

**Biochemische und genetische  
Analyse der Wechselwirkung von  
*Rhodococcus equi* mit Makrophagen**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Marco Polidori**  
aus Frankfurt/Main

Bonn, Juli 2007

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

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Zellbiologie der Rheinischen Friedrich-  
Wilhelms-Universität Bonn angefertigt.

1. Referent: Prof. Dr. Albert Haas
2. Referent: Prof. Dr. Jörg Höfeld

Tag der Promotion:

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Albert Haas für die Möglichkeit, an diesem Projekt arbeiten zu können. Die zahlreichen Anregungen, Diskussionen und Ideen waren mir stets eine große Hilfe. Ich danke ihm auch für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft, die freundliche Atmosphäre, seine ansteckende Begeisterungsfähigkeit, aber auch für seine Unterstützung bei der Verfolgung eigener Ideen. Dômo arigatô gozaimasu, Albert!

Bei meinen Kollegen Tine v. Barga, Ulrike Becken, Christian Schüller, Bianca Schneider, Tobias Sydor, Steffi Schielke und Uta Strübing möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Vor allem danke ich Steffi für ihre Freundschaft und ihre herzliche und fröhliche Art den Alltag im Labor zu erhellen. Ein herzliches Dankeschön geht an Eugenia Fernandez für die tolle Zusammenarbeit und die vielen Diskussionen. Vielen Dank auch an meine Korrekturleser Tine, Christian, Ulrike und Steffi. Renate Ollig und Sabine Spürck danke ich für die tatkräftige Unterstützung im Labor.

Herrn Prof. Dr. Jörg Höfeld danke ich herzlich für die Übernahme des Koreferats. Für die gute Zusammenarbeit und das herzliche Arbeitsklima bedanke ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Höfeld und besonders bei Markus Genau und Verena Arndt für das freundschaftliche Büroklima.

Elisabeth Krämer danke ich für die Entwicklung der EM Aufnahmen. Dr. John Prescott für die Bereitstellung von Vektoren und die Tests an Mäusen.

Für die Begutachtung dieser Arbeit danke ich Frau PD Dr. Christiane Dahl sowie Herrn Prof. Dr. Michael Gütschow.

Ich danke auch Jan Lübber und seiner gesamten Truppe für die schöne und lehrreiche Zeit in Bonn.

Meiner Familie und ganz besonders meinen Eltern danke ich für ihre ständige Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Durch ihren Glauben an mich habe ich immer wieder neuen Mut und die Kraft geschöpft weiter zu gehen. Was ich Sabine verdanke, lässt sich nicht in Worte fassen. Vielen Dank für Alles.

## Publikationen und Kongressbeiträge

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Fernandez-Mora E.\*, **Polidori M.\***, Lührmann A., Schaible U. E., Haas A. (2005). Maturation of *Rhodococcus equi*-containing vacuoles is arrested after completion of the early endosome stage. *Traffic*;6(8):635-53.

**Polidori M.**, Haas A. (2006). VapI, a new member of the *Rhodococcus equi* Vap family. *Antonie Van Leeuwenhoek*;90(3):299-304

**Polidori M.**, von Bargen K., Becken U., Prescott J. F., Haas A. (2007). Molecular dissection of *Rhodococcus equi* pathogenicity island function. *Molecular Microbiology*. Eingereicht.

\*: contributed equally to this study

Vorträge:

“When phagosomes go astray – *Rhodococcus equi* in macrophages”. (2005) *Bonner Forum Biomedizin*, Walberberg.

Posterbeiträge:

**Polidori M.**, Fernandez-Mora E., Haas A. (2006). The enemy within – characterisation of *Rhodococcus equi* pathogenesis. *Bonner Forum Biomedizin*, Bad Breisig.

**Polidori M.**, Sydor T., von Bargen K., Haas A. (2006). Molecular analysis of the interaction between pathogenic *Rhodococcus equi* and their host macrophages. Begutachtung des SFB 670, Köln.

Fernandez-Mora, E., Sydor, T., **Polidori, M.**, Lührmann, A., Mauder, N., Schulze-Lührmann, J., Haas, A. (2004). Live and let die- *Rhodococcus equi* infection of macrophages. *Bonner Forum Biomedizin*. Walberberg, Germany. 07-08.02.2004.

Lührmann, A., Fernandez-Mora, E., Mauder, N., Schulze-Lührmann, J., **Polidori, M.**, Sydor, T., Haas, A. (2003). Necrotic death of *Rhodococcus equi*-infected macrophages is regulated by virulence-associated plasmids. *ELSO 2003 Conference*. Dresden, Germany. 20.-24.09.2003.

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	VI
<b>1 Einleitung</b> .....	1
1.1 Makrophagen.....	1
1.2 Erkennung und Aufnahme eines Partikels durch Makrophagen.....	2
1.3 Phagosomenreifung.....	3
1.4 Überlebensstrategien intrazellulärer Pathogene.....	7
1.4.1 Lyse der Phagosomenmembran und Ausbruch in das Zytosol.....	8
1.4.2 Blockierung der Phagosomenreifung.....	8
1.4.3 Etablierung eines nicht-endozytischen Kompartiments.....	11
1.4.4 Anpassung an lysosomale Bedingungen.....	12
1.5 Aktivierung von Makrophagen.....	13
1.6 <i>Rhodococcus equi</i> .....	14
1.6.1 Die Gattung <i>Rhodococcus</i> .....	14
1.6.2 <i>Rhodococcus equi</i> .....	15
1.6.3 <i>Rhodococcus equi</i> als Krankheitserreger.....	16
1.6.4 Interaktion von <i>Rhodococcus equi</i> mit Wirtszellen.....	16
1.6.5 Virulenzfaktoren von <i>Rhodococcus equi</i> .....	17
1.7 Ziele dieser Arbeit.....	19
<b>2 Material und Methoden</b> .....	20
2.1 Chemikalien.....	20
2.2 Verbrauchsmaterialien.....	22
2.3 Geräte.....	23
2.4 Antikörper.....	24
2.4.1 Primäre Antikörper.....	24
2.4.2 Sekundäre Antikörper.....	25
2.5 Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe.....	25
2.6 Kulturmedien und Agarplatten.....	25
2.6.1 Medien für <i>Rhododoccus equi</i> .....	25
2.6.2 Medien für <i>Escherichia coli</i> .....	26
2.6.3 Medien für murine Zelllinien.....	26
2.7 Lösungen und Puffer.....	27
2.8 Zellkultur.....	33
2.8.1 Zelllinien.....	33
2.8.2 Kultivierung von J774E- und RAW264.7-Zellen.....	34
2.8.3 Kultivierung von L929 Fibroblasten.....	34
2.8.4 Isolierung und Kultivierung von Knochenmarksmakrophagen.....	34

2.8.5 Einfrieren und Lagerung von Zellen .....	35
2.8.6 Bestimmung der Zellzahl .....	35
2.8.7 Aktivierung von Makrophagen .....	35
2.9 Anzucht von Bakterien .....	36
2.9.1 Verwendete Bakterienstämme .....	36
2.9.2 Anzucht von <i>Rhodococcus equi</i> .....	36
2.9.3 Anzucht von <i>Listeria innocua</i> .....	37
2.9.4 Anzucht von <i>Escherichia coli</i> .....	37
2.10 Bestimmung der Bakterienzellzahl .....	37
2.11 Vorbehandlung der Bakterien .....	38
2.11.1 Behandlung mit Hitze .....	38
2.11.2 Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an Bakterien .....	38
2.12 Phagosomenisolierung .....	38
2.13 Quantifizierung von Protein und DNA .....	39
2.13.1 Quantifizierung von Protein .....	39
2.13.2 Quantifizierung von DNA .....	40
2.14 Bestimmung der sauren $\beta$ -Galaktosidase Aktivität .....	40
2.15 Gelelektrophorese .....	40
2.15.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	40
2.15.2 DNA Gelelektrophorese .....	40
2.16 Transfer von Proteinen auf Membranen .....	41
2.17 Immunmarkierung von <i>Western Blots</i> .....	41
2.18 Isolierung von Nukleinsäuren .....	41
2.18.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	41
2.18.2 Isolierung des Virulenzplasmids aus <i>R. equi</i> .....	42
2.19 Molekularbiologische Reaktionen .....	43
2.19.1 Verwendete Vektoren .....	43
2.19.2 Restriktion von DNA .....	43
2.19.3 Ligation .....	43
2.19.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	43
2.19.5 Sequenzierung von DNA .....	45
2.19.6 Modifizierung von DNA-Strängen .....	45
2.20 Immunfluoreszenz .....	46
2.20.1 Infektion .....	46
2.20.2 Fixieren der Proben .....	46
2.20.3 Antikörperfärbung .....	47
2.21 Visualisierung von Lysosomen mit LysoTracker .....	47

2.22 Färbung mit Syto-Green.....	47
2.23 <i>Laser Scanning</i> Mikroskopie.....	48
2.24 Intrazelluläre Vermehrung von Bakterien.....	48
2.25 Bestimmung der Zytotoxizität .....	48
2.26 FRET-Assay.....	49
2.27 Transmissionselektronenmikroskopie.....	50
2.28 Transfektion.....	50
2.29 Transformation.....	51
2.29.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> .....	51
2.29.2 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> .....	51
2.29.3 Herstellung kompetenter <i>R. equi</i> .....	51
2.29.4 Transformation von <i>R. equi</i> .....	52
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>53</b>
3.1 Analyse von <i>Rhodococcus equi</i> -enthaltenden Phagosomen.....	53
3.1.1 Elektronenmikroskopische Darstellung isolierter Phagosomen...54	
3.1.2 Bestimmung der lysosomalen Enzymaktivität in isolierten Phagosomen.....	55
3.1.3 Analyse <i>R. equi</i> -enthaltender Phagosomen mittels Western-Blot...56	
3.2 Intrazelluläre Vermehrung von <i>Rhodococcus equi</i> .....	60
3.2.1 <i>R. equi</i> vermehrt sich in einem nicht-sauren Kompartiment.....	60
3.2.2 Die intrazelluläre Vermehrung von <i>R. equi</i> führt zu einem Verlust saurer Kompartimente.....	62
3.3 Interaktion von <i>R. equi</i> mit aktivierten Makrophagen.....	64
3.3.1 <i>R. equi</i> vermehrt sich nicht in aktivierten Makrophagen.....	64
3.3.2 <i>R. equi</i> 103(+)-enthaltende Phagosomen akquirieren in aktivierten Makrophagen vATPase.....	66
3.3.3 <i>R. equi</i> 103(+)-enthaltende Phagosomen sind auch in aktivierten Makrophagen nicht sauer.....	67
3.4 Charakterisierung rekombinanter <i>R. equi</i> -Stämme.....	67
3.4.1 Konstruktion von Plasmiden mit Bereichen der Pathogenitätsinsel.....	69
3.4.2 Konstruktion des Plasmids pRE7-vapA.....	71
3.4.3 Konstruktion rekombinanter <i>R. equi</i> -Stämme.....	72
3.4.4 Intrazelluläre Vermehrung rekombinanter <i>R. equi</i> -Stämme.....	72
3.4.5 Zytotoxizität rekombinanter <i>R. equi</i> -Stämme.....	73
3.5 Komplementierung rekombinanter <i>R. equi</i> -Stämme mit <i>vapA</i> .....	74
3.5.1 Konstruktion des Plasmids pSMT3-vapA.....	75

3.5.2 Komplementation rekombinanter <i>R. equi</i> -Stämme mit <i>vapA</i> .....	75
3.5.3 Intrazelluläre Vermehrung rekombinanter <i>vapA</i> exprimierender <i>R. equi</i> Rekombinanten.....	75
3.5.4 Rekombinante-Rhodokokken sind avirulent für Mäuse.....	78
3.5.5 Zytotoxizität <i>vapA</i> exprimierender <i>R. equi</i> -Rekombinanten.....	79
3.5.6 Kolokalisation von Rekombinanten mit LysoTracker.....	80
3.5.7 <i>vapA</i> exprimierende Rekombinanten vermehren sich in sauren Kompartimenten.....	81
3.5.8 Fusion von Lysosomen mit <i>R. equi</i> -enthaltenden Phagosomen...	83
3.6 Expression einzelner Gene der Pathogenitätsinsel.....	84
3.6.1 Konstruktion von Plasmiden zur Expression einzelner Gene in <i>R. equi</i> (-).....	84
3.6.2 Konstruktion rekombinanter Rhodokokken zur Expression einzelner Gene.....	85
3.6.3 Einfluss der Gene <i>orf3</i> bis <i>orf8</i> auf Zytotoxizität und intrazelluläre Vermehrung.....	86
3.7 Komplementierung von <i>R. equi</i> $\Delta$ <i>orf8</i> mit <i>vapA</i> .....	86
3.8 Konstruktion einer <i>vapA</i> -Mutante von <i>R. equi</i> 103(+).....	88
3.8.1 Konstruktion des Plasmids pD <i>vapA</i> .....	88
3.8.2 Konstruktion von <i>R. equi</i> D <i>vapA</i> .....	90
3.8.3 Konstruktion des Plasmids p $\Delta$ <i>vapA</i> -DC.....	91
3.8.4 Konstruktion von <i>R. equi</i> $\Delta$ <i>vapA</i> -DC.....	92
3.9 Charakterisierung der <i>vapA</i> -Mutante von <i>R. equi</i> 103(+).....	94
3.9.1 Intrazelluläre Vermehrung der <i>vapA</i> -Mutante.....	94
3.9.2 Kolokalisation mit LysoTracker.....	94
3.9.3 Fusion von Phagosomen mit Lysosomen.....	96
3.9.4 Zytotoxizität der <i>vapA</i> -Mutante.....	96
3.9.5 Akquisition der vATPase.....	97
3.9.5.1 Konstruktion des Vektors p <i>vatE</i> - <i>egfp</i> .....	98
3.9.5.2 Kolokalisation des Fusionsproteins mit endozytischen Markern.....	98
3.9.5.3 Kolokalisation des Fusionsproteins mit <i>R. equi</i> -D <i>vapA</i> ..	99
3.10 Lokalisation des VapA-Proteins während des Wachstums von <i>R. equi</i> in Makrophagen.....	101
<b>4 Diskussion</b> .....	102
4.1 Kompartimentierung von <i>Rhodococcus equi</i> in Makrophagen.....	102
4.2 Interaktion von <i>R. equi</i> mit aktivierten Makrophagen.....	105

4.3 Das Virulenzplasmid von <i>R. equi</i> .....	107
4.4 Einfluss von Genen der Pathogenitätsinsel auf die Virulenz von <i>R. equi</i> .....	112
4.5 Interaktion von <i>R. equi</i> mit Makrophagen.....	116
4.6 Mögliche Funktionen der Vap-Proteine.....	119
4.6.1 Export von Virulenzfaktoren.....	119
4.6.2 Import von Nährstoffen.....	121
4.7 Zusammenfassung.....	121
<b>5 Zusammenfassung</b> .....	<b>124</b>
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>125</b>
<b>Anhang</b> .....	<b>137</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
APS	Ammoniumpersulfat
BHI (engl.)	Brain Heart Infusion
BMMΦ (engl.)	Bone marrow derived macrophages
Cath B	Cathepsin B
DNA (engl.)	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DMEM (engl.)	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EEA1 (engl.)	Early Endosomal Antigen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylene Glycol-bis(β-Aminoethylether)- N,N,N',N'-Tetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS (engl.)	Fetal Calf Serum
GFP	Green Fluorescent Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HP	Homogenisierungspuffer
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'- Ethansulfonsäure
HRP (engl.)	Horseradish Peroxydase (Meerrettich Peroxidase)
IFγ	Interferon γ
kBp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LAMP-1	Lysosomal-Associated Membrane Protein 1
LB (engl.)	Luria Broth
LPS	Lipopolysaccharid
LSM (engl.)	Laser Scanning Microscope
min	Minuten
MOI (engl.)	Multiplicity of Infection
NSF (engl.)	N-Ethylmaleimide-sensitive Fusion Protein

OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS (engl.)	Phosphat Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
PNS (engl.)	Postnuclear Supernatant
rpm (engl.)	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
SDS (engl.)	Sodiumdodecylsulfate
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TfR	Transferrin-Rezeptor
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
Tris	2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-1,3-Propanediol
U	Unit
Vap (engl.)	virulence associated protein
vATPase	vakuoläre ATPase

## 1. Einleitung

Menschen, Tiere und Pflanzen sind einer ständigen Bedrohung durch Invasion von Keimen ausgesetzt. Das Eindringen mancher Mikroorganismen in den sterilen Teil des Körpers kann zu schwerwiegenden Krankheiten führen. Zum Schutz vor solchen Attacken haben sich verschiedene Abwehrsysteme wie das Immunsystem der Säugetiere entwickelt. Das Immunsystem von Säugetieren wird in die adaptive und angeborene Immunität eingeteilt. Die angeborene Immunität stellt eine erste Verteidigungslinie dar und wird vor allem durch professionelle Phagozyten wie beispielsweise Makrophagen, polymorphkernige neutrophile Leukozyten (PMNs) und Dendritische Zellen vermittelt. Eingedrungene Keime werden von Phagozyten aufgenommen und abgebaut (Janeway et al. 2002). Einige krankheitserregende Mikroorganismen verhindern jedoch den intrazellulären Abbau und sind in der Lage sich in Phagozyten zu vermehren. Zu diesen Mikroorganismen zählt auch das Gram-positive Bakterium *Rhodococcus equi*.

### 1.1 Makrophagen

Makrophagen sind ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems von Säugetieren. Sie entwickeln sich aus pluripotenten Stammzellen im Knochenmark. Durch Einwirkung verschiedener Wachstumsfaktoren differenzieren sich Vorläuferzellen zunächst zu Promonozyten, die in die Blutbahn abgegeben werden. Promonozyten entwickeln sich im Blut zu Monozyten. Unter Einfluss von Zytokinen können sich Monozyten in Makrophagen umwandeln und in alle Körpergewebe einwandern. In verschiedenen Geweben können sich Makrophagen zwar morphologisch stark unterscheiden, üben jedoch alle ähnliche Funktionen aus. Makrophagen haben die Aufgabe, Mikroorganismen, andere Fremdkörper oder auch körpereigene apoptotische Zellen aufzunehmen und intrazellulär zu zerstören. Darüber hinaus können diese Zellen immunkompetenten Lymphozyten Antigene präsentieren sowie Zytokine freisetzen, die sowohl die adaptive wie auch die angeborene Immunantwort aktivieren (Janeway et al. 2002, Abbas et al. 2005). Die Aufnahme eines Fremdkörpers durch Phagozyten wird als Phagozytose bezeichnet (Alberts et al. 2002).

## 1.2 Erkennung und Aufnahme eines Partikels durch Makrophagen

Die Phagozytose durch Makrophagen und andere Phagozyten verläuft rezeptorvermittelt. Konservierte Oberflächenmoleküle von Mikroorganismen, die sogenannten *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), werden von Makrophagen mit Hilfe von verschiedenen Rezeptoren (*pattern-recognition receptors*, PRR) erkannt (Janeway et al. 2002). PRRs binden häufig essentielle Komponenten eines Mikroorganismus, wodurch die Anpassungsfähigkeit von Keimen zur Vermeidung der Phagozytose eingeschränkt ist. Einige dieser Rezeptoren werden konstitutiv auf Makrophagen exprimiert und sichern somit eine ständige Einsatzbereitschaft (Akira et al. 2006). Die Bindung von Liganden an PRRs kann sowohl Phagozytose vermitteln als auch zur Produktion von Zytokinen wie Interferonen oder Interleukinen führen. Die wichtigsten Rezeptoren werden im Folgenden vorgestellt:

Der Mannose-Rezeptor bindet Glykokonjugate mit terminalen Mannose-, Fucose- oder N-Acetylglucosaminresten. Typische Liganden sind Polysaccharide, Glycoproteine und Glycolipide (Linehan 2000). Der Mannose-Rezeptor vermittelt nicht nur Phagozytose, sondern auch die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor*, Stein und Gordon 1991), IL-1 $\beta$  oder IL-6 (Interleukin, Yamamoto et al. 1997).

Scavenger-Rezeptoren wie SR-A (Scavenger-Rezeptor-A) oder MARCO (*Macrophage Receptor With Collagenous Domain*) binden Lipopolysaccharid (LPS), Lipoteichonsäure (LTA), modifizierte Formen des *low density lipoprotein* (LDL) und apoptotische Zellen (Taylor et al. 2005). Details der durch Scavenger-Rezeptoren vermittelten Phagozytose sind noch ungeklärt.

Die Familie der TOLL-like Rezeptoren bindet eine Vielzahl von PAMPs wie LPS, LTA, Peptidoglycan, Lipoproteine oder Flagellin, manche Vertreter sogar Nukleinsäuren. Im Gegensatz zu den anderen PRRs vermitteln TLRs keine Phagozytose, sondern sind nur an der Erkennung eines Pathogens beteiligt. Mit Hilfe von Adapter-Proteinen lösen TLRs verschiedene Signalkaskaden aus, die zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen führen (Latz et al. 2004).

Fc-Rezeptoren binden Immunglobulin G (IgG) opsonisierte Partikel. In Phagozyten werden drei Hauptklassen dieser Rezeptorfamilie exprimiert: Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII und Fc $\gamma$ RIII (Ravetch und Bolland 2001). Fc-Rezeptoren vermitteln die Phagozytose eines Partikels

und gleichzeitig die Aktivierung des oxidativen Bursts und der Arachidonsäure-Kaskade (Janeway et al. 2002).

Die Komplementrezeptoren (CR1, CR3 und CR4) gehören zur Familie der Integrine und binden Partikel, die mit Komplementproteinen opsonisiert sind. Die Phagozytose durch Komplementrezeptoren wird allerdings nur mit zusätzlichen aktivierenden Signalen vermittelt (Janeway et al. 2002).

Mit Hilfe der verschiedenen PRRs können Makrophagen mehrere Strukturen an Mikroorganismen gleichzeitig erkennen. Es ist deshalb anzunehmen, dass unterschiedliche Rezeptoren kooperieren können, um so eine effektive Abwehr zu vermitteln. Die Aufnahme eines Partikels erfolgt nach Bindung an entsprechende Rezeptoren auf der Makrophagen-Plasmamembran. Von diesen Rezeptoren ausgehend wird eine Signalkaskade initiiert, die unter anderem zu einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts führt. Das Partikel wird von einem Teil der Plasmamembran umschlossen, der sich nach innen stülpt und abgeschnürt wird. Auf diese Weise entsteht ein neues Organell, das als Phagosom bezeichnet wird (Haas 2007). Nach seiner Entstehung durchläuft das Phagosom einen Reifungsprozess, der mit der Bildung eines Phagolysosoms endet. Im Verlauf der Phagolysosomen-Biogenese erhält dieses Organell eine Reihe antimikrobieller Substanzen wie reaktive Sauerstoffmetabolite, saure Hydrolasen, Defensine und einen niedrigen pH. In dieser Umgebung wird ein aufgenommener Mikroorganismus getötet und abgebaut. Durch hydrolytischen Verdau eines Mikroorganismus werden Antigene gebildet, die von Makrophagen an der Zelloberfläche präsentiert und für eine adaptive Immunantwort benötigt werden (Janeway et al. 2002).

### 1.3 Phagosomenreifung

Phagosomen sind dynamische Organellen, die ständig modifiziert werden. Dabei verändert sich sowohl die Membran als auch der Inhalt des Phagosoms in seiner Protein- und Lipid-Zusammensetzung. Dieser Prozess wird als Phagosomenreifung bezeichnet. Im Verlauf dieser Reifung fusionieren Phagosomen zunächst mit frühen, dann späten Endosomen und schließlich mit Lysosomen. Dabei werden sie entlang von Mikrotubuli- oder Aktin-Filamenten in das Zellinnere transportiert (Desjardins et al. 1994, Pitt et al. 1992, Al-Haddad et al. 2001). Die Modifikationen in Protein- und Lipidzusammensetzung entstehen hauptsächlich durch Fusion der Phagosomen mit Endosomen aber auch durch

Rekrutierung und Abgabe zytosolischer Proteine und Fusion mit Vesikeln des *trans*-Golgi-Apparates. Die Fusion von Endosomen- und Phagosomenmembranen führt nicht immer zu einer vollständigen Verschmelzung beider Organellen. In einem Vorgang, der *kiss and run fusion* genannt wird, findet nur eine lokale Verschmelzung zweier Kompartimente statt. Nach einem partiellen Austausch luminaler Inhalte trennen sich die Organellen wieder (Desjardins 1995). Die Fusion von Phagosomen und Endosomen ist ein selektiver und streng regulierter Vorgang. Die Familie der Rab-Proteine (*Ras-related protein from rat brain*) spielt bei der Regulierung von Fusionsereignissen eine wichtige Rolle. Rab-Proteine sind kleine GTPasen, die in einem aktiven (GTP gebunden) oder inaktiven Zustand (GDP gebunden) vorliegen können. Im aktivierten Zustand (GTP gebunden) sind sie über zwei Prenylgruppen mit der zytosolischen Seite von Endosomen- und Phagosomenmembranen verankert. In ihrem aktiven Zustand rekrutieren diese Proteine Effektoren, die zur Erkennung und Fusion des Zielorganells benötigt werden (Zerial und McBride 2001).

Kurz nach ihrer Bildung interagieren Phagosomen mit frühen *sorting* Endosomen. Die Fusion zwischen Phagosomen und frühen Endosomen wird von Rab5 kontrolliert, welches sich zum Teil schon auf dem naszierenden Phagosom befindet (Desjardins 1994). Rab5 interagiert dabei mit einer Reihe von Effektoren, die zur Erkennung und Fusion dieser Kompartimente nötig sind. Das Effektorprotein Rabaptin5 bindet Rabex5, das Rab5 durch den Austausch von GDP zu GTP aktiviert. In diesem aktivierten Zustand rekrutiert Rab5 weitere Rabaptin5-Rabex5-Komplexe, was zu einer lokalen Anhäufung von Rab5 (Rab-Domäne) führt. Zusätzlich wird die Phosphoinositol-3-OH Kinase hVPS34 rekrutiert. Dieses Enzym katalysiert die Phosphorylierung von Phosphoinositol zu Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PtdIns(3)P). Die gleichzeitige Präsenz von aktivem Rab5 und PtdIns(3)P führt zur Rekrutierung von Rabenosyn-5 und dem *Early Endosome Antigen-1* (EEA-1). Diese beiden Effektoren binden über ihre FYVE-Domäne an PtdIns(3)P und stellen den Kontakt zu Rab5-Proteinen auf der Zielmembran (*tethering*) her (Zerial und McBride 2001). Die räumliche Nähe der beiden Membranen ermöglicht in Rab-Domänen angereicherten cis-SNARE (soluble NSF attachment receptor) Komplexen stabile trans-SNARE Komplexe zu bilden, die letztlich die Fusion der Kompartimente vermitteln. Nach vollendeter Fusion werden trans-SNARE-Komplexe unter Verbrauch von ATP durch die Proteine NSF und  $\alpha$ SNAP wieder entwunden und stehen danach einem weiteren Fusionszyklus zur Verfügung.

Durch den leicht erniedrigten pH von 6.0–6.5 werden in *sorting* Endosomen die Bindungen von Rezeptoren und Liganden gelöst. In diesem Stadium werden für das *Recycling* bestimmte Rezeptoren wie der Transferrin-Rezeptor (TfR) über das endosomale Recycling Kompartiment zur Plasmamembran zurücktransportiert. Dieser

Vorgang wird hauptsächlich durch die kleinen GTPasen Rab4 und Rab11 kontrolliert (Maxfield und McGraw 2004).

Ein phagozytiertes Partikel verbringt in der Regel nur wenige Minuten in einem sorting-Endosomen-ähnlichen Kompartiment. Frühe Phagosomen verlieren nach dieser Zeit kontinuierlich Rab5 und akquirieren das Protein Rab7, das die Interaktion des Phagosoms mit spät endozytischen Vesikeln vermittelt (Bucci et al. 2000). Der Austausch von Rab5 und Rab7 findet dabei direkt auf dem Organell statt. Es wird deshalb vermutet, dass Rab-Domänen einem ständigen Auf- und Abbau unterworfen sind. Diese Rab-Protein Konversion ist möglicherweise direkt für die Reifung eines frühen zu einem späten Endosom verantwortlich (Rink et al. 2005).

In der frühen Phase eines späten Phagosoms akquiriert dieses Kompartiment Hrs (*Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*), das eine wesentliche Rolle in der Bildung von *Multivesicular Bodies* besitzt (Viera et al. 2004, Raiborg und Stenmark 2002). Hrs bindet über seine FYVE-Domäne PtdIns(3)P in der Phagosomenmembran und reguliert dort möglicherweise die Internalisierung von Rezeptoren, die für den Abbau bestimmt sind. Durch eine Monoubiquitinierung von Rezeptoren wie EGF-R oder FcγR werden diese von Hrs erkannt und in einem ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) abhängigen Prozess internalisiert. Auf diese Weise entstehen interne Vesikel, in denen auch das für späte Endosomen typische LBPA (Lysobisphosphatidylsäure) angereichert wird (Kobayashi et al. 1998, Brumell und Grinstein 2003).

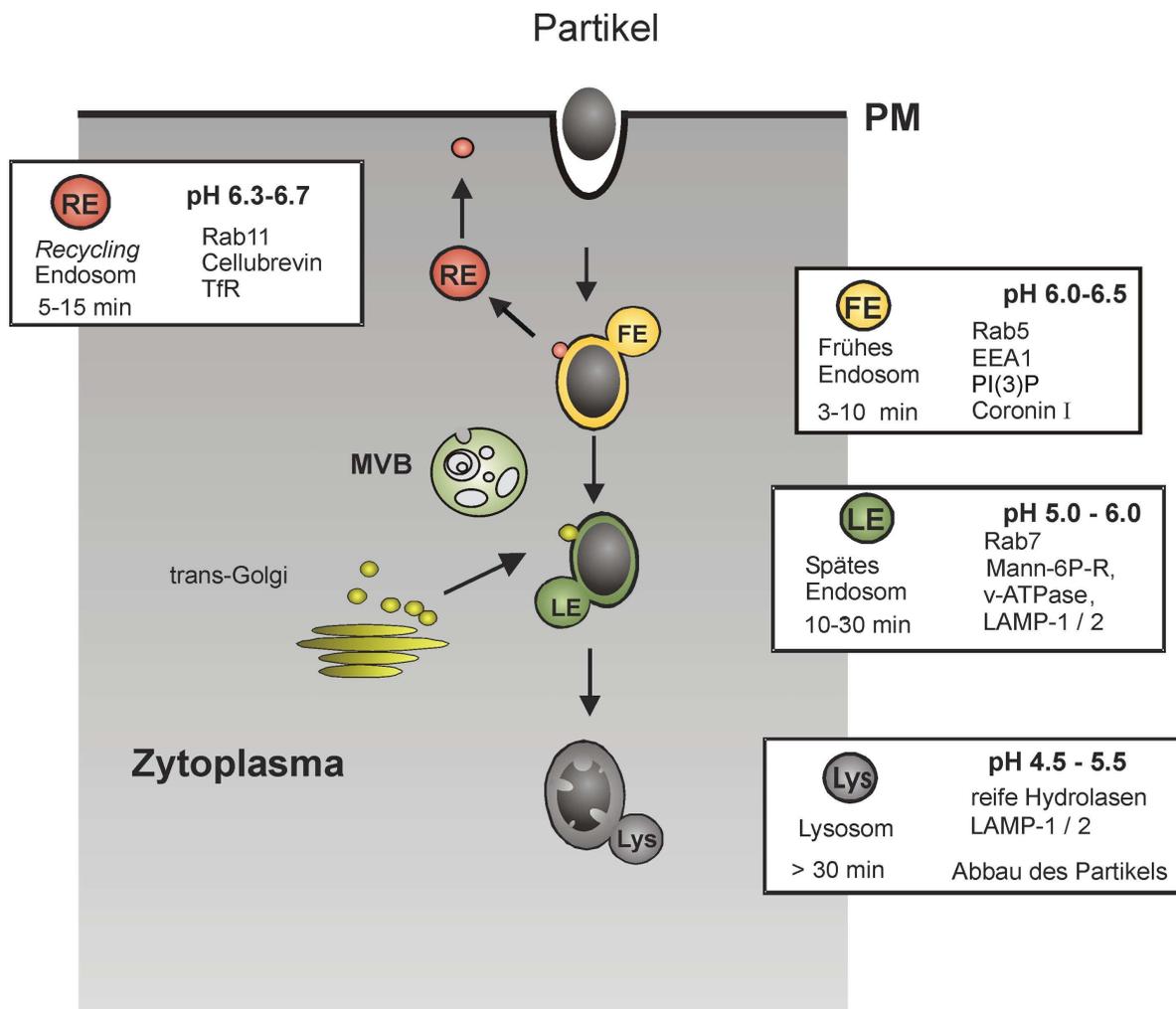
Durch den Verlust von Rab5 und dessen Interaktionspartner fusionieren späte Phagosomen nicht mit frühen Endosomen. Das für die Fusion von frühen Endosomen ebenfalls wichtige PtdIns(3)P wird im Verlauf der Reifung später Endosomen durch die Kinase PIK-FYVE zu Phosphatidyl-inositol-3-5-bisphosphat umgesetzt. Obwohl die genaue Funktion dieser Reaktion noch nicht geklärt ist, wird eine wichtige Rolle in der Phagosomen- und Endosomenreifung sowie in der Bildung von MVBs vermutet (Michell et al. 2006, Lindmo und Stenmark 2006).

Späte Phagosomen werden an Mikrotubuli entlang in das Zellinnere transportiert. Dies wird durch den Rab7-Effektor RILP (*Rab7-interacting lysosomal protein*) ermöglicht, der den Mikrotubuli-assoziierten Motorproteinkomplex Dynein-Dynactin bindet.

Späte Phagosomen interagieren zusätzlich mit biosynthetischen Vesikeln aus dem trans-Golgi-Netzwerk. Sie erhalten dadurch Proteine wie LAMP1, Cathepsine, Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (M6PR) und den vATPase-Komplex (Karlsson und Carlsson 1998, Schaible et al. 1999, Garin et al. 2001). Die vATPase transportiert unter Verbrauch von ATP Protonen aus dem Zytosol in das Lumen des Phagosoms. Der pH-Wert im Phagosom sinkt dadurch auf etwa 5.0–6.0 (Grabe und Oster 2001). Ein weiteres wichtiges Enzym auf späten Phagosomen ist der NADPH-Oxidase Komplex, der die Reduktion von Sauerstoff durch NADPH katalysiert. Die Endprodukte dieser Reaktion sind Superoxidradikale, die maßgeblich zur Tötung eines phagozytierten Mikroorganismus beitragen.

Späte Phagosomen interagieren schließlich mit Lysosomen, wodurch Phagolysosomen gebildet werden. In diesem Stadium verlieren Phagosomen sowohl M6PR als auch Rab7 und können nicht mehr mit späten Endosomen fusionieren (Storrie und Desjardins 1996). Phagolysosomen (pH 4.0–5.0) enthalten über 40 verschiedene hydrolytische Enzyme wie DNAsen, Proteasen und Lipasen (Geisow et al. 1981, Alberts et al. 2002). In dieser Umgebung werden mikrobielle Bestandteile abgebaut. Aus diesem Abbau entstandene Peptide werden von Makrophagen durch MHC-Komplexe auf der Plasmamembran präsentiert. Die Bindung von Antigenen an MHC-II Moleküle findet möglicherweise direkt im Phagosom statt (Lang et al. 1994). Antigene können aber auch aus Phagolysosomen zu MHC-II Kompartimenten transportiert und dort an diese gebunden werden (Tjelle et al. 1998). Mit Antigen beladene MHC-II Moleküle werden dann zur Plasmamembran transportiert und CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert. Als Folge der Interaktion zwischen Makrophagen und T-Zellen wird eine adaptive Immunantwort eingeleitet. Auf einem alternativen Weg können Antigene auch an MHC-I Moleküle gebunden werden und anschließend CD8<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert werden (Jutras und Desjardins 2005).

Abbildung 1 zeigt die Phagosomenreifung schematisch.



**Abb. 1: Schematische Darstellung der Phagosomenreifung.**

Dargestellt sind die Fusionsereignisse eines Phagosoms mit endozytischen Kompartimenten. Die jeweiligen Charakteristika der verschiedenen Reifungsstadien sind angegeben. PM: Plasmamembran; RE: Recycling Endosom; FE: frühes Endosom; Lys: Lyososom; MVB: Multivesikular Body; Mann-6P-R: Mannose-6-Phosphat-Rezeptor; TfR: Transferrin-Rezeptor. Verändert nach Haas (2007).

## 1.4 Überlebensstrategien intrazellulärer Pathogene

Intrazelluläre Pathogene haben verschiedene Strategien evolviert, die es dem Erreger erlauben der Zerstörung durch Makrophagen zu entgehen. Diese Gruppe von Krankheitserregern hat sich an Lebensbedingungen in einem Phagozyt angepasst und dabei unterschiedliche Nischen erobert. Der Aufnahmeweg eines Pathogens ist für dessen Überleben ebenso wichtig wie der Aktivierungsstatus der Wirtszelle. Der Gebrauch von Phagozyten als Wirtszellen für Mikroorganismen bietet zudem einen Schutz vor der Aktivierung der adaptiven Immunantwort. Die Überlebenstrategien solcher Mikroorganismen lassen sich in vier Kategorien aufteilen:

- Lyse der Phagosomenmembran und Ausbruch in das Zytosol
- Blockierung der Phagosomenreifung
- Etablierung eines nicht-endozytischen Kompartimentes
- Anpassung an lysosomale Bedingungen

Im Folgenden werden diese Strategien im Detail anhand einiger Beispiele erläutert.

#### 1.4.1 Lyse der Phagosomenmembran und Ausbruch in das Zytosol

Um einem Abbau im Lysosom einer Wirtszelle zu entgehen sind manche intrazelluläre Bakterien in der Lage, die Phagosomenmembran zu lysieren und aus dem Phagosom in das Zytosol auszubrechen. Diese Strategie wird vor allem von *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* und *Rickettsia conorii* verfolgt (Smith et al. 1995, High et al. 1992, Gouin et al. 1999). Im Zytosol nutzen die Bakterien die dort vorhandenen Nährstoffe zur Vermehrung. Mit Hilfe einer Rekrutierung von Aktin an einem Pol der Bakterien können sich die genannten Mikroorganismen innerhalb einer Zelle fortbewegen und sogar in Nachbarzellen eindringen (Dramsı und Cossart 1998).

#### 1.4.2 Blockierung der Phagosomenreifung

Eine andere Strategie einiger Mikroorganismen, ihrem phagolysosomalen Abbau zu entgehen, ist die Blockierung der normalen Phagosomenreifung. Bei einem solchen Prozess etablieren sich Phagosomen, die endozytischen Charakter aufweisen, aber nicht mit Lysosomen fusionieren. Die Fusion solcher Kompartimente mit Endosomen sorgt für den Nachschub an Nährstoffen, sodass die Bakterien in den Phagosomen überleben und sich vermehren können. *Mycobacterium tuberculosis*, *Ehrlichia chaffensis* und *Salmonella enterica* serovar Typhimurium sind typische Vertreter, die zur Blockierung der Phagosomenreifung fähig sind.

Der Tuberkulose-Erreger *Mycobacterium tuberculosis* arretiert kurz nach Aufnahme in Makrophagen die Reifung des Phagosoms (Russell 2001). Das resultierende Kompartiment hat einen pH von 6,2-6,3, der durch einen Ausschluss des vATPase-Komplexes aufrecht erhalten wird (Sturgill-Koszycki et al. 1994). Trotz veränderter Phagosomenreifung haben Mycobakterien-enthaltende Phagosomen Kontakt mit der extrazellulären Umgebung. Diese Phagosomen sind zugänglich für den Transferrin, MHC-I und MHC-II (Russell et al. 1996, Clemens und Horwitz 1995). Darüber hinaus

assoziiieren diese Kompartimente mit den recycling-endosomalen Proteinen Rab11 und Transferrin-Rezeptor, was eine Interaktion mit Recycling-Endosomen vermuten lässt (Fratti et al. 2000). Der früh-endosomale Charakter dieser Phagosomen wird durch die dauerhafte Assoziation von Rab5 und die fehlende Akquisition von Rab7 untermauert (Via et al. 1997). Trotz des früh-endosomalen Charakters dieser Phagosomen erhalten sie die spät-endosomalen Proteine LAMP1 und Cathepsin D. Das Cathepsin liegt dabei in seiner unreifen Form vor. Es wird deshalb angenommen, dass Mycobakterien-enthaltende Phagosomen diese Proteine durch Interaktion mit biosynthetischen Vesikeln des trans-Golgi erhalten (Sturgill-Koszycki et al. 1994, Ullrich et al. 1999).

Der Mechanismus, der zu dieser veränderten Phagosomenreifung führt, ist bislang unklar. Zunächst wurde vermutet, dass eine Retention des Proteins TACO (Tryptophan-Aspartate containing coat protein, auch Coronin 1) auf Mycobakterien-enthaltenden Phagosomen für die Blockierung der Phagosomenreifung verantwortlich ist (Ferrari et al. 1999). TACO ist ein Aktin bindendes Protein, das auf naszierenden und sehr frühen Phagosomen zu finden ist (Maniak et al. 1995). Eine andere Studie konnte die Rolle von TACO bei der Reifung von Mycobakterien-enthaltenden Phagosomen nicht bestätigen (Schüller et al. 2001). In einem weiteren Modell blockieren Mycobakterien die Phagosomenreifung durch den Abbau des früh-endosomalen SNARE-Proteins Cellubrevin mit Hilfe von sekretierten Metalloproteasen (Fratti et al. 2002). Da die Phagosomen aber mit frühen Endosomen fusionieren, erscheint diese Hypothese nicht wahrscheinlich.

Das Lipid PtdIns(3)P steht im Vordergrund des jüngsten Modells. Diesem Modell zufolge sollen Glykolipide von *M. tuberculosis* die Konzentration von PtdIns(3)P in der Phagosomenmembran erniedrigen (Deretic et al. 2006). Bei der Phagolysosomenbiogenese scheinen das  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Protein Calmodulin und dessen Effektor Calmodulin-Kinase II eine wichtige Rolle zu spielen. Es wurde gezeigt, dass *M. tuberculosis* die Aktivierung von Calmodulin und Calmodulin-Kinase II stört (Malik et al. 2000, 2001). Dabei inhibiert das Zellwand-Glykolipid Lipoarabinomannan (ManLAM) den Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Vergne et al. 2003). Weiterhin wurde eine Abhängigkeit der hVPS34-Rekrutierung auf frühen Endosomen von  $\text{Ca}^{2+}$  und Calmodulin beobachtet (Vergne et al. 2004). Dies führte zu der Vermutung, dass ManLAM für eine Blockierung der PtdIns(3)P-Bildung verantwortlich ist und somit PtdIns(3)P-bindende Faktoren wie EEA-1 und Hrs von Mycobakterien-enthaltenden Phagosomen ausgeschlossen werden. Die sekretierte bakterielle Phosphatase SapM sorgt in diesem Prozess für die Aufrechterhaltung eines niedrigen PtdIns(3)P-Spiegels in der Phagosomenmembran (Vergne et al. 2005). Diese Phosphatase setzt PtdIns(3)P wieder

zu Phosphatidylinositol um und hemmt die Fusion von Phagosomen mit späten Endosomen und Lysosomen (Vergne et al 2005). Die Interaktion der Phagosomen mit frühen Endosomen wird in diesem Modell wiederum von einem anderen Glykolipid, Phosphatidylinositol-Mannosid (PIM), vermittelt (Vergne et al 2004). Interessant ist auch die Beobachtung, dass ein weiteres Glykolipid der mycobakteriellen Zellwand, Trehalose-Dimycolat (TDM, auch *cord factor*), die Ansäuerung von Phagosomen inhibiert (De Chastellier et al. 1995, Indrigo et al. 2003). Obwohl die Mechanismen, die hier zugrunde liegen, noch unbekannt sind, scheinen Zellwandglykolipide der Bakterien bei der Blockierung der Phagosomenreifung eine wichtige Rolle zu spielen.

Das Enterobakterium *Salmonella enterica* serovar Typhimurium verursacht bei Menschen Gastroenteritis nach Verzehr von kontaminierten Speisen. Die Bakterien können sich intrazellulär in Makrophagen und Epithelzellen vermehren. Die Phagosomenreifung wird dabei zwar in beiden Zelltypen blockiert, führt aber zu leicht unterschiedlichen Ergebnissen (Holden 2002). In Epithelzellen zeigen *Salmonella*-enthaltende Phagosomen eine transiente Akquisition früh endosomaler Proteine wie EEA-1 und TfR (Steele-Mortimer et al. 1999). Die Phagosomen erhalten die spät-endosomalen Marker LAMP1, LAMP2, Rab7, und vATPase. Trotz des spät-endosomalen Charakters der Phagosomen reichern sie weder lysosomale Hydrolasen noch Mannose-6-Phosphat Rezeptor an (Mèresse et al. 1999, Steele-Mortimer et al. 1999). Es wird deshalb vermutet, dass *Salmonella*-enthaltende Phagosomen nicht mit Lysosomen und Vesikeln des TGN interagieren (Holden 2002).

In Makrophagen verläuft die Reifung von *Salmonella*-enthaltende Phagosomen ähnlich. In ihrem frühen Stadium erhalten die Phagosomen den früh-endosomalen Marker Rab5, der bis zu dreißig Minuten auf diesem Kompartiment bleibt (Hashim et al. 2000). In einem zellfreien System konnten gereinigte Phagosomen, die Salmonellen enthalten, NSF und Rab5 rekrutieren und mit frühen Endosomen fusionieren (Mukherjee et al. 2000). Zu späteren Zeitpunkten akquirieren die Phagosomen zwar LAMP1, aber kein Cathepsin D oder M6P-R und fusionieren nicht mit Lysosomen (Buchmeier und Heffron 1991, Rathmann et al. 1997). Darüber hinaus zeigen *Salmonella*-enthaltende Phagosomen kaum Interaktion mit dem endozytischen System (Ishibashi und Arai 1990, Buchmeier und Heffron 1991, Rathmann et al. 1997, Hashim 2000 et al.). Eine kürzlich veröffentlichte Studie konnte allerdings eine stetige Interaktion der Phagosomen mit dem endozytischen System in Epithelzellen nachweisen (Drecktrah et al. 2007).

### 1.4.3 Etablierung eines nicht-endozytischen Kompartiments

Statt die Phagosomenreifung zu blockieren, gelangen manche Mikroorganismen in ein Kompartiment, das keinen endozytischen Charakter besitzt. Solche Kompartimente fusionieren nicht mit Vesikeln des endozytischen Systems, können aber meist mit anderen Wirtszellorganellen interagieren (Hackstadt 2000, Haas 2007). Diese Strategie wird beispielsweise von *Chlamydia trachomatis*, *Afpia felis* und *Legionella pneumophila* angewendet.

Chlamydien sind obligat intrazelluläre Bakterien, die Erkrankungen der Schleimhäute im Augen-, Atemwegs- und Genitalbereich verursachen. Nach ihrer Aufnahme durch Makrophagen etablieren Chlamydien sogenannte Einschlüsse (*inclusions*) (Schramm et al. 1996). Diese Einschlüsse sind nicht Teil des endozytischen Systems (Heinzen et al. 1996). Stattdessen fusionieren sie untereinander und interagieren mit exozytischen Vesikeln des TGN (Hackstadt et al. 1996, Fields und Hackstadt 2002).

Der Erreger der Legionärskrankheit, *Legionella pneumophila*, etabliert sowohl in Amöben als auch in Phagozyten eine replikative Vakuole (Swanson und Hammer 2000). *Legionella*-enthaltende Phagosomen interagieren weder mit Endosomen noch Lysosomen und werden nicht sauer (Horwitz 1983a, Horwitz und Maxfield 1984, Clemens und Horwitz 1995, Roy et al. 1998, Clemens 2000). Kurz nach ihrer Aufnahme assoziieren die Phagosomen dicht mit Vesikeln des Endoplasmatischen Retikulum (ER) und mit Mitochondrien (Horwitz 1983b, Swanson und Isberg 1995). Nach einigen Stunden nimmt die Assoziation der Phagosomen mit Vesikeln ab. Stattdessen akkumulieren Ribosomen auf der Vakuolenmembran, sodass ein ER-ähnliches Kompartiment gebildet wird (Horwitz 1983a, Swanson und Isberg 1995). In neueren Studien konnte allerdings gezeigt werden, dass die replikativen Vakuolen von Legionellen zu späten Zeitpunkten lysosomale Charakteristika aufweisen (Sturgill-Koszycki und Swanson 2000).

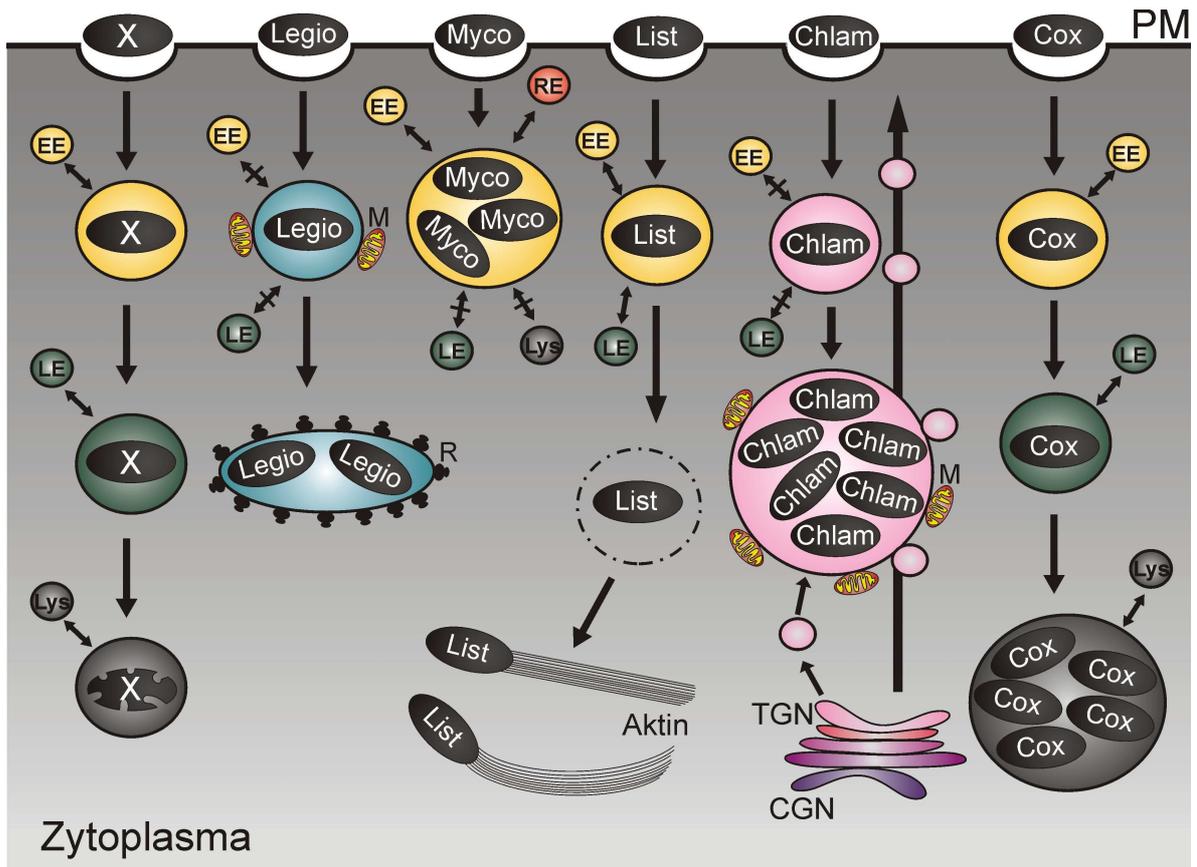
Für die Umwandlung des Phagosoms in ein ER-ähnliches Kompartiment verwendet *Legionella* ein Typ IV Sekretionssystem, das von *dot/icm*-Genen (*defective for organelle trafficking/intracellular multiplication*) codiert wird. Der Dot/Icm Sekretionsapparat sorgt für eine Translokation bakterieller Effektorproteine in das Zytoplasma der Wirtszelle (Nagai und Roy 2001). Durch Interaktionen mit Wirtszellproteinen stimulieren die bakteriellen Effektorproteine die Umwandlung des Phagosoms in eine ER-ähnliches Kompartiment (Roy und Tilney 2002).

#### 1.4.4 Anpassung an lysosomale Bedingungen

Eine kleine Anzahl von Mikroorganismen ist in der Lage, unter lysosomalen Bedingungen zu überleben und sich zu vermehren. Zu diesen Mikroorganismen zählen *Coxiella burnetii* und *Leishmania mexicana*.

Das obligat intrazelluläre Gram-negative Bakterium *Coxiella burnetii* verursacht Q-Fieber bei Menschen, das durch Tiere übertragen wird. Phagosomen, die Coxiellen enthalten, zeigen eine verzögerte Reifung zum Phagolysosom (Howe und Mallavia 2000, Tjelle et al. 2000). Letztlich akquirieren die Phagosomen vATPase, LAMP1, LAMP2, Cathepsin D und saure Phosphatasen (Heinzen et al. 1996, Mege et al. 1997). Der pH-Wert im Phagosom wird auf etwa 5,2 erniedrigt, wodurch der Metabolismus der Bakterien aktiviert wird (Hackstadt und Williams 1981). Um in dem sonst lebensfeindlichen Milieu des Lysosoms zu überleben produziert *Coxiella* Enzyme, die eine Produktion von toxischen Sauerstoffmetaboliten inhibieren (Baca et al. 1994).

Eine Zusammenfassung der unterschiedlichen Überlebensstrategien intrazellulärer Pathogene ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.



**Abb. 2: Überlebensstrategien intrazellulärer Pathogene**

Dargestellt sind die in Kapitel 1.4 beschriebenen intrazellulären Überlebensstrategien einiger Mikroorganismen. Die Kompartimentierung der jeweiligen Bakterien ist anhand der Interaktionen mit Wirtszell-Organellen gezeigt. EE: Frühes *Sorting* Endosom; LE: Spätes Endosom; Lys: Lysosom; PM: Plasmamembran; M: Mitochondrien; R: Ribosomen; Legio: *Legionella pneumophila*; Myco: *Mycobacterium tuberculosis*; List: *Listeria monocytogenes*; Chlam: *Chlamydia trachomatis*; Cox: *Coxiella burnetii*. Verändert nach Haas (2007).

## 1.5 Aktivierung von Makrophagen

Die Fähigkeit in einem Makrophagen zu überleben und sich zu vermehren schützt einige Mikroorganismen vor dem angeborenen und adaptiven Immunsystem. So sind intrazelluläre Pathogene beispielsweise für eine Opsonisierung durch Antikörper nicht zugänglich. Makrophagen können allerdings in einen aktivierten Zustand versetzt werden, der es ihnen erlaubt, auch intrazelluläre Pathogene zu töten (Janeway et al. 2002). Die Aktivierung von Makrophagen wird hauptsächlich durch inflammatorische CD4-T Zellen (auch  $T_H1$ -Zellen genannt) gesteuert.  $T_H1$ -Zellen erkennen infizierte Makrophagen spezifisch anhand von Antigen-präsentierenden MHC-II Komplexen und des Oberflächenmarkers CD40. Der Kontakt zwischen den Zellen veranlasst  $T_H1$ -Zellen zur Produktion des Cytokins Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), das wiederum mit dem IFN- $\gamma$ -Rezeptor von

Makrophagen erkannt wird. Die Stimulation durch IFN- $\gamma$  wird durch zusätzliche Signale wie die Bindung von LPS durch Makrophagen verstärkt (Janeway 2002). Die Makrophagen-Zelle durchläuft daraufhin einige Veränderungen, die es der Zelle erlauben eine Reihe von intrazellulären Pathogenen wie *Mycobacterium*, *Leishmania* oder *Listeria* zu töten. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass *Mycobacterium*-enthaltende Phagosomen in aktivierten Makrophagen ansäuern und nicht mehr mit Recycling-Endosomen interagieren (Schaible et al. 1998).

Die verstärkte mikrobizide Aktivität der Makrophagen beruht vermutlich zum Großteil auf der Bildung der induzierbaren Stickoxid-Synthase (iNOS) und der damit verbundenen Produktion großer Mengen an Super- und Stickoxiden (Janeway et al. 2002, Kolios et al. 2004). Die Aktivierung von Makrophagen wirkt sich aber auch auf die Reifung von Phagosomen aus. Bei einer Stimulation durch IFN- $\gamma$  wird die kleine GTPase Lrg47 produziert. Mäuse, denen das Gen für Lrg47 fehlt, zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber einer Vielzahl von intrazellulären Pathogenen (Taylor et al. 2004). Interessanterweise scheint die Phagosomenreifung in aktivierten Makrophagen aber deutlich verlangsamt zu sein (Tsang et al. 2000, Yates et al. 2007). Die genauen Mechanismen, die in aktivierten Makrophagen zur effizienteren Zerstörung von Pathogenen führen, sind allerdings noch unbekannt.

## 1.6 *Rhodococcus equi*

### 1.6.1 Die Gattung *Rhodococcus*

Die Gattung *Rhodococcus* zählt zu den nocardioformen Actinomyceten, die auch die Gattungen *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Caeseobacter* und *Nocardia* beinhalten (Goodfellow 1987). Rhodokokken sind Gram-positive, unbewegliche, Katalase-positive aerobe Bakterien. Je nach Wachstumsphase besitzen die Bakterien eine kokkoide oder stäbchenförmige Gestalt (Prescott 1991). Der Gattungsname *Rhodococcus* wurde erstmals von Zopf 1891 beschrieben und 1977 neu definiert (Goodfellow und Alderson 1977). Vertreter dieser Gattung sind sehr weit verbreitet und wurden aus Böden, Gesteinen, Grundwasser, marinen Sedimenten, Tierausscheidungen, Insekendärmen, gesunden sowie kranken Menschen, Tieren und Pflanzen isoliert (Goodfellow et al. 1990, Ivshina et al. 1994). Ihre Fähigkeit, aliphatische Kohlenwasserstoffe und Schadstoffe wie Pentachlorphenol (PCP) abzubauen, verleiht einigen Rhodokokken eine besondere Bedeutung für Industrie und Umwelt. Darüber hinaus produzieren Rhodokokken Flockungsmittel, Amide und Polymere, die ebenfalls von biotechnologischem Interesse

sind (Bell et al. 1998). Unter den Rhodokokken befinden sich auch einige Krankheitserreger von Tieren (*R. equi*), Pflanzen (*R. fascians*) und Menschen (*R. equi*, *R. rhodochrous*, *R. erythropolis*, *R. sp*) (Finnerty 1992, McNeil und Brown 1994, Bell et al. 1998). Die Gattung *Rhodococcus* umfasst 12 Spezies: *R. coprophilus*, *R. equi*, *R. fascians*, *R. erythropolis*, *R. globerulus*, *R. marinonascens*, *R. opacus*, *R. percolatus*, *R. rhodnii*, *R. rhodochrous*, *R. ruber* und *R. zopfii*.

### 1.6.2 *Rhodococcus equi*

*Rhodococcus equi* wurde erstmals von Magnussen (1923) aus der pyogranulomatösen Lunge eines Fohlen isoliert und als *Corynebacterium equi* bezeichnet. Das Bakterium wurde nach seiner Reklassifizierung in *Rhodococcus equi* umbenannt (Skerman et al. 1980; Cornish und Washington 1999). *R. equi* ist ein Gram-positives, obligat aerobes, Katalase-positives, Oxidase-negatives und Urease-positives Bakterium (Prescott 1991). Die Bakterien können bei Temperaturen zwischen 10°C und 40°C auf verschiedenen Medien wie BHI, Schokoladen- oder Blut-Agar wachsen (Prescott 1991). Die optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 30°C und 37°C (Hughes und Sulaiman 1987). *R. equi* produziert eine antigenisch variable, lamellare Polysaccharid-Kapsel (Wollcock und Mutimer 1978). Durch die Anreicherung von Glykolipiden wie ManLAM und TDM ist die Zellwand von *R. equi* stark hydrophob (Sutcliffe 1998, Meijer und Prescott 2004). Kolonien dieser Bakterien sind nach 48 Stunden und 37°C etwa 2-4 mm groß, unregelmäßig rund, rosa, glatt, schleimig, semitransparent und glänzend (Prescott 1991). *R. equi* ist ein weltweit verbreiteter Umweltkeim, der aus Boden, Wasser und Tierausscheidungen isoliert werden kann (Ellenberger und Genetsky). Im Boden und im Dung von Herbivoren wird dieses Bakterium am häufigsten gefunden, insbesondere bei sommerlichen Temperaturen gemäßigter Klimazonen (Prescott 1987). *R. equi* besitzt innerhalb der Gattung *Rhodococcus* das größte pathogene Potential für Tiere und Menschen (Prescott 1991).

### 1.6.3 *Rhodococcus equi* als Krankheitserreger

*Rhodococcus equi* ist ein bedeutender Krankheitserreger für 1-5 Monate alte Fohlen (Prescott 1987). Eine Infektion verursacht eine subakut bis chronisch verlaufende pyogranulomatöse Bronchopneumonie. In manchen Fällen tritt zusätzlich eine Ulzerative Colitis, Lymphadenitis, Osteomyelitis und Abszesse in verschiedenen Bereichen des

Körpers auf (Meijer und Prescott 2004). Neben Fohlen wurden auch vereinzelt Infektionen bei Schweinen, Rindern und jungen Ziegen festgestellt, meist in Form von submandibularer Lymphadenitis und granulomatösen Läsionen der Leber (Meijer und Prescott 2004). Gesunde Menschen sind nur selten von Infektionen durch *R. equi* betroffen. Immunsupprimierte Personen haben hingegen ein erhöhtes Risiko, an einer *R. equi*-Infektion zu erkranken (Bell et al. 1998). Am häufigsten wurde der Erreger in AIDS-Patienten nachgewiesen. Die Sterblichkeitsrate von infizierten AIDS-Patienten liegt bei etwa 50%, bei immunkompetenten Menschen bei etwa 11% (Votava et al. 1997, Bell et al. 1998). Humane *R. equi*-Infektionen äußern sich meist in Form einer Pneumonie mit Fieber, Husten und Brustschmerzen (Harvey und Sunstrum et al. 1991). Die Infektion kann sich ausbreiten und Läsionen in anderen Organen sowie Bakteriämie verursachen (Prescott 1991, McNeil und Brown 1994). Eine direkte Übertragung von Tieren auf Menschen wurde bislang nicht beobachtet. Man geht davon aus, dass Aerosole und kontaminierter Staub die Quelle von Infektionen mit *R. equi* sind.

#### 1.6.4 Interaktion von *Rhodococcus equi* mit Wirtszellen

*Rhodococcus equi* ist ein fakultativ intrazelluläres Pathogen. Die Infektiosität scheint auf mononukleäre Phagozyten beschränkt zu sein (Hondalus 1997). Neutrophile sind hingegen zur Tötung der Bakterien fähig (Meijer und Prescott 2004). Die Aufnahme in Makrophagen geschieht wahrscheinlich über den Komplementrezeptor 3, der auch als Mac-1 bezeichnet wird (Mosser und Hondalus 1996). Da ManLAM aus *R. equi* an den Mannose-Rezeptor binden kann, ist eine Beteiligung dieses Rezeptors bei der Aufnahme der Bakterien ebenfalls denkbar (Meijer und Prescott 2004). Eine Fc $\gamma$ -Rezeptor vermittelte Aufnahme von *R. equi* führt verstärkt zu einer Abtötung der Bakterien durch Makrophagen (Hietala und Ardans 1987). In der Wirtszelle residiert *R. equi* in einem Phagosom, das nicht mit Lysosomen fusioniert (Zink et al. 1987, Hietala und Ardans 1987, Fernandez 2005, Lührmann 2002). Nach einer lag-Phase von einigen Stunden vermehren sich die Bakterien intraphagosomal mit einer Verdopplungszeit von etwa 6-8 Stunden (Hietala und Ardans 1987, Zink et al. 1987, Hondalus und Mosser 1994). Die Phagosomenmembran scheint während der bakteriellen Vermehrung erhalten zu bleiben (Zink et al. 1987).

Einer immunohistochemischen Analyse zufolge blockieren *R. equi* die Reifung ihrer Phagosomen in einem Stadium, das späten Endosomen ähnlich ist. *R. equi*-enthaltende Phagosomen reichern spät endosomale Proteine wie LAMP1, LAMP2, Rab7 und das Lipid LBPA an. Typische Marker für frühe oder Recycling-Endosomen werden transient

akquiriert oder komplett ausgeschlossen (Fernandez 2005). Die Phagosomen erhalten jedoch keinen vATPase-Komplex und werden auch nicht angesäuert (Fernandez 2005, Bargen 2005). Eine erste Untersuchung von *R. equi*-enthaltenden Phagosomen, die aus infizierten Zellen isoliert wurden, zeigte zwar ebenfalls einen Ausschluss der vATPase, aber im Gegensatz zur immunohistochemischen Analyse eine verminderte Akkumulation von LAMP1 und eine Assoziation der Phagosomen mit Rab5 (Dissertation Lührmann 2002).

Die Infektion mit *R. equi* ist zudem toxisch für Wirtszellen (Zink et al. 1987, Hietala und Ardans 1987). Die Degeneration der Zellen ist bereits nach einigen Stunden sichtbar und beruht auf Nekrose. Eine durch *R. equi* induzierte Apoptose konnte ausgeschlossen werden (Lührmann et al. 2004). Um die Nekrose der Wirtszellen auszulösen, müssen Rhodokokken lebendig sein (Lührmann et al. 2004).

#### 1.6.5 Virulenzfaktoren von *Rhodococcus equi*

Über die Faktoren und Mechanismen, die zur veränderten Phagosomenreifung, Zytotoxizität und intrazellulären Vermehrung von *Rhodococcus equi* führen, ist nur wenig bekannt. Die Polysaccharidkapsel der Bakterien hemmt möglicherweise die Aufnahme durch Phagozyten (Prescott 1991). Bislang wurden 27 verschiedene Kapsel-Serotypen von *R. equi* identifiziert (Mutimer et al. 1982). Eine direkte Verbindung zwischen Serotyp und Virulenz wurde bisher allerdings nicht beobachtet (Mutimer 1982, Takai et al. 1991a). Es wurde vermutet, dass die sekretierte Cholesterol-Oxidase (ChoE) von *R. equi* im Zusammenspiel mit Phospholipasen schädigend auf Membranen wirkt und damit ein wichtiger Faktor für die Zytotoxizität der Bakterien ist (Smola et al. 1994, Hondalus 1997, Navas et al. 2001). Eine kürzlich veröffentlichte Studie konnte jedoch ChoE als Virulenzfaktor ausschließen (Pei et al. 2006). In der Zellwand von *R. equi* angereicherte Mykolsäuren haben möglicherweise Einfluss auf die Virulenz der Bakterien. Stämme mit langkettigen Mykolsäuren produzieren größere Granuloma und führen zu einer höheren Letalität bei Mäusen als Stämme mit kürzeren Mykolsäuren (Gotoh et al. 1991).

Von entscheidender Bedeutung für die Virulenz von *R. equi* ist ein 80-85 kBp großes Virulenz-assoziiertes Plasmid, das unter anderem für das „Virulenz-assoziierte Protein A“ codiert (Meijer und Prescott 2004). Das Plasmid konnte im Gegensatz zu Umweltisolaten in den meisten isolaten aus erkrankten Fohlen nachgewiesen werden (Takai et al. 1991a und b, Tan et al. 1995). Die Fähigkeit, in Makrophagen zu überleben und sich intrazellulär zu vermehren, hängt stark von der Anwesenheit des Plasmides in *R. equi* ab. Isogene Bakterienstämme, denen dieses Plasmid fehlt, sind avirulent und nicht in der Lage sich

intrazellulär zu vermehren (Giguere et al. 1999a, Hondalus & Mosser 1994) und zeigen eine verminderte Zytotoxizität (Lührmann et al. 2004). Phagosomen, die *R. equi* ohne Plasmid enthalten, akquirieren langsam die vATPase und säuern an (Lührmann 2002, Fernandez 2005, Barges 2006). *R. equi*-Stämme, die aus Lymphknoten infizierter Schweine isoliert wurden, besitzen meist ein VapB-codierendes Plasmid und zeigen im Vergleich zu VapA-Stämmen eine intermediäre Virulenz bei Mäusen (Takai et al. 1996). Verschiedene Isolate aus infizierten Menschen hatten entweder ein VapA-, VapB oder keines von beiden Plasmiden (Takai et al. 1994).

Die Sequenzierung des VapA-codierenden Plasmids ergab insgesamt 64 vorhergesagte offene Leserahmen (ORF), die in drei Bereiche des Plasmids eingeteilt werden können: ein replikativer Bereich, ein konjugativer Bereich und eine Region, die typische Merkmale einer Pathogenitätsinsel aufweist (Takai et al. 2000). Die Pathogenitätsinsel beinhaltet 26 offene Leserahmen, von denen 7 für dem VapA sehr ähnliche Proteine codieren (*vapA*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G*, *H*). Die *vap*-Gene zeigen, wie die meisten anderen Gene des Plasmids auch, keinerlei Homologien zu bislang sequenzierten nicht *vap*-Genen. *vapF* ist scheinbar ein Pseudogen, da es zwei Mutationen enthält, die den Leserahmen verschieben (*frame shift*). Alle anderen *vap*-Gene codieren für Proteine mit Signalpeptid, was auf eine Sekretion der Proteine hindeutet. Neben den 6 funktionellen *vap*-Genen codieren noch vier weitere Gene für Proteine mit Signalpeptid (Meijer und Prescott 2004).

Das VapA-Protein ist ein wichtiger Virulenz-Faktor, dessen genaue Funktion allerdings unbekannt ist. Dieses 15-17 kDa große Protein ist das Hauptantigen bei Infektionen von Fohlen (Takai et al 1991a). Das VapA Protein wird acyliert und in der Zellwand verankert (Meijer und Prescott 2004). Die Expression des *vapA*-Gens wird durch einen niedrigen pH (6.0), Temperaturen über 32°C und oxidativen Stress induziert (Takai et al. 1992, Takai et al. 1996a, Benoit et al. 2001). Während einer Infektion ist *R. equi* wahrscheinlich ähnlichen Bedingungen ausgesetzt. Die VapA-Expression wird zusätzlich durch ORF4 und 8 reguliert (Meijer und Prescott). Die Expression von *vapC*, *D* und *E* ist ebenfalls thermoreguliert (Byrne et al. 2001). Darüber hinaus wurde in einem Microarray-Verfahren eine Induktion der Leserahmen 7, 8, 9, 10, 13 *vapG* und *H* unter ähnlichen Bedingungen gefunden. Diese Gene sind ebenfalls in der Pathogenitätsinsel lokalisiert. Gene außerhalb der Pathogenitätsinsel werden unter den gleichen Bedingungen (pH 5.0, 37°C) nicht induziert. Während des intrazellulären Wachstums von *R. equi* werden die gleichen Gene induziert wie bei dem Wachstum bei niedrigem pH und hohen Temperaturen (Ren und Prescott 2003). Durch die Deletion des *vapA* Gens werden die Bakterien avirulent (Jain et al. 2003). Das VapA-Protein alleine vermittelt jedoch keine Virulenz (Giguere et al.

1999a). Die Bedeutung von VapA für die Phagosomenreifung und Zytotoxizität waren unbekannt.

### 1.7 Ziele dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Kompartimentierung *Rhodococcus equi*-enthaltender Phagosomen durch Isolierung der Phagosomen aus infizierten Mausmakrophagen zu analysieren. Durch den Vergleich von *R. equi*(+) haltigen Phagosomen mit *R. equi*(-) haltigen Phagosomen, sollte die Bedeutung des Virulenzplasmides für die Kompartimentierung der Bakterien genauer beleuchtet werden. Darüber hinaus sollte der Einfluss von Genen der Pathogenitätsinsel des Virulenzplasmides auf die Phagosomenreifung, intrazelluläre Vermehrung und Zytotoxizität untersucht werden. Zu diesem Zweck sollten rekombinante *R. equi*-Stämme, die unterschiedliche Bereiche der Pathogenitätsinsel besitzen, zunächst konstruiert und anschließend charakterisiert werden. Durch eine gezielte Deletion des *vapA*-Gens und der Charakterisierung der resultierenden Mutante sollte außerdem die Rolle von VapA für die Zytotoxizität, intrazelluläre Vermehrung und Phagosomenreifung geklärt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Acrylamidlösung	Roth (Karlsruhe)
Agar-Agar	Roth (Karlsruhe)
Agarose <i>Low Melting Point</i>	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ammoniumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Apramycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
ATTO488	ATTO Tec (Siegen)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)
Benzonase	Merck (Darmstadt)
BHI (Brain Heart Infusion)	Difco (Sparks, USA)
Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe)
Cytotoxicity Detection Kit	Roche Diagnostics (Mannheim)
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
DMF (Dimethylformamid)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth (Karlsruhe)
EDTA	Roth (Karlsruhe)
EGTA	Roth (Karlsruhe)
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
Eserserum	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Roth (Karlsruhe)
FCS (Fetales Kälberserum)	Invitrogen (Karlsruhe)
Ficoll 70000 MW	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Formaldehyd	Roth (Karlsruhe)
Gel Mount	Biomedica corp. (Foster City, USA)
Gentamicin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Glutaraldehyd	Polysciences, Inc (Eppelheim)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Hefe-Extrakt	Roth (Karlsruhe)
Hepes	Roth (Karlsruhe)
Hygromycin B	Invitrogen (Karlsruhe)

Interferon $\gamma$ , rekombinant, Maus	Strathmann Biotec (Hamburg)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Kaliumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
Kanamycin	Roth (Karlsruhe)
LB (Luria Broth)	Roth (Karlsruhe)
Leupeptin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Lipopolysaccharid ( <i>E. coli</i> )	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
LysoTracker	Molecular Probes (Leiden, NL)
Magnesiumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumsulfat	Roth (Karlsruhe)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
Mowiol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumacetat	Roth (Karlsruhe)
Natriumcarbonat	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumcitrat Dihydrat	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydrogencarbonat	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
Osmiumtetroxid	Roth (Karlsruhe)
Orange G	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt)
Pefabloc	Roche (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Pepstatin A	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Pferdeserum	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Pfu DNA Polymerase	Fermentas (St. Leon Roth)
Phenanthrolin Monohydrat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Plasmid Midi Kit	Qiagen (Hilden)
Ponceau S	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Pyruvat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
p-Nitrophenyl-b-D-Galaktopyranosid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
QiaQuick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
QiaQuick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
Restriktionsendonukleasen	Fermentas (St. Leon Roth)
RPMI 1640	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Salzsäure	Roth (Karlsruhe)
Saccharose	Roth (Karlsruhe)
Saponin	Roth (Karlsruhe)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth (Karlsruhe)
SuperSignal West Pico	Pierce (Rockford, USA)
SytoGreen 13	Molecular Probes (Leiden, NL)
Taq DNA Polymerase	Fermentas (St. Leon Roth)
Tannin	Merck (Darmstadt)
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Roth (Karlsruhe)
Tris Base	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Roth (Karlsruhe)
Tween 20	Roth (Karlsruhe)
Vancomycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Xylene Cyanol F	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ziegenserum	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

0,5 ml Reaktionsgefäße (PCR)	Brand (Wertheim)
1,5 ml Reaktionsgefäße	Brand (Wertheim)
1 ml Spritzen	Henke Sass Wolf (Tuttlingen)
10 ml und 20 ml Spritzen	Omnifix (Melsungen)
15 ml Zentrifugenröhrchen	TPP (Trasadingen, Schweiz)
2 ml Kryoröhrchen	Nunc (Wiesbaden)
23G-Kanülen	Henke Sass Wolf (Tuttlingen)
24- <i>well</i> -Zellkulturplatten	TPP (Trasadingen, Schweiz)
50 ml Zentrifugenröhrchen	TPP (Trasadingen, Schweiz)
96- <i>well</i> -Platte	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Deckgläschen	Menzel Gläser (Braunschweig)
Einmalküvetten	Ratiolab (Dreieich)
Elektroporationsküvetten Bakterienkulturen	BioRad (München)
Elektroporationsküvetten Zellkultur	Eppendorf (Hamburg)
Handschuhe	Kimberly-Clark (Zaventem, Belgien)
Nitrocellulosemembran	Schleicher und Schuell (Dassel)
Objektträger	Menzel Gläser (Braunschweig)
Pasteurpipetten	Brand (Wertheim)

Röntgen Filme	Novas (Würzburg)
Schnappdeckelröhrchen	Greiner (Frickenhausen)
Serologische Pipetten	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Sterilfilter	Roth (Karlsruhe)
SW40 Ti Röhrchen	Beckmann (Krefeld)
Whatman Papier	Schleicher und Schuell (Dassel)
Zellkulturschalen	TPP (Trasadingen, Schweiz)

## 2.3 Geräte

Autoklav 3870 ELV	Systemec (Wettenberg)
Brutschränke	Binder Products GmbH (Tuttlingen)
Bunsenbrenner FlammyC	Schütt SK-Laborbedarf (Würzburg)
Dualbandfilter FITC/TexasRed	AHF Analysetechniken (Tübingen)
Eismaschine MF 22	Scotsman
Elektroporator Micro Pulser	BioRad (München)
Fluoreszenzmikroskope (Axioplan, Axiophot)	Zeiss (Oberkochen)
Gefrierschränke (-20°C)	Privileg, Quelle (Fürth)
Gefrierschränke (-80°C)	Thermoforma (Egelsbach)
Gummischaber (Rubber Policeman)	Hartenstein (Würzburg)
Heizblock	Heap Labor Consult (Bovende)
Konfokales Laser-Scan Mikroskop LSM 510	Zeiss (Oberkochen)
Kühlschränke	Privileg, Quelle (Fürth)
Lichtmikroskop TS100	Nikon (Badhoevedorp, NL)
Magnetrührer MSH 300, MSH 3000	SK-Laborbedarf (Würzburg)
Mikroskop invers ID 03	Zeiss (Oberkochen)
Multi-Detection Microplate Reader FL800	Bio-Tek Instruments (Winooski, USA)
pH-Meter	WTW (Weilheim)
Photospektrometer	Thermo Hybaid (USA)
Schüttelinkubatoren	Stuart Scientific (UK)
Sterilbänke Microflow 2	Nalge Nunc (Wiesbaden)
Tischzentrifuge Micro 20	Hettich (Tuttlingen)
Transmissionselektronenmikroskop CM120	Philips (Eindhoven, NL)
Universal Microplate Reader EL800	Bio-Tek Instruments (Winooski, USA)
Vortex (Vortex Genie2)	Scientific Industries (New York, USA)
Waagen (Grob- und Feinwaage)	Denver Instrument

Wasserbäder  
Zählkammer (Neubauer)

Memmert (Schwalbach)  
Brand (Wertheim a.M.)

## 2.4 Antikörper

### 2.4.1 Primäre Antikörper

Antigen	Antikörpertyp	Spezies	Herkunft
LAMP-1	monoklonal, 1D4B	Ratte	U. Schaible / DSHB, Iowa)
Rab5	monoklonal, CL621.1	Maus	R. Jahn / Synaptic Systems
Annexin II	monoklonal, HH7	Maus	V. Gerke
Transferrin Rezeptor	monoklonal, H68.4	Maus	Zymed
Rab7	polyklonal	Kaninchen	M. Zerial
Rab4	monoklonal	Maus	BD Transduction Laboratories
Rab11	polyklonal	Kaninchen	Zymed
EEA1	polyklonal	Kaninchen	M. Clague
EEA1	monoklonal	Maus	Santa. Cruz Biotech
Coronin-1	polyklonal	Kaninchen	J. Pieters
CathepsinD	polyklonal	Kaninchen	Kominami
proCath B	polyklonal	Kaninchen	D. Russel
vATPase E-Untereinheit	polyklonal	Kaninchen	D. Brown
<i>Rhodococcus equi</i>	polyklonal, ST06	Kaninchen	C. Lämmler
VapA	monoklonal	Maus	S. Takai

## 2.4.2 Sekundäre Antikörper

Antigen	Konjugat	Spezies	Firma / Bestellnummer
Ratte	HRP	Ziege	Dianova / 112-035-062
Kaninchen	HRP	Ziege	Dianova / 111-035-144
Maus	HRP	Ziege	Dianova / 111-035-062
Kaninchen	Cy3	Esel	Dianova / 711-165-152
Kaninchen	Alexa 488	Ziege	Molecular Probes A-11008

HRP: Meerrettich-Peroxidase

## 2.5 Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

Farbstoff	Stammlösung	Endkonzentration	Firma
LysoTracker <sup>®</sup> Red	1 mM	100 nM	Molecular Probes
DND-99	in DMSO	in DMEM	(Leiden, NL)
Syto <sup>®</sup> Green	5 mM	2,5 µM	Molecular Probes
Fluorescent Nucleic Acid Stain	in DMSO	in DMEM oder PBS	(Leiden, NL)
ATTO 488 NHS-ester	2 mg/ml in H <sub>2</sub> O	80 µg/ml in NaHCO <sub>3</sub>	ATTO-Tec GmbH (Siegen)

## 2.6 Kulturmedien und Agarplatten

### 2.6.1 Medien für *Rhodococcus equi*

#### BHI-Medium

BHI 37 g  
Ad 1000 ml aqua dest.

#### BHI-Agar

BHI 37 g  
Agar 15 g  
Ad 1000 ml aqua dest.

Minimalmedium

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,25 g
MgSO <sub>4</sub> Heptahydrat	0,25 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10,3 g
Glycerin (87%)	1,74 ml

Ad 1000 ml aqua dest.

2.6.2 Medien für *Escherichia coli*LB-Medium

LB	20 g
----	------

Ad 1000 ml aqua dest.

LB-Agar

LB	20 g
Agar	15 g

Ad 1000 ml aqua dest.

## 2.6.3 Medien für murine Zelllinien

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) komplett (DMEM/FCS)

DMEM	500 ml
FCS (hitzeinaktiviert)	50 ml

Im Folgenden wird die Bezeichnung DMEM/FCS als Abkürzung für das komplette Medium verwendet.

Kulturmedium für primäre murine Knochenmarksmakrophagen

500 ml DMEM/FCS mit folgenden Zusätzen:

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,85 g
D-Glucose	2,25 g
HEPES (pH 7,3)	10 mM
Pyruvat	1 mM
Pferdeserum (hitzeinaktiviert)	5%
Kulturüberstand von L929 Zellen	20%

## 2.7 Lösungen und Puffer

### PBS (20x)

NaCl	160 g
KCl	4 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	23 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4 g

Ad 1000 ml Aqua dest.

### PBS (1x)

PBS 20x	50 ml
---------	-------

Ad 1000 ml Aqua dest., autoklavieren

### Natriumhydrogencarbonat (0,1 M, pH 8,5)

NaHCO <sub>3</sub>	8,4 g/l
--------------------	---------

in Aqua dest.

Die Lösung wurde steril filtriert und bei 4°C gelagert.

### Fixierlösung Immunfluoreszenz: 3% *para*-Formaldehyd (PFA) in PBS

PFA 16%	1,875 ml
PBS 20x	0,5 ml

Ad 10 ml Aqua dest

Lagerung bei 4°C. Vor Gebrauch wurde der pH-Wert überprüft (pH 7,2-7,4).

### Quenchlösung Immunfluoreszenz: Ammoniumchlorid (50 mM in PBS)

PBS 20x	25 ml
NH <sub>4</sub> Cl	1,34 g

Ad 500 ml Aqua dest.

### Permeabilisierungspuffer für Immunfluoreszenz

Ziegen- oder Eselserum	5% (v/v)
Saponin	0,1% (v/v)

in PBS

### Mowiol

Glycerin	6 g
Mowiol	2,4 g

Diese Lösung wurde 1 h bei RT gerührt, anschließend Zugabe von

Aqua dest.	6 ml
------------	------

Die Lösung wurde weitere 2 h bei RT gerührt, dann

0,2 M Tris/HCl (pH 8,8)	12 ml
-------------------------	-------

zugegeben, für 10 min bei 50°C gerührt und 15 min bei 5000 rpm zentrifugiert.

Der Überstand wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Fixierlösung Transmissionselektronenmikroskopie: 2% PFA, 0,25% GA in PBS

PFA 16%	1,25 ml
---------	---------

Glutaraldehyd 8%	0,31 ml
------------------	---------

Ad 10 ml PBS

**Lösungen für die Phagosomenisolierung**

EGTA-Stammlösung (50 mM)

EGTA	19 g/l
------	--------

in aqua dest. Der pH wurde mit KOH auf 8,0 eingestellt.

Hepes-KOH-Stammlösung (200 mM)

Hepes	23,83 g
-------	---------

Aqua dest. 500 ml

Der pH wurde mit KOH auf 7,2 eingestellt.

Ficoll-Kissen

Ficoll 70000	3 g
--------------	-----

Saccharose	1 g
------------	-----

EGTA-Stammlösung	0,2 ml
------------------	--------

Hepes/KOH-Stammlösung	2,0 ml
-----------------------	--------

Ad 20 ml aqua dest.

Homogenisierungspuffer

Saccharose	85,58 g
------------	---------

EGTA-Stammlösung	10 ml
------------------	-------

Hepes-KOH-Stammlösung	100 ml
-----------------------	--------

Ad 1000 ml aqua dest.

Saccharose-Lösungen

70% Saccharose	35 g
55% Saccharose	27,5 g
32,5% Saccharose	16,25 g
10% Saccharose	5 g

jeweils in

EGTA-Stammlösung	0,5 ml
Hepes/KOH-Stammlösung	5,0 ml

Ad 50 ml aqua dest. Die Lösungen wurden bei 4°C gelagert.

50x Protease-Inhibitor Cocktail (Endkonzentrationen)

Leupeptin (Stammlösung 1 mg/ml aqua dest.)	1 µM
1,10-Phenanthrolin (Stammlösung 99,1 mg/ml Ethanol)	0,75 mM
Pepstatin A (Stammlösung 1 mg/ml aqua dest.)	1 µM
E64 (Stammlösung 1 mg/ml aqua dest.)	2 µM
Pefabloc (Stammlösung 50 mg/ml)	1 mM

Lösungen für den β-Galaktosidase-Assay

Citratpuffer	(1M / pH 3,5)
Zitronensäure	8,4 g
Na-Citrat-Dihydrat	2,94 g

Ad 100 ml aqua dest.

β-Galaktosidase-Reaktionslösung

Triton X-100 (20%)	700 µl
1 M Citratpuffer pH 3,5	3 ml
p-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid	0,04515 g

Aqua dest. 16,3 ml

Stopplösung (0,5 M/pH 12)

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	10,6 g
---------------------------------	--------

Ad 200 ml aqua dest.

Lösungen für DNA-Gelelektrophorese

0,8%iges Agarose Gel

Agarose	1,6 g
---------	-------

ad 200 ml TAE-Puffer (1x).

Die Lösung wurde in einem Mikrowellenofen aufgeköcht um die Agarose zu lösen.

TAE-Puffer (50x)

Tris/HCl	242 g
Eisessig	57,1 ml
EDTA (0,5 M)	100 ml

ad 1000 ml aqua des.

Probenpuffer

Bromphenolblau	25 mg
Xylene Cyanol F	25 mg
Orange G	25 mg
Ficoll (Typ 100)	1,5 g

ad 10 ml aqua dest.

**Lösungen für SDS-PAGE**Probenpuffer nach Laemmli

1 M Tris/HCl (pH 6,8)	0,6 ml
50% Glycerin	5 ml
10% SDS	2 ml
β-Mercaptoethanol	0,5 ml
1% Bromphenol Blau	1 ml

Aqua dest. 0,9 ml

Laufpuffer für SDS-Gele (10x)

Tris	30 g
Glycin	144 g
SDS	10 g

Ad 500 ml aqua dest.

Laufpuffer für SDS-Gele (1x)

Laufpuffer 10x	100 ml
----------------	--------

Ad 1000 ml aqua dest.

Tris/HCl (20 mM)

Tris	2,4 g/l
------	---------

Der pH wurde mit 1 M HCl auf 8,0 eingestellt.

Tris/HCl (1,5 M)

Tris	181,7 g/l
------	-----------

Der pH wurde mit 1 M HCl auf 6,8 oder 8,8 eingestellt.

Trenngel 12%

Acrylamidlösung 40%	1,85 ml
---------------------	---------

1,5 M Tris pH 8,8	1,55 ml
-------------------	---------

SDS 10%	75 µl
---------	-------

APS 10%	75 µl
---------	-------

TEMED	7,5 µl
-------	--------

Aqua dest. 2,75 ml

Sammelgel 4%

Acrylamidlösung 40%	315 µl
---------------------	--------

1,5 M Tris pH 6,8	315 µl
-------------------	--------

SDS 10%	25 µl
---------	-------

APS 10%	25 µl
---------	-------

TEMED	2,5 µl
-------	--------

Aqua dest. 1,8 ml

Lösungen für WesternblotTransferpuffer 5x

Tris	29 g
------	------

Glycin	14,6 g
--------	--------

SDS	1,9 g
-----	-------

Ad 1000 ml aqua dest.

Transferpuffer 1x

Transferpuffer 5x	50 ml
-------------------	-------

Methanol	50 ml
----------	-------

Aqua dest. 150 ml

PBS/Tween

PBS 20x	50 ml
Tween 20	0,5 ml

Ad 1000 ml aqua dest.

Blocklösung für Westernblot

Tween 20	0,025 ml
Milchpulver	2,5 g

ad 50 ml PBS 1x

Lösungen für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*Plasmid-Puffer 1

Tris/HCl	6,06 g
EDTA	3,72 g
Sucrose	20 g
RNAse A (DNAse frei)	20 mg

ad 1000 ml aqua dest.

Der pH wurde mit HCl auf 8,0 eingestellt.

Plasmid-Puffer 2

NaOH	8 g
SDS	20 g

ad 1000 ml aqua dest.

Plasmid-Puffer 3

Kalium-Acetat	294,5 g
---------------	---------

ad 1000 ml aqua dest.

Der pH wurde mit Eisessig auf pH 5,5 eingestellt.

**Lösungen für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *R. equi*****Plasmid-Puffer 1**

Tris/HCl	6,06 g
EDTA	3,72 g
Sucrose	171,15 g
RNAse A (DNAse frei)	20 mg

ad 1000 ml aqua dest.

Der pH wurde mit HCl auf 8,0 eingestellt.

**Plasmid-Puffer 2**

NaOH	8 g
SDS	10 g

ad 1000 ml aqua dest.

**Plasmid-Puffer 3**

Kalium-Acetat	294,5 g
---------------	---------

ad 1000 ml aqua dest.

Der pH wurde mit Eisessig auf pH 5,5 eingestellt.

**2.8 Zellkultur****2.8.1 Zelllinien**

<b>Zelllinie</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Referenz</b>
J774E	Murine makrophagenartige Zelllinie	Philip Stahl (Washington-University, St. Louis, USA)	Fiani et al. 1998
Primäre Knochenmarks-makrophagen (BMM $\Phi$ )	Primäre Mausmakrophagen, aus dem Knochenmark isoliert	C57BL/6ByJ weibliche Mäuse, 6 Wochen alt	Schaible et al. 1999
L929	Murine Fibroblasten-Zelllinie	Stammsammlung Mikrobiologie der Universität Würzburg	Hutz et al. 1984
RAW 264.7	Murine Makrophagen Zelllinie, transformiert durch murines Adelson Leukämievirus	Hubert Hilbi (ETH Zürich, Schweiz)	Raschke et al. 1978

### **2.8.2 Kultivierung von J774E- und RAW 264.7-Zellen**

Die Kultivierung von J774E- und RAW 264.7-Makrophagen erfolgte bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> in humider Atmosphäre. Zur Subkultivierung wurden die adhärennten Zelllinien alle 2 Tage mit einem Gummischaber vom Schalenboden gelöst, in frischem Medium resuspendiert und anschließend in einem Verhältnis von 1:2 auf neue Zellkulturschalen verteilt.

### **2.8.3 Kultivierung von L929 Fibroblasten**

Zur Kultivierung von primären Makrophagen wurde ein Kulturüberstand von L929 Fibroblasten benötigt. L929-Zellen produzieren Wachstumsfaktoren, die für die Ausdifferenzierung der primären Knochenmarksmakrophagen erforderlich sind. L929-Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 25 cm<sup>2</sup> in DMEM / 10% FCS bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte alle 2 Tage in einem Verhältnis von 1:3. Hierzu wurde zunächst das alte Medium entfernt und die Zellen mit einmalig mit warmen PBS gewaschen. Anschließend wurden die Fibroblasten mit 2 ml Trypsin- EDTA ca. zehn Minuten bei 37°C inkubiert. Nachdem sich die Zellen vom Flaschenboden abgelöst hatten, wurden sie in frisches Medium aufgenommen und auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Um den L929-Kulturüberstand zu erzeugen, wurden die Zellen in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 150 cm<sup>2</sup> bis zu einer Konfluenz vermehrt. Nachdem die Zellen eine Konfluenz von ca. 80% erreicht hatten, wurde das alte Medium entfernt durch 50 ml frisches DMEM / 10% FCS ersetzt. Es folgte eine Inkubation mit diesem Medium bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> von 10 Tagen. Daraufhin wurde das Medium gesammelt, sterilfiltriert und in 10 ml Aliquots bei -20°C gelagert.

### **2.8.4 Isolierung und Kultivierung von Knochenmarksmakrophagen**

Primäre Knochenmarksmakrophagen (BMMΦ) wurden von 6 Wochen alten weiblichen C57BL/6ByJ Mäusen gewonnen. Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und die Oberschenkel- und Schienbeinknochen frei präpariert. Die Knochenmarkszellen einer Maus wurden mit 6 ml PBS und einer 27 G Kanüle aus den Knochen ausgespült und in Petrischalen gesammelt. Das erhaltene Knochenmark wurde in 54 ml Kulturmedium für primäre Knochenmarksmakrophagen (siehe Kapitel 2.5) mit 200 µg/ml Penicillin/Streptomycin aufgenommen und auf 6 Petrischalen verteilt. Zur Ausdifferenzierung und Vermehrung wurden die BMMΦ für 6 Tage bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> kultiviert. Zur Subkultivierung der BMMΦ wurde das alte Medium durch eiskaltes PBS ersetzt, die Zellen für 30 min bei 4°C darin inkubiert und anschließend mit einem Gummischaber gelöst. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 1000 rpm) geerntet und in frischem Medium aufgenommen. Primäre BMMΦ wurden zwischen Tag 10 und

Tag 21 nach ihrer Isolierung für Versuche verwendet oder für eine langfristige Lagerung eingefroren.

### **2.8.5 Einfrieren und Lagerung von Zellen**

Sämtliche Zelllinien wurden zur Lagerung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zur Kryokonservierung wurde Zellzahl von ca.  $2 \times 10^7$  mit einem Gummischaber geerntet und in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 1000 rpm und 5 min pelletiert und daraufhin in 1 ml DMEM aufgenommen. Anschließend wurde der Zellsuspension DMSO bis zu einer Endkonzentration von 10% zugegeben. Dieser Schritt erfolgte langsam und auf Eis. Nach Überführung der Zellsuspension in 2 ml Kryoröhrchen, wurden die Zellen zunächst für 2 h bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Danach folgte eine Lagerung der Zellen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für ca 14 h bevor sie schließlich in flüssigem Stickstoff ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) gelagert wurden.

Zur Reaktivierung eingefrorener Zellen wurden die in Kryoröhrchen eingefrorenen Zellen bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen mit 9 ml vorgewärmten DMEM überführt und bei 1000 rpm und RT abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml frischem DMEM aufgenommen, in eine Zellkulturschale gegeben und bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 7%  $\text{CO}_2$  kultiviert (2.6.2)

### **2.8.6 Bestimmung der Zellzahl**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer. Hierzu wurden Zellen mit einem Gummischaber gelöst und auf eine geeignete Verdünnung in DMEM gebracht. Von dieser Zellsuspension wurden 10  $\mu\text{l}$  in die Zählkammer überführt. Es wurde stets die Anzahl von Zellen in vier Großquadraten bestimmt und anschließend gemittelt. Die Zellzahl resultiert aus dem Produkt des erhaltenen Mittelwertes (Anzahl der Zellen pro Großquadrat), der Kammerkonstanten ( $10^4$ ) und dem Verdünnungsfaktor.

### **2.8.7 Aktivierung von Makrophagen**

Für Versuche mit aktivierten Makrophagen wurde den Zellen 500 U/ml  $\text{IF}\gamma$  über Nacht in DMEM zugegeben. Vor der Infektion wurde den Zellen zusätzlich 250 ng/ml LPS zugegeben und 2 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 7%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Anschließend wurden die Makrophagen zur Infektion verwendet. Die Infektion erfolgte in Anwesenheit von  $\text{IF}\gamma$  und LPS.

## 2.9 Anzucht von Bakterien

### 2.9.1 Verwendete Bakterienstämme

Spezeis / Stamm	Eigenschaften	Herkunft	Referenz
<i>R. equi</i> 103+	Enthält 80 KBp Virulenz assoziiertes Plasmid; produziert VapA	J.F. Prescott (University of Guelph, Canada) Folenisolat	Giguere <i>et al.</i> 1999a
<i>R. equi</i> 103-	Isogen zum Stamm 103+; enthält kein Virulenz Plasmid; produziert kein VapA	J.F. Prescott (University of Guelph, Canada) Folenisolat	Giguere <i>et al.</i> 1999a
<i>R. equi</i> ATTC 33701+	Enthält 80 KBp großes Plasmid; produziert VapA	J.F. Prescott (University of Guelph, Canada) Folenisolat	Takai et al. 1991c
<i>R. equi</i> ATTC 33701-	33701+; enthält kein Virulenz Plasmid; produziert kein VapA	J.F. Prescott (University of Guelph, Canada) Folenisolat	Takai et al. 1991c
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$		AG Herzog (Bonn)	
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	avirulenter Stamm von <i>M. bovis</i>	U. Schaible (Berlin)	
<i>L. innocua</i> Serotyp 6b		Stammsammlung des Lehrstuhls für Mikrobiologie der Universität Würzburg	

### 2.9.2 Anzucht von *Rhodococcus equi*

Die Kultivierung von *R. equi* auf festen Nährmedien erfolgte mit BHI-Agar bei 30°C für ca. zwei Tage. Unter diesen Wachstumsbedingungen wird das Risiko eines Virulenzplasmid-Verlustes minimiert. Die Vermehrung von *R. equi* in größerem Maßstab erfolgte in flüssigem BHI in Reagenzglasröhrchen oder 100 ml Erlenmeyer-Kolben bei 30°C und 200

rpm. Bei Verwendung rekombinanter Stämme wurden dem Medium je nach Bedarf Apramycin (50 mg/l), Hygromycin B (300 mg/l) oder Kanamycin (200 mg/l) zugesetzt. Für Infektionsversuche wurde *R. equi* über Nacht bei 37°C und 200 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,5 - 2 vermehrt.

### 2.9.3 Anzucht von *Listeria innocua*

*L. innocua* wurde auf BHI-Platten bei 37°C kultiviert. Für die Infektionsexperimente wurde *L. innocua* in flüssigem BHI-Medium über Nacht in Schüttelkultur vermehrt (37°C, 200 rpm).

### 2.9.4 Anzucht von *Escherichia coli*

Für die Zucht von *E.coli* -Stämmen wurde LB-Medium verwendet. Die Bakterien wurden bei 37°C und 200 rpm kultiviert. Bei Vermehrung rekombinanter Stämme wurden dem Medium je nach Bedarf Ampicillin (100 mg/ml), Apramycin (50 mg/l), Hygromycin B (50 mg/l) oder Kanamycin (50 mg/l) zugesetzt.

## 2.10 Bestimmung der Bakterienzellzahl

Bei geringer Bakteriendichte ist die optische Dichte einer Bakteriensuspension direkt proportional zur Bakterienzahl. Durch Messung der Absorption einer Bakteriensuspension bei einer Wellenlänge von 600 nm kann die Zellzahl bestimmt werden. Die Messung der Absorption erfolgte mit einer geeigneten Verdünnung in PBS. Für die verschiedenen Bakterienstämme ergeben sich folgende Beziehungen zwischen der Bakterienzellzahl und der optischen Dichte:

<i>Rhodococcus equi</i>	1 OD <sub>600</sub> = 1,5 x 10 <sup>8</sup> Bakterien/ml
<i>L. innocua</i>	1 OD <sub>600</sub> = 2 x 10 <sup>8</sup> Bakterien/ml
<i>E. coli</i>	1 OD <sub>600</sub> = 2 x 10 <sup>8</sup> Bakterien/ml

## 2.11 Vorbehandlung der Bakterien

### 2.11.1 Behandlung mit Hitze

Die gewünschte Anzahl an Bakterien wurde in 100 µl PBS im Heizblock bei 75°C für 15 min inkubiert.

### 2.11.2 Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an Bakterien

Vor manchen Infektionsexperimenten wurden die Bakterien mit ATTO488. ATTO488 liegt als N-hydroxysuccinimidyl(NHS)-Ester vor, der kovalent an Aminogruppen von Proteinen bindet. Je  $2 \times 10^8$  Bakterien wurden einmal mit PBS gewaschen (8000 rpm, 5 min, RT), in 200 µl 100 mM NaHCO<sub>3</sub> pH 8,5 aufgenommen und mit 80 µg/ml ATTO488 für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Durch Zugabe von 20 mM Tris/HCl pH 8 wurde die Reaktion gestoppt. Die Bakterien wurden zweimal mit PBS gewaschen (8000 rpm, 5 min) und anschließend in PBS aufgenommen.

## 2.12 Phagosomenisolierung

Zur biochemischen Analyse wurden Bakterien-enthaltende Phagosomen aus infizierten Zellen isoliert. Für jeden Ansatz wurden 15-20 Zellkulturschalen (90 cm Durchmesser) mit J774E oder 10-12 Schalen mit BMMΦ verwendet. Am Vorabend der Phagosomenisolierung wurde das Medium der Makrophagen durch 5 ml frisches DMEM ersetzt. Zur Infektion wurden Übernacht-Kulturen von *R. equi* und *L. innocua* verwendet. Je 30 ml Kultur wurde bei 4000 rpm und 30 min abzentrifugiert. Pelletierte Bakterien wurden in 1 ml PBS resuspendiert, die Bakterienzellzahl bestimmt (siehe Kapitel 2.8) und bis zur Infektion auf Eis aufbewahrt. Für die Isolierung von Phagosomen wurden Makrophagen 1 h mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 20 infiziert (37°C / 7% CO<sub>2</sub>). Daraufhin wurden nicht aufgenommene Bakterien durch dreimaliges waschen mit warmen PBS entfernt und die Zellen weitere 2 h mit 5 ml frischem Medium inkubiert. Anschließend wurde das Medium wieder entfernt und die Zellen in je 2 ml kaltem PBS pro Schale mit einem Gummischaber vom Schalenboden gelöst. Die Zellen eines Ansatzes wurden in 50 ml Zentrifugationsröhrchen gesammelt. Nach Zentrifugation der Zellsuspension bei 700 rpm und 4°C für 7 min, wurden die Makrophagen zuerst in 15 ml kalten PBS gewaschen (700 rpm, 4°C, 7 min) und daraufhin in 15 ml Homogenisierungspuffer (HP) aufgenommen und erneut zentrifugiert (1000 rpm, 4°C 7 min). Pelletierte Zellen wurden in je 2 ml HP

ohne EGTA aufgenommen und mit Benzonase (50 U) und Proteinase-Inhibitoren versetzt (30 µl Proteinase-Inhibitor-Cocktail). Die Zellen wurden in einem Dura Grind Homogenator mit ca. 10-12 Stößen und mikroskopisch auf ihre Lyse hin überprüft. Bei einem Aufschlussgrad von ca 70% wurden die Zellen nicht weiter mit dem Homogenator behandelt. Zur Erzeugung eines postnukleären Überstandes wurde das Lysat bei 2000 rpm und 4°C für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet erneut in HP aufgenommen und zentrifugiert (2000 rpm, 4°C, 3 min). Der neue Überstand wurde mit dem vorherigen vereinigt. Um die Integrität der Phagosomen zu erhalten, wurde nur noch mit abgeschnittenen Pipettenspitzen gearbeitet. Der PNS wurde danach 5 min bei 37°C inkubiert, um Nukleinsäuren durch Benzonas e zu verdauen. Vom PNS wurden 50 µl als Probe bei –80°C gelagert. Der Restliche PNS wurde mit 65%iger Sucroslösung auf 39% Sucrose Endkonzentration eingestellt. Um einen osmotischen Schock der Phagosomen gering zu halten, wurde dieser Schritt langsam durchgeführt. In ein SW40Ti-Röhrchen wurde anschließend nacheinander 1 ml 65%ige Sucroslösung, 2 ml 55%ige Sucroslösung, der PNS mit 39% Sucrose, 2 ml 32,5%ige Sucroslösung und 2 ml 10%ige Sucroslösung übereinander geschichtet. Der so erzeugte diskontinuierliche Sucrosegradient wurde bei 28000 rpm und 4°C 1 h zentrifugiert. Bakterien enthaltende Phagosomen wandern in diesem Dichtegradienten zur Interphase zwischen 55% und 65% Sucrose. Sie erscheinen dann als eine trübe Bande, die anschließend vorsichtig abgenommen wurde. Durch Zugabe von HP ohne Sucrose wurde die Phagosomensuspension auf 11% Sucrose eingestellt. Auch in diesem Schritt wurde langsam verfahren, um einen osmotischen Schock der Phagosomen zu minimieren. Zur weiteren Reinigung der Phagosomen wurde die auf 11% Sucrose eingestellte Probe auf 1 ml Ficoll Lösung in einem SW40Ti-Röhrchen geschichtet. Nach Zentrifugation bei 10000 rpm und 4°C für 1 h, wurden Bakterien enthaltende Phagosomen pelletiert. Der Überstand samt Ficoll Lösung wurde entfernt und das Pellet vorsichtig in 11 ml kaltem PBS aufgenommen. Anschließend wurden die Phagosomen erneut pelletiert (SW40Ti; 10000 rpm, 4°C, 20 min). Bakterien enthaltende Phagosomen wurden schließlich in 100 µl PBS aufgenommen und bis zur Verwendung bei –80°C gelagert.

## **2.13 Quantifizierung von Protein und DNA**

### **2.13.1 Quantifizierung von Protein**

Proteinkonzentrationen wurden mit dem BioRad DC *Protein Detection Assay* nach Angaben des Herstellers bestimmt. Zur Bestimmung von Phagosomalen Proteinkonzentrationen wurden die Proben mit TritonX100 behandelt (0,2%

Endkonzentration). Nach Inkubation für 30 min auf Eis wurden die Proben bei 13000 rpm 5 min zentrifugiert, um Bakterien zu pelletieren. Für die Messung der Überstand wurde für eingesetzt. Als Standard dienten Lösungen mit definierten BSA Konzentrationen.

### **2.13.1 Quantifizierung von DNA**

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde photometrisch in einer Quartzküvette bestimmt (Sambrook et al. 1989).

### **2.14 Bestimmung der sauren $\beta$ -Galaktosidase Aktivität**

Proben wurden auf 50  $\mu$ l mit aqua dest. gebracht und anschließend mit 100  $\mu$ l Reaktionslösung versetzt und in Kavitäten einer 96-*well*-Platte pipettiert. Als Blankprobe diente PBS. Die Ansätze wurden 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 150  $\mu$ l Stopplösung beendet. Zur Auswertung wurde die Extinktion der Proben bei 405 nm in einem ELISA Reader gemessen. Die Aktivität wurde in Units angegeben ( $E_{405}$ /mg Protein).

### **2.15 Gelelektrophorese**

#### **2.15.1 SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Zur gelektrophoretischen Trennung von Proteinen in Polyacrylamidgelen unter denaturierenden Bedingungen wurde die Methode von Lämmli (1970) angewandt.

#### **2.15.2 DNA-Gelelektrophorese**

DNA-Fragmente wurden mit 0,8%igen Agarosegelen elektrophoretisch in TAE-Puffer aufgetrennt (Sambrook et al. 2001). Als Größenstandard diente *EcoRI/HindIII*-geschnittene DNA des Phagen  $\lambda$ . Die DNA-Banden wurden 20 min in einer wässrigen Ethidiumbromid-Lösung (1  $\mu$ g/ml) gefärbt und nach Anregung mit einem Transilluminator (Wellenlänge 302 nm) fotografiert.

## 2.16 Transfer von Proteinen auf Membranen

Durch SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennte Proteine wurden durch Elektroblothing mit kontinuierlichem Puffersystem (Khyse-Andersen 1984) auf Nitrocellulose-Membranen (Typ BA 85) übertragen. Das transferierte Gesamtprotein wurde anschließend durch Färbung mit Ponceau S sichtbar gemacht. Durch Waschen mit PBS/Tween wurde der Farbstoff wieder entfernt.

## 2.17 Immunmarkierung von *Western Blots*

Nach dem Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membran, wurde diese mit einer Milchpulver-Lösung (5% w/v in PBS/Tween) geblockt (1 h, RT). Primäre Antikörper wurden in einer Milchpulver-Lösung (2% w/v in PBS/Tween) verdünnt und 1 h bei RT mit der Membran inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS/Tween (1x 5 min und 2x 10 min) wurde die Membran mit dem zweiten Antikörper, der an HRP-gekoppelt und in Milchpulver-Lösung (2% w/v in PBS/Tween) verdünnt war, inkubiert (1 h, RT). Die Membran wurde danach erneut mit PBS/Tween gewaschen (1x 5 min und 2x 10 min). Die Detektion erfolgte mit dem SuperSignal West Pico Chemilumineszenz Substrat (Pierce) und wurde auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht.

## 2.18 Isolierung von Nukleinsäuren

### 2.18.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

#### Analytischer Maßstab

Die Isolierung von Plasmid-DNA zu analytischen Zwecken (<25 µg DNA) erfolgte nach einem modifizierten „Alkaline Lysis“-Verfahren (Birnboim und Doly 1979). Je 1,5 ml von Übernackulturen plasmidhaltiger *E. coli*-Stämme wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen zentrifugiert (13000 rpm, 5 min). Die Überstände wurden dekantiert und die Zellen in je 150 µl Plasmid-Puffer 1 resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl Plasmid-Puffer 2 wurden die Zellen lysiert. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurde jeder Ansatz mit 150 µl Plasmid-Puffer 3 versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Das entstandene Präzipitat wurde bei 13000 rpm 10 min abzentrifugiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 1 ml kaltem Ethanol (99% p.a.) und Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C für 20 min. Die Überstände

wurden anschließend abgenommen und die Niederschläge mit 1 ml 70%iger Ethanol-Lösung (in aqua dest.) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (13000 rpm, 10 min, RT) wurde der Überstand verworfen und die Niederschläge bei 40°C im Heizblock für 10 min getrocknet. Die DNA wurde schließlich in je 30 µl TE-Puffer resuspendiert.

### Präparativer Maßstab

Im präparative Maßstab wurde Plasmid-DNA aus *E. coli* mit Hilfe des Plasmid Midi Kits von Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert. Zur Isolierung von endotoxinfreier Plasmid-DNA wurde das Endotoxin free Plasmid Maxi Kit von Qiagen verwendet. Die Angaben des Herstellers wurden dabei eingehalten.

### **2.18.2 Isolierung des Virulenzplasmids aus *R. equi***

Die Isolierung des Virulenzplasmids erfolgte ebenfalls mit einem modifizierten „Alkaline Lysis“-Verfahren (Takai et al. 1991). *R. equi* 103(+) wurde hierzu in 100 ml BHI für 48 h kultiviert. Die Bakterien wurden in 50 ml Zentrifugationsröhrchen geerntet (4000 rpm, 30 min) und in 20 ml TE-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation der Bakterien, wurden sie in 3,2 ml Plasmid-Puffer 1 resuspendiert. Nach Zugabe von Lysozym (30 mg/ml Endkonzentration) wurden die Zellen für 4 h bei 37°C inkubiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch Zugabe von 6,4 ml Plasmid-Puffer 2. Die Proben wurden bei leichtem schwenken 10 min bei RT inkubiert, bis die Bakteriensuspension klar wurde. Es folgte eine Fällung der Protein durch Zugabe von 4,8 ml Plasmid-Puffer 3 und Inkubation für 20 min auf Eis. Die gesamte Probe wurde anschließend auf 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und bei 13000 rpm 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in neu Reaktionsgefäße überführt und mit jeweils 500 µl einer Phenol-Choloroform Mischung versetzt. Nach gründlichem Mischen der Proben durch schwenken, wurden sie erneut zentrifugiert (13000 rpm 20 min). Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 750 µl Isopropanol und Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C für 30 min. Die Überstände wurden anschließend abgenommen und die Niederschläge mit 1 ml 70%iger Ethanol-Lösung (in aqua dest.) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (13000 rpm, 10 min, RT) wurde der Überstand verworfen und die Niederschläge bei 40°C im Heizblock für 10 min getrocknet. Die DNA wurde in je 20 µl Tris-Puffer (10 mM, pH 8) resuspendiert und die Proben eines Ansatzes vereinigt. Zur weiteren Konzentrierung der Probe wurde bei Bedarf eine zusätzliche Isopropanol-Fällung durchgeführt.

## 2.19 Molekularbiologische Reaktionen

### 2.19.1 Verwendete Vektoren

Plasmid	Beschreibung	Replikation	Referenz
pBluescript+SK	Amp <sup>R</sup> , LacZ, Klonierungs-Vektor	<i>E. coli</i>	Stratagene
pRE7	Kan <sup>R</sup> , Shuttle-Vektor	<i>E. coli</i> , <i>R. equi</i>	Zheng et al. 1997
pSC301	Hyg <sup>R</sup> , HSP60 <sub>Mtb</sub> -Promotor, Shuttle/Expressions-Vektor	<i>E. coli</i> , <i>R. equi</i>	Herrmann et al. 1996
pEGFP-N1	Neo <sup>R</sup> /Kan <sup>R</sup> , CMV-Promotor, EGFP, Vektor zur Konstruktion von EGFP-Fusionsproteinen	<i>E. coli</i> , Säugerzellen	Clontech
pVK171T	Apr <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Shuttle-Vektor	<i>E. coli</i> , <i>R. equi</i>	Paget und Davies
pPE207	Apr <sup>R</sup> , Shuttle-Vektor	<i>E. coli</i> , <i>R. equi</i>	Paget und Davies
pPvlacZ	Amp <sup>R</sup> , LacZ, Vektor zur Deletion von Genen in <i>R. equi</i>	<i>E. coli</i>	Ren und Prescott 2003

Apr: Apramycin, Amp: Ampicillin, Hyg: Hygromycin, Kan: Kanamycin, Neo: Neomycin

### 2.19.2 Restriktion von DNA

DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen (MBI Fermentas, St. Leon Roth) nach Anleitung und in den Puffern des Herstellers.

### 2.19.3 Ligation

0,05-0,1 pmol Vektor-DNA wurde mit 0,05-0,5 pmol Insert-DNA in einem Ligationsansatz vereinigt. Der Ansatz enthielt außerdem 1/10 Volumen Ligase Puffer und 0,5 U T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas, St. Leon Roth) in einem Endvolumen von 20 µl. Nach Inkubation für 16 h bei 16°C wurde der Ansatz zur Transformation eingesetzt.

### 2.19.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur Amplifikation von ausgewählten Bereichen von Plasmid-DNA durchgeführt. Es wurden jeweils etwa 50 ng DNA, je 15 pmol der beiden PCR-Primer und ein dNTP-Gemisch (Endkonzentration 0,2 mM pro dNTP) eingesetzt. Die MgCl<sub>2</sub>-Endkonzentration betrug 2,5 mM. Die PCR-Reaktionen wurden in einem PCR-Sprint Cycler (Thermo Electron, Oberhausen) mit Deckelheizung durchgeführt. Zur

Amplifikation langer Bereiche (> 5 kBp) des Virulenzplasmids von *R. equi* wurde das *Expand Long Template*-System von Roche (Mannheim) verwendet. Die Angaben des Herstellers wurden eingehalten. Analytische PCR-Reaktionen wurden mit der *Taq*-Polymerase von MBI Fermentas (St. Leon Roth) durchgeführt. Hier wurde ein Puffer des Herstellers mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  aber ohne zusätzliches  $\text{MgCl}_2$  verwendet. Zur Amplifikation von Fragmenten für Klonierungen wurde die *Pfu*-Polymerase von MBI Fermentas (St. Leon Roth) in einem Puffer des Herstellers mit  $\text{MgCl}_2$  verwendet. Folgende PCR-Programme wurden durchgeführt:

#### Long Range

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	2 min	1x
Denaturierung	94°C	30 sec	
Annealing	55°C	30 sec	15x
Elongation	68°C	8 min	
Denaturierung	94°C	30 sec	
Annealing	55°C	30 sec	25x
Elongation	68°C	8 min + 20 sec/Zyklus	
Finale Elongation	68°C	7 min	1x
Kühlung	4°C	unbegrenzt	

#### High Fidelity

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	2 min	1x
Denaturierung	94°C	20 sec	
Annealing	55°C	35 sec	15x
Elongation	70°C	2 min	
Denaturierung	94°C	20 sec	
Annealing	55°C	35 sec	25x
Elongation	70°C	2 min + 20 sec/Zyklus	
Finale Elongation	70°C	7 min	1x
Kühlung	4°C	unbegrenzt	

Touch Down

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	2 min	1x
Denaturierung	94°C	30 sec	
Annealing	65°C	30 sec	6x
Elongation	70°C	8 min	
Denaturierung	94°C	30 sec	
Annealing	65°C –1°C	30 sec	22x
	/Zyklus	8 min	
Elongation	70°C		
Denaturierung	94°C	30 sec	
Annealing	45°C	30 sec	7x
Elongation	70°C	8 min	
Finale Elongation	70°C	7 min	1x
Kühlung	4°C	unbegrenzt	

**2.19.5 Sequenzierung von DNA**

DNA-Sequenzierungen erfolgten durch das Unternehmen GATC (Konstanz).

**2.19.6 Modifizierung von DNA-Strängen**Klenow fill in

Um 5'-Überhänge von DNA-Fragmenten aufzufüllen, wurde eine Klenow-Polymerase-Reaktion durchgeführt. Ein Reaktionsansatz enthielt 100 – 500 ng DNA, ein dNTP-Gemisch (Endkonzentration 0,05 mM pro dNTP), 1/10 Volumen Reaktionspuffer (MBI Fermentas, St. Leon Roth) und 0,5 U Klenow-Polymerase (MBI Fermentas, St. Leon Roth) in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Die Reaktionen wurden für 2 h bei 37°C inkubiert und durch Erhitzen gestoppt (75°C, 10 min). Modifizierte DNA-Fragmente wurden mit dem PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden) gereinigt und anschließend für Ligationen verwendet.

Dephosphorylierung

Vektor-DNA wurde vor einer Ligation mit einer alkalischen Phosphatase behandelt, um Religationen zu minimieren. Ein Reaktionsansatz enthielt 0,05 – 0,1 pmol Vektor-DNA,

1/10 Volumen Reaktionspuffer (MBI Fermentas, St. Leon Roth) und 0,5 U *Calf Intestine Alkaline Phosphatase* (MBI Fermentas, St. Leon Roth) in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Die Reaktion wurde 3 h bei 37°C inkubiert und durch Erhitzen gestoppt (85°C, 10 min). Dephosphorilierte DNA-Fragmente wurden mit dem PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden) gereinigt und anschließend für Ligationen verwendet.

## **2.20 Immunfluoreszenz**

Für alle Immunfluoreszenzanalysen wurden Makrophagen zu einer definierten Dichte am Vortag des Experiments auf 12 mm Deckgläschen in 24-well-Platten ausgesät. Die Zelldichte wurde zur Überprüfung unmittelbar vor der Infektion noch einmal bestimmt (siehe Kapitel 2.7.5).

### **2.20.1 Infektion**

Für Infektionen wurden die Bakterien in der gewünschten MOI zu Zellen gegeben. Anschließend wurden die Makrophagen mit der Bakteriensuspension für 1 h bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nicht aufgenommene Bakterien wurden durch dreimaliges Waschen mit warmen PBS entfernt. Es folgte eine weitere Inkubation der Zellen in frischem DMEM für 2 h bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub>. Betrug die Laufzeit einer Infektion länger als 2 h, wurde dem Medium in der ersten Stunde nach dem Waschen 150 µg/ml Gentamicin zugesetzt und in der darauf folgenden Zeit (z.B. 24 h oder 48 h) 10 µg/ml Gentamicin. Wurden Makrophagen mit Apramycin-resistenten Bakterien infiziert, wurde Gentamicin durch Vancomycin (1 h 5 µg/ml, danach 3 µg/ml) ersetzt. Durch die Behandlung mit Antibiotika sollte sichergestellt werden, dass alle extrazellulären Bakterien abgetötet werden.

### **2.20.2 Fixieren der Proben**

Nach dem Ende der Infektion wurden die Proben einmal mit PBS gewaschen und für 30 min in 3% PFA fixiert. Anschließend wurden die Proben dreimal mit PBS gewaschen und 20 min mit einer NH<sub>4</sub>Cl-Lösung inkubiert. Die Proben wurden bis zur Immunfluoreszenzfärbung bei 4°C in PBS aufbewahrt.

### 2.20.3 Antikörperfärbung

Auf Deckgläschen fixierte Zellen wurden zunächst mit Permeabilisierungspuffer inkubiert (1 h, RT, im Dunkeln). Die Proben wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen und 1 h im Dunkeln mit dem 1. Antikörper (in Permeabilisierungspuffer verdünnt) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS (dreimal) wurden die Proben mit 2. Antikörper inkubiert (1 h, in Permeabilisierungspuffer, im Dunkeln) und danach wieder dreimal mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden schließlich auf Objektträger mit Mowiol oder *Gel Mount* fixiert.

### 2.21 Visualisierung von Lysosomen mit LysoTracker

Das Fluorophor LysoTracker ist eine schwache Base, die bei neutralem pH durch Membranen diffundiert. In einer sauren Umgebung wird das Reagenz protoniert und verliert durch die zusätzliche Ladung die Fähigkeit durch Membranen zu diffundieren. LysoTracker akkumuliert somit in sauren Kompartimenten von Zellen und kann durch Anregung bei 577 nm visualisiert werden (Emission bei 590 nm).

LysoTracker wurde für 15 min zu einer Endkonzentration von 100 nm zu infizierten Zellen gegeben. Bakterien wurden gleichzeitig mit Hilfe einer Syto-Färbung sichtbar gemacht (2.21). Die Proben wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen und auf einem Objektträger mit *Low Melting Point Agarose* fixiert und direkt mit *Laser Scanning* Mikroskopie (2.21) analysiert.

### 2.22 Färbung mit Syto-Green

SYTO-9- und SYTO-13-*Green-Fluorescent Nucleic Acid Stain* sind membrangängige Fluorophore, die an Nucleinsäuren binden. Die Fluoreszenz der Farbstoffe wird durch Bindung von RNA oder DNA verstärkt. Um intrazelluläre Bakterien anzufärben, wurden infizierte Zellen mit Syto-Green-9 oder Syto-Green-13 zu einer Endkonzentration von 2,5  $\mu\text{M}$  für 15-20 min behandelt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Proben mit Mowiol auf Objektträger fixiert.

## 2.23 Laser Scanning Mikroskopie

Die Auswertung von Immunfluoreszenz- sowie mit LysoTracker markierte Proben wurden an einem konfokalen *Laser Scanning* Mikroskop (LSM) durchgeführt. Hierzu wurden mikroskopische Aufnahmen mit dem 63 x /1,4 Ölimmersions-Objektiv in einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixel erstellt. Zur Quantifizierung von Kollokationen wurde die Anzahl kollokalisierender Bakterien pro Bakteriengesamtzahl (in Prozent) bestimmt.

## 2.24 Intrazelluläre Vermehrung von Bakterien

Zur Bestimmung von intrazellulärer Vermehrung wurden J774E- oder primäre Makrophagen wie unter 2.19.1 beschrieben mit einer MOI von 1 infiziert. Nach der Infektion wurden die Zellen 12, 24 und 48 h bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> inkubiert. Bakterien wurden mit Hilfe einer Syto-Färbung (2.20) sichtbar gemacht. Zur Auswertung wurde entweder die Anzahl von Bakterien pro Makrophage oder die Anzahl von infizierten Zellen mit mehr als 10 Bakterien pro Gesamtzahl infizierter Zellen (in Prozent) bestimmt.

## 2.25 Bestimmung der Zytotoxizität

Die Zytotoxizität pathogener Bakterien wurde mit Hilfe eines Laktat-Dehydrogenase-(LDH) Assays quantifiziert. Hierzu wurde die Aktivität des zytoplasmatischen Enzyms im Kulturüberstand der Wirtszellen gemessen. Je mehr Wirtszellen durch Bakterien getötet werden, desto höher ist die LDH Aktivität im Kulturüberstand. Als Bezugswert diente der Kulturüberstand von nicht infizierten Zellen, die durch Triton X-100 lysiert wurden (Maximalwert). Zur Quantifizierung der LDH-Aktivität wurde das Cytotoxicity Detection Kit (Roche) verwendet. Makrophagen wurden wie Kapitel 2.19.1 beschrieben infiziert und 24 h bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> inkubiert. Zwei Proben pro Ansatz wurden nicht infiziert aber gleich behandelt. Eine der nicht infizierten Proben diente als Negativkontrolle. Die Zellen der zweiten nicht infizierten Probe wurden mit Triton x-100 lysiert (1:1). Je 0,5 ml Überstand wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (13000 rpm, 5 min). Für die Messung wurde je 100 µl Probe, 112,5 µl LDH-Reaktionsreagenz und 2,5 µl Katalysator-Reagenz in den Kavitäten einer 96 well Platte vermischt. Die Reaktionen wurden anschließend im Dunkeln für 5 min inkubiert und durch Zugabe von 50 µl einer 1 M HCl-Lösung gestoppt. Die Auswertung der Proben erfolgte durch Messung der Absorption bei 550 nm im ELISA-Reader. Als Blank diente DMEM/FCS das ebenfalls mit

den LDH-Reagenzien versetzt wurde. Um die relative Zytotoxizität zu erhalten, wurden die erhaltenen Werte in Relation zu dem Maximalwert gesetzt und in Prozent angegeben.

## 2.26 FRET-Assay

Um die Fusion von Bakterienenthaltenden Phagosomen mit Lysosomen zu quantifizieren, wurde ein Verfahren durchgeführt, das auf „Fluorescence Resonance Energy Transfer“ (FRET) basiert (Dissertation Becken). FRET ist ein physikalischer Prozess, bei dem Energie eines angeregten Fluoreszenzfarbstoffs (Donor-Fluorophor) strahlungsfrei auf einen zweiten Fluoreszenzfarbstoff (Akzeptor-Fluorophor) übertragen werden kann. Hierzu wird der Donor mit einer geeigneten Wellenlänge angeregt. Wenn FRET vorliegt, erzeugt der Akzeptor eine Emission, die photometrisch bestimmt werden kann. Die Effizienz des Energietransfers und damit die Intensität des FRET hängt stark von der Entfernung der beiden Fluorophore ab. FRET kommt nur bei sehr geringen Abständen (wenige Nanometer) der Fluorophormoleküle zu Stande.

Um die Fusion von Phagosomen mit Lysosomen zu messen, wurden die Lysosomen von Makrophagen mit einem roten Fluorophor (Rhodamin) markiert. Hierzu wurden J774E-Zellen auf 12 *well* Schalen ausgesät (ca.  $4 \times 10^5$  Zellen pro *well*) und zwei Tage bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurde den Zellen 45 µg/ml BSA-Rhodamin zugegeben und 1 h bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> inkubiert. Je zwei Proben pro Ansatz wurden nicht mit BSA-Rhodamin versetzt (1 Probe als Blank, 1 Probe als „nur grün“). Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit warmen PBS wurden die Makrophagen 2 h bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit ATTO488 markierten Bakterien (2.10.2) für 30 min bei einer MOI von 30 infiziert. Je zwei Proben wurden nicht mit Bakterien infiziert (1 Probe als Blank, 1 Probe als „nur rot“). Nicht aufgenommene Bakterien wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Nach 1,5 h Inkubation bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> in DMEM/FCS wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und danach mit 1 ml kaltem PBS/5 mM EDTA vom Schalenboden gespült. Nach Überführen in 1,5 ml Reaktionsgefäße wurden die Makrophagen in einem Ausschwingrotor bei 1200 rpm pelletiert (5 min, 4°C) und in je 200 µl PBS aufgenommen. Je 190 µl einer Probe wurden in eine 96 *well* Schale pipettiert und die Fluoreszenz in einem ELISA-Fluorometer gemessen. Folgende Einstellungen wurden dabei verwendet:

	Grün	Rot	FRET
Anregung	485 nm	560 nm	485 nm
Detektion	516 nm	635 nm	635 nm

Messwerte im FRET-Kanal wurden mit Hilfe der Werte aus den Kontrollproben („nur grün“ und „nur rot“) korrigiert und in Verhältnis zu den Werten aus dem Grün-Kanal gesetzt (FRET-Signal pro Menge eingesetzter Bakterien). Als Blank dienten nicht infizierte Zellen, die nicht mit BSA-Rhodamin markiert wurden.

## 2.27 Transmissionselektronenmikroskopie

Proben gereinigter Phagosomen wurden mit 2% PFA/0,25% Glutaraldehyd in PBS für 2 h fixiert. Anschließend wurden die Proben dreimal mit 0,1 M Cacodylat gewaschen und für 90 min bei 4°C in 1,5% Kaliumferricyanid und 1% Osmiumtetroxid in Aqua dest. kontrastiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Aqua dest. wurden die Proben mit 5% Uranylacetat in Aqua dest. für 120 min bei 4°C inkubiert und anschließend 3 min in Aqua dest. gewaschen. Nach 30 minütiger Inkubation der Proben in 0,1% Tanninsäure in Aqua dest. bei RT wurden die Proben einmal in Aqua dest. gewaschen und durch Inkubation in aufsteigenden Konzentrationen Ethanol dehydriert (Ethanol 70%, 90%, 100% [Molekularsieb] je 2 x 5 min). Die Phagosomen wurden dann in 100% Ethanol vom Boden der Zellkulturplatten geschabt und in Propylenoxid aufgenommen. Nach erneutem Waschen in Propylenoxid wurden die Proben über Nacht in Epon/Propylenoxid (1:1) inkubiert und anschließend in Been-Kapseln überführt. Zur Einbettung der Proben wurden die Phagosomen in Epon (1 ml Epon, 20 µl Beschleuniger) aufgenommen, über Nacht bei RT, dann 2-3 Tage bei 60°C inkubiert. Anschließend wurden Ultradünnschnitte hergestellt, welche auf Grids gebracht wurden und mit dem Philips CM 120 Transmissionselektronenmikroskop betrachtet werden konnten.

## 2.28 Transfektion

Zur Transfektion wurden Raw264.7-Makrophagen verwendet. Die Zellen wurden am Vortag der Transfektion subkultiviert, um eine optimale Wachstumsphase für die Transfektion zu gewährleisten. Die Raw264.7-Makrophagen wurden in DMEM ohne FCS geerntet und die Zellzahl bestimmt. Pro Transfektionsansatz wurden  $5 \times 10^6$  Zellen in einem ml hypoosmolarem Elektroporationspuffer aufgenommen und mit 30 µg Plasmid-DNA versetzt. 800 µl der Zellsuspension wurden in eine Elektroporationsküvette mit 4 mm Spaltbreite überführt und mit 570 V für 50 µs elektroporiert. Die Zellen wurden 5-10 min bei RT inkubiert, in DMEM/FCS aufgenommen und mit einer Dichte von  $3 \times 10^5$  Zellen pro well auf Deckgläschen einer 24-well- Platte gebracht wurden.

## 2.29 Transformation

### 2.29.1 Herstellung kompetenter *E. coli*

Mit einer Einzelkolonie des *E. coli*-Stammes DH5 $\alpha$  wurden 2 ml LB-Flüssigmedium angeimpft und über Nacht auf einem Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. 200 ml LB-Medium wurden der Vorkultur inokuliert und bei 37°C und 200 rpm inkubiert, bis sich die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase befanden ( $OD_{600} = 0,3-0,5$ ). Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Kultur wurde 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend in 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach Zentrifugation der Bakteriensuspension (3000 rpm, 4°C, 10 min) wurden die erhaltenen Pellets in je 2,5 ml 0,1 M MgCl<sub>2</sub> resuspendiert und vereinigt. Die Bakterien wurden erneut zentrifugiert (3000 rpm, 4°C, 10 min) und anschließend in 20 ml einer 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen. Nach einer 20 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen zentrifugiert (3000 rpm, 4°C, 10 min) und das Pellet in 2,5 ml einer 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung mit 15% Glycerin (v/v) resuspendiert und bis zur Verwendung als 100  $\mu$ l Aliquots bei -80°C gelagert.

### 2.29.2 Transformation kompetenter *E. coli*

Es wurde ein 100  $\mu$ l Aliquot pro Transformation verwendet. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in ein 12 ml Schnappdeckelröhrchen überführt. Der Bakteriensuspension wurde DNA zugegeben (5  $\mu$ l eines Ligationsansatzes oder 0,1–1 ng Plasmid-DNA) und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte durch Hitzeschock der Zellen für 45 sec bei 42°C im Wasserbad. Die Bakterien wurden anschließend 2 min auf Eis abgekühlt und mit 1 ml flüssigem LB-Medium versetzt. Nach Regeneration für 30 min bei 37°C und 200 rpm wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

### 2.29.3 Herstellung kompetenter *R. equi*

Aus einer 2 ml *R. equi* 103(-) Übernachtkultur (BHI, 37°C 200 rpm) wurden 100 ml BHI-Medium inokuliert. Die Bakterien wurden bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5-0,7 bei 37°C und 200 rpm kultiviert. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Bakteriensuspension in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und pelletiert (4000 rpm, 30 min, 4°C). Anschließend wurden die Bakterien dreimal mit eiskaltem 10%igem Glycerin (v/v) gewaschen. Die Pellets wurden vereint, in 1 ml 10% Glycerin aufgenommen und in 100  $\mu$ l Aliquots bei -80°C gelagert.

#### **2.29.4 Transformation von *R. equi***

Je 100 µl kompetenter *R. equi* wurden in einem Reaktionsgefäß mit 0,5-1 µg Plasmid-DNA versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien-DNA-Suspension wurde in eine BioRad Elektroporationsküvette mit 2 mm Spaltbreite überführt und im Ec2-Modus des Elektroporators transformiert. Die transformierten Zellen wurden durch Zugabe von 1 ml kaltem BHI-Medium abgekühlt und in 12 ml Schnappdeckelröhrchen überführt. Die Bakterien wurden für 1 h bei 37°C, 220 rpm kultiviert und anschließend auf BHI-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

### 3. Ergebnisse

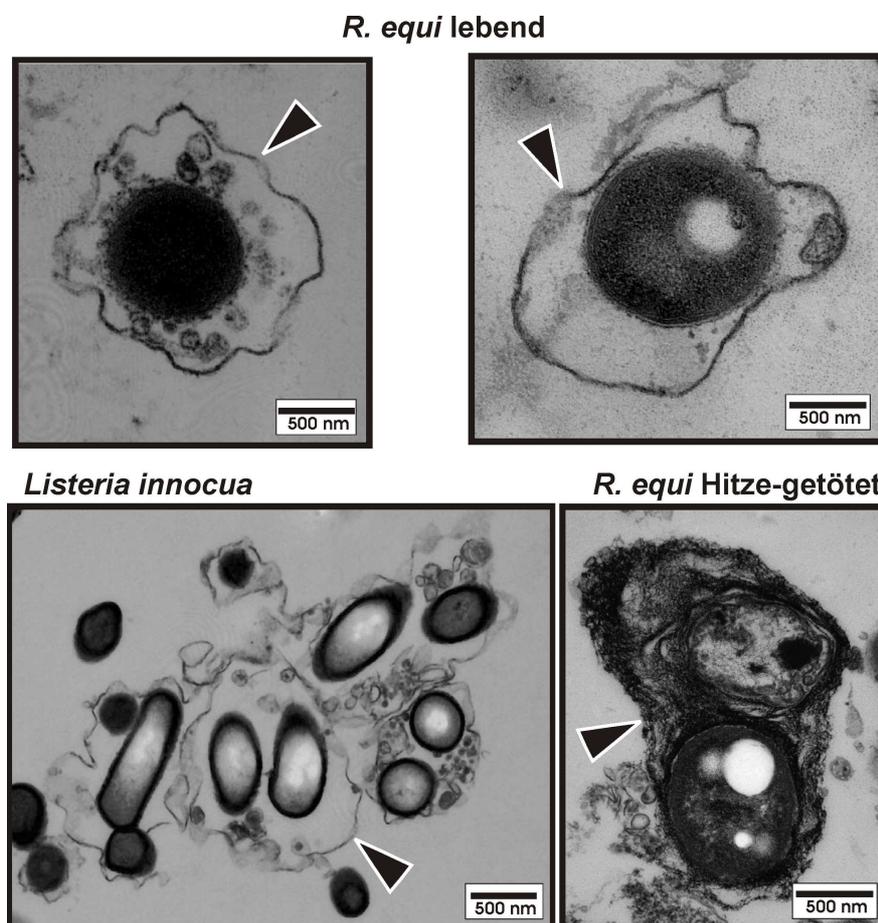
#### 3.1. Analyse von *Rhodococcus equi*-enthaltenden Phagosomen

Fluoreszenzmikroskopische Analysen in diesem Labor haben nahegelegt, dass *R. equi*-enthaltende Phagosomen die frühen Stadien der Endosomenreifung durchlaufen und spätendosomale Charakteristika erhalten. Sie fusionieren jedoch nicht mit Lysosomen, akquirieren keine vATPase und säuern nicht an (Fernandez 2005). Die Unterschiede in der Phagosomenreifung zwischen virulenten (*R. equi*(+)) und avirulenten (*R. equi*(-)) *R. equi* sind allerdings relativ klein, sodass die Rolle des Virulenzplasmids und die Mechanismen der veränderten Phagosomenreifung unklar blieben. Eine noch detailliertere Analyse der Phagosomen erforderte deren Isolierung aus infizierten Zellen, vor allem da viele Antikörper gegen Wirtszellproteine mit *R. equi* kreuzreagieren und damit für Immunfluoreszenz-Analysen ungeeignet sind. Darüber hinaus erlauben die gereinigten Phagosomen einen Vergleich der Konzentration akquirierter Wirtszellproteine zwischen virulenten und avirulenten Rhodokokken und bieten eine unabhängige Analyseverfahren.

Zur Isolierung *R. equi*-enthaltender Phagosomen wurde die Methode von Lührmann und Haas (2001) angewandt. Als Kontrollen dienten „Pseudophagosomen“ aus nicht infizierten Zellen und Phagosomen, die das apathogene Bakterium *Listeria innocua* oder durch Hitze getötete *R. equi*(+) enthielten. *Listeria innocua*-enthaltende Phagosomen reifen zu Phagolysosomen und dienen damit zusätzlich zu getöteten Rhodokokken als Positivkontrolle. J774E-Makrophagen wurden eine Stunde mit den jeweiligen Bakterien infiziert. Nach Entfernen nicht aufgenommener Bakterien wurden die Makrophagen weitere zwei Stunden inkubiert und anschließend aufgeschlossen. Die Isolierung der Phagosomen erfolgte mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation (Kapitel 2.11). Gereinigte Phagosomen wurden mittels Western-Blot-Analyse auf ihre Kompartimentierung hin untersucht. Durch Messung der Aktivität der sauren  $\beta$ -Galactosidase wurde die lysosomale Enzymaktivität in den Phagosomen bestimmt. Um die Integrität der isolierten Phagosomen zu überprüfen, wurden Ultradünnschnitte angefertigt und transmissions-elektronenmikroskopisch untersucht.

### 3.1.1. Elektronenmikroskopische Darstellung isolierter Phagosomen

Phagosomen, die entweder *R. equi*(+), Hitze-getötete *R. equi*(+) oder *L. innocua* enthielten wurden isoliert und für die Transmissionselektronenmikroskopie präpariert. Abbildung 3 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen von isolierten Phagosomen. Phagosomen mit *R. equi*(+)- und *L. innocua* enthielten oft interne Vesikel, die auch in Präparationen kompletter infizierter Makrophagen beobachtet wurden (Dissertation Fernandez 2005). Phagosomen, die getötete Rhodokokken enthielten, erschienen meist sehr elektronendicht (Abb. 2) und multilamellar, wie es für Lysosomen charakteristisch ist. Diese Form wurde bei Präparationen von *L. innocua* ebenfalls beobachtet, jedoch weniger oft. Obwohl viele *R. equi*-enthaltende Phagosomen intakt waren, wurden in diesen Proben mehr Bakterien ohne Phagosomenmembran beobachtet als bei *L. innocua* (nicht gezeigt).

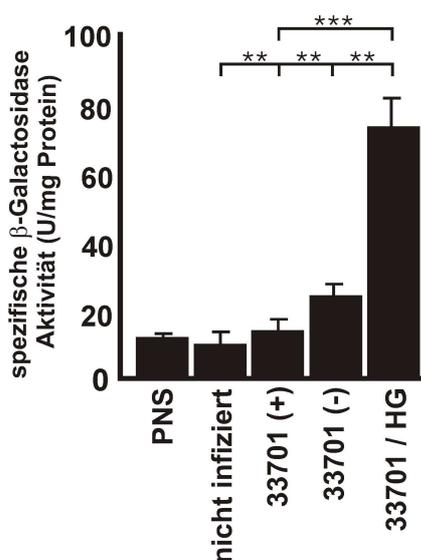


**Abb. 3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen isolierter Phagosomen**

Phagosomen wurden nach 2 h Infektion mit Bakterien aus J774E-Makrophagen isoliert, fixiert und Ultradünnschnitte für die Mikroskopie hergestellt. Es wurden *R. equi* 33701(+) lebend, *R. equi* 33701(+) Hitze-getötet und *L. innocua* verwendet. Pfeilköpfe zeigen auf phagosomale Membranen.

### 3.1.2. Bestimmung der lysosomalen Enzymaktivität in isolierten Phagosomen

Zur Charakterisierung der Phagosomen wurde zunächst deren Inhalt an lysosomaler saurer  $\beta$ -Galactosidase bestimmt. Die spezifische Enzymaktivität wurde in Phagosomen aus nicht infizierten Zellen (Pseudophagosomen), aus mit *R. equi* 33701(+), *R. equi* 33701(-) und mit Hitze-getöteten *R. equi* 33701(+) infizierten Zellen sowie im PNS (post nukleärer Überstand) gemessen. Die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität in *R. equi*(+)-enthaltenden Phagosomen war mit durchschnittlich 15,3 U/mg Protein kaum höher als die Aktivität in der Negativkontrolle (Abb. 4; 11,1 U/mg; nicht infiziert). Die hohe spezifische Aktivität in Phagosomen mit getöteten Bakterien lässt auf eine normale Phagolysosomenbiogenese dieser Phagosomen schließen. Die  $\beta$ -Galactosidase Aktivität in Phagosomen mit *R. equi*(-) war im Vergleich zu der *R. equi*(+)-enthaltender Phagosomen signifikant erhöht (Abb. 4). Demnach wird der Ausschluss des lysosomalen Enzyms von *R. equi*-enthaltenden Phagosomen durch das Virulenzplasmid verstärkt.



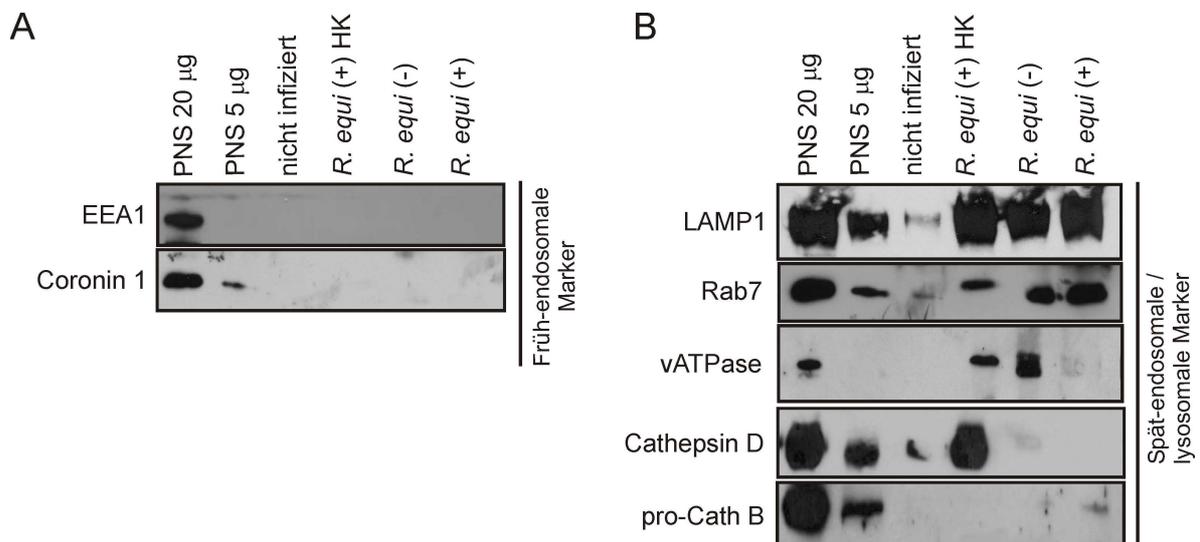
**Abb. 4: Spezifische  $\beta$ -Galactosidase-Aktivitäten in isolierten Phagosomen**

Spezifische  $\beta$ -Galactosidase-Aktivitäten wurden in PNS, Pseudophagosomen (nicht infiziert) und *R. equi*-enthaltenden Phagosomen mit 33701(+), (-) oder Hitze-getöteten (33701+)/HG Bakterien bestimmt. Dargestellt sind die spezifischen  $\beta$ -Galactosidase-Aktivitäten sind Einheiten/mg Protein als Mittelwert aus 4 unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mittels T-Test (zwei-seitig, ungleiche Varianzen) ermittelt und sind angegeben als \*\*0,05  $\geq$  p > 0,005; \*\*\* 0,005  $\geq$  p.

### 3.1.3. Analyse *R. equi*-enthaltender Phagosomen mittels Western-Blot

Um die Reifung *R. equi*-enthaltender-Phagosomen genauer zu untersuchen, wurden sie auf ihren Gehalt an verschiedenen Wirtszellproteinen hin untersucht. Phagosomale Proteine aus primären Makrophagen (5 µg/Spur) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Die Membranen wurden mit verschiedenen Antikörpern gegen Proteine des endozytischen Systems markiert und mittels Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Um Anreicherungen oder Verluste von Markern in Phagosomen-Präparationen einschätzen zu können, wurden zusätzlich jeweils 5 µg und 20 µg des Ausgangsmaterials (PNS) aufgetragen.

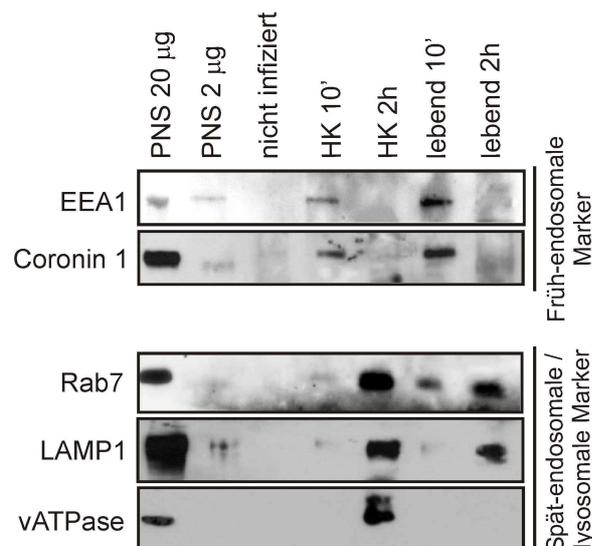
Nach 2 Stunden Infektion wurden in keiner Phagosomenfraktion die frühendosomalen Marker EEA-1 und Coronin1 (TACO) gefunden (Abb. 5 A). In Übereinstimmung mit Immunfluoreszenz-Analysen wurde in allen Proben LAMP1 gefunden (Abb. 5 B). Das spätendosomale Protein Rab7 wurde ebenfalls in allen Proben angereichert. Phagosomen, die lebende Rhodokokken enthielten, reicherten mehr Rab7 an als Phagosomen mit toten Bakterien. Die vATPase war auf Phagosomen mit lebenden *R. equi*(+) nur in Spuren nachweisbar, während Phagosomen mit *R. equi*(-) und Hitzegetöteten Bakterien diesen Marker akquirierten. Die unreife, 46 kDa große Form des CathepsinD war ausschließlich in Phagosomen mit getöteten Bakterien zu finden, während Pro-CathepsinB in keiner der Proben gefunden wurde (Abb. 5 B).



**Abb. 5: Western-Blot Analyse isolierter Phagosomen**

Aus primären Makrophagen wurden nach 2 h Infektion Phagosomen mit *R. equi*(+), (-), Hitzegetöteten *R. equi*(+) (HK) und Pseudophagosomen (nicht infiziert) isoliert und im SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulose wurden ausgesuchte Wirtszellproteine mit Antikörpern detektiert. Es wurde je 20 µg und 5 µg des Ausgangsmaterials (PNS) sowie je 5 µg der jeweiligen phagosomalen Fraktion aufgetragen. Dargestellt ist je ein repräsentatives Ergebnis aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. A: frühe endosomale Marker, B: spät endosomale Marker.

Durch Immunfluoreszenz-Analysen konnte eine transiente Akquisition von frühendosomal Proteinen auf *R. equi*-enthaltenden Phagosomen nachgewiesen werden (Fernandez 2005). Zur Verifizierung dieser Daten wurden Phagosomen isoliert, die entweder 10 Minuten oder 2 Stunden alt waren. Nach 10 Minuten Infektion sollten hauptsächlich früh-endosomale Marker, nach 2 Stunden überwiegend spät-endosomale Marker auf Phagosomen zu finden sein. J774E Makrophagen wurden mit lebenden oder getöteten *R. equi*33701(+) infiziert und isolierte Phagosomen mittels Western-Blot Analyse untersucht. Die Western-Blot Analyse der Phagosomen zeigte, dass die früh-endosomal Proteine EEA1 und Coronin1 nach 10 Minuten auf Phagosomen angereichert wurden. Nach 2 Stunden waren diese Marker wie erwartet nicht mehr detektierbar (Abb. 6). LAMP1 war nach 2 Stunden in Phagosomen mit lebenden und toten *R. equi*(+) gleichermaßen nachweisbar. Die vATPase wurde im Gegensatz zu Phagosomen mit toten Bakterien bei lebenden *R. equi*(+) nach 2 Stunden nicht gefunden (Abb. 6). Diese Ergebnisse stimmten mit den Immunfluoreszenz-Analysen von *R. equi*-enthaltenden Phagosomen überein.

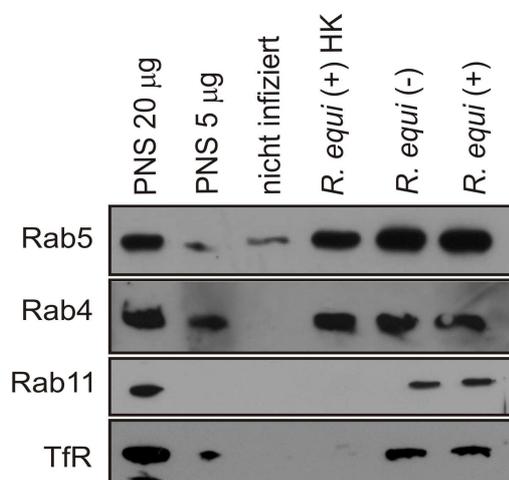


**Abb. 6: Kinetische Analyse von *R. equi*-enthaltende Phagosomen**

J774E-Makrophagen wurden für 10 min oder 2 h mit lebenden oder Hitze-getöteten (HK) *R. equi* 33701(+) infiziert und die Phagosomen aus diesen Zellen gereinigt. Je 20 µg und 2 µg des Ausgangsmaterials (PNS) und je 2 µg phagosomale Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Ausgesuchte Wirtszellproteine wurden mit Antikörpern detektiert. Zur Kontrolle wurden 2 µg Protein von Pseudophagosomen aus nicht infizierten Zellen aufgetragen (nicht infiziert).

In Präparationen *R. equi*-enthaltender Phagosomen wurden große Mengen Rab5 gefunden. Zusätzlich wurden in diesen Proben Rab4, Rab11 und TfR angereichert (Abb. 7). Dieser Befund stand im Gegensatz zu Immunfluoreszenz basierten Studien, die eine Abwesenheit dieser Proteine von *R. equi*-enthaltenden Phagosomen 2 Stunden nach

einer Infektion zeigte (Fernandez 2005). Der Grund für diese Diskrepanz lag entweder in der Sensitivität der Immunfluoreszenz-Analysen, in der Kontamination mit nicht phagosomalen Organellen oder in einer artifiziellen Anreicherung der Proteine während der Phagosomen-Präparation.



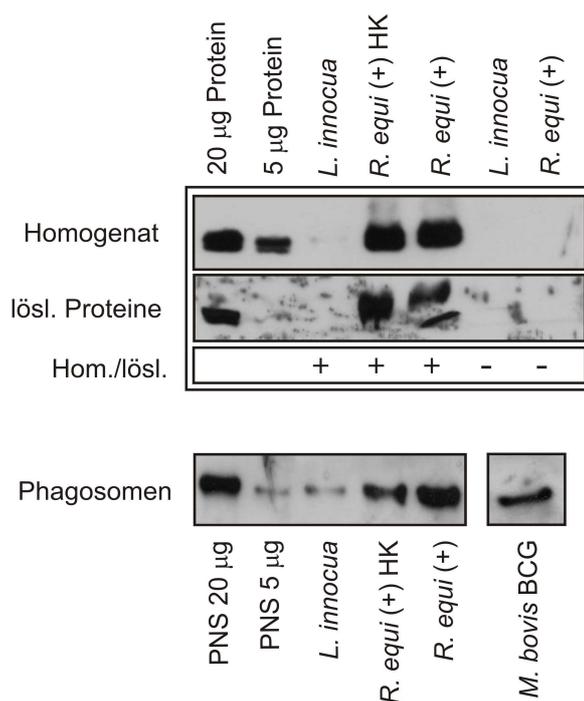
**Abb. 7: Assoziation von isolierten Phagosomen mit früh endosomalen Markern.**

Aus J774E-Makrophagen wurden nach 2 h Infektion Phagosomen mit *R. equi*(+), (-), Hitzegetöteten *R. equi*(+) und Pseudophagosomen (nicht infiziert) isoliert und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulose wurden ausgesuchte Wirtszellproteine mit Antikörpern detektiert. Es wurde je 20 µg und 5 µg des Ausgangsmaterials (PNS) sowie je 5 µg der jeweiligen phagosomalen Fraktion aufgetragen. Dargestellt ist je ein repräsentatives Ergebnis aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. TfR: Transferrin Rezeptor

Um zu klären, ob Wirtszellproteine möglicherweise direkt mit Bakterien assoziieren, wurde zunächst ein Homogenat aus nicht infizierten Zellen hergestellt (PNS). Zu diesem Homogenat wurden entweder *Listeria innocua*, lebende oder durch Hitze getötete *R. equi* 33701(+) gegeben und 10 Minuten bei 37° inkubiert. Anschließend wurden mit diesen Proben eine Phagosomen-Präparation durchgeführt, um die Bedingungen einer normalen Phagosomenisolierung zu rekonstruieren. Während der Präparation wurden nur Bakterien anstatt Phagosomen isoliert, die anschließend im Western-Blot auf die Anwesenheit verschiedener Wirtszellproteine hin untersucht wurden.

In Präparationen mit *R. equi* wurde deutlich Rab5 angereichert (Abb. 8, Homogenat). Eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit *R. equi* war ausgeschlossen, da unbehandelte Bakterien im Western-Blot kein Signal produzierten. In Proben mit *L. innocua* war kein Rab5 nachweisbar. Die Interaktion des Proteins mit Bakterien war demnach auf *R. equi* beschränkt. Neben Rab5 konnte auch eine Interaktion von Rab4, Rab11 und TfR mit *R. equi* beobachtet werden (nicht gezeigt). Zur Kontrolle wurden die Proben auch auf die

Anwesenheit von Rab7, LAMP1, vATPase, EEA-1 und Coronin1 überprüft. Eine Interaktion von Rhodokokken mit diesen Proteinen wurde nicht gefunden (nicht gezeigt). In einem zweiten Ansatz wurden von einem Zellhomogenat nicht infizierter Zellen durch Ultrazentrifugation eine membranfreie lösliche Fraktion hergestellt. Zu dieser löslichen Fraktion wurden anschließend wieder *L. innocua*, lebende und tote *R. equi*(+) gegeben. Nach Pelletierung und Waschen der Bakterien wurden sie ebenfalls im Western-Blot auf die Anwesenheit von Rab5 hin analysiert. Die Behandlung von lebenden oder toten Rhodokokken mit löslichen Proteinen der Makrophagen resultierte in einer direkten Bindung von Rab5 (Abb. 8; lösliche Proteine). Vermutlich handelte es sich dabei um inaktives Rab5, das in einer GDP-gebundenen Form komplexiert an GDI im Zytosol der Zelle vorliegt. Die Eigenschaft von *R. equi*, Rab5 zu binden ist nicht von der Anwesenheit des Virulenzplasmids abhängig (nicht gezeigt). Dieses Ergebnis lässt auf eine direkte Bindung sowohl von lebenden als auch von toten *R. equi* an Rab5 schließen. Aufgrund dieser Daten wurden die Marker Rab5, Rab4, Rab11 und TfR für die Analyse der Kompartimentierung von *R. equi* nicht berücksichtigt.



**Abb. 8: *R. equi* bindet Rab5 aus Wirtszellhomogenat und Zytosol**

Je  $10^9$  Bakterienzellen von *L. innocua*, lebende oder Hitze getötete (HK) *R. equi* 33701(+) wurden mit einem J774E-Homogenat oder einer löslichen Fraktion des Homogenats (lösl. Proteine) vermischt und anschließend einer Phagosomen-Präparation unterzogen. Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit einem Rab5-Antikörper markiert. Es wurden jeweils 20 µg und 5 µg Homogenat oder lösliches Protein von uninfizierten Makrophagen zur Kontrolle aufgetragen. Von den Präparationen und unbehandelten Bakterien wurden je 5 µg Protein aufgetragen. „Hom/lösl.“ zeigt an, welche Proben mit Homogenat oder löslichem Protein behandelt wurden (+) oder nicht (-). Zum Vergleich wurden Phagosomen aus infizierten J774E Makrophagen mit je 5 µg Protein aufgetragen (unten).

Da bekannt war, dass Mycobakterien-enthaltende Phagosomen Rab5 akkumulieren (Russell et al. 2001), sollte überprüft werden, ob auch *Mycobacterium bovis* BCG zur direkten Bindung von Rab5 fähig ist. Während *M. bovis*-BCG-enthaltende Phagosomen Rab5 akkumulierten (Abb. 8), konnte keine direkte Bindung des Proteins an Mykobakterien nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

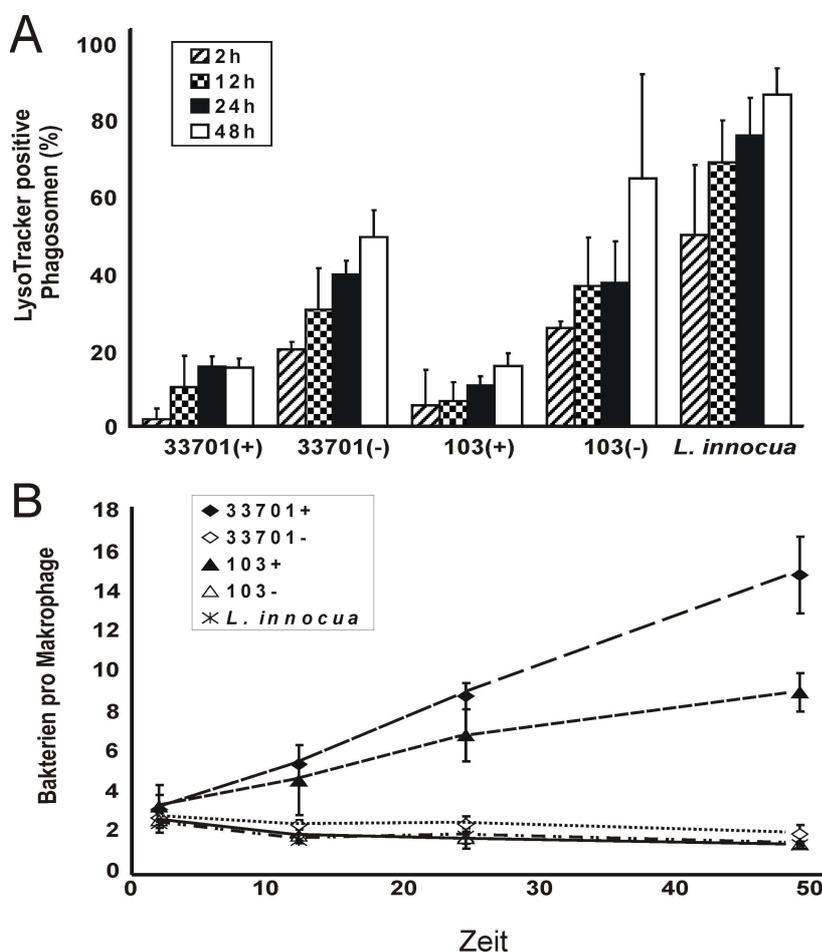
### **3.2. Intrazelluläre Vermehrung von *Rhodococcus equi***

#### **3.2.1. *R. equi* vermehrt sich in einem nicht-sauren Kompartiment**

Die vATPase sorgt während der Phagosomenreifung für eine Ansäuerung des Phagosomenlumens. Würde dieser Proteinkomplex ausgeschlossen, fände vermutlich nur eine schwache Ansäuerung von Phagosomen statt. Tatsächlich wurde eine fehlende Phagosomen-Ansäuerung zwei Stunden nach einer Infektion mit *R. equi*(+) beobachtet (Dissertation Fernandez 2005). Ob *R. equi*(+) auch über einen längeren Zeitraum die Ansäuerung der Phagosomen inhibieren kann, war unbekannt. Um die Frage zu klären, ob *R. equi* sich in einem sauren oder nicht sauren Kompartiment vermehrt, wurden primäre Makrophagen mit *L. innocua*, *R. equi* 33701 und *R. equi* 103 jeweils mit oder ohne Virulenzplasmid infiziert und 2, 12, 24 und 48 Stunden inkubiert. Die Proben wurden nach den jeweiligen Zeiten mit dem Fluorophor LysoTracker behandelt, der bevorzugt in sauren Kompartimenten akkumuliert (pH<5.8). Bakterien wurden mit SYTO9 sichtbar gemacht, das Nukleinsäuren anfärbt. Die Auswertung der Proben erfolgte an einem konfokalen Laser-scan Mikroskop.

In Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen (Fernandez 2005) kolokalisierten nach 2 Stunden nur 5 bis 10% aller *R. equi*(+)-enthaltenden Phagosomen mit LysoTracker. Die Anzahl an LysoTracker positiven *R. equi*(+)-enthaltenden Phagosomen stieg über die Zeit nur leicht an und erreichte auch nach 48 Stunden maximal 20% (Abb. 9 A). Phagosomen die *R. equi*(-) enthielten waren nach 2 Stunden zu etwa 20% positiv für LysoTracker. Die Anzahl saurer *R. equi*(-)-Phagosomen stieg über die Zeit an und erreichte nach 48 Stunden einen Maximalwert von über 80% (Abb. 9 A). Die Stammpaare 33701 und 103 verhielten sich dabei nahezu identisch. Phagosomen, die das apathogene Gram-positive Bakterium *L. innocua* enthielten, kolokalisierten zu allen untersuchten Zeiten häufig mit LysoTracker (50-90%, Abb. 9 A). Die Ergebnisse zeigen, dass *R. equi*(+) die Ansäuerung seiner Phagosomen verhindert und diesen Zustand über einen Zeitraum von mindestens 48 Stunden aufrecht erhalten kann. In den selben Proben wurde gleichzeitig die Anzahl intrazellulärer Bakterien bestimmt. Während die Anzahl von Bakterien pro Makrophage

bei *L. innocua* und *R. equi*(-) über die Zeit leicht abnahm, war eine deutliche Vermehrung von *R. equi*(+) in Zellen zu erkennen (Abb. 9 B).

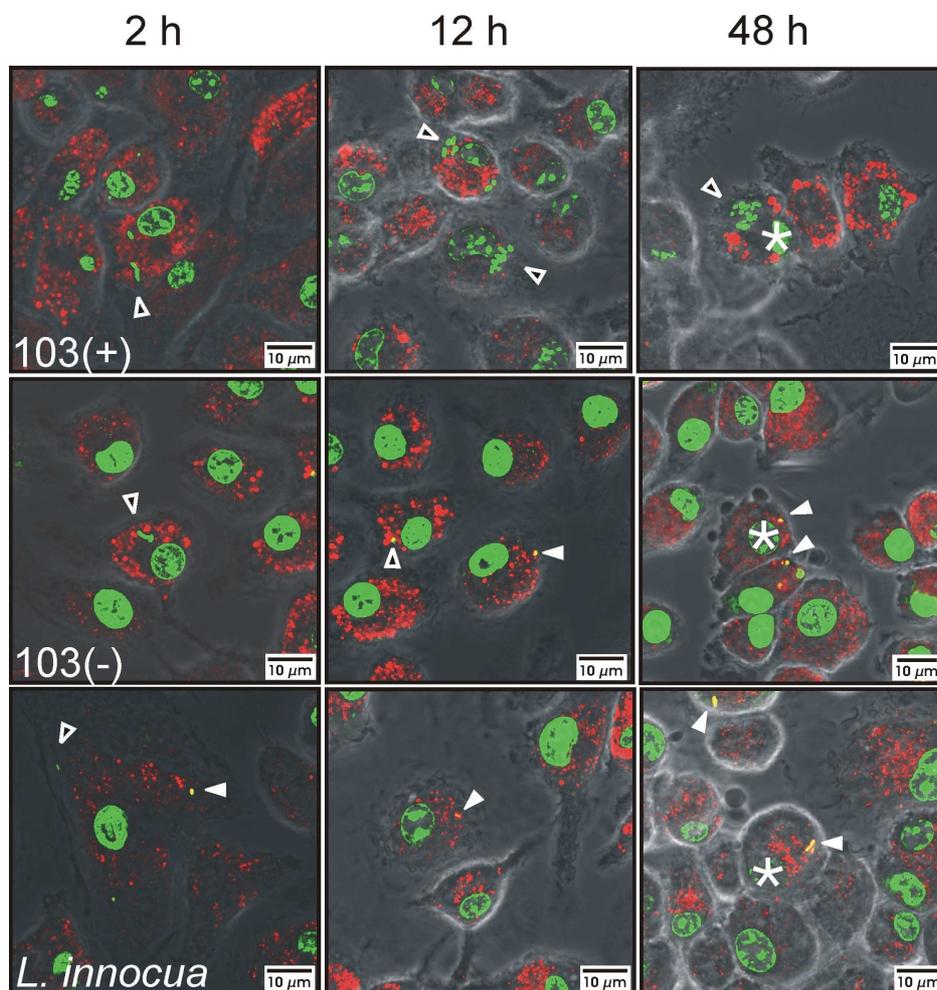


**Abb. 9: Virulenzplasmidhaltige Rhodokokken vermehren sich in einem nicht-sauren Kompartiment.**

Primäre Makrophagen wurden mit *L. innocua*, *R. equi*33701(+) oder (-) und *R. equi*103(+) oder (-) mit einer MOI von 1 für 30 min infiziert und weitere 2, 12, 24 und 48 h inkubiert. (A) Infizierte Zellen wurden mit LysoTracker und SYTO9 behandelt und anschließend für die Mikroskopie verwendet. Kolokalisations-Häufigkeiten zwischen LysoTracker und Bakterien wurden mittels Epifluoreszenz-Mikroskopie quantifiziert. Angegeben sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Es wurden pro Ansatz und Probe mindestens 40 infizierte Makrophagen ausgewertet. Statistische Signifikanzen (t-Test, 2-seitig, ungleiche Varianzen) für Werte bei 48 h betragen: 33701(+) versus 33701(-),  $p = 0,008$ ; 103(+) versus 103(-),  $p = 0,09$ ; 33701(+) versus *L. innocua*,  $p = 0,001$ ; 33701(-) versus *L. innocua*,  $p = 0,003$ ; 103(+) versus *L. innocua*,  $p = 0,0006$ ; 103(-) versus *L. innocua*,  $p = 0,3$ . (B) SYTO9 gefärbte Bakterien wurden gezählt und die Gesamtzahl intrazellulärer Bakterien durch die Anzahl infizierter Zellen geteilt. Die durchschnittlichen Anzahlen von Bakterien pro infizierten Makrophagen wurde gegen die Infektionsdauer aufgetragen. Angegeben sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Es wurden pro Ansatz und Probe mindestens 40 infizierte Makrophagen ausgewertet.

Die Vermehrung der Bakterien erschien innerhalb der Wirtszellen in Form von Mikrokolonien (Abb. 10, 103(+), 12 h und 48 h) und somit wahrscheinlich innerhalb großer

kommunaler Vakuolen (vgl. Fernandez 2005). Sowohl für die Hemmung der Phagosomenansäuerung als auch für intrazelluläre Vermehrung war die Anwesenheit des Virulenzplasmids erforderlich. Die Infektionsrate blieb über die beobachtete Zeit bei etwa 10% konstant (nicht gezeigt).



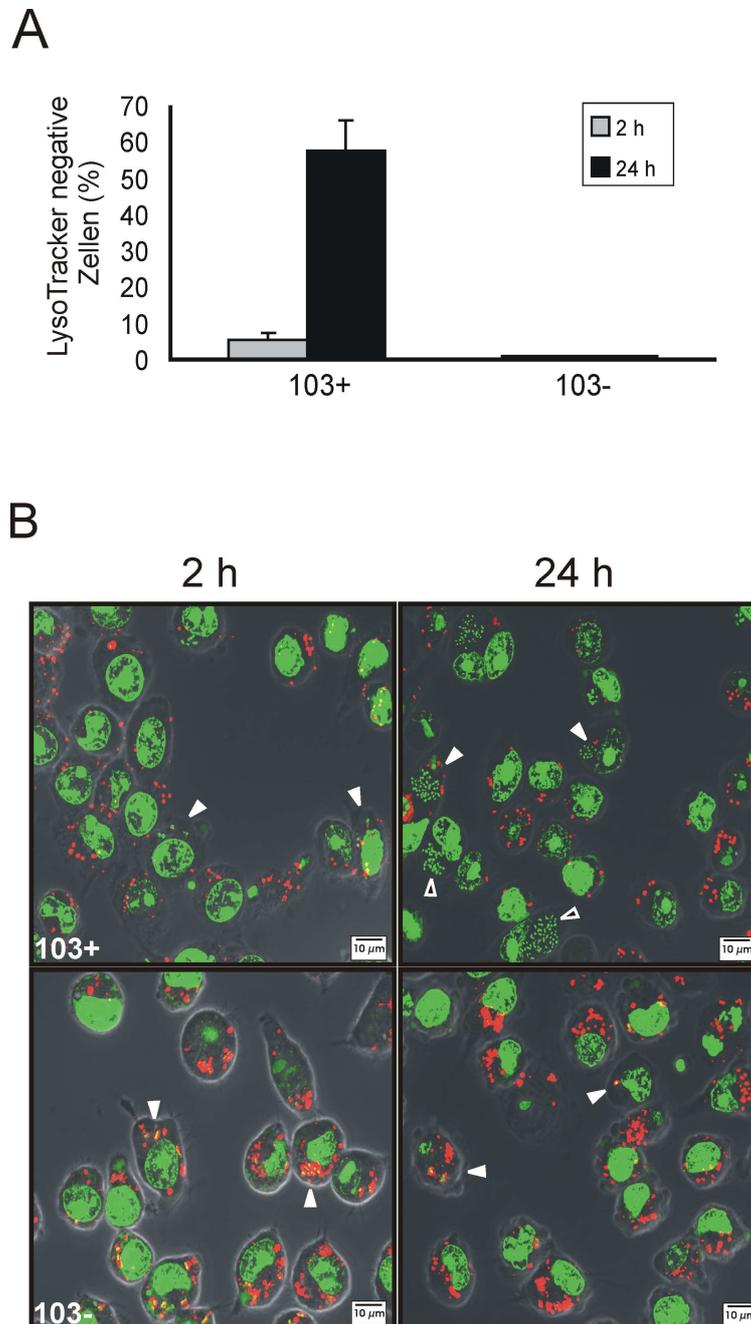
**Abb. 10: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zum Nachweis von *R. equi*(+) in nicht sauren Kompartimenten**

Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen der Experimente aus Abb.9. Die Aufnahmen zeigen primäre Makrophagen, die mit *R. equi*103(+), (-) oder *L. innocua* infiziert und für 2, 12 und 24 h inkubiert wurden. Mit SYTO9 gefärbte Bakterien und Zellkerne sind in grün, LysoTracker in rot dargestellt. Offene Pfeilköpfe zeigen nicht saure, geschlossene Pfeilköpfe auf saure Phagosomen. Sterne zeigen mit SYTO9 gefärbte Zellkerne.

### 3.2.2. Die intrazelluläre Vermehrung von *Rhodococcus equi*(+) führt zu einem Verlust saurer Kompartimente in J774E-Makrophagen

Während der Auswertung der in 3.2. gezeigten Experimente wurde ein auffälliger Verlust des LysoTracker-Signals nach 24 und 48 Stunden in Zellen beobachtet, in denen *R. equi*

sich stark vermehrt hatte. Zur genaueren Analyse dieser Beobachtung wurden J774E-Zellen mit *R. equi*103(+) oder (-) infiziert und anschließend 2 und 24 Stunden inkubiert. Zur Auswertung wurde der Anteil infizierter Zellen ohne jegliches LysoTracker-Signal aus der Gesamtzahl infizierter Zellen ermittelt.



**Abb. 11: Verlust von LysoTracker positiven Kompartimenten nach intrazellulärer Vermehrung**

(A) J774E-Makrophagen wurden mit *R. equi*103(+) oder (-) infiziert, für 2 h und 24 h inkubiert und mit LysoTracker und SYTO13 inkubiert. Proben wurden an einem CLSM ausgewertet. Angegeben ist der Anteil infizierter Zellen ohne LysoTracker-Signal pro Gesamtzahl infizierter Zellen. Gezeigt sind Mittelwerte aus 3 Experimenten mit Standardabweichung. (B) Repräsentative Aufnahmen zeigen infizierte Zellen mit LysoTracker Signalen (geschlossene Pfeilköpfe) und ohne LysoTracker-Signal (offene Pfeilköpfe).

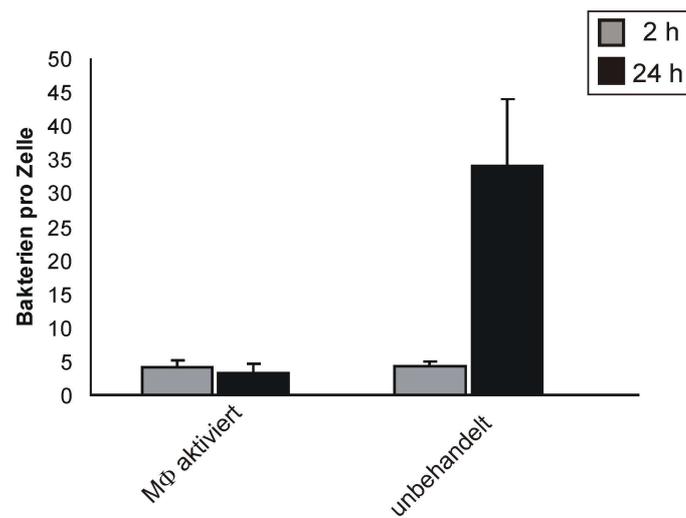
Nach 2 Stunden Infektion war nur ein geringer Anteil mit *R. equi*(+) infizierten Zellen negativ für LysoTracker (5,3%). Über 50% aller Zellen, in denen *R. equi*(+) sich nach 24 Stunden vermehrt hatte, konnten nicht mit LysoTracker gefärbt werden (Abb. 11). Der Anteil von LysoTracker-negativen Zellen nach Infektion mit *R. equi*103(-) war zu allen untersuchten Zeiten kleiner als 1% (Abb. 11). Der Verlust von LysoTracker-positiven Kompartimenten scheint von einer intrazellulären Vermehrung abzuhängen. Wurden Zellen mit *R. equi*103(+) mit einer MOI von 30 infiziert, konnte trotz hoher Zahl an Bakterien pro Makrophage nach 2 Stunden kaum ein Verlust von LysoTracker positiven Signalen beobachtet werden (nicht gezeigt). Makrophagen, die mit einer hohen MOI an *R. equi*103(-) infiziert wurden, zeigten auch nach 24 h kaum Verlust an LysoTracker Signal (nicht gezeigt).

### **3.3. Interaktion von *R. equi* mit aktivierten Makrophagen**

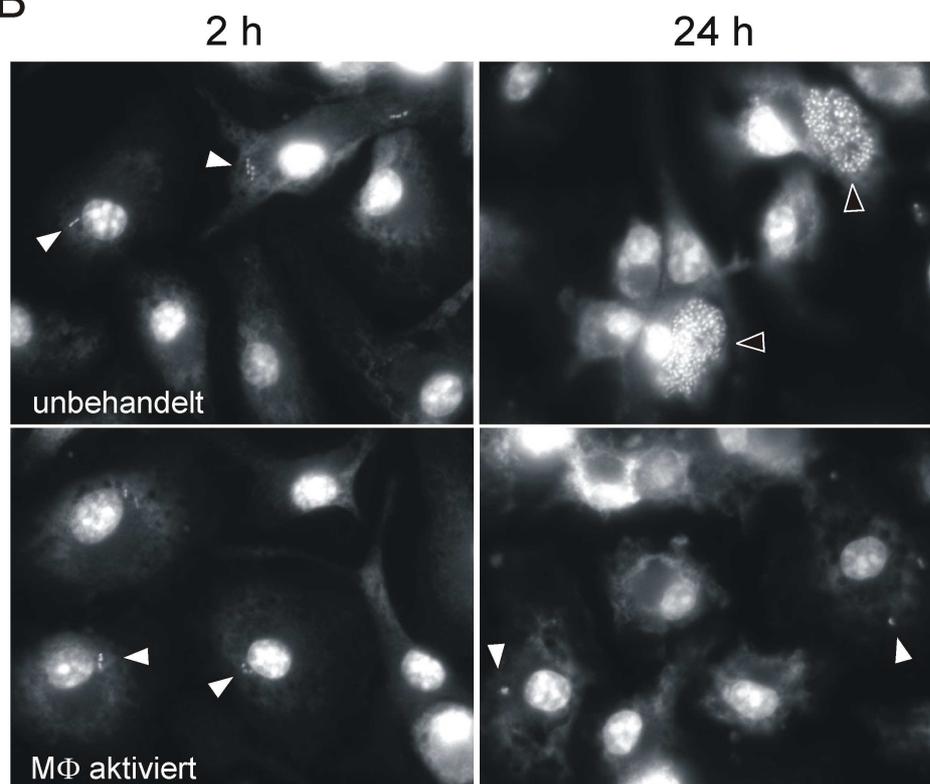
#### **3.3.1 *R. equi*103(+) vermehrt sich nicht in aktivierten Makrophagen**

Durch IFN $\gamma$  und einen weiteren Stimulus wie LPS oder LTA werden Makrophagen in einen aktivierten Zustand versetzt. Dieser Zustand ermöglicht den Makrophagen, intrazelluläre Pathogene zu töten, die sich normalerweise in Makrophagen vermehren können. Um zu überprüfen, ob *R. equi* sich in aktivierten Makrophagen vermehren kann, wurden primäre Makrophagen vor einer Infektion mit IFN $\gamma$  und LPS aktiviert. Aktivierte sowie unbehandelte Makrophagen wurden daraufhin mit *R. equi* infiziert. Nach jeweils 2 und 24 Stunden wurden die Proben mit SYTO13 gefärbt und die Anzahl von Bakterien pro Zelle bestimmt. Wie erwartet vermehrte sich *R. equi*103(+) in unbehandelten Zellen (Abb. 12). In aktivierten Makrophagen blieb die Anzahl der Bakterien pro Zelle dagegen konstant. Die Ergebnisse zeigen, dass *R. equi* sich nicht in aktivierten Makrophagen vermehren konnte.

A



B

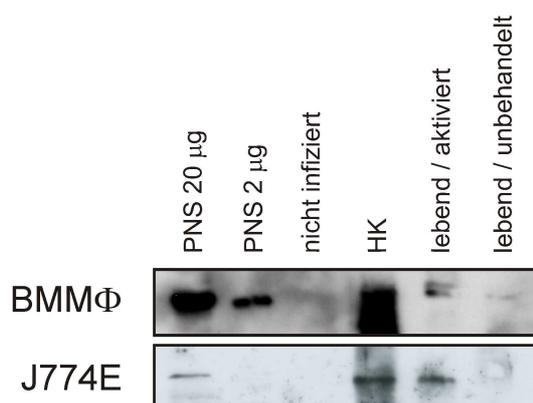


**Abb. 12: *R. equi* vermehrt sich nicht in aktivierten Makrophagen**

Primäre Makrophagen wurden über Nacht mit  $\text{IFN}\gamma$  behandelt und 2 h vor Infektion wurden diese Zellen mit LPS behandelt. Anschließend wurden die Makrophagen mit *R. equi*103(+) (MOI = 1) infiziert und für 2 h oder 24 h inkubiert. Zur Auswertung wurden die Proben mit SYTO13 gefärbt und die Anzahl der Bakterien pro Zelle bestimmt. Als Kontrolle dienen unbehandelte Zellen. (A) Angegeben sind Mittelwerte aus drei Experimenten mit Standardabweichung. Es wurden mindestens 50 infizierte Zellen pro Probe und Ansatz ausgewertet. (B) Gezeigt sind repräsentative Epifluoreszenzaufnahmen. Geschlossene Pfeilköpfe zeigen auf einzelne intrazelluläre Bakterien, offene Pfeilköpfe auf intrazellulär vermehrte Bakterien. Bilder wurden bei einer Vergrößerung von 1250x aufgenommen.

### 3.3.2 *R. equi*103(+)-enthaltende Phagosomen akquirieren in aktivierten Makrophagen vATPase

Um zu überprüfen, ob der Verlust der Vermehrungsfähigkeit von *R. equi* in aktivierten Makrophagen mit einer Normalisierung der Phagosomenreifung einher geht, wurden *R. equi*-enthaltenden Phagosomen auf die Anwesenheit der vATPase hin untersucht. Hierzu wurden primäre oder J774E-Makrophagen mit IFN $\gamma$  und LPS aktiviert und anschließend mit *R. equi*103(+) infiziert. Nach 2 Stunden Infektion wurden Phagosomen aus den infizierten Zellen isoliert und auf die Anwesenheit der vATPase mittels Western-Blot überprüft. Als Positiv-Kontrolle dienten Phagosomen aus unbehandelte Zellen, die mit lebenden oder Hitze- getöteten *R. equi*103(+) infiziert wurden. Als Negativ-Kontrolle wurden Pseudophagosomen aus nicht infizierten Zellen isoliert. Die vATPase konnte in Phagosomen mit lebenden Bakterien ohne Aktivierung nur in Spuren nachgewiesen werden. In Phagosomen, die tote Rhodokokken enthielten wurde, wie erwartet, die E-Untereinheit der vATPase angereichert. *R. equi*-enthaltende Phagosomen aus aktivierten primären Makrophagen enthielten nur geringe Mengen des Proteins. Phagosomen aus aktivierten J774E dagegen enthielten beinahe ebensoviel vATPase E-Untereinheit wie in Proben mit toten Bakterien (Abb. 13). Im Vergleich zu primären Makrophagen wurde in Proben aus J774E Zellen deutlich weniger der vATPase-E-Untereinheit gefunden (Abb. 13). Möglicherweise war die Expression der vATPase-Gene in J774E-Makrophagen geringer als in primären Makrophagen.



**Abb. 13 Western-Blot Analyse mit Phagosomen aus aktivierten Makrophagen.**

Aus aktivierten oder unbehandelten primären (BMMΦ) oder J774E-Makrophagen wurden nach 2 h Infektion Phagosomen mit *R. equi*(+) und Pseudophagosomen (nicht infiziert) isoliert. Phagosomen mit Hitze getöteten *R. equi*(+)/HK wurden aus nicht aktivierten Zellen isoliert. Phagosomale Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf Nitrozellulose wurde die vATPase (E-Untereinheit) mit einem Antikörper detektiert. Es wurden 20 µg und 2 µg des Ausgangsmaterials (PNS) sowie je 2 µg der jeweiligen phagosomalen Fraktion aufgetragen.

### 3.3.3 *R. equi*103(+)-enthaltende Phagosomen sind auch in aktivierten Makrophagen nicht sauer.

Die Anwesenheit der vATPase auf *R. equi*-enthaltenden Phagosomen sollte in aktivierten Makrophagen eine Ansäuerung dieser Kompartimente zur Folge haben. Um dies zu überprüfen, wurden unbehandelte oder aktivierte primäre Makrophagen mit *R. equi* infiziert und nach 2 und 24 Stunden mit LysoTracker und SYTO13 gefärbt. An einem CLSM wurden die Proben auf Kolokalisation der Bakterien mit LysoTracker hin untersucht. Die Kolokalisationshäufigkeiten von *R. equi*-enthaltenden Phagosomen in unbehandelten Zellen stimmten mit den Ergebnissen aus Kapitel 3.2. überein. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen war der Anteil an LysoTracker-positiven Phagosomen in aktivierten Makrophagen sowohl für *R. equi*(+) als auch (-) etwa gleich groß (Tab. 3). Demnach wirkt sich die Aktivierung der Makrophagen durch IFN $\gamma$  und LPS nicht auf die Ansäuerung von *R. equi*-enthaltenden Phagosomen aus. Dies ist vor allem für *R. equi*103(+) überraschend, da die entsprechenden Phagosomen vATPase akquirierten (Abb. 13).

**Tab. 3 Kolokalisationshäufigkeiten von *R. equi* mit LysoTracker in aktivierten Makrophagen**

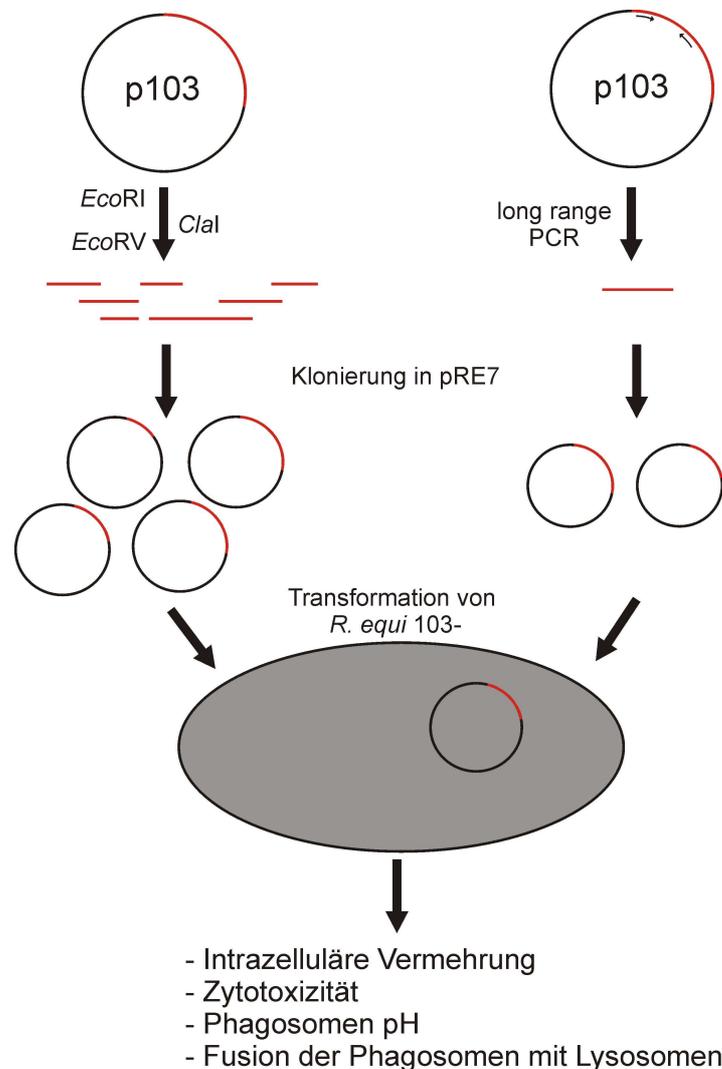
Mit IFN $\gamma$  und LPS aktivierte oder unbehandelte primäre Makrophagen wurden mit *R. equi*103(+) oder (-) mit einer MOI von 1 infiziert und 2 h oder 24 h inkubiert. Proben wurden danach mit LysoTracker und SYTO13 behandelt. Kolokalisationen zwischen LysoTracker und Bakterien wurden an einem CLSM quantifiziert. Angegeben sind die Anteile von LysoTracker-positiven Phagosomen (%) aus zwei unabhängigen Experimenten.

Experiment 1	2 h	24 h	2 h	24 h
	unbehandelt	unbehandelt	aktiviert	aktiviert
<b>103(+)</b>	12,6%	26,3%	18,4%	25,3%
<b>103(-)</b>	47,3%	68,7%	49,2%	75,5%
Experiment 2				
<b>103(+)</b>	13,4%	20,4%	15,9%	30,1%
<b>103(-)</b>	75,9%	95,7%	62%	96%

### 3.4. Charakterisierung rekombinanter *Rhodococcus equi* Stämme

Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass das Virulenzplasmid von *R. equi* für die intrazelluläre Vermehrung und den Ausschluss der vATPase benötigt wird. Darüber

hinaus wirkt das VapA-Plasmid verstärkend auf die Zytotoxizität der Rhodokokken gegenüber Makrophagen (Lührmann et al. 2003). Welche Gene des Virulenzplasmides für diese Eigenschaften von *R. equi* verantwortlich sind, war unklar. Im Folgenden sollte die Bedeutung Virulenzplasmid codierter Gene für die veränderte Phagosomenreifung, Zytotoxizität und intrazelluläre Vermehrung genauer untersucht werden.



**Abb. 14: Strategie zur Charakterisierung virulenzrelevanter Gene des Plasmids p103.**

Das VapA-Plasmid p103 wurde mit *EcoRI*, *EcoRV* oder *ClaI* geschnitten. Fragmente mit Bereichen der Pathogenitätsinsel (rot) wurden in pRE7 kloniert. Alternativ wurden Teile der Pathogenitätsinsel mittels PCR amplifiziert und anschließend in pRE7 kloniert. *R. equi*103(-) wurde mit den jeweiligen Konstrukten transformiert und die erhaltenen Stämme charakterisiert. Die Charakterisierung der rekombinanten Stämme erfolgte durch Überprüfung von intrazellulärer Vermehrung, Zytotoxizität, phagosomalem pH und Fusion der Phagosomen mit Lysosomen.

Hierzu wurde der Stamm 103(-), der das VapA-Plasmid nicht besitzt, mit Fragmenten der Pathogenitätsinsel ausgestattet und die entsprechenden rekombinanten Stämme auf ihre

Virulenz hin überprüft. Da während des intrazellulären Wachstums der Bakterien nur die Expression von Virulenzplasmid-Genen induziert wird, die auf der Pathogenitätsinsel lokalisiert sind (Ren und Prescott 2003), wurden keine anderen Bereiche des Virulenzplasmids analysiert. In Abbildung 14 ist eine Übersicht der verwendeten Strategie dargestellt.

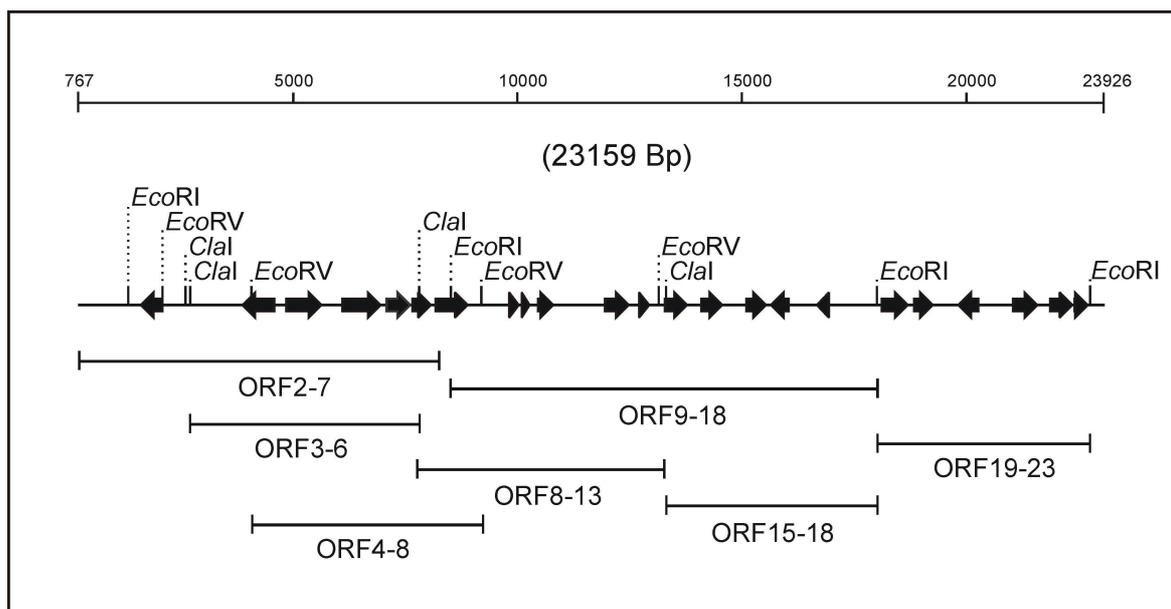
#### 3.4.1. Konstruktion von Plasmiden mit Bereichen der Pathogenitätsinsel

Zur Konstruktion rekombinanter Stämme wurde das VapA-Plasmid p103 aus *R. equi*103(+) isoliert und mit Restriktionsenzymen behandelt oder zur *long range* PCR eingesetzt. Für die direkte Klonierung von Virulenzplasmid-Fragmenten wurde das isolierte Virulenzplasmid mit *Clal*, *EcoRI* oder *EcoRV* verdaut und in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt. DNA-Fragmente, die Bereiche der Pathogenitätsinsel enthielten, wurden ausgeschnitten und gereinigt. Durch Behandlung mit Klenow-Polymerase wurden die Enden der mit *Clal* und *EcoRI* erzeugten Fragmente geglättet. Die jeweiligen Fragmente wurden danach mit dem Vektor pRE7 ligiert, der zuvor mit *EcoRV* geschnitten wurde. Die Orientierung der Inserts wurden durch Kontrollverdau ermittelt (nicht gezeigt). Zur Konstruktion der Plasmide pRE7-(orf2-7) und pRE7-(orf5-8) wurden die Fragmente mittels *long range* PCR synthetisiert. Hierzu wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Primer verwendet. Die Primer enthielten zusätzliche Erkennungssequenzen für *HindIII*, die eine Klonierung in den Vektor pRE7 ermöglichten. Als Matrize diente das Virulenzplasmid aus *R. equi*103(+). Die PCR-Produkte und das Plasmid pRE7 wurden mit *HindIII* geschnitten und anschließend ligiert. Die Orientierungen der Inserts wurden durch Kontrollverdau überprüft (nicht gezeigt). Eine Übersicht der erzeugten Fragmente ist in Abbildung 15 gezeigt. Detaillierte Darstellungen erzeugter Plasmide sind im Anhang aufgeführt.

**Tab. 4: PCR-Primer zur Herstellung der Fragmente orf2-7 und orf5-8 aus p103**

Die zusätzlichen Restriktionsschnittstellen für *HindIII* sind in der Primersequenz unterstrichen. Die Nummerierung erfolgte anhand der Sequenz des Plasmides p103 (Acc. Nr.: NC\_002576).

Primer	Sequenz	Position
ORF2-7 For	5'-CCCA <u>AAGCTT</u> GGGGGAAATACATACCCGAGGGAGGG-3'	767-790
ORF2-7 Rev	5'-CCCA <u>AAGCTT</u> GGGGTGCATGCCACCTCACAGAATC-3'	7971-7993
ORF5-8 For	5'-CCCA <u>AAGCTT</u> GGGCGGACGAGTTCGACTGGTATGAG-3'	5396-5418
ORF5-8 Rev	5'-CCCA <u>AAGCTT</u> GGGTACAACGCAACGGCGTAAAGCTAC-3'	10468-10491

**Abb. 15 Klonierte Bereiche des Virulenzplasmides p103**

Fragmente der Pathogenitätsinsel von p103 wurden mittels PCR oder durch Verdau mit *EcoRI*, *EcoRV* oder *Clal* hergestellt und mit dem Vektor pRE7 ligiert. Die Positionen verwendeter Schnittstellen wurden angegeben. Die Bezeichnung der Fragmente gibt an, welche intakten *open reading frames* von den Fragmenten codiert werden. Die Nummerierung entspricht der jeweiligen Position in p103.

**Tab. 5: Offene Leserahmen der klonierten Bereiche**

Angegeben sind die offenen Leserahmen (ORF), die in den klonierten Bereichen enthalten sind, sowie deren Homolog oder putative Funktion.

ORF	Name	Homolog / put. Funktion	ORF	Name	Homolog / put. Funktion
2	<i>vapG</i>	Vap Protein Familie	14	<i>vapC</i>	Vap Protein Familie
3	ORF3	Unbekannt	15	<i>vapD</i>	Vap Protein Familie
4	<i>virR</i>	<i>lysR</i> Familie / pos. Regulator ( <i>vapA</i> )	16	ORF16	Unbekannt
5	ORF5	<i>araJ</i> / put. arabinose efflux Protein	17	ORF17	Unbekannt
6	<i>vapH</i>	Vap Protein Familie	18	ORF18	Unbekannt
7	ORF7	Unbekannt	19	<i>vapE</i>	Vap Protein Familie
8	ORF8	Two component response regulator ( <i>vapA</i> )	20	<i>vapF</i>	Vap Protein Familie / Pseudogen
9	ORF9	Unbekannt	21	ORF21	<i>aroQ</i> / sekretierte Chorismat Mutase
10	ORF10	Unbekannt	22	ORF22	<i>invA</i> / DNA invertase
11	ORF11	Unbekannt	23	ORF23	Unbekannt
12	<i>vapA</i>	Vap Protein Familie	24	ORF24	Unbekannt
13	ORF13	Unbekannt			

### 3.4.2. Konstruktion des Plasmids pRE7-vapA

Um zu überprüfen, ob VapA das einzig entscheidende Plasmidelement mit Einfluss auf die Ansäuerung von Phagosomen oder die Zytotoxizität der Bakterien ist, sollte ein *R. equi*103(-)-Stamm konstruiert werden, der das *vapA*-Gen exprimiert. Dazu wurde *vapA* in den Vektor pRE7 kloniert. Zur Konstruktion des Plasmids pRE7-vapA wurde *vapA* mittels PCR mit den in Tabelle 6 aufgeführten Primern synthetisiert. Das PCR-Produkt enthielt das *vapA*-Gen sowie 679 Basenpaare stromaufwärts davon. Der Bereich stromaufwärts des Gens enthält die lange Promotorregion von *vapA* (Russell et al. 2004). Die Primer enthielten zusätzliche Erkennungssequenzen für *NcoI* und *BamHI*, die eine Klonierung in den Vektor pRE7 ermöglichten. Als Matrize diente das Virulenzplasmid aus *R. equi*103(+). Die PCR Produkte und das Plasmid pRE7 wurden mit *NcoI* und *BamHI* geschnitten, gereinigt und anschließend ligiert.

**Tab. 6: PCR-Primer für die Synthese des *vapA*-Gens zur Konstruktion von pRE7-*vapA***

Die zusätzlichen Restriktionsschnittstellen für *Nco*I und *Bam*HI sind in der Primersequenz unterstrichen. Die Nummerierung erfolgte anhand der Sequenz des Plasmids p103.

Primer	Sequenz	Schnittstelle	Position
vapA-full F	5'-GCG <u>CCATGG</u> GAGACCAACATCGTTTCGCG-3'	<i>Nco</i> I	11867-11884
vapA-full R	5'-GCGGGAT <u>CCCTGC</u> AGTCAGCGCGATTG-3'	<i>Bam</i> HI	13360-13377

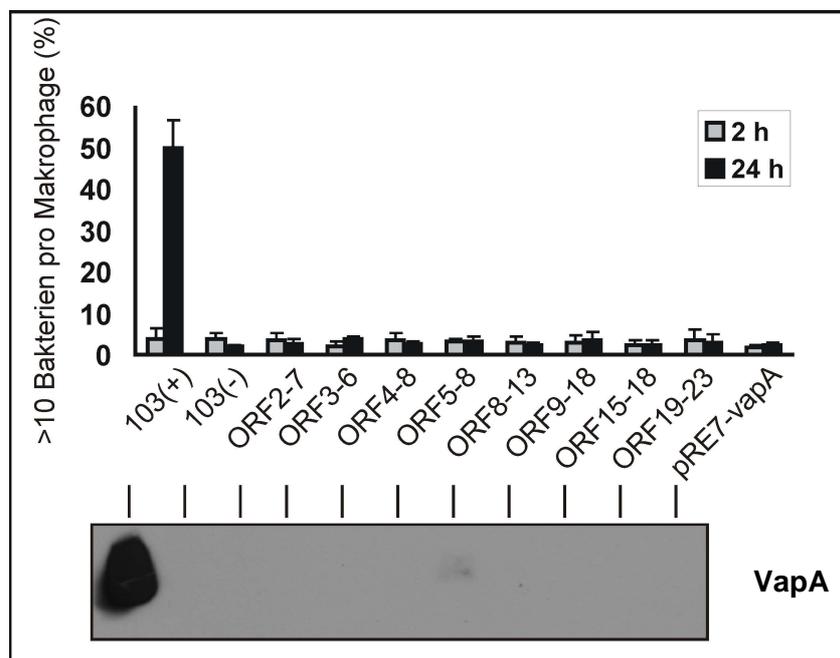
### 3.4.3. Konstruktion rekombinanter *R. equi*-Stämme

Zellen von *R. equi*103(-) wurden mit den Plasmiden aus Kapitel 3.4.1 und 3.4.2 transformiert und die erhaltenen Transformanten in BHI-Medium mit Kanamycin vermehrt. Die Transformationseffizienz lag bei etwa  $10^4$  Transformanten pro  $\mu$ g DNA (nicht gezeigt). Die Transformanten wurden auf ihre Aufnahme von Plasmiden mittels PCR und Plasmidisolierung hin überprüft (nicht gezeigt). Die genetische Stabilität der Klone wurde durch Plasmidisolierung nach Vermehrung für 48 Stunden in BHI-Medium ohne Kanamycin überprüft. Die Stabilität der untersuchten Stämme war unter diesen Bedingungen nie kleiner als 90% (nicht gezeigt).

### 3.4.4. Intrazelluläre Vermehrung rekombinanter *R. equi*-Stämme

Rekombinante *R. equi*-Stämme wurden auf ihre Fähigkeit, sich intrazellulär zu vermehren, untersucht. Hierzu wurden J774E Makrophagen mit den *R. equi*-Stämmen infiziert. Nach 2 und 24 Stunden wurden Proben mit SYTO13 gefärbt und die Anzahl von Zellen bestimmt, in denen sich Bakterien vermehrt hatten (Abb. 16). Als Kontrollen wurden *R. equi*103(+) und 103(-) verwendet. Bei keinem rekombinanten *R. equi*-Stamm konnte eine intrazelluläre Vermehrung beobachtet werden. Der Wildtyp von *R. equi*(+) vermehrte sich wie erwartet in Makrophagen, während *R. equi*(-) kein intrazelluläres Wachstum zeigte. Die verwendeten Bakterien wurden mittels Western-Blot Analyse auf die Gegenwart von VapA überprüft. Obwohl *R. equi*(orf8-13), (9-18) und pRE7-*vapA* das *vapA*-Gen (orf12) besitzen, wird es in diesen Stämmen nicht exprimiert (Abb. 16). Rekombinante *R. equi*-Stämme, die aus dem Virulenzplasmid nur das *vapA*-Gen besitzen, sind nicht in der Lage, VapA zu produzieren (Abb. 16). Zur Expression des Gens werden vermutlich die

Genprodukte von *orf4* und *orf8* gleichzeitig benötigt, da beide Proteine die *vapA*-Expression regulieren (Russell et al. 2004, Bargaen 2005).



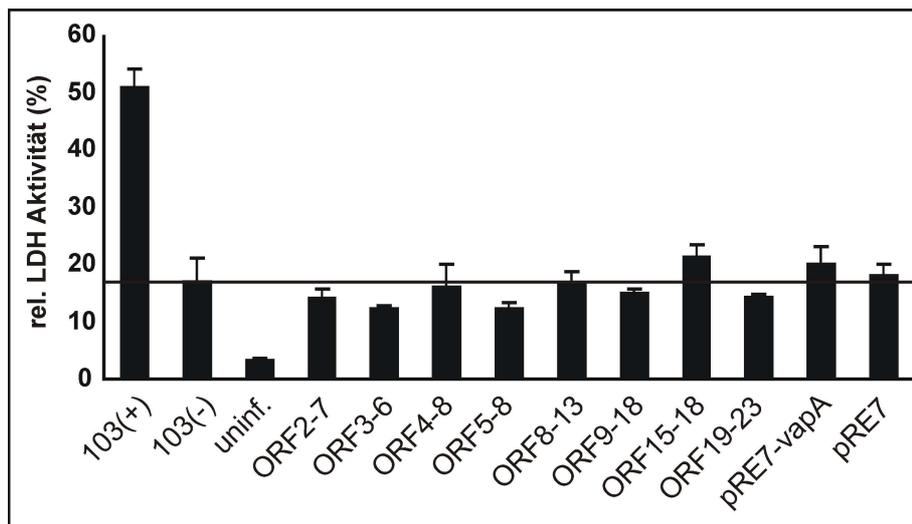
**Abb. 16: Intrazelluläre Vermehrung und *vapA*-Expression rekombinanter *R. equi*-Stämme**

J774E Makrophagen wurden mit einer MOI von 0,5 für 1 h infiziert und 2 h oder 24 h inkubiert. Proben wurden fixiert und mit SYTO13 gefärbt. Zur Auswertung wurde der Anteil von Makrophagen mit mehr als zehn intrazellulären Bakterien von hundert infizierten Zellen bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte aus drei Experimenten mit Standardabweichung. Es wurden mindestens 100 infizierte Zellen pro Probe und Ansatz ausgewertet. Die Western-Blot Analyse erfolgte mit den zur Infektion verwendeten *R. equi*-Kulturen. Proteine ganzer Zellen von *R. equi* wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran übertragen. Das Protein wurde mit einem Antikörper detektiert und durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Pro Spur wurde Material äquivalent zu ca.  $10^8$  Bakterien aufgetragen.

### 3.4.5. Zytotoxizität rekombinanter *R. equi*-Stämme

Der nekrotische Einfluss von rekombinanten *R. equi* Stämmen wurde mit einem Laktat-Dehydrogenase-Assay bestimmt. Dazu wurden J774E-Makrophagen mit *R. equi*-Stämmen infiziert und nach 24 Stunden die LDH-Aktivität im Kulturüberstand der Zellen ermittelt (Abb. 17). Die Freisetzung des zytoplasmatischen Enzyms in den Kulturüberstand diente als Maß für den Vitalitätsverlust der Makrophagen. Als Kontrollen dienten Infektionen mit dem Wildtyp von *R. equi*103(+) und (-). Nicht infizierte Zellen wurden als Negativ-Kontrolle verwendet. Die Infektion mit *R. equi* 103(+) hatte einen Vitalitätsverlust von etwa 50% der Wirtszellen zur Folge. Die relative Zytotoxizität von *R. equi*103(-) war mit etwa 20% weniger als halb so groß. Die waagerechte Linie markiert diesen Wert. Keiner der rekombinanten *R. equi*-Stämme war signifikant zytotoxischer als

*R. equi*(-). Gene, die auf den klonierten Bereichen codiert werden, haben demnach keinen oder nur in anderer Kombination Einfluss auf den Vitalitätsverlust von Makrophagen. Ein *R. equi*-Stamm, der den „leeren“ Vektor pRE7 besitzt, ist ebenfalls nicht zytotoxisch für Makrophagen. Ein störender Einfluss des Vektors auf die Zytotoxizität der Bakterien ist damit ausgeschlossen. Wie erwartet, konnte in Proben mit uninfizierten Zellen kaum LDH-Aktivität im Kulturüberstand nachgewiesen werden.



**Abb. 17: Relative Zytotoxizität rekombinanter *R. equi*-Stämme**

J774E-Zellen wurden mit *R. equi*-Stämmen bei einer MOI von 30 infiziert und 24 h inkubiert. Relative LDH-Aktivitäten wurden in Kulturüberständen infizierter Wirtszellen mit Hilfe des Cytotoxicity Detection Kit von Roche bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

### 3.5. Komplementierung rekombinanter *R. equi*-Stämme mit *vapA*

Die bisher gezeigten Ergebnisse zeigen, dass keiner der rekombinanten Stämme von *R. equi* in der Lage ist, sich intrazellulär zu vermehren oder Nekrose zu induzieren. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die fehlende Gegenwart von VapA sein. Es sollte deshalb überprüft werden, ob eine zusätzliche *vapA*-Expression in diesen Stämmen einen Einfluss auf die Zytotoxizität und die Fähigkeit der intrazellulären Vermehrung der Bakterien hat. Hierzu wurde ein Plasmid konstruiert, das eine konstitutive *vapA*-Expression in *R. equi* ermöglicht. Das Plasmid pRE7-*vapA* war dazu nicht geeignet, da das *vapA*-Gen durch diesen Vektor nicht exprimiert wird (Abb. 16).

### 3.5.1. Konstruktion des Plasmids pSMT3-*vapA*

Zur Konstruktion des Plasmids pSMT3-*vapA* wurde das *vapA*-Gen mittels PCR amplifiziert. Hierzu wurden die in Tabelle 7 aufgeführten Primer verwendet. Zusätzliche Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *NheI* und *KpnI* in den Primern ermöglichten eine gerichtete Klonierung in den Vektor pSMT3. Das Virulenzplasmid aus *R. equi*103(+) diente als Matrize. Das PCR Produkt und das Plasmid pSMT3 wurden mit *NcoI* und *BamHI* geschnitten, gereinigt und anschließend ligiert. In dem resultierenden Konstrukt wird die Expression des *vapA*-Gens durch den *hsp60*-Promotor aus *Mycobacterium tuberculosis* kontrolliert.

**Tab. 7: PCR-Primer für die Synthese des *vapA*-Gens zur Konstruktion von pSMT3-*vapA***

Die zusätzlichen Restriktionsschnittstellen für *NheI* und *KpnI* sind in der Primersequenz unterstrichen. Die Nummerierung erfolgte anhand der Sequenz des Plasmids p103.

Primer	Sequenz	Schnittstelle	Position
vapA-pc 1	5'-CTAG <u>CTAGCTAG</u> CCGCGAAGGCGATCGAAGGGC -3'	<i>NheI</i>	12503- 12523
vapA-pc 2	5'-CGG <u>GTACCC</u> CTCGCAGCCTGCATGTTTCTGG -3'	<i>KpnI</i>	13225- 13247

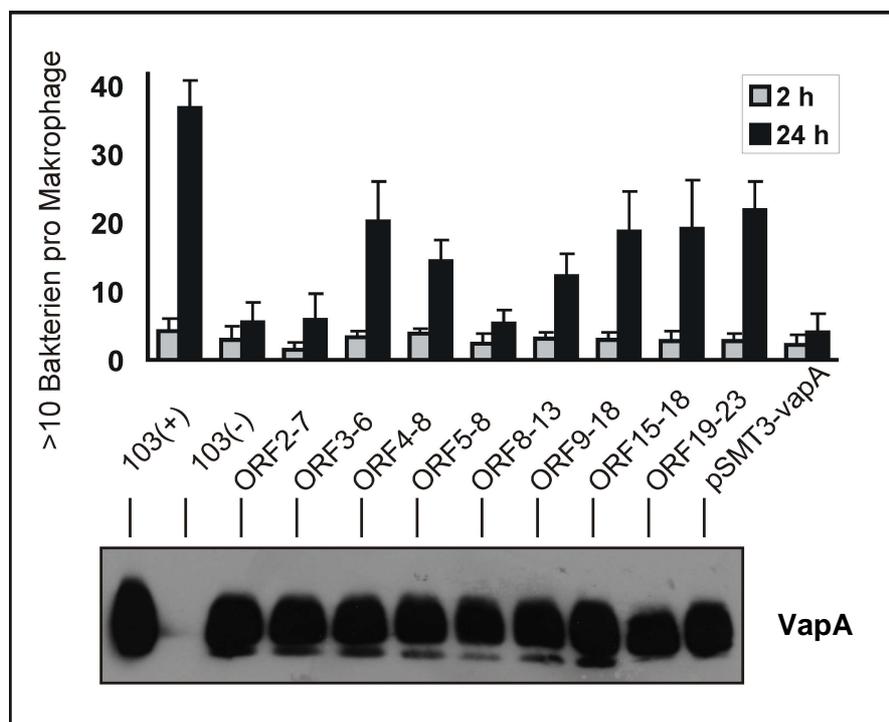
### 3.5.2. Komplementation rekombinanter *R. equi*-Stämme mit *vapA*

Rekombinante *R. equi*-Stämme aus Kapitel 3.4. wurden mit dem Plasmid pSMT3-*vapA* transformiert und auf BHI-Agar-Platten vermehrt. Die Selektion der Transformanten erfolgte durch Zugabe von Kanamycin und Hygromycin B. Die Transformanten wurden auf ihre Aufnahme von Plasmiden mittels PCR und Plasmidisolierung hin überprüft (nicht gezeigt). Die genetische Stabilität der Klone wurde durch Vermehrung für 5 Tage in BHI-Medium ohne Antibiotika überprüft. Die Stabilität der untersuchten Stämme war unter diesen Bedingungen nie kleiner als 85% (nicht gezeigt).

### 3.5.3. Intrazelluläre Vermehrung *vapA*-exprimierender *R. equi*-Rekombinanten

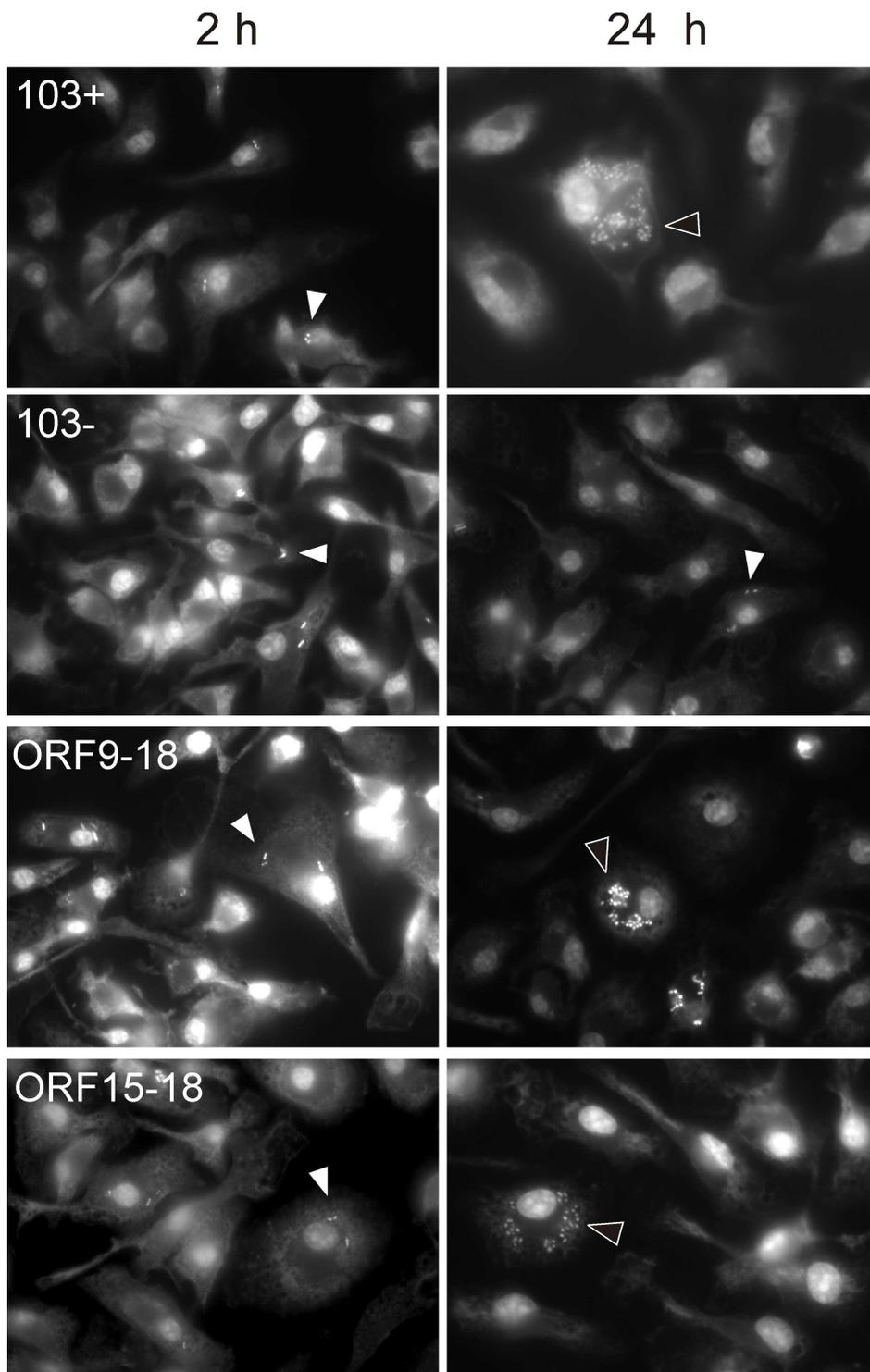
J774E Makrophagen wurden mit *vapA*-exprimierenden *R. equi*-Rekombinanten infiziert, um die intrazelluläre Vermehrung der Stämme zu überprüfen. Proben wurden nach 2 und

24 Stunden mit SYTO13 gefärbt und die Anzahl von Zellen bestimmt, in denen sich Bakterien vermehrt hatten (Abb. 18). Als Kontrollen dienten *R. equi*103(+), 103(-) und ein *R. equi*-Stamm, der nur das Plasmid pSMT3-*vapA* trägt. Die verwendeten Stämme wurden mittels Western-Blot Analyse auf die Gegenwart von VapA überprüft. Wie erwartet produzieren alle rekombinanten Stämme VapA (Abb. 18). Die zusätzliche Expression von *vapA* führte bei allen rekombinanten Stämmen außer *R. equi*(2-7), (5-8) und (pSMT3-*vapA*) zu einer intrazellulären Vermehrung. Der Anteil an Makrophagen, in denen sich diese *R. equi*-Stämme vermehrt hatten, war mit 15-20% nur etwa halb so groß wie bei Proben mit *R. equi*(103+). Dieses Resultat zeigt, dass VapA für eine intrazelluläre Vermehrung von zentraler Bedeutung ist. Die Produktion von VapA allein reicht jedoch nicht aus, um intrazelluläre Vermehrung zu vermitteln. Dies zeigt sich am Stamm *R. equi*(pSMT3-*vapA*), der sich nicht intrazellulär vermehren konnte. Repräsentative mikroskopische Aufnahmen infizierter Zellen sind in Abbildung 19 gezeigt.



**Abb. 18: Intrazelluläre Vermehrung von *vapA*-exprimierenden Rekombinanten**

J774E Makrophagen wurden mit einer MOI von 0,5 für 1 h infiziert und 2 h oder 24 h inkubiert. Proben wurden mit PFA fixiert und mit SYTO13 gefärbt. Zur Auswertung wurde der Anteil von Makrophagen mit mehr als zehn intrazellulären Bakterien von hundert infizierten Zellen bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte aus drei Experimenten mit Standardabweichung. Es wurden mindestens 100 infizierte Zellen pro Probe und Ansatz ausgewertet. Die Western-Blot Analyse erfolgte mit den zur Infektion verwendeten *R. equi*-Kulturen. Proteine ganzer Zellen von *R. equi* wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran übertragen. Das Protein wurde mit einem Antikörper detektiert und durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Pro Spur wurde ein Äquivalent zu ca.  $10^8$  Bakterien aufgetragen.



**Abb. 19: Intrazelluläre Vermehrung rekombinanter Rhodokokken**

Gezeigt sind repräsentative Epifluoreszenzaufnahmen von infizierten Makrophagen. Proben wurden mit SYTO13 gefärbt. Geschlossene Pfeilköpfe zeigen auf einzelne intrazelluläre Bakterien, offene Pfeilköpfe auf intrazellulär vermehrte Bakterien. Bilder wurden bei einer Vergrößerung von 1250x aufgenommen.

Um auszuschließen, dass ein metabolischer Defekt die Ursache der geringeren intrazellulären Vermehrungsfähigkeit von Rekombinanten ist, wurde das Wachstum dieser Stämme in Minimalmedium untersucht (Tab. 8). Der Stamm 103(+) benötigte für eine Verdoppelung der Zellzahl 90 Stunden. Die Verdopplungszeit von *R. equi* 103(-) war im Vergleich zu 103(+) mit 46 Stunden nur etwa halb so groß. Die Wachstumsgeschwindigkeit rekombinanter Stämme unterschied sich hingegen kaum von 103(-). Trotz höherer Wachstumsgeschwindigkeiten in Minimalmedium vermehren sich rekombinante Rhodokokken in Makrophagen schlechter als der Wildtyp von *R. equi*103(+).

**Tab. 8: Verdopplungszeiten von *R. equi* Stämmen in Minimalmedium**

50 ml Minimalmedium wurden in einem Erlenmeyerkolben mit jeweils  $10^6$  Bakterien inokuliert und bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Zellzahlen wurden anhand der optischen Dichte photometrisch bei 600 nm bestimmt. Angegeben sind Verdopplungszeiten ( $t_d$ ) in Stunden.

Stamm	$t_d$ (h)
103(+)	90
103(-)	46
ORF9-18	39
ORF3-6	53
ORF15-18	50

### 3.5.4. Rekombinante Rhodokokken sind avirulent für Mäuse

Die Virulenz rekombinanter Rhodokokken für Mäuse wurde in Zusammenarbeit mit J. Prescott (Guelph, Kanada) untersucht. Hierzu wurden Mäuse mit den *vapA*-exprimierenden Rekombinanten intravenös infiziert. Nach 4 Tagen wurden die Mäuse getötet und die Anzahl koloniebildender Einheiten (*colony forming units*; CFU) von *R. equi* in der Leber der Tiere bestimmt (Tab. 9). Als Kontrollen dienten *R. equi*103(+) und (-). Aus Mäusen, die mit *R. equi*103(+) infiziert wurden, konnten nach 4 Tagen etwa  $10^5$  Bakterien isoliert werden. Rekombinante Rhodokokken sowie der Stamm 103(-) waren nach dieser Zeit hingegen kaum oder gar nicht nachweisbar. Dieses Ergebnis zeigt, dass die verwendeten Rekombinanten in diesem Mausmodell avirulent waren.

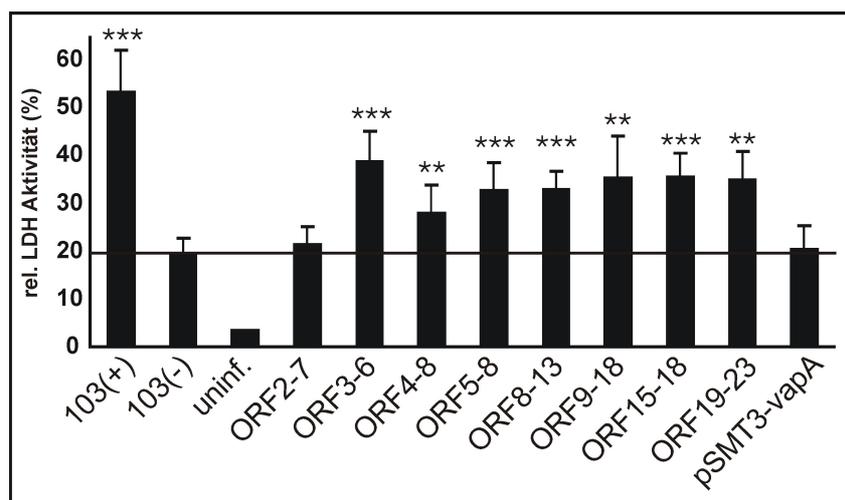
**Tab. 9: Virulenz rekombinanter Rhodokokken für Mäuse**

Für die Infektionen wurden 6-8 Wochen alte, weibliche CD1-Mäuse verwendet. Je 7 Mäuse wurden mit angegebenen Stämmen intravenös infiziert. Nach 4 Tagen wurden die Tiere getötet und deren Leber unter aseptischen Bedingungen isoliert und anschließend in PBS homogenisiert. Verdünnungsreihen wurden auf Trypticase Soy Agar ausplattiert und 48 h bei 37° inkubiert. Anhand von Kolonien auf den Platten wurde die Anzahl Koloniebildender Einheiten (CFU) pro Leber ermittelt. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichungen.

Stamm	log CFU
103(+)	5,4 ± 0,55
103(-)	0
ORF3-6	0,4 ± 0,8
ORF5-8	0
ORF15-18	0
ORF19-23	0,47 ± 1,23

### 3.5.5. Zytotoxizität *vapA* exprimierender *R. equi*-Rekombinanten

Die Zytotoxizität *vapA* exprimierender *R. equi*-Rekombinanten wurde wie in Kapitel 3.4.5. beschrieben bestimmt. Die zusätzliche Expression von *vapA* verstärkte die Zytotoxizität von allen rekombinanten *R. equi*-Stämmen außer *R. equi*(ORF2-7) und (ORF4-8) (Abb. 20). Die Zytotoxizität des Stamms (ORF4-8) war im Vergleich zu *R. equi*103(-) nicht signifikant erhöht. Bei allen anderen rekombinanten Stämmen lag der Vitalitätsverlust der Makrophagen mit 35-40% zwischen den Werten von Proben mit *R. equi*(+) und (-). Der Vektor pSMT3-*vapA* vermittelte in *R. equi*(-) allein keine Zytotoxizität. In nicht infizierten Zellen (uninf.) konnte kaum LDH-Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 20).

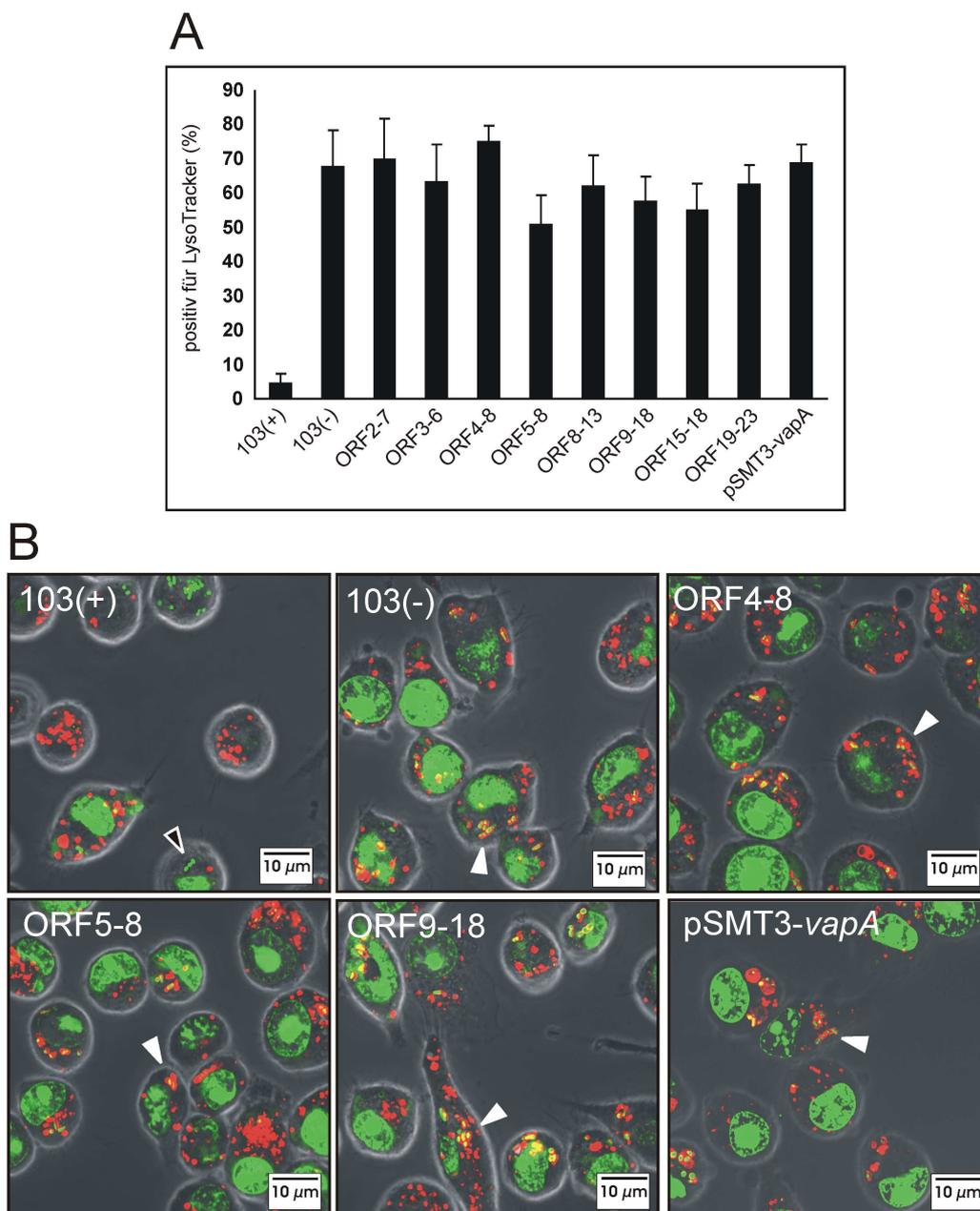


**Abb. 20: Relative Zytotoxizität *vapA* exprimierender *R. equi*-Rekombinanten**

J774E-Makrophagen wurden mit *R. equi*-Stämmen bei einer MOI von 30 infiziert. Nach 24 h Inkubation wurden relative LDH-Aktivitäten in Kulturüberständen infizierter Wirtszellen ermittelt. Die Enzymaktivitäten wurden mit Hilfe des Cytotoxicity Detection Kits von Roche bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Signifikanzen wurden mit einem t-Test (zweiseitig, ungleiche Varianzen) ermittelt und sind angegeben als \*\* $p > 0,05$ ; \*\*\*  $0,005 \geq p$ .

### 3.5.6. Kolokalisation von Rekombinanten mit LysoTracker

Rekombinante *vapA*-exprimierende Rhodokokken wurden auf ihre Fähigkeit überprüft, die Ansäuerung von Phagosomen zu inhibieren. Dazu wurden J774E Makrophagen mit *R. equi*-Stämmen infiziert und nach 2 Stunden mit LysoTracker und SYTO13 gefärbt (Abb. 21). Wie erwartet, kolokalisierten in Proben mit *R. equi*(+) nur etwa 10% aller Bakterien mit LysoTracker. Rekombinante Rhodokokken kolokalisierten mit 50-80% so häufig wie *R. equi*(-). Diesem Ergebnis zufolge ist keiner der rekombinanten Stämme in der Lage, die Ansäuerung der Phagosomen zu verhindern.



**Abb. 21: Kolokalisation von *vapA* exprimierenden Rekombinanten mit LysoTracker**

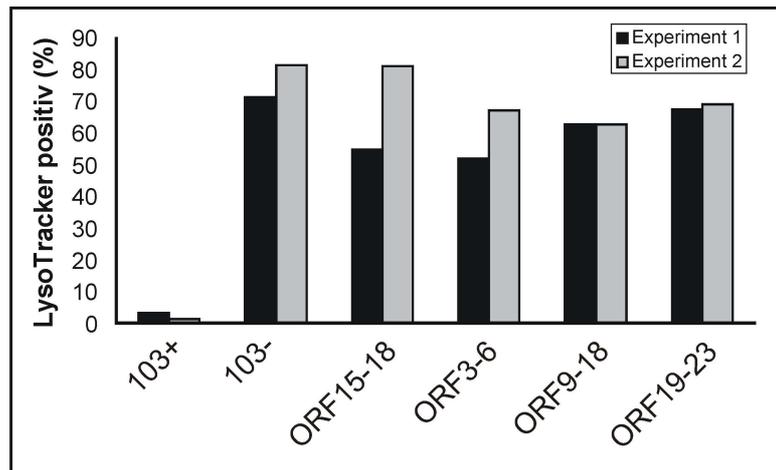
J774E-Zellen wurden mit *R. equi*-Stämmen infiziert und nach 2 h mit LysoTracker und SYTO13 gefärbt. (A) Zur Auswertung wurde der Anteil an Bakterien, der mit dem Farbstoff LysoTracker kolokalisieren, bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. (B) Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen der LysoTracker-Färbungen. Bilder wurden an einem Konfokalen Laser Mikroskop aufgenommen. Offene Pfeilköpfe deuten auf nicht kolokalisierende, geschlossene Pfeilköpfe auf kolokalisierende Bakterien.

### 3.5.7. *vapA* exprimierende Rekombinanten vermehren sich in einem sauren Kompartiment

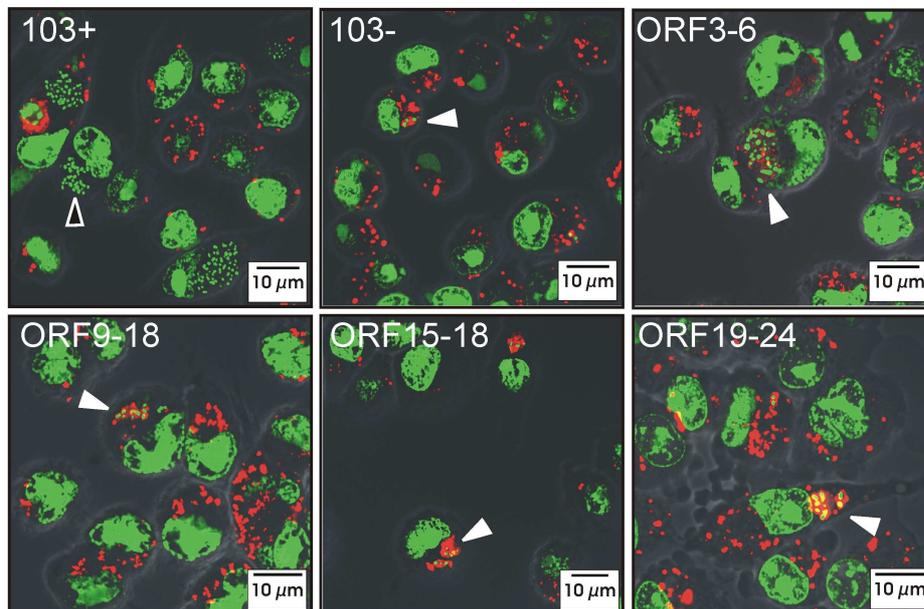
Mit einigen rekombinanten Stämmen wurde eine LysoTracker Färbung 24 Stunden nach Infektion durchgeführt. Auch nach 24 Stunden war die Mehrzahl der Bakterien in für

LysoTracker positiven Kompartimenten zu finden (Abb. 22 A). Vakuolen, in denen sich diese Rekombinanten vermehrt hatten, waren ebenfalls überwiegend positiv für LysoTracker (Abb. 22 B). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Kapitel 3.2.1. waren replikative Vakuolen von *R. equi*103(+) nicht sauer. Dies zeigt, dass sich einige rekombinante *R. equi*-Stämme in sauren Kompartimenten vermehren können.

A



B

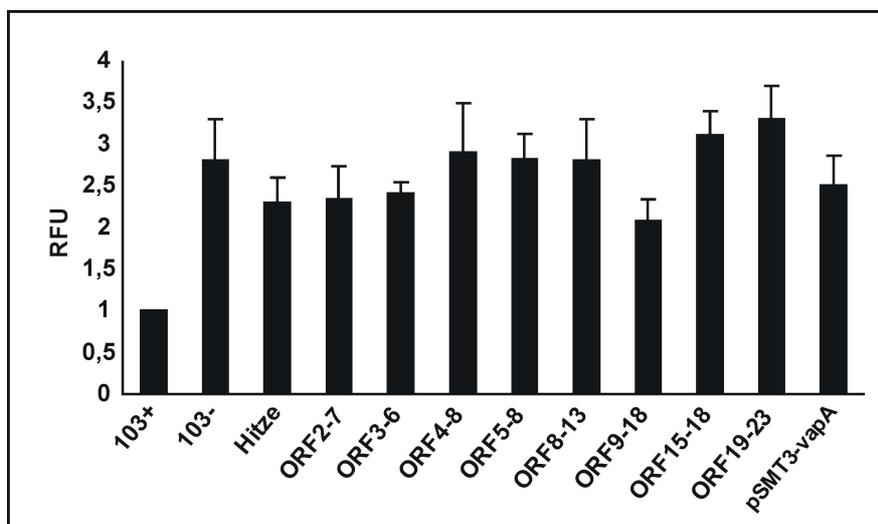


**Abb. 22 Vermehrung von rekombinanten Rhodokokken in sauren Kompartimenten**

J774E-Makrophagen wurden mit *R. equi*-Stämmen infiziert und nach 24 h mit LysoTracker und SYTO13 gefärbt. (A) Es wurde der Anteil mit LysoTracker kolokalisierender Bakterien von hundert bestimmt. Angegeben sind Werte aus zwei unabhängigen Experimenten. (B) Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen der LysoTracker-Färbungen. Bilder wurden an einem Konfokalen Laser Mikroskop aufgenommen. Offene Pfeilköpfe deuten auf nicht kolokalisierende, geschlossene Pfeilköpfe auf kolokalisierende Bakterien.

### 3.5.8. Fusion von Lysosomen mit *R. equi*-enthaltenden Phagosomen

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass nur *R. equi*-Stämme mit Virulenzplasmid die Fusion von Phagosomen mit Lysosomen verhindern können (Fernandez 2005). Es sollte geklärt werden, ob die Komplementation von *R. equi*(-) mit Bereichen der Pathogenitätsinsel einen Einfluss auf die Fusion von Phagosomen mit Lysosomen hat. Dazu wurden *vapA*-exprimierende Rekombinanten mit einem FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) basierenden Testverfahren analysiert. Dieses Testverfahren ermöglicht die Quantifizierung von Fusionen der Phagosomen mit vormarkierten Lysosomen. J774E Makrophagen wurden zunächst mit BSA-Rhodamin inkubiert und anschließend mit ATTO488-markierten Bakterien infiziert. Zwei Stunden nach der Infektion wurde der Energietransfer zwischen den Fluorophoren in ganzen Zellen mit einem Fluorometer gemessen (Abb. 23). Als Negativ-Kontrolle diente *R. equi*103(+), als Positiv-Kontrollen *R. equi*103(-) und durch Hitze getötete *R. equi*103(+). Das FRET-Signal in Proben mit *R. equi*103(+), wurde gleich 1 gesetzt. Wie aus Abbildung 23 hervorgeht, fusionieren Phagosomen mit *R. equi*(-) signifikant mehr mit Lysosomen als Phagosomen mit *R. equi*(+).



**Abb. 23: FRET-Analyse mit rekombinanten *R. equi*-Stämmen**

J774E-Zellen wurden 1 h mit BSA-Rhodamin inkubiert, gewaschen, für 2 h inkubiert und anschließend mit ATTO488-markierten Bakterien infiziert. Nach 2 h wurden die Zellen geerntet und wie in Kapitel 2.24 beschrieben die Fluoreszenz mit einem Fluorometer gemessen. FRET-Signale in Proben mit 103(+) wurden als 1 definiert. Fluoreszenzen der anderen Proben wurden in Relation zu den Werten von 103(+) gesetzt und als *relative fluorescence units* (RFU) angegeben. Gezeigt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

Wie erwartet wurde in Proben mit getöteten Bakterien ebenfalls eine hohe Fluoreszenz gemessen. Phagosomen mit rekombinanten Stämmen fusionierten etwa in gleichem

Ausmaß mit Lysosomen wie Phagosomen mit *R. equi*(-) oder getöteten Bakterien. Die hier verwendete Komplementation von *R. equi*103(-) mit Bereichen der Pathogenitätsinsel reicht demnach nicht aus, um eine Inhibierung der Phagosomen-Lysosomen-Fusion zu vermitteln.

### 3.6. Expression einzelner Gene der Pathogenitätsinsel

Den bisherigen Ergebnissen zufolge enthält der Bereich zwischen ORF3 und ORF8 Gene, die für die Zytotoxizität und die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* wichtig sind. Um einzelne Gene mit Einfluss auf virulenzrelevante Phänotypen zu identifizieren, sollten die Gene *orf3* bis *orf8* jeweils zusammen mit *vapA* in *R. equi*103(-) exprimiert werden. Die resultierenden Rekombinanten sollten daraufhin auf ihre Zytotoxizität und Vermehrungsfähigkeit in Makrophagen untersucht werden.

#### 3.6.1. Konstruktion von Plasmiden zur Expression einzelner Gene in *R. equi*(-)

Die Gene *orf3* bis *orf8* wurden jeweils mittels PCR amplifiziert. Als Matrize diente das Virulenzplasmid aus *R. equi*103(+). Es wurden die in Tabelle 8 aufgeführten Primer verwendet. Die Synthese der Gene erfolgte mit dem Enzym *Pfu*-Polymerase, das glatte Enden produziert. PCR Produkte wurden mit dem Vektor pSMT3 ligiert, der zuvor mit *EcoRV* geschnitten wurde. Die Orientierungen der Inserts wurden durch Kontrollverdau überprüft. Da die Gene *orf4* bis *orf8* als eine Transkriptionseinheit (Operon) durch einen gemeinsamen Promotor reguliert werden, musste zur Expression der einzelnen Gene in *R. equi* ein fremder Promotor verwendet werden. Die Orientierungen der Inserts in pSMT3 wurden deshalb so gewählt, dass die Expression der Gene durch den HSP60 Promotor des Vektors kontrolliert wird. Zur Kontrolle wurden die Konstrukte mit den in Tabelle 10 aufgeführten Primern sequenziert.

**Tab. 10: PCR-Primer für die Synthese der Gene *orf3* bis *orf8***

Die Nummerierung erfolgte anhand der Sequenz des Plasmids p103.

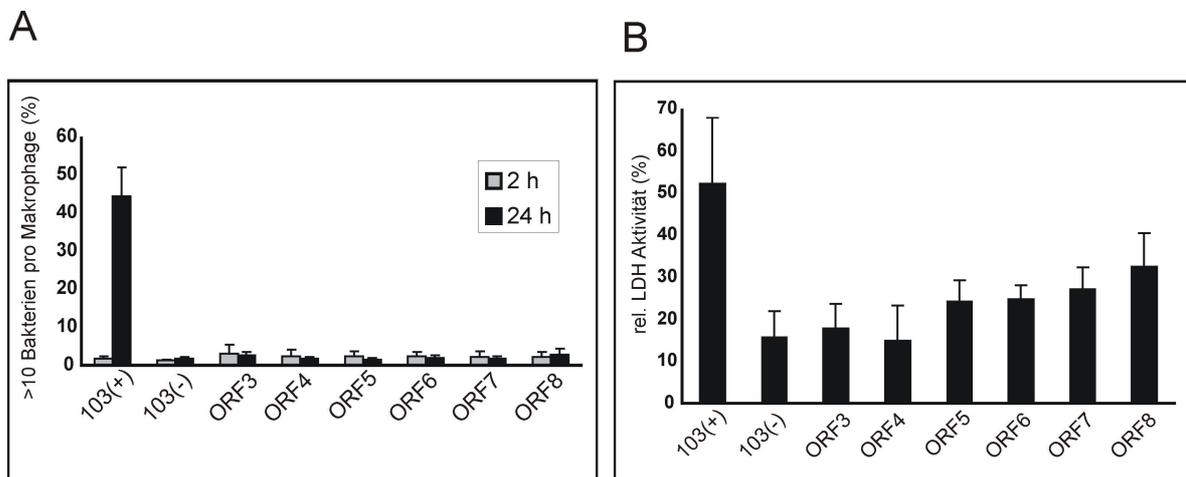
Primer	Sequenz	Position
ORF3 F	5'-GCGGTGAAGAGAGCTCAGTGG -3'	3905-3925
ORF3 R	5'-CCGTCCAGTCGCCCTATCC -3'	4737-4756
ORF4 F	5'-AGGTAGACGTCATGGTCAAGGG -3'	4883-4904
ORF4 R	5'-CGCTAGGAGGGGTTGGGCCTA -3'	5917-5937
ORF5 F	5'-TAGGCCCAACCCCTCCTAGCG -3'	5917-5937
ORF5 R	5'-GTAGGACGAGTTGCAGAGGGG -3'	6298-6318
ORF6 F	5'-GGACGAGACGAGAGGGGTGC -3'	7343-7362
ORF6 R	5'-GGATTCGAAAGCAGGTCGAGCG -3'	8016-8037
ORF7 F	5'-CGTAGTCCAAGCGAAGAATCACG -3'	7926-7948
ORF7 R	5'-CCCAAACCACCTACTCCCACAC -3'	8511-8532
ORF8 F	5'-CTGTTTCTACGGCGCGGTTGC -3'	8365-8385
ORF8 F	5'-CCCCACGGTTCTTCTTCGCC -3'	9502-9521

### 3.6.2. Konstruktion rekombinanter Rhodokokken zur Expression einzelner Gene

Zur Expression der Gene *orf3* bis *orf8* mit *vapA* wurde das *vapA*-Gen mit dem HSP60 Promotor aus pSMT3-*vapA* in den Vektor pRE7 umkloniert. Das Plasmid pSMT3-*vapA* wurde mit *Xba*I und *Hind*III geschnitten und ein 1193 Bp großes Fragment, das *vapA* und den Promotor enthielt, isoliert. Die Enden des Fragments wurden mit Klenow-Polymerase geglättet. Das resultierende Produkt wurde mit dem *Eco*RV linearisierten Vektor pRE7 ligiert, um das Konstrukt pRE7-HSP60-*vapA* zu erhalten. *R. equi*103(-) wurde jeweils mit pSMT3-*orf3*, -*orf4*, -*orf5*, -*orf6*, -*orf7* und -*orf8* zusammen mit pRE7-HSP60-*vapA* transformiert. Die erhaltenen Stämme sollten alle *vapA* und je ein Gen von *orf3* bis *orf8* exprimieren. Die Anwesenheit von VapA in den Rekombinanten wurde mittels Western Blot überprüft. Alle rekombinanten Stämme produzierten VapA (nicht gezeigt).

### 3.6.3. Einfluss der Gene *orf3* bis *orf8* auf Zytotoxizität und intrazelluläre Vermehrung

Rekombinante *R. equi*-Stämme wurden wie zuvor beschrieben auf ihre Zytotoxizität und intrazelluläre Vermehrungsfähigkeit hin untersucht. Als Kontrollen wurden der Wildtyp von *R. equi*103(+) und 103(-) verwendet. Keiner der rekombinanten Stämme war in der Lage, sich in Makrophagen zu vermehren (Abb. 24 A). Zur intrazellulären Vermehrung scheint eine bestimmte Kombination dieser Gene erforderlich zu sein, da sich die Stämme ORF3-6 und ORF4-8 in Makrophagen vermehren (Abb. 18). Die Expression von *orf5*, *orf6*, *orf7* und *orf8* jeweils mit *vapA* in *R. equi*(-) vermittelte eine leicht erhöhte Zytotoxizität (Abb. 24 B). Der Vitalitätsverlust der Wirtszellen erreichte mit 25-35% etwa das Niveau der Stämme ORF3-6, ORF4-8 und ORF5-8 (Abb. 20).



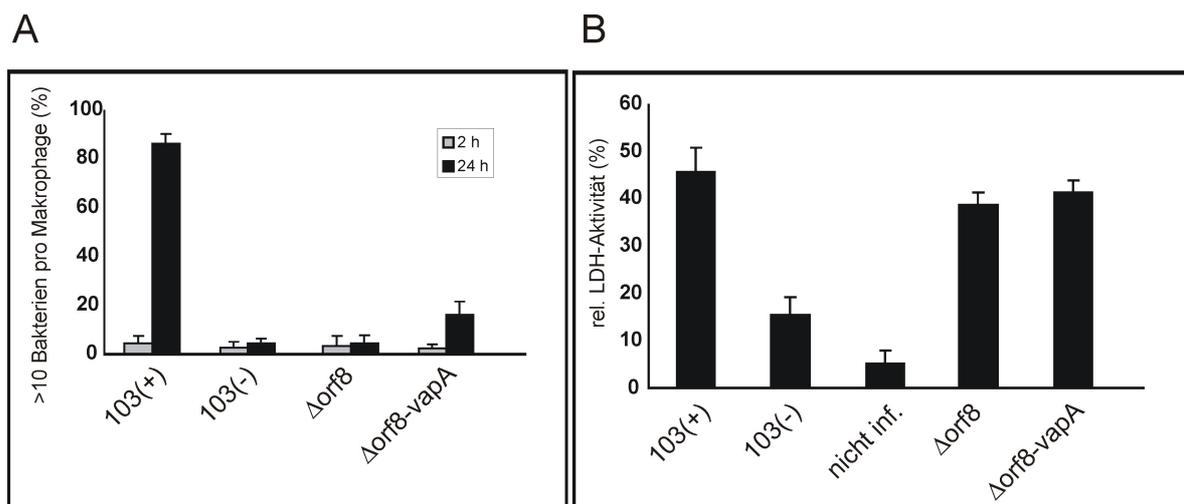
**Abb. 24: Charakterisierung von *orf3* bis *orf8* exprimierenden *R. equi* Rekombinanten**

(A) J774E Makrophagen wurden mit *R. equi*-Stämmen infiziert und Proben nach 2 h und 24 h mit SYTO13 gefärbt. Der Anteil an infizierten Zellen mit mehr als 10 intrazellulären Bakterien von hundert infizierten Zellen wurde bestimmt. (B) LDH-Aktivitäten im Kulturüberstand infizierter Zellen wurden wie zuvor beschrieben mit dem Cytotoxicity Detection Kit von Roche bestimmt. Alle rekombinanten Stämme exprimierten zusätzlich *vapA*. Angegeben sind jeweils Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung.

### 3.7. Komplementierung von *R. equi*Δ*orf8* mit *vapA*

Bislang wurden einige Mutanten von *R. equi*, denen Gene des Virulenzplasmides fehlen, konstruiert und deren Virulenz für Mäuse untersucht. *R. equi*-Mutanten, denen das Gen für *vapA*, *orf8* oder *orf4* fehlen, waren avirulent (Jain et al. 2003; Ren et al. 2004). Über die Kompartimentierung und Zytotoxizität dieser Mutanten ist dagegen nur wenig bekannt. Die Ansäuerung von Phagosomen, die eine *orf8*-Mutante enthalten, entspricht

Phagosomen mit *R. equi*(-). Das Genprodukt von *orf8* reguliert die *vapA*-Expression positiv, weshalb in dieser Mutante kaum VapA produziert wird (Bargen 2005). Es ist daher unklar, ob die Deletion von *orf8*, das Fehlen von VapA oder beides die Bakterien in der Inhibierung der Phagosomenansäuerung beeinträchtigte. Um dieser Frage nachzugehen, wurde eine *orf8* Mutante mit dem Plasmid pSMT3-*vapA* transformiert. Dadurch sollte eine konstitutive *vapA* Expression unabhängig von *orf8* erzeugt werden. Die Komplementante sollte auf ihre Zytotoxizität und intrazelluläre Vermehrungsfähigkeit überprüft werden. Die Expression von *vapA* durch den Vektor pSMT3-*vapA* wurde mittels Western Blot bestätigt (nicht gezeigt). Als Kontrolle dienten der Wildtyp von *R. equi*103(+) und (-) sowie die *orf8*-Mutante. Die Vermehrungsrate von *R. equi*103(+) war in diesen Experimenten fast doppelt so hoch wie in den bisher gezeigten Experimenten. Wie erwartet, konnte sich die *orf8*-Mutante nicht in Makrophagen vermehren. Nach Komplementation dieser Mutante mit konstitutiv exprimiertem *vapA*, zeigte der resultierende Stamm ein geringes intrazelluläres Wachstum (Abb. 25 A).



**Abb. 25: Zytotoxizität und intrazelluläre Vermehrung einer mit *vapA* komplementierten *orf8*-Mutante**

(A) J774E Makrophagen wurden mit *R. equi*-Stämmen infiziert und nach 2 h und 24 h mit SYTO13 gefärbt. Zur Auswertung wurde der Anteil infizierter Zellen mit mehr als 10 intrazellulären Bakterien an jeweils 100 infizierten Zellen bestimmt. (B) LDH-Aktivitäten im Kulturüberstand infizierter Zellen wurden wie zuvor beschrieben mit dem Cytotoxicity Detection Kit von Roche bestimmt. Angegeben sind jeweils Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung.

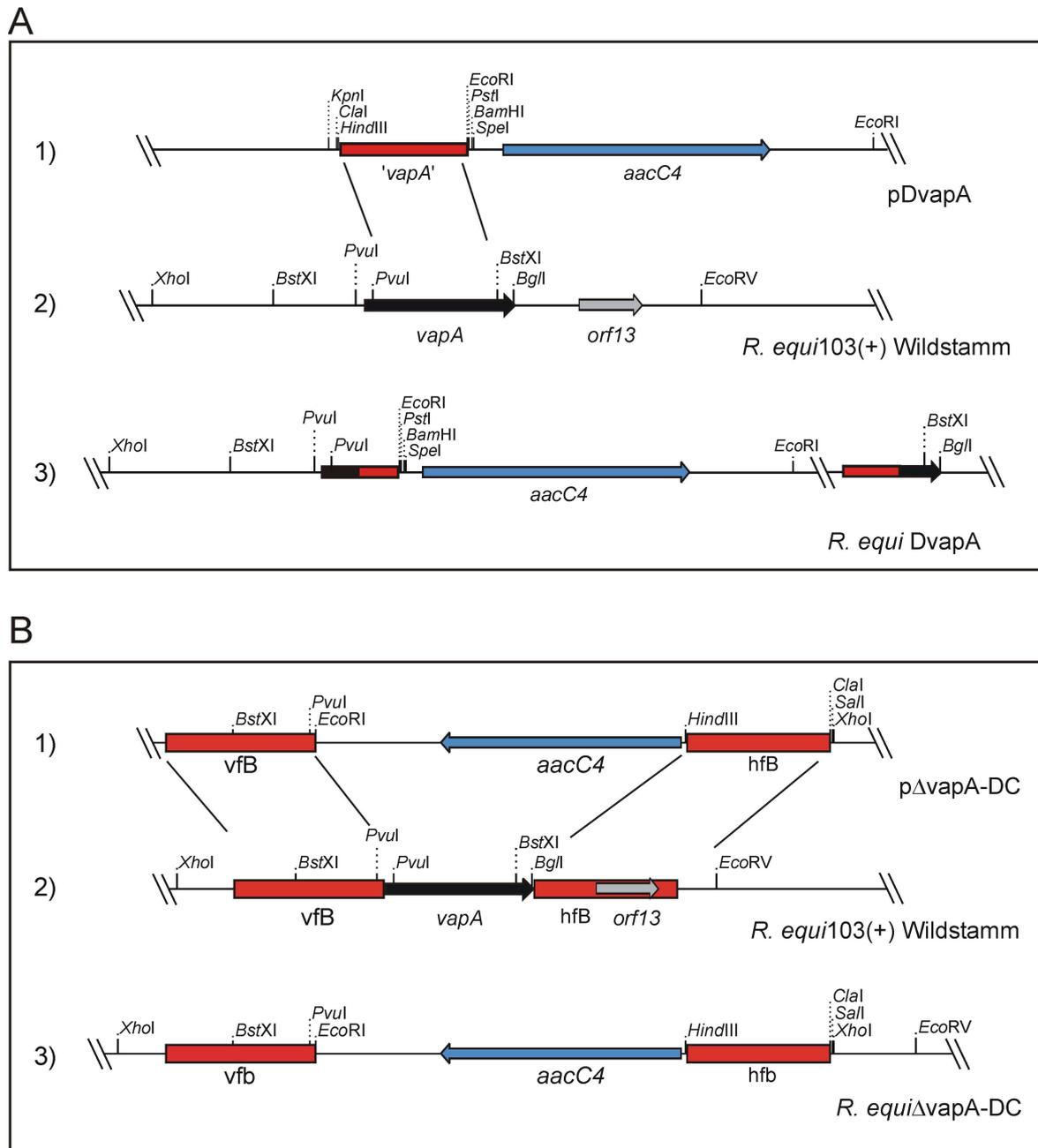
Dabei enthielten etwa 20% der infizierten Zellen mehr als zehn Bakterien. Die intrazelluläre Vermehrung der *vapA* exprimierenden *orf8*-Mutante war damit signifikant höher als die von *R. equi*103(-) ( $p=0,035$ ). Der Stamm *R. equi* $\Delta orf8$  war beinahe ebenso zytotoxisch für Makrophagen wie der Wildtyp *R. equi*103(+). Die zusätzliche Expression von *vapA* in *R. equi* $\Delta orf8$  beeinflusste die Zytotoxizität der Mutante nicht (Abb. 25 B).

### 3.8. Konstruktion einer *vapA*-Mutante von *R. equi*103(+)

Jain et al zeigten, dass eine *vapA*-Mutante avirulent für Mäuse ist und sich nicht in Makrophagen vermehren kann. Die Kompartimentierung und Zytotoxizität dieser Mutante war jedoch unbekannt. Da uns die publizierte *vapA*-Mutante nicht zur Verfügung gestellt wurde, sollte eine eigene Mutante konstruiert und anschließend charakterisiert werden. Zur Deletion des *vapA*-Gens wurden zwei unterschiedliche Strategien verwendet. In der ersten Strategie soll das *vapA*-Gen durch einfach homologe Rekombination (*single cross over*) zerstört werden. In einem zweiten Ansatz sollte das *vapA*-Gen durch doppelt homologe Rekombination deletiert werden (*double cross over*, DC). Zur Konstruktion einer *vapA*-Mutante durch doppelt homologe Rekombination wurde der Vektor pVlacZ verwendet, der eine zusätzliche Blau-Weiß-Selektion auf Integration des Vektors (blau) und doppelt homologe Rekombination (weiss) ermöglicht (Ren et al. 2004). Eine schematische Darstellung der Strategien ist in Abbildung 26 gezeigt.

#### 3.8.1. Konstruktion des Plasmids pDvapA

Zur Konstruktion des Plasmides pDvapA wurde das *vapA* Gen zunächst mittels PCR und den in Tabelle 5 aufgeführten Primern synthetisiert. Als Matrize diente das Plasmid p103. Das PCR Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *PvuI* und *BstXI* geschnitten und ein 476 Bp großes Fragment isoliert, das von der Position 12581 zur Position 13056 des Virulenzplasmids p103 reichte. Die Enden des Fragments wurden anschließend mit Klenow Polymerase geglättet und mit *EcoRV* geschnittenem Vektor pBluescript SK+ ligiert. Das resultierende Plasmid pBlue-'vapA' wurde mit *SmaI* linearisiert und mit einem Apramycin-Resistenzgen haltigem 1,5 kbp großen und ebenfalls geglätteten *PstI* Fragment aus dem Vektor pVK173T ligiert, um den Vektor pDvapA zu erhalten.



**Abb. 26: Strategien zur Konstruktion von *vapA* Mutanten von *R. equi*103(+)**

(A) Disruption des *vapA*-Gens durch einfach homologe Rekombination. 1) Das Plasmid pDvapA ist ein Derivat von pBluescript SK+ II und enthält den mittleren Bereich des *vapA*-Gens (rot) sowie das Apramycin-Resistenzgen (*aacC4*, blau). 2) Durch einfach homologe Rekombination im Leserahmen des *vapA*-Gens wird das Plasmid pDvapA in das Virulenzplasmid p103 integriert. 3) Das *vapA*-Gen (schwarz) wird durch die Integration von pDvapA zerstört. (B) Deletion des *vapA*-Gens durch doppelt homologe Rekombination. 1) Das Plasmid pΔvapA-DC ist ein Derivat von pPvlacZ. Es enthält das Apramycin Resistenzgen (blau) flankiert von einem vorderen- (*vfB*) und einem hinteren (*hfB*) Bereich (rot). Die flankierenden Bereiche sind DNA-Abschnitte, die den *vapA* umgebenden Bereichen des Virulenzplasmids entsprechen und durch PCR hergestellt wurden. 2) Durch doppelt homologe Rekombination in den flankierenden Bereichen (rot) wird das *vapA*-Gen (schwarz) durch das Apramycin Resistenzgen ausgetauscht. 3) Die resultierende Mutante *R. equi*ΔvapA-DC besitzt anstelle des *vapA*-Gens das *aacC4*-Gen. Das Gen *orf13* bleibt bei diesem Vorgang erhalten, da es im hinteren flankierenden Bereich enthalten ist.

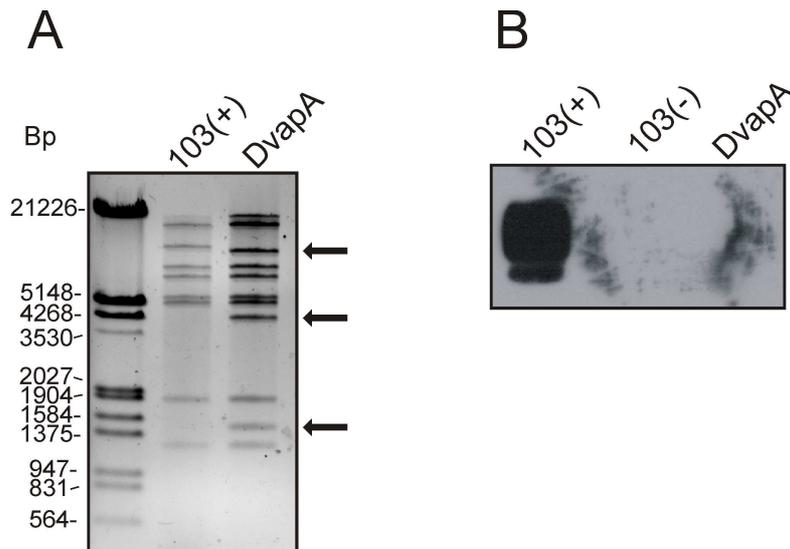
### 3.8.2. Konstruktion von *R. equi*-DvapA

*R. equi*103(+) wurden durch Elektroporation mit einzelsträngiger Plasmid-DNA von pDvapA transformiert. Transformanten wurden auf BHI-Medium vermehrt mit Apramycin selektiert. Es wurde ein Klon erhalten, der weiter untersucht wurde. Eine Western Blot-Analyse zeigte, dass dieser Klon kein detektierbares VapA mehr produzierte (Abb. 27 B). Zur weiteren Kontrolle wurde eine Restriktionsanalyse des mutierten Virulenzplasmids mit *Eco*RI durchgeführt. Durch die Integration von pDvapA werden zwei zusätzliche *Eco*RI-Schnittstellen in das Virulenzplasmid eingeführt. Dadurch wird das 10 kBp große Fragment des Virulenzplasmids in drei neue Fragmente aufgeteilt, die 9388 kBp, 4154 kBp und 1487 kBp groß sind (Tab. 11). Das 1,5 kBp große Fragment enthält das Apramycin-Resistenzgen. Das 4 kBp große Fragment reicht von der *Eco*RI Schnittstelle an Position 8895 des Wildtyp Plasmids bis zur Schnittstelle vor dem *aacC4*-Gen des Vektors. Das dritte Fragment beinhaltet den übrigen Teil des Vektors und reicht bis zur *Eco*RI Schnittstelle an Position 18999 des Virulenzplasmids (Abb. 27 C). Wie in Abbildung 27 A zu erkennen ist, wurden diese drei Fragmente aus dem veränderten Virulenzplasmid des Stammes *R. equi*-DvapA erhalten. Die Größen der Fragmente entsprechen den errechneten Werten. Da der Vektor pDvapA keinen Replikationsursprung für Rhodokokken besitzt, kann dieses Plasmid nicht autonom in *R. equi* replizieren.

**Tab. 11: *Eco*RI Fragmente des veränderten Virulenzplasmids**

Angegeben sind errechnete Größen von *Eco*RI Fragmenten der Virulenzplasmide aus *R. equi*103(+) (Wildstamm) und *R. equi*-DvapA. Fragmente, die durch Integration des Vektors pDvapA in das Virulenzplasmid p103 entstanden sind, wurden fett gedruckt.

p103 Wildstamm (kBp)	<i>R. equi</i> -DvapA (kBp)
27461	27461
15382	15382
10104	<b>9388</b>
7647	7647
6733	6733
5222	5222
4923	4923
1888	<b>4154</b>
1249	1888
	<b>1487</b>
	1249



**Abb. 27: Genetische und biochemische Analyse der *vapA*-Mutante**

(A) Virulenzplasmide aus *R. equi*103(+) und DvapA wurden isoliert, über Nacht mit *EcoRI* behandelt und in einem 0,8%igen Agarose-Gel aufgetragen. Pfeile markieren Fragmente, die nach Integration des Vektors pDvapA in das Virulenzplasmid p103 entstanden sind. Als Größenmarker diente *EcoRI/HindIII* geschnittene  $\lambda$ -DNA. Die Größen wurden in Basenpaaren (Bp) angegeben. (B) Protein von  $10^8$  Zellen von *R. equi*103(+), (-) und DvapA wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Das VapA-Protein wurde mit einem Antikörper markiert und durch Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

### 3.8.3. Konstruktion des Plasmids p $\Delta$ vapA-DC

Zur Konstruktion des Plasmids p $\Delta$ vapA-DC wurden DNA-Abschnitte mittels PCR amplifiziert, die jeweils den flankierenden Bereich vor und hinter dem *vapA*-Gen enthalten (vorderer und hinterer flankierender Bereich, vfB/hfB). Hierzu wurden die in Tabelle 12 aufgeführten Primer verwendet. Als Matrize diente das Plasmid p103. Das PCR-Produkt zur Konstruktion des vorderen flankierenden Bereichs (vfB) und der Vektor pPvlacZ wurden mit *XbaI* und *EcoRI* geschnitten und anschließend ligiert. Das daraus erhaltene Produkt sowie das PCR-Produkt zur Konstruktion des hinteren flankierenden Bereichs (hfB) wurden mit *HindIII* und *Clal* geschnitten und ligiert. Dieses Produkt wurde wiederum mit *EcoRV* geschnitten und mit dem *aacC4*-Gen ligiert, das mit *PstI* aus pVK173T ausgeschnitten und durch Klenow Polymerase geglättet wurde. Da der Vektor p $\Delta$ vapA-DC keinen Replikationsursprung für Rhodokokken besitzt, kann sich dieses Plasmid nicht autonom in *R. equi* replizieren.

**Tab. 12: PCR-Primer zur Herstellung der flankierenden Bereiche des *vapA*-Gens**

Die zusätzlichen Restriktionsschnittstellen für *Xba*I, *Eco*RI, *Hind*III und *Cl*I sind in der Primersequenz unterstrichen. Die Nummerierung erfolgte anhand der Sequenz des Plasmids p103.

Primer	Sequenz	Schnittstelle	Position
vfB-1	5'-GCTCTAGAGGCCGTCGAAGTTGCAAGCG -3'	<i>Xba</i> I	11924-11943
vfB-2	5'-CGGAATTCCTTTTCGGACGTCGCCCTTCG -3'	<i>Eco</i> RI	12516-12536
hfB-1	5'-CCCAAGCTTCGCGGTCCAGAAACATGCAGG -3'	<i>Hind</i> III	13219-13239
hfB-2	5'-CCATCGATGCGCCGGATTGGACGTGCC -3'	<i>Cl</i> I	13787-13805

### 3.8.4. Konstruktion von *R. equi*Δ*vapA*-DC

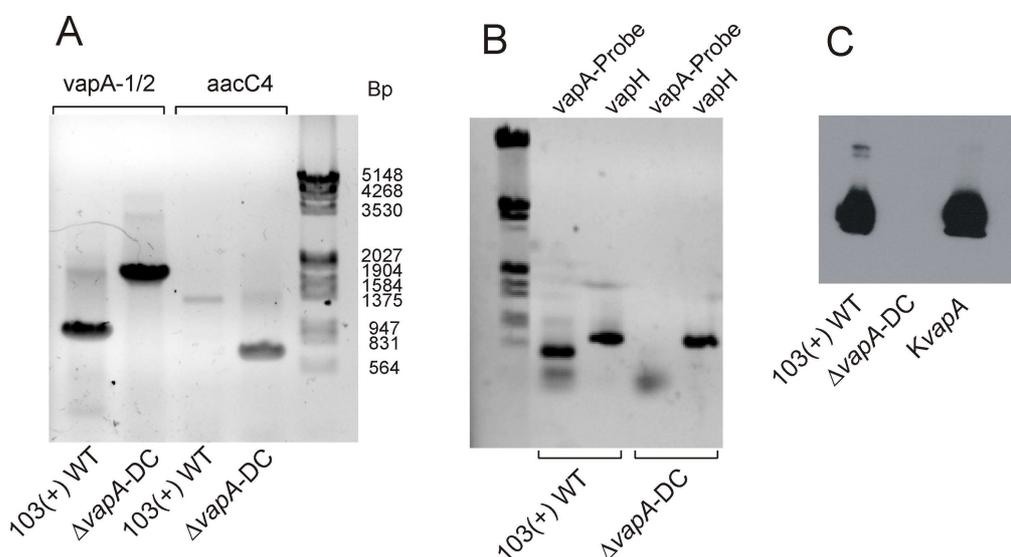
*R. equi*103(+) wurde durch Elektroporation mit einzelsträngigem Plasmid pΔ*vapA*-DC transformiert und Transformation auf BHI-Medium mit Apramycin und X-Gal selektiert. Es wurden 5 blaue Kolonien erhalten, die durch einfach homologe Rekombination des Vektors mit dem Virulenzplasmid entstanden waren. Um die zweite Rekombination zu ermöglichen, wurden die Klone mehrmals hintereinander zwei Tage bei 37°C in BHI mit Apramycin subkultiviert und erneut ausplattiert. In der fünften Generation wurden drei weiße und etwa 100 blaue Kolonien erhalten. Nur einer der weißen Klone produzierte kein VapA mehr. Zur Überprüfung der Mutation wurde eine PCR-Analyse des Klons durchgeführt. Für die PCR Analyse wurden die in Tabelle 13 aufgeführten Primer verwendet. Als Kontrolle wurde das Virulenzplasmid aus *R. equi*103(+) verwendet. Die Primer *vapA*-1 und 2 binden außerhalb des codierenden Bereiches von *vapA* und produzieren in einer PCR ein 941 Bp großes Fragment, welches das *vapA*-Gen sowie einen Teil der flankierenden Bereiche enthält. Das Primerpaar *vapA*-Probe bindet im codierenden Bereich von *vapA* und produziert in einer PCR ein 535 Bp großes Fragment. Mit den Primern *aacC4*-F und R wird ein 743 Bp großes Fragment des Apramycin-Resistenz-Gens amplifiziert. Mit dem Primerpaar *vapA*-Probe und dem Wildstamm Plasmid als Matrize wurde ein etwa 500 Bp großes Fragment amplifiziert. Dieses Fragment konnte mit dem mutierten Plasmid nicht erhalten werden (Abb. 28 B). Das Apramycin-Resistenz-Gen konnte dagegen nur mit Plasmiden aus *R. equi*Δ*vapA*-DC nachgewiesen werden. Mit Primern, die in den flankierenden Bereichen von *vapA* binden, wurde mit Wildstamm-DNA ein etwa 1 kBp großes Fragment synthetisiert (Abb. 28 A). Bei Verwendung des veränderten Plasmids als Matrize, wurde ein etwa 1,8 kBp großes Fragment erhalten (Abb. 28 A). Die Größe dieses Fragments ergibt sich aus der Größe

des *aacC4*-Fragments (1,5 kBp) und Teilen der flankierenden Bereiche des *vapA*-Gens (167 Bp). Diese Ergebnisse zeigen, dass das *vapA*-Gen in *R. equi* $\Delta$ *vapA*-DC durch das Apramycin-Resistenz-Gen ersetzt worden war. Das *vapH*-Gen (*orf6*) konnte im veränderten sowie im Wildstamm-Plasmid nachgewiesen werden (Abb. 28 B). Dies legt nahe, dass das Virulenzplasmid in *R. equi* $\Delta$ *vapA*-DC intakt ist. Zur Komplementation wurde die Mutante mit dem Plasmid pSMT3-*vapA* transformiert (Abb. 28 C).

**Tab. 13: PCR-Primer zur Herstellung der flankierenden Bereiche des *vapA*-Gens**

Die Nummerierung erfolgte anhand der Sequenz des Virulenzplasmids p103.

Primer	Sequenz	Position
vapA-1	5'-GCTAGAGAAGAGATCTTCCGCTCC-3'	12306-12329
vapA-2	5'-CCTCGCAGCCTGCATGTTTCTGG-3'	13225-13247
vapA-Sonde 1	5'-GCGATCGCAGCCACAGCCGT-3'	12576-12595
vapA-Sonde 2	5'-GCGTTGTGCCAGCTACCAGAG-3'	13091-13111
aacC4-F	5'-CGGTGGAGTGCAATGTCGTGC-3'	
aacC4-R	5'-GCGGATGCAGGAAGATCAACGG-3'	



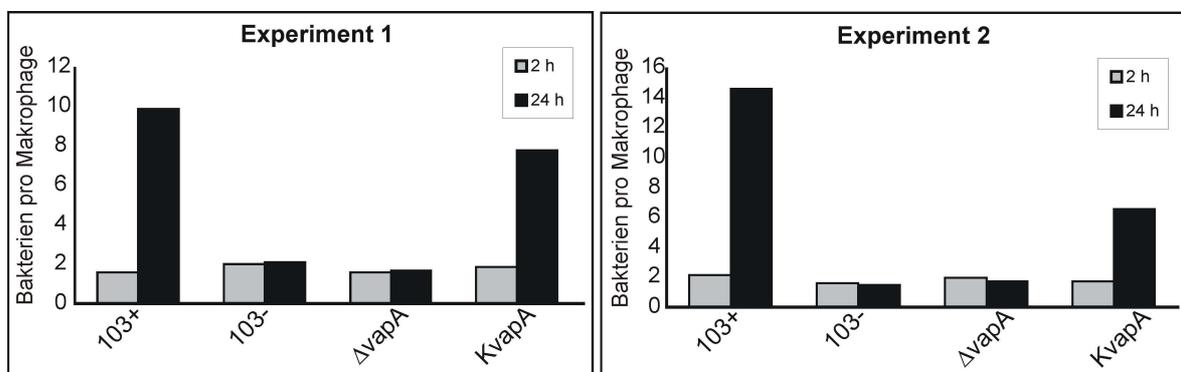
**Abb. 28: PCR und Western-Blot Analyse von *R. equi* $\Delta$ *vapA*-DC**

(A) PCR Analyse der Virulenzplasmide aus *R. equi*103(+) und *R. equi* $\Delta$ *vapA*-DC mit den Primerpaaren *vapA* und *aacC4*. Als Größenmarker wurde *EcoRI/HindIII* geschnittene  $\lambda$ -DNA verwendet. (B) PCR Analyse der Virulenzplasmide aus *R. equi*103(+) und *R. equi* $\Delta$ *vapA*-DC mit den Primerpaaren *vapA*-Sonde und *ORF6/vapH* (Tab. 8). (C) Western-Blot Analyse der *vapA*-Mutante. Gesamtprotein von *R. equi*103(+), $\Delta$ *vapA*-DC und *KvapA* wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Der Nachweis des VapA-Proteins erfolgte durch einen VapA-Antikörper.

### 3.9. Charakterisierung der *vapA*-Mutante von *R. equi*103(+)

#### 3.9.1. Intrazelluläre Vermehrung der *vapA*-Mutante

Die intrazelluläre Vermehrungsfähigkeit von *R. equi*Δ*vapA*-DC und der Komplementante *KvapA* wurden wie zuvor beschrieben untersucht. Als Kontrollen dienten die Wildstämme *R. equi*103(+) und (-). Die *vapA*-Mutante war im Gegensatz zum Wildstamm 103(+) nicht in der Lage sich in Makrophagen zu vermehren (Abb. 29). Die Anzahl der Bakterien pro Makrophage entsprach in Proben mit *R. equi*Δ*vapA*-DC sowohl nach 2 als auch nach 24 Stunden etwa den Werten von Proben mit *R. equi*103(-).



**Abb. 29: Intrazelluläre Vermehrung der *vapA*-Mutante**

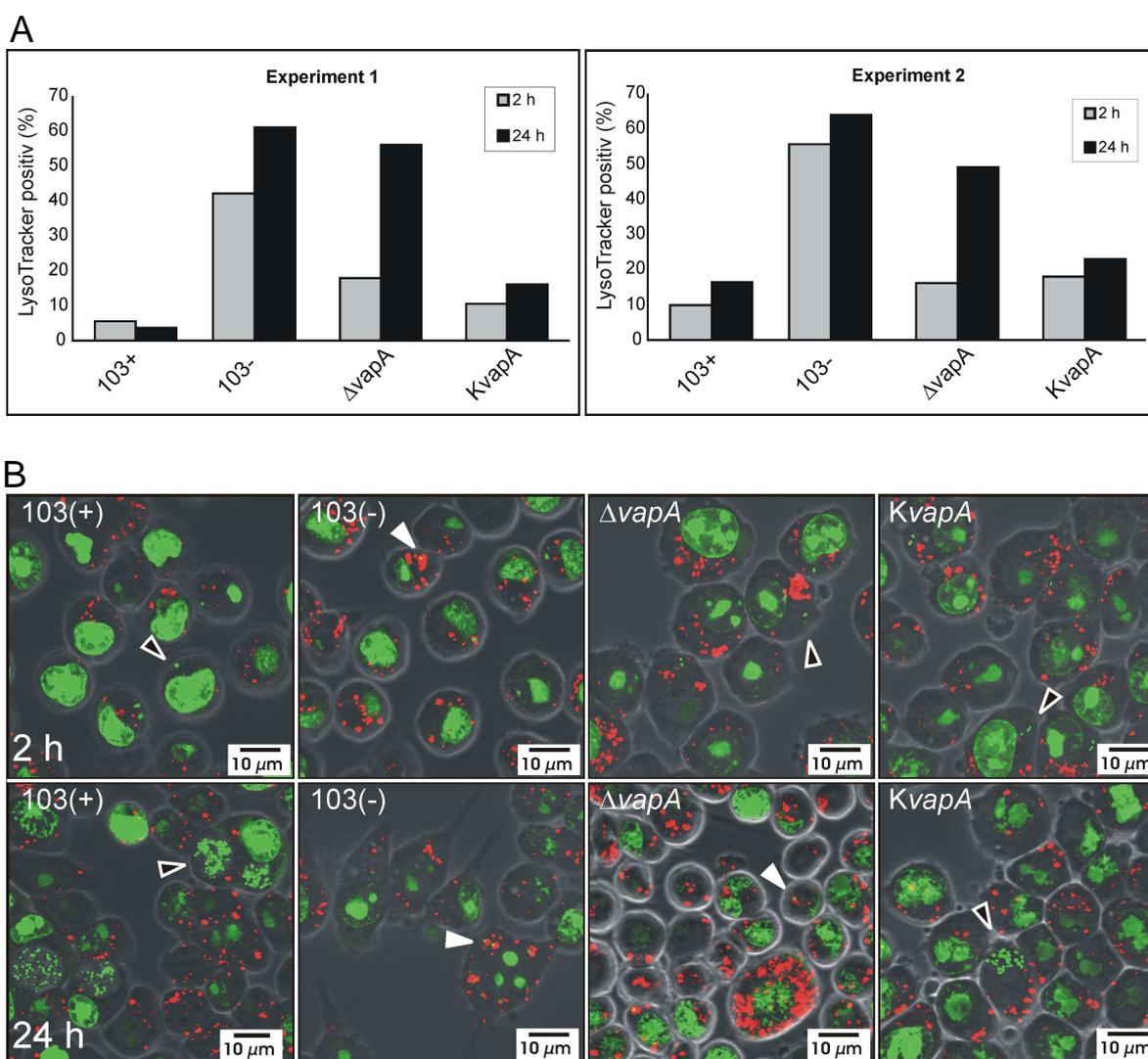
J774E Makrophagen wurden mit einer MOI von 1 mit *R. equi*103(+), (-), Δ*vapA*-DC und der komplementierten Mutante (*KvapA*) infiziert und nach 2 h und 24 h mit SYTO13 gefärbt. Angegeben ist die durchschnittliche Anzahl von Bakterien pro infizierter Zelle. Gezeigt sind die Ergebnisse von 2 unabhängigen Experimenten.

Die intrazelluläre Vermehrung konnte durch Komplementation der Mutante mit dem Vektor pSMT3-*vapA* teilweise wiederhergestellt werden. Im Vergleich zum Wildstamm erreichte die Komplementante nach 24 Stunden im ersten Experiment etwa 78% im zweiten 45% der intrazellulären Bakterienzahl. Die durch Integration erzeugte *vapA*-Mutante (*R. equi*-Δ*vapA*) war ebenfalls nicht in der Lage sich intrazellulär zu vermehren (nicht gezeigt). Die Unfähigkeit der *vapA*-Mutante sich in Makrophagen zu vermehren beruhte nicht auf einem metabolischen Defekt. Die Mutante wuchs auf Minimalmedium mit der gleichen Verdopplungszeit wie der Wildstamm (nicht gezeigt).

#### 3.9.2. Kolokalisation mit LysoTracker

J774E Makrophagen wurden mit *R. equi*Δ*vapA*-DC und dem komplementierten Stamm (*KvapA*) infiziert und nach 2 und 24 Stunden mit LysoTracker und SYTO13 gefärbt. Als

Kontrollen wurden die Wildstämme *R. equi*103(+) und 103(-) verwendet. Wie erwartet, kolokalisierte sowohl nach 2 als auch nach 24 Stunden nur ein geringer Anteil von *R. equi*103(+) mit LysoTracker, aber mehr als 50% aller *R. equi*103(-) (Abb. 30). Nur 15-20% von Bakterien der *vapA*-Mutante kolokalisierte nach 2 Stunden mit LysoTracker, aber 45-55% nach 24 Stunden. 15-20% der mit *vapA* komplementierten Mutante kolokalisierte nach 2 und 24 Stunden. Dieses Resultat zeigt, dass die *vapA*-Mutante die Ansäuerung der Phagosomen zunächst verhindert, diesen Zustand aber nicht aufrecht erhalten kann. Durch die Komplementierung konnte diese Eigenschaft wiederhergestellt werden. Die durch Integration erzeugte *vapA*-Mutante (*R. equi*-D*vapA*) zeigte die gleichen Eigenschaften wie der Stamm *R. equi* $\Delta$ *vapA*-DC (nicht gezeigt).

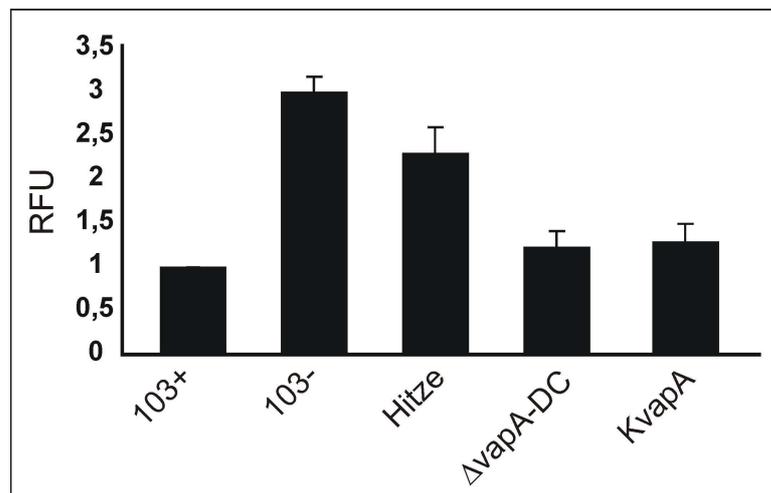


**Abb. 30: Kolokalisation der *vapA*-Mutante mit LysoTracker**

J774E Makrophagen wurden mit den angegebenen *R. equi*-Stämmen infiziert und Proben nach 2 h und 24 h mit LysoTracker und SYTO13 gefärbt. (A) Zur Auswertung wurde der Anteil von Bakterien bestimmt, die mit LysoTracker kolokalisierten. Gezeigt sind Ergebnisse aus 2 unabhängigen Experimenten. (B) Repräsentative Aufnahmen von LysoTracker Epifluoreszenzen. Weiße Pfeilköpfe zeigen auf kolokalisierte, schwarze Pfeilköpfe auf nicht kolokalisierte Bakterien.

### 3.9.3. Fusion von Phagosomen mit Lysosomen

Zur Quantifizierung der Fusion von Phagosomen mit Lysosomen wurde eine wie in Kapitel 3.5.8 beschriebene FRET-Analyse durchgeführt. Neben den Wildstämmen *R. equi*103(+) und 103(-) wurden mit Hitze getötete *R. equi*103(+) als Kontrollen verwendet. Zwei Stunden nach Infektion fusionierten Phagosomen, die eine *vapA*-Mutante enthielten, kaum mehr mit Lysosomen als Phagosomen mit *R. equi*103(+). Phagosomen mit *R. equi*103(-) und getöteten *R. equi*103(+) fusionierten hingegen deutlich mehr als Phagosomen mit *R. equi*103(+) (Abb. 31). Phagosomen mit der komplementierten *vapA*-Mutante (KvapA) fusionierten ebenfalls kaum mit Lysosomen. Die *vapA*-Mutante ist demnach in der Lage, sowohl die Fusion von Lysosomen mit Phagosomen als auch die Ansäuerung der Phagosomen zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion zu inhibieren. Eine FRET-Analyse mit *R. equi*-DvapA erbrachte ähnliche Ergebnisse (nicht gezeigt).



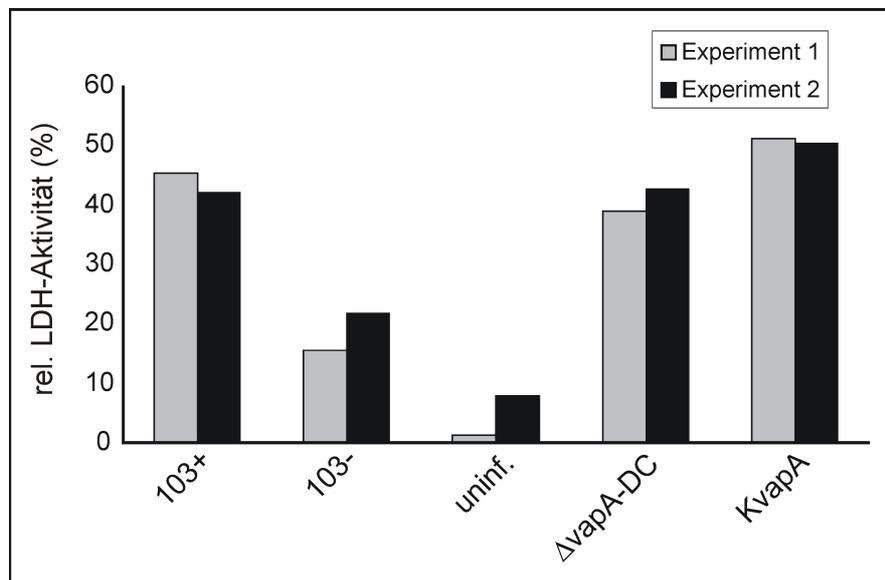
**Abb. 31: FRET-Analyse von *R. equi*ΔvapA-DC- enthaltenden Phagosomen**

J774E Makrophagen wurden mit BSA-Rhodamin inkubiert und nach Waschen mit ATTO488 markierten Bakterien infiziert. 2 h nach Infektion wurden die Zellen geerntet und FRET-Signale mit einem Fluorometer gemessen. Das FRET-Signal in Proben mit 103(+) wurde als 1 definiert. FRET-Signale der anderen Proben wurden in Relation zu den Werten von 103(+) gesetzt und als relative fluorescence units (RFU) angegeben. Gezeigt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

### 3.9.4. Zytotoxizität der *vapA*-Mutante

Die Zytotoxizität der *vapA*-Mutante wurde wie in Kapitel 3.4.5. beschrieben bestimmt. Als Kontrollen wurden die Wildstämmen *R. equi*103(+) und 103(-) sowie die komplementierte Mutante (KvapA) verwendet. Der Vitalitätsverlust in Proben mit *R. equi*ΔvapA-DC und KvapA war etwa gleich groß wie in Proben mit *R. equi*103(+) (Abb. 32). Da die *orf8*-Mutante, die auch kein VapA mehr produziert, zytotoxisch für Wirtszellen ist, war dieser

Befund zu erwarten. Die Zytotoxizität von *R. equi*-DvapA war ebenfalls so hoch wie die des Wildstamms 103(+) (nicht gezeigt).



**Abb. 32 Relative Zytotoxizität der *vapA*-Mutante**

J774E-Zellen wurden mit *R. equi*103(+), 103(-),  $\Delta vapA$ -DC und KvapA zu einer MOI von 30 infiziert oder uninfiziert belassen (uninf.). Nach 24 h Inkubation wurden relative LDH-Aktivitäten in Kulturüberständen infizierter Makrophagen ermittelt. Die Enzymaktivitäten wurden mit Hilfe des Cytotoxicity Detection Kit von Roche bestimmt. Angegeben sind Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten.

### 3.9.5. Akquisition der vATPase

Wie in Kapitel 3.9.2 beschrieben, inhibiert oder verzögert eine *vapA*-Mutante die Ansäuerung von Phagosomen nur vorübergehend. Es sollte nun geklärt werden, ob *R. equi* $\Delta vapA$ -enthaltende Phagosomen vATPase akquirieren. Um diese Frage zu beantworten, wurde ein Fusionsprotein konstruiert, das aus dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) und der E-Untereinheit der vATPase (VatE) besteht. Durch diese Fusion sollte nach Transfektion von Makrophagen die vATPase mit Hilfe von konfokaler Lasermikroskopie sichtbar gemacht werden. Die Verwendung eines vATPase-GFP Fusionsproteins gegenüber einer herkömmlichen Antikörperfärbung beinhaltet folgende Vorteile:

- *R. equi* reagiert mit einer Vielzahl von vATPase-Antikörpern kreuz. Der Gebrauch eines GFP-Fusionsproteins umgeht dieses Problem.
- Es lassen sich viele Proben in kurzer Zeit analysieren.

- Mit Hilfe dieses Konstruktes ist die Erzeugung einer stabil transfizierten Zell-Linie möglich, die sowohl weitere Analysen von *R. equi*-Mutanten als auch *live cell imaging*-Untersuchungen erlauben.

### 3.9.5.1. Konstruktion des Vektors pvatE-gfp

Das Maus-Gen für die E-Untereinheit der vATPase (*vatE*) wurde als cDNA von RZPD (Berlin) erhalten. Durch eine PCR mit den in Tabelle 11 aufgeführten Primern wurde das *vatE*-Gen amplifiziert. Durch den Primer vATPase-E-rev wurde in das *vatE*-Gen eine Mutation eingeführt, die das Stop-Codon (TGA) in ein Serin-Codon (TCA) umwandelt. Dadurch wurde das Gen um sechs Aminosäuren erweitert. Die zusätzlichen Schnittstellen in den Primern ermöglichten eine *in frame* Klonierung in den Vektor pEGFP-N1 und damit eine Fusion von *vatE* und *egfp*. Das PCR-Produkt und der Vektor wurden mit *EcoRI* und *KpnI* geschnitten und ligiert. Zur Kontrolle wurde das Gen sowie der mutierte Bereich sequenziert. Die Sequenzierung bestätigte eine korrekte Fusion von *vatE* mit dem *egfp*-Gen des Vektors.

**Tab. 11: PCR-Primer zur Herstellung eines VatE-EGFP Fusionsproteins**

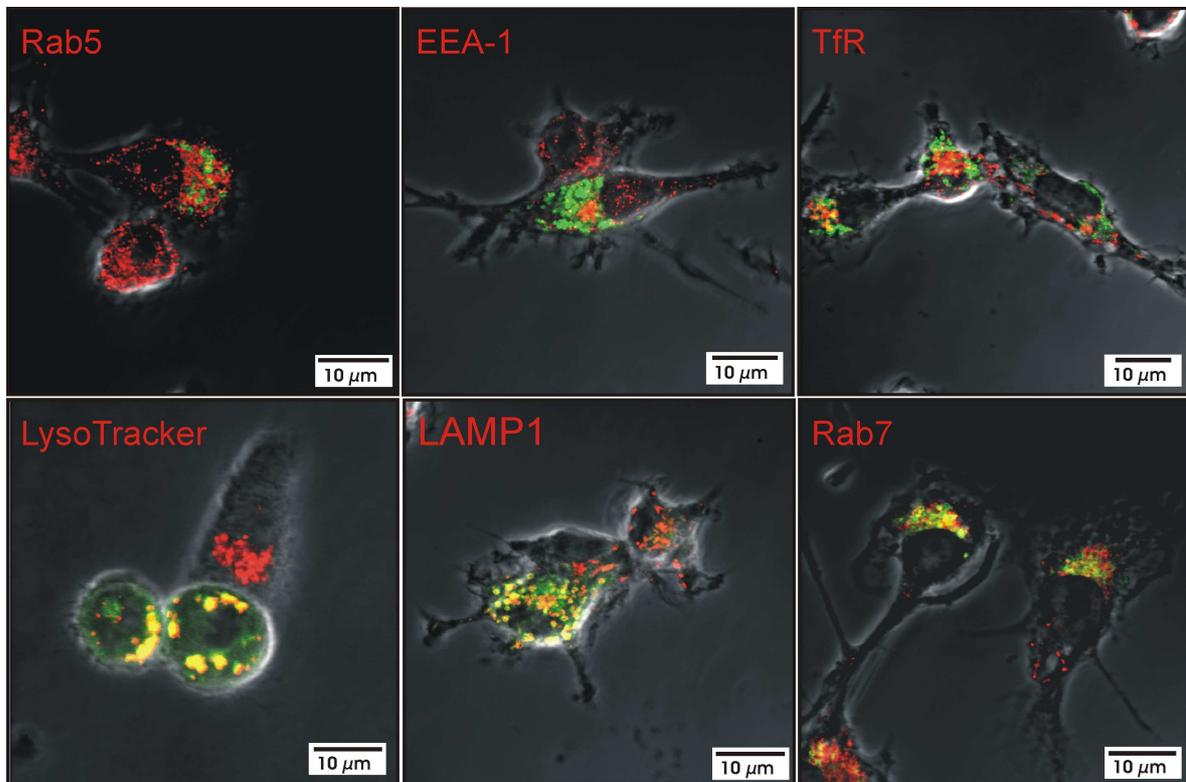
Zusätzliche Schnittstellen für *EcoRI* und *KpnI* in der Primersequenz wurden unterstrichen. Das mutierte Nukleotid wurde fett und kursiv gedruckt.

Primer	Sequenz	Schnittstelle
vATPase-E-forw	5'- <u>GGAATT</u> CCGGACTTTGCCTTCGCCATG-3'	<i>EcoRI</i>
vATPase-E-rev	5'-GGGGT <u>ACCCTGAAGCTGAGTCCAGAACTTCC</u> -3'	<i>KpnI</i>

### 3.9.5.2. Kolokalisation des Fusionsproteins mit endozytischen Markern

Zur Validierung der Kolokalisation des Fusionsproteins mit spät-endosomalen und lysosomalen Markern wurden RAW264.7-Zellen mit dem Vektor pvatE-gfp transfiziert. Transfizierte Zellen wurden fixiert und mit Antikörpern gegen verschiedene Proteine des endozytischen Systems markiert. Zusätzlich wurden lebende transfizierte Zellen mit LysoTracker gefärbt. In transfizierten Makrophagen konnte ein schwaches Signal grüner Fluoreszenz detektiert werden, das in Zellen ringförmige Strukturen aufwies (Abb. 33). Das Grün-Signal kolokalisierte fast vollständig mit LysoTracker und LAMP-1, und partiell

mit Rab7. Die Marker Rab5, EEA-1 und TfR kolokalisierten dagegen nicht mit dem EGFP-Fusionsprotein. Demzufolge kolokalisiert das Fusionsprotein mit spät- nicht aber mit früh-endozytischen Markern. Diese Ergebnisse sprechen für einen Einbau des VatE-EGFP Fusionsproteins in den vATPase-Komplex, ohne dessen Lokalisation zu beeinträchtigen.

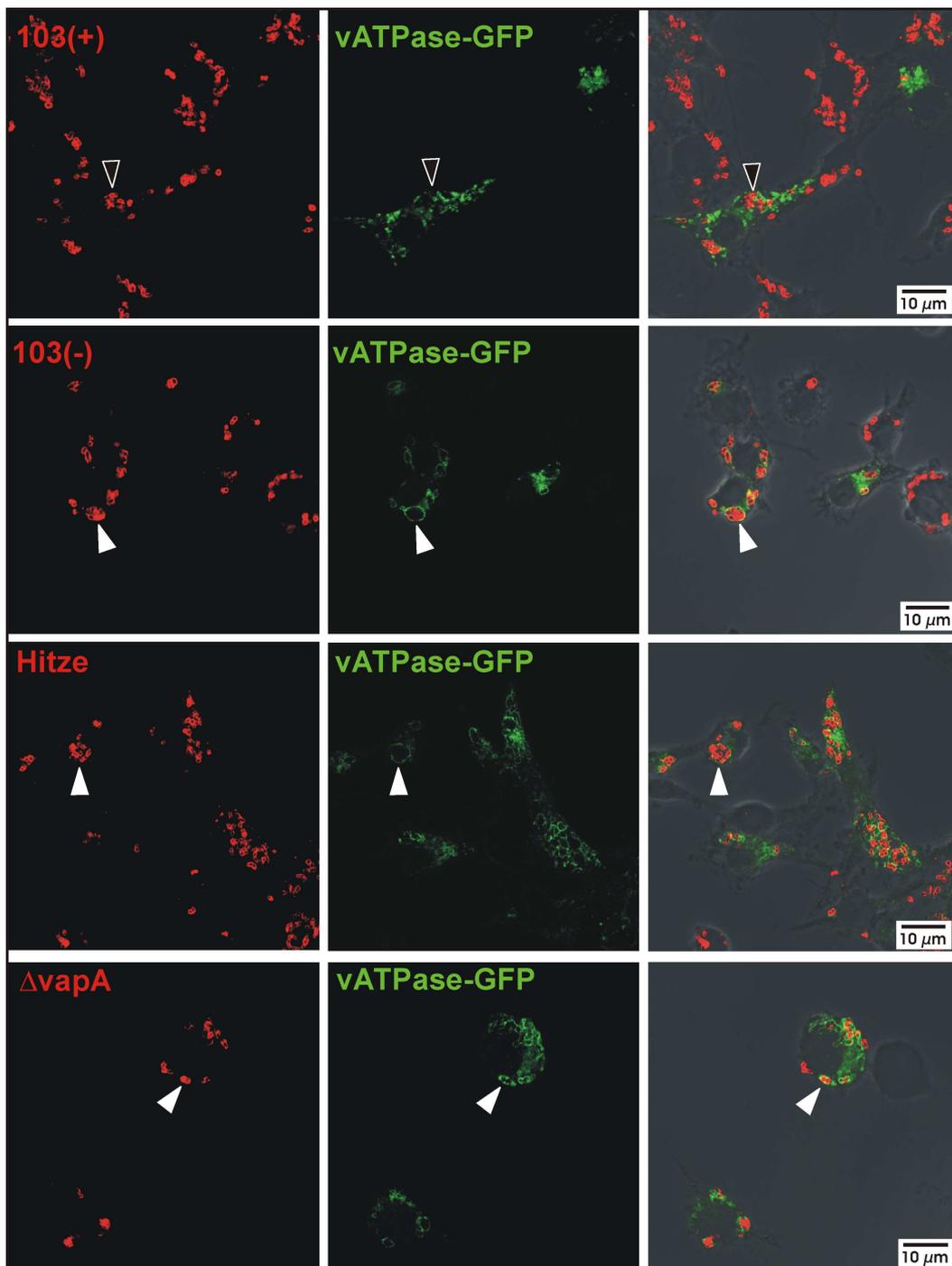


**Abb. 33: Kolokalisation des vATPase-EGFP Fusionsproteins mit endozytischen Markern**

RAW264.7 Makrophagen wurden mit 30 µg DNA des Vektors pvatE-egfp transfiziert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zellen wurden entweder fixiert und mit Antikörpern gegen angegebene Proteine markiert oder direkt mit LysoTracker gefärbt. Aufnahmen wurden mit Hilfe eines CLSM erstellt. Endozytische Marker sind in rot, das vATPase-EGFP Protein in grün dargestellt.

### 3.9.5.3. Kolokalisation des Fusionsproteins mit *R. equi*-DvapA

Mit pvatE-egfp transfizierte RAW264.7 Makrophagen wurden mit *R. equi*-DvapA infiziert und nach 2 Stunden fixiert. Bakterien wurden durch eine Antikörperfärbung sichtbar gemacht. Als Kontrollen dienten die Wildstämme *R. equi*103(+) und 103(-) sowie durch Hitze getötete *R. equi*103(+). Wie erwartet kolokalisierte die Mehrzahl lebender Bakterien von *R. equi*103(+) nicht mit dem vATPase-Komplex. Beinahe alle Phagosomen, die getötete Bakterien, *R. equi*103(-) oder DvapA enthielten, akquirierten hingegen die vATPase (Abb. 34). Demnach ist die *vapA*-Mutante nicht mehr in der Lage die Akquisition der vATPase auf Phagosomen zu verhindern.

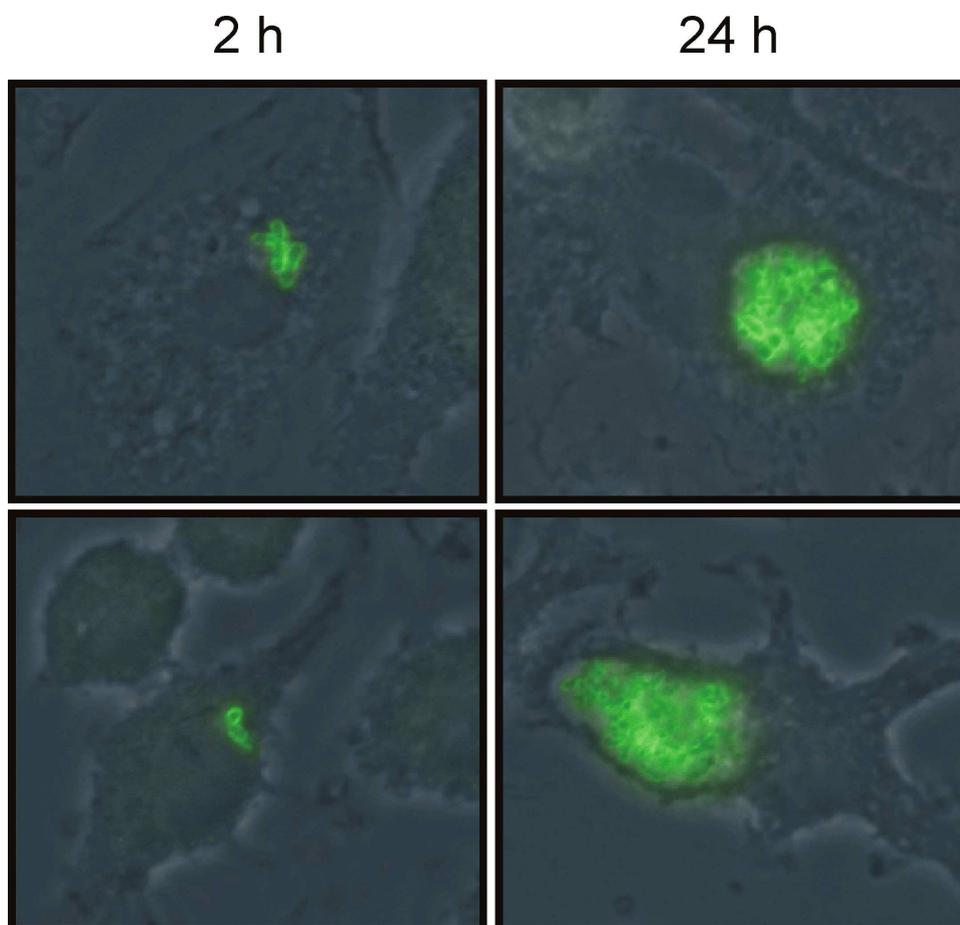


**Abb. 34: Kolokalisation von *R. equi* $\Delta vapA$  mit vATPase**

Mit *pvatE-egfp* transfizierte RAW264.7 Zellen wurden für 1 h mit *R. equi*103(+), (-),  $\Delta vapA$  und Hitze getöteten 103(+) infiziert und nach 2 h Inkubation mit PFA fixiert. Bakterien (rot) wurden durch eine Antikörperfärbung sichtbar gemacht. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen, die mit Hilfe eines CLSM erstellt wurden. Schwarze Pfeilköpfe zeigen auf nicht kolokalisierende, weiße Pfeilköpfe auf kolokalisierende Bakterien.

### 3.10. Lokalisation des VapA-Proteins während des Wachstums von *R. equi* in Makrophagen

VapA ist ein wichtiger Virulenzfaktor von *R. equi*, der acyliert und in der Zellwand der Bakterien verankert wird (Meijer und Prescott 2004). Es ist allerdings unklar, ob dieses Protein während einer Infektion an die Umgebung abgegeben wird. Um dieser Frage nachzugehen, wurden primäre Mausmakrophagen mit *R. equi*103(+) infiziert und nach 2 und 24 Stunden Inkubation fixiert. Das VapA-Protein wurde mit einem monoklonalen Antikörper markiert und anschließend mit einem Alexa488-gekoppelten Sekundär-Antikörper sichtbar gemacht. Die Antikörperfärbung zeigt deutlich, dass sich VapA zu den untersuchten Zeitpunkten direkt auf der Bakterienoberfläche befindet (Abb. 35). Die Lokalisation des Proteins verändert sich demnach auch während einer Infektion nicht.



**Abb. 35: Lokalisation von VapA nach Infektion von Makrophagen**

Primäre Mausmakrophagen wurden 1 h mit *R. equi*103(+) bei einer MOI von 1 infiziert. Nach 2 h und 24 h Inkubation wurden die Zellen mit PFA fixiert und Proben mit einem  $\alpha$ VapA Antikörper markiert. Durch Färbung mit einem Alexa488-gekoppelten Sekundär-Antikörper wurde das Protein sichtbar gemacht (grün). Gezeigt sind repräsentative Epifluoreszenzaufnahmen, die bei einer Vergrößerung von 1250x aufgenommen wurden.

## 4. Diskussion

### 4.1. Kompartimentierung von *Rhodococcus equi* in Makrophagen

*Rhodococcus equi* kann in Makrophagen überleben. Nach der Aufnahme durch Makrophagen gelangen die Bakterien in Phagosomen, die nicht zu Phagolysosomen reifen (Zink et al. 1987, Hietala und Ardans 1987, Fernandez 2005). Nachdem *R. equi*-enthaltende Phagosomen die früh-endosomalen Marker EEA-1, Rab5, Coronin I und PI(3)P transient erhalten haben, akkumulieren sie die spät-endosomalen Marker LBPA, LAMP1/2 und Rab7 (Fernandez 2005, Abb. 5 und 6). Diese Resultate deuten darauf hin, dass *R. equi*-enthaltende Phagosomen die frühen Stadien der Endosomenreifung durchlaufen und die Phagosomenreifung auf der Stufe eines Endosoms blockiert, die späten Endosomen ähneln.

Das *R. equi*-enthaltende Phagosom unterscheidet sich jedoch in einigen wichtigen Punkten von späten Endosomen. *R. equi*-enthaltende Phagosomen erhalten im Gegensatz zu späten Endosomen nicht den vATPase-Komplex (Abb. 5, Fernandez 2005). Phagosomen mit *R. equi* säuern nicht an und fusionieren nicht mit Lysosomen (Abb. 4, Fernandez 2005). Letzteres zeigt sich auch in der Abwesenheit lysosomaler Enzyme wie der  $\beta$ -Galactosidase und reifem Cathepsin D in gereinigten Phagosomen (Abb. 4 und 5). Weder Cathepsin D noch pro-Cathepsin B konnten in *R. equi*-enthaltenden Phagosomen nachgewiesen werden (Abb. 5). Cathepsin B und D werden als inaktive pro-Enzyme synthetisiert und über das ER und Golgi-Netzwerk zu Endosomen sortiert (Kornfeld und Mellman 1989, Ludwig et al. 1991, Linke et al. 2002). Die Abwesenheit dieser Proteasen in *R. equi*-enthaltenden Phagosomen deutet folglich auf eine fehlende Interaktion der Phagosomen mit biosynthetischen Vesikeln des trans-Golgi-Netzwerks hin. Die Fusionshemmung zwischen Phagosomen und Vesikeln des TGN erklärt zumindest teilweise den Ausschluss der vATPase, die zumindest teilweise über diesen Transportweg zu Endosomen gelangt (Fratti et al. 2003). Die Konzentrationen der Glycoproteine LAMP1 und LAMP2 in Phagosomen nimmt im Verlauf der Endosomen- und Phagosomenreifung zu (Desjardins et al. 1994). Die Akkumulation dieser Proteine in Phagosomen entsteht zum Teil auch durch Fusion biosynthetischer Vesikel des TGN. Da *R. equi*-enthaltende Phagosomen nicht mit TGN-Vesikeln fusionieren, wird LAMP1 in diesen Phagosomen wahrscheinlich auf einem anderen Weg angereichert. Obwohl LAMP1 ein typischer Marker für späte Endosomen ist, wurde dieses Protein auch auf frühen Endosomen und zum Teil auf der Plasmamembran von Makrophagen nachgewiesen (Rohrer et al. 1996, Carlsson und Fukuda 1991, Barker et al. 1997). Trotz Arretierung der

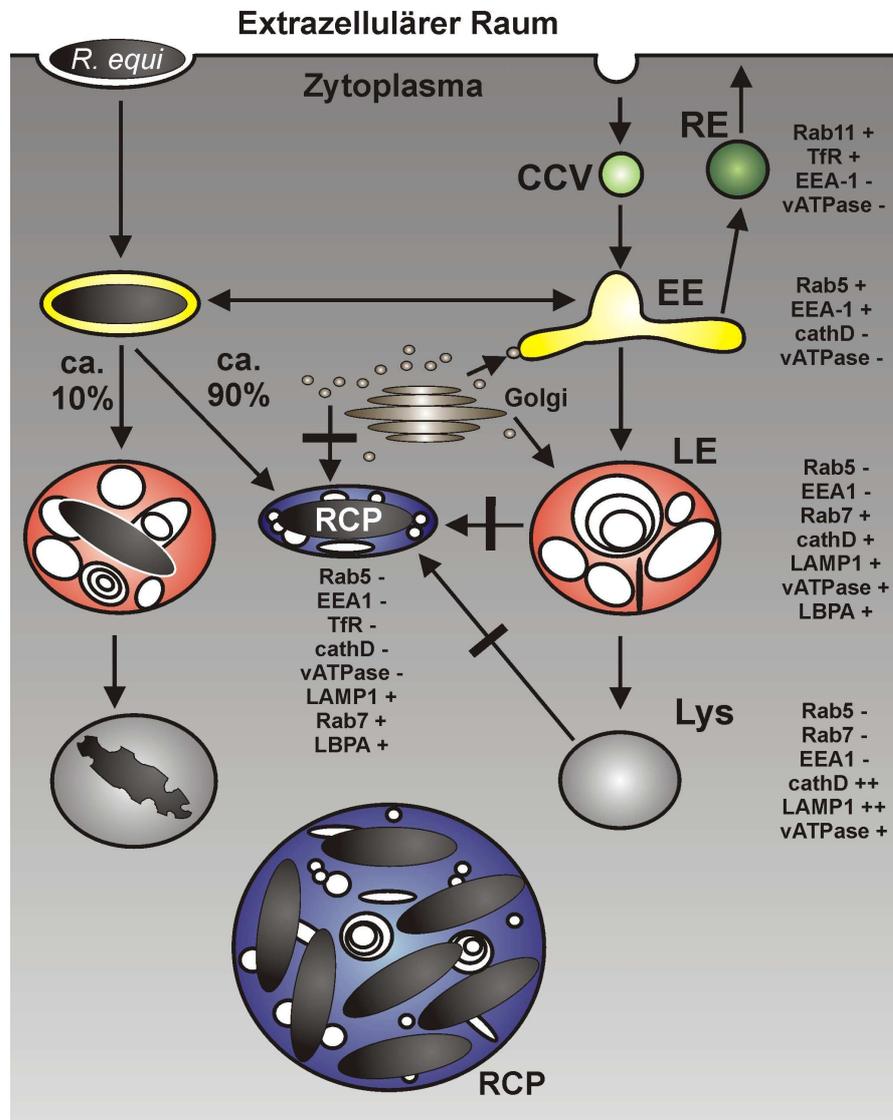
Phagosomenreifung zeigen *R. equi*-enthaltende Phagosomen eine Interaktion mit dem endozytischen System (Fernandez 2005). Es ist deshalb möglich, dass *R. equi*-enthaltende Phagosomen LAMP1 ausschließlich auf endozytischem Weg erhalten. Rab7 wird wahrscheinlich direkt gegen Rab5 ausgetauscht, ein Vorgang der als Rab-Konversion beschrieben wurde (Rink et al. 2005). Rab7 ist zwar an der Regulation der Fusion zwischen späten Endosomen und Lysosomen beteiligt (Bucci et al. 2000), kann aber allein die Fusion dieser beiden Kompartimente nicht vermitteln (Clemens et al. 2000).

Die Ansäuerung von Endosomen und Phagosomen ist für deren Reifung essentiell (Mellman 1992). Wird die Ansäuerung beispielsweise durch Bafilomycin gehemmt, ist die weitere Reifung von Endosomen verringert (Clague et al. 1994, van Weert et al. 1995). Die Fähigkeit von *R. equi*, die Ansäuerung der Phagosomen zu unterbinden, könnte demnach direkt die Reifung der Phagosomen inhibieren.

Immunfluoreszenz-Analysen von *R. equi*-enthaltenden Phagosomen zeigten die Abwesenheit früh-endosomaler Marker zwei Stunden nach Infektion (Dissertation Fernandez 2005). In gereinigten Phagosomen, die *R. equi* enthielten, wurde der früh-endosomale Marker Rab5 und die Recycling endosomalen Marker Rab4, Rab 11 und TfR gefunden (Abb. 7). Rab5 zeigte eine besonders auffällige Bindung an Rhodokokken (Abb. 8). Die Assoziation dieser Marker erfolgte anscheinend direkt an der Oberfläche von Bakterien, die nicht von einer Phagosomenmembran umschlossen waren. Rhodokokken, die während der Phagosomenisolierung durch ungewollte mechanische Zerstörung der Phagosomenmembran freigesetzt wurden, konnten vermutlich diese Proteine aus dem Zellextrakt binden. Ob die Assoziation dieser Proteine mit den Bakterien für deren Virulenz relevant ist, bleibt unklar. Die Assoziation dieser Marker war sowohl vom Plasmid-Status als auch von der Vitalität der Bakterien unabhängig. Darüber hinaus haben Rhodokokken in einem Phagosom keinen direkten Kontakt zu diesen Proteinen. Eine Bedeutung dieser Eigenschaft in der Virulenz von *R. equi* ist deshalb unwahrscheinlich.

In Verbindung mit früheren Daten (Fernandez 2005) lässt sich zusammenfassen, dass *Rhodococcus equi*-enthaltende Phagosomen nach zwei Stunden einem frühen Multi-Vesicular-Body (MVB) ähneln. Diese Annahme wird durch elektronenmikroskopische Analysen der Phagosomen unterstützt. Darüber hinaus akkumulieren *R. equi*-enthaltende Phagosomen Lysobisphosphatidyl-Säure (LBPA), einen typischen Marker für MVBs (Fernandez 2005). *R. equi*-enthaltende Phagosomen interagieren weder mit Vesikeln des

TGN noch mit Lysosomen und säuert nicht an. *R. equi* hält diesen Zustand des Phagosoms über einen Zeitraum von mindestens 48 Stunden aufrecht und beginnt nach einer kurzen lag-Phase sich innerhalb des Phagosoms zu vermehren (Abb. 9, Abb. 36).



**Abb. 36: Modell der Kompartimentierung von *Rhodococcus equi* in Makrophagen**

Clathrin bedeckte Vesikel (CCV) bringen extrazelluläres Material in das endozytische System. In frühen oder *sorting* Endosomen (EE) wird das Material zu späten Endosomen (LE) sortiert, die schließlich zu Lysosomen reifen (Lys). Einige Rezeptoren werden über Recycling-Endosomen (RE) zur Plasmamembran zurücktransportiert. Phagosomen werden an der Plasmamembran gebildet und interagieren zunächst mit frühen Endosomen, dann späten Endosomen und Lysosomen. Etwa 10% aller *R. equi*-Zellen werden nach ihrer Aufnahme den degradativen Weg entlang transportiert und wahrscheinlich in Lysosomen abgebaut. Die Mehrzahl der *R. equi*-enthaltenden Phagosomen (*R. equi* containing phagosome; RCP, ca. 90%) werden zu einem ungewöhnlichen Kompartiment, dessen Zusammensetzung eine Zwischenstufe von frühen und späten Endosomen darstellt. Vesikel des Golgi Netzwerks interagieren mit frühen und späten Endosomen, nicht aber mit RCPs. Typische Marker der jeweiligen Kompartimente wurden angegeben.

*R. equi*-enthaltende Phagosomen haben somit einige Eigenschaften mit Phagosomen gemeinsam, die das nahe verwandte Bakterium *Mycobacterium tuberculosis* enthalten. *Mycobacterium*-enthaltende Phagosomen akkumulieren ebenfalls LAMP1, schließen die vATPase aus und säuern nicht an. Anders als *R. equi*-enthaltende Phagosomen interagieren *Mycobacterium*-enthaltende Phagosomen mit Vesikeln des TGN und erhalten so die ungereifte Form des CathepsinD (Ullrich et al. 1999). Im Gegensatz zu Phagosomen mit *R. equi* sind *Mycobacterium*-enthaltende Phagosomen aber zu jeder Zeit positiv für Rab5 und TfR (Russell 2001). *Salmonella*-enthaltende Phagosomen durchlaufen wie *R. equi*-enthaltende Phagosomen die frühen Stadien der Endosomenreifung. Sie akquirieren Rab5 und EEA-1 transient und reichern LAMP1 und LAMP2 aber kein gereiftes Cathepsin D an. Allerdings erhalten sie Rab7 nur transient und reichern kein LBPA an (Meresse et al. 1999, Brumell et al. 2001, Mills und Finlay 1998). Im Gegensatz zu *R. equi*-enthaltenden Phagosomen akquirieren *Salmonella*-enthaltende Phagosomen die vATPase und säuern an (Brumell und Grinstein 2004). Phagosomen mit *Brucella abortus* durchlaufen ebenfalls ungehindert die frühen Stadien der Endosomenreifung. Sie reichern LAMP1 an und fusionieren nicht mit Lysosomen. Zu späten Zeitpunkten werden diese Phagosomen aber in ein ER-ähnliches Kompartiment umgewandelt (Celli et al. 2003). Das mit *R. equi* ebenfalls nahe verwandte Bakterium *Nocardia asteroides* kann ebenfalls in Makrophagen die Ansäuerung der Phagosomen und die Fusion mit Lysosomen verhindern (Davis-Scibienski Beaman 1980, Black et al. 1986). Die genaue Kompartimentierung dieser Bakterien ist allerdings unbekannt. Um in Makrophagen zu überleben und sich zu vermehren, etabliert *R. equi* somit eine bislang einzigartige intrazelluläre Nische.

#### 4.2. Interaktion zwischen *R. equi* und aktivierten Makrophagen

Aktivierte Makrophagen können pathogene Mikroorganismen töten, die sich in nicht aktivierten Makrophagen vermehren können. Auch *R. equi* kann sich nicht in aktivierten Makrophagen vermehren (Darrah et al. 2000, Abb. 12). Die Mechanismen, die zur Hemmung der intrazellulären Vermehrung führen, sind unklar. Es konnte gezeigt werden, dass die Produktion von Stickoxid- (NO) und Superoxid- ( $O_2^-$ ) Radikale die Vermehrung von *R. equi* in aktivierten Makrophagen inhibierten. Mäuse, denen die Gene zur Bildung von NO und  $O_2^-$  fehlten, waren signifikant empfindlicher für eine Infektion mit *R. equi* als Wildtyp-Mäuse. Die Behandlung mit zellfrei hergestelltem Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ), das aus NO und  $O_2^-$  gebildet werden kann, setzte die Viabilität von *R. equi* herab. Man nahm deshalb an, dass durch die Bildung von Peroxynitrit in aktivierten Makrophagen *R. equi*

getötet wird (Darrah et al. 2000). Ob die Kompartimentierung der Bakterien in aktivierten Makrophagen verändert wird, war nicht bekannt.

Auch für *Mycobacterium avium* wurde gezeigt, dass die Viabilität der Bakterien in aktivierten Makrophagen herabgesetzt ist (Schaible et al. 1998). Darüber hinaus konnte *Mycobacterium avium* die Phagosomenreifung in aktivierten Zellen nicht mehr blockieren. Phagosomen, die *M. avium* enthielten, akquirierten die vATPase, säuerten an und interagierten nicht mehr mit Recycling- Endosomen (Schaible et al. 1998, Via et al. 1998). Es wurde vermutet, dass die Normalisierung der Phagosomenreifung möglicherweise von Lrg47 abhängig ist, da Lrg47-negative Mäuse eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber einer mykobakteriellen Infektion zeigten und dieses Protein auf *Mycobacterium*-enthaltenden Phagosomen aus aktivierten Makrophagen gefunden wurde. Ein klarer Zusammenhang zwischen der normalisierten Phagosomenreifung und Lrg47 konnte bisher allerdings nicht gezeigt werden (MacMicking et al. 2003, Feng et al. 2004).

*R. equi*-enthaltende Phagosomen akquirierten in aktivierten Makrophagen ebenfalls den vATPase-Komplex (Abb. 13), säuerten aber selbst nach 24 Stunden nicht an (Tab. 3). Diese überraschende Beobachtung deutet darauf hin, dass *R. equi* in ruhenden Makrophagen nicht nur die Akquisition der vATPase unterbindet, sondern auch zusätzlich das Phagosomenlumen neutralisiert. Messungen des phagosomalen pH ergaben, dass nach einer leichten Ansäuerung kurz nach Aufnahme von *R. equi* sich der pH-Wert im Phagosom anschließend langsam neutralisiert (Bargen 2005). Dieses Phänomen wurde sowohl in ruhenden als auch in aktivierten Makrophagen beobachtet (Bargen 2005). In aktivierten Makrophagen könnte folglich *R. equi* die Anreicherung der vATPase nicht verhindern, den pH im Phagosom aber trotzdem neutralisieren. Die Neutralisierung des phagosomalen pH ist möglicherweise ein aktiver Prozess, der nur von lebenden Bakterien vollzogen werden kann. Eine frühe Abtötung von *R. equi* durch Sauerstoff- und Stickoxidradikale von aktivierten Makrophagen, wie sie in einer früheren Studie gefunden wurde (Darrah et al. 2000), scheint deshalb unwahrscheinlich.

Die normalisierte Phagosomenreifung in aktivierten Makrophagen führt zwar nicht zu einer Ansäuerung der Phagosomen, aber vielleicht zu suboptimalen Wachstumsbedingungen. Eine andere Möglichkeit, die intrazelluläre Vermehrung von *R. equi* in aktivierten Makrophagen zu hemmen, besteht in einer erniedrigten Fusionsfähigkeit der Phagosomen. Nach dieser Überlegung interagieren Phagosomen in aktivierten Makrophagen nur vermindert und wesentlich selektiver mit dem endozytischen System als in ruhenden Makrophagen. Intrazellulären Pathogenen würde somit möglicherweise der Zugang zu wichtigen Nährstoffen versagt. Die Bakterien würden dann für eine gewisse Zeit in aktivierten Makrophagen überleben, sich aber nicht weiter vermehren können und

schließlich sterben. In einer kürzlich erschienenen Studie wurden verminderte Aktivitäten lysosomaler Enzyme in Phagosomen aktivierter Makrophagen gemessen (Yates et al. 2007). Die Akquisition lysosomaler Inhalte war in diesen Zellen zwar verzögert, aber im Vergleich zu ruhenden Makrophagen verstärkt. Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass die Fusion von Endosomen und Phagosomen in aktivierten Makrophagen selektiver ist als in ruhenden Makrophagen.

*R. equi*-enthaltende Phagosomen interagieren in ruhenden Makrophagen mit dem endozytischen System, sodass die Phagosomen für nachträglich endozytiertes Material zugänglich sind (Fernandez 2005). Es wäre interessant zu erfahren, ob *R. equi*-enthaltende Phagosomen in aktivierten Makrophagen gleichermaßen mit dem endozytischen System interagieren wie in ruhenden Makrophagen. *R. equi* könnte in aktivierten Makrophagen durch ein Zusammenspiel von Peroxynitrit, einer verminderten Interaktion mit Endosomen und einer normalisierten Phagosomenreifung getötet werden.

#### 4.3. Das Virulenzplasmid von *R. equi*

Intrazelluläre Vermehrung, veränderte Phagosomenreifung und Zytotoxizität von *Rhodococcus equi* hängen von dem 80 kBp großen VapA codierenden Virulenz-assoziierten Plasmids (VAP) ab (Meijer und Prescott 2004, Lührmann et al. 2004, Fernandez 2005). Das Plasmid enthält neben einem replikativen und konjugativen Bereich eine Pathogenitätsinsel. Die Sequenz des Plasmids pREC1 apathogener *Rhodococcus erythropolis* ist der des VapA-Plasmids von *Rhodococcus equi* 33701 (pREAT701) sehr ähnlich (Sekine et al. 2005). Eine Pathogenitätsinsel ist in pREC1 nicht vorhanden, was die Bedeutung dieses Bereichs für die Virulenz von *R. equi* unterstreicht. Stattdessen sind auf pREC1 Gene für die  $\beta$ -Oxidation codiert, die pREAT701 fehlen. Die replikativen und konjugativen Bereiche der beiden Plasmide sind sich jedoch ähnlich. Möglicherweise haben pREC1 und pREAT701 den gleichen Ursprung. Die Pathogenitätsinsel ist vermutlich als transposables Element mittels horizontalem Gentransfer in das Plasmid gelangt (Meijer und Prescott 2004, Sekine et al. 2005) und beinhaltet 24 offene Leserahmen von denen 6 homolog zu *vapA* sind (*vapC*, *D*, *E*, *F*, *G*, *H*, Takai et al. 2000). Mit Ausnahme des Pseudogens *vapF* codieren die *vap*-Gene für Proteine mit Signalsequenzen (Takai et al. 2000). Während VapC, D und E im Kulturüberstand der Bakterien gefunden wurden, scheint VapA in der Zellwand der Bakterien verankert zu sein (Byrne et al. 2001, Abb. 35). Die Lokalisation von VapG und H noch nicht untersucht. Die Funktion der Vap-Proteine ist bislang unbekannt.

Lediglich fünf Leserahmen der Pathogenitätsinsel sind homolog zu Genen anderer Bakterien.

- Orf3 ist homolog zu O-Methyl-Transferasen, die in Prokaryoten unterschiedliche Funktionen ausüben können. Neben hypothetischen Proteinen ist Orf3 vor allem zu EncK aus *Streptomyces maritimus* homolog, welches an der Synthese von Enterocin beteiligt ist. Sowohl Orf3 als auch EncK bestehen aus 241 Aminosäureresten. Die Aminosäuresequenzen der beiden Proteine sind in ihrer Gesamtlänge zu 36% identisch und zu 50% homolog (nicht gezeigt). Enterocin ist ein natürliches Bakteriostatikum aus der Klasse der Polyketide (Rawlings 1999, Xiang et al. 2004), einer heterogenen Gruppe von sekundären Metaboliten, die ähnlich den Fettsäuren synthetisiert werden (Lengeler et al. 1999). Unter den Polyketiden befinden sich auch klinisch relevante Substanzen wie die Antibiotika Tetracyclin oder Erythromycin (Lengeler et al. 1999). Ob Orf3 ebenfalls an der Synthese von Polyketiden beteiligt ist, bleibt unklar. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass Polyketid-Synthasen an der Bildung oder Modifikation von Mycolsäuren beteiligt sind (Portevin et al. 2004). So produziert beispielsweise der hypervirulente *M. tuberculosis* Stamm HN878 ein Glycolipid, das durch eine Polyketid-Synthase modifiziert wurde und das in dem weniger virulenten Stamm H37Rv nicht gebildet wird. Darüber hinaus hemmt dieses modifizierte Glycolipid die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine *in vitro* (Reed et al. 2004).
- VirR (Orf4) ist ein Transkriptionsregulator, der die Expression von *vapA* reguliert (Russell et al. 2004). Eine Deletion des Gens resultierte in einer verminderten Expression von *vapA* (Russell et al. 2004, Bagen 2005). Darüber hinaus ergaben Expressionsanalysen mit dieser Mutante, dass VirR die Expression von weiteren Genen in der Pathogenitätsinsel reguliert. Vor allem die Gene *orf1* bis *orf8* werden offenbar durch VirR reprimiert (Ren und Prescott 2004).
- Orf8 ist wahrscheinlich ein Response-Regulator eines unbekanntenen Zwei-Komponenten-Sensors (Takai et al. 2000, Meijer und Prescott 2004), der sich ebenfalls positiv auf die *vapA*-Expression auswirkt (Russell et al. 2004). Bei einer Deletion des *orf8*-Gens wird in der entsprechenden Mutante kaum VapA produziert (Bagen 2005). Dieser Regulator beeinflusst die Expression der Gene *orf1*, *3*, *5*, *6*, *7* und *orf10* negativ (Ren und Prescott 2004). Es wäre interessant zu erfahren, welche Sensor-Kinase Orf8 aktiviert.

- Das Produkt des *orf5*-Gens zeigt eine signifikante Homologie zu Arabinose Permeasen. Ein homologes Gen ist im Chromosom von *R. equi*103 codiert. Die Aminosäuresequenzen beider putativen Proteine sind über die gesamte Länge zu 34% identisch und zu 50% homolog (nicht gezeigt). Beide Sequenzen sind homolog zur Arabinose Efflux Permease AraJ. Da die DNA-Sequenzen allerdings einen mehr divergieren als die entsprechenden Aminosäuresequenzen, ist eine Entstehung von *orf5* durch ein Rekombinationsereignis des Plasmids mit dem Chromosom von *R. equi* unwahrscheinlich. Die Bedeutung eines zusätzlichen Arabinose-Transporters für die Virulenz von *R. equi* ist unklar. Das *orf5*-Gen ist möglicherweise ein Überbleibsel aus der Entstehung der Pathogenitätsinsel, deren Ursprung unbekannt ist.
- Das Gen *orf21* zeigt eine starke Homologie zu einer Familie sekretierter Chorismat-Mutasen (AroQ). Da Chorismat-Mutasen an der Biosynthese von aromatischen Aminosäuren beteiligt sind, ist die periplasmatische oder extrazelluläre Lokalisation dieses Enzyms schwer erklärbar. Interessant ist allerdings, dass eine Reihe von pathogenen Bakterien wie *S. typhimurium*, *M. tuberculosis* und *P. aeruginosa* Gene für sekretierte Chorismat-Mutasen besitzen (Calhoun et al. 2001). Bislang ist aber noch unbekannt, ob überhaupt ein extrazellulärer oder periplasmatischer Biosyntheseweg für aromatische Aminosäuren existiert. Untersuchungen an AroQ aus *M. tuberculosis* zeigten, dass dieses Enzym zwar Chorismat als Substrat verwenden kann, aber nicht allosterisch durch aromatische Aminosäuren gehemmt wird (Sasso et al. 2005, Kim et al. 2006). Es besteht deshalb die Möglichkeit, dass AroQ eine weitere Reaktion katalysiert, die der Chorismat-Mutase Aktivität nur ähnlich ist. Das Enzym könnte auch Substrate umsetzen, die nicht Teil des Shikimat-Weges sind.
- Das Gen *orf13* wurde ebenfalls als unbekannt annotiert. Ein Abgleich mit der Datenbank zeigte allerdings, dass *orf13* homolog zu der Familie der *vap*-Gene ist. Die Aminosäuresequenz von Orf13 war zu 46% identisch und zu 57% homolog zu VapE (nicht gezeigt). Allerdings ist die Aminosäuresequenz von Orf13 nur etwa halb so lang wie die der meisten Vap-Proteine. Bei einer genaueren Analyse der *orf13*- DNA-Sequenz während dieser Doktorarbeit konnten zwei *frame shift* Mutationen entdeckt werden (Position 13597 und 13672 in p103). Diese Mutationen unterbrechen die DNA-Sequenz jeweils durch Stop-Codons. Nach Korrektur der *frame shift* Mutationen verlängert sich die Aminosäuresequenz des von Orf13 theoretisch um 120 Aminosäurereste. Diese zusätzlichen Reste zeigen

ebenfalls eine hohe Homologie zu VapE und anderen Vap-Proteinen (Abb. 37). Die C-terminale Region des theoretisch verlängerten Proteins zeigt die größte Übereinstimmung mit VapE. In diesem Bereich sind die beiden Sequenzen zu 87% identisch und zu 92% homolog. Die N-terminale Region ist dagegen kaum konserviert. Aufgrund der Homologie zu den Vap-Proteinen kann Orf13 als ein Mitglied der Vap-Protein Familie angesehen werden und wurde in VapI umbenannt. Wie alle Vap-Proteine besitzt auch VapI wahrscheinlich ein Signalpeptid, das den Export des Proteins vermittelt (nicht gezeigt). Neben VapI enthält das Virulenzplasmid ein weiteres Pseudogen, das zu *vapE* homolog ist und sich stromabwärts von *orf8* befindet (pseudo-VapE, Russell et al. 2004). Mit *vapI* enthält das Virulenzplasmid von *R. equi* somit sechs *vap*-Gene (*A, C, D, E, G, H*) sowie drei *vap*-Pseudogene (pseudo-*E, F, I*). Als Pseudogen besitzt *vapI* vermutlich keine Bedeutung in der Virulenz der Bakterien. Da für diese Proteinfamilie auch keine funktionelle Domäne gefunden wurde, bleibt die Funktion der Vap-Proteine weiter unklar.

Die restlichen Gene der Pathogenitätsinsel zeigen keine signifikanten Homologien zu bereits bekannten Genen. Welche Gene des Plasmids für die Ausprägung Virulenz-assoziiierter Merkmale verantwortlich sind, war bislang unklar. Eine Transkriptions-Analyse der Virulenzplasmid-Gene zeigte, dass bei Wachstum in Zellen oder unter Mangelbedingungen und hohen Temperaturen ausschließlich die Expression von Genen auf der Pathogenitätsinsel des Plasmids induziert werden (Ren und Prescott 2003). Während des intrazellulären Wachstums werden vor allem die Expression der *vap*-Gene induziert (Ren und Prescott 2003). Die größte Induktion wurde für die Gene *orf9*, *orf10*, *vapA* (*orf12*), *vapI* (*orf13*) und *vapC* (*orf14*) gefunden.

Trotz der hohen Expression während des intrazellulären Wachstums scheint *orf10* für die Virulenz keine unmittelbare Bedeutung zu haben, da sich eine Deletion nicht auf die Virulenz auswirkt (Ren und Prescott 2003, Borgen 2005).

Die Möglichkeit, dass Gene außerhalb der Pathogenitätsinsel für die Virulenz von *R. equi* wichtig sind, kann nicht ausgeschlossen werden. Der mögliche Konjugationsapparat, der auf dem Virulenzplasmid codiert wird, könnte auch als Sekretionsapparat fungieren. So stammt das Typ IV-Sekretionssystem Gram-negativer Bakterien vermutlich von einem Konjugationsapparat ab (Christie 2001, Cambronne und Roy 2006). Ähnliche Konjugationsapparate wurden jedoch in Gram-positiven Bakterien bislang nicht entdeckt.

VapA	-----MKT LHKT VSKAIAATAVA AAAA--AMIPAGVANATVLDS	36
VapB	-----MMKALHKT VSRATAATAAAA VLVAPASVANAAVLDS	39
VapD	-----MVRARAFGRLEF--FLLAVAVIA-----TVSMG----	26
VapG	-----MSVRTLLAATLVAGISVLAPAGIANAE TSMVSTT-----	34
VapH	-----MNL SKTTRKFTSRTAVPATFVMAL TVPWGCAAPPPLP	37
VapC	-----MFR--VGRPSKSTAVVASVLCFLALGGTARAN-----	30
VapF	-----MIEYAWYGPSIQSNRCCGDCPILLALGGHRTCR-----	33
VapE	MTTVHKKASKAIAFTVALR L PFA GTAVLVLIALTIVAAPTGIAGAREIGAQAWPAS----	57
VapI	-----MGIATGLVPIALTAVALPAGMASAQEMGDHAWSGS----	28
pseudo-VapE	-----MYSGPAAVGDAMPGAPQNSPAEAS----	25
VapA	GSS-SAILNSGAGSGIVGSGSYDSSTTSLN---LQKDEPNNG--RASDTAGQEQQYDVHGD	90
VapB	GGGGSALLKMG R-QCEVGSQAYDSSVTSN---LQKAETNGPVGLAGTAEQEQQYDVHGN	95
VapD	-----GANAQELAGTKTS--DAALLSGN---KAAIPEDKEYDVSGR	62
VapG	-----AASSVEHAANTYD--FAEAKSGSSIPAKVAAEQANSYVHGL	74
VapH	DGP-----THDLPTWREEGANYSDGTMLVRASSNFLEPSTHSDSGQQQWTVQGV	86
VapC	-----VVAPSAWGCQAQSAADKEGEGVTLGGVGVLRPHNKDADEQYTVHGV	75
VapF	-----LATPSAWVGTPSAAGK-----VLPPIINNNADEQYAVHGV	67
VapE	-----QLESGLAVS GNPVGVH D VRMAVHDDSTHTREFKEDDSEKQYVHGF	103
VapI	-----RAESDVAVLGKAESAHD-----DPSLRTPKLLKSNSGNOYRYTVL	68
pseudo-VapE	-----DNEERARTIGMGCHGI-----	41
VapA	VISAVVYQRFHVF GPEG-----KVFDGDAGGLTLP-GAGAFWGTFLT-NDLQRLYKDTV	142
VapB	VISA AVYQKFHVYGPED-----MVF DGDAGGLTLP-GAGAFWGTFLT-SDLQRLYKDTV	147
VapD	VVSALVYQYFIVTVDDAEDK-KGKTFQGDAGGV TLP-GVDFFWGTLHT-PDLEKLYSDTV	119
VapG	VISLAVYQHFSLTVEGG-----GKTFTGDSGGISIP-GVAVLEGLTFT-EDLQHLYSDTV	127
VapH	LASALVYQRLKLNVEGG-----ETFECYAGGLSFP-GGAMVWGTFLT-DNIQRLYDRT E	138
VapC	VVSALFYNHRLRISVDGG-----MTFDGDGGGLSFP-GGGALWGTLT-SDLQQLYDETA	127
VapF	VFSAVFYNHVRLISVDGG-----MTFDGEGGGLSFP-GGGALWGNLMT-SDLLCSSYTK	119
VapE	ASSFIFYQTVSIIIDDDGRCGPKTFEACEAGGITTP-GAAGYAGVLT-SDLERLYRET V	161
VapI	LSSFIFYQTL S I S I D D D G R G-----RGEVGGV T T P E GAAGFAGVPCSQAILERLHRET V	122
pseudo-VapE	NAESFHFY G S C M R V E C S-----AVGGHHHFCVP-GEEEPWGMFSP-RDL-RLYDET G	91
VapA	SFOYNAVGPYLNINFFDSSG SFLGHIQSGGVSTVVG VGGGSGSWHNA-----	189
VapB	SFOYNALGTYLNI NFFDSSGGFLGHIQACAVSAVVG VGGGSGSWHNWEVA-----	197
VapD	SFOYNA AATFLNI NFFD SKGERLGYVLAGAAGTVSGIGGGTGGWE-----	164
VapG	SFEYNAVGPYLNINFFDSHG TLLGHVQSGSIGTVSGIGGGTGGWQ-----	172
VapH	SFEENAVGPYLNINFFDCHSAILGHAQLGGVSSVIGIGGGTGTWIGDVA-----	187
VapC	SFECNAVGPYLNINFFYDSYGRILASVQAGGVSTMIGIGGGNCRWHLV-----	174
VapF	LRRSNV I W P-----VSKDQLLRQLWHSWECSR-----ERC-----	150
VapE	SFEYNAVGPYLNINL FAGDGLLGHVQSGAISSLVIGIGGGTGAWR-----	206
VapI	SFEYNAIGPYLNINL FAGDGSLLGHVQSGALSSLVIGIGGGKGAWRQLSLIQVDP C SDCSA	182
pseudo-VapE	PFDFNAAGLFMNVDFEGYRA----HRPCKKRG SERGIWYWRLLHWVDGTSYMKGPD SRP--	145
VapA	-----	
VapB	-----	
VapD	-----	
VapG	-----	
VapH	-----	
VapC	-----	
VapF	-----	
VapE	-----	
VapI	VGALLSVWTLR TNELVFR	200
pseudo-VapE	-----	

Abb. 37: Vergleich der Aminosäuresequenz von VapI mit anderen Vap-Proteinen

Aminosäuresequenzen aller Vap-Proteine, einschließlich VapI und pseudo-VapE, wurden mit dem CLUSTALW- Programm und Standardeinstellungen durchgeführt. Aminosäurereste, die identisch zu VapI sind wurden schwarz hinterlegt. Reste, die homolog zu VapI sind, wurden grau hinterlegt. Die theoretische Verlängerung der VapI-Sequenz durch Korrektur von 2 *frame shift* Mutationen wurde kursiv gedruckt. Die Sequenz von pseudo-VapE wurde nach Russell et al. korrigiert angegeben. Die korrigierte Sequenz des VapI-Proteins wurde unter der Accession Number BN000924 annotiert.

#### 4.4 Einfluss von Genen der Pathogenitätsinsel auf die Virulenz von *R. equi*

Rekombinante *R. equi*-Stämme, die kein VapA produzierten, vermehrten sich nicht in Makrophagen (Abb. 16). Die Fragmente ORF5-13 und ORF9-18 beinhalten zwar das *vapA*-Gen (*orf12*), das in diesen Stämmen aber nicht exprimiert wurde. Zur Expression von *vapA* werden die Gen-Produkte von *orf4* und *orf8* wahrscheinlich gemeinsam zusätzlich benötigt (Russell et al. 2004, Diplomarbeit Bargaen). Erst die konstitutive Expression durch pSMT3-*vapA* ermöglichte es einigen rekombinanten Stämmen, sich intrazellulär zu vermehren (Abb. 18). Die Vermehrung dieser Stämme erfolgte in einem sauren Milieu (Abb. 22), welches die Vermehrung der Bakterien beeinträchtigt haben könnte. Die Anzahl an Makrophagen mit mehr als zehn Bakterien pro Zelle war im Vergleich zum Wildstamm 103(+) maximal halb so groß. *R. equi* ist ein säurestabiles Bakterium, das auch bei einem pH-Wert von 5,0 wachsen kann. Erst ab Werten von etwa 4,0 ist kaum noch Wachstum zu messen (Bargaen 2005). Eine Analyse von *M. tuberculosis*-Mutanten zeigte, dass eine Mutante die Ansäuerung der Phagosomen nicht inhibieren kann, sich aber in seiner intrazellulären Überlebensfähigkeit nicht vom Wildtyp unterscheidet (Pethe et al. 2004). Die Inhibierung der phagosomalen Ansäuerung ist anscheinend sowohl für *R. equi* als auch für *M. tuberculosis* keine Voraussetzung für intrazelluläres Wachstum.

Obwohl sich einige *vapA* exprimierende *R. equi*-Rekombinanten in Makrophagen vermehren konnten, waren diese Stämme avirulent für Mäuse (Tab. 9). Aufgrund der Vermehrung in Makrophagen und der Zytotoxizität rekombinanter Rhodokokken, wäre eine intermediäre Virulenz der Bakterien in Mäusen zu erwarten gewesen. Möglicherweise sind rekombinante Stämme sensitiver für die Th1-Antwort, die in Mäusen bei einer Infektion mit *R. equi* ausgelöst wird (Meijer und Prescott 2004). Rekombinante Rhodokokken könnten auch gegenüber der Aktivität von Neutrophilen, die zur Bekämpfung einer *R. equi*-Infektion maßgeblich beitragen (Hondalus 1997), sensitiver sein als der Wildtyp.

VapA scheint für das Wachstum in Makrophagen essentiell zu sein. Dies zeigt sich vor allem im Unvermögen der *vapA*-Mutante, sich intrazellulär zu vermehren (Abb 29). Die Unfähigkeit der *orf4*- und *orf8*-Mutanten, sich in Makrophagen zu vermehren, könnte an der verminderten *vapA*-Expression dieser Stämme liegen (Russell et al. 2004, Abb. 25). Durch Transformation der *orf8*-Mutante mit konstitutiv *vapA* exprimierendem pSMT3-*vapA* wurde die Vermehrungsfähigkeit der Mutante teilweise wiederhergestellt (Abb. 25). Die gemeinsame Expression von *orf8* und *vapA* in *R. equi*(-) konnte allerdings keine Vermehrungsfähigkeit in Makrophagen vermitteln (Abb. 24). Scheinbar werden für die intrazelluläre Vermehrung neben VapA noch weitere Virulenzplasmid codierte Faktoren

benötigt, die möglicherweise von Orf8 reguliert werden. Es wäre interessant zu sehen, ob die Transformation der *orf4*-Mutante mit pSMT3-*vapA* ebenfalls in einer intrazellulären Vermehrungsfähigkeit resultiert.

Für die Zytotoxizität von *R. equi* ist die Anwesenheit von VapA ebenfalls wichtig. Rekombinante Stämme, die kein VapA produzierten, waren nicht zytotoxisch für Makrophagen (Abb. 17). Alle rekombinanten Stämme, die intrazelluläres Wachstum zeigten, waren auch zytotoxisch. Die Zytotoxizität der Bakterien ist allerdings nicht von der intrazellulären Vermehrungsfähigkeit abhängig. Sowohl der rekombinante Stamm ORF5-8 (mit pSMT3-*vapA*) als auch die *vapA*- und die *orf8*-Mutante waren zytotoxisch, ohne sich in Makrophagen vermehren zu können (Abb. 20, 25, 32). Die Zytotoxizität ist außerdem unabhängig von der Kompartimentierung der Bakterien. Phagosomen mit rekombinanten Stämmen säuerten innerhalb von zwei Stunden an und fusionierten mit Lysosomen, während Phagosomen mit der *vapA*- Mutante weder ansäuerten noch mit Lysosomen fusionierten. Die *vapA*- sowie die *orf8*-Mutante produzierten aber kein VapA, was den Ergebnissen mit den rekombinanten Stämmen widerspricht. Dieser Befund lässt vermuten, dass VapA nicht der Auslöser der Zytotoxizität ist, aber dennoch eine wichtige Rolle bei der *R. equi* -vermittelten Nekrose einnimmt. Möglicherweise ist VapA für die Zytotoxizität durch andere Faktoren austauschbar, die entweder durch das Chromosom der Bakterien oder durch das Virulenzplasmid codiert werden. Aufgrund der hohen Homologie der Vap-Proteine untereinander könnte auch die Struktur der Proteine konserviert sein. In diesem Fall könnte VapA durch ein anderes Vap-Protein in *R. equi*Δ*vapA* ersetzt und somit weiterhin zytotoxisch für Wirtszellen sein. Für die intrazelluläre Vermehrung ist VapA allerdings essentiell und offenbar nicht durch ein anderes Vap-Protein ersetzbar, da sich die *vapA*-Mutante und rekombinante Rhodokokken ohne VapA nicht in Makrophagen vermehren können.

Durch Transformation von *R. equi*(-) mit Teilen der Pathogenitätsinsel des Virulenzplasmids konnte die veränderte Phagosomenreifung des Wildstamms nicht wiederhergestellt werden. Keiner der untersuchten rekombinanten Stämme konnte die Ansäuerung der Phagosomen (Abb. 21) oder die Fusion der Phagosomen mit Lysosomen verhindern (Abb. 23). Um eine veränderte Phagosomenreifung zu vermitteln, könnte eine bestimmte Kombination von Genen des Virulenzplasmids nötig sein, die in diesen Experimenten nicht abgedeckt wurde. Die Resultate zeigen, dass das intrazelluläre Wachstum nicht unmittelbar von einer veränderten Phagosomenreifung abhängig ist. Eine weitere wichtige Beobachtung war die Fähigkeit der *vapA*-Mutante, die Ansäuerung der Phagosomen zu inhibieren (Abb. 30). Dieser Zustand konnte von der Mutante allerdings

nicht aufrecht erhalten werden (Abb. 30). Der Grund dafür könnte die Akquisition der vATPase von Phagosomen mit *R. equi*ΔvapA sein (Abb. 34). Somit wäre die vapA-Mutante zwar für kurze Zeit in der Lage, den phagosomalen pH zu neutralisieren, aber nicht die Akquisition der vATPase zu verhindern. Da dieser Stamm sich auch nicht in Makrophagen vermehrt, kann er wahrscheinlich die für die Neutralisierung des phagosomalen pH zuständigen Faktoren nicht lange nachsynthetisieren. Dies würde zur Ansäuerung des Phagosoms zu späteren Zeitpunkten führen. Die orf8-Mutante kann die Ansäuerung der Phagosomen dagegen nicht inhibieren. Da dieser Stamm auch kein VapA produziert, scheint Orf8 für die Ansäuerung der Phagosomen ein wichtiger Faktor zu sein. Da Orf8 ein Response-Regulator eines Zwei-Komponenten Systems ist, reguliert dieses Protein wahrscheinlich neben vapA noch weitere Virulenz-assoziierte Gene. Es wäre deshalb interessant zu sehen, ob der Stamm Δorf8-vapA die Ansäuerung oder die Akquisition der vATPase verhindern kann.

Die Neutralisierung des phagosomalen pH durch *R. equi*103(+) wirkt nach längeren Infektionszeiten möglicherweise auch auf Endosomen und Lysosomen infizierter Zellen (Abb. 11). Dieser Effekt war ausschließlich in infizierten Zellen zu finden, in denen die Bakterien sich stark vermehrt hatten. Die Faktoren, die diese Neutralisierung verursachen, werden anscheinend von *R. equi* über die Grenzen der eigenen Phagosomen hinaus sekretiert. Demzufolge könnte *R. equi* nach 24 Stunden in Makrophagen auch die Reifung von Phagosomen verhindern, die apathogene Bakterien enthalten. Um diese Vermutung zu überprüfen, sollten zukünftig mit *R. equi*(+) infizierte Zellen 24 Stunden nach Infektion mit apathogenen Bakterien zusätzlich infiziert werden. Die apathogenen Bakterien sollten dann nicht mehr mit Lysosomen fusionieren. Ein ähnliches Experiment wurde bereits für frühe Zeitpunkte durchgeführt (Streker 2000). Zwei Stunden nach einer Infektion mit *R. equi* hatten die Bakterien noch keinen Einfluss auf die Reifung von Phagosomen, die Listerien enthielten. Zu diesem Zeitpunkt konnte auch noch kein Verlust des LysoTracker-Signals in infizierten Makrophagen beobachtet werden (Abb. 11). Der Verlust saurer Kompartimente in Makrophagen könnte auch ein durch die von *R. equi* induzierte Nekrose verursacht werden, da Nekrose häufig mit der Zerstörung von Lysosomen einhergeht (Syntichaki und Tavernarakis 2002). Im Kulturüberstand von Zellen, die mit *R. equi* infiziert waren, konnte nach 24 Stunden nur eine geringe Aktivität des lysosomalen Enzyms saure β-Galactosidase nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Eine Sekretion von Lysosomen infizierter Makrophagen ist deshalb als Ursache für den Verlust des LysoTracker-Signals unwahrscheinlich.

Die Hemmung der phagosomalen Ansäuerung durch *R. equi* hängt nicht von der Vermehrung und Zytotoxizität der Bakterien ab. Die *orf8*-Mutante war zytotoxisch für Makrophagen, konnte sich aber nicht intrazellulär vermehren und die Ansäuerung der Phagosomen nicht verhindern. Die *vapA*-Mutante konnte dagegen die phagosomale Ansäuerung verhindern und war zytotoxisch, konnte sich aber ebenfalls nicht in Zellen vermehren. Die rekombinanten Stämme konnten die Ansäuerung der Phagosomen nicht inhibieren, waren aber zum Teil zytotoxisch und in Makrophagen vermehrungsfähig.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass in Verbindung mit *vapA* drei Abschnitte in der Pathogenitätsinsel des Virulenzplasmids intrazelluläre Vermehrung und Zytotoxizität in *R. equi* vermitteln können: ORF3-8, ORF8-15 und ORF15-24. Dieses Ergebnis ist überraschend, da anscheinend kein bestimmtes Gen allein für die Ausprägung virulenzspezifischer Phänotypen verantwortlich ist. Obwohl das Fragment ORF3-6 intrazelluläre Vermehrung sowie Zytotoxizität vermitteln kann, reichte die einzelne Expression der Gene *orf3* bis *orf8* nicht aus, um diese Phänotypen zu vermitteln. Demzufolge werden aus diesem Bereich mindestens zwei Gene gleichzeitig sowie VapA benötigt um die intrazelluläre Vermehrung und Zytotoxizität der Bakterien zu ermöglichen. Alle rekombinanten Stämme, die sich in Makrophagen vermehren konnten und zytotoxisch waren, besaßen neben dem konstitutiv exprimierten *vapA*-Gen noch mindestens ein weiteres *vap*-Gen (Tab. 20). So liegt die Vermutung nahe, dass VapA mit anderen Proteinen der Vap-Familie interagiert um Zytotoxizität und intrazelluläre Vermehrung zu vermitteln. Gegen diese Hypothese sprechen die Ergebnisse, die mit den folgenden drei verwendeten Fragmenten der Pathogenitätsinsel erhalten wurden.

Das Fragment ORF2-7 beinhaltet sowohl *vapG* als auch *vapH*. Trotzdem war der entsprechende rekombinante Stamm nicht in der Lage, sich in Makrophagen zu vermehren oder Nekrose zu induzieren (Abb. 20). Dieser Stamm trägt als einziger das *vapG*-Gen. VapG könnte im Stamm ORF2-7 einen hemmenden Effekt auf die mögliche Interaktion von VapA mit VapH, die im Stamm ORF3-6 vielleicht stattfindet, ausüben. Eine andere Erklärung für den Phänotyp von ORF2-7 könnte ein hemmender Einfluß von PodG sein. Das *podG*-Gen befindet sich downstream von *vapG* und wurde bei einer Transkriptionsanalyse entdeckt. Dieses Gen ist in der ursprünglichen Nummerierung der Gene nicht enthalten (Benoit et al. 2002). Das *podG*- und *vapG*-Gen werden möglicherweise als bicistronisches Operon transkribiert (Benoit et al. 2002). Da ein Datenbankabgleich mit PodG keinerlei Resultate erbrachte, bleibt dessen Funktion und mögliche Bedeutung für die Virulenz von *R. equi* unklar.

Das Fragment ORF5-8 beinhaltet zwar das *vapH*-Gen, das aber in diesem Fragment vermutlich nicht exprimiert wird. Die Gene *orf4* bis *orf8* bilden ein Operon (Russell et al.

2004). Der Promotor, der die Transkription der Gene *orf4* bis *orf8* ermöglicht, befindet sich *upstream* von *virR* (*orf4*) und ist somit auf dem Fragment ORF5-8 nicht enthalten. Interessanterweise kann sich der entsprechende rekombinante Stamm in Makrophagen nicht vermehren, ist aber leicht zytotoxisch. Es ist nicht auszuschließen, dass die Gene in diesem Fragment durch den *lacZ*-Promotor des Vektors leicht exprimiert werden. VirR reguliert möglicherweise auch die Expression anderer Gene, die für eine intrazelluläre Vermehrung nötig sind.

Der Stamm ORF8-13 produziert aus der Vap-Familie nur VapA. VapA allein reicht jedoch nicht aus, um intrazelluläre Vermehrung und Zytotoxizität zu vermitteln. Aus diesem Grund müssen neben den Vap-Proteinen noch weitere Faktoren des Virulenzplasmids an diesen Prozessen beteiligt sind. Dafür spricht auch der Befund, dass die gemeinsame Expression von *vapH* (*orf6*) und *vapA* nicht ausreicht, um intrazelluläres Wachstum und Zytotoxizität zu vermitteln. Die genauen Zusammenhänge von Virulenzplasmid-codierten Faktoren bleiben unbekannt. Ebenso unklar ist, welche Virulenzplasmid-Gene in rekombinanten Stämmen exprimiert werden. Mit einem kürzlich etablierten Microarray-Testverfahren für *R. equi* könnten die Expressionsprofile der Rekombinanten ermittelt werden (Ren und Prescott 2003).

#### 4.5. Interaktion von *R. equi* mit Makrophagen

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, kann *Rhodococcus equi* in der Lage, die Ansäuerung der Phagosomen zu verhindern. Eine der Hauptursachen dieses Prozesses besteht im Ausschluss der vATPase von *R. equi*-enthaltenden Phagosomen (Abb. 5). Diese Phagosomen sind allerdings für endozytiertes Material, das nach der Infektion von einer Zelle aufgenommen wurde, zugänglich (Fernandez 2005, Bargaen, unpublizierte Daten). Phagosomen mit *R. equi* scheinen demnach spezifisch nur mit Endosomen zu fusionieren, die noch keine vATPase akquiriert haben. Ein Testverfahren, das eine Analyse der Fusion von Endosomen mit Phagosomen *in vitro* ermöglicht, könnte Aufschluss darüber geben, mit welcher Endosomenspezies *R. equi*-enthaltende Phagosomen fusionieren.

Auch das mit *R. equi* nahe verwandte Bakterium *M. tuberculosis* verhindert die Akquisition der vATPase auf Phagosomen (Sturgill-Koszycki et al. 1994). Im Vergleich zu *R. equi* arretiert *M. tuberculosis* die Phagosomenreifung aber in einem früheren Stadium (Fratti et al. 2001). In der Arretierung der Phagosomenreifung durch *M. tuberculosis* scheinen Glykolipide eine wichtige Rolle zu spielen. Nach derzeitigen Erkenntnissen übt das Glykolipid Lipoarabinomannan (LAM) einen hemmenden Einfluss auf die Bildung von

PtdIns(3)P und  $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen am Phagosom aus und blockiert somit die Reifung der Phagosomen. Wie das kovalent in der Zellwand der Bakterien verankerte LAM die PtdIns(3)P-Bildung jenseits der Phagosomenmembran beeinflusst ist unklar. Das Phosphatidylinositolmannosid (PIM) der Bakterien soll dagegen die Fusion der Phagosomen mit frühen und Recycling-Endosomen fördern (Vergne et al. 2004). *R. equi* synthetisiert ebenfalls LAM, das dem mycobakteriellem LAM ähnlich ist (Garton et al. 2002). Glykolipide von *R. equi* könnten, ähnlich wie bei *Mycobacterium*, die Regulierung Phosphatidylinositol-abhängiger Fusionsprozesse beeinflussen. Im Gegensatz zu *M. tuberculosis* kann *R. equi* die Bildung von PtdIns(3)P jedoch nicht inhibieren (Fernandez). Der Einfluss auf die Regulation der Fusion von Endosomen und Phagosomen durch *R. equi* muss demnach an einer anderen regulatorischen Schaltstelle stattfinden, um die Akquisition der vATPase zu verhindern. Weitere Hinweise für die Relevanz von Lipiden in der Blockierung der Phagosomenreifung lieferten Studien an Transposonmutanten von *M. tuberculosis*. Einige der Mutanten, die unfähig waren die Reifung der Phagosomen zu verhindern, wiesen Defekte im Lipidstoffanabolismus auf (Stewart et al. 2005, Pethe et al. 2004). Interessanterweise wurde keine Mutante identifiziert, die defekte in der Biosynthese von LAM oder PIM aufweisen. Eine frühere Studie konnte zeigen, dass die Deletion des *embC*-Gens in *Mycobacterium smegmatis* zu einem Verlust der LAM-Synthese führte (Zhang et al. 2003). Eine *embC* von *M. tuberculosis* könnte Aufschluss darüber geben, inwiefern LAM die Phagosomenreifung beeinflusst.

Ein Zusammenhang zwischen der Virulenz und Glycolipiden von *R. equi* wurde bereits in einer früheren Studie gefunden. So wurde gezeigt, dass *R. equi*- Stämme mit langkettigen Mykolsäuren größere Granuloma produzierten und zu einer höheren Letalität bei Mäusen führte als Stämme mit kürzeren Mykolsäuren (Gotoh et al. 1991). Erste Ergebnisse einer Analyse von *R. equi*-Transposonmutanten ergaben ebenfalls Hinweise auf eine wichtige Rolle des Lipidstoffwechsels bei der Inhibierung der Phagosomenreifung (Tobias Sydor, Bonn, persönliche Mitteilung). Darüber hinaus zeigte eine erste Analyse des Genoms von *R. equi*, dass viele Gene des Lipid-Stoffwechsels, die in *M. tuberculosis* vorkommen, auch im Genom von *R. equi* enthalten sind (Rahman et al. 2003). Die Akquisition der vATPase von *R. equi*-enthaltenden Phagosomen ist von der Abwesenheit des Virulenzplasmids abhängig (Abb. 5). Sollten tatsächlich Lipide für den Ausschluss der vATPase verantwortlich sein, müsste ein Unterschied in der Synthese oder Modifikation von Lipiden zwischen plasmidhaltigen und plasmidlosen Rhodokokken feststellbar sein. Das Virulenzplasmid enthält zwar keine Gene mit Homologien zu Enzymen der Glykolipidbiosynthese, möglicherweise sind aber Genprodukte des Plasmids an der Modifikation oder am Export von virulenzrelevanten Glykolipiden beteiligt. Die Konstruktion von *R. equi*-Stämmen mit Mutationen im Virulenzplasmid und eine

anschließende Analyse der Lipidzusammensetzung der Bakterien könnte klären, ob das Virulenzplasmids an der Modifikation oder am Export von Lipiden beteiligt ist.

Neben mycobakteriellen Lipiden scheinen auch Lipoproteine für die Virulenz essentiell zu sein. Laut einer Genomanalyse sind etwa 2,5% aller Proteine von *M. tuberculosis* Lipoproteine (Cole et al. 1998). Bislang wurden aber nur wenige dieser Proteine charakterisiert. Es ist bekannt, dass die Prozessierung von Lipoproteinen für die Virulenz von *M. tuberculosis* und *L. monocytogenes* notwendig ist (Sander et al. 2004, Reglier-Poupet et al. 2003). Während manche Lipoproteine enzymatische Aktivität besitzen, ist ein großer Teil dieser Proteine an Transport-Prozessen löslicher Substrate wie Saccharide, anorganischen Phosphats oder anderer Proteine beteiligt (Sutcliffe und Russell 1995, Sutcliffe und Harrington 2004). Die Bedeutung von Lipoprotein bei der Virulenz von *R. equi* zeigt sich am Beispiel von VapA. Das VapA Protein wird durch einen noch unbekanntem Mechanismus vermutlich palmitoyliert (Tan et al. 1995). Ob auch andere Vap-Proteine acyliert werden ist unbekannt. Für die Virulenz von *Mycobacterium* bedeutsame Lipoproteine sind unter anderem das stark immunogene ESAT-6 (6 kDa Early Secreted Antigenic Target) und CFP10 (10 kDa Culture Filtrate Protein). Diese beiden Proteine werden durch ein spezialisiertes Sekretionssystem exportiert und bilden einen 1:1 Komplex *in vitro* (Guinn et al. 2004, Renshaw et al. 2002). In *M. marinum* führt eine Deletion von ESAT-6 und CFP-10 zu vermindertem intrazellulären Wachstum und geringerer Zytotoxizität (Gao et al. 2004). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass ESAT-6/CFP-10 in *M. marinum* die Veränderung der Phagosomenreifung verstärkt (Tan et al. 2006). Ebenfalls interessant war der Befund, dass der ESAT-6/CFP10 Proteinkomplex eine membranolytische Eigenschaft besitzt (Hsu et al. 2003).

Die Deletion von *vapA* führte in *R. equi* zu einem Verlust der intrazellulären Vermehrungsfähigkeit (Abb. 29), die Zytotoxizität blieb dagegen erhalten (Abb. 32). Die *vapA*-Mutante konnte die Akquisition der vATPase nicht mehr verhindern, den phagosomalen pH aber trotzdem neutralisieren (Abb. 30, 34). Die Hemmung der vATPase-Akquisition ist offenbar nicht der einzige Mechanismus, um die Ansäuerung der Phagosomen zu blockieren. *R. equi* könnte die Phagosomenmembran durch eine Permeabilisierung neutralisieren. Diese Permeabilisierung könnte nicht nur den Austritt von Protonen, sondern auch von Calcium-Ionen ermöglichen, die ein wichtiger Co-Faktor für die Regulation intrazellulärer Membranfusionen sind (Hay 2007). *L. monocytogenes* perforiert Phagosomenmembranen durch Listeriolysin O, neutralisiert so den phagosomalen pH und verhindert einen Anstieg der  $Ca^{2+}$  Konzentration im Phagosom (Shaughnessy et al. 2006). Man nimmt an, dass der Efflux von Protonen und  $Ca^{2+}$ -Ionen

die Fusion der Phagosomen mit Lysosomen hemmt, ähnliches war für *Streptococcus pyogenes* beschrieben (Hakansson et al. 2005). Im Gegensatz zu *R. equi* kann *L. monocytogenes* allerdings aus dem Phagosom in das Zytosol der Wirtszellen ausbrechen (Gaillard et al. 1987). Anders als bei *L. monocytogenes* führt die mögliche Perforation der Phagosomenmembran durch *R. equi* nicht zum Austritt der Bakterien in das Zytosol der Wirtszellen. Anhand transmissionselektronenmikroskopischer Analysen wurde gezeigt, dass die Struktur der phagosomalen Membran in infizierten Zellen zu allen untersuchten Zeiten erhalten blieb (Lührmann 2002, Fernandez 2005). Die Reifung von *R. equi*-enthaltenden Phagosomen könnte durch eine Perforation der Phagosomenmembran zusätzlich inhibiert werden. *R. equi*Δ*vapA* verzögert durch diese Permeabilisierung die Phagosomenreifung, sodass zu frühen Zeitpunkten auch keine Fusion der Phagosomen mit Lysosomen zu beobachten werden kann (Abb. 31). Die Permeabilisierung der Phagosomenmembran scheint deshalb von VapA unabhängig zu sein, nicht aber von anderen Faktoren des Virulenzplasmids.

## 4.6 Mögliche Funktionen der Vap-Proteine

### 4.6.1 Export von Virulenzfaktoren

In *R. equi* könnten die Vap-Proteine am Export wichtiger Virulenzfaktoren beteiligt sein. Die Tatsache, dass *R. equi*-Stämme ohne Virulenzplasmid leicht zytotoxisch sind und, verglichen mit toten Rhodokokken, die Phagosomenreifung zumindest verlangsamen können, weist auf chromosomal codierte für die Virulenz relevante Faktoren hin. Diese Faktoren könnten mit Hilfe der Vap-Proteine und möglichen anderen Virulenzplasmid-codierten Faktoren exportiert werden. Dies könnte erklären, warum VapA sowohl für die Phagosomenreifung als auch für die Zytotoxizität wichtig ist. Ein weiterer Hinweis dafür ist die Lokalisation des Proteins. VapA befindet sich auch während des intrazellulären Wachstums stets auf der Oberfläche der Bakterien (Abb. 35). In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde gezeigt, dass das Lipoprotein LppX von *M. tuberculosis* am Transport des Lipids Phthiocerol Dimycocerosat beteiligt ist (Sulzenbacher et al. 2006). Eine LppX-Mutante war nicht mehr in der Lage dieses Lipid zu exportieren und interessanterweise auch attenuiert. Da Lipoproteine meist mit Transportersystemen interagieren (Sutcliffe und Russell 1995, Sutcliffe und Harrington 2004), könnte eine Protein-Interaktionsstudie mit VapA Aufschluss darüber geben, ob es am Export weiterer Virulenzfaktoren beteiligt ist.

Auch die für die Zytotoxizität von *R. equi* verantwortlichen Faktoren könnten mit Hilfe von Vap-Proteinen exportiert werden. Dies würde erklären, weshalb die Zytotoxizität von *R. equi* Rekombinanten mit *vap*-Genen höher ist als von *R. equi*(-). Die Tatsache, dass *R. equi*(-) leicht zytotoxisch für Makrophagen ist, spricht für eine chromosomale Codierung von für die Zytotoxizität verantwortlichen Faktoren. Die Zytotoxizität wird durch Virulenzplasmid-Faktoren verstärkt oder reguliert (Lührmann et al. 2004). VapA ist für diesen Prozess sowie die intrazelluläre Vermehrung zentral, da nur rekombinante Stämme mit VapA zytotoxisch sind. In der *vapA*-Mutante, die ebenfalls zytotoxisch war, könnte die Funktion von VapA durch ein anderes Vap-Protein ersetzt sein. Die Austauschbarkeit von VapA war anscheinend in rekombinanten Stämmen nicht gegeben. Die für die Zytotoxizität von *R. equi* verantwortlichen Faktoren sind noch unbekannt. Das mit *R. equi* nahe verwandte Bakterium *Mycobacterium ulcerans* verursacht die Krankheit Buruli Ulcer und ist bekannt für seine zytotoxischen Eigenschaften (Hayman und McQueen 1985; George et al. 1999). Die Ursache für die Zytotoxizität von *M. ulcerans* ist das Macrolid Mycolacton (George et al. 1999). Mycolactone werden durch Polyketid-Synthasen produziert, die von einem 174 kBp großen Virulenzplasmid codiert werden (Stinear et al. 2006). Dieses Plasmid zeigt allerdings keine Ähnlichkeiten zum VapA-Plasmid von *R. equi*. Darüber hinaus lebt *M. ulcerans* im Gegensatz zu *R. equi* im Wirt extrazellulär (Hayman und McQueen 1985). Die Zytotoxizität von *R. equi* entsteht möglicherweise auch durch eine leicht hämolytische Eigenschaft der Bakterien, die hauptsächlich durch eine Phospholipase C verursacht wird (Smola et al. 1994). Interessant ist der Befund, dass Phospholipasen C auch in *M. tuberculosis* für die volle Virulenz der Bakterien notwendig ist (Raynaud et al. 2002). Die Entstehung der Nekrose in Zellen, die mit *R. equi* infiziert sind, ist unerforscht. Man nimmt an, dass eine Permeabilisierung von Lysosomen ein entscheidender Schritt in der Nekrose von Zellen ist (Zink et al. 1987, Syntichaki und Tavernarakis 2002). Diese Permeabilisierung kann durch verschiedene Signale in einer Zelle induziert werden. Durch eine Zerstörung lysosomaler Membranen werden Hydrolasen in das Zytosol der Zelle freigesetzt, die wiederum eine Kette von Nekrose-fördernden Ereignissen verursachen. Diese beinhalten beispielsweise die Blockierung des Metabolismus, Zerstörung der mitochondrialen Funktionen bis hin zur Permeabilisierung der Plasmamembran (Ferri und Kroemer 2001). Eine große Anzahl Makrophagen, in denen *R. equi* sich stark vermehrt hatte, wiesen keinerlei saure Kompartimente mehr auf (Abb. 11). Es ist denkbar, dass *R. equi* einen Faktor produziert, der zur Permeabilisierung der Lysosomenmembranen und somit zum beobachteten Verlust saurer Kompartimente führt. Diese Beobachtung könnte allerdings auch eine Folge der Zytotoxizität sein. Eine Analyse von *R. equi* Transposon-Mutanten könnte weitere wichtige Erkenntnisse über die Zytotoxizität von *R. equi* erbringen, indem

beispielsweise Mutanten identifiziert werden, die keine Nekrose mehr induzieren. Dass solche Mutanten bei einem visuellen Screen von etwa 3000 Transposon-Mutanten von *R. equi* nicht gefunden wurden (Tobias Sydor, Bonn, persönliche Mitteilung), lässt vermuten, dass diese Faktoren house keeping Funktionen erfüllen.

#### 4.6.2 Import von Nährstoffen

Eine weitere mögliche Funktion der Vap-Proteine könnte den Import von Nährstoffen während des intrazellulären Wachstums betreffen. Die intrazelluläre Vermehrung der Bakterien erfordert eine spezifische Anpassung an vorhandene Nährstoffe. Um diese Stoffe zu sichern und nutzbar zu machen, könnten Vap-Proteine oder andere Faktoren des Virulenzplasmids beteiligt sein. Dies könnte die Unfähigkeit der *vapA*-Mutante erklären, sich in Makrophagen zu vermehren. Als einzige Funktion für die Vap-Proteine erscheint dies allerdings unwahrscheinlich denn die Zytotoxizität der Bakterien hängt nicht vom intrazellulären Wachstum ab, VapA ist aber für beide Prozesse wichtig. In *R. equi* werden außer den sechs Vap-Proteinen noch drei weitere Proteine mit einer Exportsequenz von der Pathogenitätsinsel des *R. equi* Virulenzplasmids codiert (orf5, orf9, orf21, Meijer und Prescott 2004). Eine Funktion dieser Proteine ist aufgrund fehlender Homologie unbekannt. Auch bei diesen Proteinen ist eine Beteiligung am Export von chromosomal codierten Virulenzfaktoren oder Import von Nährstoffen denkbar.

#### 4.7 Zusammenfassung

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich in folgendem Modell zusammenfassen (Abb. 38). Das VapA-Protein interagiert möglicherweise mit weiteren Vap-Proteinen sowie anderen Faktoren, die chromosomal oder vom Virulenzplasmid codiert werden. Durch diese Interaktion werden Virulenzfaktoren in das Lumen des Phagosoms exportiert. Die Arretierung der Phagosomenreifung, die Zytotoxizität und die Vermehrung in Phagosomen sind voneinander getrennte Prozesse. Die Fusion mit Endosomen oder Golgi-Vesikeln, die den vATPase-Komplex beinhalten, wird durch einen oder mehrere Faktoren an der Phagosomenmembran verhindert. Unabhängig von diesem Prozess wird der phagosomale pH, möglicherweise mit Hilfe eines Permeabilisierungsfaktors, neutralisiert. Die Phagosomenreifung wird dadurch reprogrammiert (Abb. 36). Die Expression des Gens für den Permeabilisierungsfaktor wird durch Orf8 positiv beeinflusst. Faktoren, die für die Hemmung der Fusion mit späten Endosomen und Golgi-Vesikeln

sowie für die Neutralisierung des phagosomalen pH verantwortlich sind, werden durch VapA und dessen Interaktionspartner exportiert. Für die Zytotoxizität der Bakterien verantwortliche Faktoren werden möglicherweise ebenfalls mit Hilfe von VapA und dessen Interaktionspartnern exportiert und lösen die Nekrose der Wirtszelle aus. Aus der *vapA*-Mutante *R. equi* $\Delta$ *vapA* werden nur Faktoren für die Zytotoxizität und die Permeabilisierung der Phagosomenmembran exportiert. Die Akquisition der vATPase wird von der Mutante nicht verhindert. Der phagosomale pH wird von der *vapA*-Mutante für kurze Zeit neutralisiert. Dadurch wird die Reifung der Phagosomen vermutlich verzögert, sodass zu frühen Zeitpunkten auch keine Fusion der Phagosomen mit Lysosomen zu beobachten ist. Da die Mutante nicht mehr in der Lage ist, sich intrazellulär zu vermehren und Permeabilisierungsfaktoren nachzusynthetisieren, säuern die Phagosomen nach längeren Infektionszeiten schließlich an. Rekombinante Rhodokokken können weder die Akquisition der vATPase verhindern noch den phagosomalen pH neutralisieren, da die entsprechenden Faktoren nicht exportiert, modifiziert oder gebildet werden können. Lediglich Faktoren, die Nekrose auslösen, werden produziert und exportiert. Der Export der für die Zytotoxizität verantwortlichen Faktoren ist von VapA abhängig, kann aber durch eine bestimmte Kombination möglicherweise durch ein anderes Vap-Protein ersetzt werden, sodass auch die *vapA*-Mutante Nekrose auslösen kann.

Eine andere mögliche Funktion von VapA und dessen Interaktionspartner beinhaltet die Gewinnung oder den Transport von Nährstoffen, die das intrazelluläre Wachstum der Bakterien ermöglicht. Für diesen Prozess wäre VapA essentiell, da rekombinante Stämme sich in Makrophagen vermehren können, die *vapA*-Mutante allerdings nicht.

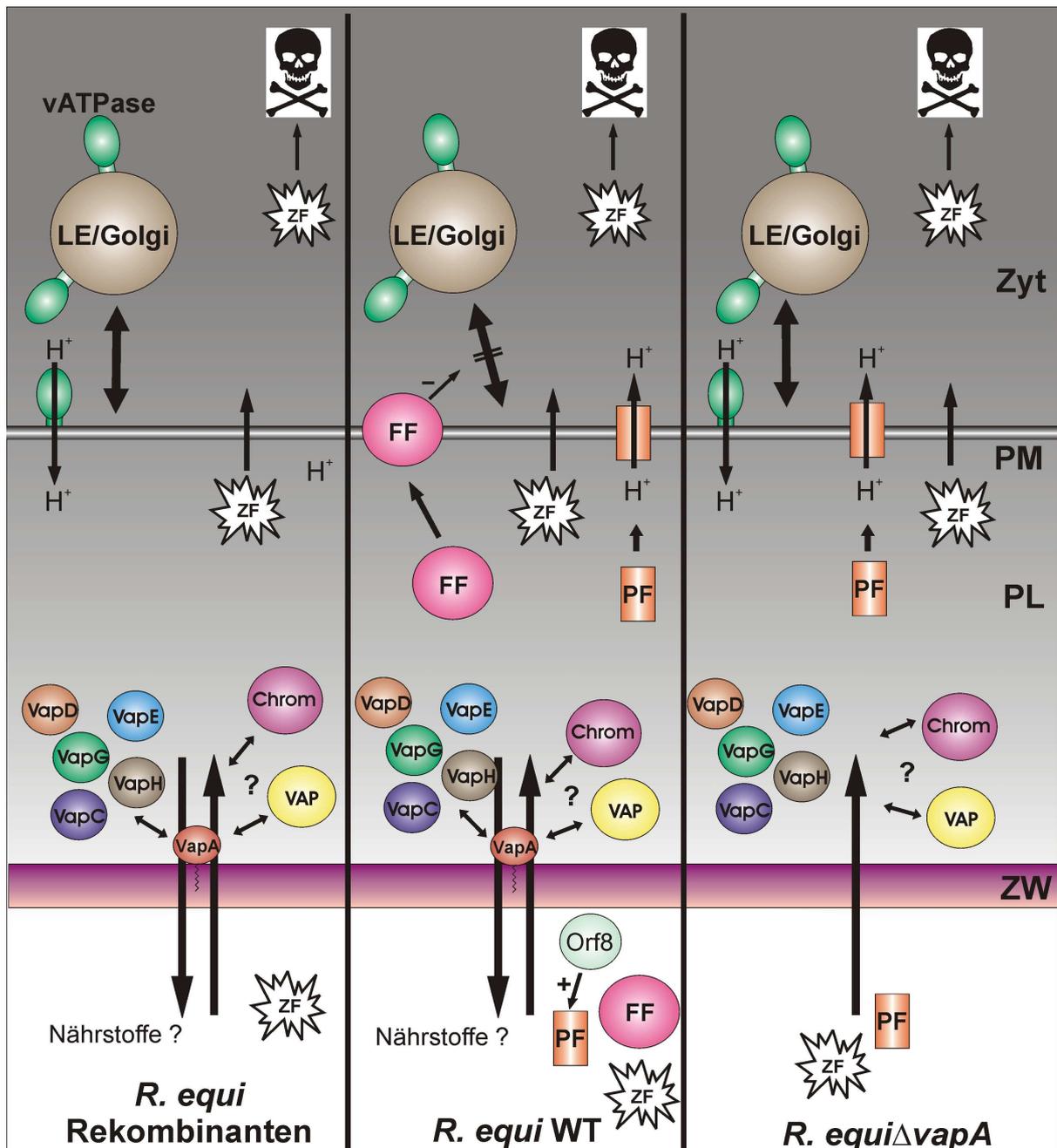


Abb. 38: Arbeitsmodell der Interaktion von *R. equi* mit Wirtszellen

Dargestellt sind mögliche Prozesse, die sich während einer Infektion von Makrophagen im Phagosom abspielen. Das VapA-Protein ist in der Zellwand der Bakterien verankert und interagiert mit anderen Vertretern der Vap-Proteinfamilie sowie mit möglichen chromosomal (Chrom) oder Virulenzplasmid (VAP) codierten Faktoren. Mit Hilfe dieser Interaktionspartner werden Faktoren exportiert, die eine Fusion mit vATPase-haltigen späten Endosomen und Golgi-Vesikeln (LE/Golgi) inhibieren (FF), die Phagosomenmembran permeabilisiert (PF) und Zytotoxizität verursacht (ZF). *R. equi*-Rekombinanten können intrazellulär wachsen und sind zytotoxisch, können aber die Ansäuerung der Phagosomen und die Fusion mit späten Endosomen und Lysosomen nicht verhindern. Die *vapA*-Mutante kann sich intrazellulär nicht vermehren und auch die Akquisition der vATPase nicht verhindern. Faktoren für die Permeabilisierung der Phagosomenmembran und für die Zytotoxizität werden von der Mutante jedoch gebildet und exportiert. Der VapA-Komplex könnte auch für die Gewinnung und den Import von Nährstoffen verantwortlich sein. Für diesen Prozess wäre VapA essentiell. ZW: Zellwand; PL: Phagosomenlumen; PM: Phagosomenmembran; Zyt: Zytoplasma.

## 5. Zusammenfassung

*Rhodococcus equi* ist ein Gram-positives, fakultativ intrazelluläres Bakterium, das in Fohlen unter anderem granulomatöse Bronchopneumonie verursacht. *R. equi* vermehrt sich in Makrophagen und ist zytotoxisch für Wirtszellen. Intrazelluläre Vermehrung und Zytotoxizität von *R. equi* hängen von der Anwesenheit eines Virulenzplasmids ab. In Makrophagen residiert *R. equi* in Phagosomen, die nicht mit Lysosomen fusionieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Kompartimentierung von *R. equi* in Makrophagen anhand gereinigter Phagosomen analysiert. *R. equi*-enthaltende Phagosomen erhielten die früh-endosomalen Marker EEA-1 und Coronin1 transient und zu späteren Zeitpunkten die spät-endosomalen Proteine LAMP1 und Rab7, aber kein Cathepsin D oder pro-Cathepsin B. Phagosomen, die *R. equi*(+) enthielten, reichert keine vATPase an und säuerten nicht an. Eine Ansäuerung von *R. equi*(+)-enthaltenden Phagosomen wurde auch nach 48 Stunden nicht beobachtet. In diesem nicht-sauren Kompartiment vermehrte sich *R. equi* intrazellulär in kommunalen Vakuolen. Rhodokokken ohne Virulenzplasmid konnten die Akquisition der vATPase und die Ansäuerung der Phagosomen dagegen nicht verhindern und sich auch nicht in Makrophagen vermehren.

Um virulenzrelevante Gene des Virulenzplasmids zu identifizieren, wurde *R. equi*(-) mit Plasmiden transformiert, die große Bereiche der Pathogenitätsinsel enthielten. Rekombinante Rhodokokken, die kein VapA produzierten, konnten sich nicht in Makrophagen vermehren und waren nicht zytotoxisch. Die zusätzliche konstitutive Expression von *vapA* ermöglichte es einigen rekombinanten Stämmen sich in Makrophagen zu vermehren und Nekrose zu induzieren. Die Zytotoxizität der Bakterien war nicht von der intrazellulären Vermehrungsfähigkeit abhängig. Keiner der getesteten Stämme konnte die Fusion mit Lysosomen und die Ansäuerung der Phagosomen hemmen. Die Vermehrung rekombinanter Stämme erfolgte im Gegensatz zum Wildtyp in sauren Kompartimenten. Um die Rolle von VapA in der Zytotoxizität von *R. equi* und der veränderten Phagosomenreifung genauer zu analysieren wurde eine *vapA*-Mutante konstruiert und anschließend charakterisiert. Die *vapA*-Mutante konnte sich nicht mehr intrazellulär vermehren, war aber ebenso zytotoxisch wie der Wildtyp. Phagosomen mit *R. equi* $\Delta$ *vapA* erhielten nach zwei Stunden die vATPase, säuerten aber nicht an und fusionierten nicht mit Lysosomen. Die phagosomale Ansäuerung konnte *R. equi* $\Delta$ *vapA* zu späten Zeitpunkten allerdings nicht mehr verhindern. Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lässt sich sagen, dass die Zytotoxizität, die intrazelluläre Vermehrung und die veränderte Phagosomenreifung von *R. equi*(+) voneinander unabhängige Prozesse sind, in denen VapA und wahrscheinlich weitere Vap-Proteine eine zentrale Rolle einnehmen.

---

## Literaturverzeichnis

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Baker, D.L. (2005). *Cellular and molecular immunology*. Philadelphia, Pa: Elsevier Saunders.
- Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 783-801.
- Al-Haddad, A., Shonn, M.A., Redlich, B., Blocker, A., Burkhardt, J.K., Yu, H., Hammer, J.A.3., Weiss, D.G., Steffen, W., Griffiths, G. and Kuznetsov, S.A. (2001) Myosin Va bound to phagosomes binds to F-actin and delays microtubule-dependent motility. *Mol Biol Cell*, 12, 2742-55.
- Alberts, B. et al. (2004). *Molekularbiologie der Zelle*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Baca, O.G., Li, Y.P. and Kumar, H. (1994) Survival of the Q fever agent *Coxiella burnetii* in the phagolysosome. *Trends Microbiol*, 2, 476-80.
- Barker, L.P., George, K.M., Falkow, S. and Small, P.L. (1997) Differential trafficking of live and dead *Mycobacterium marinum* organisms in macrophages. *Infect Immun*, 65, 1497-504.
- Barlowe, C. (2000) Traffic COPs of the early secretory pathway. *Traffic*, 1, 371-7.
- Bell, K.S., Philp, J.C., Aw, D.W. and Christofi, N. (1998) The genus *Rhodococcus*. *J Appl Microbiol*, 85, 195-210.
- Benoit, S., Benachour, A., Taouji, S., Auffray, Y. and Hartke, A. (2001) Induction of vap genes encoded by the virulence plasmid of *Rhodococcus equi* during acid tolerance response. *Res Microbiol*, 152, 439-49.
- Benoit, S., Benachour, A., Taouji, S., Auffray, Y. and Hartke, A. (2002) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which causes macrophage-related stress, triggers induction of expression of virulence-associated plasmid determinants in *Rhodococcus equi*. *Infect Immun*, 70, 3768-76.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7, 1513-23.
- Black, C.M., Paliescheskey, M., Beaman, B.L., Donovan, R.M. and Goldstein, E. (1986) Modulation of lysosomal protease-esterase and lysozyme in Kupffer cells and peritoneal macrophages infected with *Nocardia asteroides*. *Infect Immun*, 54, 917-9.
- Brumell, J.H. and Grinstein, S. (2003) Role of lipid-mediated signal transduction in bacterial internalization. *Cell Microbiol*, 5, 287-97.
- Brumell, J.H. and Grinstein, S. (2004) Salmonella redirects phagosomal maturation. *Curr Opin Microbiol*, 7, 78-84.
- Bucci, C., Thomsen, P., Nicoziani, P., McCarthy, J. and van Deurs, B. (2000) Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell*, 11, 467-80.
- Buchmeier, N.A. and Heffron, F. (1991) Inhibition of macrophage phagosome-lysosome fusion by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun*, 59, 2232-8.
- 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. *Infect Immun*, 69, 650-6.
- 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*. *J Bacteriol*

- Cambronne, E.D. and Roy, C.R. (2006) Recognition and delivery of effector proteins into eukaryotic cells by bacterial secretion systems. *Traffic*, 7, 929-39.
- Cameron, L.A., Giardini, P.A., Soo, F.S. and Theriot, J.A. (2000) Secrets of actin-based motility revealed by a bacterial pathogen. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1, 110-9.
- Carlsson, S.R. and Fukuda, M. (1992) The lysosomal membrane glycoprotein Lamp-1 is transported to lysosomes by two alternative pathways. *Arch Biochem Biophys*, 296, 630-9.
- Clague, M.J., Urbe, S., Aniento, F. and Gruenberg, J. (1994) Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation. *J Biol Chem*, 269, 21-4.
- Clemens, D.L. and Horwitz, M.A. (1995) Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J Exp Med*, 181, 257-70.
- Clemens, D.L., Lee, B.Y. and Horwitz, M.A. (2000) Deviant expression of Rab5 on phagosomes containing the intracellular pathogens *Mycobacterium tuberculosis* and *Legionella pneumophila* is associated with altered phagosomal fate. *Infect Immun*, 68, 2671-84.
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E.3., Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S. and Sulsto, (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393, 537-44.
- Cornish, N. and Washington, J.A. (1999) *Rhodococcus equi* infections: clinical features and laboratory diagnosis. *Curr Clin Top Infect Dis*, 19, 198-215.
- Cowley, S.C. and Av-Gay, Y. (2001) Monitoring promoter activity and protein localization in *Mycobacterium* spp. using green fluorescent protein. *Gene*, 264, 225-31.
- 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. *Infect Immun*, 68, 3587-93.
- Davis-Scibienski, C. and Beaman, B.L. (1980) Interaction of alveolar macrophages with *Nocardia asteroides*: immunological enhancement of phagocytosis, phagosome-lysosome fusion, and microbicidal activity. *Infect Immun*, 30, 578-87.
- de Chastellier, C., Lang, T. and Thilo, L. (1995) Phagocytic processing of the macrophage endoparasite, *Mycobacterium avium*, in comparison to phagosomes which contain *Bacillus subtilis* or latex beads. *Eur J Cell Biol*, 68, 167-82.
- Deretic, V., Singh, S., Master, S., Harris, J., Roberts, E., Kyei, G., Davis, A., de Haro, S., Naylor, J., Lee, H. and Vergne, I. (2006) *Mycobacterium tuberculosis* inhibition of phagolysosome biogenesis and autophagy as a host defence mechanism. *Cell Microbiol*, 8, 719-27.
- Desjardins, M., Huber, L.A., Parton, R.G. and Griffiths, G. (1994) Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J Cell Biol*, 124, 677-88.
- Desjardins, M., Celis, J.E., van Meer, G., Dieplinger, H., Jahraus, A., Griffiths, G. and Huber, L.A. (1994) Molecular characterization of phagosomes. *J Biol Chem*, 269, 32194-200.
- Desjardins, M. (1995) Biogenesis of phagolysosomes: the 'kiss and run' hypothesis. *Trends Cell Biol*, 5, 183-6.
- Dramsı, S. and Cossart, P. (1998) Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14, 137-66.

- Drecktrah, D., Knodler, L.A., Howe, D. and Steele-Mortimer, O. (2007) Salmonella trafficking is defined by continuous dynamic interactions with the endolysosomal system. *Traffic*, 8, 212-25.
- Ellenberger MA, G.R. (1978) *Rhodococcus equi* infections; literature review. *Compend Continuing Ed Pract Vet*, 8, 414-423.
- Feng, C.G., Collazo-Custodio, C.M., Eckhaus, M., Hieny, S., Belkaid, Y., Elkins, K., Jankovic, D., Taylor, G.A. and Sher, A. (2004) Mice deficient in LRG-47 display increased susceptibility to mycobacterial infection associated with the induction of lymphopenia. *J Immunol*, 172, 1163-8.
- Fernandez-Mora Eugenia (2005). Analysis of the Maturation of *Rhodococcus equi*-containing Vacuoles in Macrophages.
- Ferrari, G., Langen, H., Naito, M. and Pieters, J. (1999) A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell*, 97, 435-47.
- 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. *J Leukoc Biol*, 64, 85-91.
- Fields, K.A. and Hackstadt, T. (2002) The chlamydial inclusion: escape from the endocytic pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 18, 221-45.
- Finnerty, W.R. (1992) The biology and genetics of the genus *Rhodococcus*. *Annu Rev Microbiol*, 46, 193-218.
- Fratti, R.A., Vergne, I., Chua, J., Skidmore, J. and Deretic, V. (2000) Regulators of membrane trafficking and *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation block. *Electrophoresis*, 21, 3378-85.
- Fratti, R.A., Chua, J. and Deretic, V. (2002) Cellubrevin alterations and *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest. *J Biol Chem*, 277, 17320-6.
- Fratti, R.A., Chua, J., Vergne, I. and Deretic, V. (2003) *Mycobacterium tuberculosis* glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 5437-42.
- Gaillard, J.L., Berche, P., Mounier, J., Richard, S. and Sansonetti, P. (1987) In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect Immun*, 55, 2822-9.
- Gao, L., Guo, S., McLaughlin, B., Morisaki, H., Engel, J.N. and Brown, E.J. (2004) A mycobacterial virulence gene cluster extending RD1 is required for cytolysis, bacterial spreading and ESAT-6 secretion. *Mol Microbiol*, 53, 1677-93.
- 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. *J Cell Biol*, 152, 165-80.
- Garton, N.J., Gilleron, M., Brando, T., Dan, H., Giguere, 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. *J Biol Chem*, 277, 31722-33.
- Geisow, M.J., D'Arcy Hart, P. and Young, M.R. (1981) Temporal changes of lysosome and phagosome pH during phagolysosome formation in macrophages: studies by fluorescence spectroscopy. *J Cell Biol*, 89, 645-52.
- Giguere, S., Hondalus, M.K., Yager, J.A., Darrah, P., Mosser, D.M. and Prescott, J.F. (1999a) Role of the 85-kilobase plasmid and plasmid-encoded virulence-associated protein A in intracellular survival and virulence of *Rhodococcus equi*. *Infect Immun*, 67, 3548-57.
- Giguere, S., Wilkie, B.N. and Prescott, J.F. (1999b) Modulation of cytokine response of pneumonic foals by virulent *Rhodococcus equi*. *Infect Immun*, 67, 5041-7.

- Goodfellow, M. and Alderson, G. (1977) The actinomycete-genus *Rhodococcus*: a home for the 'rhodochrous' complex. *J Gen Microbiol*, 100, 99-122.
- Goodfellow, M. (1987) The taxonomic status of *Rhodococcus equi*. *Vet Microbiol*, 14, 205-9.
- Goodfellow, M., Thomas, E.G., Ward, A.C. and James, A.L. (1990) Classification and identification of rhodococci. *Zentralbl Bakteriol*, 274, 299-315.
- Gotoh, K., Mitsuyama, M., Imaizumi, S., Kawamura, I. and Yano, I. (1991) Mycolic acid-containing glycolipid as a possible virulence factor of *Rhodococcus equi* for mice. *Microbiol Immunol*, 35, 175-85.
- Gouin, E., Gantelet, H., Egile, C., Lasa, I., Ohayon, H., Villiers, V., Gounon, P., Sansonetti, P.J. and Cossart, P. (1999) A comparative study of the actin-based motilities of the pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* and *Rickettsia conorii*. *J Cell Sci*, 112 ( Pt 11), 1697-708.
- Grabe, M. and Oster, G. (2001) Regulation of organelle acidity. *J Gen Physiol*, 117, 329-44.
- Guinn, K.M., Hickey, M.J., Mathur, S.K., Zake, K.L., Grotzke, J.E., Lewinsohn, D.M., Smith, S. and Sherman, D.R. (2004) Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, 51, 359-70.
- Haas, A. (1998) Reprogramming the phagocytic pathway--intracellular pathogens and their vacuoles (review). *Mol Membr Biol*, 15, 103-21.
- Haas, A. (2007) The phagosome: compartment with a license to kill. *Traffic*, 8, 311-30.
- Hackstadt, T. and Williams, J.C. (1981) Stability of the adenosine 5'-triphosphate pool in *Coxiella burnetii*: influence of pH and substrate. *J Bacteriol*, 148, 419-25.
- Hackstadt, T. (2000) Redirection of host vesicle trafficking pathways by intracellular parasites. *Traffic*, 1, 93-9.
- Hakansson, A., Bentley, C.C., Shakhnovic, E.A. and Wessels, M.R. (2005) Cytolysin-dependent evasion of lysosomal killing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 5192-7.
- Harvey, R.L. and Sunstrum, J.C. (1991) *Rhodococcus equi* infection in patients with and without human immunodeficiency virus infection. *Rev Infect Dis*, 13, 139-45.
- Hashim, S., Mukherjee, K., Raju, M., Basu, S.K. and Mukhopadhyay, A. (2000) Live *Salmonella* modulate expression of Rab proteins to persist in a specialized compartment and escape transport to lysosomes. *J Biol Chem*, 275, 16281-8.
- Hay, J.C. (2007) Calcium: a fundamental regulator of intracellular membrane fusion? *EMBO Rep*, 8, 236-40.
- Heinzen, R.A., Scidmore, M.A., Rockey, D.D. and Hackstadt, T. (1996) Differential interaction with endocytic and exocytic pathways distinguish parasitophorous vacuoles of *Coxiella burnetii* and *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun*, 64, 796-809.
- Herrmann, J.L., O'Gaora, P., Gallagher, A., Thole, J.E. and Young, D.B. (1996) Bacterial glycoproteins: a link between glycosylation and proteolytic cleavage of a 19 kDa antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *EMBO J*, 15, 3547-54.
- Hietala, S.K. and Ardans, A.A. (1987) Interaction of *Rhodococcus equi* with phagocytic cells from R. equi-exposed and non-exposed foals. *Vet Microbiol*, 14, 307-20.
- High, N., Mounier, J., Prevost, M.C. and Sansonetti, P.J. (1992) IpaB of *Shigella flexneri* causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole. *EMBO J*, 11, 1991-9.
- Holden, D.W. (2002) Trafficking of the *Salmonella* vacuole in macrophages. *Traffic*, 3, 161-9.

- Hondalus, M.K. (1997) Pathogenesis and virulence of *Rhodococcus equi*. *Vet Microbiol*, 56, 257-68.
- Horwitz, M.A. (1983a) Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *J Exp Med*, 158, 1319-31.
- Horwitz, M.A. (1983b) The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J Exp Med*, 158, 2108-26.
- Horwitz, M.A. and Maxfield, F.R. (1984) *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *J Cell Biol*, 99, 1936-43.
- Howe, D. and Mallavia, L.P. (2000) *Coxiella burnetii* exhibits morphological change and delays phagolysosomal fusion after internalization by J774A.1 cells. *Infect Immun*, 68, 3815-21.
- Hsu, T., Hingley-Wilson, S.M., Chen, B., Chen, M., Dai, A.Z., Morin, P.M., Marks, C.B., Padiyar, J., Goulding, C., Gingery, M., Eisenberg, D., Russell, R.G., Derrick, S.C., Collins, F.M., Morris, S.L., King, C.H. and Jacobs, W.R.J. (2003) The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 12420-5.
- Hughes, K.L. and Sulaiman, I. (1987) The ecology of *Rhodococcus equi* and physicochemical influences on growth. *Vet Microbiol*, 14, 241-50.
- Indrigo, J., Hunter, R.L.J. and Actor, J.K. (2003) Cord factor trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages. *Microbiology*, 149, 2049-59.
- Ishibashi, Y. and Arai, T. (1990) Specific inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages mediated by *Salmonella typhimurium* infection. *FEMS Microbiol Immunol*, 2, 35-43.
- Ivshina IB, K.T.L.Y. (1994). *IEGM Catalogue of Strains of Regional Specialised Collection of Alkanotrophic Microorganisms*. Moscow: Russian Academy of Sciences.
- Jain, S., Bloom, B.R. and Hondalus, M.K. (2003) Deletion of vapA encoding Virulence Associated Protein A attenuates the intracellular actinomycete *Rhodococcus equi*. *Mol Microbiol*, 50, 115-28.
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M. and Shlomchik, M. (2002). *Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Jutras, I. and Desjardins, M. (2005) Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21, 511-27.
- Karlsson, K. and Carlsson, S.R. (1998) Sorting of lysosomal membrane glycoproteins lamp-1 and Lamp-2 into vesicles distinct from mannose 6-phosphate receptor/gamma-adaptin vesicles at the trans-Golgi network. *J Biol Chem*, 273, 18966-73.
- Kasuga-Aoki, H., Takai, S., Sasaki, Y., Tsubaki, S., Madarame, H. and Nakane, A. (1999) Tumour necrosis factor and interferon-gamma are required in host resistance against virulent *Rhodococcus equi* infection in mice: cytokine production depends on the virulence levels of *R. equi*. *Immunology*, 96, 122-7.
- Kim, S., Reddy, S.K., Nelson, B.C., Vasquez, G.B., Davis, A., Howard, A.J., Patterson, S., Gilliland, G.L., Ladner, J.E. and Reddy, P.T. (2006) Biochemical and structural characterization of the secreted chorismate mutase (Rv1885c) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: an \*AroQ enzyme not regulated by the aromatic amino acids. *J Bacteriol*, 188, 8638-48.
- Kobayashi, T., Gu, F. and Gruenberg, J. (1998) Lipids, lipid domains and lipid-protein interactions in endocytic membrane traffic. *Semin Cell Dev Biol*, 9, 517-26.
- Kolios, G., Valatas, V. and Ward, S.G. (2004) Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology*, 113, 427-37.
- Kornfeld, S. and Mellman, I. (1989) The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol*, 5, 483-525.

- Kyhse-Andersen, J. (1984) Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*, 10, 203-9.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- Lang, T., de Chastellier, C., Frehel, C., Hellio, R., Metezeau, P., Leao, S.d.S. and Antoine, J.C. (1994) Distribution of MHC class I and of MHC class II molecules in macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J Cell Sci*, 107 ( Pt 1), 69-82.
- Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K.A., Monks, B.G., Knetter, C.F., Lien, E., Nilsen, N.J., Espevik, T. and Golenbock, D.T. (2004) TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol*, 5, 190-8.
- Lengeler, J.W., Drews, G. and Schlegel, H.G. (1999). *Biology of the prokaryotes*. Stuttgart: Thieme
- Lindmo, K. and Stenmark, H. (2006) Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. *J Cell Sci*, 119, 605-14.
- Linehan, S.A., Martinez-Pomares, L. and Gordon, S. (2000) Mannose receptor and scavenger receptor: two macrophage pattern recognition receptors with diverse functions in tissue homeostasis and host defense. *Adv Exp Med Biol*, 479, 1-14.
- Linke, M., Herzog, V. and Brix, K. (2002) Trafficking of lysosomal cathepsin B-green fluorescent protein to the surface of thyroid epithelial cells involves the endosomal/lysosomal compartment. *J Cell Sci*, 115, 4877-89.
- Ludwig, T., Griffiths, G. and Hoflack, B. (1991) Distribution of newly synthesized lysosomal enzymes in the endocytic pathway of normal rat kidney cells. *J Cell Biol*, 115, 1561-72.
- Lührmann, A. and Haas, A. (2000) A method to purify bacteria-containing phagosomes from infected macrophages. *Methods Cell Sci*, 22, 329-41.
- 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. *Infect Immun*, 72, 853-62.
- Lührmann Anja (2002). *Analyse der Reifung von Atypien- und Rhodokokken-enthaltenden Phagosomen in Makrophagen*.
- MacMicking, J.D., Taylor, G.A. and McKinney, J.D. (2003) Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47. *Science*, 302, 654-9.
- Magnusson H (1923) Spezifische infektiöse Pneumonie beim Fohlen. Ein neuer Eitererreger beim Pferde. *Arch Wiss Praht Tierheilkd*, 50, 22-38.
- Malik, Z.A., Denning, G.M. and Kusner, D.J. (2000) Inhibition of Ca(2+) signaling by *Mycobacterium tuberculosis* is associated with reduced phagosome-lysosome fusion and increased survival within human macrophages. *J Exp Med*, 191, 287-302.
- Malik, Z.A., Iyer, S.S. and Kusner, D.J. (2001) *Mycobacterium tuberculosis* phagosomes exhibit altered calmodulin-dependent signal transduction: contribution to inhibition of phagosome-lysosome fusion and intracellular survival in human macrophages. *J Immunol*, 166, 3392-401.
- Maniak, M., Rauchenberger, R., Albrecht, R., Murphy, J. and Gerisch, G. (1995) Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein Tag. *Cell*, 83, 915-24.
- Maxfield, F.R. and McGraw, T.E. (2004) Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 121-32.
- McNeil, M.M. and Brown, J.M. (1994) The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev*, 7, 357-417.

- Mege, J.L., Maurin, M., Capo, C. and Raoult, D. (1997) *Coxiella burnetii*: the 'query' fever bacterium. A model of immune subversion by a strictly intracellular microorganism. *FEMS Microbiol Rev*, 19, 209-17.
- Meijer, W.G. and Prescott, J.F. (2004) *Rhodococcus equi*. *Vet Res*, 35, 383-96.
- Mellman, I. (1992) The importance of being acid: the role of acidification in intracellular membrane traffic. *J Exp Biol*, 172, 39-45.
- Mèresse, S., Steele-Mortimer, O., Finlay, B.B. and Gorvel, J.P. (1999) The rab7 GTPase controls the maturation of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles in HeLa cells. *EMBO J*, 18, 4394-403.
- Mèresse, S., Unsworth, K.E., Habermann, A., Griffiths, G., Fang, F., Martinez-Lorenzo, M.J., Waterman, S.R., Gorvel, J.P. and Holden, D.W. (2001) Remodelling of the actin cytoskeleton is essential for replication of intravacuolar *Salmonella*. *Cell Microbiol*, 3, 567-77.
- Michell, R.H., Heath, V.L., Lemmon, M.A. and Dove, S.K. (2006) Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate: metabolism and cellular functions. *Trends Biochem Sci*, 31, 52-63.
- Mills, S.D. and Finlay, B.B. (1998) Isolation and characterization of *Salmonella typhimurium* and *Yersinia pseudotuberculosis*-containing phagosomes from infected mouse macrophages: *Y. pseudotuberculosis* traffics to terminal lysosomes where they are degraded. *Eur J Cell Biol*, 77, 35-47.
- Mosser, D.M. and Hondalus, M.K. (1996) *Rhodococcus equi*: an emerging opportunistic pathogen. *Trends Microbiol*, 4, 29-33.
- Mukherjee, K., Siddiqi, S.A., Hashim, S., Raje, M., Basu, S.K. and Mukhopadhyay, A. (2000) Live *Salmonella* recruits N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein on phagosomal membrane and promotes fusion with early endosome. *J Cell Biol*, 148, 741-53.
- Mutimer, M.D., Prescott, J.F. and Woolcock, J.B. (1982) Capsular serotypes of *Rhodococcus equi*. *Aust Vet J*, 58, 67-9.
- Nagai, H. and Roy, C.R. (2001) The DotA protein from *Legionella pneumophila* is secreted by a novel process that requires the Dot/Icm transporter. *EMBO J*, 20, 5962-70.
- Nagai, H., Kagan, J.C., Zhu, X., Kahn, R.A. and Roy, C.R. (2002) A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on *Legionella* phagosomes. *Science*, 295, 679-82.
- Navas, J., Gonzalez-Zorn, B., Ladron, N., Garrido, P. and Vazquez-Boland, J.A. (2001) Identification and mutagenesis by allelic exchange of *choE*, encoding a cholesterol oxidase from the intracellular pathogen *Rhodococcus equi*. *J Bacteriol*, 183, 4796-805.
- Ochman, H., Soncini, F.C., Solomon, F. and Groisman, E.A. (1996) Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 7800-4.
- Paget, E. and Davies, J. (1996) Apramycin resistance as a selective marker for gene transfer in mycobacteria. *J Bacteriol*, 178, 6357-60.
- 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*. *Vet Microbiol*, 118, 240-6.
- Pethe, K., Swenson, D.L., Alonso, S., Anderson, J., Wang, C. and Russell, D.G. (2004) Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* mutants defective in the arrest of phagosome maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 13642-7.
- Pitt, A., Mayorga, L.S., Schwartz, A.L. and Stahl, P.D. (1992) Transport of phagosomal components to an endosomal compartment. *J Biol Chem*, 267, 126-32.

- Portevin, D., De Sousa-D'Auria, C., Houssin, C., Grimaldi, C., Chami, M., Daffe, M. and Guilhot, C. (2004) A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 314-9.
- Prescott, J.F. (1987) Epidemiology of *Rhodococcus equi* infection in horses. *Vet Microbiol*, 14, 211-4.
- Prescott, J.F. (1991) *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 4, 20-34.
- Rahman, M.T., Herron, L.L., Kapur, V., Meijer, W.G., Byrne, B.A., Ren, J., Nicholson, V.M. and Prescott, J.F. (2003) Partial genome sequencing of *Rhodococcus equi* ATCC 33701. *Vet Microbiol*, 94, 143-58.
- Raiborg, C. and Stenmark, H. (2002) Hrs and endocytic sorting of ubiquitinated membrane proteins. *Cell Struct Funct*, 27, 403-8.
- Raschke, W.C., Baird, S., Ralph, P. and Nakoinz, I. (1978) Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell*, 15, 261-7.
- Rathman, M., Barker, L.P. and Falkow, S. (1997) The unique trafficking pattern of *Salmonella typhimurium*-containing phagosomes in murine macrophages is independent of the mechanism of bacterial entry. *Infect Immun*, 65, 1475-85.
- Ravetch, J.V. and Bolland, S. (2001) IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol*, 19, 275-90.
- Rawlings, B.J. (1999) Biosynthesis of polyketides (other than actinomycete macrolides). *Nat Prod Rep*, 16, 425-84.
- Reed, M.B., Domenech, P., Manca, C., Su, H., Barczak, A.K., Kreiswirth, B.N., Kaplan, G. and Barry, C.E.3. (2004) A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature*, 431, 84-7.
- Reglier-Poupet, H., Frehel, C., Dubail, I., Beretti, J., Berche, P., Charbit, A. and Raynaud, C. (2003) Maturation of lipoproteins by type II signal peptidase is required for phagosomal escape of *Listeria monocytogenes*. *J Biol Chem*, 278, 49469-77.
- Ren, J. and Prescott, J.F. (2003) Analysis of virulence plasmid gene expression of intramacrophage and in vitro grown *Rhodococcus equi* ATCC 33701. *Vet Microbiol*, 94, 167-82.
- Renshaw, P.S., Panagiotidou, P., Whelan, A., Gordon, S.V., Hewinson, R.G., Williamson, R.A. and Carr, M.D. (2002) Conclusive evidence that the major T-cell antigens of the *Mycobacterium tuberculosis* complex ESAT-6 and CFP-10 form a tight, 1:1 complex and characterization of the structural properties of ESAT-6, CFP-10, and the ESAT-6\*CFP-10 complex. Implications for pathogenesis and virulence. *J Biol Chem*, 277, 21598-603.
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. and Zerial, M. (2005) Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell*, 122, 735-49.
- Rohrer, J., Schweizer, A., Russell, D. and Kornfeld, S. (1996) The targeting of Lamp1 to lysosomes is dependent on the spacing of its cytoplasmic tail tyrosine sorting motif relative to the membrane. *J Cell Biol*, 132, 565-76.
- Roy, C.R., Berger, K.H. and Isberg, R.R. (1998) *Legionella pneumophila* DotA protein is required for early phagosome trafficking decisions that occur within minutes of bacterial uptake. *Mol Microbiol*, 28, 663-74.
- Roy, C.R. and Tilney, L.G. (2002) The road less traveled: transport of *Legionella* to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, 158, 415-9.
- Russell, D.G., Dant, J. and Sturgill-Koszycki, S. (1996) *Mycobacterium avium*- and *Mycobacterium tuberculosis*-containing vacuoles are dynamic, fusion-competent vesicles that are accessible to glycosphingolipids from the host cell plasmalemma. *J Immunol*, 156, 4764-73.

- Russell, D.G. (2001) *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 569-77.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sander, P., Rezwan, M., Walker, B., Rampini, S.K., Kroppenstedt, R.M., Ehlers, S., Keller, C., Keeble, J.R., Hagemeyer, M., Colston, M.J., Springer, B. and Bottger, E.C. (2004) Lipoprotein processing is required for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, 52, 1543-52.
- Sasso, S., Ramakrishnan, C., Gamper, M., Hilvert, D. and Kast, P. (2005) Characterization of the secreted chorismate mutase from the pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS J*, 272, 375-89.
- Schaible, U.E., Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P.H. and Russell, D.G. (1998) Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes in murine macrophages. *J Immunol*, 160, 1290-6.
- Schaible, U.E., Collins, H.L. and Kaufmann, S.H. (1999) Confrontation between intracellular bacteria and the immune system. *Adv Immunol*, 71, 267-377.
- Schaible, U.E. and Kaufmann, S.H.E. (2004) Iron and microbial infection. *Nat Rev Microbiol*, 2, 946-53.
- Schramm, N., Bagnell, C.R. and Wyrick, P.B. (1996) Vesicles containing *Chlamydia trachomatis* serovar L2 remain above pH 6 within HEC-1B cells. *Infect Immun*, 64, 1208-14.
- Schüller, S., Neefjes, J., Ottenhoff, T., Thole, J. and Young, D. (2001) Coronin is involved in uptake of *Mycobacterium bovis* BCG in human macrophages but not in phagosome maintenance. *Cell Microbiol*, 3, 785-93.
- Sekine, M., Tanikawa, S., Omata, S., Saito, M., Fujisawa, T., Tsukatani, N., Tajima, T., Sekigawa, T., Kosugi, H., Matsuo, Y., Nishiko, R., Imamura, K., Ito, M., Narita, H., Tago, S., Fujita, N. and Harayama, S. (2006) Sequence analysis of three plasmids harboured in *Rhodococcus erythropolis* strain PR4. *Environ Microbiol*, 8, 334-46.
- 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. *Cell Microbiol*, 8, 781-92.
- Skerman VDB, M.V.S.P. (1980) Approved list of bacteria names. *Int J Syst Bacteriol*, 30, 225-400.
- Smith, G.A., Marquis, H., Jones, S., Johnston, N.C., Portnoy, D.A. and Goldfine, H. (1995) The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infect Immun*, 63, 4231-7.
- Smola, J., Katerov, V. and Schalen, C. (1994) Haemolytic and phospholipase C (PLC) activities of *Rhodococcus equi*. *J Appl Bacteriol*, 77, 325-33.
- Steele-Mortimer, O., Meresse, S., Gorvel, J.P., Toh, B.H. and Finlay, B.B. (1999) Biogenesis of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles in epithelial cells involves interactions with the early endocytic pathway. *Cell Microbiol*, 1, 33-49.
- Stein, M. and Gordon, S. (1991) Regulation of tumor necrosis factor (TNF) release by murine peritoneal macrophages: role of cell stimulation and specific phagocytic plasma membrane receptors. *Eur J Immunol*, 21, 431-7.
- Stewart, G.R., Patel, J., Robertson, B.D., Rae, A. and Young, D.B. (2005) Mycobacterial mutants with defective control of phagosomal acidification. *PLoS Pathog*, 1, 269-78.
- Storrie, B. and Desjardins, M. (1996) The biogenesis of lysosomes: is it a kiss and run, continuous fusion and fission process? *Bioessays*, 18, 895-903.
- Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P.H., Chakraborty, P., Haddix, P.L., Collins, H.L., Fok, A.K.,

- Allen, R.D., Gluck, S.L., Heuser, J. and Russell, D.G. (1994) Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science*, 263, 678-81.
- Sturgill-Koszycki, S. and Swanson, M.S. (2000) *Legionella pneumophila* replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. *J Exp Med*, 192, 1261-72.
- Sutcliffe, I.C. and Russell, R.R. (1995) Lipoproteins of gram-positive bacteria. *J Bacteriol*, 177, 1123-8.
- Sutcliffe, I.C. (1998) Cell envelope composition and organisation in the genus *Rhodococcus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 74, 49-58.
- Sutcliffe, I.C. and Harrington, D.J. (2004) Lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis*: an abundant and functionally diverse class of cell envelope components. *FEMS Microbiol Rev*, 28, 645-59.
- Swanson, M.S. and Isberg, R.R. (1995) Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic reticulum. *Infect Immun*, 63, 3609-20.
- Swanson, M.S. and Hammer, B.K. (2000) *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu Rev Microbiol*, 54, 567-613.
- Takai, S., Koike, K., Ohbushi, S., Izumi, C. and Tsubaki, S. (1991a) Identification of 15- to 17-kilodalton antigens associated with virulent *Rhodococcus equi*. *J Clin Microbiol*, 29, 439-43.
- Takai, S., Ohbushi, S., Koike, K., Tsubaki, S., Oishi, H. and Kamada, M. (1991b) Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in isolates from soil and feces of horses from horse-breeding farms with and without endemic infections. *J Clin Microbiol*, 29, 2887-9.
- Takai, S., Sekizaki, T., Ozawa, T., Sugawara, T., Watanabe, Y. and Tsubaki, S. (1991c) Association between a large plasmid and 15- to 17-kilodalton antigens in virulent *Rhodococcus equi*. *Infect Immun*, 59, 4056-60.
- Takai, S., Iie, 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. *Infect Immun*, 60, 2995-7.
- Takai, S., Sasaki, Y., Ikeda, T., Uchida, Y., Tsubaki, S. and Sekizaki, T. (1994) Virulence of *Rhodococcus equi* isolates from patients with and without AIDS. *J Clin Microbiol*, 32, 457-60.
- Takai, S., Fukunaga, N., Kamisawa, K., Imai, Y., Sasaki, Y. and Tsubaki, S. (1996a) Expression of virulence-associated antigens of *Rhodococcus equi* is regulated by temperature and pH. *Microbiol Immunol*, 40, 591-4.
- Takai, S., Fukunaga, N., Ochiai, S., Imai, Y., Sasaki, Y., Tsubaki, S. and Sekizaki, T. (1996b) Identification of intermediately virulent *Rhodococcus equi* isolates from pigs. *J Clin Microbiol*, 34, 1034-7.
- 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., Dan, H. and Prescott, J.F. (2000) DNA sequence and comparison of virulence plasmids from *Rhodococcus equi* ATCC 33701 and 103. *Infect Immun*, 68, 6840-7.
- Tan, C., Prescott, J.F., Patterson, M.C. and Nicholson, V.M. (1995) Molecular characterization of a lipid-modified virulence-associated protein of *Rhodococcus equi* and its potential in protective immunity. *Can J Vet Res*, 59, 51-9.
- Tan, T., Lee, W.L., Alexander, D.C., Grinstein, S. and Liu, J. (2006) The ESAT-6/CFP-10 secretion system of *Mycobacterium marinum* modulates phagosome maturation. *Cell Microbiol*, 8, 1417-29.
- Taylor, G.A., Feng, C.G. and Sher, A. (2004) p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol*, 4, 100-9.

- Taylor, P.R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H., Brown, G.D. and Gordon, S. (2005) Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 23, 901-44.
- Tjelle, T.E., Saigal, B., Froystad, M. and Berg, T. (1998) Degradation of phagosomal components in late endocytic organelles. *J Cell Sci*, 111 ( Pt 1), 141-8.
- Tsang, A.W., Oestergaard, K., Myers, J.T. and Swanson, J.A. (2000) Altered membrane trafficking in activated bone marrow-derived macrophages. *J Leukoc Biol*, 68, 487-94.
- Ullrich, H.J., Beatty, W.L. and Russell, D.G. (1999) Direct delivery of procathepsin D to phagosomes: implications for phagosome biogenesis and parasitism by *Mycobacterium*. *Eur J Cell Biol*, 78, 739-48.
- van Weert, A.W., Dunn, K.W., Gueze, H.J., Maxfield, F.R. and Stoorvogel, W. (1995) Transport from late endosomes to lysosomes, but not sorting of integral membrane proteins in endosomes, depends on the vacuolar proton pump. *J Cell Biol*, 130, 821-34.
- Vergne, I., Chua, J. and Deretic, V. (2003) Tuberculosis toxin blocking phagosome maturation inhibits a novel Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-PI3K hVPS34 cascade. *J Exp Med*, 198, 653-9.
- Vergne, I., Fratti, R.A., Hill, P.J., Chua, J., Belisle, J. and Deretic, V. (2004) *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest: mycobacterial phosphatidylinositol analog phosphatidylinositol mannoside stimulates early endosomal fusion. *Mol Biol Cell*, 15, 751-60.
- Vergne, I., Chua, J., Lee, H., Lucas, M., Belisle, J. and Deretic, V. (2005) Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 4033-8.
- Via, L.E., Deretic, D., Ulmer, R.J., Hibler, N.S., Huber, L.A. and Deretic, V. (1997) Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *J Biol Chem*, 272, 13326-31.
- Via, L.E., Fratti, R.A., McFalone, M., Pagan-Ramos, E., Deretic, D. and Deretic, V. (1998) Effects of cytokines on mycobacterial phagosome maturation. *J Cell Sci*, 111 ( Pt 7), 897-905.
- Vieira, O.V., Harrison, R.E., Scott, C.C., Stenmark, H., Alexander, D., Liu, J., Gruenberg, J., Schreiber, A.D. and Grinstein, S. (2004) Acquisition of Hrs, an essential component of phagosomal maturation, is impaired by mycobacteria. *Mol Cell Biol*, 24, 4593-604.
- von Bargen Kristine (2005). *Rhodococcus equi*-containing Vacuoles: Acidification and Fusion with Lysosomes.
- Woolcock, J.B. and Mutimer, M.D. (1978) The capsules of *Corynebacterium equi* and *Streptococcus equi*. *J Gen Microbiol*, 109, 127-30.
- Xiang, L., Kalaitzis, J.A. and Moore, B.S. (2004) EncM, a versatile enterocin biosynthetic enzyme involved in Favorskii oxidative rearrangement, aldol condensation, and heterocycle-forming reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 15609-14.
- Yamamoto, Y., Klein, T.W. and Friedman, H. (1997) Involvement of mannose receptor in cytokine interleukin-1beta (IL-1beta), IL-6, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses, but not in chemokine macrophage inflammatory protein 1beta (MIP-1beta), MIP-2, and KC responses, caused by att. *Infect Immun*, 65, 1077-82.
- Yates, R.M., Hermetter, A., Taylor, G.A. and Russell, D.G. (2007) Macrophage activation downregulates the degradative capacity of the phagosome. *Traffic*, 8, 241-50.
- Zerial, M. and McBride, H. (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 107-17.

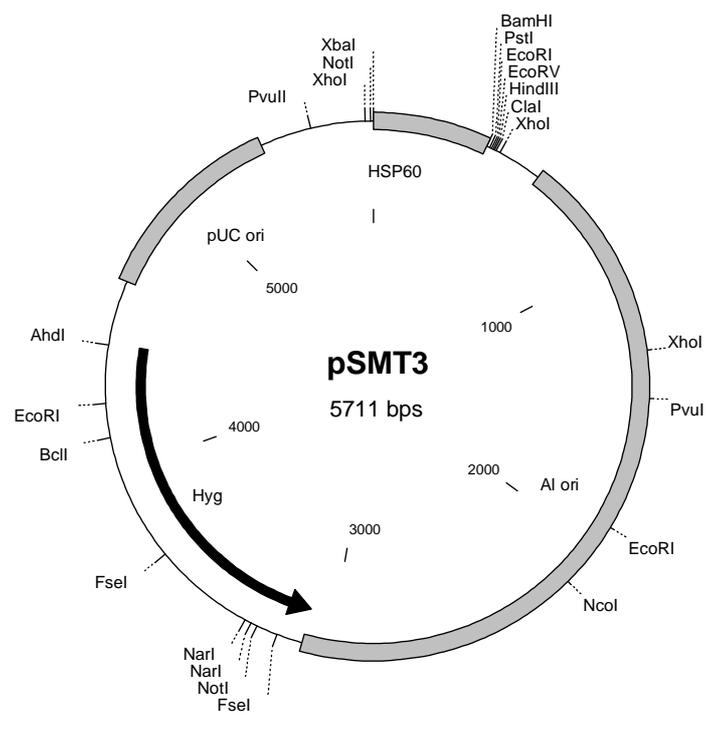
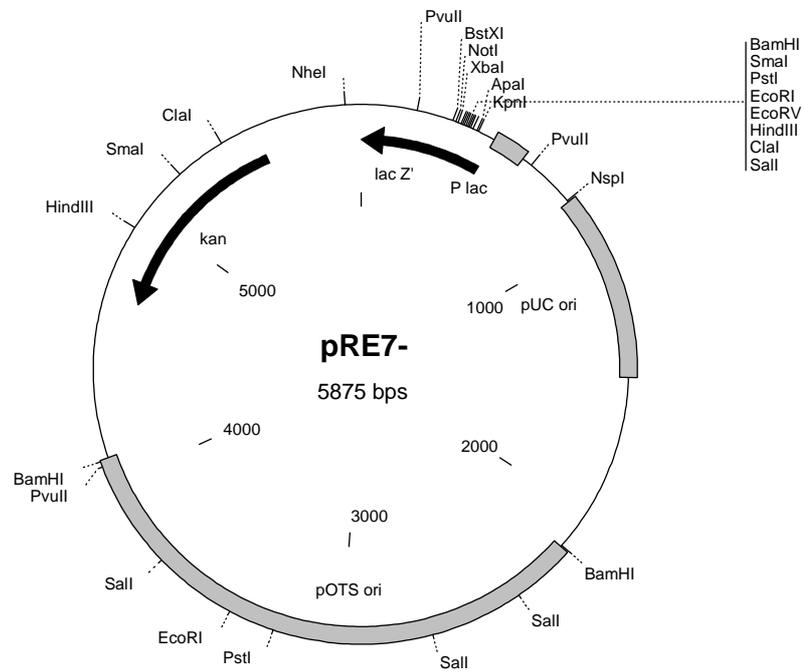
Zhang, N., Torrelles, J. B., McNeil, M., Escuyer, V., Khoo, KH., Brennan, P. and Chatterjee, D. (2003) The Emb proteins of mycobacteria direct arabinosylation of lipoarabinomannan and arabinogalactan via an N-terminal recognition region and a C-terminal synthetic region. *Mol Micro*, 50(1), 69-76.

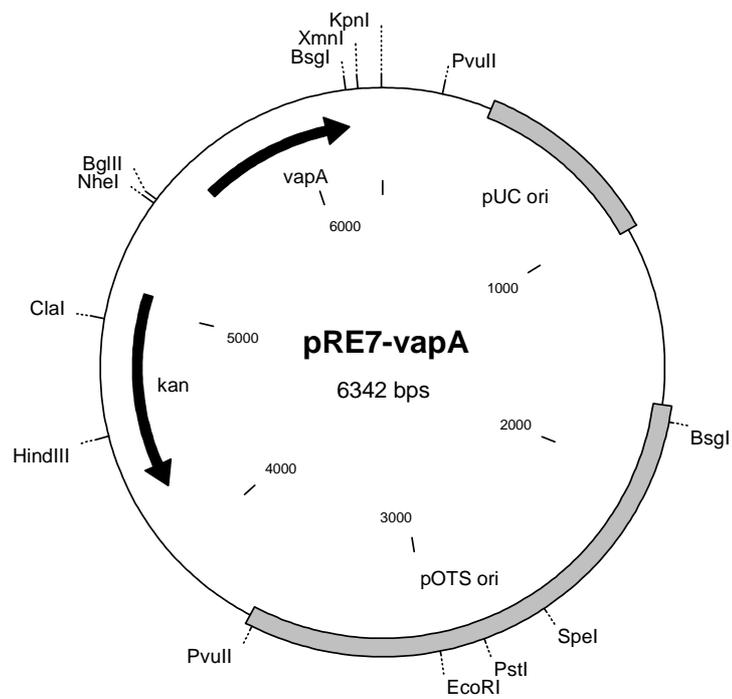
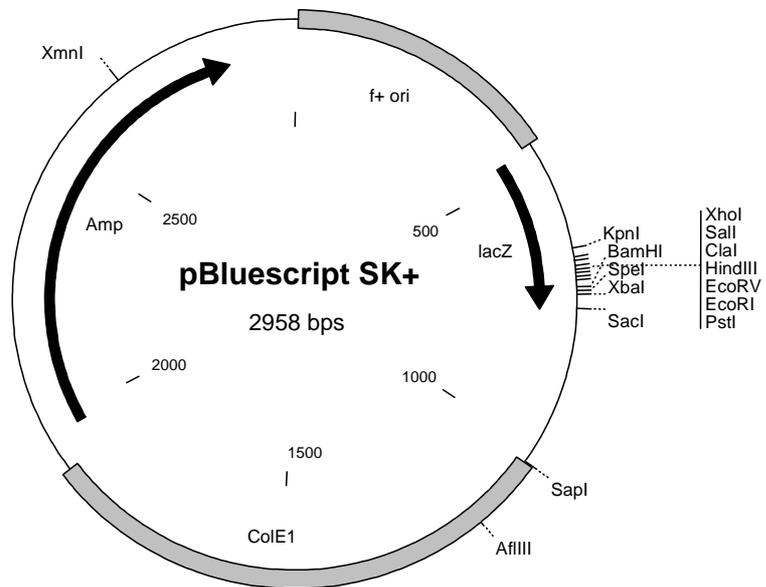
Zheng, H., Tkachuk-Saad, O. and Prescott, J.F. (1997) Development of a *Rhodococcus equi*-*Escherichia coli* plasmid shuttle vector. *Plasmid*, 38, 180-7.

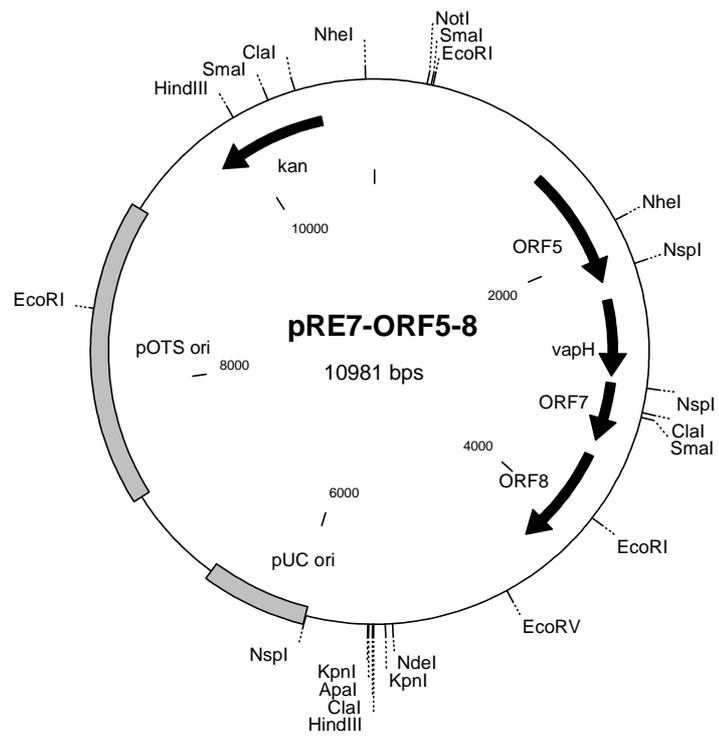
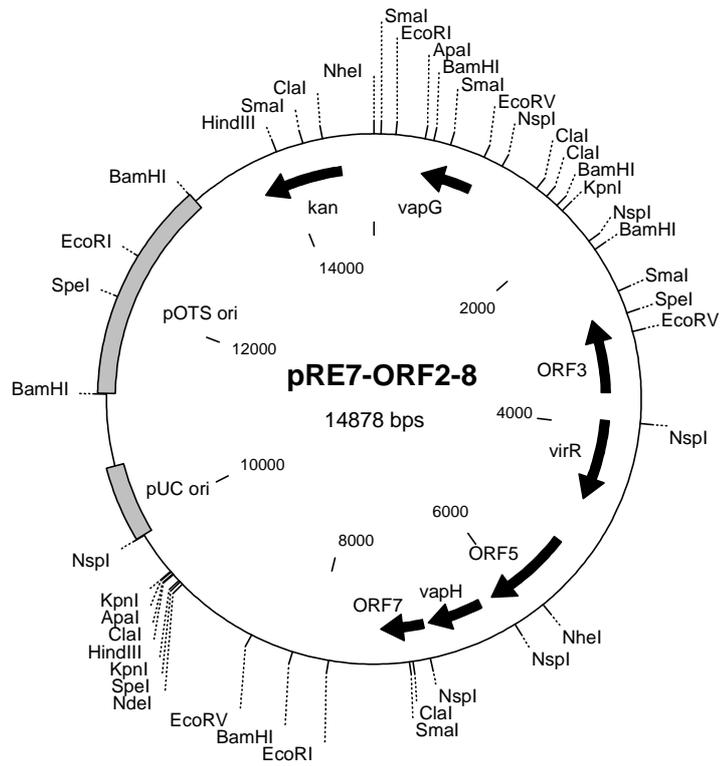
Zink, M.C., Yager, J.A., Prescott, J.F. and Fernando, M.A. (1987) Electron microscopic investigation of intracellular events after ingestion of *Rhodococcus equi* by foal alveolar macrophages. *Vet Microbiol*, 14, 295-305.

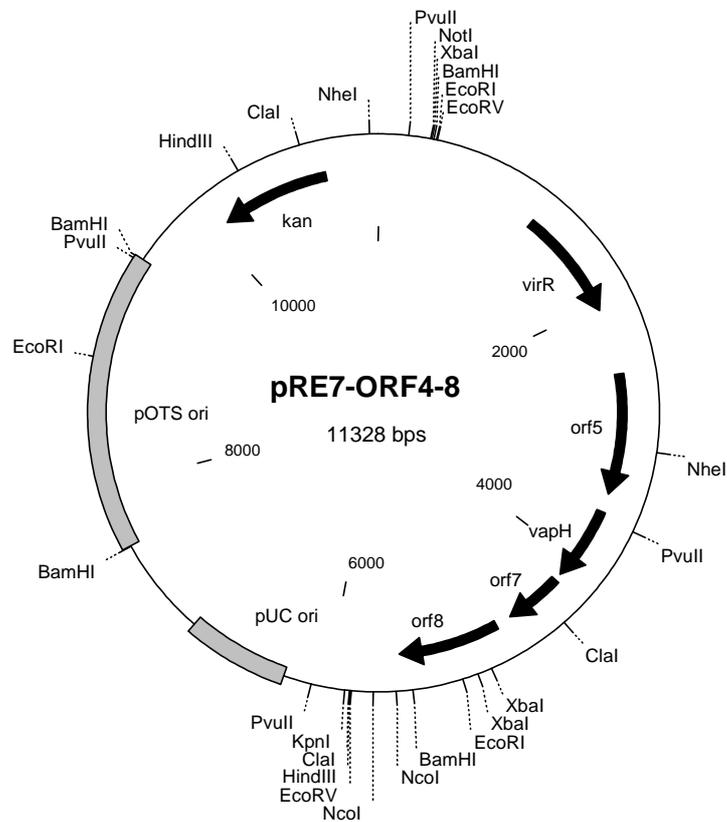
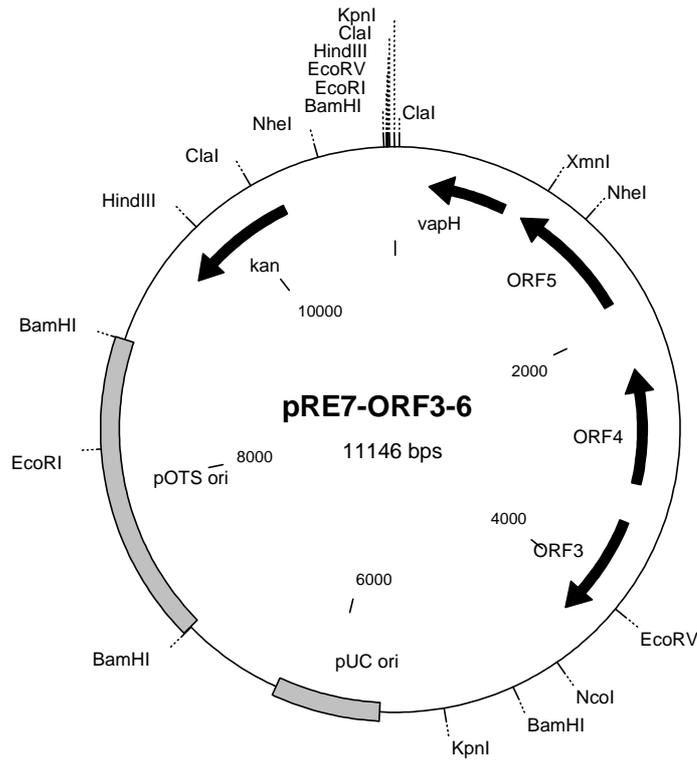
Zopf W (1891) Über Ausscheidungen von Fettfarbstoffen (Lipochromen) seitens gewisser Spaltpilze. *Berichte der Deutschen Gesellschaft*, 9, 22-28.

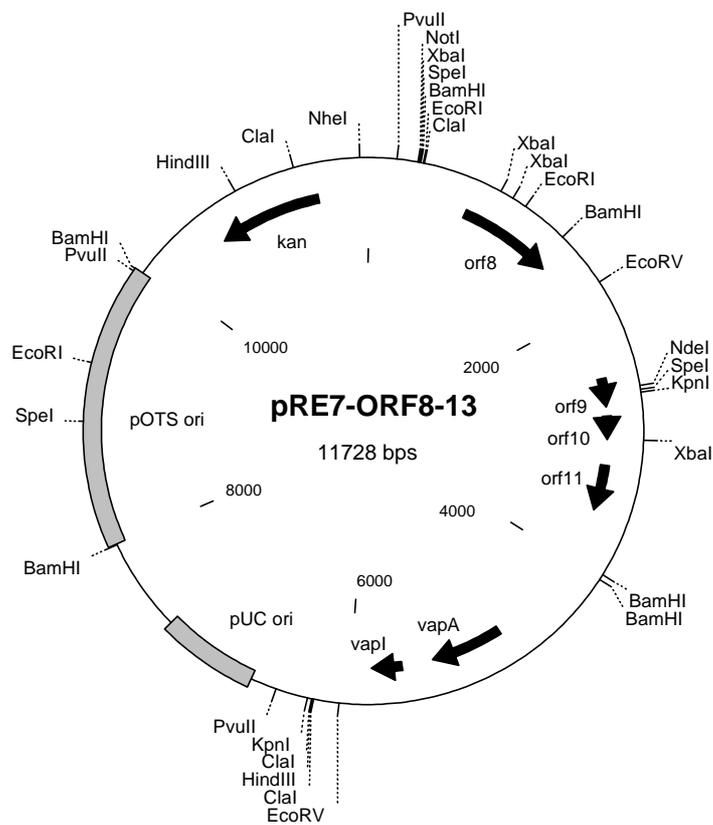
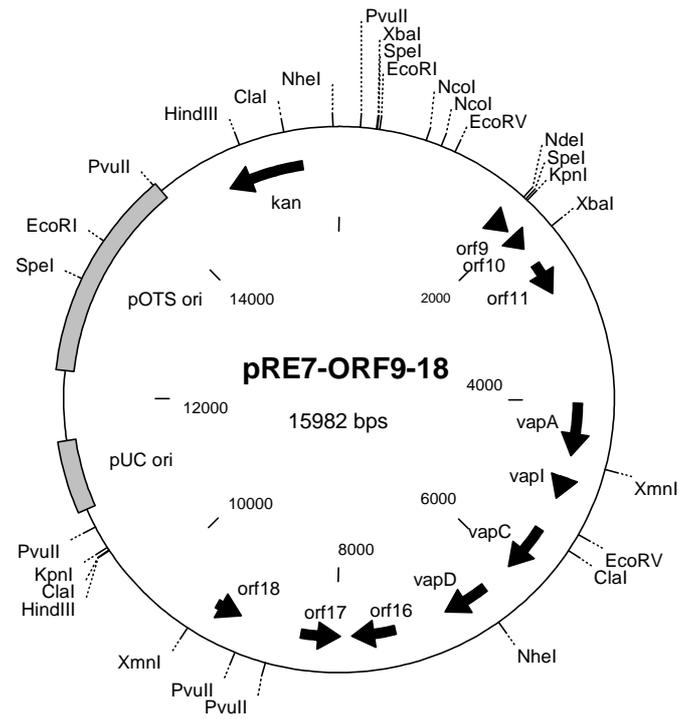
## Anhang: Vektoren und Konstrukte

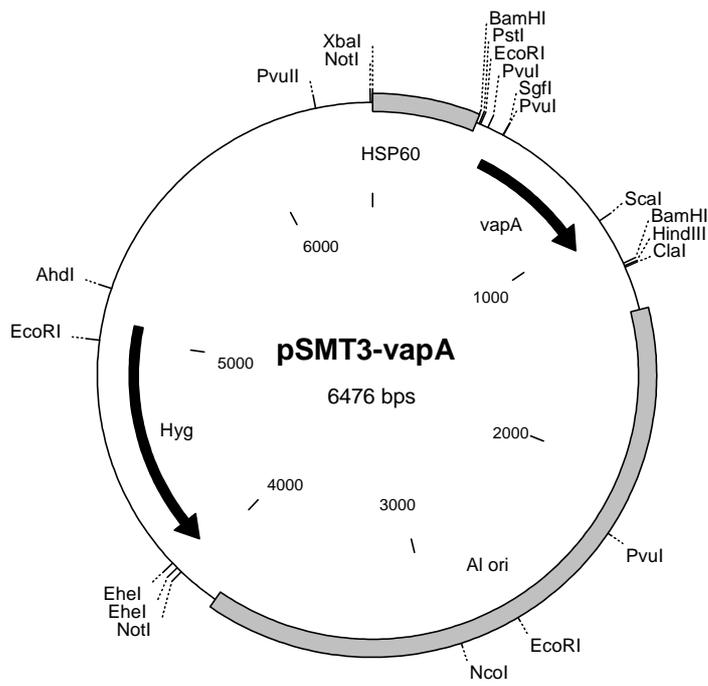
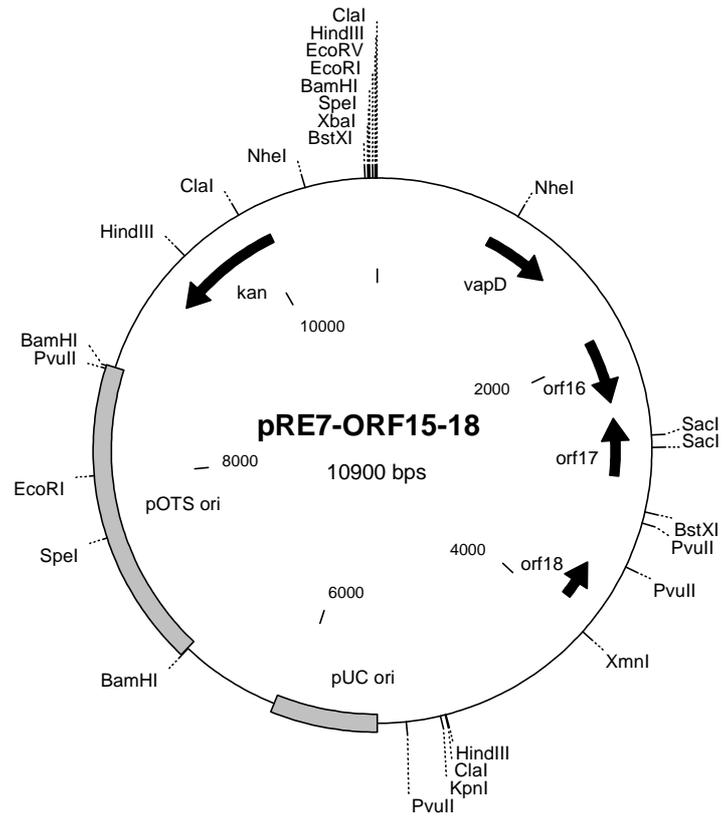


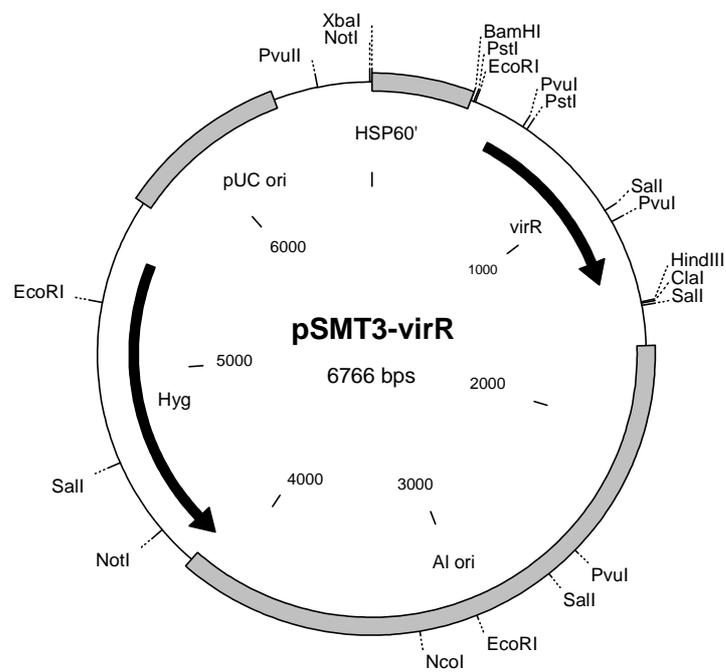
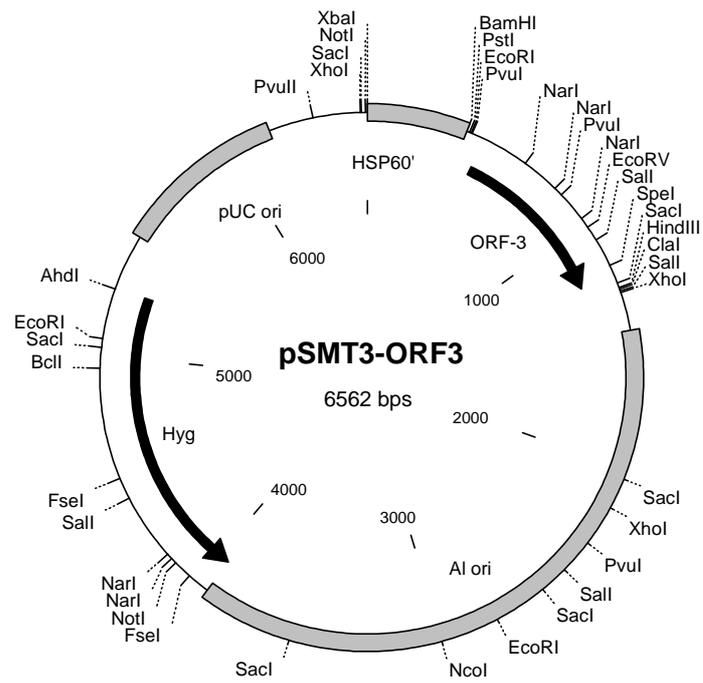


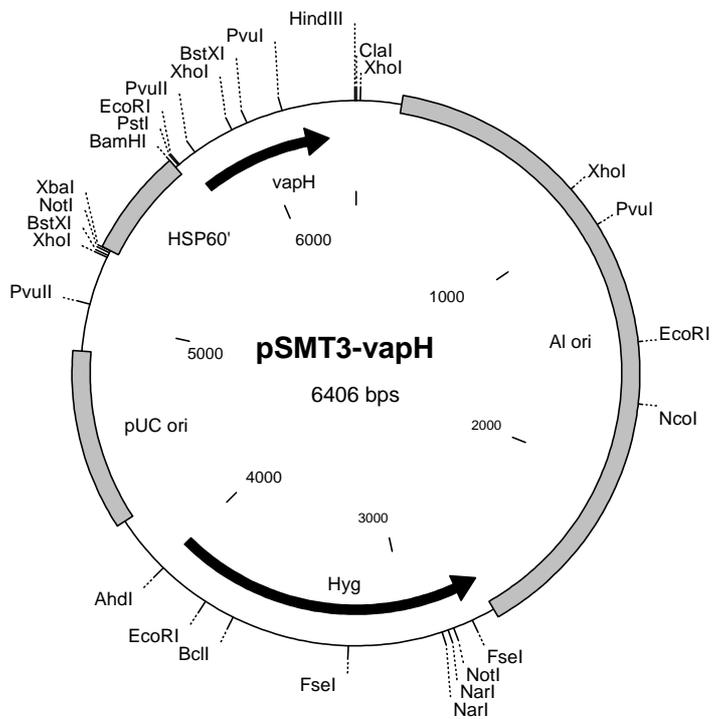
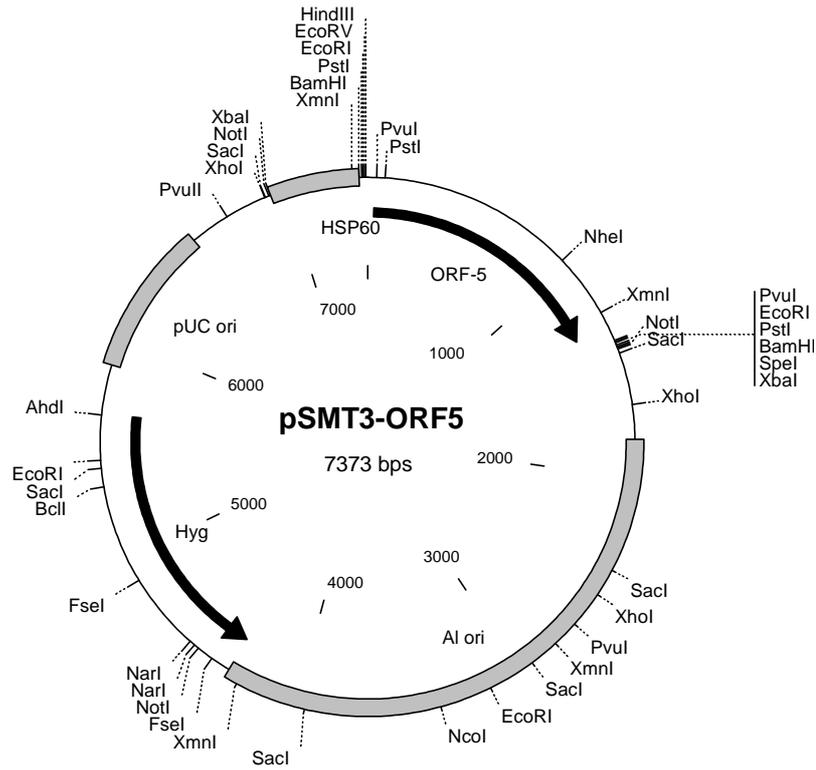


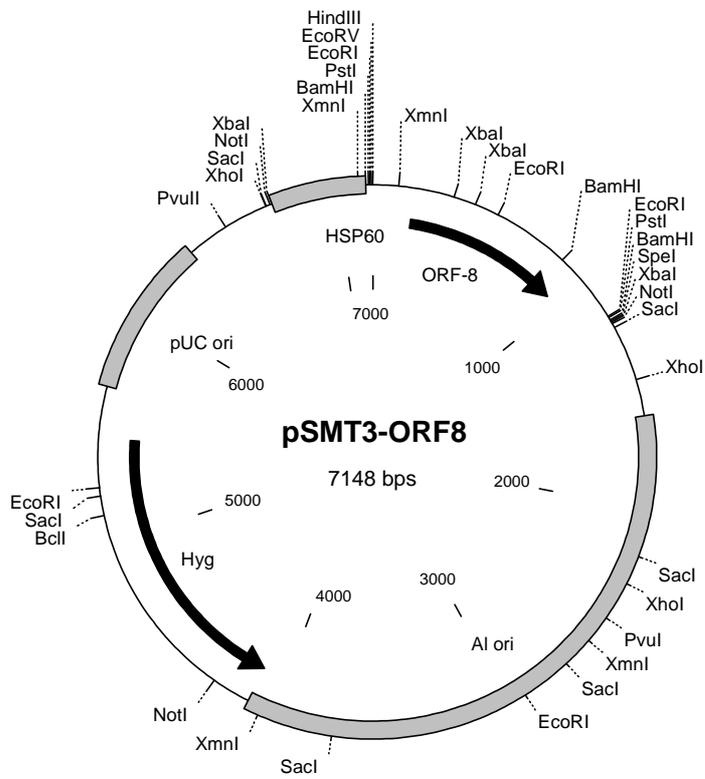
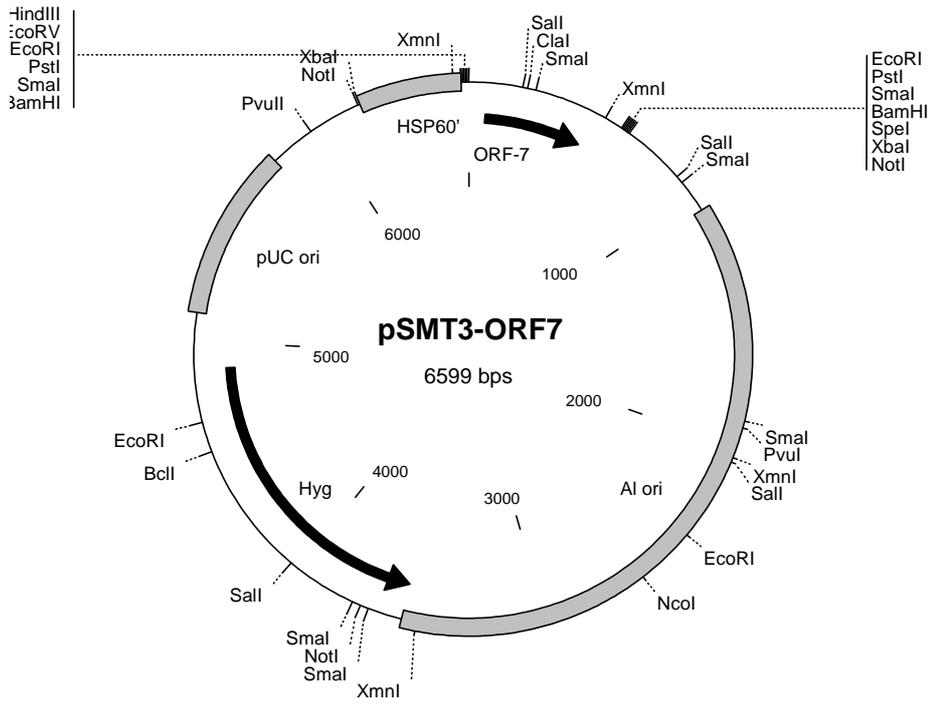


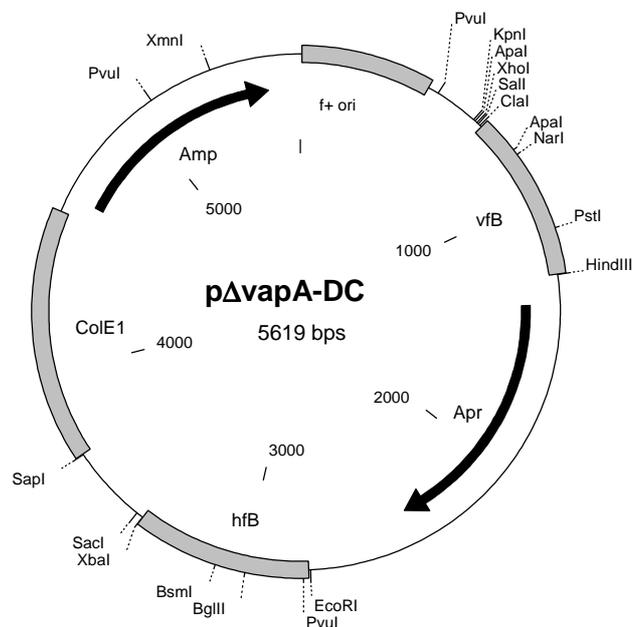
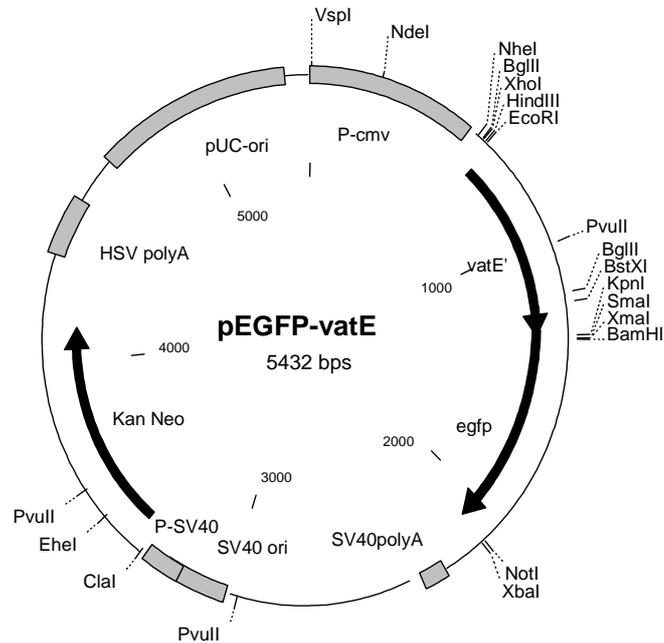












Amp: Ampicilin-Resistenzgen, Kan: Kanamycin-Resistenzgen, Neo: Neomycin-Resistenzgen, Hyg: Hygromycin-Resistenzgen, Apr: Apramycin-Resistenzgen, pOTS ori: *R. equi* Replikationsursprung, pUC/ColE1 ori: *E.coli* Replikationsursprung, AI ori: *Mycobacterium* Replikationsursprung, vfB: vorderer flankierender Bereich, hfB: hinterer flankierender Bereich, P-lac: *lacZ* Promotor, HSP60: HSP60 Promotor, P-CMV: Cytomegalovirus Promotor, P-SV40: SV40 Promotor, SV40 ori: SV40 Replikationsursprung