2009) nach Infektionsbeginn intrazellulär vermehrt, wurde für die IFN β -Freisetzung von mit *R. equi* infizierten Makrophagen zum Zeitpunkt 24 h p.i. untersucht. Die IFN β -Konzentration im Kulturmedium der Makrophagen war dabei sowohl Virulenzplasmid- als auch VapA-unabhängig. Die *R. equi*-Stämme 103+, 103+ Δ vapA und 103- induzierten jeweils nur geringfügig die Sekretion von IFN β . Im Kulturmedium der mit *R. equi* 103+(LLO) infizierten Makrophagen wurde jedoch eine etwa 10-fach höhere IFN β -Konzentration gemessen als beim wildtypischen Stamm. Infektionen mit *L. monocytogenes* und *R. equi* 103+(LLO) führten somit zu einer gleich hohen extrazellulären IFN β -Konzentration. Eine 24-stündige Behandlung der Makrophagen mit LPS führte ebenfalls zu einem Anstieg des extrazellulären IFN β s. Allerdings war die IFN β -Konzentration nach 24-stündiger Behandlung nur halb so hoch wie nach 6-stündiger Behandlung. Mit diesen Daten wurde nun gezeigt, dass *R. equi* 103+(LLO) in Kontakt mit dem Makrophagenzytosol kommt.

Als nächstes wurde untersucht, ob *R. equi* 103+(LLO) durch den Kontakt mit dem Zytosol abgetötet wird oder ob LLO nicht nur die Phagosomenmembran, sondern auch die Plasmamembran der Wirtszelle perforierte, so dass das Antibiotikum (Vancomycin) eindringen und die Bakterien abtöten konnte. Um dies zu untersuchen, wurde ein Zytotoxizitäts-Assay durchgeführt (Abbildung 13E), bei dem die Zytotoxizität über die Freisetzung der Laktatdehydrogenase (LDH) in den Kulturüberstand der Makrophagen bestimmt wurde. Die Makrophagen wurden durch *R. equi* 103+, 103+ pSMT3, 103+(LLO), 103+ Δ vapA oder 103- bei zwei verschiedenen MOI (3 und 30) infiziert. Wurden die Makrophagen mit einer MOI von 3 infiziert, so ergab sich kein Unterschied in der LDH-Freisetzung zwischen den untersuchten Bakterienstämmen. Erst bei einer Erhöhung der MOI auf 30 setzten die mit *R. equi* 103+, 103+ pSMT3 oder 103+(LLO) infizierten Makrophagen vermehrt LDH frei. Vergleicht man die Werte der einzelnen Replikate miteinander, so war im Kulturüberstand der mit *R. equi* 103+(LLO) infizierten Makrophagen stets am meisten LDH vorhanden. Dagegen waren Infektionen mit *R. equi*, die kein VapA exprimieren (103- und 103+ Δ vapA), selbst bei einer MOI von 30 nur schwach zytotoxisch für die Makrophagen.

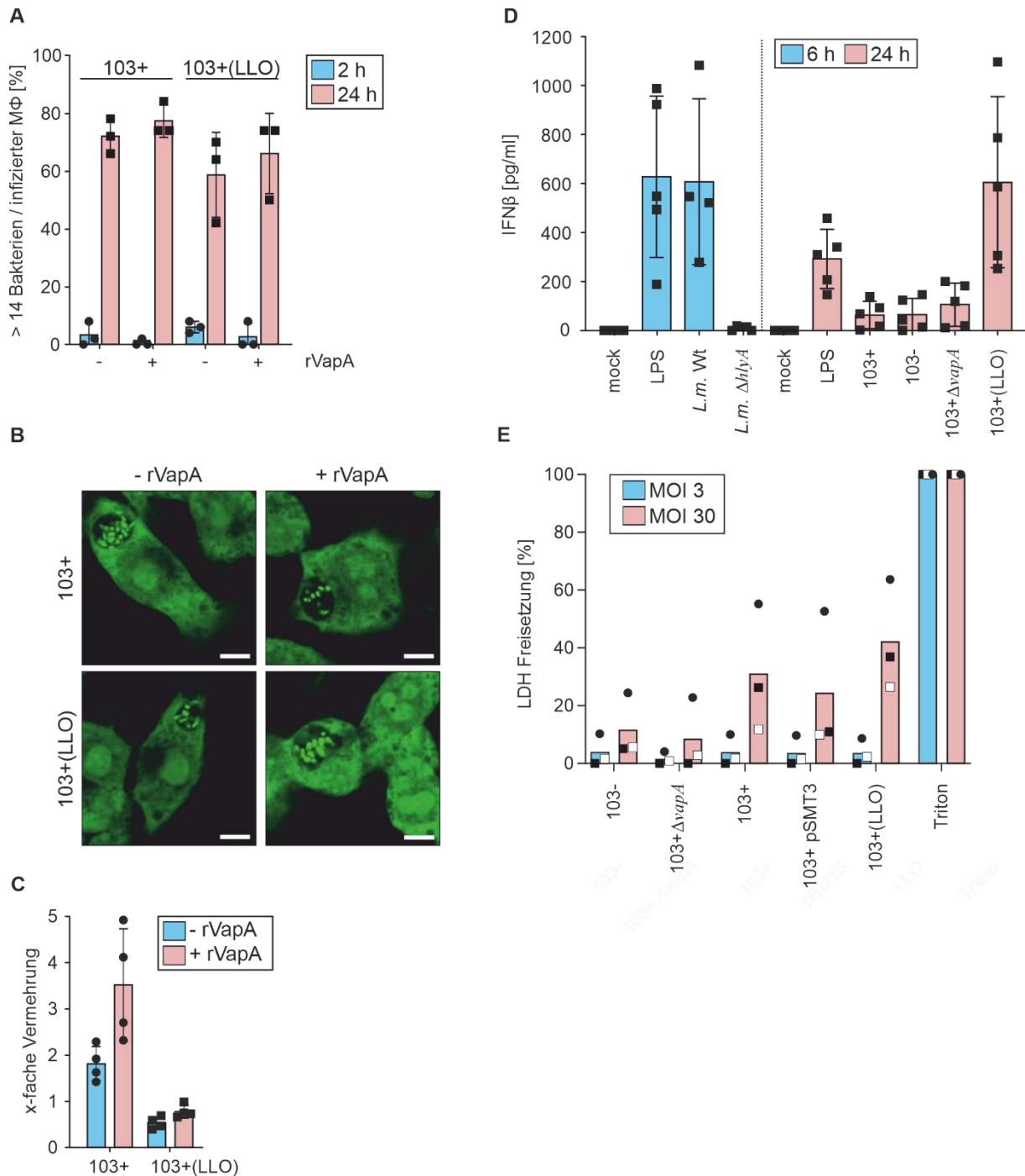


Abbildung 13: *R. equi* 103+(LLO) kommt im Verlauf der Infektion in Kontakt mit dem Makrophagenzytosol und stirbt darin. (A) Robuste Vermehrung von *R. equi* 103+ und 103+(LLO) in RAW264.7 Makrophagen. Wo angegeben, wurden die Makrophagen mit 10 μg/ml rVapA behandelt. **(B)** Repräsentative Aufnahmen von (A), zum Zeitpunkt 24 h p.i. Maßbalken: 5 μm. **(C)** Wie in (A), aber Vermehrungsbestimmung durch CFUs. **(D)** IFNβ ELISA von mit den angegebenen Bakterien infizierten J774E Makrophagen zu den angegebenen Zeitpunkten. Die Makrophagen wurden, wo angegeben, mit 100 ng/ml LPS behandelt. **(E)** Zytotoxizitäts-Assay von mit mit den angegebenen Bakterien infizierten RAW264.7 Makrophagen (MOI = 3 oder 30). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus (A, E) drei, (C) vier bzw. (D) fünf unabhängigen Experimenten. *L.m.*, *L. monocytogenes*.

Um die Membranintegrität von RCVs oder VCVs in RAW264.7 Makrophagen zu untersuchen, wurde die Lokalisation von Galektin 3 (Gal3) mittels Immunfluoreszenzmikroskopie bestimmt. Gal3 ist ein zytosolisches Protein, das aufgrund von Membranläsionen in das Lumen von Lysosomen gelangt und dort an die β -Galaktoside auf der Innenseite der Membrane bindet (Miller et al. 2016). Um künstliche Membranschäden zu induzieren, wurde das Dipeptid Glycyl-L-phenylalanin-2-naphthylamid (GPN) zugesetzt (Abbildung 14). Die Zugabe von GPN zum Kulturmedium der Makrophagen führte zur Bildung von Gal3-Puncta in den Zellen. Sollte es im Verlauf einer *R. equi*-Infektion zu RCV-Membranläsionen kommen, die vermutlich durch VapA ausgelöst werden, so würde dies zu einer verstärkten Gal3-Lokalisierung an der limitierenden RCV-Membran führen. Auch einige interne Vesikel, die vermutlich teilweise an der RCV-Membran gebildet werden, wären wahrscheinlich Gal3-positiv. Im Gegensatz dazu wurde Gal3 nur geringfügig an die limitierenden Membranen von RCVs oder VCVs rekrutiert und lokalisierte nicht im Lumen der Vakuolen. Die eindeutige Identifizierung der Vakuolen war durch die Färbung des Zytosols aufgrund der dortigen Lokalisation von Gal3 gegeben. Auffallend war dabei, dass die Plasmamembran der mit rVapA behandelten oder mit *R. equi* infizierten Makrophagen stärker selektiv mit Gal3 angefärbt wurde.

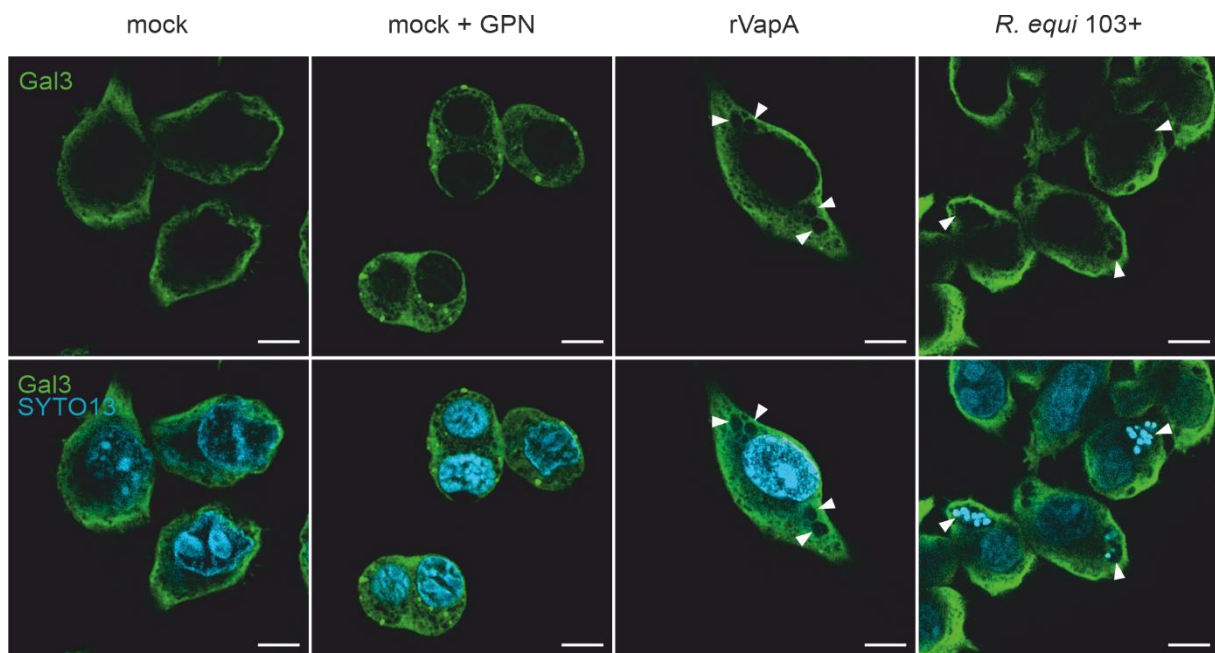


Abbildung 14: Gal3 wird nicht an RCVs oder VCVs rekrutiert. Gal3 in der Immunfluoreszenz von RAW264.7 Makrophagen. Die Makrophagen wurden mit *R. equi* 103+ infiziert oder 10 μ g/ml rVapA behandelt oder für 13 min mit 300 μ M GPN behandelt. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen aus zwei unabhängigen Experimenten. Maßbalken: 5 μ m. Die weißen Pfeilköpfe markieren die limitierende Membran der VCVs bzw. RCVs

Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass *R. equi* 103+(LLO) eine *R. equi*-typische RCV etablierte, in der sich die Bakterien intrazellulär vermehrten (mikroskopische Vermehrung, Abbildung 13A und B). Allerdings waren nur noch wenige dieser Bakterien vital

(Abbildung 13C). Der vermutete Grund für das intrazelluläre Sterben von *R. equi* 103+(LLO) ist der Kontakt mit dem Makrophagenzytosol (Abbildung 11) aufgrund von LLO-induzierten Löchern in der Phagosomenmembran (Abbildung 13D) und nicht das Eindringen des Antibiotikums durch Löcher in der Plasmamembran (Abbildung 13E). Wildtypische virulente *R. equi* vermehren sich intrazellulär, ohne dabei die RCV-Membran oder die Plasmamembran der Wirtsmakrophagen zu beschädigen (Abbildung 13D und E, Abbildung 14). Dadurch konnte erstmals gezeigt werden, dass *R. equi* für die intrazelluläre Vermehrung eine intakte RCV-Membran benötigt.

3.3.2. Intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* ist von Makroautophagie-unabhängig

Die ESCRT-Proteine spielen eine entscheidende Rolle in der Membranreparatur von Lysosomen. Sie reparieren kleine Läsionen und markieren Lysosomen mit größeren Löchern für den Abbau durch Autophagie (Jia et al., 2020). Um den Einfluss der ESCRT-Proteine auf die Membranintegrität der RCV zu untersuchen, wurde ein weiterer ELISA durchgeführt, diesmal mit siRNA-transfizierten und mit *R. equi* 103+ infizierten RAW264.7 Makrophagen. Verwendet wurden siRNAs gegen ESCRT-I (Tsg101+Alix) und Vps4 (Abbildung 15). Wie im vorherigen ELISA (Abbildung 13D) wurden die Makrophagen parallel zu den 24-stündigen *R. equi* Infektionen für 6 h mit *L. monocytogenes* bzw. *L. monocytogenes* $\Delta hlyA$ infiziert. Die höchste IFN β -Konzentration wurde im Kulturüberstand der mit wildtypischen *L. monocytogenes* infizierten Makrophagen gemessen. In nicht infizierten und mit *L. monocytogenes* $\Delta hlyA$ infizierten Makrophagen wurde erwartungsgemäß kein extrazelluläres IFN β gemessen. Im Überstand von mit *R. equi* 103+(LLO)-infizierten Makrophagen konnte nur halb so viel IFN β nachgewiesen werden wie mit *L. monocytogenes*. Darüber hinaus war die extrazelluläre IFN β -Konzentration in mit *R. equi* 103+ infizierten Makrophagen um mehr als die Hälfte reduziert im Vergleich zu der des LLO-exprimierenden *R. equi*-Stammes. Interessanterweise führte keiner der ESCRT-*Knockdowns* bei gleichzeitiger Infektion mit *R. equi* 103+ zu einer Veränderung der IFN β -Konzentration im Kulturüberstand der Makrophagen. Bei den nicht infizierten Makrophagen (Negativkontrolle) war jedoch kein IFN β im Überstand nachweisbar und bei *R. equi* 103+(LLO) zuverlässig am höchsten

Insgesamt waren die Trends der einzelnen IFN β -Immunantworten zwischen RAW264.7 und J774E Makrophagen ähnlich. Allerdings waren die absoluten Werte in den RAW264.7-Makrophagen niedriger.

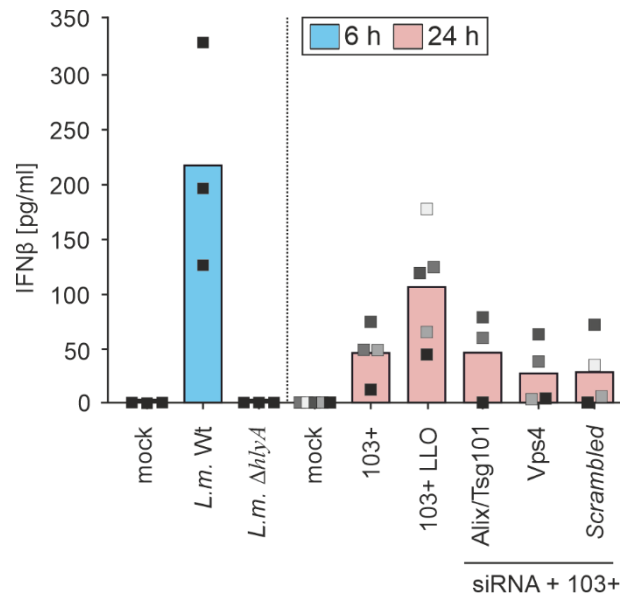


Abbildung 15: ESCRT-Knockdowns haben keinen Einfluss auf die IFN β Sekretion. IFN β ELISA von mit *L. monocytogenes* (*L.m.*) oder *R. equi* 103+ infizierten RAW264.7 Makrophagen zu den angegebenen Zeitpunkten. Die Makrophagen wurden, wo angegeben, mit siRNA gegen Alix und Tsg101 oder Vps4 transfiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei bis fünf unabhängigen Experimenten.

Obwohl im ELISA keine erhöhten IFN β -Konzentrationen im Überstand der *R. equi*-infizierten ESCRT-Knockdown-Makrophagen detektiert wurden, konnte eine potentielle Membranschädigung und ein damit verbundenes Wachstumsdefizit von *R. equi* nicht auszuschließen werden, da bei starker Schädigung anstelle einer Membranreparatur die RCV auch durch Lysophagie aufgenommen werden könnte. Lysophagie ist eine spezielle Form der Autophagie, die induziert wird, wenn große Löcher in der Lysosomenmembran nicht durch die ESCRT-Maschinerie repariert werden können (Jia et al., 2020). Ein wichtiger Faktor in der Lysophagie ist neben ATG7, ATG12 das Protein ATG5 (Koerver et al., 2019). Um den Einfluss einer möglichen Membranschädigung auf das intrazelluläre Wachstum weiter zu untersuchen, wurde eine stabile ATG5-Knockdown RAW264.7 Zelllinie verwendet, die im Folgenden näher charakterisiert wird.

Die Analyse der ATG5-Expression in der ATG5-Knockdown Zelllinie zeigte eine Verringerung um etwa 90 % im Vergleich zu unmanipulierten Makrophagen (Abbildung 16A). Weiteren wurde der Einfluss des Makroautophagie-induzierenden Reagens (mTOR-Inhibitor) Rapamycin auf die Makroautophagie in wildtypischen und ATG5-Knockdown RAW264.7 Makrophagen untersucht. Dazu wurden die Makrophagen für 24 h mit dem Inhibitor behandelt und anschließend der Autophagosom-Marker LC3 durch Immunfärbung analysiert (Abbildung 16B). Rapamycin induzierte die Bildung von LC3-Puncta ausschließlich in den wildtypischen und nicht in den ATG5-defizienten RAW264.7 Makrophagen. Darüber hinaus war die LC3-Färbung in Rapamycin-behandelten ATG5-Knockdown-Makrophagen ähnlich der von unbehandelten RAW264.7 und unbehandelten ATG5-Knockdown RAW264.7 Makrophagen.

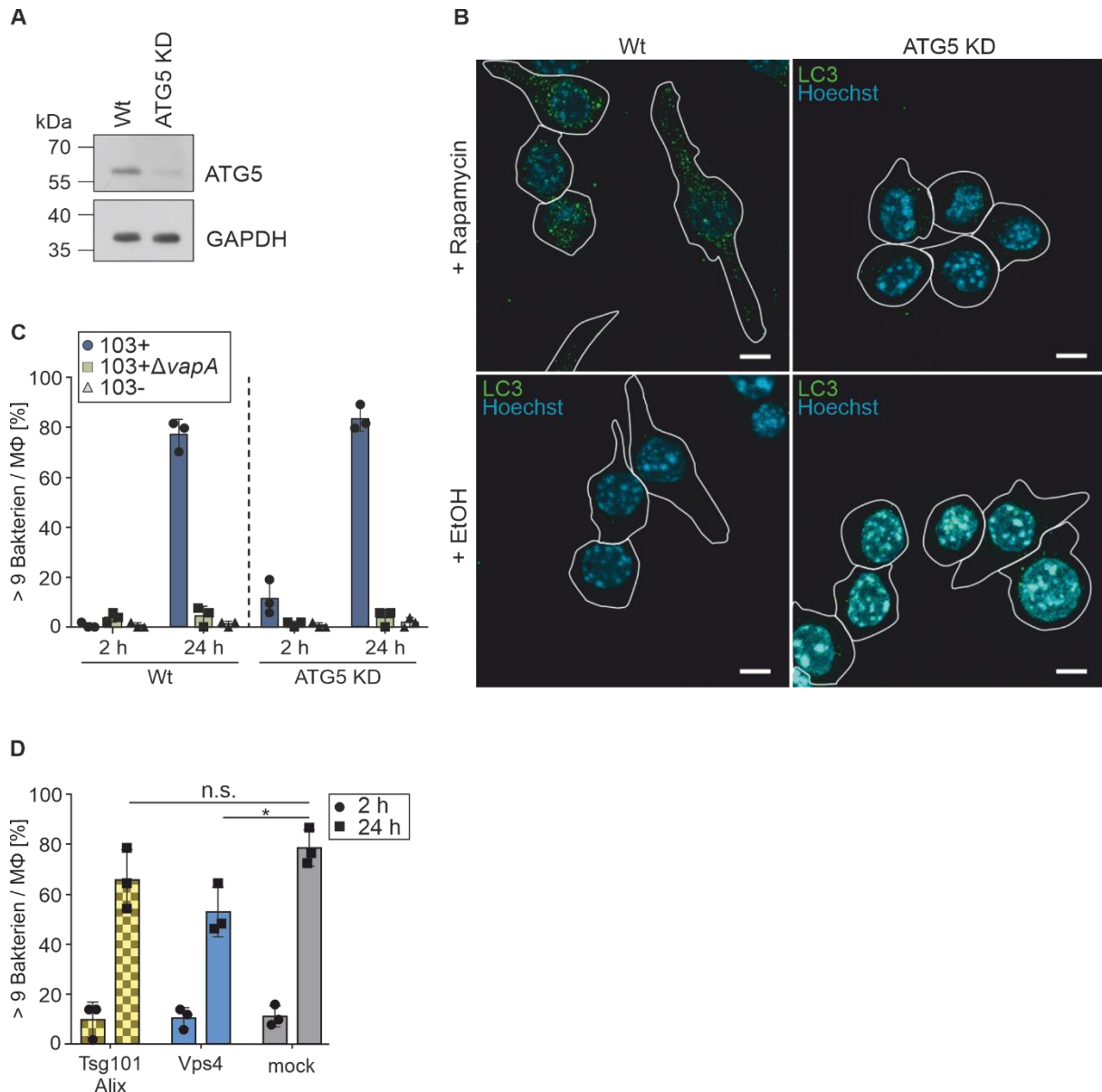


Abbildung 16: ATG5-Knockdown beeinflusst das intrazelluläre Vermehrungsverhalten von *R. equi* nicht. (A) Bestimmung des ATG5-Proteinlevels in Zelllysaten aus wildtypischen (Wt) und ATG5-Knockdown (ATG5-KD) RAW264.7 Makrophagen mittels Immunblot. (B) Repräsentative Aufnahmen der LC3-Immunfluoreszenz von Rapamycin-behandelten (200 nM) Wt oder ATG5-KD RAW264.7 Makrophagen aus zwei unabhängigen Experimenten. Maßbalken: 5 μm. (C) Robuste Vermehrung von den angegebenen *R. equi* Stämmen in Wt oder ATG5-KD RAW264.7 Makrophagen. (D) Robuste Vermehrung von *R. equi* 103+ in siRNA transfizierten ATG5-KD RAW264.7 Makrophagen. In (C und D) sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. *, p-Wert < 0,05.

Um zusätzlich zu untersuchen, ob die verringerte Makroautophagie in den ATG5-Knockdown RAW264.7 Makrophagen das intrazelluläre Vermehrungsverhalten von *R. equi* beeinflusst, wurden wildtypische RAW264.7 Makrophagen und ATG5-defiziente Makrophagen mit *R. equi* 103+, 103 ΔvapA oder 103- infiziert (Abbildung 16C). Es zeigte sich, dass *R. equi* 103+ von ATG5-Knockdown besser aufgenommen wurde als von wildtypischen RAW264.7 Makrophagen. Für die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* war das Expressionslevel von

ATG5 unerheblich. *R. equi* 103+ vermehrte sich innerhalb von 24 h stark, wohingegen sich weder 103- noch 103+ $\Delta vapA$ intrazellulär vermehrten.

Um die Ausgangsfrage zu beantworten, ob ESCRT die intrazelluläre Proliferation von *R. equi* 103+ über die Aufrechterhaltung der RCV-Membranintegrität beeinflusst, wurden die ESCRT-I-Faktoren Alix und Tsg101 oder die AAA-ATPase Vps4 in ATG5-*Knockdown* RAW264.7 Makrophagen mittels siRNA herunterreguliert und die Makrophagen anschließend mit virulenten *R. equi* infiziert (Abbildung 16D). Nur ein Vps4-*Knockdown* führte zu einer signifikanten Verringerung der intrazellulären Vermehrung von 103+. In den Alix und Tsg101-*Knockdown*-Makrophagen vermehrte sich *R. equi* 103+ nicht signifikant schlechter als in den Kontroll-Makrophagen, die mit *Scrambled* siRNA transfiziert worden waren. Wie im vorherigen Experiment (Abbildung 16C), waren auch in diesem Experiment zu Beginn mehr Bakterien pro infiziertem ATG5-*Knockdown*-Makrophagen vorhanden, als es im vergleichbaren Experiment mit wildtypischen RAW264.7 Makrophagen der Fall war (Abbildung 9). Die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* in ATG5-defizienten Makrophagen war jedoch genauso abhängig von Vps4 bzw. unabhängig von ESCRT-I wie in Wildtypmakrophagen (Abbildung 9).

3.4. Die Bildung von intravakuolären Vesikeln (IVVs) erfolgt ESCRT-abhängig

Da die ESCRT-abhängige Membranreparatur höchst wahrscheinlich keinen Einfluss auf die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* in Makrophagen hat, stellte sich nun die Frage, wie ESCRT stattdessen das Wachstum von *R. equi* beeinflusst. Ein häufig beschriebener Mechanismus in Hefe ist die ESCRT-abhängige Einstülpung der Vakuolenmembran weg vom Zytosol (beispielsweise in Teis et al., 2009; Alonso et al., 2014). Aber auch in Säugerzellen wurde dieses Phänomen bereits beschrieben, meist bei der Bildung von MVBs (Sahu et al., 2011, Mejvang et al., 2018). Die ILVs, die ESCRT-abhängig an den MVBs gebildet werden, weisen einen Durchmesser von ~ 50 nm auf und können somit charakteristischerweise diesem Kompartiment zugeordnet werden (Stuffers et al., 2009).

3.4.1. MG132-Behandlung verringert die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi*

Der am häufigsten beschriebene Prozess ist die Bildung von ILVs an den späten Endosomen in Zusammenhang mit der Aufnahme des EGF-Rezeptors. Dabei werden Rezeptoren, die sich auf der Endosomenmembran befinden, selektiv mit Ubiquitin markiert. Diese ubiquitinierten Rezeptoren werden von Hgs (ESCRT-0) erkannt (Raiborg & Stenmark, 2009). ESCRT-0 rekrutiert ESCRT-I, der wiederum ESCRT-II und -III rekrutiert und so die Aufnahme der Rezeptoren in ILVs vermittelt (Raiborg & Stenmark, 2009). Da bereits ein geringer Einfluss von Hgs auf die intrazelluläre Vermehrung von virulenten *R. equi* gezeigt wurde (Abbildung 9),

deutete dies auf einen selektiven, Ubiquitin- und ESCRT-0 vermittelten Mechanismus hin, der der intrazellulären Vermehrung von *R. equi* zugrunde liegt.

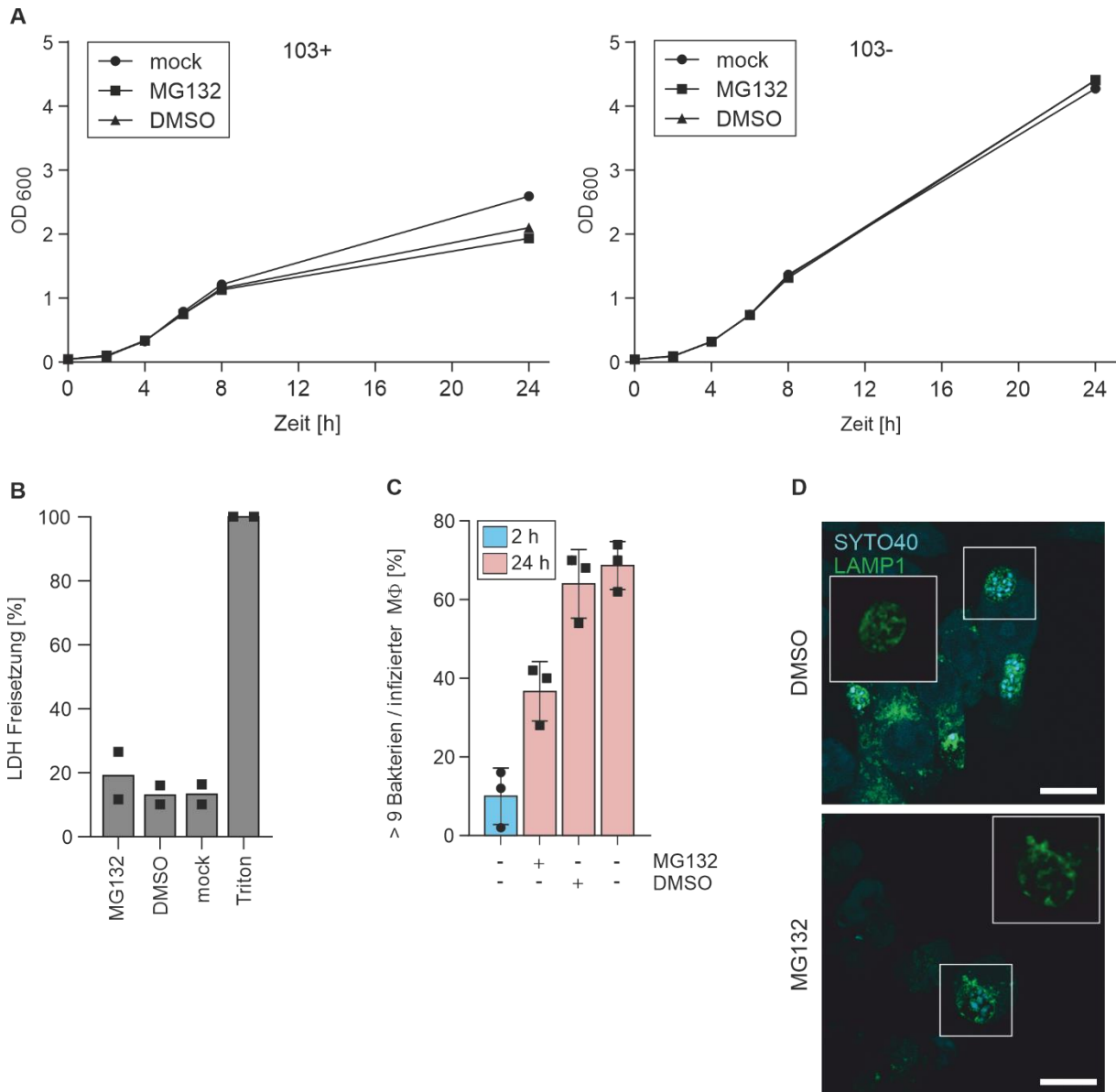


Abbildung 17: MG132-Behandlung infizierter Makrophagen verringert die Vermehrung von *R. equi*. (A) Wachstumskinetik von *R. equi* 103+ und 103- in 0,5 µM MG132-enthaltendem BHI-Medium. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. (B) Zytotoxizitäts-Assay von RAW264.7 Makrophagen, die für 22 h mit 0,4 µM MG132 (Endkonzentration) behandelt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente. (C) Robuste Vermehrung von *R. equi* 103+ infizierten RAW264.7 Makrophagen, die für 22 h mit 0,4 µM MG132 (Endkonzentration) behandelt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. (D) LAMP1 Immunfluoreszenz von (C) zum Zeitpunkt 24 h p.i.. Repräsentative Aufnahmen aus drei unabhängigen Experimenten. Maßbalken: 5 µm.

Um diese Hypothese zu testen, wurde der Proteasom-Inhibitor MG132 verwendet. Wird das Proteasom gehemmt, bleibt Ubiquitin an Substrate gebunden, die für den proteasomalen Abbau markiert wurden. Dadurch verringert sich die Menge an freiem Ubiquitin in der

Wirtszelle. Wenn weniger freies Ubiquitin zur Verfügung steht, werden auch weniger andere Substrate, z.B. Rezeptoren, die ESCRT-vermittelt in ILVs verpackt werden sollen, ubiquitiniert.

Bevor der potentielle Einfluss von MG132 auf das Vermehrungsverhalten von *R. equi* in Makrophagen untersucht werden konnte, war es wichtig einen direkten Einfluss von MG132 auf das Proteasom von *R. equi* auszuschließen. Dazu wurden Wachstumskinetiken von virulenten und avirulenten *R. equi* in mit MG132 bzw. DMSO supplementiert BHI-Medium durchgeführt (Abbildung 17A). Die Bakterien wuchsen unabhängig von der pharmakologischen Substanz gleich stark, 103- doppelt so stark wie 103+.

Darüber hinaus könnte MG132 aufgrund des gestörten proteasomalen Abbaus (und anderer gestörter Prozesse) die Letalität der Makrophagen über die Dauer des Infektionsexperiments (24 h) erhöhen. Um dies zu untersuchen, wurde die Zytotoxizität über die LDH-Freisetzung von MG132-behandelt RAW264.7 Makrophagen bestimmt (Abbildung 17B). Weder MG132 noch DMSO führten zu einer verstärkten LDH-Freisetzung der Makrophagen. Vielmehr wurde von den MG132-behandelten Makrophagen circa gleich viel LDH freigesetzt wie von der Negativkontrolle (unbehandelte Makrophagen).

Für das anschließende Vermehrungsexperiment wurden RAW264.7 Makrophagen mit *R. equi* 103+ infiziert (Abbildung 17C). Um sicherzustellen, dass *R. equi* in die Phagolysosomen gelangt, wurden die Makrophagen ab dem Zeitpunkt 2 h p.i. mit MG132 behandelt. Nach der Behandlung mit MG132 vermehrten sich virulente *R. equi* nur noch halb so stark wie in DMSO behandelten Makrophagen. Außerdem lokalisiert LAMP1 in den MG132-behandelten Makrophagen hauptsächlich auf der limitierenden RCV-Membran und nur geringfügig im RCV-Lumen (Abbildung 17D). Im Gegensatz dazu hatte das Lösungsmittel (DMSO) keinen Einfluss auf die intrazelluläre Vermehrung der Bakterien und auf die RCV. Somit wurde hier gezeigt, dass in MG132-behandelten (Abnahme der Menge an freiem Ubiquitins in der Zelle) Makrophagen (1) wenig LAMP1 in RCVs akkumuliert wurde und (2) die Vermehrung von *R. equi* 103+ verringert war. Da DN-Hgs (Abbildung 10) die Vermehrung von virulenten *R. equi* ähnlich stark reduzierte wie die Behandlung mit MG132, deutete dies auf einen selektiven, Ubiquitin- und ESCRT-0-vermittelten Mechanismus hin, der die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* beeinflusst.

3.4.2. Die Zusammensetzung und Anzahl an IVVs ist Vps4-abhängig

Die Bildung von Vesikel, insbesondere von ILVs, wird häufig mit den ESCRT-I-Faktoren Tsg101 und Alix, ESCRT-III und Vps4 in Zusammenhang gebracht (Larios et al., 2020; zusammengefasst in Vietri et al., 2020). Da RCVs zahlreiche und unterschiedliche Vesikel enthalten (Zink et al., 1987), könnte ESCRT potentiell über Vesikelbildung auf die intrazelluläre

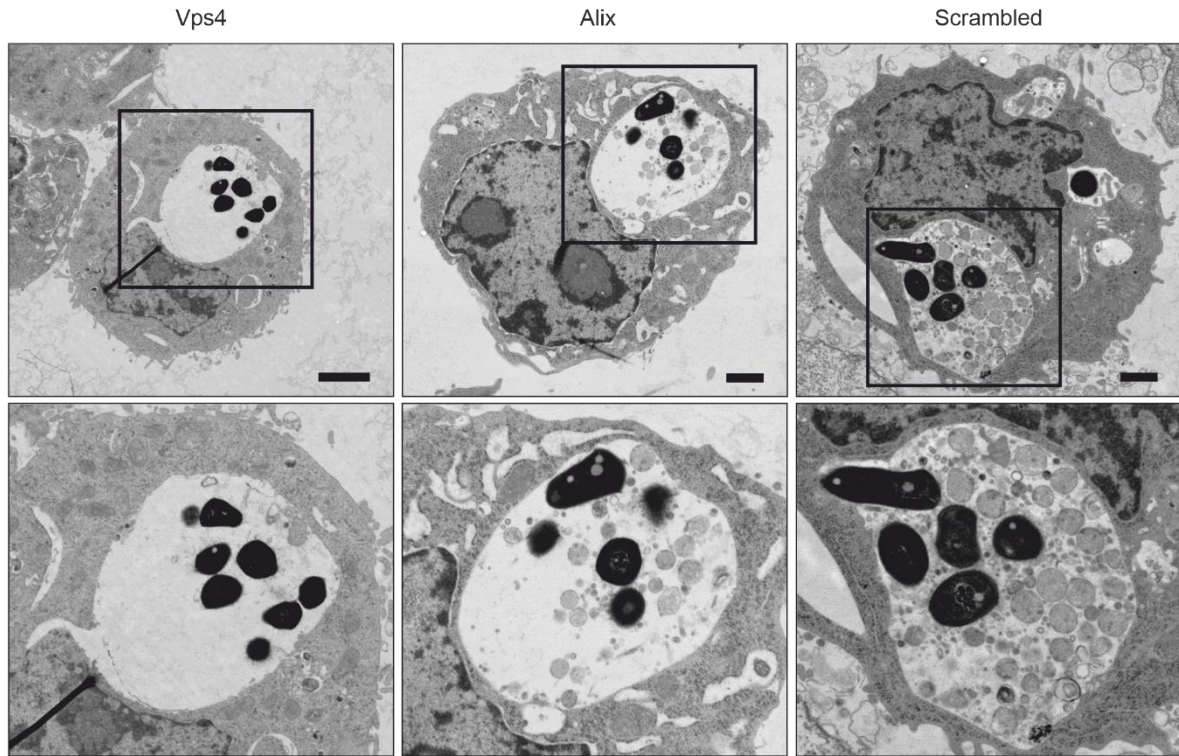
Vermehrung von *R. equi* wirken. Um diese Hypothese zu testen, wurde die Genexpression einzelner ESCRT-Faktoren mittels RNAi herunterreguliert, die bereits zuvor die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* nicht (Alix) oder stark (Vps4) verringert hatten (Abbildung 9 und 10). Mittels TEM wurden RCVs von *Knockdown*-Makrophagen (Abbildung 18A; Anhang 5, 6, 7) 24 h p.i. untersucht und die Größe, Elektronendichte und Anzahl der IVVs pro RCV bestimmt (Abbildung 18B).

Die RCVs der Kontrollmakrophagen (transfiziert mit *Scrambled* siRNA) waren fast vollständig mit Vesikeln unterschiedlicher Größe gefüllt. Die Vesikel unterschieden sich in ihrer Morphologie und Elektronendichte. Die meisten Vesikel waren annähernd rund, ähnlich elektronendicht wie das Zytosol der Makrophagen und von unterschiedlicher Größe. RCVs in *Alix Knockdown* Makrophagen enthielten weniger Vesikel als RCVs in Kontroll-Makrophagen (transfiziert mit *Scrambled* siRNA), aber mehr als RCVs in *Vps4 Knockdown* Makrophagen, die nahezu Vesikel-leer waren. Sowohl ein *Alix* als auch ein *Vps4 Knockdown* hatten den Verlust von überwiegend kleinen Vesikeln in den RCVs zur Folge.

Diese Beobachtungen wurden durch eine quantitative Analyse der RCVs bestätigt (Abbildung 18B). Die durchschnittliche Vakuolengröße unterschied sich zwischen *Vps4*-, *Alix*- und Kontroll-siRNA-transfizierten RAW264.7 Makrophagen nicht. Daher konnten im Folgenden die IVVs der verschiedenen Proben durch Normalisierung auf die jeweilige RCV-Größe miteinander verglichen werden. Die *Knockdowns* unterschieden sich in ihrer absoluten IVV-Anzahl. Im Durchschnitt enthielten RCVs der *Alix*- bzw. *Vps4-Knockdown* Makrophagen signifikant weniger IVVs als die RCVs der Kontrolle.

Um diesen signifikanten Unterschied in der IVV-Zahl zwischen den ESCRT-*Knockdowns* und der Kontrolle genauer zu untersuchen, wurden die IVVs nach Größe gruppiert und erneut analysiert. Es wurde zwischen kleinen (< 80 nm), mittleren (≥ 80 nm und < 200 nm) großen (≥ 200 nm) und nicht kleinen Vesikeln (≥ 80 nm) unterschieden.

A



B

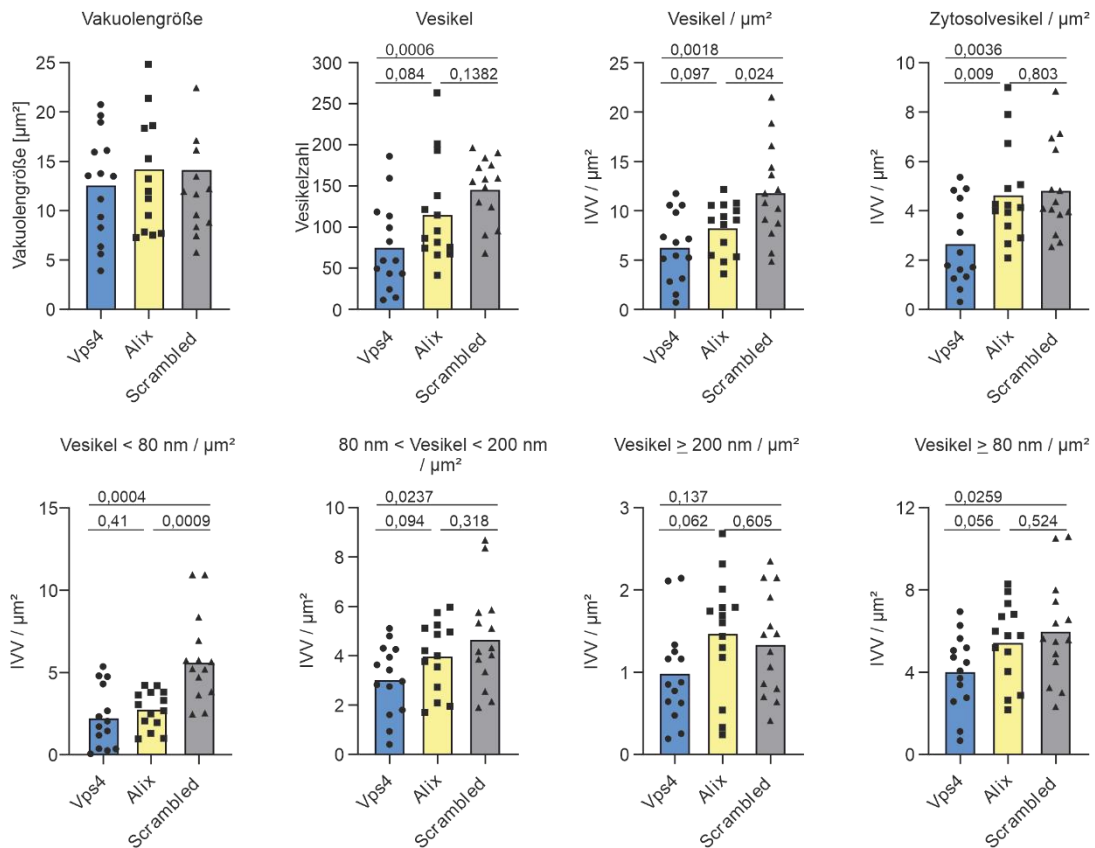


Abbildung 18: Knockdown von Vps4 oder Alix führt zur Veränderung der IVV Zusammensetzung in RCVs. (A) Repräsentative TEM-Aufnahmen aus Vps4 bzw. Alix siRNA-transfizierten und *R. equi* 103+ infizierten RAW264.7 Makrophagen 24 h p.i.. Repräsentative Aufnahmen aus zwei unabhängigen Experimenten. Maßbalken: 1 μm. **(B)** Auswertung von (A)

für die Quantifizierung der RCVs und deren IVVs nach Größe, Anzahl und Inhalt. Dargestellt sind die Einzelereignisse aus zwei unabhängigen Experimenten, in denen je sieben RCVs zufällig ausgewählt wurden. Wo angegeben, sind die p-Werte dargestellt.

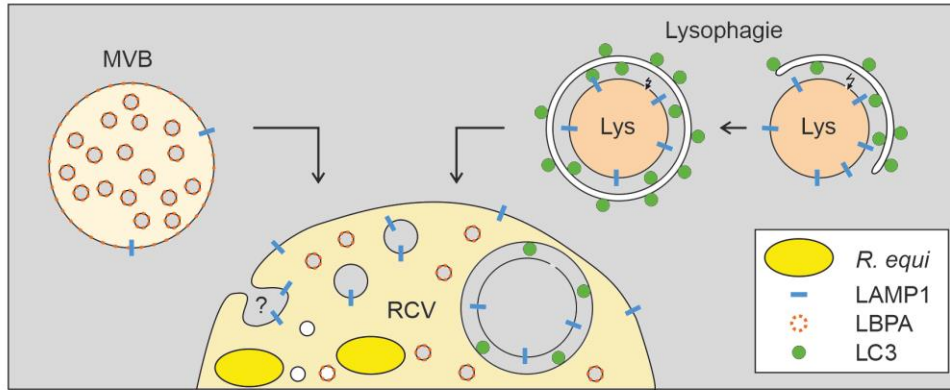
Ein ESCRT *Knockdown* führte zu einer signifikanten Verringerung der Anzahl kleiner IVVs in den RCVs. Außerdem führte ein *Vps4 Knockdown* zur Bildung von zwei Populationen unter den Replikaten, die sich deutlich in ihren durchschnittlichen IVVs/ μm^2 unterschieden. Ein *Vps4 Knockdown* reduzierte signifikant die Anzahl an mittelgroßen Vesikeln in RCVs. Beide ESCRT-*Knockdowns* hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der großen IVVs. Ein *Vps4 Knockdown* verringerte die Anzahl an IVVs, die ≥ 80 nm groß waren. Somit führte ein *Vps4 Knockdown* zu einer generellen Abnahme von IVVs und nicht nur zu einer Verringerung von Vesikeln einer bestimmten Größe. Darüber hinaus war die Anzahl der Vesikel mit zytosolähnlichem Inhalt (Elektronendichte gleich des Makrophagenzytosols) nur in RCVs von *Vps4 Knockdown* Makrophagen verringert. Im Gegensatz dazu reduzierte ein *Alix Knockdown* nur die Anzahl der kleinen Vesikel signifikant.

3.4.3. Zytosolisches GFP gelangt Vps4-abhängig und ATG5-unabhängig in die RCV

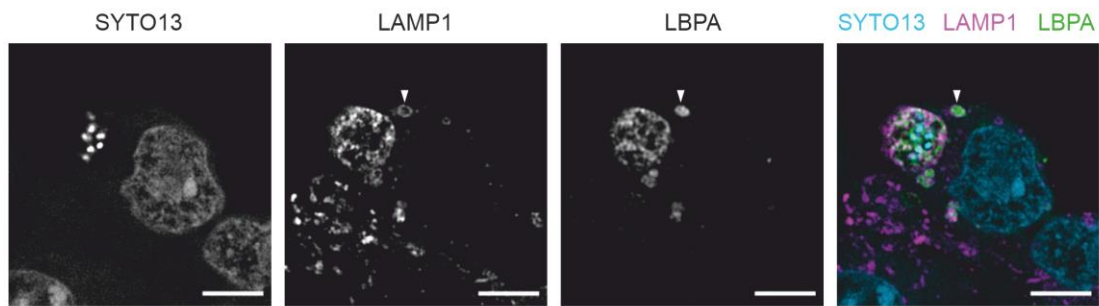
Besonders interessante Beobachtungen aus der Analyse der TEM-Aufnahmen waren, dass sich große Vesikel (≥ 200 nm) mit potentiell zytosolischem Inhalt in den RCVs anreicherten und dass ein *Vps4 Knockdown* die Anzahl dieser Vesikel reduzierte. Daher wurde die Frage nach dem Ursprung der Vesikel mit potentiell zytosolischem Inhalt untersucht.

Da die Anzahl der kleinen IVVs in Abhängigkeit von ESCRT reduziert wurde, deutete dies auf eine Fusion zwischen MVBs, die viele homogene ILVs enthalten, und RCVs hin. Aufgrund der Richtung der Vesikelbildung (weg vom Zytosol) enthalten ILVs auch Wirtszytosol. Darüber hinaus enthalten ILVs LBPA, ein Phospholipid, das überwiegend an späten Endosomen lokalisiert ist (Gruenberg, 2020). Somit fungiert LBPA als Markerprotein für MVBs. Um zu überprüfen, ob LBPA-positive ILVs in RCVs transportiert werden, wurden *R. equi* 103+ infizierte Makrophagen 24 h p.i. gegen LBPA und LAMP1 immungefärbt (Abbildung 19B). Interessanterweise wurde ein Organell beobachtet (vermutlich ein MVB; weiße Pfeilspitze), das LBPA in einer LAMP1-positiven Membran umschlossen enthielt. LBPA und LAMP1 akkumulierten in RCVs. Die Tatsache, dass die beiden Proteine nicht in RCVs kolokalisierten, deutete auf unterschiedliche Ursprünge der LAMP1- und LBPA-positiven IVVs hin, bestätigte aber die Hypothese, dass einige IVVs aus der Fusion von MVBs mit RCVs entstanden.

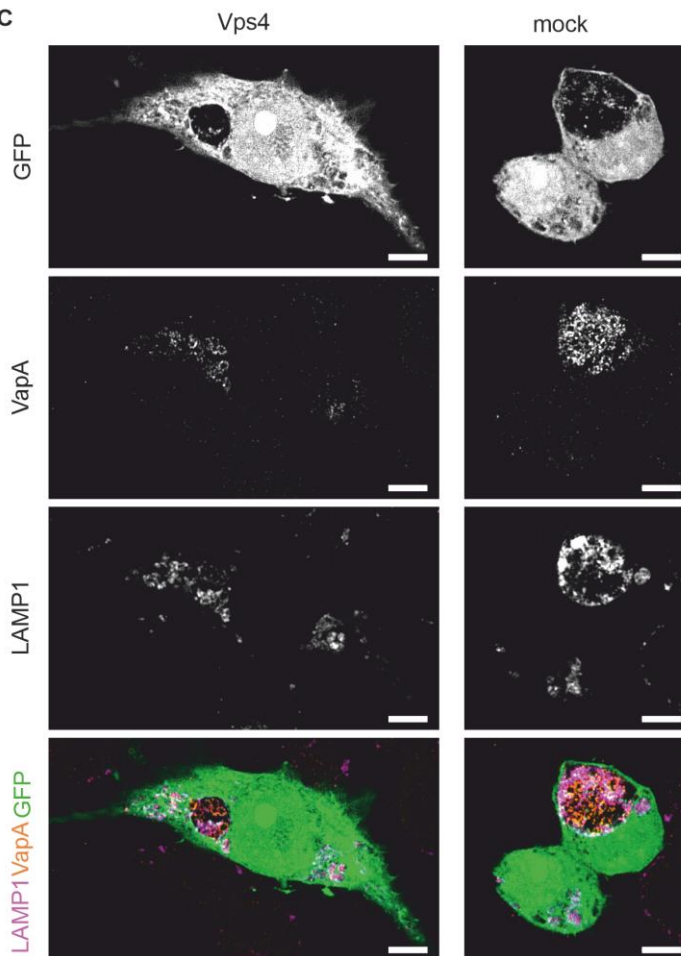
A



B



C



D

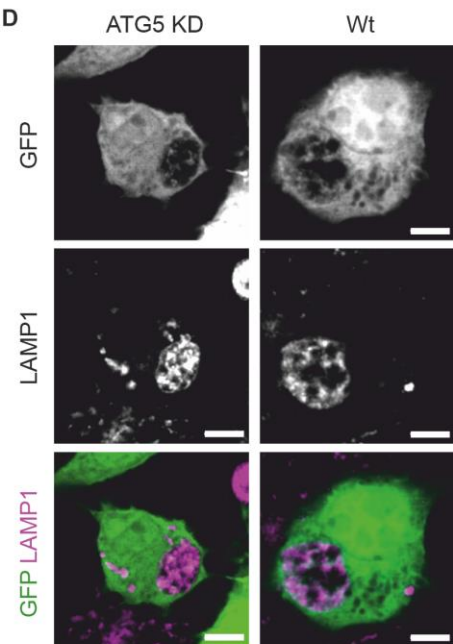


Abbildung 19: Zytosolisches EGFP wird Vps4-abhängig und ATG5-unabhängig in die RCV aufgenommen. (A) Arbeitshypothese zur Entstehung der IVVs. An späten Endosomen werden ESCRT-abhängig MVBs gebildet. Durch Fusion von MVBs können RCVs/ILVs erhalten. ILVs enthalten u.a. Zytosol und tragen das spätendosomale Phospholipid LBPA auf ihrer Membran. Durch Lysophagie werden beschädigte Lysosomen ATG5-abhängig von einem Phagophor umschlossen, an das LC3 (Markerprotein für Autophagosomen) akquiriert wird. Durch Fusion mit Autophagosomen könnten beschädigte, LAMP1-positive Lysosomen in die RCV gelangen. Ein dritter, bisher unbekannter Prozess (gekennzeichnet mit „?“) könnte LAMP1-positive Vesikel an der RCV Membran abgeschnüren. (B) Repräsentative Aufnahmen der Immunfluoreszenz von LBPA und LAMP1 in von *R. equi* 103+ infizierten RAW264.7 Makrophagen 24 h p.i.. (C) Repräsentative Aufnahmen der Immunfluoreszenz von LAMP1 und VapA in von *R. equi* 103+ infizierten RAW264.7 Makrophagen 24 h p.i. transfiziert mit Vps4 siRNA und pEGFP. (D) Repräsentative Aufnahmen der Immunfluoreszenz von LAMP1 in von *R. equi* 103+ infizierten wildtypischen (Wt) oder ATG5-*Knockdown* RAW264.7 Makrophagen transfiziert mit pEGFP 24 h p.i.. Dargestellt sind jeweils repräsentative Aufnahmen aus zwei unabhängigen Experimenten. Maßbalken: 5 µm.

Um nun zu untersuchen, ob IVVs tatsächlich Zytosol enthalten und ob Vps4 als zentrales Protein der ESCRT-Maschinerie die Bildung von Zytosol-enthaltenden Vesikeln beeinflusst, wurde EGFP in *R. equi* 103+ infizierten Vps4 *Knockdown* Makrophagen überexprimiert. Zusätzlich wurde LAMP1 als lysosomaler Marker und VapA zur Identifizierung von RCVs immunfluoreszenzgefärbt (Abbildung 19C). Ein Vps4 *Knockdown* führte erwartungsgemäß zu weniger Bakterien in den RCVs (zirkuläre VapA-Strukturen in der RCV). Außerdem führte der *Knockdown* zu weniger LAMP1 und EGFP im Lumen der RCVs. Die wenigen EGFP-Puncta kolokalisierten hauptsächlich mit LAMP1. Zudem lokalisierte VapA in anderen LAMP1-positiven Kompartimenten außerhalb der RCVs. Die Pathogen-enthaltenden Vakuolen der Kontrolle waren fast vollständig VapA-positiv. Darüber hinaus war fast das gesamte LAMP1 der Makrophagen in und auf den RCVs lokalisiert. Die EGFP-Puncta im RCV-Lumen kolokalisierten überwiegend mit LAMP1. Somit wurde gezeigt, dass Vps4 die Bildung von Zytosol-enthaltenden IVVs begünstigt.

Woher stammt nun das LAMP1 in der RCV? Eine Möglichkeit wäre, dass beschädigte Lysosomen durch ATG5-abhängig Lysophagie (Maejima et al., 2013), in die RCV transportiert werden. Die sich bildenden Phagophore würden auch Zytosol einschließen (Abbildung 19A). Daher könnten große IVVs (≥ 200 nm), die Zytosol enthaltend, beschädigten Lysosomen entsprechen, die über Lysophagie zur RCV gelangten. Um diese Hypothese zu testen, wurden ATG5-*Knockdown* RAW264.7 Makrophagen mit pEGFP (hier wieder Marker für Zytosol) transfiziert und mit *R. equi* 103+ infiziert. Zudem wurde die Lokalisierung von LAMP1 mittels Immunfluoreszenz untersucht (Abbildung 19D). In beiden untersuchten Makrophagenzelllinien (ATG5 *Knockdown* und wildtypische RAW264.7 Makrophagen) lokalisierten LAMP1 und EGFP überwiegend im Lumen der RCVs und beide enthielten gleich viel LAMP1. Zudem kolokalisierte EGFP fast vollständig mit LAMP1. Dadurch wurde gezeigt, dass LAMP1 unabhängig von ATG5 in das Lumen der RCVs gelangt.

Zusammenfassend zeigte die Versuchsreihe, dass IVVs durch die Fusion mit MVBs in RCVs gelangen. Die IVVs enthalten teilweise Zytosol, das ESCRT-abhängig aber ATG5-unabhängig in die Vesikel eingeschlossen wird. Außerdem werden LAMP1-positive Vesikel ATG5-unabhängig gebildet.

3.5. IVVs werden teilweise an der RCV-Membran gebildet

Dass trotz ATG5 *Knockdown* LAMP1-positive IVVs mit zytosolischem Inhalte in RCVs akkumulierten, ließ vermuten, dass diese Vesikel direkt an der RCV-Membran gebildet werden könnten (Abbildung 19A). Um dies genauer zu untersuchen, wurden stabile LAMP1-GFP RAW264.7 Makrophagen in einem Lebend-Zell-Mikroskopie-Experiment mit fluoreszenten *R. equi* 103+ (*R. equi* 103+ pCharge-Turbo637) infiziert. Die Infektion wurde 8 h p.i. untersucht, da zu diesem Zeitpunkt die RCV bereits etabliert (von Bargen et al., 2009), aber vermutlich noch nicht vollständig mit IVVs gefüllt ist. Die Lebend-Zell-Mikroskopie zeigte, dass sich bereits LAMP1-positive Vesikel im Lumen der RCV befanden, die sich zudem hochdynamisch bewegten. Die Bewegung der LAMP1-positiven IVVs war sehr schnell und gerichtet. Auch die Anreicherung und Abreicherung von LAMP1 an verschiedenen Stellen der limitierenden RCV-Membran war hochdynamisch. Trotz dieser schnellen und hochdynamischen Prozesse ließ sich die Bildung eines LAMP1-positiven Vesikels an der RCV-Membran deutlich erkennen, das sich in das Lumen der RCV ablöste (Abbildung 20A, weißer Pfeilkopf). Um die Ursache dieser gerichteten Bewegung genauer zu untersuchen, wurde das Mikrotubulussystem zum Zeitpunkt 8 h p.i. mittels Immunfluoreszenzfärbung visualisiert (Abbildung 20B). Es zeigte sich, dass die Mikrotubuli punktuell mit der RCV-Membran kolokalisierten (blaue Pfeilspitze), ohne in das Innere der RCV vorzudringen. In Übereinstimmung mit der Lebend-Zell-Mikroskopie, war zu diesem Zeitpunkt die RCV bereits vergrößert und LAMP1 lokalisierte hauptsächlich auf der limitierenden RCV-Membran, aber auch im Lumen der RCV.

Weitere Beispiele für die Abschnürung von Vesikel direkt an der RCV-Membran fanden sich in den zuvor verwendeten TEM-Aufnahmen aus Abbildung 18 (Abbildung 20C, D und E). Bei einem *Alix Knockdown* 24 h nach Infektionsbeginn war ein fast vollständig abgeschnürtes Vesikel zu erkennen mit einem Durchmesser von ≥ 200 nm zu erkennen (Abbildung 20C). In *Scrambled* siRNA-transfizierten Makrophagen waren nebeneinander zwei Membranausstülpungen zu erkennen, die möglicherweise Zytosol enthielten (Abbildung 20D). Interessanterweise konnte auch eine fingerförmige Ausstülpung beobachtet werden (Abbildung 20E).

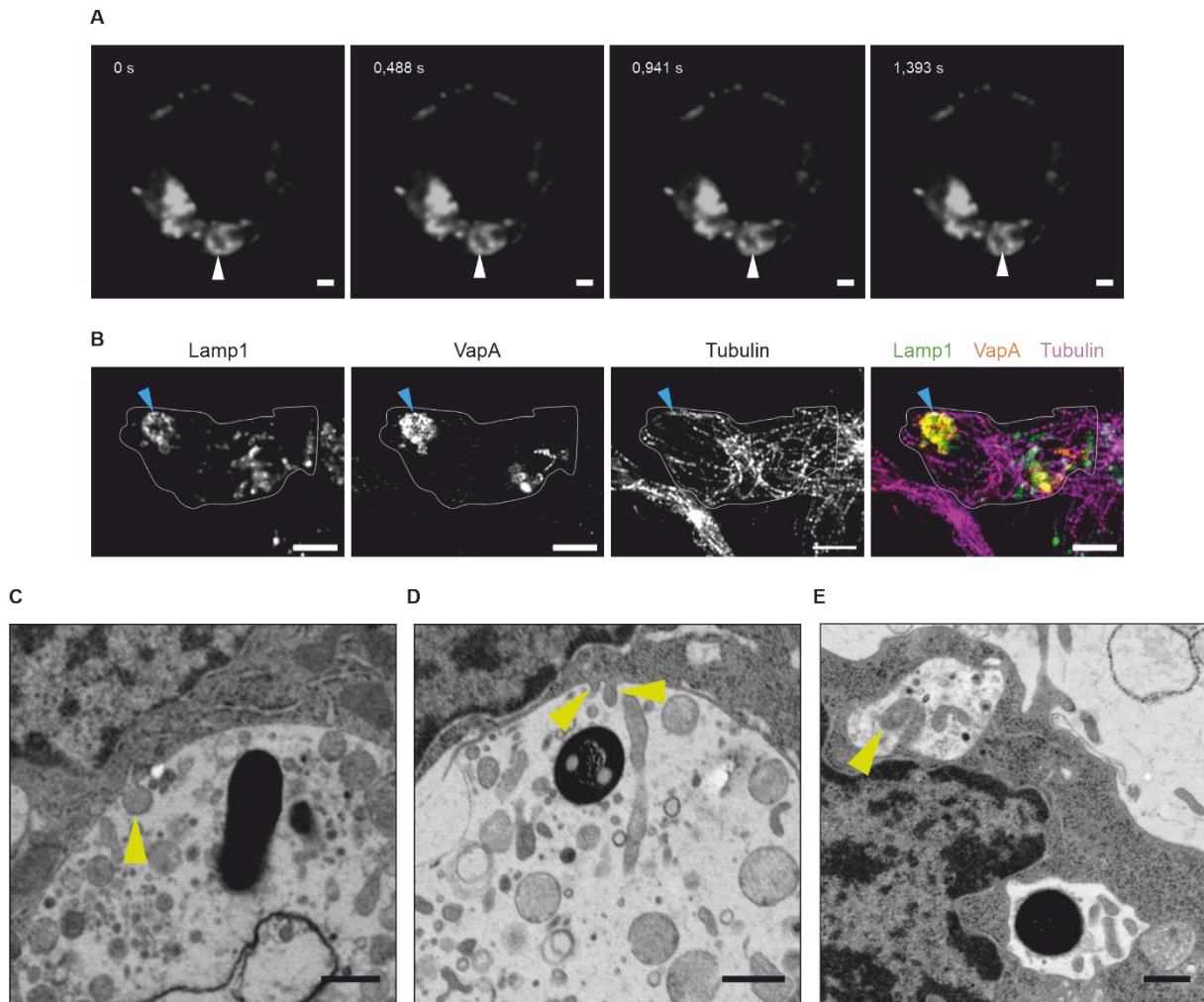


Abbildung 20: IVVs werden zum Teil direkt an der RCV-Membran gebildet. (A) Lebend-Zell-Mikroskopie von *R. equi* 103+ (pCharge-Trubo635)-infizierten RAW264.7 GFP-LAMP1 Makrophagen 8 h p.i.. Dargestellt ist das LAMP1-Signal. Zwischen den einzelnen Aufnahmen lagen 453 bis 488 ms. Maßbalken: 1 μ m. **(B)** Repräsentative Aufnahmen der Immunfluoreszenz von γ -Tubulin und VapA in mit *R. equi* 103+ infizierten RAW264.7 GFP-LAMP1 Makrophagen 8 h p.i.. Maßbalken: 5 μ m. **(C)** Aufnahme wie in Abbildung 18 aus von mit Alix siRNA transfizierten und mit *R. equi* 103+ infizierten RAW264.7 Makrophagen. **(D)** Aufnahme wie in Abbildung 18 von mit Scrambled-siRNA transfizierten und mit *R. equi* 103+ infizierten RAW264.7 Makrophagen. **(E)** Aufnahme wie in Abbildung 18 aus mit Scrambled-siRNA transfizierten und mit *R. equi* infizierten RAW264.7 Makrophagen. In (C, D und E) zeigen die gelben Pfeilspitzen wahrscheinlich auf sich bildende Vesikel. Maßbalken: 0,5 μ m.

3.6. Die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* ist IVV- und cholesterolabhängig

Durch die vorherigen Ergebnisse von mit *R. equi* infizierten *Vps4 Knockdown* Makrophagen wurde ein Vermehrungsdefekt mit der reduzierten Anzahl an IVVs verknüpft. Diese Korrelation ließ darauf schließen, dass die IVVs die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* beeinflussen. Um diese Hypothese zu untersuchen, musste die Bildung interner Vesikel vollständig verhindert werden. Durch die Inhibierung von NPC1 verändert U18666A das Cholesterol-Trafficking der Säugerzelle (Koh & Cheung, 2006), wodurch keine ILVs mehr an den späten

Endosomen gebildet werden und somit auch keine MVBs entstehen können (Elgner et al., 2016).

Um zu untersuchen, ob U18666A auch die Bildung von IVVs inhibiert, wurden entweder unbehandelte oder mit rVapA und U18666A behandelte Makrophagen, die zusätzlich mit virulenten oder avirulenten *R. equi* infiziert wurden, mittels TEM untersucht (Abbildung 21, Anhang 8). Die Behandlung mit U18666A führte zu einer Vergrößerung einiger Organellen (vermutlich Endosomen oder Lysosomen, eine Unterscheidung ist hier nicht möglich), die zudem frei von Vesikeln waren (Abbildung 21A; gelbe Pfeilspitze und B blaue Pfeilspitze). In den Vakuolen waren ebenfalls membranöse Strukturen vorhanden (Abbildung 21B magentafarbene Pfeilspitze). Die gleichzeitige Behandlung der Makrophagen mit rVapA und U18666A führte zu einem ausgeprägten Phänotyp. Die VCVs schwollen stark an (blaue Pfeilspitze) und enthielten kaum Vesikel, aber membranöse Strukturen in der Vakuole (magentafarbene Pfeilspitze) (Abbildung 21C). In *R. equi* 103+ und 103- infizierten und mit rVapA behandelten Makrophagen führte die U18666A-Behandlung ebenfalls zur Bildung von stark geschwollenen RCVs, die membranöse Strukturen (magentafarbene Pfeilspitze), aber kaum IVVs in ihrem Lumen aufwiesen (Abbildung 21D und E). Auffallend war, dass 103+ wahrscheinlich in RCVs replizierte (viele Bakterien pro Querschnitt), während 103- sich wahrscheinlich nicht in RCVs vermehrt (nur ein oder zwei Bakterien pro Querschnitt) (Abbildung 21D und E). Darüber hinaus enthielten virulente *R. equi* einige Lipidkörperchen, während avirulente Bakterien keine oder nur wenige dieser Strukturen aufwiesen.

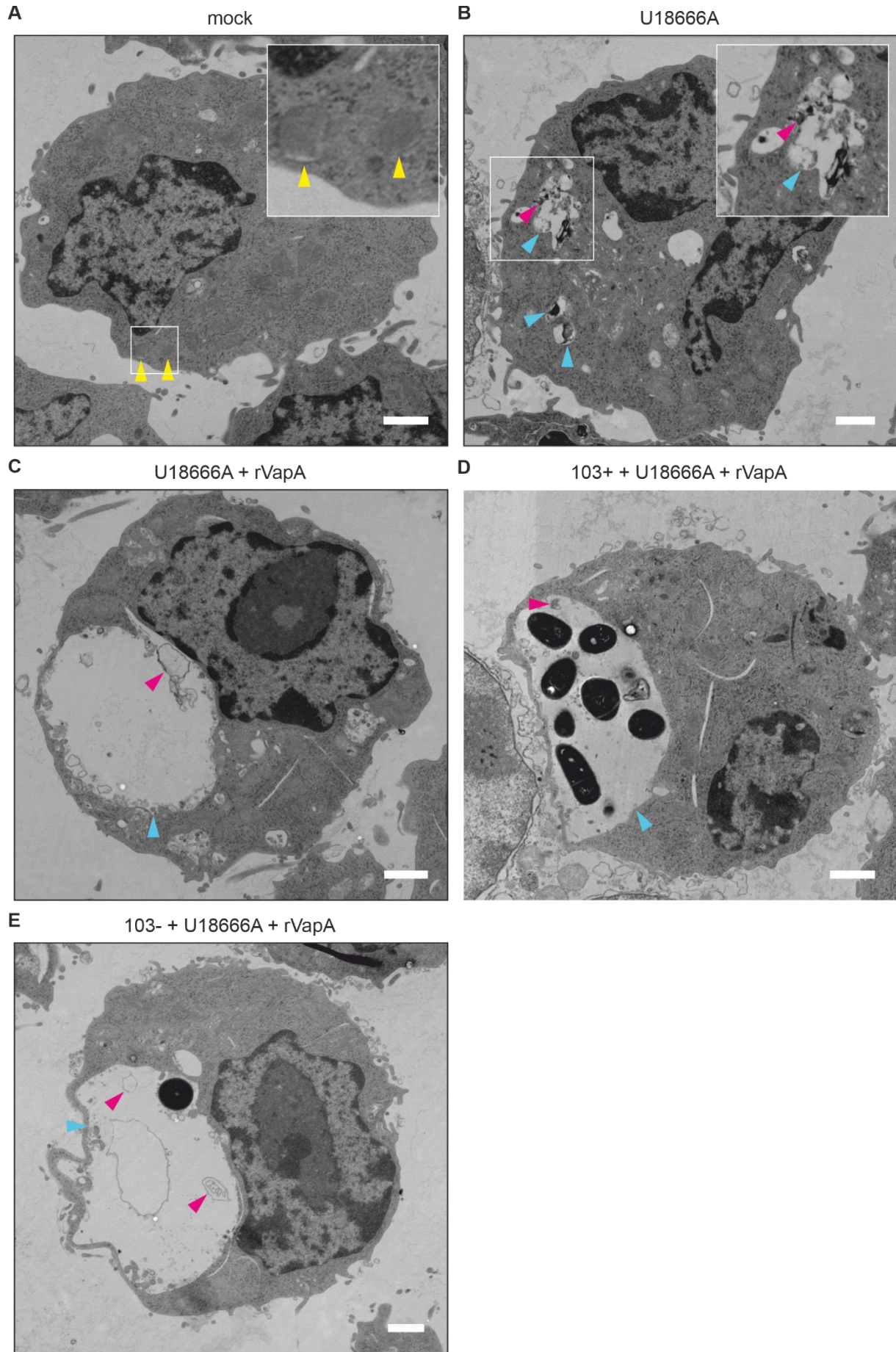


Abbildung 21: Behandlung mit U18666A führt in VCVs und RCVs zu verringerter IVV-Zahl.

Repräsentative TEM-Aufnahmen aus RAW264.7 Makrophagen, die für 22 h mit (A) DMSO oder (B) 2 µg/ml U18666A oder (C) 2 µg/ml U18666A und 10 µg/ml rVapA behandelt wurden. In (D) und (E) wurden die Makrophagen mit *R. equi* 103+ bzw. 103- in Anwesenheit von 10 µg/ml rVapA infiziert. Gelbe Pfeilspitzen zeigen auf Lysosomen, blaue Pfeilspitzen auf U18666A-induzierte Vakuolen und magentafarbene Pfeilspitzen auf membranöse Strukturen. Maßbalken: 1 µm.

Um diesen möglichen Vermehrungsdefekt von *R. equi* 103- im Vergleich zu 103+ zu untersuchen, wurde ein Vermehrungsexperiment in RAW264.7 Makrophagen durchgeführt (Abbildung 22B). Dabei wurde die robuste Vermehrung der intrazellulären Bakterien mikroskopisch bestimmt. Virulente *R. equi* vermehrten sich stark und mit rVapA etwas besser als ohne rVapA. Hingegen führte eine U18666A-Behandlung der Makrophagen dazu, dass sich *R. equi* 103+ nur halb so stark vermehrte. *R. equi* 103- vermehrte sich intrazellulär nur mit rVapA. Im Vergleich zu *R. equi* 103+ vermehrte sich *R. equi* 103- mit rVapA nur halb so stark. In Makrophagen, die gleichzeitig mit rVapA und U18666A behandelt wurden, vermehrten sich avirulente *R. equi* nicht. Wie schon in den TEM-Aufnahmen beobachtet, führte die gleichzeitige Behandlung mit rVapA und U18666A zur Bildung von stark vergrößerten RCVs, die noch größer waren als VCVs (Abbildung 22C). Im Gegensatz zu den mit rVapA behandelten Makrophagen lokalisierte LAMP1 durch die kombinierte Behandlung (rVapA und U18666A) fast vollständig auf der limitierenden RCV-Membran (Abbildung 22C).

Dass sich *R. equi* 103- in rVapA- und U18666A-behandelten Makrophagen nicht vermehrte, war zunächst überraschend, da (1) U18666A das Wachstum von *R. equi* 103- in BHI- und MS/Ac Medium nicht beeinflusste (Abbildung 22F) und (2) RCVs in rVapA- und U18666A-behandelten Makrophagen nicht häufiger LT-positiv waren, als in Makrophagen, die nur mit rVapA behandelt wurden (Abbildung 22G). Somit befand sich *R. equi* 103- in einer potentiellen Replikationsnische.

Ergebnisse

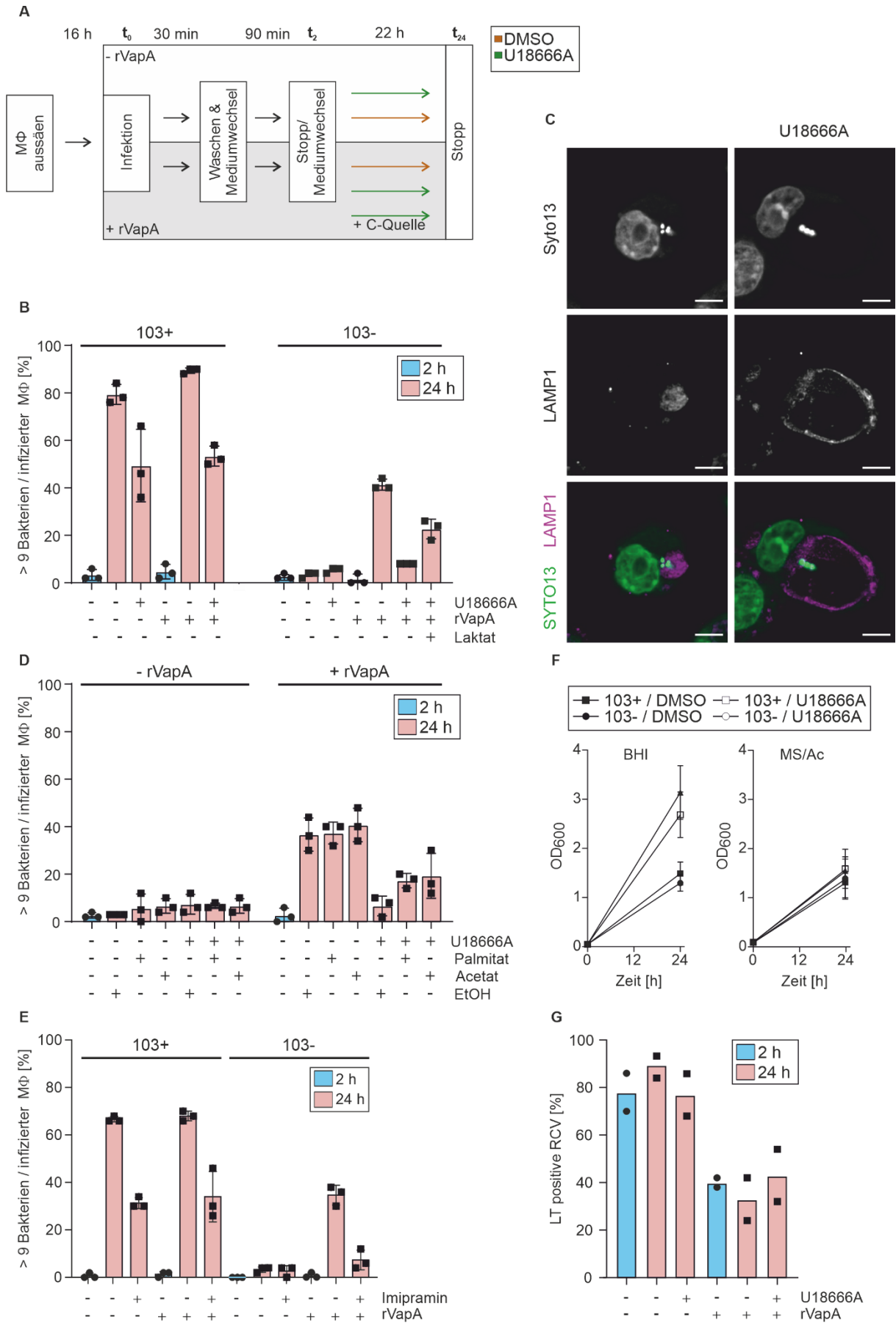


Abbildung 22: U18666A induziert einen Vermehrungsdefekt von *R. equi* in Makrophagen, der durch zusätzliche Kohlenstoffquellen verringert wird. (A) Schematische Darstellung des Infektionsexperiments. **(B)** Robuste Vermehrung von *R. equi* 103+ und 103- in RAW264.7 Makrophagen. Die Makrophagen wurden, wo angegeben, mit rVapA oder U18666A analog zu (A) behandelt. **(C)** Repräsentative Aufnahmen der LAMP1 Immunfluoreszenz von *R. equi* 103- infizierten und rVapA-behandelten RAW264.7 Makrophagen 24 h p.i., aus (B). Maßbalken: 5 µm **(D)** Robuste Vermehrung von *R. equi* 103- in RAW264.7 Makrophagen, die wie angegeben behandelt wurden. **(E)** Versuchsdurchführung wie in (B), jedoch mit 50 µM Imipramin anstelle von U18666A. **(F)** Wachstumsendpunktmessungen von *R. equi* 103+ und 103- in BHI-Medium, das, wo angegeben, U18666A enthielt. **(G)** LysoTracker (LT) Färbung der RCVs von *R. equi* 103- infizierten RAW264.7 Makrophagen zu den angegebenen Zeitpunkten. Behandlungen der Makrophagen wie angegeben. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von (G) zwei bzw. (B, D, E, F) Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. C-Quelle, zusätzliche Kohlenstoffquelle.

Um die intrazelluläre Vermehrung der avirulenten Bakterien zu unterstützen, sollten den Bakterien zusätzliche Kohlenstoffquellen zur Verfügung gestellt werden, die von *R. equi* bevorzugt verstoffwechselt werden. Dazu sollte das Kulturmedium der Makrophagen mit Laktat, Palmitat oder Acetat versetzt werden, die dadurch endozytiert und in die RCVs transportiert würden. Zuvor musste jedoch untersucht werden, ob die phagozytierte Fracht auch in einem fortgeschrittenen Stadium der *R. equi* Infektion in die RCVs gelangt. Dazu wurden 21 h nach Infektionsbeginn *R. equi* 103+ infizierte RAW264.7 Makrophagen mittels Pulse/Chase (1 h/2 h) mit verschiedenen Fluoreszenzmarkern markiert und deren Lokalisation 24 h p.i. bestimmt. Verwendet wurden Rhodamin-markiertes BSA, der Membranfarbstoff FM4-64 oder fluoreszenzmarkiertes Palmitat (Bodipy® Palmitat) (Abbildung 23). BSA-Rhodamin lokalisierte in unbehandelten Makrophagen in RCVs (Abbildung 23A), lokalisierte aber auch in U18666A- und rVapA-behandelten Makrophagen in RCVs (Daten nicht gezeigt). Für FM4-64 wurde erwartet, dass der Farbstoff hauptsächlich in der limitierenden RCV-Membran lokalisiert wird, was jedoch nicht der Fall war, da der Farbstoff fast ausschließlich in der RCV lokalisierte (Abbildung 23B). Auch das fluoreszenzmarkierte Palmitat lokalisierte in der RCV (Abbildung 23C). Erstaunlicherweise kolokalisierte Palmitat auch punktuell mit den Bakterien, was darauf hindeutete, dass *R. equi* fluoreszenzmarkiertes Palmitat intrazellulär metabolisiert. Somit wurde gezeigt, dass die Endozytose/Phagozytose auch noch in einem fortgeschrittenen Stadium der *R. equi* Infektion stattfindet.

Um nun die Vermehrung von *R. equi* 103- in mit U18666A- und rVapA-behandelten Makrophagen zu unterstützen, wurde dem Kulturmedium Laktat zugesetzt. Dadurch vermehrten sich intrazelluläre *R. equi* 103- geringfügig, etwa halb so stark wie 103-, die nur mit rVapA behandelt wurden (Abbildung 22B). Acetat oder Palimitat im Kulturmedium der Makrophagen förderte ebenfalls die intrazelluläre Vermehrung von avirulenten *R. equi* in rVapA- und U18666A-behandelten Makrophagen (Abbildung 22D). Interessanterweise hatten die zusätzlichen Kohlenstoffquellen keinen Einfluss auf die Vermehrung in Makrophagen, die

nur mit rVapA behandelt wurden. Unabhängig von Acetat oder Palmitat vermehrte sich *R. equi* 103- in Abwesenheit von rVapA nicht.

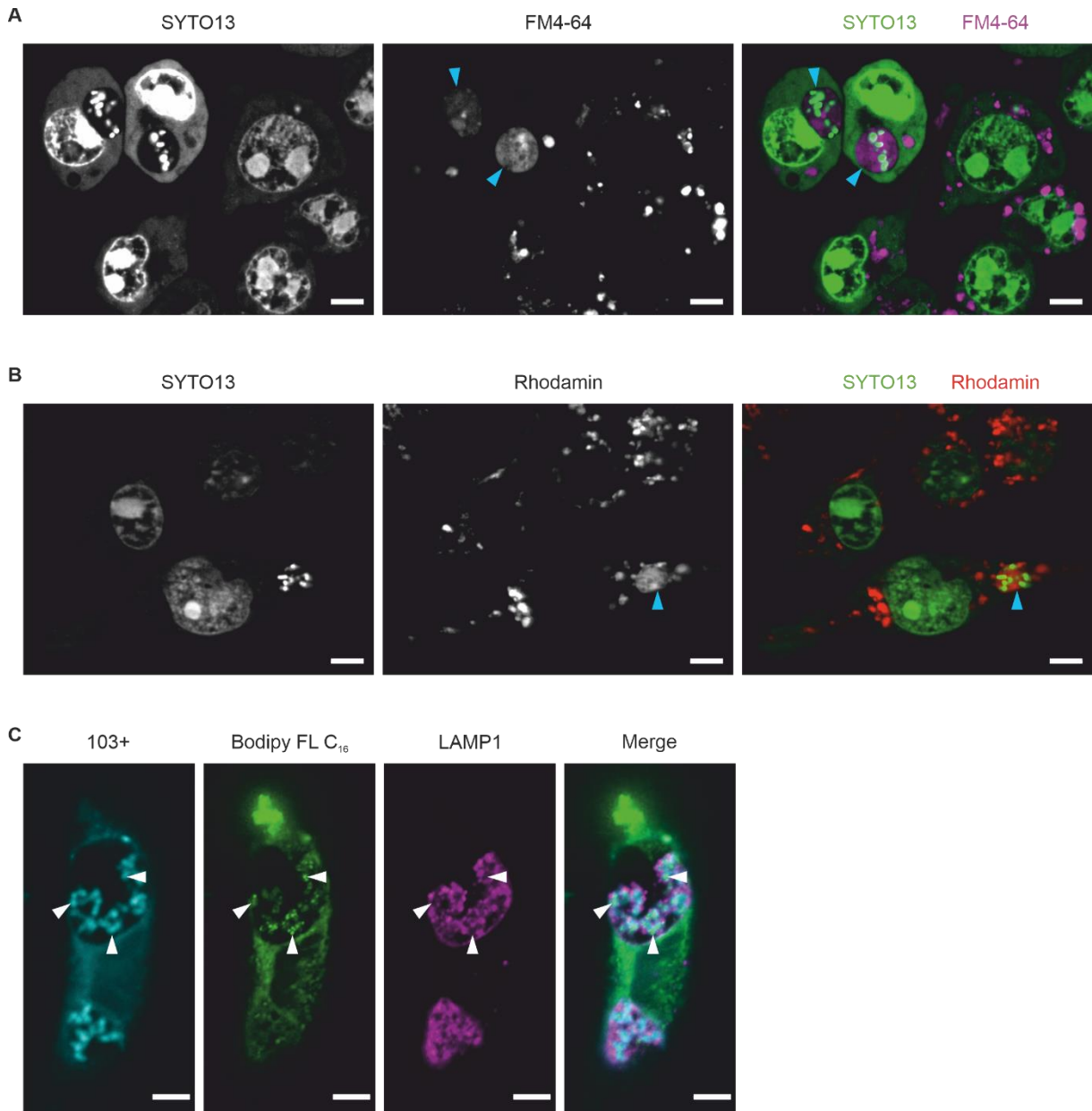


Abbildung 23. BSA-Rhodamin, FM4-64 und Bodipy® Palmitat werden von *R. equi* infizierten Makrophagen aufgenommen und lokalisieren in RCVs. RAW264.7 Makrophagen wurden mit *R. equi* 103+ infiziert und 21 h p.i. mittels *Pulse/Chase* (1 h / 2 h) mit (A) 300 µg/ml BSA-Rhodamin, (B) 4 µM FM4-64 und (C) 100 µM Bodipy® Palmitat (Bodipy FL C₁₆) beladen. (C) wurde mit LAMP1 immunfluoreszenzgefärbt. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen 24 h p.i.. aus jeweils zwei unabhängigen Experimenten. Maßbalken: 5 µm.

U18666A führte somit zu einer Verringerung der Vesikel in den RCVs/VCVs und reduzierte zudem die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi*. Da U18666A durch die Inhibierung von NPC1 das Cholesterin-Trafficking der Zelle stört, wurde das intrazelluläre Vermehrungsverhalten von *R. equi* anschließend mit Imipramin überprüft (Abbildung 22E), einer pharmakologischen Substanz, die ebenfalls zur Akkumulation von unverestertem

Cholesterol und Glykosphingolipiden in Lysosomen führt (Rodriguez-Lafrasse et al., 1990). Imipramin ist ein hydrophobes Amin, das sich daher strukturell grundlegend vom Sterol U18666A unterscheidet, aber ebenfalls einen NPC-Phänotyp hervorruft (Rodriguez-Lafrasse et al., 1990). In Imipramin-behandelten RAW264.7 Makrophagen vermehrte sich *R. equi* gleich stark wie in U18666A-behandelten Makrophagen: Durch Imipramin halbierte sich die intrazelluläre Vermehrung von virulenten *R. equi* (rVapA-unabhängig) und avirulente *R. equi* vermehrten sich selbst in rVapA-behandelten Makrophagen nicht.

Zusammenfassend zeigt sich, dass U18666A zur Bildung von stark vergrößerten VCVs und RCVs in Makrophagen führt, deren Lumen zudem nahezu Vesikel-frei bzw. LAMP1-negativ sind. Außerdem führt eine U18666A-Behandlung der Makrophagen zur stark verringerten Vermehrung von *R. equi* 103+ bzw. zu einem Vermehrungsdefekt von 103-. Der Vermehrungsdefekt kann durch eine zusätzliche Kohlenstoffquelle (Acetat, Laktat oder Palmitat) im Kulturmedium der Makrophagen abgeschwächt oder nahezu aufgehoben werden.

3.6.1. In U18666A-behandelten Makrophagen verringern virulente *R. equi* stark die Cholesterolkonzentration in RCVs

U18666A und Imipramin führen zu einer Akkumulierung von unverestertem Cholesterol in Lysosomen (Elgner et al., 2016; Howe & Heinzen, 2006) und damit vermutlich auch in RCVs. Für das Pathogen *C. burnetii* ist ein verringertes intrazelluläres Wachstum bzw. ein toxischer Effekt durch eine hohe Cholesterolkonzentration in der *Coxiella*-enthaltenden Vakuole (CCVs) beschrieben (Howe & Heinzen, 2006). Im Folgenden wurde daher untersucht, ob in den RCVs von U18666A-behandelten Makrophagen tatsächlich die fehlenden IVVs oder aber das sich darin ansammelnde Cholesterol für die verminderte Vermehrung von *R. equi* verantwortlich ist.

Dazu wurde in *R. equi* 103+ infizierten RAW264.7 Makrophagen freies Cholesterol mittels Filipin-III -Färbung visualisiert. Zur Identifizierung von VCVs bzw. RCVs wurde zusätzlich VapA über Antikörper fluoreszenzmarkiert (Abbildung 24). Unbehandelte Makrophagen einthielten wenige kleine Filipin-positive Kompartimente. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung der Makrophagen mit U18666A zur Bildung vergrößerter und cholesterolgefüllter Vakuolen. In *R. equi* 103+ infizierten Makrophagen akkumulierte freies Cholesterol in RCVs, während RCVs in U18666A-behandelten Makrophagen Filipin-negativ waren.

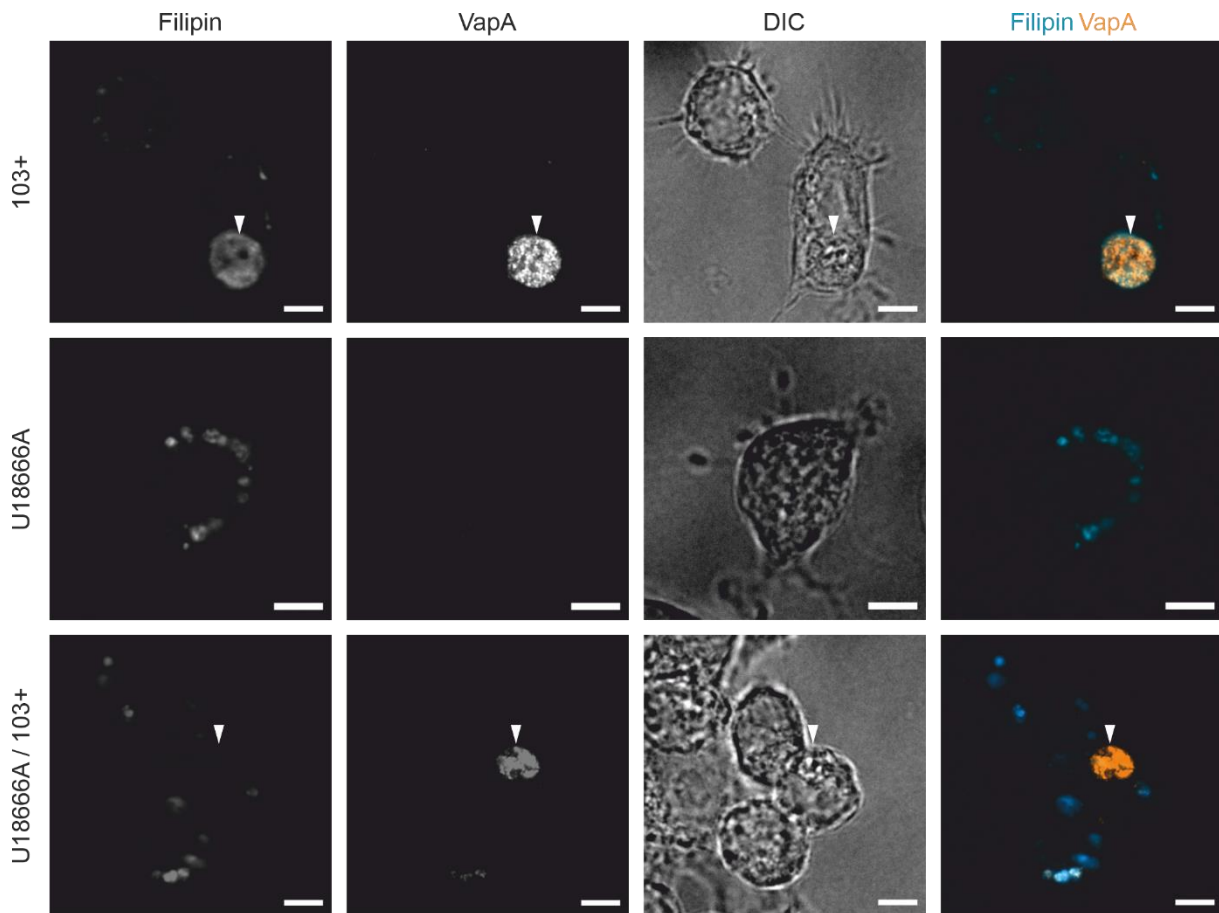


Abbildung 24: In RCVs von unbehandelten Makrophagen steigt die Konzentration an freiem Cholesterol an und wird bei U18666A-Behandlung reduziert. Immunfluoreszenzmarkierung von VapA und Filipin III-Färbung von RAW264.7 Makrophagen, die, wo angegeben, mit U18666A behandelt oder mit *R. equi* 103+ infiziert wurden. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen 24 h p.i. aus zwei unabhängigen Experimenten. Weiße Pfeilköpfe zeigen auf RCVs. Maßbalken: 5 μ m.

3.6.2. Cross-Talk zwischen Virulenzplasmid und Chromosom ist entscheidend für intrazellulären Cholesterolmetabolismus

Basierend auf den unterschiedlichen Konzentrationen an freiem Cholesterol in RCVs (hohe Konzentration ohne U18666A, niedrige Konzentration bei U18666A-Behandlung), war es interessant zu erfahren, ob und wie die Cholesterolkonzentration in RCVs und das intrazelluläre Vermehrungsverhalten von *R. equi* zusammenhängen. Ein möglicher Einflussfaktor könnte das Virulenzplasmid sein, genauer die *open reading frames orf4 (virR)* und *orf8 (virS)*, die zusammen mit *vapA* für die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* essentiell sind (Coulson et al., 2015). Um die Abhängigkeit der Vermehrung von *R. equi* in U18666A-behandelten Makrophagen von VirR und VirS zu untersuchen, wurden RAW264.7 Makrophagen mit *R. equi* 103+ $\Delta vapA$ pSMT3, 103- pSMT3 und 103- pSMT3-*orf4-orf8* (trägt die Gene *virR* und *virS* auf pSMT3; siehe 2.2.4.4.) für die Infektion von RAW264.7 Makrophagen verwendet. Die Makrophagen wurden zusätzlich mit rVapA oder mit einer

Kombination aus rVapA und U18666A behandelt und die robuste Vermehrung der Bakterien bestimmt (Abbildung 25). Wie bereits zuvor beobachtet, vermehrte sich keiner der drei Bakterienstämme intrazellulär ohne rVapA. Nach Zugabe von rVapA vermehrten sich alle drei Bakterienstämme, die beiden 103- Stämme jedoch schlechter als 103+ $\Delta vapA$. Die zusätzliche Behandlung mit U18666A reduzierte sich die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* 103+ $\Delta vapA$ auf die Hälfte, während sich die 103- Stämme nicht vermehrten. Interessanterweise halbierte sich die Vermehrung in rVapA- und U18666A-behandelten Makrophagen sowohl bei *R. equi* 103- *orf4-8* als auch bei VapA-deletiertem 103+.

Diese Daten zeigen, dass sich *R. equi* in rVapA- und U18666A-behandelten Makrophagen, d.h. in IVV-armen RCVs mit hoher Cholesterolkonzentration, nur vermehren können, wenn sie zusätzlich VirR und VirS exprimieren.

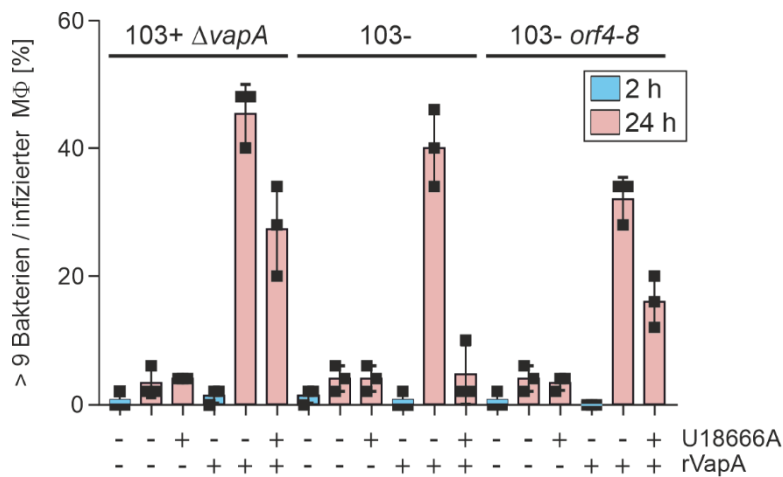


Abbildung 25: Die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* ist bei Zugabe von U18666 abhängig von VirR und VirS. Robuste Vermehrung von den angegebenen Bakterienstämmen in RAW264.7 Makrophagen zu den angegebenen Zeitpunkten. Die Makrophagen wurden, wie angegeben, behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Neben *virR* und *virS* wurden bereits weitere chromosomale Gene beschrieben, die das Wachstum von *R. equi* in cholesterolreichem Medium beeinflussen: *choE*, kodiert für die Cholesteroxidase E (Navas et al., 2001) und *supAB*, die zum katabolischen Cholesterol-Gen-Cluster gehören (van der Geize et al., 2008).

Bevor untersucht werden konnte, wie sich *choE* bzw. *supAB* deletierte *R. equi* in U18666A-behandelten Makrophagen verhalten, musste zunächst das Wachstumsverhalten der Bakterien in Medium mit Cholesterol als einziger Kohlenstoffquelle untersucht werden. Dazu wurden Wachstumskurven von *R. equi* 103+, 103+ $\Delta choE$, 103-, RE1 und RE1 $\Delta supAB$ nach van der Geize (2008) erstellt. Die Bakterien wurden in cholesterolreichem MS Medium bei 37 °C (entspricht der Temperatur der Infektionsexperimente) für 72 h inkubiert (Abbildung 26A). Ein Unterschied im Wachstum zwischen den untersuchten Bakterienstämmen war erst nach 72 h

Inkubation erkennbar. *R. equi* 103+, 103+ $\Delta choE$ und RE1 vermehrten sich, während 103- und RE1 $\Delta supAB$ im cholesterolreichem Medium nicht wuchsen.

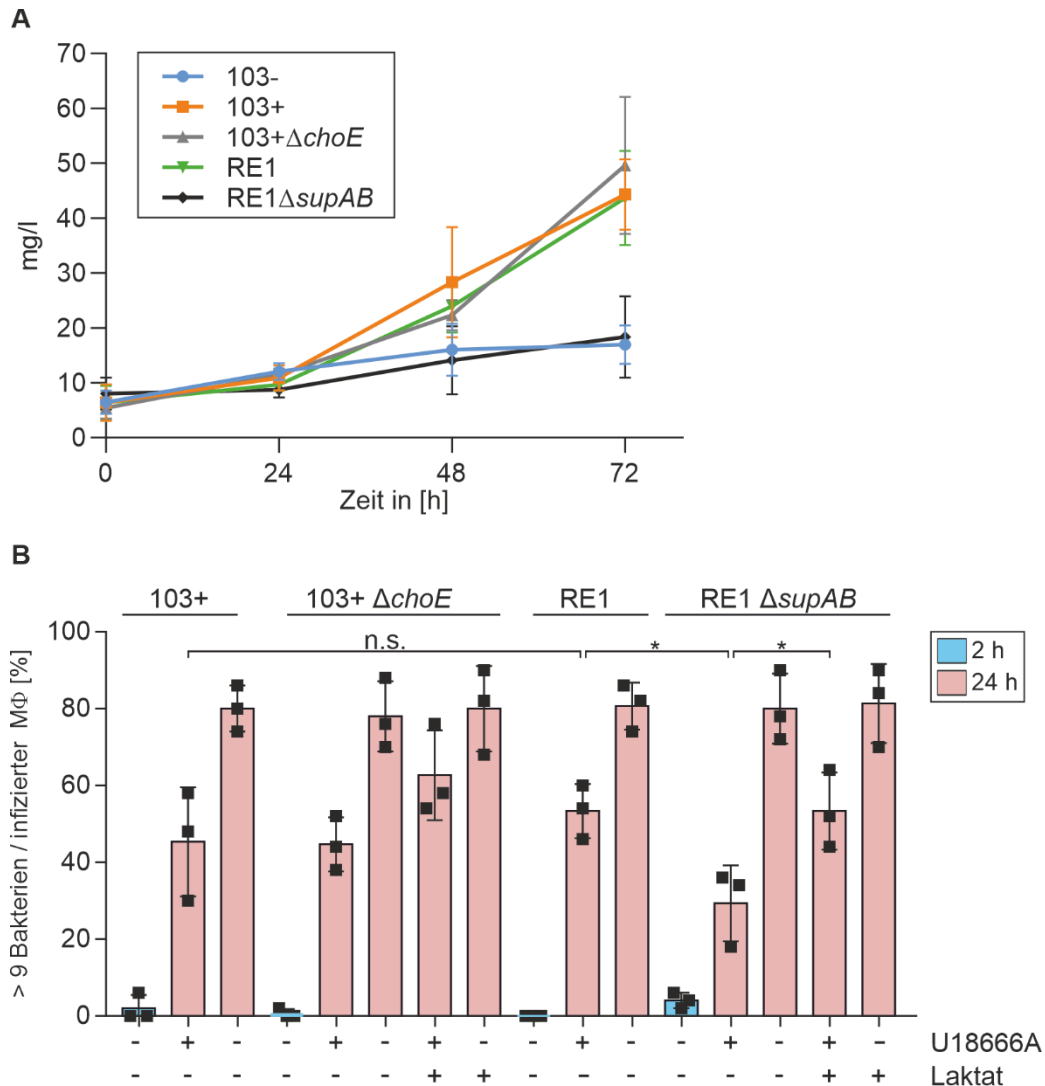


Abbildung 26: *R. equi* vermehrt sich durch Cholesterin in der RCV, wenn keine IVVs vorhanden sind. (A) Wachstumskinetik der angegebenen *R. equi* Stämme in Medium mit Cholesterin als einziger Kohlenstoffquelle nach van der Geize (2008), bei 37 °C. **(B)** Robuste Vermehrung der angegebenen Bakterienstämme in RAW264.7 Makrophagen zu den angegebenen Zeitpunkten. Die Makrophagen wurden, wie angegeben, behandelt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. *, p-Wert < 0,05, n.s., nicht signifikant. Die Unterabbildung (B) wurde in Zusammenarbeit mit Tobias Dummin (AG Haas, Universität Bonn) angefertigt.

Die Tatsache, dass sowohl *R. equi* 103- als auch RE1 $\Delta supAB$ nicht in cholesterolreichem Medium wuchsen, 103+ und RE1 dagegen jedoch sehr wohl, ließ vermuten, dass die intrazelluläre Vermehrung potentiell mit der Fähigkeit Cholesterin in der RCV zu verwerten zusammenhängt. Sowohl ein *Knockdown* von *Vps4* als auch die Behandlung der Makrophagen mit U18666A führte zur Reduzierung der IVVs in RCVs. Unter beiden Bedingungen vermehrten sich jedoch virulente *R. equi*, vermutlich aufgrund ihrer Fähigkeit Cholesterin zu metabolisieren. Um diese Hypothese zu testen, wurde in Zusammenarbeit mit

Tobias Dummin (AG Haas, Universität Bonn) die Vermehrung von *R. equi* 103+ $\Delta choE$ bzw. RE1 $\Delta supAB$ in U18666A-behandelten RAW264.7 Makrophagen untersucht (Abbildung 26B). Es zeigte sich, dass der wildtypische und der *choE*-defiziente 103+ Stamm intrazellulär gleich stark wuchsen. Durch die Behandlung der Makrophagen mit U18666A vermehrten sich beide Stämmen deutlich schlechter und durch zusätzliches Laktat vermehrte sich 103+ $\Delta choE$ besser. Die beiden RE1 Stämme vermehrten sich ohne U18666A gleich gut, allerdings wuchs $\Delta supAB$ bei einer U18666A Behandlung signifikant schlechter als der Wildtyp. Durch Laktat als zusätzliche, mit dem Kultivierungsmedium zugegebene, Kohlenstoffquelle vermehrte sich $\Delta supAB$ signifikant besser, was darauf hinweist, dass der Wachstumsdefekt tatsächlich auf einem Nährstoffmangel beruhte. Insgesamt ähnelten sich die beiden Wildtypstämme von *R. equi* in ihrem Vermehrungsverhalten.

Um den Einfluss von U18666A auf die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* auch in primären Makrophagen zu untersuchen, wurden BMDMs aus C57B-6 Mäusen mit *R. equi* 103+, 103- oder 103+ $\Delta choE$ infiziert. Als auch in den vorangegangenen Experimenten wurden die infizierten Makrophagen mit rVapA oder U18666A oder einer Kombination aus beiden (rVapA und U18666A) behandelt und die robuste Vermehrung der Bakterien bestimmt (Abbildung 27). *R. equi* 103+ vermehrte sich stark, wobei die Anwesenheit von rVapA oder Laktat im Kulturmedium der Makrophagen keinen Einfluss hatte. Erst die Behandlung mit U18666A führte zu einer signifikanten Abnahme der intrazellulären Vermehrung von 103+. Der U18666A-induzierte Vermehrungsdefekt konnte durch Laktat im Kulturmedium fast vollständig aufgehoben werden. Hingegen vermehrten sich avirulente *R. equi* ausschließlich mit rVapA, jedoch schlechter als in der immortalisierten RAW264.7 Zelllinie (Abbildung 22). Die Behandlung mit U18666A reduzierte die Vermehrung von 103- auf Null. Im Gegensatz zu 103+ konnte sich 103- durch zusätzliches Laktat nur geringfügig besser vermehren. *R. equi* 103+ $\Delta choE$ glich in seiner intrazellulären Vermehrung dem wildtypischen 103+: eine U18666A-Behandlung reduzierte die Vermehrung auf die Hälfte, durch zusätzliches Laktat replizierte 103+ $\Delta choE$ wieder besser. Das Vermehrungsdefizit konnte jedoch nicht vollständig kompensiert werden.

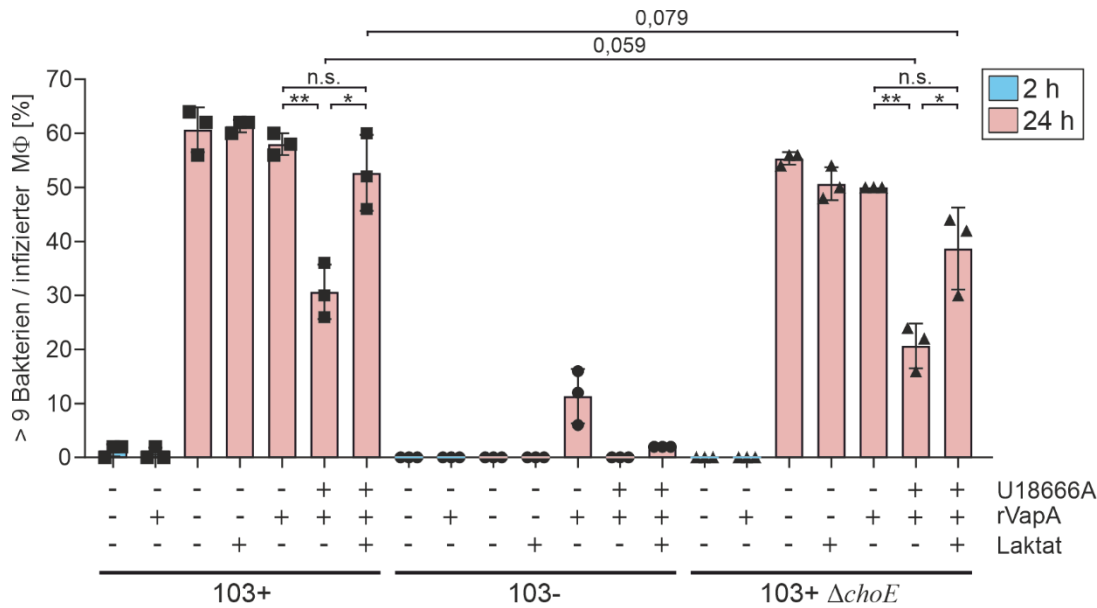


Abbildung 27: In BMDMs induziert U18666A einen Vermehrungsdefizit von *R. equi*, der durch zusätzliches Laktat verringert wird. Robuste Vermehrung von den angegebenen Bakterienstämmen in BMDMs aus C57B-6J Mäusen. Die Makrophagen wurden, wie angegeben, behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Experimenten. *, p-Wert < 0,05; **, p-Wert < 0,01; n.s., nicht signifikant.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es in RCVs zur Akkumulation von Cholesterol und IVVs kommt. Wird die Bildung von IVV durch *Vps4 Knockdown* oder pharmakologisch durch U18666A oder Imipramin verringert bzw. inhibiert, vermehren sich virulente *R. equi* schlechter und avirulente *R. equi* gar nicht. Korrelierend mit der reduzierten Vermehrung von 103+ nimmt auch die Konzentration an freiem Cholesterol in den RCVs ab. Dass der Wachstumsdefekt von *R. equi* 103+ in U18666A-behandelten Makrophagen tatsächlich auf einem Nährstoffmangel beruht, wird durch die zusätzliche Zugabe von Laktat zu infizierten Makrophagen gezeigt. Zur intrazelluläre Vermehrung in cholesterolreichen und IVV-armen RCVs, benötigt *R. equi* neben den chromosomalen Genen *supAB* die Virulenzgene *virR* und *virS*.

3.7. Spezielle Preadaptationen von *R. equi* wirken mit VapA während der Makrophageninfektion

In den vorangegangenen Experimenten, aber auch anderen Studien, wurde die Unabdingbarkeit von VapA für die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* gezeigt (Takai et al., 1991). Dabei neutralisiert VapA den pH-Wert der Phagolysosomen von Makrophagen und schafft so eine Replikationsnische für die Bakterien (von Bargen et al., 2019). Zudem konnte durch Takai et al. (1992) gezeigt werden, dass in *R. equi* Flüssigkulturen die VapA Expression durch einen sauren pH-Wert, aber vor allem temperaturabhängig (> 34 °C) induziert wird. Daraus resultierend stellte sich folgende Frage: Wie verhält sich *R. equi* in Bezug auf pH-

Neutralisierung und VapA Expression in Makrophagen, wenn das Bakterium zeitgleich mit einem sauren Milieu und einer Temperaturerhöhung auf 37 °C konfrontiert wird?

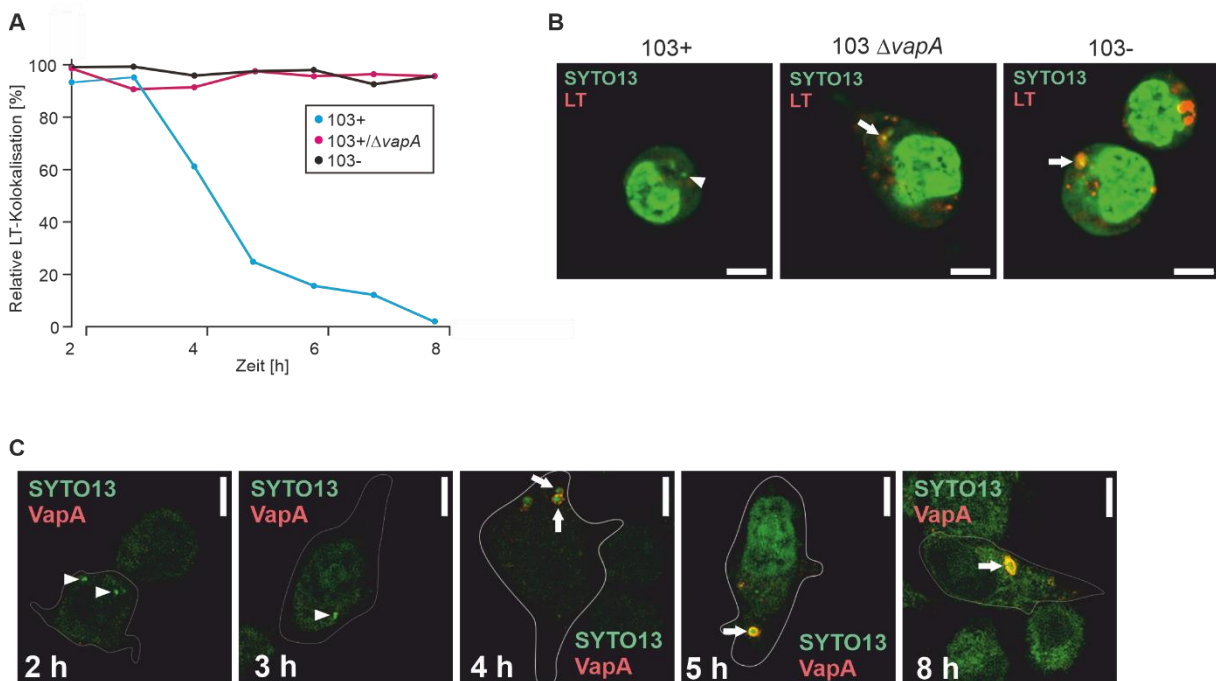


Abbildung 28: Virulente *R. equi* befinden sich zu Beginn der Infektion in sauren Phagolysosomen und neutralisieren den pH des Kompartiments innerhalb der ersten 4 h. **(A)** LT-Kolokalisation der RCVs von mit *R. equi* 103+, 103- oder 103+ $\Delta vapA$ infizierten RAW264.7 Makrophagen zu den angegebenen Zeitpunkten. **(B)** Repräsentative Aufnahmen von (A) zum Zeitpunkt 5 h p.i.. Auf Kolokalisation von Bakterien und LT weisen Pfeile hin, wohingegen Pfeilspitzen auf fehlende Kolokalisation hinweisen. **(C)** Intrazelluläre Expression von VapA über die Zeit einer *R. equi* 103+ Infektion in RAW264.7 Makrophagen, wie in (A). Alle quantitativen Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten und zeigen den Mittelwert. Maßbalken: 5 μ m. Abbildung aus Haubenthal et al., 2023.

Dass die VapA Expression bei *R. equi* 103+ BHI-Flüssigkulturen durch einen Temperaturwechsel von 30 °C auf 37 °C induziert wird und VapA erst nach 4 h im Immunblot detektierbar ist, wurde bereits früher gezeigt (von Bargaen, 2010). Um eine Infektion von *R. equi* 103+ zu imitieren, bei der das Bakterium aus einer Umgebung kommt, die die VapA Expression nicht induziert, wurden RAW264.7 Makrophagen mit Bakterien infiziert, die bei 30 °C vorkultiviert wurden. Zudem wurden die Stämme 103- und 103+ $\Delta vapA$ untersucht (Abbildung 28A und B). Nach 2 h Infektion waren nahezu alle Phagolysosomen LT-positiv. Ab dem Zeitpunkt 4 h, aber vor allem 5 h bis 6 h nach Infektionsbeginn begannen die 103+ enthaltenden Phagolysosomen zunehmend LT-negativ zu werden, wohingegen 103- und 103+ $\Delta vapA$ enthaltende Phagolysosomen unverändert LT-positiv waren. Nach 8 h in der 103+ Infektion waren nahezu alle Phagolysosomen LT-negativ. Um eine mögliche Korrelation zwischen LT-Färbung und der VapA Expression zu untersuchen, wurde mit dem gleichen Experimentaufbau VapA immungefärbt (Abbildung 28C). Es zeigte sich, dass 103+ 4 h nach Infektionsbeginn sichtbar VapA exprimierte und dass die VapA-Proteinmenge im Verlauf der

Infektion zunahm. Zu den Zeitpunkten 2 h und 3 h p.i. waren die virulenten Bakterien VapA-negativ.

Da auch apathogene *R. equi* durch rVapA zur intrazellulären Vermehrung gebracht werden konnten, stellte sich die Frage ob auch andere *R. equi* verwandte Rhodokokken das gleiche pathogene Potential besitzen. *R. defluvii* ist der nächste Verwandte zu *R. equi* mit 83 % chromosomaler Identität (Anastasi et al., 2016) und wurde bislang erst zwei Mal isoliert. Das erste Mal wurde *R. defluvii* in einem Bioreaktor identifiziert (Kämpfer et al., 2014) und von der DMSZ in ihre Stammsammlung aufgenommen. *R. defluvii* ist im Vergleich zu *R. equi* 103+ plasmidlos. Das zweite Mal wurde *R. defluvii* in der Lunge eines AIDS-Patienten identifiziert (Canetti et al., 2019). Um die beiden eng verwandten Rhodokokken-Stämme eingangs zu charakterisieren wurde das Wachstumsverhalten der Bakterien in BHI oder MS/Ac Medium bei 30 °C bzw. 37 °C untersucht (Abbildung 29A). In BHI Medium wuchsen plasmidlose *R. equi* schneller als pVAPA-tragende Bakterien, wohingegen bei 30 °C beide Stämme gleich wuchsen. In MS/Ac verhielten sich beide *R. equi* Stämme gleich, während sie sich besser bei 30 °C vermehrten. *R. defluvii* vermehrte sich Medium-unabhängig nur bei 30 °C, in MS/Ac besser als in BHI Medium.

Um das pathogene Potential von *R. defluvii* zu untersuchen, mussten die Infektionsbedingungen angepasst werden, um zum einen die Wachstumslimitation durch Temperatur und zum anderen die durch das fehlende Virulenzplasmid zu umgehen. Daher erfolgten die Infektionen der RAW264.7 Makrophagen bei 30 °C und zusätzlich wurden das Kulturmedium der Makrophagen mit rVapA supplementiert (Abbildung 29B und C). Die Infektionsexperimente zeigten, dass *R. defluvii*, gleich wie *R. equi* 103-, ohne die Zugabe von rVapA intrazellulär nicht replizierte. Durch die Zugabe von rVapA bildeten sich geschwollene RCVs, in denen *R. defluvii*, anders als *R. equi*, verklumpt vorlag (Abbildung 29B). Auf das Vermehrungsverhalten von *R. equi* hatten die unterschiedlichen Temperaturen keinen Einfluss. Allerdings vermehrte sich *R. defluvii* ausschließlich bei 30 °C und insgesamt schlechter als plasmidlose *R. equi* (Abbildung 29C).

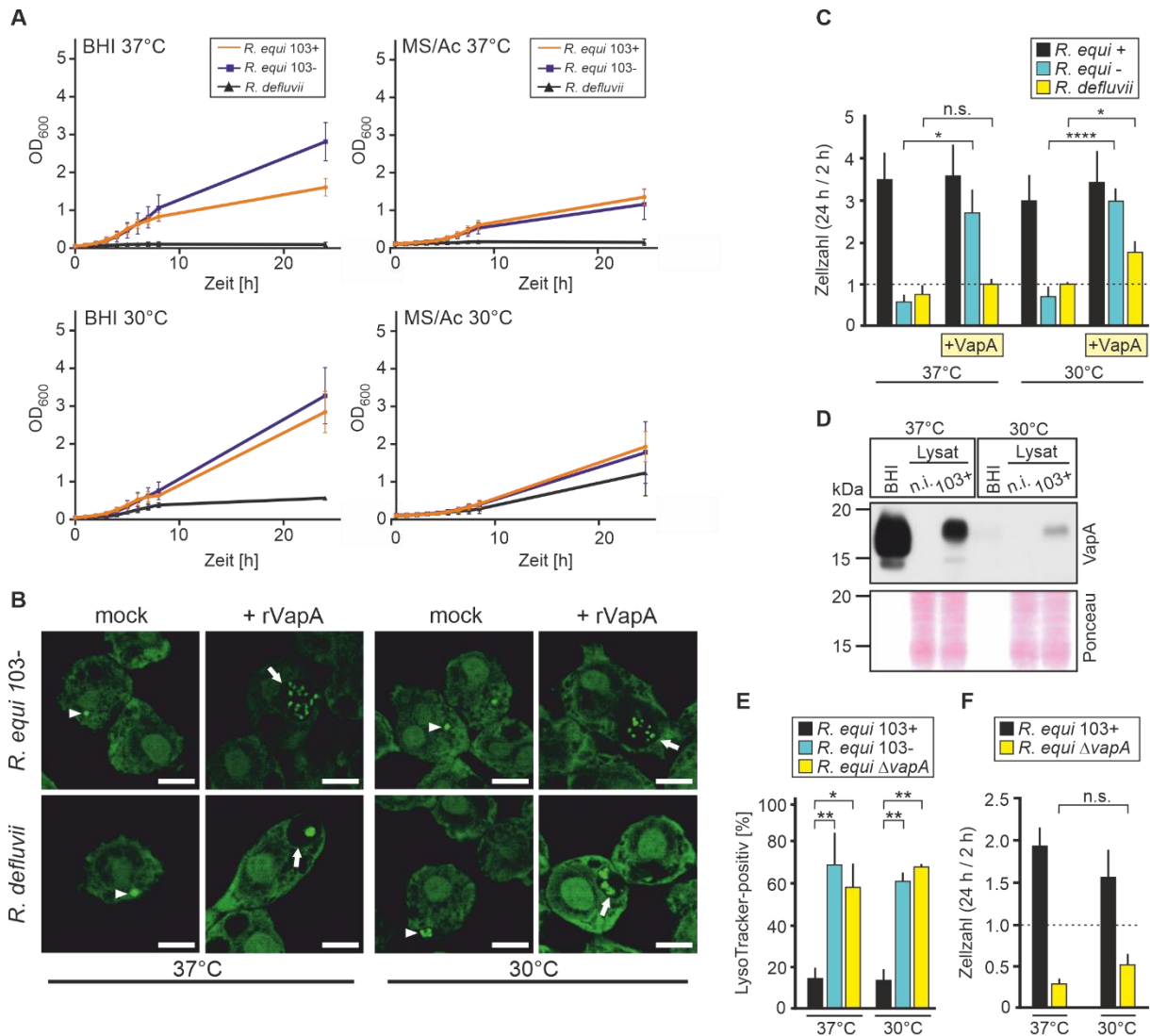


Abbildung 29: *R. equi* und *R. defluvii* wachsen in Makrophagen und in Flüssigkultur unterschiedlich. (A) Wachstumskurven von *R. equi* 103+, 103- und *R. defluvii* CA11 in BHI oder MS/Ac, die bei 30 °C bzw. 37 °C inkubiert wurden. **(B)** Repräsentative Aufnahmen von *R. equi* 103- oder *R. defluvii* infizierten RAW264.7 Makrophagen 24 h p.i.. Wo angegeben, wurden 10 µg/ml rVapA während der gesamten Infektion hinzugegeben. Pfeilköpfe zeigen auf nicht vermehrte Bakterien, Pfeile auf Vakuolen mit replizierten Bakterien. Maßbalken: 5 µm. **(C)** Robuste Vermehrung von *R. equi* 103+, 103- und *R. defluvii* CA11 in RAW264.7 Makrophagen, die für die gesamte Dauer des Experiments bei 30 °C bzw. 37 °C inkubiert wurden. Wo angegeben, wurde rVapA während der gesamten Infektion hinzugegeben. **(D)** Quantifizierung der VapA-Freisetzung in *R. equi* 103+ infizierten Makrophagen, die bei 30 °C bzw. 37 °C inkubiert wurden, mittels Immunblot. Dargestellt sind die repräsentative Ponceau S Färbung und der VapA Immunblot aus drei unabhängigen Experimenten. **(E)** LT-Kolokalisation mit RCVs zum Zeitpunkt 24 h p.i. von *R. equi* 103+, 103- und 103+ ΔvapA infizierten RAW264.7 Makrophagen, die bei 30 °C oder 37 °C inkubiert wurden. **(F)** RAW264.7 Makrophagen wurden mit den angegebenen Bakterien infiziert, die Lebendzellzahl bestimmt und dargestellt wie in (C). In (A, C, E und F) sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. *, p-Wert < 0,05; **, p-Wert ≤ 0,01; n.s., nicht signifikant. Abbildung aus Haubenthal et al., 2023.

Da *R. equi* 103+ VapA nicht bei einer Temperatur von 30 °C in Flüssigkulturen exprimiert (Takai et al., 1996), war es überraschend, dass sich 103+ auch ohne rVapA bei 30 °C intrazellulär vermehrte. Um nun zu untersuchen, ob 103+ die VapA Expression im

Makrophagen bei 30 °C dennoch induzieren kann, wurden von infizierten RAW264.7 Makrophagen, die bei 30 °C oder 37 °C inkubiert wurden, Zelllysate hergestellt und das VapA Proteinlevel mittels Immunblot verglichen (Abbildung 29D). Trotz der Infektion bei 30 °C, exprimierte 103+ im Makrophagen VapA, allerdings weniger als bei 37 °C.

Um weiter zu untersuchen, ob das geringe VapA-Level für die Neutralisierung der RCV bei 30 °C ausreichend war oder ob auch andere Gene von pVAPA die intrazelluläre Vermehrung bei verringerter Temperatur induzieren können, wurden RAW264.7 Makrophagen mit *R. equi* 103+, 103- und 103+ $\Delta vapA$ infiziert und die Ansäuerung mittels LT überprüft (Abbildung 29E). Erneut lokalisierten die VapA-defizienten *R. equi* in LT-positiven und 103+ in LT-negativen Phago lysosomen, wobei auch hier die Temperatur keinen Einfluss hatte. Des Weiteren vermehrte sich der *vapA* deletierte 103+ auch bei 30 °C nicht (Abbildung 29F).

Die Vermehrungsexperimente aus Abbildung 29C wurden ebenfalls mit dem humanen Isolat von *R. defluvii* durchgeführt. Allerdings verhielten sich die Bakterien intrazellulär wie avirulente *R. equi*: nur durch rVapA vermehrten sie sich bei 37 °C (Daten nicht gezeigt). Daraus resultierte die Frage, ob das humane *R. defluvii* Isolat nicht doch ein *R. equi* war, da bereits mehrere Fälle von *R. equi* Infektionen in immunsuprimierten Patienten beschrieben wurden (zusammengefasst in Weinstock et al., 2002). Zur eindeutigen Identifizierung des Isolats wurde ein PCR-basierter Assay entwickelt, der über 16S rDNA zwischen *R. equi* und *R. defluvii* unterscheiden kann. Dafür wurde jeweils derselbe reverse Primer verwendet. In Kombination mit den unterschiedlichen vorwärts Primern resultierten unterschiedliche Amplikons (Abbildung 30A). Über Kolonie-PCR wurden *R. equi* 103+, *R. defluvii* (Bioreaktor, DMSZ) und der vermutliche „*R. defluvii* (humanes Isolat)“ miteinander verglichen (Abbildung 30B). Dabei zeigte sich, dass bei dem humanen „*R. defluvii*“ Isolat mit dem Equi_fw Primer ein Amplikon resultierte, aber nicht mit dem Defluvii_fw Primer. Entgegengesetzt dazu resultierte für das Isolat aus dem Bioreaktor (DMSZ) nur mit dem Defluvii_fw Primer ein Amplikon.

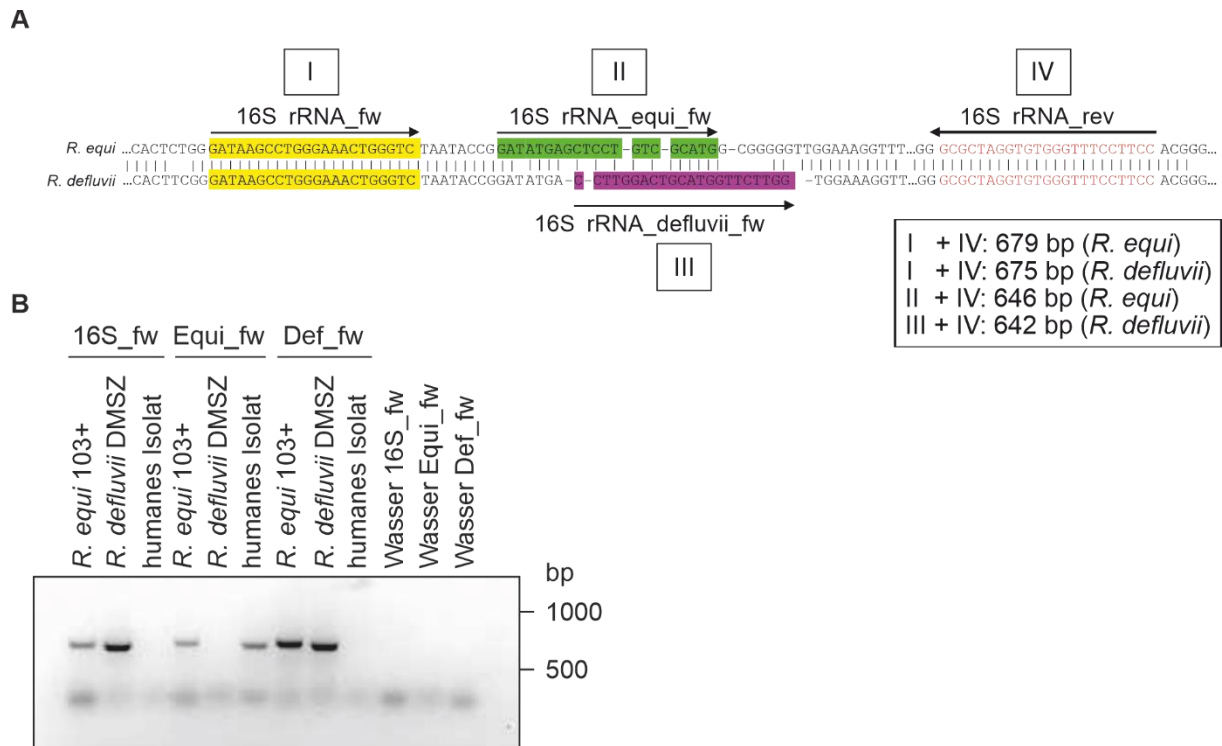


Abbildung 30: Unterscheidung von *R. equi* und *R. defluvii* mittels PCR (A) Ausschnitt der überlagerten 16S rDNA von *R. equi* und *R. defluvii* mit den eingezeichneten Sequenzen für die Primer 16S_fw, 16S_equi_fw, 16S_defluvii_fw und 16S_rev. **(B)** Kolony-PCR von Einzelkolonien der angegebenen Bakterienstämme. *R. defluvii* DMSZ war aus der Bakteriensammlung der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DMSZ) und „humanes Isolat“ war das humane Isolat eines vermutlichen *R. defluvii* aus der Publikation Canetti et al. (2019).

Somit wurde gezeigt, dass bei 30°C vorkultivierte *R. equi* 103+ die ersten vier Stunden einer Infektion benötigen, um VapA zu exprimieren und den pH-Wert der Phagosomen zu neutralisieren. Dieser Effekt verstärkte sich innerhalb der nächsten 4 h der Infektion weiter. Zum anderen wurde gezeigt, dass sich auch der nächste Verwandte zu *R. equi*, *R. defluvii*, mit Hilfe von rVapA intrazelluläre vermehren kann, wenn die Infektionstemperatur auf 30 °C reduziert wird.

4. Diskussion

Vor Beginn dieser Arbeit war gezeigt worden, dass die pH-Neutralisierung durch VapA einen entscheidenden Schritt in der intrazellulären Vermehrung darstellt (Toyooka et al., 2005). *R. equi* generiert auf diese Weise ein atypisches großes Phagolysosom als Replikationsnische (Haubenthal et al., 2023; von Bargaen et al., 2019). In einem ersten Projektteil wurde untersucht, welche Folgen die Neutralisierung auf das Proteom relevanter Kompartimente hat.

4.1. pH-Neutralisierung verändert das Proteom von Phagolysosomen

Durch die Expression von VapA können virulente *R. equi* den pH-Wert der Phagolysosomen neutralisieren und daher in Makrophagen replizieren (von Bargaen et al., 2019). Aber selbst avirulente *R. equi* können durch Zugabe von BafA1, einem v-ATPase Inhibitor, oder von rVapA ins Kulturmedium der Makrophagen intrazellulär replizieren (Haubenthal et al., 2023; von Bargaen et al., 2019). Die Aufreinigung von *R. equi*-enthaltenden Phagosomen wurde erfolgreich zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion (2 h p.i.) durchgeführt (Fernandez-Mora et al., 2005). Allerdings stellt die Reinigung einer intakten RCV zu einem fortgeschrittenen Infektionszeitpunkt eine große Herausforderung dar. Somit wurde in dieser Arbeit das Proteom von rVapA-behandelten Phagolysosomen analysiert. Erst durch rVapA bildet sich bei avirulenten *R. equi* eine Vakuole aus, die fluoreszenz- und elektronenmikroskopisch der RCV virulenter *R. equi* ähnelt (Abbildung 3, 18) (Hansen, Haubenthal, Reiter, Kniewel, Bosse-plois, Niemann, Bargaen, Haas, et al., 2023). Der Vergleich elektronenmikroskopischer Aufnahmen von VCVs und BafVs zeigte, dass durch die pH-Neutralisation morphologisch ähnliche Vakuolen entstanden waren (Abbildung 3). Daher war es nicht verwunderlich, dass sich auch die Proteome von VCVs und BafVs ähnelten (Abbildung 4, 5, 6). Zu den Proteinen, die besonders stark durch die pH-Neutralisierung reduziert worden waren, gehörten Cathepsine (Abbildung 5). Cathepsine sind Proteasen, die in Serin- (Cathepsin A, und G), Aspartyl- (Cathepsin D und E) und Cysteinproteasen (Cathepsin B, C, F, H, K, L, O, S, V, W, Z) unterteilt werden (Patel et al., 2018). Von allen lysosomalen Proteasen sind Cathepsin B, D und L die abundantesten (Yadati et al., 2020). Die primäre Struktur aller Cathepsine besteht aus einem Signalpeptid, einem Propeptid und einem katalytisch-aktiven, gereiften funktionalen Enzym (Yadati et al., 2020). Beispielsweise prozessieren Cathepsin B und L Procathepsin D zu reifem Cathepsin D (Laurent-Matha et al., 2006). Die meisten Cathepsine besitzen die höchste enzymatische Aktivität und die höchste Proteinstabilität in einem sauren Milieu, wie es typischerweise in Lysosomen vorliegt (Yadati et al., 2020). Allerdings gibt es auch Enzyme, wie Cathepsin B oder D, die bei einem neutralen pH enzymatisch aktiv sind (Sapolsky et al., 1974; Yoon et al., 2021). Dass sich die Proteinstabilität von Cathepsin B, D und F bei einem neutralen pH-Wert unterscheidet, ist bekannt: Cathepsin F ist etwas länger als eine Minute

stabil (B. Wang et al., 1998), Cathepsin B bis zu zwei Stunden (Yoon et al., 2021) und Cathepsin D sogar bis zu 30 h (Compaine et al., 1995). Die beobachtete Reduzierung der Proteinmengen an Cathepsin B und F (Abbildung 7) könnte daher auf ein Kollabieren des Lysosomenprotonengradienten zurückzuführen sein. Auch wenn Lysosomen *in vitro* länger einen sauren pH-Wert aufrechterhalten können als Endosomen, sinkt dennoch ihre Protonenkonzentration zeitabhängig (van Dyke, 1993). Eine weitere mögliche Erklärung der Proteinmengenabnahme wäre, dass die lysosomalen Inhalte mit dem umliegenden Puffer (pH-Wert 7) aufgrund von Löchern in den Phagolysosomenmembranen, die während der Inkubation entstehen könnten, in Kontakt kommen. Beides, ein kollabierter Protonengradient oder Membranlöcher, würde auch die verringerte Proteinmenge an Cathepsin B und F in HB-Puffer (pH-Wert 7,2) und auf Eis inkubierten Lysosomen gegenüber Lysosomen, die bei einem pH-Wert von 5 inkubierten worden waren, erklären (Abbildung 7). Das einzige Protein, das in Lysosomen, die bei einem pH-Wert von 5 inkubiert worden waren, fast vollständig abgebaut wurde, war Procathepsin D (Abbildung 7). Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass Procathepsin D durch Cathepsin B, das bei einem pH-Wert von 4,5 bis 5,0 seine stärkste enzymatische Aktivität besitzt (Mindell, 2012) und in den gereinigten Lysosomen vorliegt (Abbildung 7), prozessiert wird (Laurent-Matha et al., 2006). Somit würde eine geringe Enzymaktivität und Proteinmenge von Cathepsin B, wie sie bei neutralem pH-Wert vorliegen, zu keiner Prozessierung von Procathepsin D führen (Abbildung 7).

Dass die Abnahme der Cathepsin-Proteinmengen und enzymatischen Aktivität bei neutralem pH-Wert nicht nur ein Artefakt der Aufreinigungen und *in vitro* Inkubationen sind, sondern auch *in vivo* stattfinden, wird durch Hansen et al. (2023) gezeigt. In einem Zytometrie-basierten Proteolyse-Assay weisen die Autoren eine fast vollständig gehemmte Proteolysefähigkeit von Phagolysosomen in rVapA- bzw. BafA1-behandelten Makrophagen nach (Hansen et al., 2023). Aber auch in mit *R. equi* infizierten Makrophagen ist eine Verringerung an Cathepsin D in RCVs nachgewiesen. Während 6 h nach Infektionsbeginn noch Cathepsin D in RCVs lokalisiert (Toyooka et al., 2005), ist kaum mehr etwas von dem lysosomalen Protein 24 h nach Infektionsbeginn in RCVs vorhanden (von Bargen et al., 2019). Dass die Proteinmenge an Cathepsinen in RCVs verringert ist, könnte mehr als nur ein Nebeneffekt der pH-Neutralisierung durch VapA sein, sondern gezielt die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* fördern. Beispielsweise ist für das artverwandte Pathogen *M. tuberculosis* gezeigt, dass dessen Vermehrung in Phagosomen primärer Makrophagen durch eine verringerte Proteinmenge an Cathepsin B, S und L begünstigt wird (Pires et al., 2016).

Neben Cathepsinen wird häufig auch das lysosomale Membranprotein LAMP1 zur Identifizierung von Lysosomen verwendet. LAMP1 lokalisiert überwiegend im Lumen von RCVs und VCVs (Rofe et al., 2017; von Bargen et al., 2019; Wright et al., 2018), was ein

Alleinstellungsmerkmal dieser Vakuolen ist. Da eine pH-Neutralisation durch rVapA mit einer verringerten hydrolytischen Kapazität von VCVs (atypische Phagolysosomen) einhergeht, wird in mit VapA-behandelten Zellen Lysosomenbiogenese induziert (Rofe et al., 2016). Rofe et al. (2016) zeigten, dass in mit rVapA behandelten NRK Zellen die LAMP1-Proteinkonzentration im Verlauf von 72 h kontinuierlich anstieg und bereits 8 h nach Behandlungsbeginn deutlich mehr LAMP1 in mit rVapA behandelten, als in unbehandelten Zellen vorlag. Im Gegensatz dazu wiesen unbehandelte und mit rVapA behandelte Makrophagen jeweils die gleiche LAMP1-Proteinmenge im PNS als auch in isolierten Phagolysosomen bzw. VCVs auf (Abbildung 6). Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass Rofe et al (2016) die 10-fache rVapA-Konzentration (100 µg/ml) und eine andere Zelllinie (NRK Zellen) verwendeten, als in der hier vorliegenden Arbeit verwendet wurde (10 µg/ml rVapA und J774E Makrophagen). Obwohl in unbehandelten Makrophagen viele LAMP1-positive Phagolysosomen und in rVapA-behandelten Makrophagen weniger LAMP1-positive VCVs vorliegen (Hansen et al., 2023), besitzen isolierte Phagolysosomen bzw. VCVs die gleiche LAMP1-Proteinmenge (Abbildung 6). Da für die Analyse mittels Immunblot die Proben auf eine gleiche Proteinkonzentration eingestellt wurden (Abbildung 6), würde das bedeuten, dass die gleiche LAMP1-Proteinmenge in wenigen VCVs und in vielen Phagolysosomen vorliegt. Konsequenterweise würde das bedeuten, dass fast alle LAMP1-positiven Kompartimente (späte Endosomen bzw. Lysosomen) mit VCVs fusionieren und sich keine LAMP1-positiven Lysosomen aus den Vakuolen reformieren. Für eine heterotypische Fusion zwischen späten Endosomen und Lysosomen werden Rab2, Arl8 und der HOPS Komplex benötigt (Schleinitz et al., 2023). Da auch Rab2, Arl8 und HOPS in der Proteomanalyse von unbehandelten Phagolysosomen detektiert wurden (Abbildung 6, Rab2 und HOPS nicht gezeigt), könnte möglicherweise auch homotypische Fusion (Lysosomen-Lysosomen-Fusion) durch Rab2, Arl8 und HOPS stattfinden. Aufgrund der Abreicherung von HOPS und Arl8 würde man annehmen, dass es vermutlich zu weniger Fusionsereignissen zwischen späten Endosomen und Phagolysosomen bzw. Phagolysosomen und Phagolysosomen kommt. Da der alleinige Knockout (KO) von Arl8b nicht, sondern erst der Doppel-KO von Arl8a und Arl8b eine späte Phagosomen-Lysosomen-Fusion verhindert (Schleinitz et al., 2023), unterstützt dies die These, dass die Fusion an und mit VCVs, an denen halb so viel Arl8ab vorhanden ist (Abbildung 6), gehemmt sein könnte. Aber warum kann dann das Gegenteil eine Fusion von nahezu allen LAMP1-positiven Kompartimenten mit VCVs oder RCVs beobachtet werden? Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass, obwohl die Arl8-Konzentration auf VCV-Membranen geringer ist als an unbehandelten Phagolysosomen, auf den VCV-Membranen die gleiche absolute Menge an Arl8 vorhanden ist, weswegen späte Endosomen-Lysosomen- oder Lysosomen-Lysosomen-Fusion gleich häufig stattfinden kann. Da durch VapA keine Lysosomenreformation stattfindet (Rofe et al., 2017), sammelt sich vermutlich LAMP1 in VCVs

oder RCVs an.

Auch das Protein Gal3 wurde an/in gereinigten VCVs bzw. BafVs im selben Maß wie in unbehandelten Phagolysosomen in der Proteomanalyse und im Western Blot detektiert (Abbildung 6). Gal3 ist ein zytosolisches Lektin, das an stark glykosylierte Proteine bindet, die sich auf der luminalen Seite der Lysosomenmembran befinden (Miller et al., 2016). Zusammen mit anderen Galektinen vermittelt Gal3 eine Zellantwort, wenn aufgrund von Läsionen der Lysosomenmembran Glykane zytosolisch exponiert vorliegen (Hong et al., 2021). Dass allerdings Gal3 auch in gesunden und unbehandelten Makrophagen an Phagolysosomen lokalisiert, wurde bereits 2001 in der Proteomanalyse von Garin et al. beschrieben. Wären Löcher in den Phagolysosomenmembranen durch die Lysosomenisolierung entstanden, die am wahrscheinlichsten bei den stark geschwollenen VCVs aufgetreten wären, hätte sich das in der Proteomanalyse und im Western Blot durch eine Anreicherung von Gal3 geäußert. Auch *in vivo* war durch Fluoreszenzmikroskopie keine Anreicherung von Gal3 an limitierenden VCV-Membranen zu beobachten (Abbildung 14). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die VCVs im Makrophagen und nach magnetischer Isolation weitestgehend intakt sind.

Die ESCRT-Proteine wurden durch eine pH-Neutralisierung in VCVs bzw. BafVs angereichert (Abbildung 6). Warum diese Proteine womöglich in VCVs bzw. BafVs anreichern und was deren potentielle Funktion in der Etablierung der Vakuolen ist, wird in den nachfolgenden Kapiteln 4.2. und 4.3. näher diskutiert.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der Proteomanalyse und der Immunblots, dass die beobachteten Veränderungen der analysierten Proteine vermutlich auf die pH-Neutralisierung durch rVapA bzw. BafA1 zurückzuführen sind. Durch die beobachteten Gemeinsamkeiten zwischen RCVs und VCVs können zudem VCVs als Modell für RCVs bestätigt werden.

In den TEM-Aufnahmen (Abbildung 3) war ER-Stress, eine morphologische Veränderung des ERs, meist zurückzuführen auf ungefaltete Proteine (Mateus et al., 2018; Sriburi et al., 2004), vor allem durch eine 18-stündige BafA1 Behandlung deutlich zu erkennen. Es ist bekannt, dass eine lysosomale Stressantwort aufgrund eines Anstiegs des lysosomalen pH-Werts zu ER-Stress führen kann (Lakpa et al., 2021). Umgekehrt steigt durch ER-Stress auch der lysosomale pH-Wert an (Lakpa et al., 2021). Eine Stressantwort der Lysosomen (*lysosomal stress response*, LSR) wird durch interne und externe Stimuli ausgelöst und wird aktuell durch neun Kriterien charakterisiert (Lakpa et al., 2021). Dazu zählen u.a. Anstieg des lysosomalen pHs, Vergrößerung der Lysosomen, Kationenefflux, LDL Cholesterolakkumulierung oder Aggregation von fehlgefalteten Proteinen (Lakpa et al., 2021). Viele dieser Kriterien treffen auf VCVs bzw. auch RCVs (von Bargen et al., 2019) zu, wie zum Teil noch später aufgezeigt wird (Abschnitt 4.4.), aber auch auf die BafVs (Fedele & Proud, 2020; Naganuma et al., 1992; Oda

et al., 1991). Eine Zelle reagiert auf LSR mit der Dephosphorylierung von TFEB, wodurch eine Kaskade aktiviert wird, die die Lysosombiogenese hochreguliert (Lakpa et al., 2021). Auch Pathogene sind dafür bekannt, eine LSR auszulösen (Lakpa et al., 2021). Virulente *R. equi* stören durch VapA Endolysosomenfunktionen und stimulieren Lysosomenbiogenese durch die Aktivierung von TFEB (Rofe et al., 2017). Somit ist es nicht verwunderlich, dass in rVapA-behandelten Makrophagen ER-Stress vorliegt (Abbildung 3). BafA1 verhindert den Proteinabbau in Lysosomen, indem es die v-ATPase inhibiert (Yoshimori et al., 1991). Allerdings inhibiert BafA1 auch die v-ATPase des Golgi Apparats, wodurch kein retrograder Transport (von Golgi zu ER) mehr stattfinden kann (Palokangas et al., 1998). Somit stört BafA1 auf mehr als nur eine Weise die ER-Funktionen (Fumagalli et al., 2016), wodurch dieser dominante Phänotyp (sehr stark gestresste ER) nach 18-stündiger BafA1-Behandlung vermutlich hervorgerufen wird.

4.2. Die intrazelluläre Lokalisation der ESCRT-Maschinerie gibt Aufschluss über die potentielle Funktion

Die ESCRT-Maschinerie besitzt vielfältige Funktionen entlang des endozytischen Wegs (zusammengefasst in Vietri et al., 2020) und ist zudem in die Pathogenese von verschiedenen Bakterien wie *C. burnetii* und *S. enterica* involviert (Göser et al., 2020; Radulovic et al., 2018). Dass nahezu alle ESCRT-Proteine an VCVs und BafVs angereichert sind (Abbildung 4), lässt auf eine Funktion dieser Proteine in der Etablierung der Vakuolen schließen. Da sich VCVs als RCV-Modell eignen, können für die folgenden Ausführungen VCV und RCV als gleichwertig betrachtet werden.

Im Allgemeinen wird angenommen, dass der ESCRT-Komplex nach Vesikelabschnürung bzw. Membranreparatur vollständig von Membranen dissoziiert und recycelt wird (Christ et al., 2017; Raiborg & Stenmark, 2009; Wollert & Hurley, 2010). Die einzigen bekannten Ausnahmen, in denen die Dissoziation nicht vollständig stattfindet, sind die ESCRT-abhängige Virionenbildung von HIV (van Engelenburg et al., 2014) und die ESCRT-abhängige Bildung von Vesikel an der limitierenden Membran von *T. gondii*-enthaltende Vakuolen (Rivera-Cuevas et al., 2021). In beiden Prozessen werden ESCRT-Proteine in sich bildende Virionen bzw. Vesikel eingeschlossen (van Engelenburg et al., 2014; Rivera-Cuevas et al., 2021). Dass nun Chmp3 und Vps4 in RCVs vorliegen (Abbildung 8), ist die erste beschriebene Lokalisierung von ESCRT-Proteinen in einem Bakterien-enthaltendem Phagosom. Da Chmp3 und Vps4 teilweise mit dem lysosomalen Markerprotein LAMP1 kolokalisieren (Abbildung 8), d.h. vermutlich in einem LAMP1-positivem Vesikel verpackt vorliegen, könnte das auf eine ESCRT-abhängige Bildung von Vesikel an limitierenden, LAMP1-positiven RCV-Membranen hindeuten. Auf diese Hypothese wird unter Abschnitt 4.4. näher eingegangen. Dass IVVs in

RCVs beobachtet werden können, ist vermutlich auf einen annähernd neutralen pH-Wert der Vakuolen (pH-Wert 7,2) (von Bargen et al., 2019) und damit einhergehend auf eine stark verringerte Hydrolaseaktivität von lysosomalen Enzymen zurückzuführen. Damit im Einklang sind *T. gondii*-enthaltenden Vakuolen, in denen Tsg101 und Alix in Vesikel verpackt vorliegen (Rivera-Cuevas et al., 2021), pH-Wert neutral (Sibley et al., 1985). Im Gegensatz zur RCV oder *T. gondii*-enthaltenden Vakuolen besitzen CCVs und SCVs einen sauren pH-Wert (Akporiaye et al., 1983; Rathman et al., 1996). Sowohl bei *C. burnetii* als auch bei *S. enterica* wird die ESCRT-Maschine für die Aufrechterhaltung der Membranintegrität benötigt (Göser et al., 2020; Radulovic et al., 2018). Würden ESCRT-abhängig Vesikel an den limitierenden Membranen von CCVs oder SCVs gebildet und in diese ESCRT-Proteine verpackt werden, was bisher noch nicht untersucht wurde, könnte man diese Vesikel aufgrund des sauren pH-Werts der Vakuolen (Akporiaye et al., 1983; Rathman et al., 1996) vermutlich nicht beobachten.

In zukünftigen Studien intrazellulärer Pathogene in Zusammenhang mit der ESCRT-Maschinerie sollte stets die Lokalisierung einzelner ESCRT-Faktoren untersucht werden, da darüber ein erster Hinweis für eine potentielle Rolle von ESCRT in der Pathogeninfektion erhalten werden könnte. Beispielsweise könnte eine Lokalisation von ESCRT-Proteinen in einer Pathogen-enthaltenden Vakuole auf einen Einfluss von ESCRT in der Vesikelbildung hindeuten. Hingegen würde eine Lokalisierung von ESCRT-Proteinen auf der limitierenden Membran der Pathogen-enthaltenden Vakuolen eine Funktion in der Membranreparatur nahelegen.

4.3. *R. equi* benötigt eine intakte RCV-Membran für intrazelluläre Vermehrung

Aktuelle Studien über das vakuoläre Überleben von *M. tuberculosis* und anderen langsam wachsenden virulenten Mykobakterien zeigten, dass der ESCRT-Komplex die Bakterien vor frühzeitigen Schäden in der Vakuolenmembran schützt, obwohl diese Bakterien zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion auch aus der Vakuole ausbrechen, ins Zytosol gelangen und den Wirtsmakrophagen verlassen (López-Jiménez et al., 2018). Aufgrund der Verwandtschaft und ähnlicher Pathologie zwischen *M. tuberculosis* und *R. equi* könnten auch Löcher in der RCV-Membran ESCRT-abhängig repariert werden. Anzunehmen wäre, dass kleine Läsionen der RCV-Membran, die für die pH-Neutralisierung der RCV durch VapA verursacht werden (von Bargen et al., 2019), sich vergrößern und anschließend durch ESCRT repariert werden (Skowyra et al., 2018). Kommen intrazelluläre Bakterien aufgrund von Löchern in der Phagosomenmembran in Kontakt mit Makrophagenzytosol, wird eine Signalkaskade aktiviert, die zur Sekretion von IFN β in den Extrazellularraum führt (Leber et al., 2008; McCaffrey et al., 2004). Dass eine Infektion durch *R. equi* nur eine geringe IFN β -Freisetzung der Makrophagen

induziert und diese Antwort gleich schwach für virulente und avirulente *R. equi* ist (Abbildung 13D), legt nahe, dass Rhodokokken die RCV-Membran nicht hinreichend weit permeabilisieren, um eine Erkennung durch die zellautonome Immunität zu gewährleisten. Würde es im Makrophagen VapA-abhängig zu Läsionen in den Phagosomenmembranen kommen, würde Gal3, ein zytosolisches Lektin, das an stark glykosylierte Proteine des Lysosomenlumens bzw. des RCV-Lumens binden kann (Miller et al., 2016), an die Schadensstelle rekrutiert werden. Da sich vermutlich auch Vesikel direkt an der VCV/RCV Membran in das Phagosomenlumen abschnüren (Abschnitt 4.4.), müsste zudem Gal3 an IVVs binden können. Allerdings waren die limitierenden Membrane nur schwach Gal3-positiv und IVVs kolokalisierten gar nicht mit Gal3 (Abbildung 14), was weiter die Hypothese der intakten RCV-Membran während einer Makrophageninfektion untermauert.

Gal3 wird durch einen unkonventionellen Sekretionsweg, dessen exakter Mechanismus bisher noch nicht bekannt ist, vom Zytosol in den extrazellulären Raum sezerniert (Popa et al., 2018; Stewart et al., 2017). Außerhalb der Zelle kann Gal3 an β -Galaktoside auf der Zelloberfläche binden (Nabi et al., 2015) und so wesentlich zur Phagozytose durch Makrophagen beitragen (Sano et al., 2003). Dass mehr Gal3 auf der Plasmamembran von mit *R. equi* infizierten oder mit rVapA-behandelten Makrophagen lokalisiert, könnte bedeuten, dass womöglich in diesen Makrophagen verstärkt Phagozytose stattfindet. Dass zu einem fortgeschrittenen Infektionszeitpunkt generell noch Phagozytose stattfindet, was aufgrund der Akkumulation von unverestertem Cholesterin in RCVs (Abbildung 24) und des dadurch vermutlich gestörten Cholesterin-Traffickings nicht zwangsläufig zu erwarten wäre, wurde in dieser Studie durch die Aufnahme verschiedener fluoreszenzmarkierter *Tracer* gezeigt (Abbildung 23). Ob nun allerdings in mit *R. equi* infizierte Makrophagen verstärkt phagozytieren, müsste zukünftig noch untersucht werden.

Um Löcher in der Phagosomenmembran zu induzieren und anschließend aus dem Phagosom auszubrechen, exprimiert *L. monocytogenes* das *hlyA* codierte Listeriolysin O (LLO) (Beauregard et al., 1997; Bielecki et al., 1990). Dabei sind die membranpärforierenden Eigenschaften von LLO abhängig von zwei Faktoren: (1) Cholesterin in der Phagosomenmembran und (2) einem sauren pH-Wert (Ray et al., 2009). Dass *L. monocytogenes* innerhalb der ersten 6 h nach Infektionsbeginn aus dem Phagosom ausbricht, spiegelt sich in der Menge des freigesetzten IFN β s wider (Abbildung 13D). Hingegen brechen *hlyA*-defiziente *L. monocytogenes* nicht aus dem Phagosom aus (Beauregard et al., 1997; Birmingham et al., 2008), kommen daher auch nicht in Kontakt mit dem Makrophagenzytosol und stimulieren entsprechend auch keine IFN β -Freisetzung. Interessanterweise war die Konzentration an extrazellulärem IFN β bei wildtypischen *L. monocytogenes* und virulenten *R. equi*, die LLO unter der Kontrolle eines *hsp60* Promotors

exprimieren, gleich hoch (Abbildung 13D). Um dem Phagosom zu entkommen und ins Zytosol zu gelangen, benötigt *L. monocytogenes* einen phagosomalen pH-Wert von 4,9 – 6,7 (Beauregard et al., 1997). Dadurch, dass der phagosomale pH-Wert zu Infektionsbeginn durch *R. equi* 103+ auf 6,2 absinkt, aber bereits 2 h p.i. auf pH 7,2 ansteigt und für die restliche Dauer der Infektion bei diesem pH bleibt (von Bargen et al., 2011), waren LLO-verursachte Membranläsionen nicht zwangsläufig zu erwarten. Allerdings war vermutlich die Kombination aus der Dauer des Experiments (24 h) und die geringe Restaktivität von LLO bei einem annähernd neutralem pH-Wert (Beauregard et al., 1997) ausreichend, um Läsionen in RCV-Membranen zu induzieren. Dass es einige Zeit dauert bis LLO-induzierte Löcher in RCV-Membranen entstehen, zeigt sich unter anderem daran, dass 103+(LLO) trotz einer verringerten VapA Expression wildtypische RCVs etabliert, in denen das Bakterium repliziert (Abbildung 13A und B). Somit stellt dieser Stamm ein wertvolles Werkzeug für die Untersuchung der zytosolischen Überlebensfähigkeit von virulenten *R. equi* dar.

Ähnlich wie in der hier vorliegenden Arbeit, wurden in der Studie von Vail et al. (2021) die Typ I-IFN Immunantwort von mit *R. equi* infizierten Makrophagen und die Galektin-Rekrutierung an RCVs untersucht. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass *R. equi* (1) eine Typ I-IFN Immunantwort ähnlich wie *M. tuberculosis* stimuliert und dass (2) während der *R. equi* Infektion verstärkt Gal3, Gal8 und Gal9 an und in RCVs rekrutiert werden (Vail et al., 2021). Somit steht die Studie von Vail et al. (2021) im Widerspruch mit der hier vorliegenden Arbeit. Ein möglicher Einflussfaktor für die unterschiedlichen Ergebnisse könnten die verwendeten Bakterienstämme (33701 bei Vail et al. (2021), 103 in dieser Arbeit) sein. Außerdem untersucht die Studie von Vail et al. (2021) ausschließlich die Typ I-IFN Immunantwort von virulenten *R. equi* zu früheren Zeitpunkten der Infektion (4 und 8 h p.i.), allerdings ohne eine Positivkontrolle für eine aktivierte Immunantwort wie durch *L. monocytogenes* oder eine Negativkontrolle wie hitzegetötete oder avirulente *R. equi* in ihren Versuchsaufbau zu integrieren. Bei der Analyse der Gal3-Rekrutierung an RCVs in der Arbeit von Vail et al. (2021) übersteigt die verwendete MOI in den repräsentativen Bildern vielfach die von den Autoren angegebene MOI von 5, wodurch zu frühen Zeiten der Infektion bereits viel VapA im Makrophagen vorhanden ist. Dadurch könnten aufgrund der hohen VapA Proteinmenge Membranläsionen entstehen und Gal3 an RCVs rekrutiert werden. Außerdem beschreiben Vail et al. (2021) nicht genau, wie die Quantifizierung der Kolo-kalisation zwischen Gal3, Gal8 oder Gal9 mit *R. equi* durchgeführt wurde und verwenden erneut keine angebrachten Kontrollen, wodurch die Aussagekraft ihrer Ergebnisse nicht nachvollziehbar ist. Warum zu einem früheren Zeitpunkt einer *R. equi* Infektion also mehr Gal3 an RCV-Membran lokalisiert (Vail et al., 2021) als zu einem späteren Infektionszeitpunkt (Abbildung 14), an dem durch die höhere Proteinmenge an VapA und die höhere Bakterienzahl auch potentiell mehr Membranläsionen entstehen könnten, sollte zukünftig näher untersucht werden. Die hier

vorliegende Arbeit ergänzt die Studie von Vail et al. (2021) und hilft bei der Einordnung der Ergebnisse im Vergleich zu avirulenten *R. equi* bzw. Membranläsionen-induzierenden *L. monocytogenes* (Abbildung 13D).

Vermutlich entstehen Läsionen in RCV-Membranen, die zu einer Gal3-Rekrutierung an die Vakuolen und zum Kontakt der Bakterien mit dem Makrophagenzytosol führen (Abbildung 14), selten und VapA-unabhängig. Vermutlich ist es sogar so, dass *R. equi* auf eine intakte RCV-Membran für eine intrazelluläre Vermehrung angewiesen ist. In der Studie von Beuzón et al. (2002) zeigten die Autoren einen toxischen Effekt von isoliertem Makrophagenzytosol auf *S. enterica*. Die Inkubation mit Zytosol aus infizierten Makrophagen führt zu einem Sterben von *S. enterica*, wohingegen sich die Bakterien in Zytosol aus uninfizierten Makrophagen stark vermehren (Beuzón et al., 2002). Zurückzuführen ist das Sterben auf den zytosolischen mikrobiziden Faktor Ubiquicidin (Hiemstra et al., 1999), der aus mit IFN γ aktivierten Makrophagen isoliert werden kann und *in vitro* antimikrobielle Aktivität gegen *S. enterica*, *E. coli*, *S. aureus* und *L. monocytogenes* zeigt (Hiemstra et al., 1999). In einer Zelle ist das Zytosol durch millimolare Mengen an Glutathion ein stark reduzierendes Milieu (Kosower & Kosower, 1978). Daher ist es nicht verwunderlich, dass *R. equi* stark in isoliertem Makrophagenzytosol ohne Glutathion und L-Cystein wächst, wohingegen eine Simulation des reduzierenden Milieus durch Glutathion und L-Cystein zu einem verringerten Wachstum führt (Abbildung 11). Eine Zugabe von Glutathion alleine hatte keine Auswirkungen auf das Wachstum von *R. equi* im Standard-Wachstumsmedium (Daten nicht gezeigt). Dass sich *R. equi* dennoch etwas in reduzierendem Zytosol vermehrt, könnte an der Verdünnung des Zytosols und dadurch auch der Verdünnung des zytosolischen mikrobiziden Faktors Ubiquicidin (Hiemstra et al., 1999) liegen, wodurch dessen Wirkung vermutlich abgeschwächt wird. Zum anderen könnte es sein, dass weniger Ubiquicidin im Zytosol unbehandelter Makrophagen, aus denen für diesen Versuch Zytosol isoliert wurde, als im Zytosol IFN γ -aktivierter Makrophagen, wie in der Studie von Beuzón et al., (2002) verwendet wurde, vorliegt.

Um *in vivo* Bakterien in Kontakt mit Wirtszytosol zu bringen und die Auswirkungen auf das intrazelluläre Wachstum der Bakterien zu untersuchen, werden Bakterien genetisch modifiziert und mit *hlyA* ausgestattet, mit Hilfe dessen sie aus ihrem Phagosom ausbrechen können (zusammengefasst in Goebel & Kuhn, 2000). Allerdings reagieren Bakterien unterschiedlich auf den Kontakt mit Wirtszytosol: *B. subtilis* und nicht-pathogene *E. coli*, die aufgrund der LLO Expression dem Phagosom entkommen, können sich im Makrophagenzytosol vermehren, wohingegen LLO-exprimierende *Salmonella dublin* dies nicht können (zusammengefasst in Goebel & Kuhn, 2000). Bei virulenten *R. equi* führt der Kontakt mit dem Makrophagenzytosol aufgrund LLO-induzierter Löcher zum Sterben der Bakterien (Abbildung 13C). Im Verlauf einer Infektion mit *R. equi* 103+ (LLO) exprimieren die Bakterien wahrscheinlich kontinuierlich LLO,

das allerdings lange unter den unvorteilhaften Bedingungen (pH-Wert 7,2) (von Bargen et al., 2009) benötigt dürfte, um Membranläsionen zu induzieren (Beauregard et al., 1997; Glomski et al., 2002). Erst zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt der Infektion, an dem sich RCVs bereits vollständig etabliert haben und *R. equi* sich mehrfach geteilt hat, dürfte ausreichend LLO zur Membranperforierung vorhanden gewesen sein, wodurch die Bakterien in Kontakt mit mikrobiziden Faktoren des Zytosols kommen. Abgestorbene *R. equi* werden nur langsam abgebaut und sind daher noch für Stunden mikroskopisch nachweisbar (von Bargen et al., 2009), was die Unterschiede der beiden Vermehrungsexperimente (robuste Vermehrung mikroskopisch bestimmt und CFU-Assay) erklären kann (Abbildung 13A und C).

Angenommen, dass eine intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* durch VapA-induzierte Membranlöcher beeinträchtigt werden könnte, führt das zu einer potentiellen Bindung zwischen der ESCRT-Maschinerie und der RCV. Kleine Membranlöcher werden über Tsg101 und Alix, ESCRT-III und Vps4 repariert (Radulovic et al., 2018; Skowrya et al., 2018). Bei einer Deletion bzw. einem *Knockdown* von ESCRT-I würden beschädigte Lysosomen über Lysophagie, einem speziellen Autophagiemechanismus, von makroautophagischen Membranen umschlossen und zu intakten Lysosomen transportiert werden (Jia et al., 2020; Papadopoulos et al., 2020). Untersucht man den Einfluss von ESCRT und Makroautophagie auf die RCV-Membranintegrität bzw. die intrazelluläre Vermehrung, hat ein ESCRT *Knockdown* (Alix, Chmp3 oder Vps4) keinen Einfluss auf die IFN β -Freisetzung und somit auf die Integrität der RCV-Membran (Abbildung 15). Dass sich die IFN β -Konzentrationen durch LLO-induzierte Membranlöcher in den beiden in dieser Arbeit durchgeführten ELISAs unterscheiden (Abbildung 13D und 15), liegt vermutlich im Unterschied der Zelllinien (RAW264.7 vs J774E Makrophagen) begründet. RAW264.7 Makrophagen exprimieren im Gegensatz zu J774 Makrophagen kein *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* (ASC) (Hirano et al., 2017; Pelegrin et al., 2008). ASC aktiviert das *nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing receptor protein 3* (NLRP3) und bildet zusammen mit AIM2, NLRP3 und Pro-Caspase-1 das AIM2 Inflammasom (zusammengefasst in Zito et al., 2020). Kommen beispielsweise intrazelluläre *L. monocytogenes* in Kontakt mit Wirtszytosol, werden die Bakterien durch NLRP3 erkannt und es wird anschließend eine IFN β Immunantwort über das AIM2 Inflammasom stimuliert (Kim S, 2010). Somit fällt in RAW264.7 Makrophagen eine IFN β -Immunantwort bei zytosolisch vorliegenden Bakterien schwächer aus.

Auch ein genereller Einfluss der Makroautophagie auf die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* kann weitgehend ausgeschlossen werden, da zum einen *R. equi* sich in ATG5 *Knockdown* Makrophagen genauso stark vermehrt wie in wildtypischen Makrophagen (Abbildung 16C). Diesen Makrophagen fehlt somit ein zentrales Protein der Makroautophagie (zusammengefasst in Ye et al., 2018). Zum anderen vermehren sich *R. equi* auch in

Makrophagen, in denen Autophagie pharmakologisch durch eine Behandlung mit 3-Methyladenin (3-MA), einem PI3K Inhibitor, inhibiert ist, stark (von Bargen et al., 2019).

Trotz eines kombinierten ESCRT und ATG5 *Knockdowns*, also einer Bedingung, bei der Löcher in der RCV-Membran nicht repariert (Skowrya et al., 2018) und anschließend das Kompartiment nicht autophagisch abgebaut werden kann (Koerver et al., 2019), replizierten *R. equi* 103+ genauso gut wie bei einem alleinigen ESCRT *Knockdown* (Abbildung 9 und 16D). Dass zudem die intrazelluläre Vermehrung ESCRT-I unabhängig ist, belegt, dass ESCRT nicht über Membranreparatur, sondern einen anderen zellulären Prozess auf RCVs wirkt.

Es bleibt dennoch zu berücksichtigen, dass, obwohl ATG5 ein wichtiges Protein der Makroautophagie- und somit auch der Lysophagiemaschinerie ist (Jia et al., 2020), auch ATG5-unabhängige Formen der Makroautophagie beschrieben wurden (Honda et al., 2020; Nishida et al., 2009). Außerdem könnten VapA-induzierte RCV-Membranläsionen auch über einen alternativen Reparaturmechanismus behoben werden. Radulovic et al. (2022) beschreiben einen ER-vermittelten Reparaturprozess beschädigter Lysosomen, der vollständig ESCRT-unabhängig verläuft. Allerdings wird in derselben Studie auch gezeigt, dass Lysosomen durch freies Cholesterol im Lysosomenlumen ESCRT-unabhängig vor Membranschäden geschützt werden (Radulovic et al., 2022). Daher ist es am wahrscheinlichsten, dass die hohe Konzentration an freiem Cholesterol in RCVs (Abbildung 24) die Vakuolen vor Membranläsionen schützt, wodurch die Bedeutung der Membranaufrechterhaltung losgelöst von ESCRT in Zusammenhang gebracht werden kann.

4.4. Ursprünge der IVVs

Eine weitere Möglichkeit, wie ESCRT die Zusammensetzung der RCV und damit potentiell das intrazelluläre Überleben von *R. equi* beeinflussen könnte, ist über die Bildung von IVVs. Wie in früheren Studien beschrieben (von Bargen et al., 2019), akkumulieren aufgrund fehlender Degradation Vesikel in den RCVs. Im folgenden Abschnitt werden daher potentielle Ursprünge dieser IVVs näher diskutiert.

Der erste Typ von IVVs ähnelt den ILVs der endosomalen MVBs. Diese meist perfekt runden ILVs mit einem Durchmesser von ~50 nm enthalten Membranproteine, die für den lysosomalen Abbau bestimmt sind (Stuffers et al., 2009). Die Aufnahme der Membranproteine an den späten Endosomen erfolgt über den kanonischen ESCRT-Weg, d.h. in Abhängigkeit von ESCRT-0, -I, -II, -III und Vps4 oder über aktives Alix, das direkt ESCRT-III an die Endosomenmembran rekrutiert und die Aufnahme von LBPA induziert (Larios et al., 2020; Vietri et al., 2020). Es können aber auch ESCRT-I- und ESCRT-II-unabhängig ILVs gebildet werden, indem HD-PTP die Bindung zwischen Stam2 (ESCRT-0) und Chmp4b (ESCRT-III)

vermittelt (Ali et al., 2013). Wie Alix besitzt HD-PTP eine Bro1 und eine Prolin-reiche Domäne, die für die Interaktion mit ESCRT-0 und ESCRT-III notwendig sind (Ichioka et al., 2007). HD-PTP wurde wie Alix im Zusammenhang mit der Sortierung von ubiquitiniertem EGFR in ILVs an späten Endosomen beschrieben (Ali et al., 2013). Eine andere Art der ILVs, sogenannte Exosomen, wird ebenfalls an der Endosomenmembran Tsg101- und Alix-abhängig gebildet. Exosomen lassen sich kaum von rezeptorenhaltenden oder LBPA-enthaltenden ILVs unterscheiden, da auch sie runde Vesikel mit einem Durchmesser von 30 nm bis 100 nm darstellen. Normalerweise sind Exosomen für den Transport aus der Zelle bestimmt, können aber auch zur Degradation in Lysosomen transportiert werden (Y. Zhang et al., 2019). Es zeigte sich, dass sich im Lumen von RCVs viele unterschiedlich große IVVs befinden, die darüber hinaus teilweise mit einem monoklonalen LBPA-Antikörper anfärben (Abbildung 19B) (von Bargen et al., 2019). Dabei gelangt LBPA, das stark in der RCV akkumuliert, durch kleine LAMP1-positive Vesikel, vermutlich MVBs, zur RCV (Abbildung 19B). Auch wenn ein Alix *Knockdown* die Zahl an kleinen Vesikeln, d.h. vermutlich ILVs, in der RCV reduziert (Abbildung 18), hat der *Knockdown* keinen Einfluss auf das Wachstum von *R. equi* in Makrophagen (Abbildung 9). Somit scheint dieser Vesikeltyp keinen Hauptnutzen für das intrazelluläre *R. equi* zu besitzen, sondern sammelt sich aufgrund der nicht funktionellen Degradation (siehe 4.1.) in den Vakuolen an.

IVVs mit einem Durchmesser von ca. 150 nm könnten beschädigte Lysosomen sein, die durch Lysophagie in die RCV gelangt sind (Papadopoulos et al., 2020; Steinman et al., 1976). Dies würde auch die Färbung von Vesikel im RCV-Lumen mit dem lysosomalen Markerprotein LAMP1 erklären (Maejima et al., 2013; von Bargen et al., 2019). Es erscheint jedoch unwahrscheinlich, dass diese IVVs durch Lysophagie erworben werden, da LAMP1-positive Vesikel in der RCV unabhängig von ATG5 vorhanden sind (Abbildung 19D).

In RCVs akkumuliert Cholesterin (Abbildung 24). Dadurch könnten Einschlüsse in Form von membranösen Strukturen gebildet werden (Philips et al., 2008). Es ist jedoch eher unwahrscheinlich, dass Cholesterin geschlossene Membranen bildet und somit für die Vesikelbildung in der RCV verantwortlich ist. Allerdings kann ein gestörtes Cholesterin-*Trafficking*, z.B. durch die Behandlung von Zellen mit U18666A, zur Bildung von Cholesterin-gefüllten multilamellären Strukturen führen (Elgner et al., 2016; Lajoie et al., 2005). Da die Bildung multilamellärer Strukturen durch Cholesterinakkumulation in Lysosomen induziert werden kann (Lajoie et al., 2005), sind ähnliche Strukturen in RCVs und VCVs (Abbildung 3, 18, Anhang 4, 7) vermutlich ein Anzeichen für ein gestörtes Cholesterin-*Trafficking*. Aufgrund dieser Strukturen könnten die RCVs eher als atypisches LSD-Kompartiment einer NPC-Erkrankung angesehen werden.

Ein vierter Typ an Vesikel, die vermutlich den geringsten Teil der IVVs ausmachen, ist

bakteriellen Ursprungs. Es handelt sich dabei um extrazelluläre Vesikel, die bei Gram-positiven Bakterien in der Nährstoffrekrutierung, Stressantwort, Transport von Virulenzfaktoren und Invasion der Wirtsimmunantwort involviert sind (Brown et al., 2015). Ähnlich wie *M. tuberculosis* produziert auch *R. equi* proteinenthaltende extrazelluläre Vesikel, durch die eine Immunantwort von Makrophagen über den TLR2 induziert wird (Prados-Rosales et al., 2011; Xu et al., 2022). In vorangegangenen Studien über bakterielle extrazelluläre Vesikel wurden die Vesikel, als auch in der hier vorliegenden Arbeit, anhand ihrer Größe gruppiert (Nagakubo et al., 2021; Xu et al., 2022). *R. equi* produziert zu gleichen Teilen kleine (< 100 nm) und mittlere (100 - 200 nm) extrazelluläre Vesikel und nur circa 5 - 10 % der Vesikel sind ≥ 200 nm (Nagakubo et al., 2021; Xu et al., 2022). Dabei hat das Virulenzplasmid keinen Einfluss auf die Anzahl oder Größe der extrazellulären Vesikel (Xu et al., 2022). Somit ist es nicht verwunderlich, dass selbst bei ein *Vps4 Knockdown*, der zumal nicht vollständig ist, weiterhin IVVs in RCVs vorliegen (Abbildung 14).

Allerdings gibt es noch einen fünften potentiellen Ursprung der IVVs, der bislang in der Literatur kaum beschrieben worden ist: Mikroautophagie an der Phagolysosomenmembran. Dadurch, dass eine RCV ein hochdynamisches Kompartiment ist und die Vesikel sehr schnell abgeschnürt werden, ist es höchst unwahrscheinlich, dass die Vesikelabschnürung lichtmikroskopisch beobachtet werden kann. Nichtsdestotrotz konnte in dieser Arbeit eine Vesikelbildung an der RCV durch Lebend-Zell-Mikroskopie zu einem frühen Zeitpunkt in der Infektion beobachtet werden (Abbildung 20A). Hierfür war der optimale Zeitpunkt 8 h p.i., da die RCV zu diesem Zeitpunkt (1) bereits mehrere Stunden pH neutral ist (von Bargen et al., 2011), (2) so Vesikel darin akkumulieren können und (3) die Bakterien anfangen zu replizieren (von Bargen et al., 2009; Zink et al., 1987). Gleichzeitig sind RCVs zu diesem Zeitpunkt noch nicht komplett Vesikel-gefüllt (Abbildung 20A und B), was die Dynamik und Bewegungsfreiheit der IVVs sicherlich begünstigt. Die Bewegung der Vesikel erscheint zudem nicht ungerichtet, sondern gerichtet stattzufinden. Daher könnte es sein, dass ähnlich wie beim Protozoen Parasit *T. gondii*, Mikrotubuli in die pathogenenthaltende Vakuole ragen und dort mit internen Vesikeln interagieren (Walker et al., 2008). Durch die Immunfärbung von Tubulin und Gegenfärbung mit LAMP1 wurde allerdings keine Mikrotubuli in der RCV gefunden (Abbildung 20B), die eine gerichtete Bewegung der Vesikel entlang dieser erklären würde. Möglicherweise ist die Vesikeldynamik in der RCV durch Fusion- und Fissionsereignisse (Saffi & Botelho, 2019) oder Membrandeformationen durch Zug/Druck von Mikrotubuli bei der Organellenbewegung (Bonifacino & Neefjes, 2017) zu erklären. Allerdings müsste in zukünftigen Studien die Ursache der Vesikelbewegung geklärt werden. Dass Mikroautophagie an der RCV Membran stattfindet, wurde weiter durch TEM Aufnahmen belegt, die zum einen Vesikelausstülpung an der limitierenden Membran, aber auch fingerartige Ausstülpungen ins Lumen der RCV zeigen. In beiden Fällen scheint das Lumen der Vesikel mit zytosolischen

Inhalten gefüllt zu sein (Abbildung 20C, D, E). Dass über fingerartige Ausstülpungen Vesikel gebildet werden, ist bislang in der Literatur kaum beschrieben. Ein seltenes Beispiel dafür findet sich in *Dictyostelium*, in dem 15 min nach U18666A Behandlung, einem Inhibitor von NPC1, drei unterschiedliche Arten von Vesikelbildung beobachtet wurden, darunter diese fingerartigen Ausstülpungen (Marchetti et al., 2004).

Auch wenn Vesikelbildungen an der RCV eher selten zu beobachten waren, lässt sich mit Hilfe der TEM Aufnahmen auch eine quantitative Aussage über die IVVs treffen. Durch das *Silencing* von *vps4a* und *vps4b* wird der wichtigste Proteinkomplex für eine funktionsfähige ESCRT-Maschinerie entfernt (Vietri et al., 2020), was bedeutet, dass alle ESCRT-abhängigen zellulären Prozesse von einem *Vps4 Knockdown* beeinträchtigt sind. Wie bereits zuvor dargelegt wurde (Abschnitt 4.3.), ist durch diesen *Knockdown* nicht die Membranintegrität der RCV und somit die geschützte Replikationsnische von *R. equi* gefährdet. Vielmehr wirkt sich der *Knockdown* auf alle ESCRT-abhängigen Vesikelbildungen aus. Anders als der *Knockdown* von Alix, der die Bildung von endosomalen ILVs (< 80 nm) beeinflusst, reduziert ein *Vps4-Knockdown* die Gesamtzahl an IVVs (Abbildung 18). Somit werden durch ESCRT-III und *Vps4* noch andere Vesikel als ILVs gebildet, die für die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* notwendig sind. Auch bei einer fehlenden ESCRT-Maschinerie werden ILVs gebildet, die sich allerdings aufgrund ihrer unregelmäßigen Größe und der verringerten Anzahl von den typischen ILVs unterscheiden (Stuffers et al., 2009). Nimmt man die Lebend-Zell-Mikroskopie, die im TEM beobachteten seltenen Vesikelausstülpungen an der limitierenden RCV-Membran und den Einfluss von *Vps4* auf die RCV-enthaltenden Vesikeltypen zusammen, legt das einen ESCRT-abhängigen Mechanismus der Vesikelbildung an der RCV Membran nahe. Da Mikroautophagie als lysosomaler Abbauprozess, der zytoplasmatische Fracht direkt an einer Membran einschließt und in das Lumen abschnürt, definiert ist (Li et al., 2012), stellt die Bildung von Vesikel an der RCV-Membran somit ein seltenes Beispiel für Mikroautophagie an (Phago-)Lysosomen dar.

In einer aktuellen Studie wurde zum ersten Mal ein konservierter ESCRT-vermittelter Aufnahmeweg lysosomaler Membranproteine beschrieben (W. Zhang et al., 2021). RNF152 und LAPTM4A werden durch Ubiquitinierung für den lysosomalen Abbau markiert und ESCRT-I (Tsg101, Alix), ESCRT-III und *Vps4* abhängig in Vesikel verpackt (W. Zhang et al., 2021). Weil Vesikel stark mit der Fracht angereichert sind, würde die Inhibition der Ubiquitinierung auch die Vesikelbildung verhindern (Frankel & Audhya, 2018). Durch eine Behandlung von Makrophagen mit dem pharmakologischen Proteasominhibitor MG132, der aufgrund des inhibierten proteasomalen Abbaus freies Ubiquitin in der Zelle reduziert, wird neben der verringerten Anzahl an LAMP1-positiven Vesikeln in RCVs auch die Vermehrung von *R. equi* verringert (Abbildung 17C, D). Auch *R. equi* besitzt ein bakterielles Proteasom

(Tamura et al., 1995), das durch MG132 potentiell inhibiert werden könnte. Dass die pharmakologische Substanz allerdings direkt das Wachstum von *R. equi* beeinflusst, kann ausgeschlossen werden (Abbildung 17A). Beides, die verringerte Vermehrung von *R. equi* bei einem Hgs-*Knockdown* (Abbildung 9) und bei MG132 Behandlung (Abbildung 17C), legt nahe, dass bestimmte Membranproteine der RCV für die Aufnahme ins Phagolysosom ubiquitiniert werden und die mikroautophagisch gebildeten Vesikel die Vermehrung virulenter *R. equi* beeinflussen. Auch wenn MG132 die Zahl der IVVs gemessen an der LAMP1-Färbung in der RCV verringerte (Abbildung 17D), kann bislang nicht sicher gesagt werden, dass LAMP1 das direkte Substrat der Ubiquitinierung ist und über Mikroautophagie aufgenommen wird. LAMP1 wurde in der Studie über Lysosomen-assoziierte Mikroautophagie von Zhang et al. (2021) nicht untersucht, weil nur Membranproteine, die im Lysosom schnell degradiert werden, näher analysiert wurden, zu denen LAMP1 allerdings nicht zählt (W. Zhang et al., 2021). Nichtsdestotrotz bleibt die LAMP1-Färbung der IVVs der bislang beste Marker für die hier beschriebene Mikroautophagie an RCV-Membranen.

Um zukünftig LAMP1-Vesikel und weitere Proteine (Chmp3, Vps4, etc.) in RCVs besser identifizieren zu können, könnte ein neuer mikroskopischer Ansatz verwendet werden: die korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie (*correlative light and electron microscopy*, CLEM). CLEM beinhaltet multiple Aufnahmetechniken, die kombiniert werden, um fluoreszenzmarkierte Moleküle in ihrer ultrastrukturellen Umgebung zu erfassen (Kommnick et al., 2019; Loginov et al., 2022). Somit bietet diese Mikroskopiertechnik für die Analyse aller intrazellulärer Pathogene einen hohen Mehrwert.

4.5. *R. equi* verwendet IVVs als bevorzugte Nahrung

Die Fähigkeit von Makrophagen ESCRT-abhängig Vesikel zu bilden, korrelierte mit der intrazellulären Vermehrung von *R. equi* (Abschnitt 4.4.). Bereits Zink et al. (1987) beobachteten in RCVs Vesikel und Mikrovillistrukturen, die die Autoren in Zusammenhang mit der Aufnahme von zytosolischen Faktoren für die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* brachten. Auch das intrazelluläre Pathogen *T. gondii* verwendet die Wirts-ESCRT-Maschinerie, um Vesikel an der Pathogen-enthaltenden Vakuole zu bilden, über die zytosolische Proteine für die Aminosäureherstellung aufgenommen werden (Rivera-Cuevas et al., 2021; Y. Wang et al., 2020). Um den Einfluss der Vesikelbildung auf die Vermehrung von *R. equi* zu untersuchen, wurde eine kationische Aminosteroid-Substanz verwendet, die das lysosomale Protein NPC1 inhibiert und so den Übertritt von lysosomalem Cholesterol ins ER und Richtung Plasmamembran blockiert (F. Lu et al., 2015). Die Behandlung mit U18666A führt zur Akkumulation von Cholesterol in den Lysosomen und inhibiert über die folgende Cholesterolverarmung des Rests der Zelle die Bildung von ILVs an MVBs (Sahu et al., 2011).

Tatsächlich korrelierte die U18666A-induzierte Verringerung an IVVs und somit die LAMP1-Färbung von Vesikel im RCV-Lumen mit gehemmtem bakteriellem Wachstum (Abbildung 21, 22B und C). Dennoch enthält die RCV in U18666A-behandelten Makrophagen noch wenige Vesikel (Abbildung 21D), was vermutlich in den zuvor erwähnten extrazellulären Vesikeln von *R. equi* begründet liegt (Abschnitt 4.4.). Da *R. equi* auf die Metabolisierung von Lipiden und organischen Säuren (z.B. Acetat, Laktat und Palmitat) spezialisiert ist (Letek et al., 2010), fehlen dem Pathogen vermutlich wichtige Nährstoffe, wenn keine IVVs vorhanden sind. Somit ist es nicht verwunderlich, dass der Wachstumsdefekt der avirulenten *R. equi* in VCVs durch Zugabe von Acetat, Laktat oder Palmitat als zusätzliche Kohlenstoffquelle teilweise wiederhergestellt werden konnte (Abbildung 22B und D). Aber auch *R. equi* 103+ vermehrte sich durch die Zugabe einer externen Kohlenstoffquelle signifikant besser (Abbildung 27). Zusammen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass ein Effekt oder womöglich der Haupteffekt von U18666A der Entzug von Nährstoffen für die intrazellulären Bakterien ist. Obwohl U18666A in der Literatur als Hemmstoff von ILV Biogenese an MVBs beschrieben wird (Elgner et al., 2016), könnte die Substanz auch über das gestörte Cholesterolgeleichgewicht in Membranen die Abschnürungs- und Fusionsereignisse der RCV-Membran beeinflussen und so Mikroautophagie an Phagolysosomen inhibieren (Lange et al., 1998; Yang et al., 2016). Es ist wichtig hier zu berücksichtigen, dass die pH-Wert senkende Eigenschaft von U18666A (Appelqvist et al., 2011) der Grund für den Vermehrungsdefekt in RCVs sein könnte. Dem steht allerdings entgegen, dass nach U18666A-Behandlung der Makrophagen RCVs nicht häufiger mit LT kolokalisieren (Abbildung 22G) und daher einen pH-Wert > 6,0 besitzen (von Bargen et al., 2009).

Überraschend war, dass auch ohne U18666A-Behandlung Cholesterol in der RCV akkumulierte (Abbildung 24). Eine Anreicherung von Cholesterol wurde bislang häufig in Kombination mit lysosomalen Speicherkrankheiten wie der Niemann-Pick Typ C-Krankheit beschrieben, bei der Mutationen in NPC1 oder NPC2 dazu führen, dass Cholesterol nicht aus Lysosomen transportiert werden kann (Rosenbaum & Maxfield, 2012). Ein saurer pH-Wert erleichtert die Cholesterolbindung an NPC2 und die NPC1-NPC2-Interaktion (Friedland et al., 2003; Infante et al., 2008), sowie den Transfer von der NPC1 N-terminalen Domäne durch den Tunnel des Transmembranproteins, wodurch Cholesterol aus dem Lysosom transportiert wird (Qian et al., 2020). Davis et al. (2021) zeigten, dass ein NPC1-Defekt mit einem Proteolysedefekt der Lysosomen einhergeht. Dieser Proteolysedefekt ist nicht auf einen neutralen pH-Wert der Lysosomen zurückzuführen, da NPC1-defiziente Lysosomen durch die sich auf der limitierenden Membran befindende v-ATPase azide sind (Elrick et al., 2012). Im Einklang mit einer eingeschränkten proteolytischen Aktivität der NPC1-defizienten Lysosomen sind einige luminalen Hydrolasen wie Cathepsin Z verringert (Davis et al., 2021). Zudem ist weniger *lysosomal acidic lipase* (LIPA), welche aus LDL-freigesetztes Cholesterol

deesterifiziert oder β -Galaktosylceramidase (GALC), die für den Abbau von Glykanen und Sphingoglykanen verantwortlich ist, in NPC1-defizienten Lysosomen vorhanden (Davis et al., 2021). Neben dem Einfluss auf die Proteolysekapazität besitzen die beiden abundanten Cathepsine B und L womöglich eine wichtige Rolle im Cholesterol-*Trafficking*, da eine Inhibition der beiden Cathepsine zur Akkumulation von NPC1 in Lysosomen führt (Cermak et al., 2016).

Ein Blick in die Proteomanalyse verrät, dass die Proteinkonzentrationen an NPC1 um die Hälfte und NPC2 um den Faktor 20 durch eine rVapA Behandlung an Phagolysosomen (VCVs) reduziert werden (Abbildung 6). Zusätzlich könnte aufgrund der Erhöhung des pH-Werts von VCVs bzw. RCVs durch (r)VapA (von Bargaen et al., 2011, 2019) der Transfer des Cholesterols von NPC2 zu NPC1 in diesen Kompartimenten erschwert werden (Friedland et al., 2003; Infante et al., 2008), wodurch es zur Akkumulation von Cholesterol kommen könnte. Außerdem sind in VCVs, ähnlich zu NPC1-defizienten Lysosomen, die Proteinmengen an Cathepsinen (Abbildung 5), LIPA (Daten nicht gezeigt) und GALC (Daten nicht gezeigt) stark verringert. Die stark verringerten Proteinmengen an Cathepsin B und L (Abbildung 5) führen vermutlich zur Akkumulation von NPC1 (Cermak et al., 2016) in VCVs bzw. RCVs. Das hätte zur Folge, dass weniger NPC1 auf der limitierenden RCV/VCV-Membran vorhanden wäre, um Cholesterol aus diesen Kompartimenten zu transportieren. Erste Analysen der NPC1-Lokalisierung in *R. equi* infizierten Makrophagen zeigten, dass das Transmembranprotein tatsächlich in RCVs lokalisiert (unveröffentlichte Daten, AG Haas). Somit ist die Akkumulation von unverestertem Cholesterol in RCVs/VCVs vermutlich auf die verringerte Proteolysekapazität und einen annähernd neutralen/deutlich erhöhten pH-Wert der Kompartimente zurückzuführen. Dadurch kann eine RCV als ein atypisches Phagolysosom mit Charakteristika einer NPC-Krankheit bezeichnet werden.

Verglich man die Akkumulation des freien Cholesterols in mit U18666A induzierten Vakuolen mit der von RCVs, war kein Unterschied in der Intensität zu erkennen (Abbildung 24). Dass virulente *R. equi* das in RCVs enthaltende Cholesterol in größerem Maßstab verwenden, wenn keine anderen Nährstoffe durch IVVs zur Verfügung stehen, war verwunderlich. Man hätte erwartet, dass beides, IVVs und Cholesterol, gleichermaßen zur intrazellulären Vermehrung von *R. equi* beiträgt. Um indirekte Effekte durch die Cholesterol-ähnliche Struktur von U18666A weitgehend auszuschließen, wurde parallel Imipramin eingesetzt. Imipramin ist eine pharmakologische Substanz, die in der Depressionstherapie verwendet wird und sich strukturell grundlegend von U18666A unterscheidet (Lange et al., 1997). Imipramin wirkt durch direkte NPC1-Inhibierung oder Inhibierung des Cholesterolstoffwechselwegs (Lange et al., 2000). Als auch U18666A verursacht Imipramin in Kombination mit VapA die Bildung eines großen, fast IVV-armen (Daten nicht gezeigt) und vermutlich mit Cholesterol angereicherten

Kompartiments. Da sowohl U18666A als auch Imipramin das Wachstum intrazellulärer *R. equi* gleich stark verringern (Abbildung 22B und E), kann man auf einen generellen Zusammenhang zwischen internen Vesikeln und Cholesterin in den RCVs schließen. Dass sich die Akkumulation von freiem Cholesterin in einer Pathogenvakuole auf das intrazelluläre Überleben von Bakterien auswirken kann, ist anhand von *C. burnetii* untersucht (Howe & Heinzen, 2006). Howe und Heinzen (2006) zeigten, dass eine Imipramin-induzierte Cholesterinakkumulation in CCVs das Pathogenwachstum hemmt (Howe & Heinzen, 2006). Außerdem kann *C. burnetii* Cholesterin im Gegensatz zu *R. equi* oder *M. tuberculosis* nicht metabolisieren (Clemente et al., 2022; Letek et al., 2010; van der Geize et al., 2007). Somit unterscheidet sich *C. burnetii* von *R. equi* nicht nur der Pathogen-enthaltenden Vakuole oder in der Rolle von ESCRT bei der Etablierung der Vakuole, sondern auch in der Reaktion des Bakteriums auf die Anreicherung von freiem Cholesterin in der Vakuole (zusammengefasst in Tabelle 9).

Kombiniert man folgende Beobachtungen, (1) *R. equi* 103+ vermehrt sich bei vielen IVVs und Cholesterin in der RCV stark, (2) fehlen IVVs, ist die intrazelluläre Vermehrung von 103+ reduziert und (3) fehlen IVVs, d.h. Cholesterin ist die einzige Kohlenstoffquelle in der RCV, nimmt der Cholesterin Gehalt in der RCV ab, dann sprechen diese dafür, dass virulente *R. equi* bevorzugt IVVs metabolisieren, aber ihren Metabolismus auf Cholesterin umstellen können. Avirulente *R. equi* replizieren hingegen nur intrazellulär, wenn IVVs vorhanden sind oder extern Kohlenstoffquellen zugefüttert werden.

Vergleicht man zudem die TEM-Aufnahmen von RCVs und VCVs (Abbildung 3, 18) fällt auf, dass sich die Vakuolen trotz ihrer großen Ähnlichkeit doch etwas in ihrer IVV-Zusammensetzung unterscheiden. VCVs beinhalten mehr und vor allem größere Vesikel (Abbildung 3). Dass die Vesikel in den RCVs vermeintlich reduziert vorliegen (Abbildung 18) unterstreicht die These, dass *R. equi* Vesikel als Nährstoffquelle verwendet. Ob *R. equi* einen bestimmten Vesikeltyp bevorzugt oder welche Fracht die Vesikel enthalten, sollte in zukünftigen Arbeiten näher analysiert werden.

4.6. Der intrazelluläre Cholesterinmetabolismus von *R. equi* ist abhängig vom Virulenzplasmid (von *virR* und *virS*)

Das unterschiedliche Wachstumsverhalten von virulenten und avirulenten *R. equi* liegt anscheinend im Metabolismus von unverestertem Cholesterin in RCVs begründet. Der erste Schritt der bakteriellen Cholesterinverwertung ist die Oxidation zu Cholst-4-en-3-on, die durch die Cholesterinoxidase katalysiert wird. *R. equi* besitzt drei chromosomal codierte Cholesterinoxidasen von denen die extrazelluläre Cholesterinoxidase E (ChoE) die Hauptoxidase ist (Letek et al., 2010; Navas et al., 2001; Pei et al., 2006). Ähnlich wie bei

M. tuberculosis oder *M. avium* wurde anfänglich angenommen, dass ChoE wichtige Funktionen für die Membrandegradation und somit für die Ernährung des Bakteriums im Makrophagen besitzt (Graham & Clark-Curtiss, 1999; Pei et al., 2006; Zu Bentrup et al., 1999). Zudem führt eine Mutation in *choE* zum Verlust der Hämolyseaktivität von *R. equi* mit Sphingomyelinase-produzierenden Bakterien, wie *S. aureus* (CAMP-Assay), was die membranabbauenden Eigenschaften der Oxidase weiter unterstreicht (Navas et al., 2001). Allerdings ist ChoE für die Virulenz von *R. equi* in unbehandelten Makrophagen unbedeutend (Pei et al., 2006). Unter der Hypothese, dass die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* primär von den IVVs abhängt, könnte das bedeuten, dass ChoE keine Funktion in der IVV-Verwertung besitzt. Somit könnte ChoE für die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* benötigt werden, wenn dem Bakterium ausschließlich Cholesterol als Kohlenstoffquelle zur Verfügung stünde. Allerdings zeigte sich, dass das Wachstum von *R. equi* sowohl *in vitro* (Abbildung 26A) als auch *in vivo* (Abbildung 26B) ChoE-unabhängig war. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass der initiale Schritt in der Cholesterolverwertung, in dem ChoE beteiligt ist, von einer der anderen beiden Cholesteroloxidasen, die chromosomal codiert sind (Letek et al., 2010), substituiert werden kann.

Das Bakterium *Rhodococcus jostii*, ein naher genetischer Verwandter von *R. equi*, besitzt ein Gen-Cluster, das für den Cholesterol-Abbau und die Cholesterol-Aufnahme verantwortlich ist: das *mce4*-Operon (McLeod et al., 2006; van der Geize et al., 2007). Das *mce*-Cluster besitzt hohe Ähnlichkeit mit den *mce*-Genen von *M. tuberculosis* (van der Geize et al., 2007), die wichtige Virulenzfaktoren dieses Bakteriums sind (Cole et al., 1998; Rengarajan et al., 2005). Ein Teil des *mce4*-Operons sind *supAB*, die translatiert zur Permease-Untereinheit des Cholesterol-Aufnahmesystems gehören (van der Geize et al., 2007). Für das *in vitro* Wachstum in Cholesterol-haltigem Medium sind sowohl für *R. jostii* als auch für *M. tuberculosis* die Gene *mce4abcdef* und *supAB* essentiell (Pandey & Sassetti, 2008; van der Geize et al., 2007). Die Anwesenheit von Cholesterol als einzige Kohlenstoffquelle im Kulturmedium führt bei *M. tuberculosis* allerdings nicht dazu, dass die Expression von SupAB und Mce4A-4F hochreguliert wird (Pawelczyk et al., 2021). Allerdings sind das Wachstum und die Cholesterolaufnahme von *M. tuberculosis* durch Deletionen von *mce4abcdef* oder *supAB* signifikant beeinträchtigt (Pawelczyk et al., 2021). Daher postulierten Pawelczyk et al. (2021), dass neben SupAB als Haupttransporter für Cholesterol, ein weiteres weniger effizientes System für die Aufnahme von Sterolen vorhanden sein müsse.

Van der Geize et al. (2008) identifizierte *supAB* und *mce4* auch im Genom von *R. equi* und zeigte, dass eine Deletion von *supAB* zu keinem Bakterienwachstum in Cholesterol-haltigem Wachstumsmedium bei 30 °C führte. Daher wäre zu erwarten gewesen, dass sich virulente *R. equi* Δ *supAB* nicht intrazellulär vermehren, wenn ausschließlich Cholesterol als

Kohlenstoffquelle in RCVs vorhanden ist. Allerdings vermehren sich virulente *R. equi* Δ *supAB* intrazellulär geringfügig, wenn in den RCVs ausschließlich Cholesterol und wenige IVVs als potentielle Nährstoffquelle vorliegen, das aber schlechter, als der wildtypische Stamm (Abbildung 26B). Da die Zugabe von Laktat die Vermehrung von *R. equi* RE1 Δ *supAB* erhöht (Abbildung 26), lässt das auf einen Nährstoffmangel der Bakterien in RCVs schließen. Eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Wachstum von *R. equi* RE1 Δ *supAB* *in vitro* (van der Geize et al., 2008) und *in vivo* (Abbildung 26B) könnte die unterschiedliche Temperatur (30 °C *in vitro* versus 37 °C *in vivo*) sein. Bei der Durchführung des gleichen *in vitro* Wachstumsexperiments nach van der Geize et al. (2008), nur eben bei 37 °C, konnte gezeigt werden, dass *R. equi* RE1 Δ *supAB* geringfügig in Medium mit Cholesterol als einziger Kohlenstoffquelle wuchs (Abbildung 26A). Dieser Effekt könnte durch ein weniger effizientes System für die Aufnahme von Sterolen, wie Pawełczyk et al. (2021) es für *M. tuberculosis* postulieren, hervorgerufen werden. Zudem müsste dieses System temperaturabhängig reguliert werden. In *R. equi* sind VirR und VirS als temperatur- und pH-abhängiger Transkriptionsregulator und Antwort-Regulator eines Zwei-Komponenten-Systems bekannt (Coulson et al., 2015; Russell et al., 2004). Das würde auch erklären, weshalb sich plasmidlose *R. equi* in U18666A-behandelten Makrophagen nicht vermehren (Abbildung 22B). Dass die intrazelluläre Vermehrung in cholesterolreichen und IVV-armen Vakuolen tatsächlich durch die plasmidcodierten Faktoren VirR oder VirS reguliert wird, zeigt die Vermehrung von avirulenten *R. equi*, die zusätzlich VirR und VirS exprimieren, in U18666A-behandelten Makrophagen (Abbildung 25). Da anscheinend ein potentielles Sterolaufnahmesystem temperaturabhängig (VirR-abhängig) reguliert wird, wäre es interessant zu sehen, wie sich *R. equi* RE1 Δ *supAB* in einem Vermehrungsexperiment bei 30 °C, wie in Haubenthal et al. (2023) beschrieben, verhalten würde.

Zusammen sind VirR und VirS für die Regulation von 18 % der chromosomalen Gene verantwortlich (Coulson et al., 2015). Betrachtet man die von Coulson et al. (2015) identifizierten Gene, die VirR und VirS-abhängig reguliert werden, findet man weder *supA* (REQ_07430), *supB* (REQ_07440), *mce4a* (REQ_36780), *mce4b* (REQ_36770), *mce4c* (REQ_36760), *mce4d* (REQ_36750), *mce4e* (REQ_36740), *mce4f* (REQ_36730) noch *fadE30* (REQ_07030) (van der Geize et al., 2011). Da Coulson et al. (2015) ihre Transkriptom-Analyse von *R. equi* aus BHI-Schüttelkulturen generiert haben, könnte es sein, dass sich das Transkriptom von aus Makrophagen isolierten *R. equi* deutlich unterscheidet.

Welche Folgen könnte nun ein nicht funktioneller Cholesterolmetabolismus für intrazelluläre *R. equi* haben? Propionyl-CoA ist ein Hauptmetabolit, der während des Cholesterolabbaus freigesetzt wird und zudem kritisch für den *M. tuberculosis* Metabolismus ist (Savvi et al., 2008). Propionyl-CoA wird im Methylcitratzyklus (MCC), im Methylmalonylweg (MMP) und bei

der biosynthetischen Herstellung von methylokettigen Polyketidlipiden metabolisiert (Wilburn et al., 2018). Der Vorläufermetabolit, welcher im nächsten Schritt des Cholesterolabbaus zu Propionyl-CoA umgewandelt wird, entsteht durch das Enzym FadE30 (Wilburn et al., 2018). Von FadE30, aber auch von anderen Enzymen des Cholesterolabbaus, existieren in anderen Actinomyceten neben *M. tuberculosis* Homologe, unter anderem auch in *R. equi* (van der Geize et al., 2011; Wilburn et al., 2018). Eine Deletion von *fade30* hat zur Folge, dass sich 5'OH-HIP-CoA ansammelt, kein Propionyl-CoA entsteht und so die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* um den Faktor 1000 reduziert wird (van der Geize et al., 2011). Die gleiche verringerte Vermehrung beschreibt van der Geize et al. (2011) bei *ipdAB* Deletionen. *IpdAB* katalysieren die Umwandlung von HIP in 5'OH-HIP-CoA, die somit einen Schritt vor FadE30 im Abbauweg von Cholesterol wirken (van der Geize et al., 2011). Kann diese Umwandlung nicht mehr stattfinden, führt das zu einer Vergiftung des Bakteriums an den Intermediaten, wie bei *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* und *R. jostii* gezeigt wurde (Crowe et al., 2017). Darauf ist auch der beobachtete Vermehrungsdefekt von *R. equi* durch FadE30 und *IpdAB* in der Studie von van der Geize et al. (2011) zurückzuführen. Obwohl in dieser Studie eine humane histiozytische Lymphom Zelllinie (U-937) verwendet wurde, in der sich *R. equi* ohnehin kaum vermehrte, ist eine *ipdAB* Mutante *in vivo* (in Pferdefohlen) attenuiert (van der Geize et al., 2011), was die Bedeutung dieser Gene für die Pathogenese von *R. equi* klar unterstreicht. Zusammenfassend könnte das bedeuten, dass die chromosomalen Gene *supAB* und potentiell auch *ipdAB* und *fade30* den intrazellulären Cholesterolmetabolismus beeinflussen.

Um in zukünftigen Experimenten eine Aussage über einen funktionierenden Cholesterolmetabolismus und die Vitalität intrazellulärer *R. equi* treffen zu können, könnte die Bildung von Lipidkörperchen in den Bakterien herangezogen werden. Für einen quantitativen Ansatz eignet sich die von Nazarova et al. (2019) beschriebene Methode. Mit Hilfe eines fluoreszenten Palmitats (Bodipy Palmitat) wird bei intrazellulären *M. tuberculosis* die Aufnahme von Fettsäuren mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Nazarova et al., 2019). In dieser Arbeit wurde mit *R. equi* bereits etwas Vergleichbares durchgeführt (Abbildung 23C). Auch zu einem späten Zeitpunkt der Infektion wird fluoreszentes Bodipy Palmitat phagozytiert und lokalisiert nach 3 h Inkubation in virulenten *R. equi* (Abbildung 23C). Mit Hilfe dieses Ansatzes und ggf. mit Fluorochrom-markiertem Cholesterol könnte zukünftig der intrazelluläre Cholesterolmetabolismus von *R. equi* weiter erforscht werden. Aber auch über TEM könnte zukünftig anhand der Anzahl an Lipidkörperchen in den Bakterien die Vitalität dieser bestimmt werden. Beispielsweise enthalten virulente *R. equi* in U18666A-behandelten Makrophagen, also einer cholesterolreichen und IVV-armen Umgebung, viele Lipidkörperchen, wohingegen avirulente *R. equi* keine bzw. wenige besitzen (Abbildung 21).

4.7. Die Wachstumstemperatur von *R. equi* beeinflusst die anschließende Makrophageninfektion

Virulente *R. equi* exprimieren kein VapA, wenn sie bei 30 °C in BHI Medium wachsen, allerdings jedoch bei 37 °C (G. A. Byrne et al., 2007). Interessanterweise ist die Vermehrung von *R. equi* in Makrophagen unabhängig von der Temperatur, bei der die Bakterien herangezogen werden (Haubenthal et al., 2023). Der einzige Unterschied besteht in der Kinetik der pH-Neutralisierung des Phagosoms. *R. equi*, die bei 37 °C gewachsen sind, erhöhen den pH der Phagosomen innerhalb weniger Minuten nach Infektion, wobei nach einer Stunde nur circa 20 % der *R. equi*-enthaltenden Phagosomen LT positiv sind (Haubenthal et al., 2023). Dadurch wird der starke pH-neutralisierende Effekt von VapA im frühen Stadium der Phagosomenreifung unterstrichen. Im Gegensatz dazu neutralisierten virulente *R. equi*, die beim Infektionsstart kein VapA besaßen, allmählich nach 4 h, deutlicher erst 5 h bis 6 h den pH-Wert der Phagosomen (Abbildung 28A und B). Der Anstieg des phagosomalen pH-Werts korrelierte mit der VapA Expression der Bakterien, die ebenfalls 4 h bis 5 h nach Infektionsbeginn VapA auf der Bakterienoberfläche trugen (Abbildung 28C). Diese Ergebnisse stehen auch im Einklang mit der Expressionskinetik von VapA. Werden *R. equi*, die bei 30 °C in BHI angezogen wurden, auf 37 °C gebracht, benötigen die Bakterien ebenfalls 4 h bis VapA biochemisch nachweisbar ist (von Bargaen, 2010). Plasmidlose *R. equi* können den harschen Bedingungen im Phagolysosom für einige Stunden widerstehen und sind nach 7 h noch in der Lage durch rVapA intrazellulär zu replizieren (Haubenthal et al., 2023). Somit überleben die Bakterien einige Stunden im sauren Milieu, bis VapA aufgrund der Temperatur und des pH-Werts exprimiert wird.

Die meisten *R. equi*-Impfstudien haben VapA-abgeleitete Antigene wie *vapA* DNA, gereinigtes VapA, Teile von VapA oder VapA-angereicherte Bakterienextrakte verwendet (Giles et al., 2015). Um den Impfschutz von Tieren zu testen, werden diese meist mit 37 °C herangezogenen *R. equi* infiziert (Dawson et al., 2011). Dies hat zur Folge, dass die Bakterien bereits reichliche VapA auf der Bakterienoberfläche tragen (Takai et al., 1992). Durch die Impfung wird *R. equi* über Antikörper erkannt, opsoniert und der intrazelluläre Abbau begünstigt (Dawson et al., 2011; Sanz et al., 2014). Aufgrund der hier vorliegenden Ergebnisse ist es unwahrscheinlich, dass virulente *R. equi*, die in staubigen Böden leben, bereits VapA besitzen, wenn sie von Fohlen inhaliert werden (Haubenthal et al. 2023). Ob auch aktuelle Impfstoffe in der Lage wären, VapA-lose virulente *R. equi* bei einer Infektion zu erkennen und effizient zu eliminieren, bleibt fraglich (Haubenthal et al. 2023). Bei zukünftigen Impfstoffentwicklungen sollte daher stets berücksichtigt werden, dass höchstwahrscheinlich virulente *R. equi* bei einer Infektion des Wirts kein VapA auf der Bakterienoberfläche tragen

(Haubenthal et al. 2023).

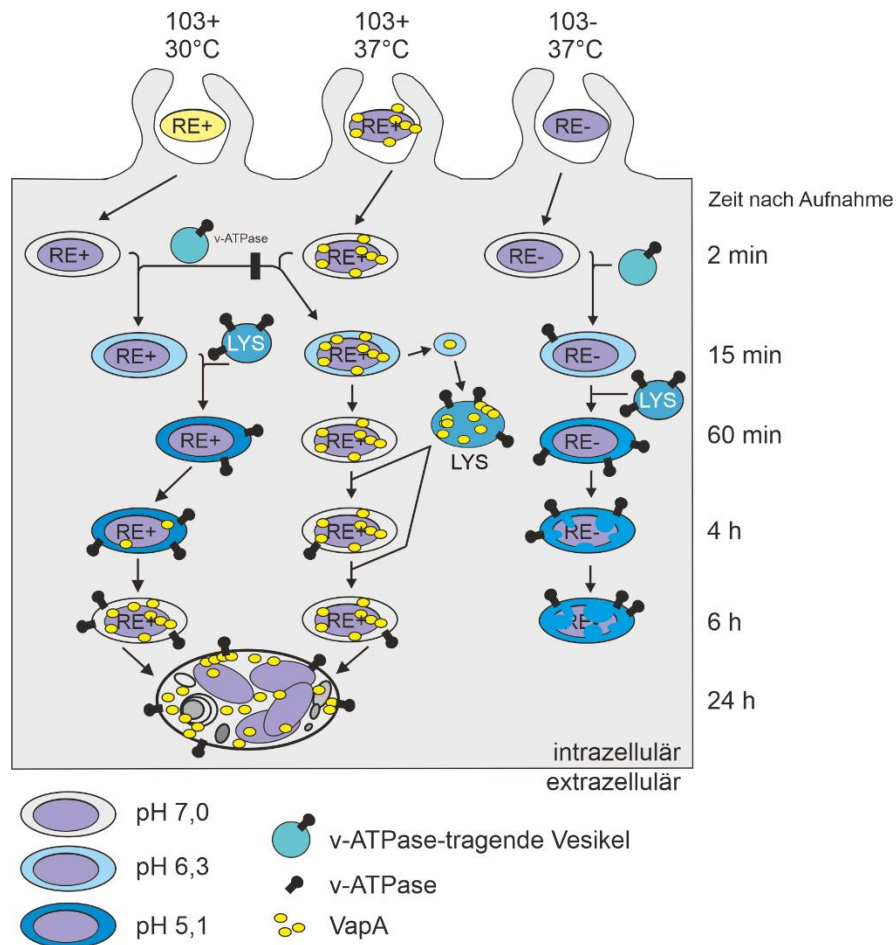


Abbildung 31: Abhängigkeit der Wachstumstemperatur von *R. equi* auf die folgende Makrophageninfektion. Infizieren avirulente *R. equi*, die bei 30/37 °C in BHI Medium angezogen wurden, Makrophagen, akquirieren die Phagosomen schnell die v-ATPase durch Fusion mit unbekanntem Vesikeln. Die v-ATPase säuert die Phagosomen vermutlich vor der Fusion mit Lysosomen an (von Bargen et al., 2019). Durch die Fusion mit Lysosomen bilden sich saure Phagolysosomen. Diese enthalten viele hydrolytische Enzyme, die für das Abtöten und den Verdau der Bakterien verantwortlich sind. Werden virulente *R. equi* bei 37 °C vorinkubiert, tragen diese bereits VapA auf der Bakterienoberfläche, wenn sie von Makrophagen phagozytiert werden. Die Fusion mit v-ATPase-positiven Vesikeln ist reduziert und VapA verteilt sich ausgehend vom Phagosom durch das endozytische System. Allerdings ist diese Reduzierung nicht relevant für den Ausgang der Infektion. VapA neutralisiert den pH der Phagosomen und Lysosomen, indem es die Membran für Protonen permeabilisiert. So vermehren sich die Bakterien intrazellulär, obwohl sie sich in einem modifizierten Phagolysosom befinden. Alternativ, wenn *R. equi* bei 30 °C in BHI herangezogen werden, besitzen die Bakterien kein VapA auf ihrer Oberfläche, das Phagosom akquiriert die v-ATPase vollständig und die Bakterien landen in einem Phagolysosom, das sauer und voller hydrolytischer Enzyme ist. Unter diesen Bedingungen wird die VapA Expression stark induziert. VapA neutralisiert den pH der Phagosomen und verwendet den lysosomalen Inhalt als Nährstoffe für die Vermehrung. Sobald der phagosomale pH nahezu neutral ist, wird die VapA Expression stark reduziert. Adaptiert aus Haubenthal et al., 2023.

4.8. Das Bakterium *R. defluvii* ist potentiell pathogen

Obwohl rVapA im Wachstumsmedium von Makrophagen intrazelluläre Vermehrung von plasmidlosen *R. equi* unterstützt, profitieren andere Rhodokokken wie *R. pyridinivorans* oder *R. coprophilus* sowie andere apathogene Bakterien wie *Bacillus subtilis* oder *E. coli* nicht von rVapA und replizieren daher nicht in Makrophagen (Haubenthal et al., 2023). Selbst *R. rhodochrous* oder *R. erythropolis*, die sporadisch mit humanen Krankheiten assoziiert sind, replizieren nicht intrazellulär durch rVapA (Haubenthal et al., 2023). In Einklang mit Wright et al. (2018) und Sangkanjanavanich et al. (2017) zeigt sich, dass die Ansäuerungshemmung und die Etablierung einer großen Vakuole nicht ausreichend sind, um das Phagosom der Makrophagen zur einer Replikationsnische für Bakterien umzubauen (Haubenthal et al., 2023). Da *R. defluvii* nicht bei 37 °C wuchs (Abbildung 29A), wurde er in dem oben genannten Vermehrungsassay nicht berücksichtigt (Haubenthal et al., 2023). Zum ersten Mal wurde *R. defluvii* im Abwasser eines Bioreaktors identifiziert (Kämpfer et al., 2014). Das Bakterium ist der nächste Verwandte zu *R. equi*, da ihre Genome 83 % durchschnittliche Nukleotididentität teilen (Anastasi et al., 2016). Im Vergleich liegt dieser Wert zwischen verschiedenen *R. equi* Stämmen bei ~99 % (Anastasi et al., 2016). Für *R. defluvii* sind bislang keine *vap* Gene und auch kein extrachromosomales Plasmid beschrieben. Die daraus resultierenden Probleme, (1) kein Wachstum bei 37 °C und (2) keine Virulenzgene, wurden in einem speziellen experimentellen Aufbau durch die Kultivierung der infizierten Makrophagen bei 30 °C und durch rVapA im Kulturmedium umgangen (Abbildung 29B und C). Dadurch konnte das intrazelluläre Wachstumsverhalten von *R. defluvii* untersucht werden. Bei diesen veränderten Temperaturen (30 °C) waren die Makrophagen vollständig in der Lage, eine Infektion mit plasmidlosen *R. equi* zu kontrollieren (Abbildung 29B). Dass avirulente *R. equi* durch rVapA auch bei 30 °C intrazellulär replizierten, legt einen grundlegenden Virulenzmechanismus nahe (Haubenthal et al., 2023).

Dieses Infektionsexperiment ist nach aktuellem Wissensstand das erste, das die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* bei nicht-*vapA*-exprimierenden Bedingungen untersucht (Haubenthal et al., 2023). Dass *R. equi* 103+ bei 30 °C geringe Mengen an VapA exprimierten, die für die Etablierung einer charakteristischen RCV und für die Vermehrung der Bakterien ausreichten (Abbildung 29B), war mehrfach überraschend. Da bei dieser Temperatur *vapA* nicht in Flüssigkulturen mit Wachstumsmedium exprimiert wird (B. A. Byrne et al., 2001; G. A. Byrne et al., 2007; Giguère et al., 1999; Kakuda et al., 2015), wäre keine intrazelluläre Vermehrung der Bakterien zu erwarten gewesen. Auch wenn erst kürzlich durch unsere Arbeitsgruppe publiziert wurde, dass in Plastikröhrchen die *vapA* Expression bei 30 °C induziert werden kann (Hansen et al., 2022), ist dieser Vergleich vermutlich weit gegriffen. Dass eine geringe VapA Proteinmenge für die intrazelluläre Vermehrung bei 30 °C ausreicht (Abbildung 29D), wohingegen ein ähnliches Proteinlevel bei 37 °C nicht ausreicht, war verwunderlich (von

Bargen et al., 2009). Mithilfe von LT wurde hier gezeigt, dass virulente *R. equi* bei 30 °C ausreichend VapA exprimieren, um den phagolysosomalen pH-Wert zu neutralisieren, wohingegen 103- in azide Phagolysosomen der Makrophagen transportiert werden (Abbildung 29E). Vermutlich ist für die pH-Neutralisierung nur das VapA auf der Bakterienoberfläche und in der direkten Umgebung relevant (Haubenthal et al., 2023). Bei einer Infektion bei 37 °C werden große Mengen an VapA freigesetzt und durch die Wirtszelle mittels Vesikel *Trafficking* transportiert (von Bargen et al., 2019). Zudem ist bei 37 °C die Menge an transportiertem VapA vermutlich größer als das bakterienassoziierte VapA, wodurch das starke Signal im Immunblot resultiert (Abbildung 29D). Man könnte annehmen, dass andere Vap Proteine VapA funktionell komplementieren könnten. Wenn das zuträfe, dann müssten *vapA* Deletionsmutanten bei 30 °C LT-negativ sein, was sie aber nicht waren (Abbildung 29E). Auch vermehrten sich diese Mutanten bei 30 °C nicht (Abbildung 29F). Daher ist das geringe VapA Proteinlevel ausreichend, dass *R. equi* 103+ bei 30 °C repliziert. Warum bei 37 °C allerdings so viel mehr *vapA* exprimiert wird, muss zukünftig weiter untersucht werden.

Die Beobachtung, dass die Infektionstemperatur das intrazelluläre Wachstum von *R. defluvii* beeinflusst, unterstützt die Hypothese der „thermalen Restriktion“. Diese Hypothese besagt, dass die energiezehrende hohe Körpertemperatur von gleichwarmen Tieren teilweise eine Konsequenz aus der Exposition mit schädlichen Mikroorganismen ist. Die Temperatur hat sich dadurch auf ein Level angehoben, bei dem die meisten gefährlichen Mikroorganismen nicht wachsen können. In einer Studie mit Pilzen wurde gezeigt, dass von den 4800 untersuchten Isolaten, die bei 30 °C wuchsen, pro Grad Celsius Temperaturerhöhung 6 % das Wachstum einstellten (Robert & Casadevall, 2009). Berücksichtigt man, dass die Körpertemperatur von Pferdefohlen in den ersten Wochen ihres Lebens ~ 38,5 °C beträgt (Kang et al., 2022), eine Temperatur bei der *R. equi* gut wächst (Takai et al., 1994), erklärt das, warum *R. equi* ein Pathogen wurde, *R. defluvii* oder andere ähnliche Bakterien dagegen jedoch nicht (Haubenthal et al., 2023). Ähnliche Belege für „thermale Restriktion“ sind bislang rar. Lediglich bei *M. marinum*-infizierten Makrophagen wurde Ähnliches beobachtet. Im Gegensatz zu *R. defluvii* ist *M. marinum* ein (Fisch-)Pathogen, das bei 33 °C eine deutlich verringerte Generationszeit gegenüber 37 °C besitzt und bei 33 °C in Makrophagen repliziert (Ramakrishnan & Falkow, 1994).

Dass *R. defluvii* bereits als Auslöser einer Pneumonie in einem AIDS-Patienten identifiziert wurde (Canetti et al., 2019), scheint der Hypothese und unseren Daten zur thermalen Restriktion von *R. defluvii* zu widersprechen. Dennoch handelt es sich bei dem identifizierten Isolat vermutlich nicht um *R. defluvii*, sondern um *R. equi*. Die damalige Identifizierung wurde mit einem Fragment der 16S rDNA durchgeführt (Canetti et al., 2019). Bei einer erneuten

Kontrolle stellte sich heraus, dass die verwendete Sequenz nicht nur identisch zu *R. defluvii*, sondern auch zu *R. equi* war (persönliche Korrespondenz mit Diana Canetti, San Raffaele Univeristät, Mailand, Italien). Durch die hier verwendete PCR-Analyse (Abbildung 30), die auf der 16S rDNA basiert, und dem intrazellulären Wachstumsverhalten bei 37 °C (Daten nicht gezeigt), kann deutlich zwischen *R. equi* und *R. defluvii* unterschieden werden. Die Daten belegen, dass es sich bei dem humanen Isolat eher um ein *R. equi* als ein *R. defluvii* handelt. Somit ist es eher unwahrscheinlich, dass *R. defluvii* Krankheiten in Säugern auslösen kann (Haubenthal et al., 2023).

4.9. Schlussfolgerung und Modell

Virulente *R. equi* etablieren im Verlauf einer Makrophageninfektion eine stark geschwollene RCV, die zudem reich an Cholesterol ist und wenig hydrolytische Enzyme wie z.B. Cathepsine enthält. Durch die Fusion von Lysosomen mit der RCV lokalisiert nahezu das gesamte LAMP1 in/an der Vakuole. Außerdem akkumulieren zahlreiche IVVs unterschiedlicher Größe im Lumen der Pathogenvakuole. Kleine homogene Vesikel (< 80 nm) werden abhängig von ESCRT-I, ESCRT-III und Vps4 an den endosomalen MVBs gebildet und gelangen über heterotypische Fusion in das Lumen der RCV. Größere Vesikel (≥ 80 nm) werden vermutlich ESCRT-III- und Vps4-abhängig über Mikroautophagie an der RCV-Membran gebildet. LAMP1 wird von der limitierenden RCV-Membran in die mikroautophagischen Vesikel abgeschnürt, wodurch die RCV-Membran LAMP1-negativ wird. Ob LAMP1 selektiv für die Aufnahme in IVVs markiert wird, beispielsweise über Ubiquitin, bleibt Gegenstand zukünftiger Forschung. Unter diesen Bedingungen besteht in der RCV ein großes Nährstoffangebot für die lipidliebenden *R. equi*, die sich in dieser Replikationsnische stark vermehren. Die RCV ist eine ganz besondere Replikationsnische, da sie Charakteristika eines Lysosoms einer NPC-Krankheit besitzt, wie beispielsweise eine geringe Proteolysekapazität oder eine hohe Konzentration an unverestertem Cholesterol. Durch rVapA entsteht ebenfalls eine RCV-ähnliche Vakuole. In diesem künstlich erzeugten Kompartiment vermehren sich auch avirulente *R. equi* intrazellulär.

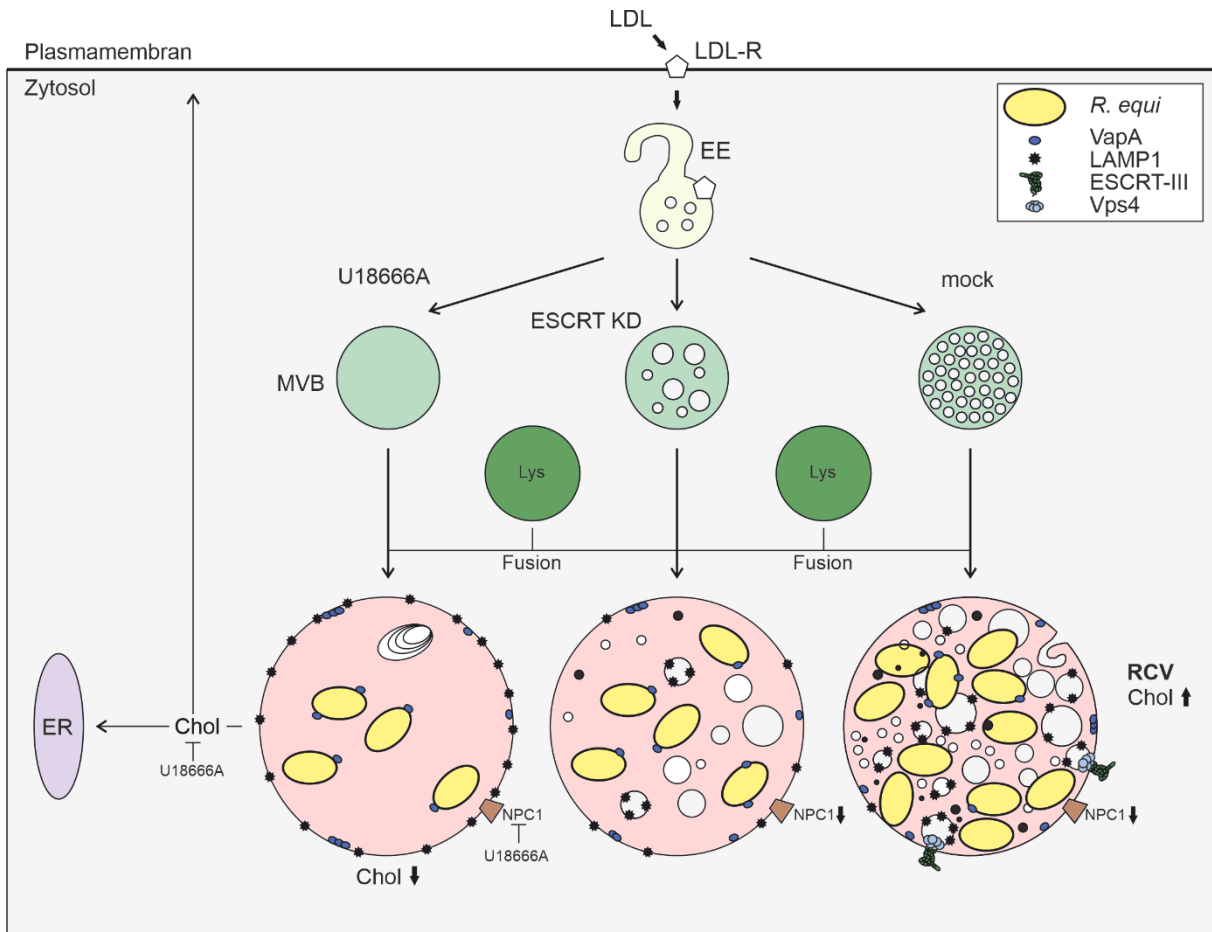


Abbildung 32: Arbeitshypothese der RCV Biogenese. In Makrophagen etablieren virulente *R. equi* eine RCV, die viele unterschiedliche intravakuoläre Vesikel (IVVs) enthält. Zahlreiche kleine, homogene Vesikel werden über die Fusion von MVBs mit der RCV akquiriert. Allerdings findet auch ESCRT-III- und Vps4-abhängige Mikroautophagie an der RCV-Membran statt, wodurch LAMP1-positive Vesikel in die Vakuole abgeschnürt werden. Neben den Cathepsinen sind auch die Cholesteroltransporter NPC1 und NPC2 in der RCV gegenüber wildtypischen Lysosomen stark reduziert. Dadurch akkumuliert Cholesterin in der RCV. Die Bakterien metabolisieren überwiegend die IVVs für eine effiziente intrazelluläre Vermehrung. Durch den NPC1-Inhibitor U18666A wird das Cholesterin-Trafficking des Makrophagen gestört, wodurch keine ILVs an den MVBs gebildet werden. Außerdem werden durch U18666A keine mikroautophagischen Vesikel mehr an der RCV-Membran gebildet, weshalb LAMP1 ausschließlich auf der limitierenden Membran der RCV lokalisiert. Die fehlenden IVVs führen dazu, dass virulente *R. equi* das akkumulierte Cholesterin in der RCV metabolisieren. Dadurch vermehren sie sich geringfügig in der RCV. Werden im Makrophagen ESCRT-III oder Vps4-assoziierte Gene durch RNAi herunterreguliert, entstehen wenige heterogene Vesikel in den MVBs. Durch heterotypische Fusion von MVBs mit der RCV gelangen unter diesen Bedingungen weniger ILVs als üblich in die RCV. Außerdem verhindert der ESCRT-III bzw. Vps4 Knockdown die Bildung von IVVs an der RCV-Membran. So residieren die virulenten *R. equi* in einer RCV, die wenige IVVs enthält, die sie metabolisieren können. Daher verstoffwechseln sie vermutlich, wie in U18666A-behandelten Makrophagen, Cholesterin für eine eingeschränkte intrazelluläre Vermehrung. Chol, Cholesterin; LDL-R, LDL-Rezeptor.

Der *Knockdown* von ESCRT-III Proteinen oder Vps4 führt unter anderem dazu, dass sich die ILVs der MVBs morphologisch verändern. Die Anzahl der IVVs nimmt ab und sie werden heterogen. Somit gelangen über Fusion der MVBs mit den RCVs auch weniger IVVs in das Lumen der Phagolysosomen. Ein *Knockdown* wirkt sich zudem auf die Mikroautophagie an

der RCV aus und es werden keine Vesikel an der RCV-Membran abgeschnürt. Das führt dazu, dass LAMP1 vermehrt auf der limitierenden Membran der RCV und nicht auf IVVs lokalisiert. Aufgrund der wenigen IVVs vermehren sich die Bakterien schlechter. Obwohl ESCRT-abhängige Membranreparatur eng mit der Pathogenese intrazellulärer Bakterien verknüpft ist, scheint ESCRT nicht in der Aufrechterhaltung der RCV-Membranintegrität, die für das intrazelluläre Überleben von *R. equi* unabdingbar ist, involviert zu sein. Durch die pharmakologische Substanz U18666A, die den lysosomale Cholesteroltransporter NPC1 inhibiert, wird das Cholesterol-*Trafficking* der Wirtszelle vollständig verändert. Vom Lysosom wird kein Cholesterol an die Plasmamembran transportiert und akkumuliert daher in diesem Kompartiment. Das führt zudem dazu, dass keine ILVs an den MVBs gebildet werden. Auch die Mikroautophagie an der RCV wird durch U18666A inhibiert. Somit etabliert sich bei einer Makrophageninfektion von virulenten *R. equi* durch den NPC1-Inhibitor eine nahezu Vesikel-freie RCV, bei der LAMP1 ausschließlich auf der limitierenden Membran lokalisiert. Dadurch, dass den Bakterien keine Vesikel als Nahrungsquelle zur Verfügung stehen, metabolisieren sie das Cholesterol in der RCV. Somit vermehren sich virulente *R. equi* nur geringfügig. Um das Cholesterol der Vakuole als Kohlenstoffquelle zu verwerten, ist *R. equi* allerdings auf sein Virulenzplasmid, genauer auf *virR* und *virS* in der PAI des Plasmids, angewiesen.

Diese Studie bietet erstmals Hinweise auf ESCRT-abhängige Mikroautophagie an einer Bakterien-enthaltenden Vakuole und verknüpft diese mit der intrazellulären Ernährung von Bakterien. Dieser neue Mechanismus ist vergleichend in Tabelle 9 eingeordnet. Obwohl auch *T. gondii* die ESCRT-Maschinerie zur Bildung von Nährstoffen-enthaltenden Vesikeln verwendet, unterscheidet sich der Mechanismus zur Vesikelbildung von *R. equi*. Somit benutzt *R. equi* die wirtseigene ESCRT-Maschinerie auf eine einzigartige Weise (Tabelle 9).

Tabelle 9. Zusammenfassung der ESCRT-Abhängigkeit von intrazellulären Bakterien und Eukaryoten und Einordnung von *R. equi*. „X/X“, wurde untersucht und hatte einen Effekt; „X/-“, wurde untersucht und hatte keinen Effekt; „-“, wurde nicht untersucht. Tabelle adaptiert nach Rivera-Cuevas & Carruthers, 2023.

		Intrazelluläre Bakterien							Intrazellulärer Eukaryot
ESCRT Faktoren		<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	<i>Brucella abortus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Coxiella burnetii</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Rhodococcus equi</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
ESCRT-0	Hrs	X/X	-	-	-	X/X	X/-	X/X	-
	Stam	-	-	-	-	-	-	-	-
ESCRT-I	Tsg101	-	-	X/X	X/X	X/X	-	X/-	X/X
	Vps28	-	-	-	-	-	-	-	X/X
	Vps37	-	-	-	-	-	-	-	X/X
	hMVB12	-	-	-	-	-	-	-	-
	Alix	X/X	-	X/X	-	X/X	-	X/-	X/X
ESCRT-II	EAP45	-	-	-	-	-	-	-	-
	EAP30	-	-	-	-	-	-	-	-
	EAP20	-	-	-	-	-	-	-	-
ESCRT-III	Chmp1	-	-	-	-	X/X	X/X	-	-
	Chmp2	-	-	-	-	-	-	-	-
	Chmp3	-	-	-	-	-	X/X	X/X	-
	Chmp4	X/X	-	-	X/X	X/X	X/X	X/X	X/X
	Chmp5	-	-	-	-	-	X/X	-	-
	Chmp6	-	-	-	-	-	-	-	-
	Chmp7	-	-	-	-	-	X/X	-	-
	Vps4	-	-	-	-	-	X/-	X/X	X/X
Funktion	MVB Biogenese & Exosomen-freisetzung	Ausbrechen aus dem Wirt via MVBS	Ausbrechen aus dem Wirt via Exosomen	Membranreparatur	Wirkt Membranreparatur entgegen; Phagosomenreifung	Membranreparatur	Ernährung über mikroautophagische Vesikel	Ernährung über Vesikel	
Literatur	Read et al., 2022	Spera et al., 2023	Miao et al., 2015	Radulovic et al., 2018	Mehra et al., 2013 Mittal et al., 2018	Dukes et al., 2006; Göser et al., 2020; Kehl et al., 2020	Diese Arbeit	Mayoral et al., 2022; Rivera-Cuevas et al., 2021; Romano et al., 2023	

5. Zusammenfassung

Das Gram-positive Bakterium *Rhodococcus equi* (*R. equi*) ist ein Lungenpathogen, das schwere Bronchopneumonie in jungen Pferdefohlen auslösen kann und auch für immunkomprimierte Menschen, wie AIDS-Patienten, eine ernsthafte Bedrohung darstellt. Das Bakterium wird in der Lunge von Alveolarmakrophagen phagozytiert. Die Makrophagen schützen den Wirt vor eindringenden Mikroorganismen, indem sie diese intrazellulär abbauen. Allerdings etabliert *R. equi* durch sein Plasmid-codiertes Virulenz-assoziiertes Protein A (VapA) eine Replikationsnische im Phagolysosom der Makrophagen, die *R. equi*-enthaltende Vakuole (RCV). VapA neutralisiert den pH-Wert intrazellulärer Kompartimente, indem es die Membranen für Protonen permeabilisiert und zudem die v-ATPase von der Phagolysosomenmembran ausschließt. Außerdem führt die Ansäuerungshemmung zum Anschwellen der RCVs und zur Akkumulation interner Vesikel. Die pH-Neutralisierung scheint für eine effiziente intrazelluläre Vermehrung der kritische Schritt zu sein, da sich plasmidlose *R. equi* durch rekombinantes VapA (rVapA) oder den v-ATPase Inhibitor Bafilomycin A1 (BafA1) in Makrophagen vermehren.

Entscheidende Fragen zu Beginn dieser Arbeit waren, wie genau sich die RCV etabliert und wie sie die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* begünstigt. Da eine Aufreinigung einer intakten RCV zu einem fortgeschrittenen Infektionszeitpunkt methodisch noch nicht etabliert werden konnte, wurde das Proteom von magnetisch gereinigten rVapA-induzierten Vakuolen (VCVs), die optisch den RCVs stark ähneln, mit dem Proteom von BafA1-induzierten Vakuolen (BafVs) und wildtypischen Lysosomen verglichen. In transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen ähnelten sich VCVs und BafVs, da beide interne Vesikel beinhalteten und im Vergleich zu Lysosomen vergrößert waren (VCVs stärker als BafVs). Diese Ähnlichkeit wurde auch durch Daten der Proteomanalyse gestützt. Veränderungen im Proteom waren durch rVapA und BafA1 nahezu übereinstimmend, was auf die pH-Neutralisierung als entscheidenden Schritt in der Vakuolenbiogenese hindeutete. Die gereinigten Vakuolen zeigten eine starke Reduktion an typischen lysosomalen Enzymen, wie Cathepsinen, und eine Anreicherung an *Endosomal Sorting Complex Required for Transport* (ESCRT)-Proteinen.

Der ESCRT-Komplex besteht aus vier Subkomplexen (ESCRT-0, -I, -II, -III) und einer AAA-ATPase Vps4, besitzt vielfältige Funktionen in der Zelle und wird u.a. vom Bakterium *Coxiella burnetii* für dessen Pathogenese benötigt. In dieser Arbeit zeigte sich auch eine ESCRT-Abhängigkeit der intrazellulären Vermehrung von *R. equi*. Sowohl der *Knockdown* als auch die Expression von dominant-negativem Chmp3 (ESCRT-III) bzw. Vps4 reduzierten die intrazelluläre Vermehrung virulenter Bakterien signifikant, wohingegen ESCRT-I keinen Einfluss hatte. Eine der meist beschriebenen Funktionen von ESCRT ist die Lysosomenmembranreparatur, durch die u.a. die Integrität von Pathogen-enthaltenden

Vakuolen aufrechterhalten wird. Da *R. equi* durch VapA protonenpermeable Poren in der RCV-Membran bildet, wurden die Auswirkungen von großen RCV-Membranläsionen, die potentiell bei defizienter ESCRT Membranreparatur entstehen, auf die Bakterien untersucht. Dafür wurden virulente *R. equi* mit dem porenbildenden Toxin Listeriolysin O (LLO) aus *Listeria monocytogenes* ausgestattet. Durch Vermehrungsexperimente in Makrophagen und *in vitro* Wachstumsexperimente in gereinigtem Zytosol konnte erstmals gezeigt werden, dass *R. equi* auf die Membranintegrität der RCV angewiesen war und nicht wie *L. monocytogenes* das Zytosol zum Replizieren bevorzugte. Überraschenderweise beeinflusste ESCRT nicht über Reparatur der RCV-Membran das intrazelluläre Wachstum von *R. equi*. Vielmehr wirkte ESCRT über die Bildung der RCV-enhaltenden intravakuolären Vesikel (IVVs), wie elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten. Während in unbehandelten Makrophagen viele heterogene Vesikel in RCVs vorlagen, reduzierte ein *Vps4 Knockdown* die Anzahl an IVVs stark. Auch die Behandlung von Makrophagen mit U18666A, einem NPC1 Inhibitor, der das Cholesterol-*Trafficking* der Wirtszelle stört, reduzierte die Anzahl an IVVs in RCVs deutlich und verringerte die Vermehrung virulenter *R. equi*. Dass sich *R. equi* dennoch geringfügig vermehrte, war abhängig von einem funktionellen Cholesterolmetabolismus und –transport des Bakteriums. Um das Cholesterol in RCVs zu verwerten, benötigte *R. equi* die Virulenzgene *virR* und *virS*, weswegen sich avirulente *R. equi* in den cholesterolreichen und IVV-armen Vakuolen trotz rVapA nicht vermehrten. Durch die Zugabe einer zusätzlichen Kohlenstoffquelle zu den infizierten und U18666A-behandelten Makrophagen vermehrten sich intrazelluläre *R. equi* deutlich stärker. Somit war das verringerte Wachstum von *R. equi* in ESCRT *Knockdown* oder U18666A-behandelten Makrophagen auf einen Nährstoffmangel, ausgelöst durch fehlende IVVs, zurückzuführen.

Durch die vorliegende Arbeit wurde die RCV näher als atypisches Phagolysosom charakterisiert. Außerdem wurde eine ESCRT-Abhängigkeit in der RCV-Biogenese herausgestellt und der intrazelluläre Metabolismus von *R. equi* näher beschrieben. Diese Studie bietet zudem Hinweise auf ESCRT-abhängige Mikroautophagie an der RCV, einem atypischen Phagolysosom, und verknüpft diese mit der intrazellulären Ernährung und Vermehrung von *R. equi*. Somit präsentiert diese Arbeit eine neue Funktion von ESCRT im intrazellulären Überleben pathogener Bakterien.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit eine Abhängigkeit der *R. equi*-Wachstumstemperatur auf eine folgende Makrophageninfektion gezeigt, die für eine zukünftige Impfstoffentwicklung relevant ist. Außerdem wurde ein pathogenes Potential von *R. defluvii*, dem nächsten genetischen Verwandten von *R. equi*, entdeckt. Dass *R. defluvii* intrazellulär bei 30 °C, aber nicht bei 37 °C replizierte, ist zudem ein seltenes experimentelles Beispiel für die antimikrobielle Funktion der thermalen Restriktion.

6. Literaturverzeichnis

- Adell, M. A. Y., Migliano, S. M., and Teis, D. (2016). ESCRT-III and Vps4: a dynamic multipurpose tool for membrane budding and scission. *The FEBS Journal*, **283**, 3288–3302.
- Akporiaye, E. T., Rowatt, J. D., Aragon, A. A., and Baca, O. G. (1983). Lysosomal response of a murine macrophage-like cell line persistently infected with *Coxiella burnetii*. *Infection and Immunity*, **40**, 1155–1162.
- Ali, N., Zhang, L., Taylor, S., Mironov, A., Urbé, S., and Woodman, P. (2013). Recruitment of UBPY and ESCRT exchange drive HD-PTP-dependent sorting of EGFR to the MVB. *Current Biology*, **23**, 453–461.
- Anastasi, E., MacArthur, I., Scotti, M., Alvarez, S., Giguère, S., and Vázquez-Boland, J. A. (2016). Pangenome and phylogenomic analysis of the pathogenic actinobacterium *Rhodococcus equi*. *Genome Biology and Evolution*, **8**, 3140–3148.
- Appelqvist, H., Nilsson, C., Garner, B., Brown, A. J., Kågedal, K., and Öllinger, K. (2011). Attenuation of the lysosomal death pathway by lysosomal cholesterol accumulation. *American Journal of Pathology*, **178**, 629–639.
- Ashour, J., and Hondalus, M. K. (2003). Phenotypic mutants of the intracellular actinomycete *Rhodococcus equi* created by in vivo *Himar1* transposon mutagenesis. *Journal of Bacteriology*, **185**, 2644–2652.
- Babst, M. (2011). MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Current Opinion in Cell Biology*, **23**, 452–457.
- Bache, K. G., Brech, A., Mehlum, A., and Stenmark, H. (2003). Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *Journal of Cell Biology*, **162**, 435–442.
- Ballabio, A., and Bonifacino, J. S. (2020). Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **21**, 101–118.
- Beauregard, B. K. E., Lee, K., Collier, R. J., and Swanson, J. A. (1997). Listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Journal of Experimental Medicine*, **186**, 1159–1163.
- Bell, K. S., Philp, J. C., Aw, D. W. J., and Christofi, N. (1998). A review: the genus *Rhodococcus*. *Journal of Applied Microbiology*, **85**, 195–210.

- Benoit, S., Benachour, A., Taouji, S., Auffray, Y., and Hartke, A. (2002). H₂O₂, which causes macrophage-related stress, triggers induction of expression of virulence-associated plasmid determinants in *Rhodococcus equi*. *Infection and Immunity*, **70**, 3768–3776.
- Beth Levine, and Guido Kroemer. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, **132**, 27–42.
- Beuzón, C. R., Salcedo, S. P., and Holden, D. W. (2002). Growth and killing of a *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* *sifA* mutant strain in the cytosol of different host cell lines. *Microbiology*, **148**, 2705–2715.
- Bieleckit, J., Youngman, P., Connelly, P., and Portnoy, D. A. (1990). *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene can grow in mammalian cells. *Nature*, **345**, 175–176.
- Birmingham, C. L., Canadien, V., Kaniuk, N. A., Steinberg, B. E., Higgins, D. E., and Brumell, J. H. (2008). Listeriolysin O allows *Listeria monocytogenes* replication in macrophage vacuoles. *Nature*, **451**, 350–354.
- Bonifacino, J. S., and Neefjes, J. (2017). Moving and positioning the endolysosomal system. *Current Opinion in Cell Biology*, **47**, 1–8.
- Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R., and Casadevall, A. (2015). Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology*, **13**, 620–630.
- Byrne, B. A., Prescott, J. F., Palmer, G. H., Takai, S., Nicholson, V. M., Alperin, D. C., and Hines, S. A. (2001). Virulence plasmid of *Rhodococcus equi* contains inducible gene family encoding secreted proteins. *Infection and Immunity*, **69**, 650–656.
- Byrne, G. A., Russell, D. A., Chen, X., and Meijer, W. G. (2007). Transcriptional regulation of the *virR* operon of the intracellular pathogen *Rhodococcus equi*. *Journal of Bacteriology*, **189**, 5082–5089.
- Canetti, D., Riccardi, N., Mastrangelo, A., Cichero, P., Pasciuta, R., Tambussi, G., Castagna, A., and Guffanti, M. (2019). *Rhodococcus defluvii* pneumonia: first reported case in humans. *AIDS*, **33**, 2261–2271.
- Carroll, P., Schreuder, L. J., Muwanguzi-Karugaba, J., Wiles, S., Robertson, B. D., Ripoll, J., Ward, T. H., Bancroft, G. J., Schaible, U. E., and Parish, T. (2010). Sensitive detection of gene expression in mycobacteria under replicating and non-replicating conditions using optimized far-red reporters. *PLoS ONE*, **5**, e9823.

- Cermak, S., Kosicek, M., Mladenovic-Djordjevic, A., Smiljanic, K., Kanazir, S., and Hecimovic, S. (2016). Loss of cathepsin B and L leads to lysosomal dysfunction, NPC-like cholesterol sequestration and accumulation of the key Alzheimer's proteins. *PLoS ONE*, **11**, e0167428.
- Christ, L., Raiborg, C., Wenzel, E. M., Campsteijn, C., and Stenmark, H. (2017). Cellular functions and molecular mechanisms of the ESCRT membrane-scission machinery. *Trends in Biochemical Sciences*, **42**, 42–56.
- Christ, L., Wenzel, E. M., Liestøl, K., Raiborg, C., Campsteijn, C., and Stenmark, H. (2016). ALIX and ESCRT-I/II function as parallel ESCRT-III recruiters in cytokinetic abscission. *Journal of Cell Biology*, **212**, 499–513.
- Clague, M. J., and Urbé, S. (2010). Ubiquitin: same molecule, different degradation pathways. *Cell*, **143**, 682–685.
- Clemente, T. M., Ratnayake, R., Samanta, D., Augusto, L., Beare, P. A., Heinzen, R. A., and Gilk, S. D. (2022). *Coxiella burnetii* sterol-modifying protein Stmp1 regulates cholesterol in the intracellular niche. *MBio*, **13**, e0307321.
- Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., III, C. E. B., Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., ... Barrell, B. G. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, **393**, 537–544.
- Compaine, A., Schein, J. D., Tabb, J. S., Mohan, P. S., and Nixon, R. A. (1995). Limited proteolytic processing of the mature form of cathepsin D in human and mouse brain: postmortem stability of enzyme structure and activity. *Neurochemistry International*, **27**, 385–396.
- Cossart, P., Vicente, M. F., Mengaud, J., Baquero, F., Perez-Diaz, J. C., and Berche, P. (1989). Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: Direct evidence obtained by gene complementation. *Infection and Immunity*, **57**, 3629–3636.
- Coulson, G. B., Miranda-CasoLuengo, A. A., Miranda-CasoLuengo, R., Wang, X., Oliver, J., Willingham-Lane, J. M., Meijer, W. G., and Hondalus, M. K. (2015). Transcriptome reprogramming by plasmid-encoded transcriptional regulators is required for host niche adaption of a macrophage pathogen. *Infection and Immunity*, **83**, 3137–3145.

- Crowe, A. M., Casabon, I., Brown, K. L., Liu, J., Lian, J., Rogalski, J. C., Hurst, T. E., Snieckus, V., Foster, L. J., and Eltisa, L. D. (2017). Catabolism of the last two steroid rings in *Mycobacterium tuberculosis* and other bacteria. *MBio*, **8**, e00321-17.
- Cuervo, A. M., and Dice, J. F. (1996). A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science*, **273**, 501–503.
- Darrah, P. A., Hondalus, M. K., Chen, Q., Ischiropoulos, H., and Mosser, D. M. (2000). Cooperation between reactive oxygen and nitrogen intermediates in killing of *Rhodococcus equi* by activated macrophages. *Infection and Immunity*, **68**, 3587–3593.
- Davis, O. B., Shin, H. R., Lim, C. Y., Wu, E. Y., Kukurugya, M., Maher, C. F., Perera, R. M., Ordonez, M. P., and Zoncu, R. (2021). NPC1-mTORC1 signaling couples cholesterol sensing to organelle homeostasis and is a targetable pathway in Niemann-Pick type C. *Developmental Cell*, **56**, 260-276.
- Dawson, D. R., Nydam, D. V., Price, C. T., Graham, J. E., Cynamon, M. H., Divers, T. J., and Felipe, M. J. B. (2011). Effects of opsonization of *Rhodococcus equi* on bacterial viability and phagocyte activation. *American Journal of Veterinary Research*, **72**, 1465–1475.
- De Jonge, M. I., Pehau-Arnaudet, G., Fretz, M. M., Romain, F., Bottai, D., Brodin, P., Honoré, N., Marchal, G., Jiskoot, W., England, P., Cole, S. T., and Brosch, R. (2007). ESAT-6 from *Mycobacterium tuberculosis* dissociates from its putative chaperone CFP-10 under acidic conditions and exhibits membrane-lysing activity. *Journal of Bacteriology*, **189**, 6028–6034.
- de la Peña-Moctezuma, A., and Prescott, J. F. (1995). Association with Hela cells by *Rhodococcus equi* with and without the virulence plasmid. *Veterinary Microbiology*, **46**, 383–392.
- Dores, M. R., Paing, M. M., Lin, H., Montagne, W. A., Marchese, A., and Trejo, J. A. (2012). AP-3 regulates PAR1 ubiquitin-independent MVB/lysosomal sorting via an ALIX-mediated pathway. *Molecular Biology of the Cell*, **23**, 3612–3623.
- Dukes, J. D., Lee, H., Hagen, R., Reaves, B. J., Layton, A. N., Galyov, E. E., and Whitley, P. (2006). The secreted *Salmonella dublin* phosphoinositide phosphatase, SopB, localizes to PtdIns(3)P-containing endosomes and perturbs normal endosome to lysosome trafficking. *Biochemical Journal*, **395**, 239–247.
- Dustin, M. L. (2016). Complement receptors in myeloid cell adhesion and phagocytosis. *Microbiology Spectrum*, **4**, 10.1128.

- Elgner, F., Ren, H., Medvedev, R., Ploen, D., Himmelsbach, K., Boller, K., and Hildt, E. (2016). The intracellular cholesterol transport inhibitor U18666A inhibits the exosome-dependent release of mature hepatitis C virus. *Journal of Virology*, **90**, 11181–11196.
- Elrick, M. J., Yu, T., Chung, C., and Lieberman, A. P. (2012). Impaired proteolysis underlies autophagic dysfunction in Niemann-Pick type C disease. *Human Molecular Genetics*, **21**, 4876–4887.
- Fairn, G. D., and Grinstein, S. (2012). How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes. *Trends in Immunology*, **33**, 397–405.
- Fedele, A. O., and Proud, C. G. (2020). Chloroquine and bafilomycin A mimic lysosomal storage disorders and impair mTORC1 signalling. *Bioscience Reports*, **40**, BSR20200905.
- Feng, Y., He, D., Yao, Z., and Klionsky, D. J. (2014). The machinery of macroautophagy. *Cell Research*, **24**, 24–41.
- Fernandez-Mora, E., Polidori, M., Lührmann, A., Schaible, U. E., and Haas, A. (2005). Maturation of *Rhodococcus equi*-containing vacuoles is arrested after completion of the early endosome stage. *Traffic*, **6**, 635–653.
- Ferrari, A., He, C., Kennelly, J. P., Sandhu, J., Xiao, X., Chi, X., Jiang, H., Young, S. G., and Tontonoz, P. (2020). Aster proteins regulate the accessible cholesterol pool in the plasma membrane. *Molecular and Cellular Biology*, **40**, e00255-20.
- Fiani, M. L., Beitz, J., Turvy, D., Blum, J. S., and Stahl, P. D. (1998). Regulation of mannose receptor synthesis and turnover in mouse J774 macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, **64**, 85–91.
- Frankel, E. B., and Audhya, A. (2018). ESCRT-dependent cargo sorting at multivesicular endosomes. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, **74**, 4–10.
- Freeman, S. A., and Grinstein, S. (2014). Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunological Reviews*, **262**, 193–215.
- Friedland, N., Liou, H. L., Lobel, P., and Stock, A. M. (2003). Structure of a cholesterol-binding protein deficient in Niemann-Pick type C2 disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 2512–2517.

- Fumagalli, F., Noack, J., Bergmann, T. J., Cebollero, E., Pisoni, G. B., Fasana, E., Fregno, I., Galli, C., Loi, M., Soldà, T., Antuono, R. D., Raimondi, A., Jung, M., Melnyk, A., Schorr, S., Schreiber, A., Simonelli, L., Varani, L., Wilson-Zbinden, C., Zerbe, O., Hofmann, K., Peter, M., Quadroni, M., Zimmermann, R., Molinari, M. (2016). Translocon component Sec62 acts in endoplasmic reticulum turnover during stress recovery. *Nature Cell Biology*, **18**, 1173–1184.
- Garin, J., Diez, R., Kieffer, S., Dermine, J. F., Duclos, S., Gagnon, E., Sadoul, R., Rondeau, C., and Desjardins, M. (2001). The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *Journal of Cell Biology*, **152**, 165–180.
- Garton, N. J., Gilleron, M., Brando, T., Dan, H. H., Giguère, S., Puzo, G., Prescott, J. F., and Sutcliffe, I. C. (2002). A novel lipoarabinomannan from the equine pathogen *Rhodococcus equi*: Structure and effect on macrophage cytokine production. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 31722–31733.
- Germain, K., and Kim, P. K. (2020). Pexophagy: a model for selective autophagy. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, 578.
- Giguère, S., Hondalus, M. K., Yager, J. A., Darrah, P., Mosser, D. M., and Prescott, J. F. (1999). Role of the 85-kilobase plasmid and plasmid-encoded virulence-associated protein A in intracellular survival and virulence of *Rhodococcus equi*. *Infection and Immunity*, **67**, 3548–3557.
- Giles, C., Vanniasinkam, T., Ndi, S., and Barton, M. D. (2015). *Rhodococcus equi* (*Prescottella equi*) vaccines; the future of vaccine development. *Equine Veterinary Journal*, **47**, 510–518.
- Glick, D., Barth, S., and Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *Journal of Pathology*, **221**, 3–12.
- Glomski, I. J., Gedde, M. M., Tsang, A. W., Swanson, J. A., and Portnoy, D. A. (2002). The *Listeria monocytogenes* hemolysin has an acidic pH optimum to compartmentalize activity and prevent damage to infected host cells. *Journal of Cell Biology*, **156**, 1029–1038.
- Goebel, W., and Kuhn, M. (2000). Bacterial replication in the host cell cytosol. *Current Opinion in Microbiology*, **3**, 49–53.
- Goodfellow, M., and Alderson, G. (1977). The actinomycete-genus *Rhodococcus*: a home for the “rhodochrous” complex. *Journal of General Microbiology*, **100**, 99–122.

- Göser, V., Kehl, A., Röder, J., and Hensel, M. (2020). Role of the ESCRT-III complex in controlling integrity of the *Salmonella*-containing vacuole. *Cellular Microbiology*, **22**, e13176.
- Graham, J. E., and Clark-Curtiss, J. E. (1999). Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 11554–11559.
- Gray, M., and Botelho, R. J. (2017). Phagocytosis and phagosomes. *Phagocytosis and Phagosomes: Methods and Protocols*, **1519**, 169–184.
- Griffey, C. J., and Yamamoto, A. (2022). Macroautophagy in CNS health and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, **23**, 411–427.
- Groves, E., Dart, A. E., Covarelli, V., and Caron, E. (2008). Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **65**, 1957–1976.
- Gruenberg, J. (2020). Life in the lumen : the multivesicular endosome. *Traffic*, **6**, 76–93.
- Gründling, A., Gonzalez, M. D., and Higgins, D. E. (2003). Requirement of the *Listeria monocytogenes* broad-range phospholipase PC-PLC during infection of human epithelial cells. *Journal of Bacteriology*, **185**, 6295–6307.
- Gürtler, V., Mayall, B. C., and Seviour, R. (2004). Can whole genome analysis refine the taxonomy of the genus *Rhodococcus*? *FEMS Microbiology Reviews*, **28**, 377–403.
- Haas, A. (2007). The phagosome: compartment with a license to kill. *Traffic*, **8**, 311–330.
- Hansen, P. (2020). Interaktion von Virulenzfaktoren des intrazellulären Pathogens *Rhodococcus equi* mit Wirtszellen. Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität Bonn.
- Hansen, P., Haubenthal, T., Reiter, C., Kniewel, J., Bosse-plois, K., Niemann, H. H., Bargen, K. Von, Haas, A., von Bargen, K., and Haas, A. (2023). Differential effects of *Rhodococcus equi* virulence-associated proteins on macrophages and artificial lipid membranes. *Microbiology Spectrum*, **11**, e0341722.
- Hansen, P., von Bargen, K., Jünger-Leif, A., and Haas, A. (2022). Laboratory plasticware induces expression of a bacterial virulence factor. *MSphere*, **7**, e0031122.
- Hasan, M., Gruber, E., Cameron, J., and Leifer, C. A. (2016). TLR9 stability and signaling are regulated by phosphorylation and cell stress. *Journal of Leukocyte Biology*, **100**, 525–533.

- Haubenthal, T., Hansen, P., Krämer, I., Gindt, M., Jünger-Leif, A., Utermöhlen, O., and Haas, A. (2023). Specific preadaptations of *Rhodococcus equi* cooperate with its virulence-associated protein A during macrophage infection. *Molecular Microbiology*, **119**, 285–301.
- He, C., and Klionsky, D. J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual Review of Genetics*, **43**, 67–93.
- Herbst, S., Schaible, U. E., and Schneider, B. E. (2011). Interferon gamma activated macrophages kill mycobacteria by nitric oxide induced apoptosis. *PLoS ONE*, **6**, e19105.
- Hiemstra, P. S., Van Den Barselaar, M. T., Roest, M., Nibbering, P. H., and Van Furth, R. (1999). Ubiquicidin, a novel murine microbicidal protein present in the cytosolic fraction of macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, **66**, 423–428.
- Hirano, S., Zhou, Q., Furuyama, A., and Kanno, S. (2017). Differential regulation of IL-1 β and IL-6 release in murine macrophages. *Inflammation*, **40**, 1933–1943.
- Honda, S., Arakawa, S., Yamaguchi, H., Torii, S., Tajima Sakurai, H., Tsujioka, M., Murohashi, M., and Shimizu, S. (2020). Association between Atg5-independent alternative autophagy and neurodegenerative diseases. *Journal of Molecular Biology*, **432**, 2622–2632.
- Hondalus, M. K., and Mosser, D. M. (1994). Survival and replication of *Rhodococcus equi* in macrophages. *Infection and Immunity*, **62**, 4167–4175.
- Hong, M. H., Weng, I. C., Li, F. Y., Lin, W. H., and Liu, F. T. (2021). Intracellular galectins sense cytosolically exposed glycans as danger and mediate cellular responses. *Journal of Biomedical Science*, **28**, 16.
- Howe, D., and Heinzen, R. A. (2006). *Coxiella burnetii* inhabits a cholesterol-rich vacuole and influences cellular cholesterol metabolism. *Cellular Microbiology*, **8**, 496–507.
- Howe, D., Melnicáková, J., Barák, I., and Heinzen, R. A. (2003). Maturation of *Coxiella burnetii* parasitophorous vacuole requires bacterial protein synthesis but not replication. *Cellular Microbiology*, **5**, 469–480.
- Huang, F., Kirkpatrick, D., Jiang, X., Gygi, S., and Sorkin, A. (2006). Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain. *Molecular Cell*, **21**, 737–748.
- Hughes, K. L., and Sulaiman, I. (1987). The ecology of *Rhodococcus equi* and physicochemical influences on growth. *Veterinary Microbiology*, **14**, 241–250.

- Ichioka, F., Takaya, E., Suzuki, H., Kajigaya, S., Buchman, V. L., Shibata, H., and Maki, M. (2007). HD-PTP and Alix share some membrane-traffic related proteins that interact with their Bro1 domains or proline-rich regions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **457**, 142–149.
- Ikonen, E., and Zhou, X. (2021). Cholesterol transport between cellular membranes: A balancing act between interconnected lipid fluxes. *Developmental Cell*, **56**, 1430–1436.
- Infante, R. E., Wang, M. L., Radhakrishnan, A., Hyock, J. K., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (2008). NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 15287–15292.
- Janvier, K., Pelchen-Matthews, A., Renaud, J. B., Caillet, M., Marsh, M., and Berlioz-Torrent, C. (2011). The ESCRT-0 component HRS is required for HIV-1 Vpu-mediated BST-2/tetherin down-regulation. *PLoS Pathogens*, **7**, e1001265.
- Jaumouillé, V., and Grinstein, S. (2016). Molecular mechanisms of phagosome formation. *Microbiology Spectrum*, **4**.
- Jeschke, A., and Haas, A. (2016). Deciphering the roles of phosphoinositide lipids in phagolysosome biogenesis. *Communicative and Integrative Biology*, **9**, e1174798.
- Jia, J., Claude-taupin, A., Gu, Y., Mari, M., Jia, J., Claude-taupin, A., Gu, Y., Choi, S. W., Peters, R., and Bissa, B. (2020). Galectin-3 coordinates a cellular system for lysosomal repair and removal article galectin-3 coordinates a cellular system for lysosomal repair and removal. *Developmental Cell*, **52**, 69-87.
- Jutras, I., and Desjardins, M. (2005). Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **21**, 511–527.
- Kakuda, T., Miyazaki, S., Hagiuda, H., and Takai, S. (2015). Transcriptional regulation by VirR and VirS of members of the *Rhodococcus equi* virulence-associated protein multigene family. *Microbiology and Immunology*, **59**, 495–499.
- Kämpfer, P., Dott, W., Martin, K., and Glaeser, S. P. (2014). *Rhodococcus defluvii* sp. nov., isolated from wastewater of a bioreactor and formal proposal to reclassify [*Corynebacterium hoagii*] and *Rhodococcus equi* as *Rhodococcus hoagii* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **64**, 755–761.
- Kang, H., Sole-Guitart, A., Mellor, V. A., Gaughan, J. B., and Zsoldos, R. R. (2022). The use of percutaneous thermal sensing microchips for non-invasive measurement of body temperature in foals during summer seasons in a subtropical region. *Animals*, **16**, 100620.

- Katzmann, D. J., Babst, M., and Emr, S. D. (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell*, **106**, 145–155.
- Kehl, A., Göser, V., Reuter, T., Liss, V., Franke, M., John, C., Richter, C. P., Deiwick, J., and Hensel, M. (2020). A trafficome-wide RNAi screen reveals deployment of early and late secretory host proteins and the entire late endo-/lysosomal vesicle fusion machinery by intracellular *Salmonella*. *PLoS Pathogens*, **16**, e1008220.
- Khandia, R., Dadar, M., Munjal, A., Dhama, K., Karthik, K., Tiwari, R., Yattoo, M. I., Iqbal, H. M. N., Singh, K. P., Joshi, S. K., and Chaicumpa, W. (2019). A comprehensive review of autophagy and its various roles in infectious, non-infectious, and lifestyle diseases: Current knowledge and prospects for disease prevention, novel drug design, and therapy. *Cells*, **8**, 674.
- Kim S, et al. (2010). *Listeria* sensed by NLRP3 and AIM2 inflammasome. *European Journal of Immunology*, **40**, 1545–1551.
- Koerver, L., Papadopoulos, C., Liu, B., Kravic, B., Rota, G., Brecht, L., Veenendaal, T., Polajnar, M., Bluemke, A., Ehrmann, M., Klumperman, J., Jäättelä, M., Behrends, C., and Meyer, H. (2019). The ubiquitin-conjugating enzyme UBE2QL1 coordinates lysophagy in response to endolysosomal damage. *EMBO Reports*, **20**, e48014.
- Koh, C. H. V., and Cheung, N. S. (2006). Cellular mechanism of U18666A-mediated apoptosis in cultured murine cortical neurons: bridging Niemann-Pick disease type C and Alzheimer's disease. *Cellular Signalling*, **18**, 1844–1853.
- Kommnick, C., Lepper, A., and Hensel, M. (2019). Correlative light and scanning electron microscopy (CLSEM) for analysis of bacterial infection of polarized epithelial cells. *Scientific Reports*, **9**, 17079.
- Kosower, N. S., and Kosower, E. M. (1978). The glutathione status of cells. *International Review of Cytology*, **54**, 109–160.
- Krieger, V., Liebl, D., Zhang, Y., Rajashekar, R., Chlanda, P., Giesker, K., Chikkaballi, D., and Hensel, M. (2014). Reorganization of the endosomal system in *Salmonella*-infected cells: the ultrastructure of *Salmonella*-induced tubular compartments. *PLoS Pathogens*, **10**, e1004374.
- Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2009). Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **388**, 621–625.

- Lajoie, P., Guay, G., Dennis, J. W., and Nabi, I. R. (2005). The lipid composition of autophagic vacuoles regulates expression of multilamellar bodies. *Journal of Cell Science*, **118**, 1991–2003.
- Lakpa, K. L., Khan, N., Afghah, Z., Chen, X., and Geiger, J. D. (2021). Lysosomal stress response (LSR): physiological importance and pathological relevance. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, **16**, 219–237.
- Lambert, C., Do, T., and Prange, R. (2007). Hepatitis B virus maturation is sensitive to functional inhibition of ESCRT-III, Vps4 and γ 2-Adaptin. *Journal of Virology*, **81**, 9050–9060.
- Lange, Y., Ye, J., and Chin, J. (1997). The fate of cholesterol exiting lysosomes. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 17018–17022.
- Lange, Y., Ye, J., Rigney, M., and Steck, T. (2000). Cholesterol movement in Niemann-Pick type C cells and in cells treated with amphiphiles. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 17468–17475.
- Lange, Y., Ye, J., and Steck, T. L. (1998). Circulation of cholesterol between lysosomes and the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 18915–18922.
- Langelier, C., von Schwedler, U. K., Fisher, R. D., De Domenico, I., White, P. L., Hill, C. P., Kaplan, J., Ward, D., and Sundquist, W. I. (2006). Human ESCRT-II complex and its role in human immunodeficiency virus type 1 release. *Journal of Virology*, **80**, 9465–9480.
- Larios, J., Mercier, V., Roux, A., and Gruenberg, J. (2020). ALIX- And ESCRT-III-dependent sorting of tetraspanins to exosomes. *Journal of Cell Biology*, **219**, e201904113.
- Laurent-Matha, V., Derocq, D., Prébois, C., Katunuma, N., and Liaudet-Coopman, E. (2006). Processing of human cathepsin D is independent of its catalytic function and auto-activation: Involvement of cathepsins L and B. *Journal of Biochemistry*, **139**, 363–371.
- Le Guerroué, F., Eck, F., Jung, J., Starzetz, T., Mittelbronn, M., Kaulich, M., and Behrends, C. (2017). Autophagosomal content profiling reveals an LC3C-dependent piecemeal mitophagy pathway. *Molecular Cell*, **68**, 786-796.
- Leber, J. H., Crimmins, G. T., Raghavan, S., Meyer-Morse, N. P., Cox, J. S., and Portnoy, D. A. (2008). Distinct TLR- and NLR-mediated transcriptional responses to an intracellular pathogen. *PLoS Pathogens*, **4**, 84–95.
- Lee, C., Lamech, L., Johns, E., and Overholtzer, M. (2020). Selective lysosome membrane turnover is induced by nutrient starvation. *Developmental Cell*, **55**, 289–297.

- Lee, H. J., Woo, Y., Hahn, T. W., Jung, Y. M., and Jung, Y. J. (2020). Formation and maturation of the phagosome: A key mechanism in innate immunity against intracellular bacterial infection. *Microorganisms*, **8**, 1298.
- Letek, M., González, P., MacArthur, I., Rodríguez, H., Freeman, T. C., Valero-Rello, A., Blanco, M., Buckley, T., Cherevach, I., Fahey, R., Hapeshi, A., Holdstock, J., Leadon, D., Navas, J., Ocampo, A., Quail, M. A., Sanders, M., Scotti, M. M., Prescott, J. F., Fogarty, U., Meijer, W., Parkhill, J., Bentley, S. D., and Vázquez-Boland, J. A. (2010). The genome of a pathogenic *Rhodococcus*: Cooptive virulence underpinned by key gene acquisitions. *PLoS Genetics*, **6**, e1001145.
- Letek, M., Ocampo-Sosa, A. A., Sanders, M., Fogarty, U., Buckley, T., Leadon, D. P., González, P., Scotti, M., Meijer, W. G., Parkhill, J., Bentley, S., and Vázquez-Boland, J. A. (2008). Evolution of the *Rhodococcus equi* vap pathogenicity island seen through comparison of host-associated vapA and vapB virulence plasmids. *Journal of Bacteriology*, **190**, 5797–5805.
- Levin, R., Grinstein, S., and Canton, J. (2016). The life cycle of phagosomes: formation, maturation, and resolution. *Immunological Reviews*, **273**, 156–179.
- Li, W., Li, J., and Bao, J. (2012). Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **69**, 1125–1136.
- Loginov, S. V., Fermie, J., Fokkema, J., Agronskaia, A. V., De Heus, C., Blab, G. A., Klumperman, J., Gerritsen, H. C., and Liv, N. (2022). Correlative organelle microscopy: fluorescence guided volume electron microscopy of intracellular processes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **10**, 829545.
- López-Jiménez, A. T., Cardenal-Muñoz, E., Leuba, F., Gerstenmaier, L., Barisch, C., Hagedorn, M., King, J. S., and Soldati, T. (2018). The ESCRT and autophagy machineries cooperate to repair ESX-1-dependent damage at the *Mycobacterium*-containing vacuole but have opposite impact on containing the infection. *PLoS Pathogens*, **14**, e1007501.
- Lu, F., Liang, Q., Abi-Mosleh, L., Das, A., de Brabander, J. K., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2015). Identification of NPC1 as the target of U18666A, an inhibitor of lysosomal cholesterol export and Ebola infection. *eLife*, **4**, e12177.
- Lu, Q., Hope, L. W., Brasch, M., Reinhard, C., and Cohen, S. N. (2003). TSG101 interaction with HRS mediates endosomal trafficking and receptor down-regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 7626–7631.

- Lührmann, A., Mauder, N., Sydor, T., Fernandez-Mora, E., Schulze-Luehrmann, J., Takai, S., and Haas, A. (2004). Necrotic death of *Rhodococcus equi*-infected macrophages is regulated by virulence-associated plasmids. *Infection and Immunity*, **72**, 853–862.
- MacArthur, I., Anastasi, E., Alvarez, S., Scotti, M., and Vázquez-Boland, J. A. (2017). Comparative genomics of *Rhodococcus equi* virulence plasmids indicates host-driven evolution of the vap pathogenicity island. *Genome Biology and Evolution*, **9**, 1241–1247.
- MacArthur, I., Parreira, V. R., Lepp, D., Mutharia, L. M., Vazquez-Boland, J. A., and Prescott, J. F. (2011). The sensor kinase MprB is required for *Rhodococcus equi* virulence. *Veterinary Microbiology*, **147**, 133–141.
- Maejima, I., Takahashi, A., Omori, H., Kimura, T., Takabatake, Y., Saitoh, T., Yamamoto, A., Hamasaki, M., Noda, T., Isaka, Y., and Yoshimori, T. (2013). Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury. *EMBO Journal*, **32**, 2336–2347.
- Magnusson, H. (1923). Pneumonie beim Fohlen. Ein neuer Eitererreger beim Pferd. *Archiv für Wissenschaftliche und Praktische Tierheilkunde*, **50**, 22–37.
- Marchetti, A., Mercanti, V., Cornillon, S., Alibaud, L., Charette, S. J., and Cosson, P. (2004). Formation of multivesicular endosomes in Dictyostelium. *Journal of Cell Science*, **117**, 6053–6059.
- Mateus, D., Marini, E. S., Progida, C., and Bakke, O. (2018). Rab7a modulates ER stress and ER morphology. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, **1865**, 781–793.
- Maxfield, F. R., and McGraw, T. E. (2004). Endocytic recycling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **5**, 121–132.
- Mayoral, J., Guevara, R. B., Rivera-Cuevas, Y., Tu, V., Tomita, T., Romano, J. D., Gunther-Cummins, L., Sidoli, S., Coppens, I., Carruthers, V. B., and Weiss, L. M. (2022). Dense granule protein GRA64 interacts with host cell ESCRT proteins during *Toxoplasma gondii* infection. *MBio*, **13**, e0144222.
- McCaffrey, R. L., Fawcett, P., O’Riordan, M., Lee, K. D., Havell, E. A., Brown, P. O., and Portnoy, D. A. (2004). A specific gene expression program triggered by Gram-positive bacteria in the cytosol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 11386–11391.

- McDonough, J. A., Newton, H. J., Klum, S., Swiss, R., Agaisse, H., and Roy, C. R. (2013). Host pathways important for *Coxiella burnetii* infection revealed by genome-wide RNA interference screening. *MBio*, **4**, e00606-12.
- McKnight, N. C., and Zhenyu, Y. (2013). Beclin 1, an essential component and master regulator of PI3K- III in health and disease. *Current Pathobiology Report*, **1**, 231–238.
- McLeod, M. P., Warren, R. L., Hsiao, W. W. L., Araki, N., Myhre, M., Fernandes, C., Miyazawa, D., Wong, W., Lillquist, A. L., Wang, D., Dosanjh, M., Hara, H., Petrescu, A., Morin, R. D., Yang, G., Stott, J. M., Schein, J. E., Shin, H., Smailus, D., Siddiqui, A. S., Marra, M. A., Jones, S. J., Holt, R., Brinkman, F. S., Miyauchi, K., Fukuda, M., Davies, J. E., Mohn, W. W., and Eltis, L. D. (2006). The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 15582–15587.
- Mehra, A., Zahra, A., Thompson, V., Sirisaengtaksin, N., Wells, A., Porto, M., Köster, S., Penberthy, K., Kubota, Y., Dricot, A., Rogan, D., Vidal, M., Hill, D. E., Bean, A. J., and Philips, J. A. (2013). *Mycobacterium tuberculosis* type VII secreted effector EsxH targets host ESCRT to impair trafficking. *PLoS Pathogens*, **9**, e1003734.
- Meijer, W. G., and Prescott, J. F. (2004). *Rhodococcus equi*. *Veterinary Research*, **35**, 383–396.
- Mejlvang, J., Olsvik, H., Svenning, S., Bruun, J. A., Abudu, Y. P., and Larsen, K. B. (2018). Starvation induces rapid degradation of selective autophagy receptors by endosomal microautophagy. *Journal of Cell Biology*, **217**, 3640–3655.
- Miao, Y., Li, G., Zhang, X., Xu, H., and Abraham, S. N. (2015). A TRP channel senses lysosome neutralization by pathogens to trigger their expulsion. *Cell*, **161**, 1306–1319.
- Miller, M. C., Ippel, H., Suylen, D., Klyosov, A. A., Traber, P. G., Hackeng, T., and Mayo, K. H. (2016). Binding of polysaccharides to human galectin-3 at a noncanonical site in its carbohydrate recognition domain. *Structural Biology*, **26**, 88–99.
- Mindell, J. A. (2012). Lysosomal acidification mechanisms. *Annual Review of Physiology*, **74**, 69–86.
- Mittal, E., Skowyra, M. L., Uwase, G., Tinaztepe, E., Mehra, A., Köster, S., Hanson, P. I., and Philips, J. A. (2018). *Mycobacterium tuberculosis* Type VII secretion system effectors differentially impact the ESCRT endomembrane damage response. *MBio*, **9**, e01765-18.
- Mogensen, T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical Microbiology Reviews*, **22**, 240–273.

- Mosser, D. M., and Hondalus, M. K. (1996). *Rhodococcus equi*: an emerging opportunistic pathogen. *Trends in Microbiology*, **4**, 29–33.
- Nagakubo, T., Tahara, Y. O., Miyata, M., Nomura, N., and Toyofuku, M. (2021). Mycolic acid-containing bacteria trigger distinct types of membrane vesicles through different routes. *IScience*, **24**, 102015.
- Naganuma, S., Kuzuya, N., Sakai, K., Hasumi, K., and Endo, A. (1992). Inhibition of the accumulation of lipid droplets in macrophage J774 by bafilomycin and destruxin E. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1126**, 41–48.
- Naito, T., Ercan, B., Krshnan, L., Triebel, A., Koh, D. H. Z., Wei, F. Y., Tomizawa, K., Torta, F. T., Wenk, M. R., and Saheki, Y. (2019). Movement of accessible plasma membrane cholesterol by GRAMD1 lipid transfer protein complex. *eLife*, **8**, e51401.
- Navas, J., González-Zorn, B., Ladrón, N., Garrido, P., and Vázquez-Boland, J. A. (2001). Identification and mutagenesis by allelic exchange of *choE*, encoding a cholesterol oxidase from the intracellular pathogen *Rhodococcus equi*. *Journal of Bacteriology*, **183**, 4796–4805.
- Nazarova, E. V., Montague, C. R., Huang, L., La, T., Russell, D., and Vanderven, B. C. (2019). The genetic requirements of fatty acid import by mycobacterium tuberculosis within macrophages. *eLife*, **8**, e43621.
- Nicholson, L. B. (2016). The immune system. *Essays in Biochemistry*, **60**, 275–301.
- Nikitas, G., Deschamps, C., Disson, O., Niaux, T., Cossart, P., and Lecuit, M. (2011). Transcytosis of *Listeria monocytogenes* across the intestinal barrier upon specific targeting of goblet cell accessible E-cadherin. *Journal of Experimental Medicine*, **208**, 2263–2277.
- Nishida, Y., Arakawa, S., Fujitani, K., Yamaguchi, H., Mizuta, T., Kanaseki, T., Komatsu, M., Otsu, K., Tsujimoto, Y., and Shimizu, S. (2009). Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature*, **461**, 654–658.
- Ocampo-Sosa, A. A., Lewis, D. A., Navas, J., Quigley, F., Callejo, R., Scotti, M., Leadon, D. P., Fogarty, U., and Vázquez-Boland, J. A. (2007). Molecular epidemiology of *Rhodococcus equi* based on *traA*, *vapA*, and *vapB* virulence plasmid markers. *Journal of Infectious Diseases*, **196**, 763–769.
- Oda, K., Nishimura, Y., Ikehara, Y., and Kato, K. (1991). Bafilomycin A1 inhibits the targeting of lysosome acidic hydrolases in cultured hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **178**, 369–377.

- Oku, M., and Sakai, Y. (2018). Three distinct types of microautophagy based on membrane dynamics and molecular machineries. *BioEssays*, **40**, 1800008.
- Padmanabhan, B., Fielden, L. F., Hachani, A., Newton, P., Thomas, D. R., Cho, H. J., Ai Khoo, C., Stojanovski, D., Roy, C. R., Scott, N. E., and Newton, H. J. (2020). Biogenesis of the spacious *Coxiella*-containing vacuole depends on host transcription factors TFEB and TFE3. *Infection and Immunity*, **88**, e00534-19.
- Palokangas, H., Ying, M., Väänänen, K., and Saraste, J. (1998). Retrograde transport from the pre-Golgi intermediate compartment and the Golgi complex is affected by the vacuolar H⁺-ATPase inhibitor Bafilomycin A1. *Molecular Biology of the Cell*, **9**, 3561–3578.
- Pandey, A. K., and Sasseti, C. M. (2008). Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 4376–4380.
- Papadopoulos, C., Kravic, B., and Meyer, H. (2020). Repair or lysophagy: dealing with damaged lysosomes. *Journal of Molecular Biology*, **432**, 231–239.
- Patel, S., Homaei, A., El-Seedi, H. R., and Akhtar, N. (2018). Cathepsins: proteases that are vital for survival but can also be fatal. *Biomedicine & Pharmacotherapy Journal*, **105**, 526–532.
- Pawełczyk, J., Brzostek, A., Minias, A., Płociński, P., Rumijowska-Galewicz, A., Strapagiel, D., Zakrzewska-Czerwińska, J., and Dziadek, J. (2021). Cholesterol-dependent transcriptome remodeling reveals new insight into the contribution of cholesterol to *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Scientific Reports*, **11**, 12396.
- Pei, Y., Dupont, C., Sydor, T., Haas, A., and Prescott, J. F. (2006). Cholesterol oxidase (ChoE) is not important in the virulence of *Rhodococcus equi*. *Veterinary Microbiology*, **118**, 240–246.
- Pelegri, P., Barroso-gutierrez, C., and Surprenant, A. (2008). P2X₇ receptor differentially couples to distinct release pathways for IL-1 β in mouse macrophage. *The Journal of Immunology*, **180**, 7147–7157.
- Philips, J. A., Porto, M. C., Wang, H., Rubin, E. J., and Perrimon, N. (2008). ESCRT factors restrict mycobacterial growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 3070–3075.
- Pipalia, N. H., Subramanian, K., Mao, S., Ralph, H., Hutt, D. M., Scott, S. M., Balch, W. E., and Maxfield, F. R. (2017). Histone deacetylase inhibitors correct the cholesterol storage defect in most Niemann-Pick C1 mutant cells. *Journal of Lipid Research*, **58**, 695–708.

- Piper, R. C., and Katzmann, D. J. (2007). Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **23**, 519–547.
- Pires, D., Marques, J., Pombo, J. P., Carmo, N., Bettencourt, P., Neyrolles, O., Lugo-Villarino, G., and Anes, E. (2016). Role of cathepsins in *Mycobacterium tuberculosis* survival in human macrophages. *Scientific Reports*, **6**, 32247.
- Pizarro-Cerdá, J., and Cossart, P. (2019). *Listeria monocytogenes*: cell biology of invasion and intracellular growth. *Microbiology Spectrum*, **6**, GPP3-0013-2018.
- Polidori, M. (2007). Biochemische und genetische Analyse der Wechselwirkung von *Rhodococcus equi* mit Makrophagen. Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität Bonn.
- Popa, S. J., Stewart, S. E., and Moreau, K. (2018). Unconventional secretion of annexins and galectins. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, **83**, 42–50.
- Prados-Rosales, R., Baena, A., Martinez, L. R., Luque-Garcia, J., Kalscheuer, R., Veeraraghavan, U., Camara, C., Nosanchuk, J. D., Besra, G. S., Chen, B., Jimenez, J., Glatman-Freedman, A., Jacobs, W. R., Porcelli, S. A., and Casadevall, A. (2011). Mycobacteria release active membrane vesicles that modulate immune responses in a TLR2-dependent manner in mice. *Journal of Clinical Investigation*, **121**, 1471–1483.
- Prescott, J. F. (1991). *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, **4**, 20–34.
- Proksch, E., Brandner, J. M., and Jensen, J. (2008). The skin :an indispensable barrier. *Experimental Dermatology*, **17**, 1063–1072.
- Qian, H., Wu, X., Du, X., Yao, X., Zhao, X., Lee, J., Yang, H., and Yan, N. (2020). Structural basis of low-pH-dependent lysosomal cholesterol egress by NPC1 and NPC2. *Cell*, **182**, 98–111.
- Quigley, J., Hughitt, V. K., Velikovskiy, C. A., Mariuzza, R. A., El-Sayed, N. M., and Briken, V. (2017). The cell wall lipid PDIM contributes to phagosomal escape and host cell exit of *Mycobacterium tuberculosis*. *MBio*, **8**, e00148-17.
- Radulovic, M., Schink, K. O., Wenzel, E. M., Nähse, V., Bongiovanni, A., Lafont, F., and Stenmark, H. (2018). ESCRT-mediated lysosome repair precedes lysophagy and promotes cell survival. *The EMBO Journal*, **37**, e99753.

- Radulovic, M., Wenzel, E. M., Gilani, S., Holland, L. K., Lystad, A. H., Phuyal, S., Oikkonen, V. M., Brech, A., Jäättelä, M., Maeda, K., Raiborg, C., and Stenmark, H. (2022). Cholesterol transfer via endoplasmic reticulum contacts mediates lysosome damage repair. *The EMBO Journal*, **41**, e112677.
- Raiborg, C., and Stenmark, H. (2009). The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature*, **458**, 445–452.
- Ramakrishnan, L., and Falkow, S. (1994). *Mycobacterium marinum* persists in cultured mammalian cells in a temperature-restricted fashion. *Infection and Immunity*, **62**, 3222–3229.
- Raschke, W. C., Diego, S., Baird, S., and Jolla, L. (1978). Functional macrophage cell lines transformed by abelson leukemia virus. *Cell*, **15**, 261–267.
- Rathman, M., Sjaastad, M. D., and Falkow, S. (1996). Acidification of phagosomes containing *Salmonella typhimurium* in murine macrophages. *Infection and Immunity*, **64**, 2765–2773.
- Ray, K., Marteyn, B., Sansonetti, P. J., and Tang, C. M. (2009). Life on the inside: the intracellular lifestyle of cytosolic bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, **7**, 333–340.
- Read, C. B., Lind, M. C. H., Chiarelli, T. J., Izac, J. R., Adcox, H. E., Marconi, R. T., and Carlyon, J. A. (2022). The obligate intracellular bacterial pathogen *Anaplasma phagocytophilum* exploits host cell multivesicular body biogenesis for proliferation and dissemination. *MBio*, **13**, e0296122.
- Ren, J., and Prescott, J. F. (2003). Analysis of virulence plasmid gene expression of intramacrophage and in vitro grown *Rhodococcus equi* ATCC 33701. *Veterinary Microbiology*, **94**, 167–182.
- Rengarajan, J., Bloom, B. R., and Rubin, E. J. (2005). Genome-wide requirements for *Mycobacterium tuberculosis* adaptation and survival in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 8327–8332.
- Riera Romo, M., Pérez-Martínez, D., and Castillo Ferrer, C. (2016). Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology*, **148**, 125–139.
- Rivera-Cuevas, Y., and Carruthers, V. B. (2023). The multifaceted interactions between pathogens and host ESCRT machinery. *PLoS Pathogens*, **19**, e1011344.
- Rivera-Cuevas, Y., Mayoral, J., Di Cristina, M., Lawrence, A. L. E., Olafsson, E. B., Patel, R. K., Thornhill, D., Waldman, B. S., Ono, A., Sexton, J. Z., Lourido, S., Weiss, L. M., and Carruthers, V. B. (2021). *Toxoplasma gondii* exploits the host ESCRT machinery for parasite uptake of host cytosolic proteins. *PLoS Pathogens*, **17**, e1010138.

- Robert, V. A., and Casadevall, A. (2009). Vertebrate endothermy restricts most fungi as potential pathogens. *Journal of Infectious Diseases*, **200**, 1623–1626.
- Rocher, P. A., and Furuta, K. (2015). The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nature Reviews Immunology*, **15**, 203–216.
- Rofe, A. P., Davis, L. J., Whittingham, J. L., Latimer-Bowman, E. C., Wilkinson, A. J., and Pryor, P. R. (2017). The *Rhodococcus equi* virulence protein VapA disrupts endolysosome function and stimulates lysosome biogenesis. *MicrobiologyOpen*, **6**, e00416.
- Romano, J. D., Mayoral, J., Guevara, R. B., Rivera-Cuevas, Y., Carruthers, V. B., Weiss, L. M., and Coppens, I. (2023). *Toxoplasma gondii* scavenges mammalian host organelles through the usurpation of host ESCRT-III and Vps4A. *Journal of Cell Science*, **136**, jcs260159.
- Rosenbaum, A. I., and Maxfield, F. R. (2012). Niemann-Pick type C disease: molecular mechanisms and potential therapeutic approaches. *Journal of Neurochemistry*, **116**, 789–795.
- Russell, D. A., Byrne, G. A., O’Connell, E. P., Boland, C. A., and Meijer, W. G. (2004). The LysR-type transcriptional regulator VirR is required for expression of the virulence gene *vapA* of *Rhodococcus equi* ATCC 33701. *Journal of Bacteriology*, **186**, 5576–5584.
- Saffi, G. T., and Botelho, R. J. (2019). Lysosome fission: planning for an exit. *Trends in Cell Biology*, **29**, 635–646.
- Saftig, P., and Klumperman, J. (2009). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins : trafficking meets function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **10**, 623–635.
- Sahu, R., Kaushik, S., Clement, C. C., Cannizzo, E. S., Scharf, B., Follenzi, A., Poticchio, I., Nieves, E., Cuervo, A. M., and Santambrogio, L. (2011). Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Developmental Cell*, **20**, 131–139.
- Salvador, N., Aguado, C., Horst, M., and Knecht, E. (2000). Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 27447–27456.
- Sangal, V., Goodfellow, M., Jones, A. L., and Sutcliffe, I. C. (2022). A stable home for an equine pathogen: valid publication of the binomial *Prescottella equi* gen. nov., comb. nov., and reclassification of four rhodococcal species into the genus *Prescottella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **72**, 005551.

- Sano, H., Hsu, D. K., Apgar, J. R., Yu, L., Sharma, B. B., Kuwabara, I., Izui, S., and Liu, F.-T. (2003). Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. *The Journal of Clinical Investigation*, **112**, 389–397.
- Sanz, M. G., Oliveira, A. F., Page, A., and Horohov, D. W. (2014). Administration of commercial *Rhodococcus equi* specific hyperimmune plasma results in variable amounts of IgG against pathogenic bacteria in foals. *Veterinary Record*, **175**, 485.
- Sapolsky, A. I., Howell, D. S., and Woessner, J. F. (1974). Neutral proteases and cathepsin D in human articular cartilage. *Journal of Clinical Investigation*, **53**, 1044–1053.
- Savvi, S., Warner, D. F., Kana, B. D., McKinney, J. D., Mizrahi, V., and Dawes, S. S. (2008). Functional characterization of a vitamin B12-dependent methylmalonyl pathway in *Mycobacterium tuberculosis*: implications for propionate metabolism during growth on fatty acids. *Journal of Bacteriology*, **190**, 3886–3895.
- Schäfer, J. A., Schessner, J. P., Bircham, P. W., Tsuji, T., Funaya, C., Pajonk, O., Schaeff, K., Ruffini, G., Papagiannidis, D., Knop, M., Fujimoto, T., and Schuck, S. (2020). ESCRT machinery mediates selective microautophagy of endoplasmic reticulum in yeast. *The EMBO Journal*, **39**, e102586.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., and Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, **9**, 676–682.
- Schleinitz, A., Pöttgen, L. A., Keren-Kaplan, T., Pu, J., Saftig, P., Bonifacino, J. S., Haas, A., and Jeschke, A. (2023). Consecutive functions of small GTPases guide HOPS-mediated tethering of late endosomes and lysosomes. *Cell Reports*, **42**, 111969.
- Schütter, M., Giavalisco, P., Brodesser, S., and Graef, M. (2020). Local Fatty Acid Channeling into Phospholipid Synthesis Drives Phagophore Expansion during Autophagy. *Cell*, **180**, 135–149.
- Sekizaki, T., Tanoue, T., Osaki, M., Shimoji, Y., Tsubaki, S., and Takai, S. (1998). Improved electroporation of *Rhodococcus equi*. *Journal of Veterinary Medical Science*, **60**, 277–279.
- Shaughnessy, L. M., Hoppe, A. D., Christensen, K. A., and Swanson, J. A. (2006). Membrane perforations inhibit lysosome fusion by altering pH and calcium in *Listeria monocytogenes* vacuoles. *Cellular Microbiology*, **8**, 781–792.

- Sibley, L. D., Weidner, E., and Krahenbuhl, J. L. (1985). Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature*, **315**, 416–419.
- Skowrya, M. L., Schlesinger, P. H., Nausmith, T. V., and Hanson, P. I. (2018). Triggered recruitment of ESCRT machinery promotes endolysosomal repair. *Physiology & Behavior*, **360**, 139–148.
- Sokol, J., Blanchette-Mackie, E. J., Kruth, H. S., Dwyer, N. K., Amende, L. M., Butler, J. D., Robinson, E., Patel, S., Brady, R. O., Comly, M. E., Vanier, M. T., and Pentchev, P. G. (1988). Type C Niemann-Pick disease. Lysosomal accumulation and defective intracellular mobilization of low density lipoprotein cholesterol. *Journal of Biological Chemistry*, **263**, 3411–3417.
- Spera, J. M., Guaimas, F., Czibener, C., and Ugalde, J. E. (2023). *Brucella* egresses from host cells exploiting multivesicular bodies. *MBio*, **14**, e0333822.
- Sriburi, R., Jackowski, S., Mori, K., and Brewer, J. W. (2004). XBP1: A link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Biology*, **167**, 35–41.
- Steinman, R. M., Brodie, S. E., and Cohn, Z. A. (1976). Membrane flow during pinocytosis: a stereologic analysis. *Journal of Cell Biology*, **68**, 665–687.
- Stewart, S. E., Menzies, S. A., Popa, S. J., Savinykh, N., Petrunkina Harrison, A., Lehner, P. J., and Moreau, K. (2017). A genome-wide CRISPR screen reconciles the role of N-linked glycosylation in galectin-3 transport to the cell surface. *Journal of Cell Science*, **130**, 3234–3247.
- Stuffers, S., Sem Wegner, C., Stenmark, H., and Brech, A. (2009). Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic*, **10**, 925–937.
- Swatek, K. N., and Komander, D. (2016). Ubiquitin modifications. *Cell Research*, **26**, 399–422.
- Takai, S., Fukunaga, N., Kamisawa, K., Imai, Y., Sasaki, Y., and Tsubaki, S. (1996). Expression of virulence-associated antigens of *Rhodococcus equi* is regulated by temperature and pH. *Microbiology and Immunology*, **40**, 591–594.
- Takai, S., Hines, S. A., Sekizaki, T., Nicholson, V. M., Alperin, D. A., Osaki, M., Takamatsu, D., Nakamura, M., Suzuki, K., Ogino, N., Kakuda, T., Hanhong, D., and Prescott, J. F. (2000). DNA sequence and comparison of virulence plasmids from *Rhodococcus equi* ATCC 33701 and 103. *Infection and Immunity*, **68**, 6840–6847.

- Takai, S., Irie, M., Watanabe, Y., Tsubaki, S., and Sekizaki, T. (1992). Virulence-associated 15- to 17-kilodalton antigens in *Rhodococcus equi*: temperature-dependent expression and location of the antigens. *Infection and Immunity*, **60**, 2995–2997.
- Takai, S., Koike, K., Ohbushi, S., Izumi, C., and Tsubaki, S. (1991). Identification of 15- to 17-kilodalton antigens associated with virulent *Rhodococcus equi*. *Journal of Clinical Microbiology*, **29**, 439–443.
- Takai, S., Sugawara, T., Watanabe, Y., Sasaki, Y., Tsubaki, S., and Sekizaki, T. (1994). Effect of growth temperature on maintenance of virulent *Rhodococcus equi*. *Veterinary Microbiology*, **39**, 187–192.
- Takai, S., Watanabe, Y., Ikeda, T., Ozawa, T., Matsukura, S., Tamada, Y., Tsubaki, S., and Sekizaki, T. (1993). Virulence-associated plasmids in *Rhodococcus equi*. *Journal of Clinical Microbiology*, **31**, 1726–1729.
- Tamura, T., Nagy, I., Lupas, A., Lottspeich, F., Cejka, Z., Schoofs, G., Tanaka, K., De Mot, R., and Baumeister, W. (1995). The first characterization of a eubacterial proteasome: the 20S complex of *Rhodococcus*. *Current Biology*, **5**, 766–774.
- Teis, D., Saksena, S., and Emr, S. D. (2008). Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Developmental Cell*, **15**, 578–589.
- Teis, D., Saksena, S., Judson, B. L., and Emr, S. D. (2010). ESCRT-II coordinates the assembly of ESCRT-III filaments for cargo sorting and multivesicular body vesicle formation. *EMBO Journal*, **29**, 871–883.
- Tekirdag, K., and Cuervo, A. M. (2018). Chaperone-mediated autophagy and endosomal microautophagy: joint by a chaperone. In *Journal of Biological Chemistry*, **293**, 5414–5424.
- Thomas, D. R., Newton, P., Lau, N., and Newton, H. J. (2020). Interfering with autophagy: the opposing strategies deployed by *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii* effector proteins. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **10**, 599762.
- Tosi, M. F. (2005). Innate immune responses to infection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **116**, 241–249.
- Toyooka, K., Takai, S., and Kirikae, T. (2005). *Rhodococcus equi* can survive a phagolysosomal environment in macrophages by suppressing acidification of the phagolysosome. *Journal of Medical Microbiology*, **54**, 1007–1015.

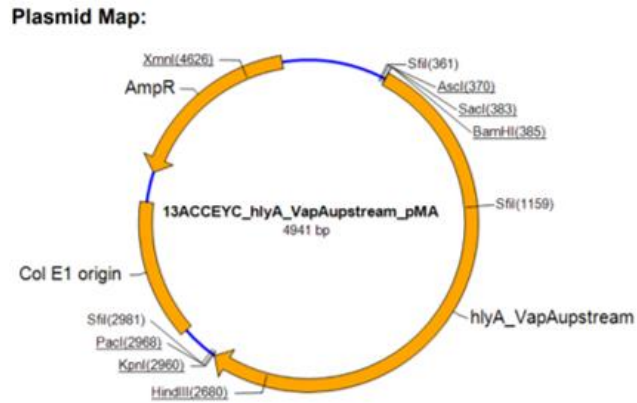
- Tu, C., Ortega-cava, C. F., Winograd, P., Jo, M., Lakku, A., and Dodge, I. (2010). Endosomal-sorting complexes required for transport (ESCRT) pathway-dependent endosomal traffic regulates the localization of active Src at focal adhesions. *PNAS*, **107**, 16107–16112.
- Uma M. Nagarajan, P. D. (2011). Induction and function of IFN β during viral and bacterial infection. *Critical Reviews in Immunology*, **31**, 459–474.
- Uribe-Querol, E., and Rosales, C. (2020). Phagocytosis:our current understanding of a universal biological process. *Frontiers in Immunology*, **11**, 1066.
- Vail, K. J., da Silveira, B. P., Bell, S. L., Cohen, N. D., Bordin, A. I., Patrick, K. L., and Watson, R. O. (2021). The opportunistic intracellular bacterial pathogen *Rhodococcus equi* elicits type I interferon by engaging cytosolic DNA sensing in macrophages. *PLoS Pathogens*, **17**, e1009888.
- Valero-Rello, A., Hapeshi, A., Anastasi, E., Alvarez, S., Scotti, M., Meijer, W. G., MacArthur, I., and Vázquez-Bolanda, J. A. (2015). An invertron-like linear plasmid mediates intracellular survival and virulence in bovine isolates of *Rhodococcus equi*. *Infection and Immunity*, **83**, 2725–2737.
- van der Beek, J., Jonker, C., van der Welle, R., Liv, N., and Klumperman, J. (2019). CORVET, CHEVI and HOPS–multisubunit tethers of the endo-lysosomal system in health and disease. *Journal of Cell Science*, **132**, jcs189134.
- van der Geize, R., de Jong, W., Hessels, G. I., Grommen, A. W. F., Jacobs, A. A. C., and Dijkhuizen, L. (2008). A novel method to generate unmarked gene deletions in the intracellular pathogen *Rhodococcus equi* using 5-fluorocytosine conditional lethality. *Nucleic Acids Research*, **36**, e151.
- van der Geize, R., Grommen, A. W. F., Hessels, G. I., Jacobs, A. A. C., and Dijkhuizen, L. (2011). The Steroid Catabolic Pathway of the Intracellular Pathogen *Rhodococcus equi* Is Important for Pathogenesis and a Target for Vaccine Development. *PLoS Pathogens*, **7**, e1002181.
- van der Geize, R., Yam, K., Heuser, T., Wilbrink, M. H., Hara, H., Anderton, M. C., Sim, E., Dijkhuizen, L., Davies, J. E., Mohn, W. W., and Eltis, L. D. (2007). A gene cluster encoding cholesterol catabolism in a soil actinomycete provides insight into *Mycobacterium tuberculosis* survival in macrophages. *PNAS*, **104**, 1947–1952.
- van Dyke, R. W. (1993). Acidification of rat liver lysosomes: quantitation and comparison with endosomes. *American Journal of Physiology*, **265**, 901–917.

- van Engelenburg, S. B., Shtengel, G., Sengupta, P., Waki, K., Jarnik, M., Ablan, S. D., Freed, E. O., Hess, H. F., and Lippincott-Schwartz, J. (2014). Distribution of ESCRT machinery at HIV assembly sites reveals virus scaffolding of ESCRT subunits. *Science*, **343**, 653–656.
- Vanier, M. T. (2015). Complex lipid trafficking in Niemann-Pick disease type C. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **38**, 187–199.
- Vazquez-Boland, J. A., Giguère, S., Hapeshi, A., MacArthur, I., Anastasi, E., and Valero-Rello, A. (2013). *Rhodococcus equi*: the many facets of a pathogenic actinomycete. *Veterinary Microbiology*, **167**, 9–33.
- Vázquez-Boland, J. A., and Meijer, W. G. (2019). The pathogenic actinobacterium *Rhodococcus equi*: what's in a name? *Molecular Microbiology*, **112**, 1–15.
- Vietri, M., Radulovic, M., and Stenmark, H. (2020). The many functions of ESCRTs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **21**, 25–42.
- Vishniac, W., and Santer, M. (1957). The Thiobacilli. *Bacteriological Reviews*, **21**, 195–213.
- von Bargen, K. (2010). Virulence mechanisms of the intracellular pathogen *Rhodococcus equi* and its interaction with activated macrophages. Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität Bonn.
- von Bargen, K., and Haas, A. (2009). Molecular and infection biology of the horse pathogen *Rhodococcus equi*. *FEMS Microbiology Reviews Rev*, **33**, 870–891.
- von Bargen, K., Maaser, A., Scraba, M., Krämer, I., Zapka, P., Bunge, M., Schlesinger, M., Griffiths, G., Gutschmann, T., Wohlmann, J., and Haas, A. (2019). Virulence-associated protein A from *Rhodococcus equi* is an intercompartmental pH-neutralising virulence factor. *Cellular Microbiology*, **21**, e12958.
- von Bargen, K., Polidori, M., Becken, U., Huth, G., Prescott, J. F., and Haas, A. (2009). *Rhodococcus equi* virulence-associated protein A is required for diversion of phagosome biogenesis but not for cytotoxicity. *Infection and Immunity*, **77**, 5676–5681.
- von Bargen, K., Wohlmann, J., Taylor, G. A., Utermöhlen, O., and Haas, A. (2011). Nitric oxide-mediated intracellular growth restriction of pathogenic *Rhodococcus equi* can be prevented by iron. *Infection and Immunity*, **79**, 2098–2111.
- Vorselen, D., Labitigan, R. L. D., and Theriot, J. A. (2020). A mechanical perspective on phagocytic cup formation. *Current Opinion in Cell Biology*, **66**, 112–122.

- Walker, M. E., Hjort, E. E., Smith, S. S., Tripathi, A., Hornick, J. E., Hinchcliffe, E. H., Archer, W., and Hager, K. M. (2008). *Toxoplasma gondii* actively remodels the microtubule network in host cells. *Microbes Infection*, **10**, 1440–1449.
- Wall, D. M., Duffy, P. S., DuPont, C., Prescott, J. F., and Meijer, W. G. (2005). Isocitrate lyase activity is required for virulence of the intracellular pathogen *Rhodococcus equi*. *Infection and Immunity*, **73**, 6736–6741.
- Wang, B., Shi, G., Yao, P. M., Li, Z., and Chapman, H. A. (1998). Human Cathepsin F. *The Journal of Biological Chemistry*, **273**, 32000–32008.
- Wang, L., Klionsky, D. J., and Shen, H. M. (2022). The emerging mechanisms and functions of microautophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **24**, 186–203.
- Wang, Y., Sangaré, L. O., Paredes-Santos, T. C., and Saeij, J. P. J. (2020). *Toxoplasma* mechanisms for delivery of proteins and uptake of nutrients across the host-pathogen interface. *Annual Review of Microbiology*, **74**, 567–586.
- Welch, M. D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D. A., Mitchison, T. J., Welch, M. D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D. A., and Mitchison, T. J. (2019). Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament Nucleation. *American Association for the Advancement of Science*, **281**, 105–108.
- Wilburn, K. M., Fieweger, R. A., and VanderVen, B. C. (2018). Cholesterol and fatty acids grease the wheels of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Pathogens and Disease*, **76**, fty021.
- Wollert, T., and Hurley, J. H. (2010). Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature*, **464**, 864–869.
- Wright, L. M., Carpinone, E. M., Bennett, T. L., Hondalus, M. K., and Starai, V. J. (2018). VapA of *Rhodococcus equi* binds phosphatidic acid. *Molecular Microbiology*, **107**, 428–444.
- Xu, Z., Hao, X., Li, M., and Luo, H. (2022). *Rhodococcus equi*-derived extracellular vesicles promoting inflammatory response in macrophage through TLR2-NF- κ B/MAPK pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, 9742.
- Yadati, T., Houben, T., Bitorina, A., and Shiri-Sverdlov, R. (2020). The ins and outs of cathepsins: physiological function and role in disease management. *Cells*, **9**, 1679.
- Yang, S., Kreutzberger, A. J. B., Lee, J., Kiessling, V., and Tamm, L. K. (2016). The Role of cholesterol in membrane fusion. *Chemistry and Physics of Lipids*, **199**, 136–143.

- Ye, X., Zhou, X. J., and Zhang, H. (2018). Exploring the role of autophagy-related gene 5 (ATG5) yields important insights into autophagy in autoimmune/autoinflammatory diseases. *Frontiers in Immunology*, **9**, 2334.
- Yoon, M. C., Solania, A., Jiang, Z., Christy, M. P., Podvin, S., Mosier, C., Lietz, C. B., Ito, G., Gerwick, W. H., Wolan, D. W., Hook, G., Donoghue, A. J. O., and Hook, V. (2021). Selective neutral pH inhibitor of cathepsin B designed based on cleavage preferences at cytosolic and lysosomal pH conditions. *ACS Chemical Biology*, **16**, 1628–1643.
- Yoshimori, T., Yamamoto, A., Moriyama, Y., Futai, M., and Tashiro, Y. (1991). Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H⁺-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **266**, 17707–17712.
- Zhang, W., Yang, X., Chen, L., Liu, Y. Y., Venkatarangan, V., Reist, L., Hanson, P., Xu, H., Wang, Y., and Li, M. (2021). A conserved ubiquitin- and ESCRT-dependent pathway internalizes human lysosomal membrane proteins for degradation. *PLoS Biology*, **19**, e3001361.
- Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., and Tang, W. H. (2019). Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell and Bioscience*, **9**, 19.
- Zink, M. C., Yager, J. A., Prescott, J. F., and Fernando, M. A. (1987). Electron microscopic investigation of intracellular events after ingestion of *Rhodococcus equi* by foal alveolar macrophages. *Veterinary Microbiology*, **14**, 295–305.
- Zito, G., Buscetta, M., Cimino, M., Dino, P., Bucchieri, F., and Cipollina, C. (2020). Cellular models and assays to study NLRP3 inflammasome biology. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, 4294.
- Zopf, W. (1891). Über Ausscheidung von Fettfarbstoffen (Lipochromen) seitens gewisser Spaltpilze. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, **9**, 22–28.
- Zu Bentrup, K. H., Miczak, A., Swenson, D. L., and Russell, D. G. (1999). Characterization of activity and expression of isocitrate lyase in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, **181**, 7161–7167.

7. Anhang



Anhang 1. Plasmid-Karte des von Lifetechnology gekauften Vektors mit einem *vapA*-Promotor *upstream* von *hlyA*.

```

ATCGAAGATGAAGACCCTCCACAAGACCGTCAGCAAGGCGATCGCCGCCACCGCCGTCGCCGCCGCGGCCATGATC
CCGGCCGGCGTCGCCAACGCCACCGTCAAGGACGCCTCGGCCTTCAACAAGGAGAACTCGATCTCGTCGATGGCCCCGC
CGGCCTCGCCGCCGCCCTCCCGAAGACCCCGATCGAGAAGAAGCACGCGGACGAGATCGACAAGTACATCCAGGGCCT
CGACTACAACAAGAACAACGTCTCGTCTACCACGGCGACGCCGTACCAACGTCCCGCCGCGCAAGGGCTACAAGGAC
GGCAACGAGTACATCGTCGTCGAGAAGAAGAAGTGCATCAACCAGAACAACGCCGACATCCAGGTCGTCAACGCCAT
CAGCTCGCTCACCTACCCGGGCGCCCTCGTCAAGGCCAACTCGGAGCTGGTCGAGAACCAGCCGGACGTCTCCCGGTC
AAGCGCGACTCGCTCACCTCTCGATCGACCTCCCGGGCATGACCAACCAGGACAACAAGATCGTCGTCGAAGAACGCCAC
CAAGTCGAACGTCAACAACGCCGTCAACACCCTCGTCGAGCGCTGGAACGAGAAGTACGCCAGGCCTACCCGAACGTCA
GCGCCAAGATCGACTACGACGACGAGATGGCCTACTCGGAGTCGAGCTGATCGCCAAGTTCGGCACCGCCTTCAAGGC
CGTCAACAACCTCGCTCAACGTCAACTTCGGCGCCATCTCGGAGGGCAAGATGCAGGAGGAGGTCATCTCGTTCAAGCAGA
TCTACTACAACGTCAACGTCAACGAGCCGACCCGCCCGTTCGCGCTTCTTCGGCAAGGCCGTGACCAAGGAGCAGCTCCAG
GCCCTCGGCGTCAACGCGGAGAACCCGCCCGCCTACATCTCGTCGGTCGCCTACGGCCGCCAGGTCTACCTCAAGCTCT
CGACCAACTCGCACTCGACCAAGGTCAAGGCCGCCTTCGACGCCGCCGTACGCGGCAAGTCGGTCAGCGGCGACGTCGA
GCTGACCAACATCATCAAGAAGTCTCGTTCGTTCAAGGCGGTCTACGGCGGCTCGGCCAAGGACGAGGTCCAGATCATCG
ACGGCAACCTCGGCGACCTCCGCGACATCCTCAAGAAGGGCGCCACCTTCAACCGCGAGACCCGGGCGTCCCGATCGC
CTACACCACCAACTTCTCAAGGACAACGAGCTGGCCGTATCAAGAACAACCTCGGAGTACATCGAGACCCTCGAAGG
CCTACACCGACGGCAAGATCAACATCGACCACTCGGGCGGCTACGTCGCCCAGTTCAACATCTCGTGGGACGAGGTCAAC
TACGACCCGGAGGGCAACGAGATCGTCCAGCACAAAGAACTGGTCGGAGAACAACAAGTCAAGTCAAGTCCGCCACTTCACTC
GTCGATCTACCTGCCGGGCAACGCCCGCAACATCAACGTCTACGCCAAGGAGTGCACCGGCCTCGCCTGGGAGTGGTGG
CGCACCGTCATCGACGACCGCAACCTCCCGCTCGTCAAGAACCGCAACATCTCGATCTGGGGCACCCACCTCTACCCGAA
GTACTCGAACAAGGTCGACAACCCGATCGAG

```

Anhang 2. Sequenz von *hlyA* codonoptimiert für *R. equi*.

Anhang

Primer	Sequenz (5'->3')	Länge	Tm	GC (%)
ORF4_FW_XbaI	AACAAAAAGCAGACGATCTAGAGAGTTGGTCAGGACCTGAGGG	21	61.78	61.90
ORF4_RV	CTCCTACTCCTGTCGCTGAACCTAGGCGCCCTCTTGTCCG	19	62.43	68.42

AACAAAAAGCAGACGATCTAGAGAGTTGGTCAGGACCTGAGGGTGAGAAGATGCGTGCGAAAAGTCGGGCATTGGCAAGGGGGTACGCCAAGGCCAGGGCCG
GGAAGTGTAAACCGTCTCGATTGATAGCATAGGTAGACGTCATGGTCAAGGGTTTGCCTATCATCGCTTCGTTCCGATGCTCCCGTAGGTGAATGTTACGAACTCCG
CTGTTTTGTGGCGTTAGCAGAATCGGAGCACATGCCGATGCCGCTGACGCCCTGCACATCTCTCAACCGACTCTCTCGCGGGCGCTTCCCGCATTGAACGACAGG
TTGGGGTGCCCTGTTTCGATCGGGTGAACCATCGCCTGCAGCTCAAGGACTACGGCCGGATCATGCTTGGACATACTCGCCGGAGTTTACCCGAACCTCACTCAGCC
GGCGAGCGGATCGCTCGCTCCGTAATCCTGAGTCAGGCACCGTTCCGGCTAGGCTTCCGCACTCCCTTCCGAGTTGGTTTTGTCCCTGAGATCATCCGGGTGTTTCG
CGAGAGCGCGCCGAGGGTGAACCTCGCGCTGAACGAGGCTCCGAGCGAGGCCATCGAAGCGATGCTGGCTCGGGGGGAGATTGATGTCGAGTATCGGGCCAGC
GCCCGCCGCGACGAGTTCGACTGGTATGAGCTCTACGTAGAACGCCCTTTCGCTCGCTGTGCCGAATCTCACCCCTTAGCGGGGCGTCCGACTATCCGGATAGCA
GACGCTTCCGATAACGCTTTCATTATGCTCCGAGGCCATTCCGGCTCCGCAAGCTGGTGCAGAACTGTTCCGGGCTGCTGGCGCTGACCCCAAAATCGTCTTTGA
GACGATCGAGATCCCTACCCCTGAGGGCCCTGTTGCCGCGAGGTTTCCGGGTCGCTGGTTCCCTTCCCGAGACCCACCAAGAGACCGAAGGCGTCAGGTACGTA
CCTTTGGACGATGTCGGAGCCTTTCGTCGATTGGCTGGCGTGGCCGATAGGACGAGAACCCTCTCCCGTCGTTACGCGCTTCCCTCGCTTTCATAGCAAACCGCGG
ACAAGAGGGCCCTAGGTTACGCGACAGGAGTGAGGAG

1102 bp

Primer	Sequenz (5'->3')	Länge	Tm	GC (%)
ORF8_FW	GTTACGCGACAGGAGTGAGG	20	60.39	60.00
ORF8_RV_XbaI	AGCTAGCTTCAGACGTGCTAGAGATTAATGCCGTGGCCCTGC	20	62.08	60.00

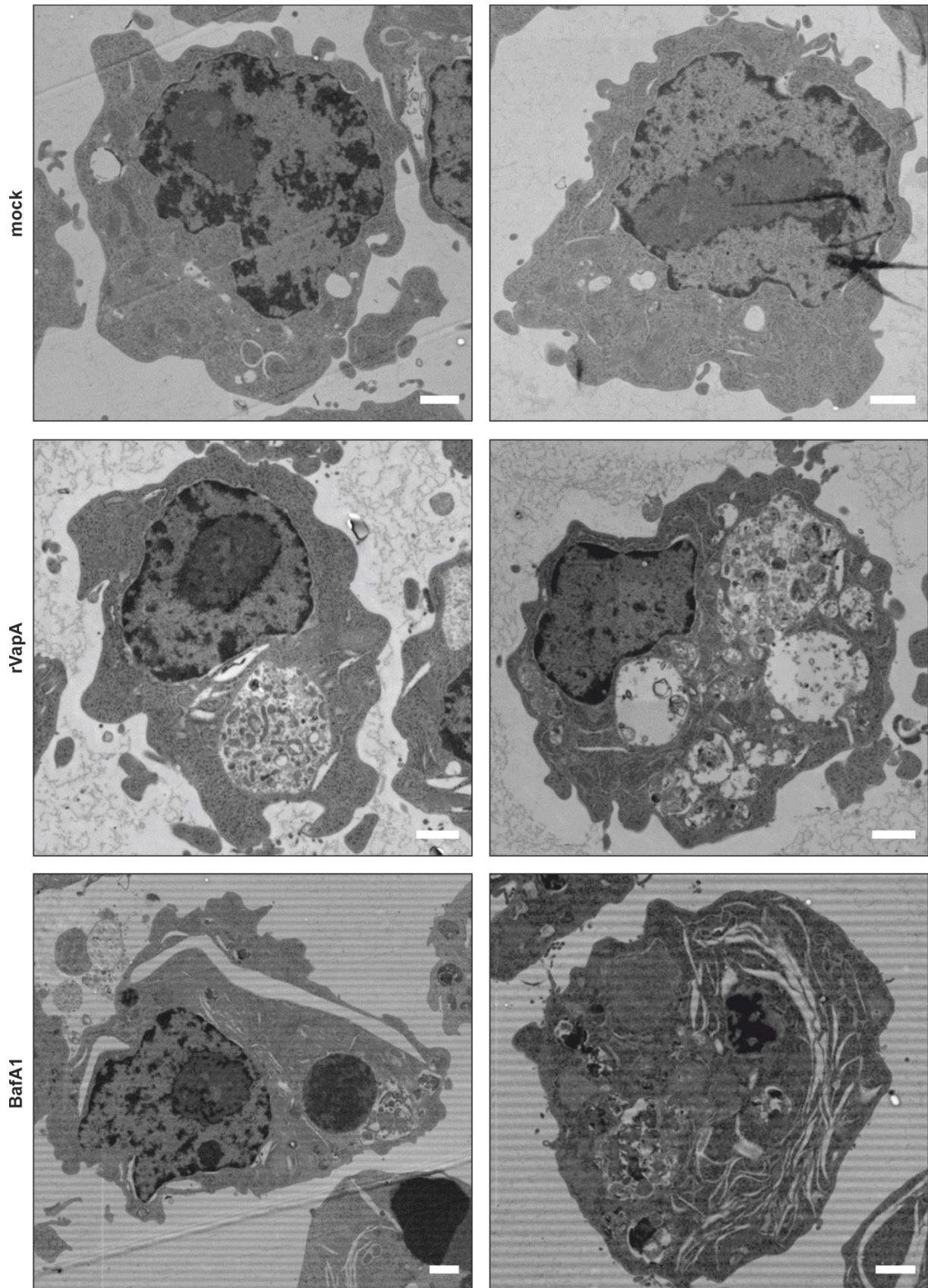
GTTACGCGACAGGAGTGAGGAGAGATTTCGTAATGGGTGCCGTTTAAAACTTTCCTGCCTCGCTGATAATGGTTAGGGCAATGCTCATCTAGTGTGGGAGTAGGTGGT
TTGGGATGGAGTCCATTCGCGGTATATCGGTCCTTCTAGCTGACCGTATCCGCGCTACGAACGCCACGCGGGCGTATTTGAACAACCTGGGAATGGTGGTCCG
AGAAGCCGGTAATGGCGATTGAAGTGCATGATCGGGCTGCGCGCAAGGATTTGACCTTATCGTTCTAGATGTAGACTACCCGGCATGAGCGGGGATGAACCTCGCC
GAAAGCGAGATGAGCAGATATCCCGGACATTCCTATCATATTGCTTTCGCTAGAAACGGCGAACAGGAGCGGATTGCCGGACTTGAATCAGGCCCGGATGACTATA
TTCCTAAACCGGTCAACTCGCGTGAAGTGGCATTGCGTATCGCTGAAATTCGACCGCTTGAAGATTCCGGAGGGAGGAAACCGCACACCGCAGCGGCTCCCGCTA
TCCGATGAGATAAATCAACTGATCCTTCCGCGCGCTGCATATATGTAACGGAGACATGATTACTTAACCTCCGAGAGTTCGACTGCTCGCATACTTATGAAAA
CCCTTTCGTAATCACTCGCGCCAGGATGCTGTAAGCGTGTATGAAATGGTATACGGTATTTATCCACGGTCACTGTACAGCTCAGAAGACTGCGTAAGAGGTTG
GGTAATTTCCCGAATCGAAACGATGAGGGGCGGGGCTATCGCTGGATCCCGGACCTCCGGTCCCGCAAGTCGACGCTCCAGCGACGAGCGATTGGCAGGGC
CACGGCATTAACTCTAGACACGCTCTGAAGCTAGCT

897 bp

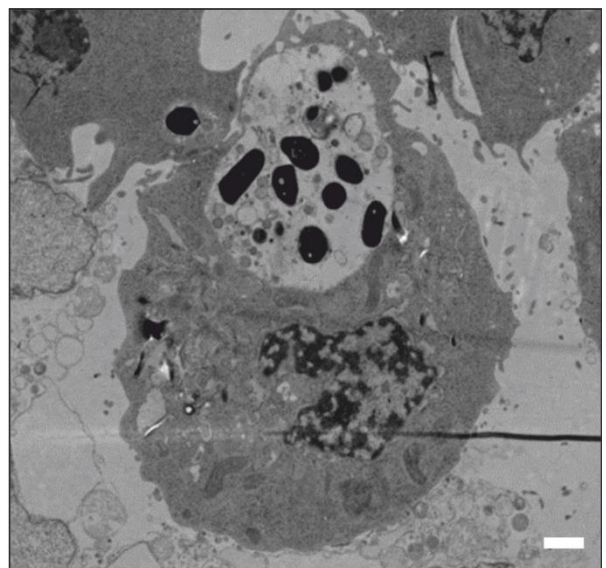
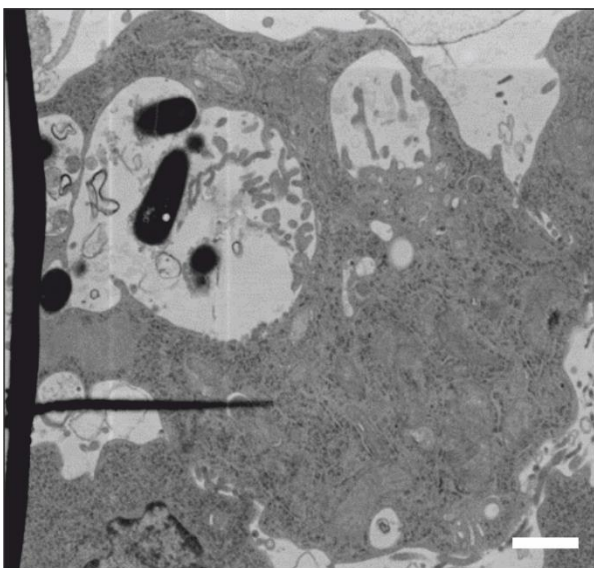
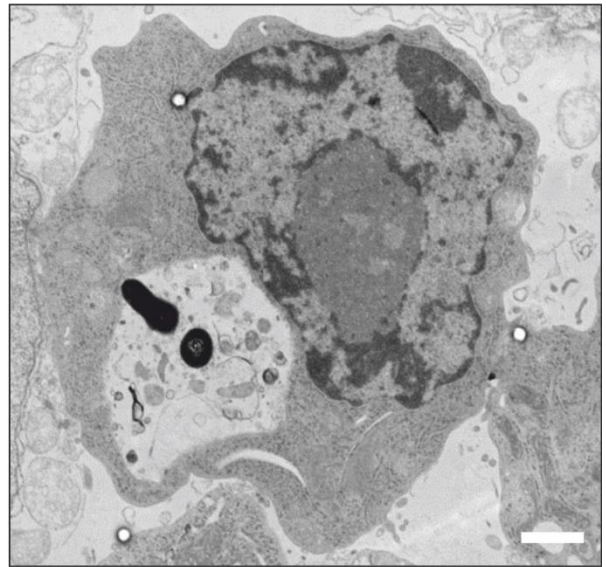
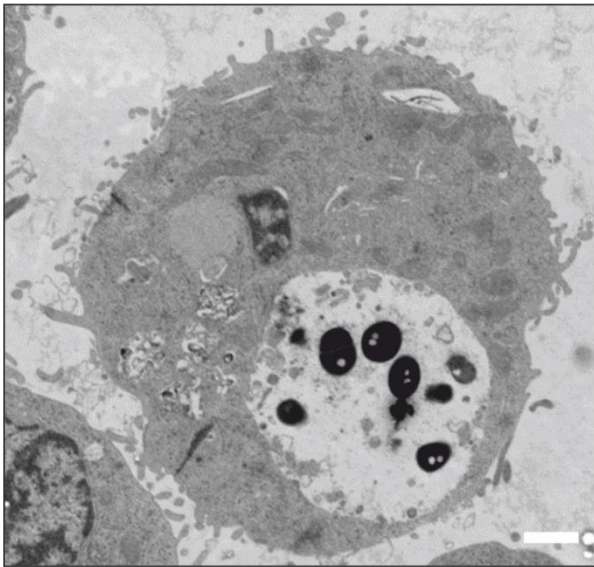
Ergebnis

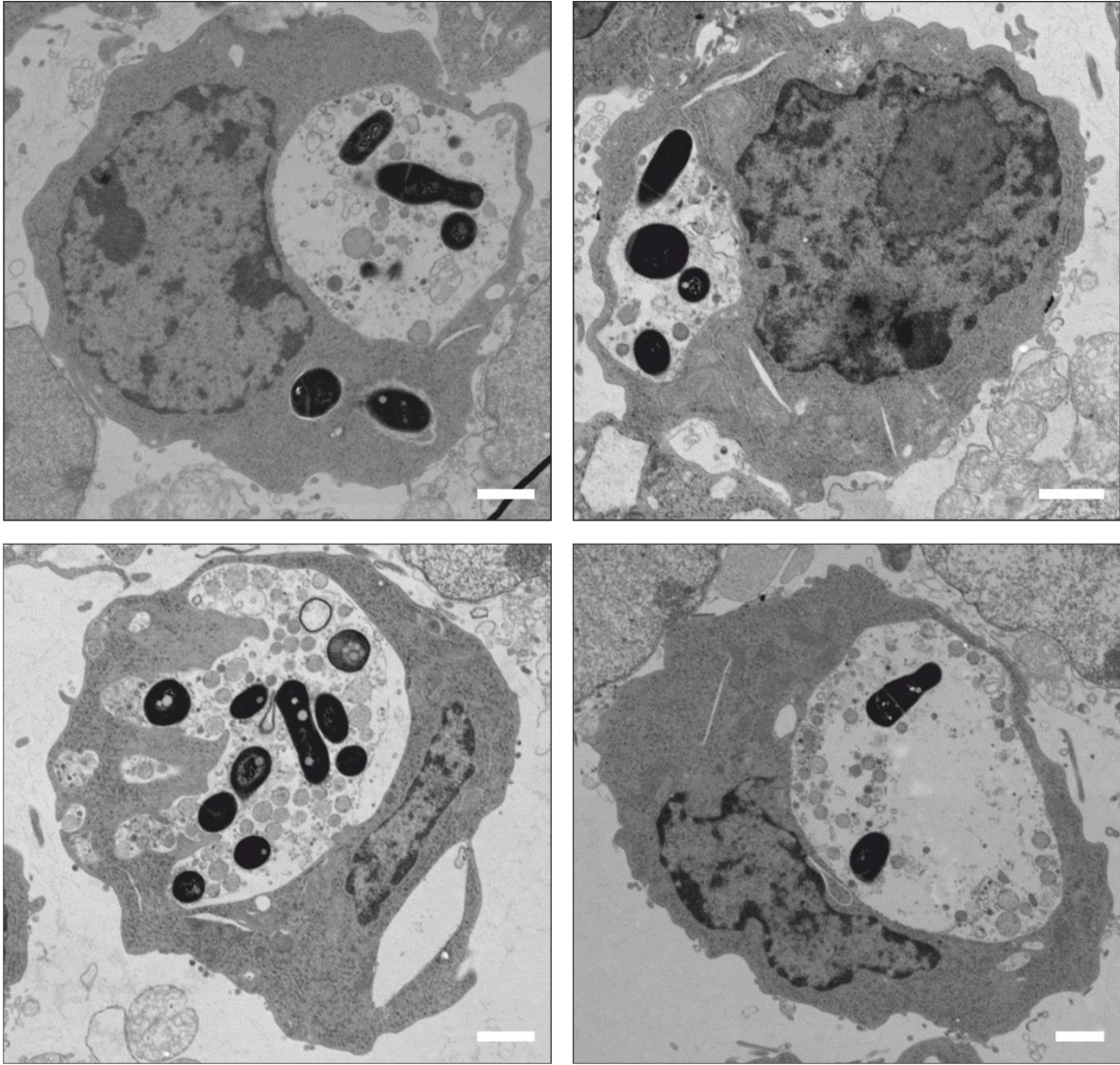
AACAAAAAGCAGACGATCTAGAGAGTTGGTCAGGACCTGAGGGTGAGAAGATGCGTGCGAAAAGTCGGGCATTGGCAAGGGGGTACGCCAAGGCCAGGGCCG
GGAAGTGTAAACCGTCTCGATTGATAGCATAGGTAGACGTCATGGTCAAGGGTTTGCCTATCATCGCTTCGTTCCGATGCTCCCGTAGGTGAATGTTACGAACTCCG
CTGTTTTGTGGCGTTAGCAGAATCGGAGCACATGCCGATGCCGCTGACGCCCTGCACATCTCTCAACCGACTCTCTCGCGGGCGCTTCCCGCATTGAACGACAGG
TTGGGGTGCCCTGTTTCGATCGGGTGAACCATCGCCTGCAGCTCAAGGACTACGGCCGGATCATGCTTGGACATACTCGCCGGAGTTTACCCGAACCTCACTCAGCC
GGCGAGCGGATCGCTCGCTCCGTAATCCTGAGTCAGGCACCGTTCCGGCTAGGCTTCCGCACTCCCTTCCGAGTTGGTTTTGTCCCTGAGATCATCCGGGTGTTTCG
CGAGAGCGCGCCGAGGGTGAACCTCGCGCTGAACGAGGCTCCGAGCGAGGCCATCGAAGCGATGCTGGCTCGGGGGGAGATTGATGTCGAGTATCGGGCCAGC
GCCCGCCGCGACGAGTTCGACTGGTATGAGCTCTACGTAGAACGCCCTTTCGCTCGCTGTGCCGAATCTCACCCCTTAGCGGGGCGTCCGACTATCCGGATAGCA
GACGCTTCCGATAACGCTTTCATTATGCTCCGAGGCCATTCCGGCTCCGCAAGCTGGTGCAGAACTGTTCCGGGCTGCTGGCGCTGACCCCAAAATCGTCTTTGA
GACGATCGAGATCCCTACCCCTGAGGGCCCTGGTGGCCGAGGTTTCCGGGTCGCTGGTTCCCTTCCCGAGACCCACCAAGAGACCGAAGGCGTCAGGTACGTA
CCTTTGGACGATGTCGGAGCCTTTCGTCGATTGGCTGGCGTGGCCGATAGGACGAGAACCCTCTCCCGTCGTTACGCGCTTCCCTCGCTTTCATAGCAAACCGCGG
ACAAGAGGGCGCCTAGGTTACGCGACAGGAGTGAGGAGAGATTTCGTAATGGGTGCCGTTTAAAACTTTCCTGCCTCGCTGATAATGGTTAGGGCAATGCTCATCTAG
TGTGGGAGTAGGTGGTTTTGGGTATGGAGTCCATTCGCGGTATATCGGTCCTTCTAGCTGACCGTATCCGGCGCTACGAACGCCACGCGGGCGTATTTGAACAAC
TGGGAATGGTGGTCCGAGAAGCCGGTAATGGCGATGAAGTGCATGATCGGGCTGCGCGCAAGGATTTGACCTTATCGTTCTAGATGTAGACTACCCGGCATGAGC
GGGATGAACCTCGCCGAAAGCGAGATGAGCAGATATCCCGACATTCCTATCATATTGCTTTCGCTAGAAAACGGCGAACAGGAGCGGATTGCGGACTTGAATCA
GGCGCGATGACTATAATCTTAAACCGGTCAACTCGCGTGAAGTGGCATTGGCTATCGCTCGAATTCGACCGCTTGAAGATTGGGAGGGAGGGAACCCGACACC
GCAGCGGCTCCCGCTATCCGATGAGATAATCAACTGTATCCTTCCGCGCGTGCATATATGTAACGGAGACATGATTACTTAACCTCCCGAGAGTTCGACCTGCTC
GCATATTCATGAAAAACCTTTCGTAATTCACCTCGCGCCAGGATCTGTAAGACGTGATGAAAAATGGTATACCGGTGATTTATCCACGGTCACTGATACACGTCA
GACTCGGTAAAGAGTTGGTAATTTCCCGAATCGAAACGATGAGGGGCGGGGCTATCGCTGGATCCCGGACCTCCGGTCCCGCAAGTCGACGCTCCAGCGA
CGAGCATTGGCAGGGCCAGGCATTAATCTAGACACGCTCTGAAGCTAGCT

Anhang 3. Sequenzen für SLIC von *orf4* (*virR*) und *orf8* (*virS*).

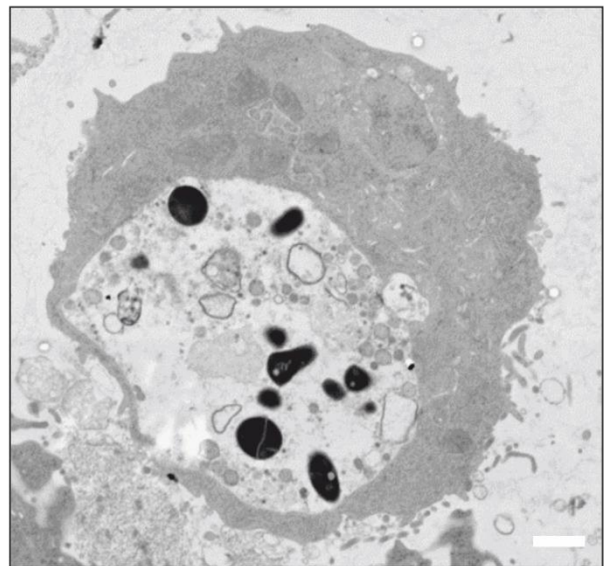
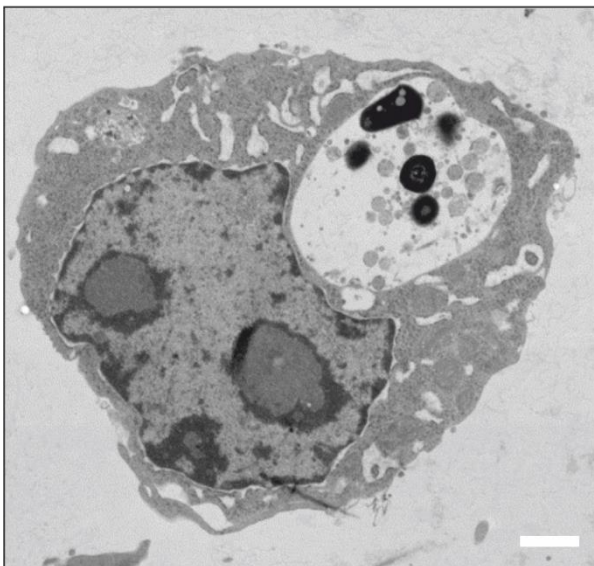
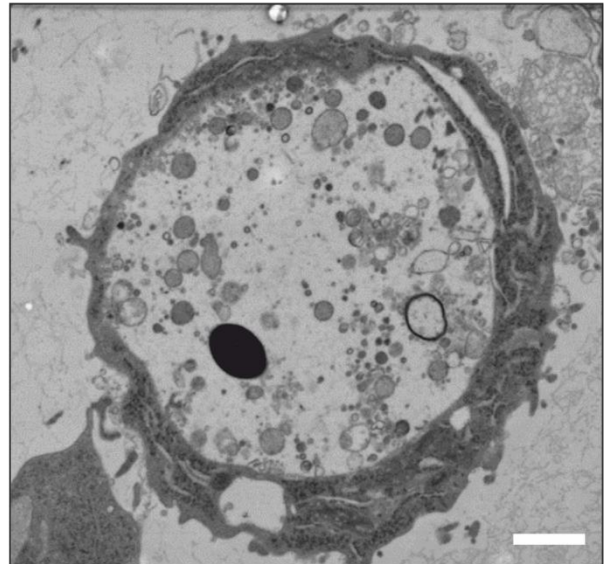
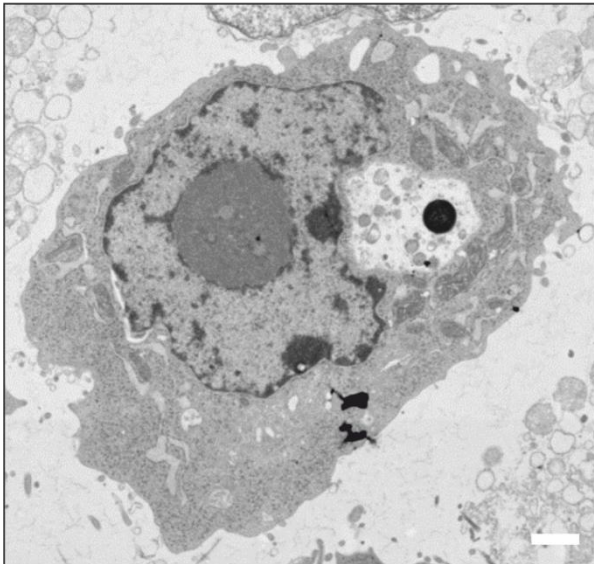
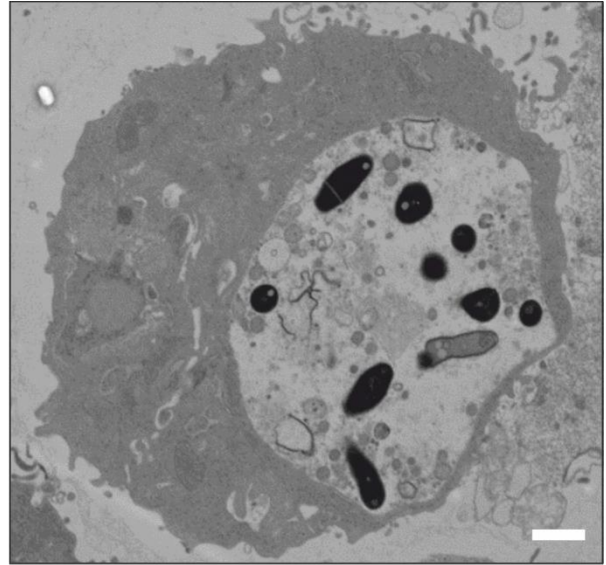
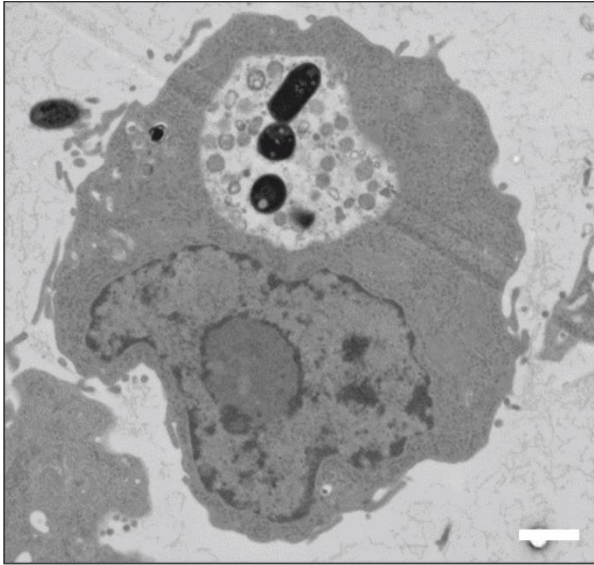


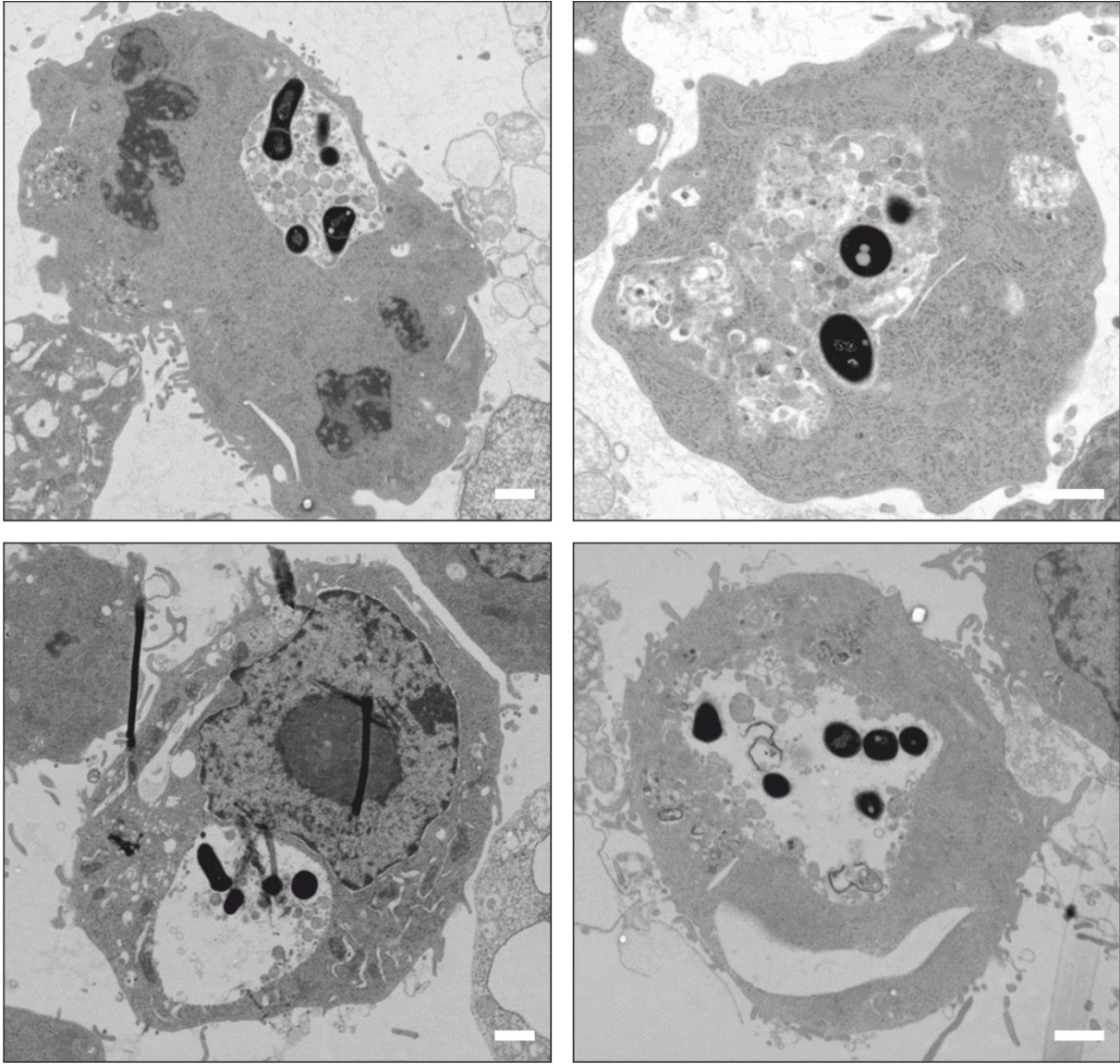
Anhang 4. TEM-Aufnahmen von 10µg/ml rVapA- bzw. 40 nM BafA1-behandelten RAW264.7 Makrophagen, nach 18 stündiger Behandlung. Maßbalken: 1 µm. mock, unbehandelt.



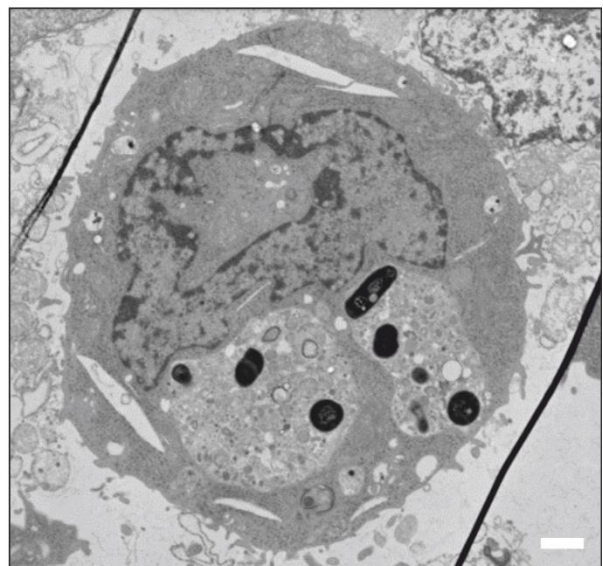
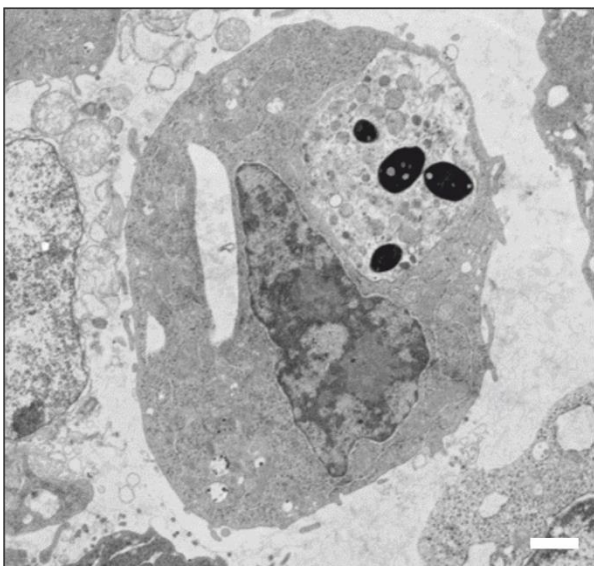
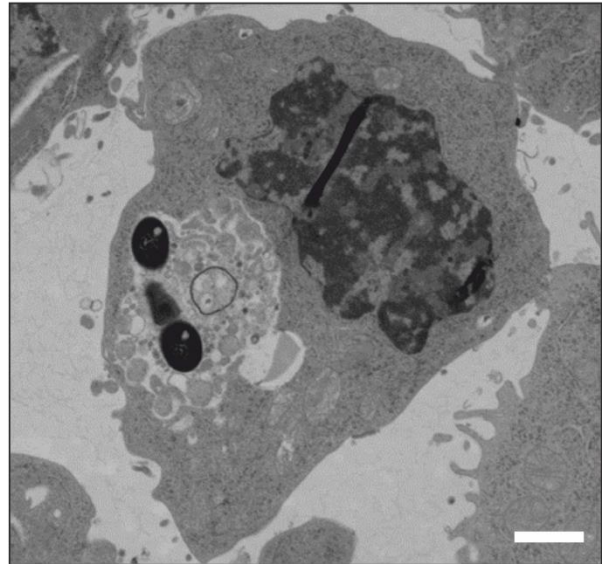
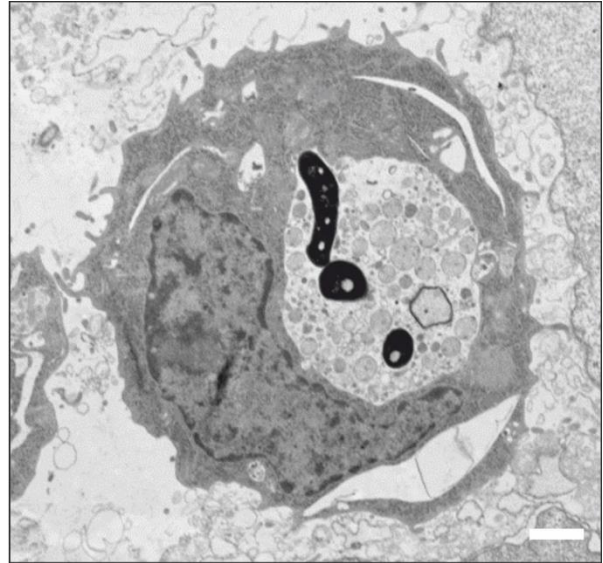
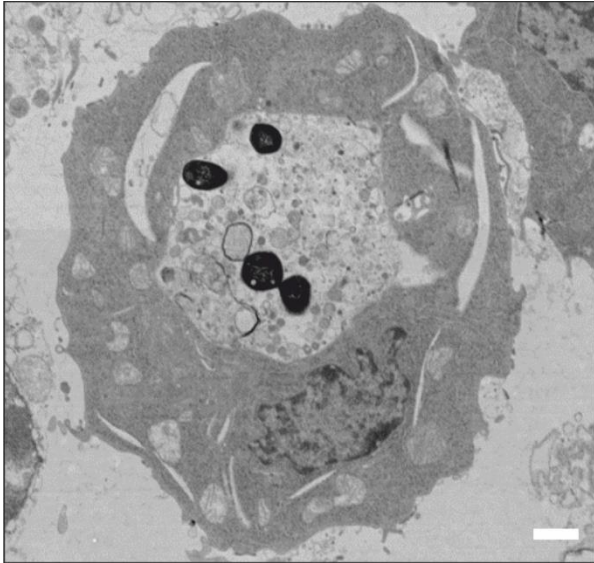


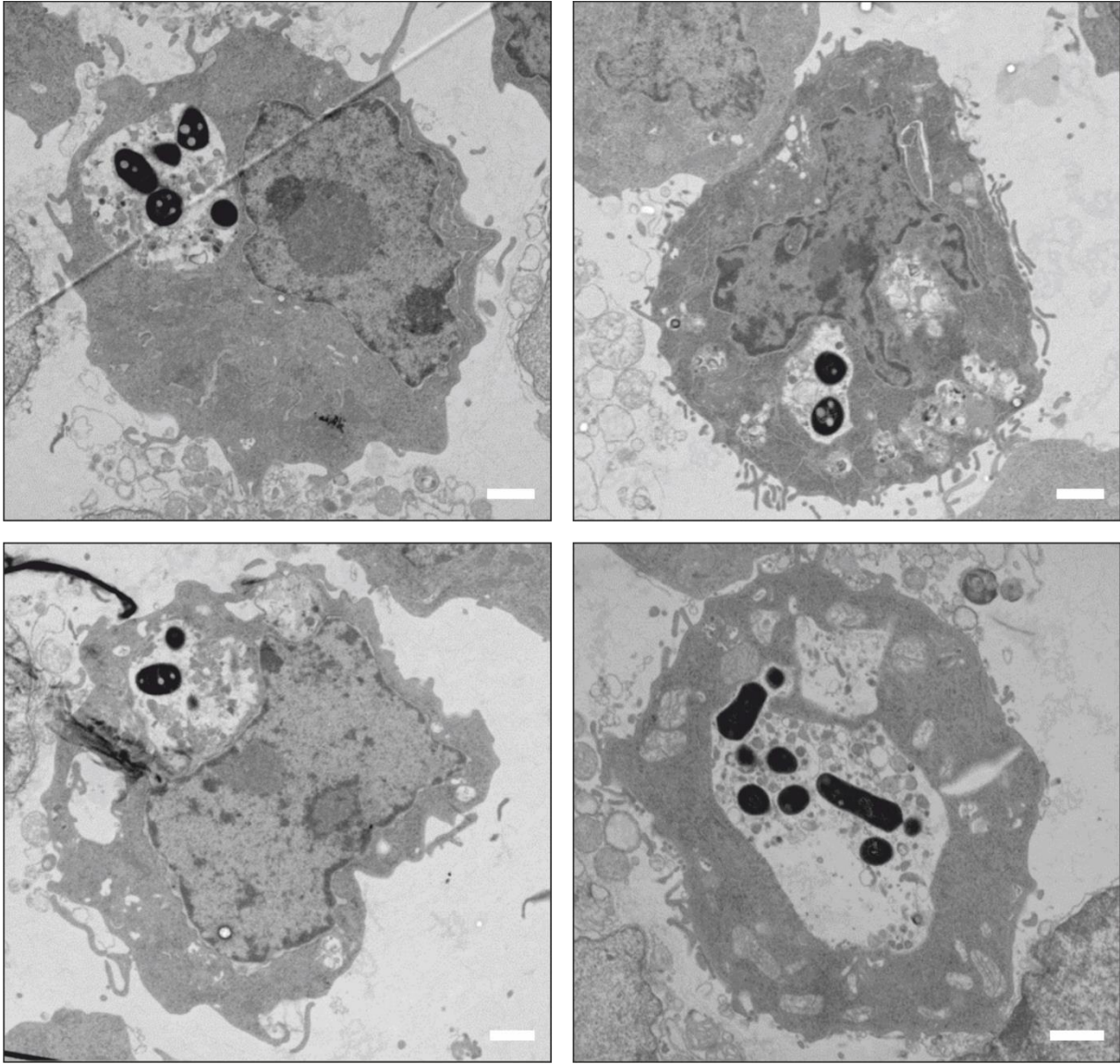
Anhang 5. TEM-Aufnahmen von Vps4 siRNA-transfizierten und mit *R. equi* 103+ infizierten RAW264.7 Makrophage 24 h p.i.. Maßbalken: 1 μ m.





Anhang 6. TEM-Aufnahmen von Alix siRNA-transfizierten und mit *R. equi* 103+ infizierten RAW264.7 Makrophage 24 h p.i.. Maßbalken: 1 μ m.



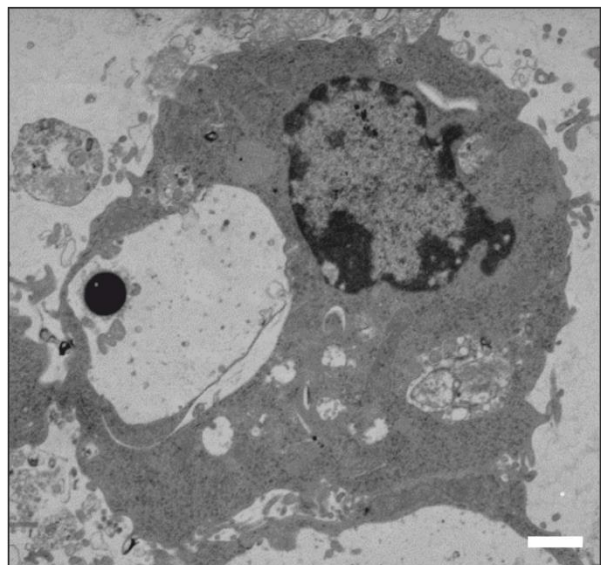
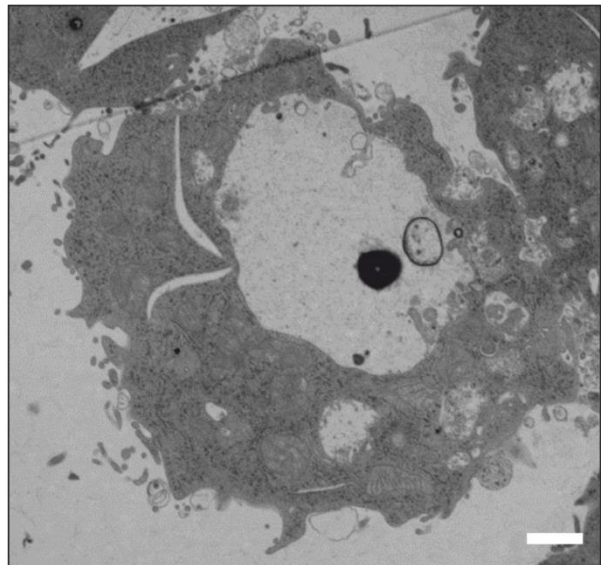
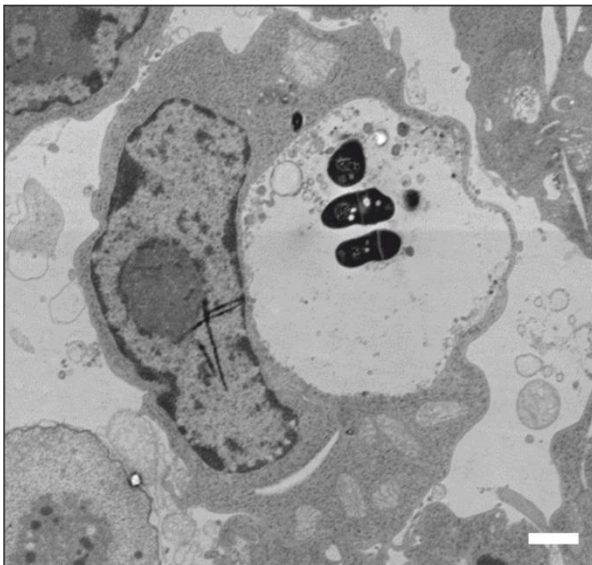
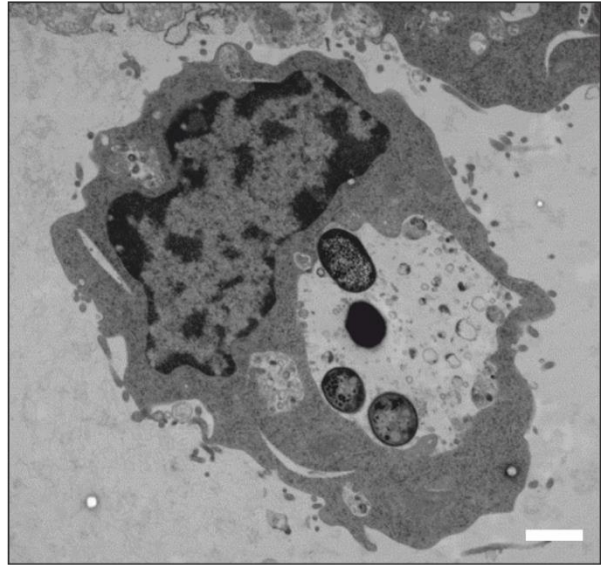


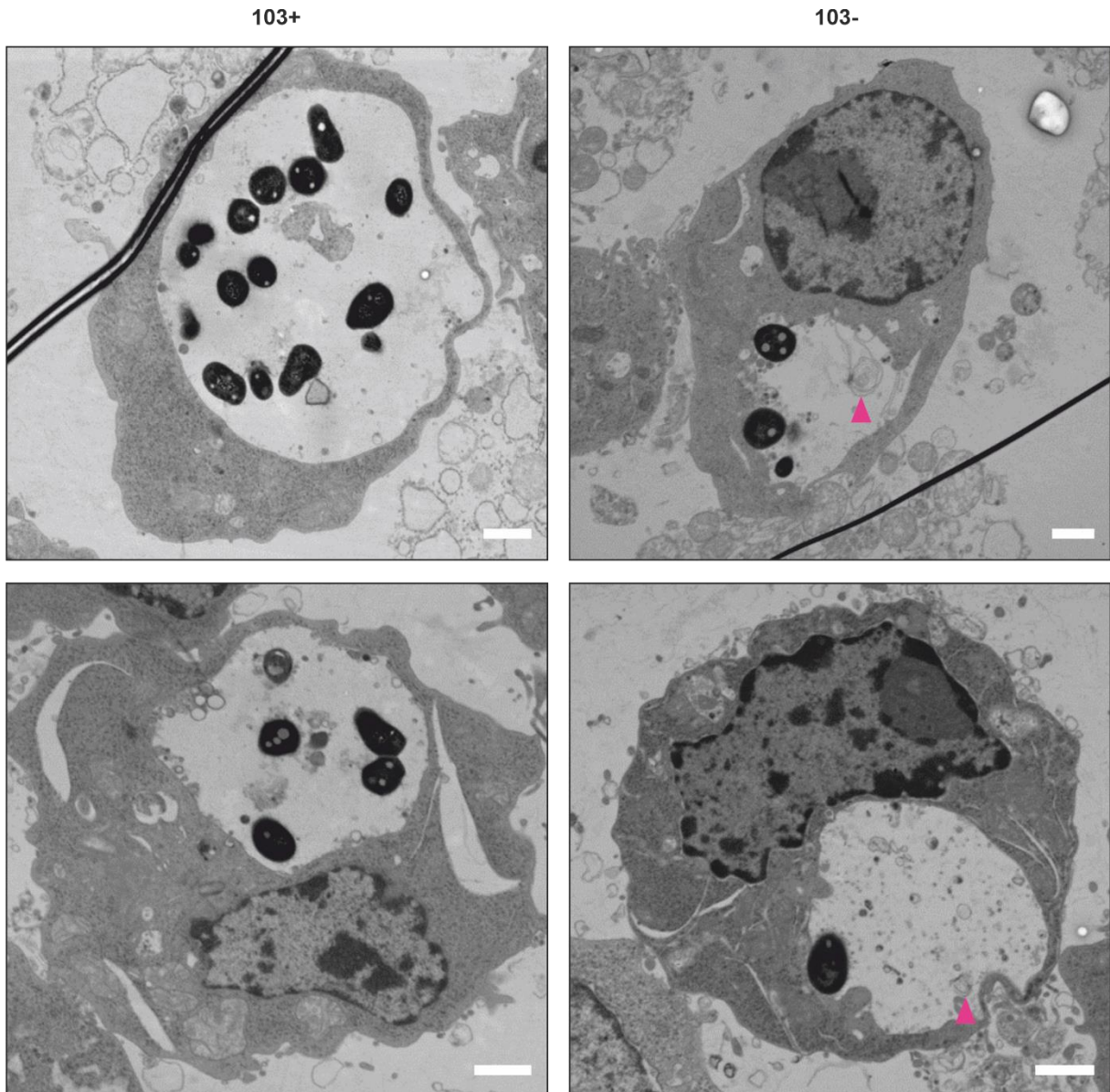
Anhang 7. TEM-Aufnahmen von *Scrambled* siRNA-transfizierten und mit *R. equi* 103+ infizierten RAW264.7 Makrophage 24 h p.i.. Maßbalken: 1 μ m.

103+



103-





Anhang 8. TEM-Aufnahmen von U18666A- und rVapA-behandelten und mit *R. equi* 103+ oder 103- infizierten RAW264.7 Makrophage 24 h p.i.. Maßbalken: 1 μ m. Magentafarbene Pfeilspitze zeigt auf multimembranöse Strukturen.

Publikationsliste

Teile der hier vorliegenden Arbeit wurden bereits in folgendem Artikel publiziert:

Haubenthal, T., Hansen, P., Krämer, I., Gindt, M., Jünger-Leif, A., Utermöhlen, O., & Haas, A. (2023). Specific preadaptations of *Rhodococcus equi* cooperate with its virulence-associated protein A during macrophage infection. *Molecular Microbiology*, **119**, 285–301. <https://doi.org/10.1111/mmi.15026>

Weitere Publikationen

Hansen, P., **Haubenthal, T.**, Reiter, C., Kniewel, J., Bosse-Plois, K., Niemann, H. H., von Bargen, K., & Haas, A. (2023). Differential effects of *Rhodococcus equi* virulence-associated proteins on macrophages and artificial lipid membranes. *Microbiology Spectrum*, **11**, e0341722.

Eingereicht und in Bearbeitung nach erster Revision bei *Molecular Microbiology*:

Nehls, C., Schröder, M., **Haubenthal, T.**, Haas, A., Gutschmann, T. (2023). The mechanistic basis of the membrane permeabilizing activities of the virulence-associated protein A (VapA) from *Rhodococcus equi*.

Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Albert Haas für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen. Außerdem danke ich ihm für die hervorragende Betreuung und dass ich mich dank ihm zu einem kritischeren und reflektierteren Menschen entwickelt habe.

Ein großer Dank geht an Herrn PD Dr. Gregor Kirfel für die Übernahme der Zweitkorrektur. Zudem danke ich ihm für seine Hilfe bei der Elektronenmikroskopie, für seine kompetente Betreuung und sein stets ehrliches Feedback.

Herzlichen Dank an Frau Prof. Dr. Susanne Schoch-McGovern und Herrn Prof. Dr. Gerhard von der Emde für die Beurteilung dieser Arbeit.

Ein großer Dank gilt der gesamten AG Haas und allen (ehemaligen) Mitarbeitern des Instituts. Ich danke Euch für Eure Hilfe und Unterstützung, viele tolle Gespräche und vor allem eine unvergessliche Zeit. Dieser Dank gilt besonders: Alexandra Jünger-Leif, Marvin Aßent, Lara Pöttgen, Ariane Schleinitz, Tobias Dummin und Andreas Jeschke.

Ich danke Tatjana Bartz für ihre zuverlässige Hilfe bei der Vorbereitung meiner TEM-Proben.

Zuletzt bedanke ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie, die mich auf meinem Weg begleitet und stets unterstützt haben. Ein besonderer Dank geht zudem an meine Freundin.