

Analyse der Reifung von Afipien- und Rhodokokken-enthaltenden Phagosomen in Makrophagen

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Anja Lührmann

geb. am 29.07.1969 in Harderberg

Würzburg, Februar 2002

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 1999 bis Januar 2002

am Lehrstuhl für Mikrobiologie

des Theodor-Boveri-Institutes für Biowissenschaften

der Universität Würzburg

unter Anleitung von Herrn Prof. A. Haas angefertigt.

Eingereicht am: 26.02.2002

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Erich Buchner

Gutachter: Prof. Dr. Georg Krohne

Gutachter: Prof. Dr. Albert Haas

Tag des Promotionskolloquiums: 22.05.2002

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der von mir angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Diese Dissertation hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits einem anderem Prüfungsverfahren vorgelegen.

Ich habe bislang noch keine akademischen Grade erworben oder versucht zu erwerben.

Würzburg, im Februar 2002

Anja Lührmann

Abkürzungsverzeichnis

2D	Zwei-Dimensional
7-AAD	7-Amino-Actinomycin D
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azinobis(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)
ACES	N-(Carbamoylmethyl)-2-Aminoethansulfonsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
aqua dest.	destilliertes Wasser
ATCC (engl.)	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BCYE (engl.)	Buffered Charcoal Yeast Extract
BHI (engl.)	Brain Heart Infusion
BSA (engl.)	Bovine Serum Albumin (Rinder Serum Albumin)
Cath D	Cathepsin D
CD (engl.)	Cluster of Differentiation
CR	Komplementrezeptor
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA (engl.)	Desoxyribonucleinacid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
E64	Trans-Epoxysuccinyl-L-Leucylamido-(4-Guanidino)Butan
EEA1 (engl.)	Early Endosome Antigen 1
EGTA (engl.)	Ethylene Glycol-bis(β -Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid
ELISA (engl.)	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Enzym-Immunoassay)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F	Endfraktion der Phagosomenisolierung
FACS (engl.)	Fluorescence Activated Cell Sorter (Durchflußzytometer)
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	Fetales Kälberserum
FL	Fluoreszenz
FSC	Vorwärts-Streulicht

GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O	destilliertes Wasser
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
HP	Homogenisierungspuffer
HRP (engl.)	Horseradish Peroxydase (Meerrettich Peroxidase)
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LAMP (engl.)	Lysosome-Associated Membrane Protein
LPS	Lipopolysaccharid
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MHC (engl.)	Major Histocompatibility Complex
MOI (engl.)	Multiplicity of Infection
NHS-CF	5-(und-6)Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester, gemischte Isomere
NHS-TR	Texas Red-X, Succinimidyl Ester, gemischte Isomere
NSF (engl.)	N-Ethylmaleimide-sensitive Fusion Protein
OD	Optische Dichte
OvTR	Ovalbumin Texas Red
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumjodid
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PNS	Postnukleärer Überstand
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNAP (engl.)	Soluble NSF Attachment Protein
SNARE (engl.)	Soluble NSF Attachment Protein Receptor

SSC	Seitwärts-Streulicht
Tab.	Tabelle
TACO (engl.)	Tryptophane Aspartate Containing Coat Protein
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TfR	Transferrin Rezeptor
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-1,3-Propanediol
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
VAMP (engl.)	Vesicle-associated Membrane Protein
w/v (engl.)	Weight per Volume (Masse pro Volumen)
X-ray (engl.)	Röntgenstrahlen

Inhaltsverzeichnis

1.	<i>Einleitung</i>	14
1.1.	Makrophagen.....	14
1.2.	Erkennung und Aufnahme des Partikels	15
1.3.	Phagosomenreifung.....	16
1.4.	Überlebensstrategien von Mikroorganismen.....	19
1.4.1.	Verhinderung der Aufnahme durch Phagozyten.....	20
1.4.2.	Tötung der Wirtszellen.....	21
1.4.3.	Blockierung der normalen Phagosomenreifung	23
1.4.4.	Etablierung eines nicht endozytischen Kompartiments.....	26
1.4.5.	Lyse der Phagosomenmembran.....	28
1.4.6.	Anpassung an ein saures phagolysosomales Kompartiment	29
1.5.	<i>Afipia felis</i>	31
1.5.1.	Die Gattung <i>Afipia</i>	31
1.5.2.	Die Spezies <i>Afipia felis</i>	32
1.5.3.	<i>Afipia felis</i> als Erreger der Katzen-Kratz Krankheit	33
1.5.4.	Interaktion von <i>Afipia felis</i> mit eukaryontischen Zellen	33
1.6.	<i>Rhodococcus equi</i>	34
1.6.1.	Die Gattung <i>Rhodococcus</i>	34
1.6.2.	Die Spezies <i>Rhodococcus equi</i>	35
1.6.3.	<i>Rhodococcus equi</i> als Krankheitserreger	36
1.6.4.	Interaktion von <i>Rhodococcus equi</i> mit eukaryontischen Zellen.....	36
1.7.	Ziel dieser Arbeit	39

2.	<i>Material und Methoden</i>	40
2.1.	Chemikalien.....	40
2.2.	Verbrauchsmaterialien.....	43
2.3.	Geräte.....	43
2.4.	Verwendete Farbstoffe.....	44
2.5.	Kulturmedien und Agarplatten.....	45
2.6.	Lösungen und Puffer.....	47
2.7.	Antikörper.....	54
2.7.1.	Primäre monoklonale Antikörper.....	54
2.7.2.	Primäre polyklonale Kaninchenantikörper.....	55
2.7.3.	Sekundäre gekoppelte Antikörper.....	55
2.8.	Angaben zu den Herstellern.....	55
2.9.	Zellkultur.....	57
2.9.1.	Lagerung und Kultivierung von J774E und J774A.1.....	57
2.9.2.	Isolierung von humanen Monozyten.....	57
2.9.2.1.	Gewinnung von peripheren Blutlymphozyten durch Dichtegradientenzentrifugation.....	57
2.9.2.2.	Gewinnung von humanen Monozyten aus PBL.....	58
2.9.3.	Anzucht von Bakterien.....	58
2.9.3.1.	Anzucht von <i>Afipia felis</i>	58
2.9.3.2.	Anzucht von <i>Rhodococcus equi</i>	58
2.9.3.3.	Anzucht von <i>Listeria innocua</i>	58
2.9.3.4.	Anzucht von <i>Bordetella pertussis</i>	59
2.9.4.	Ermittlung der Bakterienzellzahl.....	59
2.9.5.	Vorbehandlung der Bakterien.....	59
2.9.5.1.	Vorbehandlung mit Paraformaldehyd.....	59
2.9.5.2.	Opsonisierung.....	60

2.9.6.	Färbung von Bakterien und Zymosan	60
2.10.	Quantifizierung der Kolokalisierung Bakterien-enhaltender Phagosomen mit endozytiertem Ovalbumin Texas Red	60
2.10.1.	Markierung der Lysosomen mit Ovalbumin Texas Red	60
2.10.2.	Markierung des endozytischen Systems mit Ovalbumin Texas Red.....	61
2.10.3.	Fixierung mit PLPS.....	61
2.10.4.	Auswertung am Fluoreszenzmikroskop.....	61
2.11.	Phagosomenisolierung.....	61
2.11.1.	Infektion von J774-Makrophagen.....	61
2.11.2.	Aufschluss der infizierten Zellen.....	62
2.11.3.	Herstellung von postnukleärem Überstand (PNS)	62
2.11.4.	Behandlung des PNS mit Benzonase	62
2.11.5.	Erster Ultrazentrifugationsschritt	63
2.11.6.	Zweiter Ultrazentrifugationsschritt.....	63
2.11.7.	Dritter Ultrazentrifugationsschritt.....	63
2.12.	Bestimmung der Ausbeute an Bakterien in den Phagosomenfraktionen	64
2.13.	Elektronenmikroskopie	64
2.14.	Charakterisierung der bei der Phagosomenisolierung anfallenden Fraktionen.....	65
2.14.1.	Markieren der Plasmamembran mit HRP	65
2.14.2.	Markierung der frühen Endosomen mit HRP	65
2.14.3.	HRP-Assay.....	65
2.14.4.	Saure β -Galaktosidase-Assay.....	66
2.14.5.	Bestimmung der Wirtszell-Proteinkonzentration	66
2.15.	SDS-PAGE und Westernblot-Analyse.....	66
2.15.1.	SDS-PAGE	66

2.15.2.	Westernblot.....	67
2.15.3.	Dekorieren der PVDF-Membran.....	67
2.15.4.	Strippen der Membranen.....	68
2.16.	Präparation der phagosomalen Proteine für die 2D-Gelelektrophorese	68
2.17.	Immunfluoreszenz	68
2.17.1.	Infektion von J774E mit <i>Afipia felis</i> und Zymosan.....	68
2.17.2.	Infektion von humanen Monozyten mit <i>Afipia felis</i> und Zymosan.....	69
2.17.3.	Antikörper-Inkubation.....	69
2.17.4.	Auswertung am konfokalen Lasermikroskop	69
2.18.	Einfluss von <i>Rhodococcus equi</i> auf die Vitalität von Makrophagen.....	70
2.18.1.	Infektion von humanen Monozyten mit <i>Rhodococcus equi</i>	70
2.18.2.	Infektion von J774E mit <i>Rhodococcus equi</i>	70
2.18.3.	Bestimmung der Apoptose durch Nachweis des Spaltprodukts der PARP	70
2.18.4.	Bestimmung der Apoptoserate mittels SubG ₁ -Technik	71
2.18.5.	Markierung mit Annexin V-PE und 7-AAD.....	72
2.18.6.	Auswertung am FACScan.....	72
3.	<i>Ergebnisse</i>	73
3.1.	Zugänglichkeit Bakterien-enthaltender Kompartimente für endozytiertes Ovalbumin Texas Red (OvTR).....	73
3.2.	Einfluss der Vitalität und Opsonisierung der Afipien auf die Phagosomen- reifung.....	75
3.3.	Anwesenheit von zellulären Markern auf Afipien-enthaltenden Phagosomen.....	77
3.3.1.	Kolokalisierung von zellulären Markern mit Afipien-enthaltenden Phagosomen in J774E-Makrophagen.....	77

3.3.2.	Kolokalisierung von zellulären Markern mit Afipien-enthaltenden Phagosomen in humanen Monozyten.....	79
3.4.	Kinetik der Akquirierung von frühen und späten endosomalen Proteinen.....	80
3.5.	Phagosomenisolierung.....	82
3.5.1.	Die Methode	83
3.5.2.	Analyse der Phagosomenfraktionen.....	84
3.5.2.1.	Bestimmung der Proteinkonzentration in den einzelnen Fraktionen.....	85
3.5.2.2.	Bestimmung des Anteiles an frühen Endosomen in den einzelnen Fraktionen	86
3.5.2.3.	Bestimmung der lysosomalen Enzymaktivität in den einzelnen Fraktionen	87
3.5.2.4.	Bestimmung der Bakterienzahl in den einzelnen Fraktionen	88
3.5.3.	Analyse der isolierten Phagosomen.....	89
3.5.3.1.	Kontamination der isolierten Phagosomen mit zellulären Bestandteilen	90
3.5.3.2.	Elektronenmikroskopische Darstellung der isolierten Phagosomen.....	92
3.5.4.	Analyse der isolierten <i>Afipia felis</i> -enthaltenden Phagosomen mittels Westernblot.....	93
3.5.5.	2D-Gelelektrophorese der Afipien-enthaltenden Phagosomen.....	95
3.6.	Analyse von <i>Rhodococcus equi</i> -enthaltenden Phagosomen	97
3.6.1.	Elektronenmikroskopische Darstellung der isolierten Phagosomen.....	97
3.6.2.	Bestimmung der lysosomalen Enzymaktivität der <i>Rhodococcus equi</i> -enthaltenden Phagosomen.....	98
3.6.3.	Analyse der Rhodokokken-enthaltenden Phagosomen mittels Westernblot.....	99
3.7.	Einfluss von <i>Rhodococcus equi</i> auf die Vitalität von eukaryotischen Zellen.....	100
3.7.1.	Einfluss von <i>Rhodococcus equi</i> auf die Vitalität von J774E-Makrophagen.....	101
3.7.1.1.	Apoptosenachweis mittels PARP-Spaltprodukten	101
3.7.1.2.	Bestimmung der Apoptoserate mittels SubG ₁ -Technik	102
3.7.1.3.	Vitalitätsbestimmung mittels Doppelfärbung mit 7-AAD und Annexin V-PE.....	103
3.7.2.	Einfluss von <i>Rhodococcus equi</i> auf die Vitalität von humanen Monozyten.....	105

4.	<i>Diskussion</i>	107
4.1.	Phagosomenisolierung.....	107
4.2.	Kompartimentierung von <i>Afipia felis</i>	111
4.3.	Kompartimentierung von <i>Rhodococcus equi</i>	119
4.4.	Einfluss von <i>Rhodococcus equi</i> auf die Vitalität ihrer Wirtszellen.....	124
5.	<i>Zusammenfassung</i>	129
6.	<i>Summary</i>	131
7.	<i>Literaturverzeichnis</i>	133

1. Einleitung

1.1. Makrophagen

Der Körper ist durch äußere Barrieren wie Haut oder Epitheloberfläche mit Schleimhäuten sowie durch symbiontische Bakterien und bestimmte chemische Substanzen vor krankheitsverursachenden Organismen wie Viren, Bakterien, Pilze, Protozoen und Würmern geschützt. Gelangen Keime dennoch in den Körper, werden die meisten innerhalb kurzer Zeit von körpereigenen Immunzellen aufgespürt und zerstört. Zu diesen zellulären Mechanismen der angeborenen Immunität gehören Makrophagen und Neutrophile. Nur wenn Krankheitserreger diese Verteidigungslinie durchbrechen, kommt es zu einer adaptiven Immunabwehr. Dabei werden in einem Prozess, der mehrere Tage in Anspruch nimmt, Effektorzellen (B- und T-Lymphozyten) gebildet, die spezifisch gegen den eindringenden Keim gerichtet sind [Janeway und Travers 1997].

Die Makrophagen werden im Knochenmark gebildet und gelangen als Monozyten ins Blut. Dort zirkulieren sie circa 3 Tage [Klein 1991]. Danach adhären sie am Sinus von Leber, Milz, Lymphknoten, Hypophyse oder Nebenniere oder wandern nun als Makrophagen bezeichnete Zellen ins umliegende Gewebe. Die genaue Bezeichnung der Makrophagen ist dabei abhängig vom Organ bzw. Gewebetyp, in dem sie sich aufhalten. So werden zum Beispiel die Makrophagen im Bindegewebe als Histiozyten, in der Lunge als Alveolarmakrophagen oder in der Leber als Kupffer Zellen bezeichnet [Silbernagl und Despopoulos 1991]. Ihre Funktion besteht darin, Mikroorganismen, aber auch körpereigene apoptotische Zellen, aufzuspüren, aufzunehmen, abzutöten und immunkompetenten Lymphozyten als Antigen zu präsentieren sowie diese Antigene in sekundäre lymphatische Organe zu transportieren. Die Gesamtheit der Vorgänge, die zur Erkennung, Aufnahme und zum intrazellulären Abbau partikulärer Substanzen durch mononukleäre Phagozyten (Monozyten und Makrophagen) und polymorphnukleäre Phagozyten (Neutrophile) führen, wird als Phagozytose bezeichnet [Drössler 1988].

1.2. Erkennung und Aufnahme des Partikels

Der erste Schritt der Phagozytose ist die Erkennung des aufzunehmenden Partikels. So werden die konservierte Oberflächenmoleküle der Mikroorganismen (PAMP - pathogen-associated molecular patterns) von einigen Rezeptoren (PRR - pattern-recognition receptors) der Makrophagen erkannt, wie zum Beispiel vom Mannose-Rezeptor, vom Scavenger-Rezeptor, von den Fc-Rezeptoren und den Komplement-Rezeptoren [Janeway 1992].

Der Mannose-Rezeptor erkennt Mannose, Fruktose, Glukose und Galaktose auf der Oberfläche der Mikroorganismen [Stahl und Ezekowitz 1998] und ist somit ein Rezeptor für ein breites Spektrum an Pathogenen. Die Bindung des Mannose-Rezeptors an ein Oligosaccharid führt nicht nur zur Aufnahme des Partikels, sondern auch zur Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α [Stein und Gordon 1991], IL-1 β oder IL-6 [Yamamoto et al. 1997].

Der Scavenger-Rezeptor bindet Lipopolysaccharid (LPS) und Lipoteichonsäure [Dunne et al. 1994] und vermittelt somit die Aufnahme von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien. Bislang ist allerdings noch nicht geklärt, ob weitere Moleküle dazu benötigt werden.

Die Phagozyten exprimieren verschiedene Klassen von Fc-Rezeptoren: Fc RI, Fc RIIA und Fc RIII [Ravetch 1997]. Diese Rezeptoren erkennen IgG opsonisierte Partikel. Die Bindung führt zur Phagozytose des Partikels sowie zur Aktivierung des oxidativen Burst und der Arachidonsäure-Kaskade [Klein 1991].

Die Komplement-Rezeptoren 1 (CR1), 3 (CR3) und 4 (CR4) binden an Komplement opsonisierte Partikeln. Für die Phagozytose wird allerdings ein weiteres aktivierendes Signal benötigt [Pommier et al. 1983].

Die Bindung des jeweiligen Rezeptors an seinen Liganden führt zur Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und dadurch zur Aufnahme des Mikroorganismus. Bei der Aufnahme wird der Partikel von einem Teil der Plasmamembran des Phagozyten umschlossen, der sich zuerst nach innen stülpt und dann abschnürt. Bei diesem neu gebildetem endozytischen Vesikel handelt es sich

um ein Phagosom [Alberts et al. 2001]. Nach dem Entstehen durchläuft dieses neugebildete Organell verschiedene Reifungsstadien, bis es schließlich zu einem Phagolysosom wird. Diese Reifung geht einher mit dem Abtöten des aufgenommenen Mikroorganismus. Dazu wird dieser einem niedrigen pH, reaktiven Sauerstoffmetaboliten, Defensinen und hydrolytischen Enzymen (Proteasen, Phosphatasen, Nukleasen, Lipasen, Hydrolasen) ausgesetzt [Haas und Goebel 1992].

1.3. Phagosomenreifung

Die Membran des neu entstandenen Phagosoms verändert sich allmählich, wodurch sie der Membran der späten Endosomen und Lysosomen ähnlich wird. Dieser als Phagosomenreifung bezeichnete Prozess entspricht zum größten Teil der Endosomenreifung [Tjelle et al. 2000] und ist ein Ergebnis von Fusionsereignissen mit endozytischen Organellen und Abspaltung von Vesikeln. Dabei werden die Phagosomen entlang der Mikrotubuli [Desjardins et al. 1994b] oder des Aktin-Zytoskeletts [Al-Haddad et al. 2001] transportiert und fusionieren kurz nach ihrer Entstehung mit frühen Endosomen sowie später mit späten Endosomen und Lysosomen. Dadurch unterliegen die Phagosomen einer ständigen Veränderung der biochemischen Zusammensetzung [Desjardins 1995; Desjardins et al. 1994a], des Phosphorylierungsmusters [Emans et al. 1996] und der Zusammensetzung der Phospholipide [Desjardins et al. 1994a]. Es gibt Hinweise, dafür dass die für die Reifung der Phagosomen notwendigen Fusionen keine vollständigen Fusionen sind, sondern Prozesse, die als "kiss-and-run" bezeichnet werden [Storrie und Desjardins 1996]. Dabei verschmelzen die an der Fusion beteiligten Membranen nur kurzfristig und lokal, tauschen dabei luminalen Inhalte sowie wenig Membranbestandteile aus und trennen sich danach wieder.

Die Reifung des Phagosoms beginnt mit dem Recycling von bestimmten Plasmamembranmolekülen wie Transferrin-Rezeptor, Mannose-Rezeptor, Fc -Rezeptor oder -Adaptin [Muller et al. 1980; Pitt et al. 1992b]. Für die nächsten Schritte der Phagosomenreifung ist die kleine GTPase rab5 mitverantwortlich. Diese befindet sich schon zum Zeitpunkt der Entstehung des Phagosoms auf der zytoplasmatischen Seite der phagosomalen Membran [Desjardins et al. 1994b]. Die kleine GTPase rab5 vermittelt nicht nur die Fusion des neugebildeten Phagosoms mit frühen Endosomen, sondern auch die Bewegung dieser Vesikel entlang der Mikrotubuli [Zerial

und McBride 2001]. Dabei rekrutieren rab5 Moleküle sogenannte “tethering factors“ und “docking factors“ zu den zu fusionierenden Membranen [Pfeffer 1999]. Im Falle der durch rab5 kontrollierten homotypischen Fusion sind dies EEA1 und rabaptin-5 [Christoforidis et al. 1999], die den Kontakt zwischen rab5-Molekülen auf beiden Membranen herstellen. Erst bei engen Kontakt der beiden rab5-Moleküle und in Gegenwart der richtigen und aktivierten SNAREs kommt es zur Fusion zweier Vesikel [Pfeffer 1999]. Außerdem fusioniert dieses frühe Phagosom auch mit Vesikeln des Trans-Golgi-Networks (TGN). So gelangen Cathepsin H [Claus et al. 1998] und die vATPase [Bucci et al. 2000] in die Phagosomen. Die vATPase ist eine Membran-assoziierte Protonenpumpe [Lukacs et al. 1990], die zur Ansäuerung des Phagosomenlumens führt. Ein frühes Phagosom ist gekennzeichnet durch einen pH von 6,0-6,5 [Schaible et al. 1999] und durch die Assoziierung der phagosomalen Membran mit folgenden Molekülen: rab5 [Desjardins et al. 1994b], Annexin I [Harricane et al. 1996], NSF, / SNAP, Transferrin [Alvarez-Dominguez et al. 1997], EEA1 [Mu et al. 1995] und Cathepsin H [Claus et al. 1998]. Dieses Stadium der Reifung ist nach circa 5 min abgeschlossen, obwohl es in Abhängigkeit vom phagozytierten Partikel und vom Aufnahmeweg große Zeitschwankungen gibt.

Die Reifung des frühen Phagosoms zum späten Phagosom wird durch die GTPase rab7 reguliert, die vorwiegend auf späten Endosomen, aber nicht auf Lysosomen, zu finden ist [Feng et al. 1995]. Nach dem Verlust von rab5 und der Aquirierung von rab7 kommt es zur Fusion des frühen Phagosoms mit späten Endosomen, wodurch ein spätes Phagosom entsteht [Bucci et al. 2000; Press et al. 1998]. Die späten Phagosomen fusionieren aber nicht nur mit späten Endosomen, sondern auch mit Vesikeln des TGN. Auf diesem Wege gelangen LAMP-Moleküle [Karlsson und Carlsson 1998], aber auch Cathepsine und der Mannose-6-Phosphat Rezeptor [Schaible et al. 1999] ins Phagosom. Das späte Phagosom ist gekennzeichnet durch einen pH von 5,5 und die Assoziierung der phagosomalen Membran mit rab7, Mannose-6-Phosphat Rezeptor, LAMP-1, LAMP-2 [Rabinowitz et al. 1992], Cathepsin D, Cathepsin L und vATPase [Haas 1998]. Zu diesem Zeitpunkt ist das Organell circa 15 min alt, obwohl es auch hier Zeitschwankungen in Abhängigkeit vom phagozytierten Partikel und vom Aufnahmeweg gibt. Während der Reifung verliert das Phagosom die Fähigkeit, mit frühen Endosomen zu fusionieren [De Chastellier und Thilo 1997], so dass die Entwicklung dieses Organells nur in eine Richtung gehen kann, und zwar vom frühen Phagosom über ein spätes Phagosom in ein Phagolysosom.

Das Phagolysosom entsteht durch die Fusion des späten Phagosoms mit Lysosomen. Lysosomen sind mit hydrolytischen Enzymen gefüllte Membransäcke [Alberts et al. 2001]. Durch die Reifung zu Phagolysosomen verliert die phagosomale Membran die kleinen GTPasen rab5 und rab7 sowie den Mannose-6-Phosphat Rezeptor [Storrie und Desjardins 1996]. Damit ist eine homotypische Fusion mit frühen Endosomen und späten Endosomen ausgeschlossen [Jahraus et al. 1998]. Assoziiert ist das Phagolysosom mit vATPase, LAMP-1, LAMP-2 [Desjardins 1995] und hydrolytischen Enzymen [Griffiths 1996]. Der pH innerhalb der Phagolysosomen liegt bei 4,0-5,0 [Geisow et al. 1981]. Dieses durch die vATPase erzeugte sehr saure Milieu ist bakteriostatisch und wichtig für die Aktivierung der hydrolytischen Enzyme, die für den Abbau des phagozytierten Partikels verantwortlich sind. Dabei entstehende Peptide werden wahrscheinlich noch in den Phagosomen an MHC II Moleküle gebunden [Lang et al. 1994a]. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass die Peptide erst in ein anderes spät endozytisches Kompartiment transportiert und dort an MHC II Moleküle gebunden werden [Tjelle et al. 1998]. Die aus dem TGN stammenden MHC II Moleküle gelangen direkt über Vesikel vom TGN zum Phagolysosom oder vom TGN über andere endozytische Organellen ins Phagolysosom [Rabinowitz et al. 1992]. Die an die MHC II Moleküle gebundenen antigenen Peptide werden zur Plasmamembran transportiert und dort präsentiert. Die CD4⁺-T-Zellen erkennen und binden diesen Antigen-MHC II-Komplex, wodurch die adaptive Immunabwehr aktiviert wird [Klein 1991]. Andere Abbauprodukte des phagozytierten Partikels, wie z. B. Lipide werden von CD1 Molekülen unter anderem den CD8⁺-T-Zellen präsentiert [Porcelli und Modlin 1999].

Eine schematische Übersicht über die ungestörte Phagosomenreifung ist in Abb. I dargestellt.

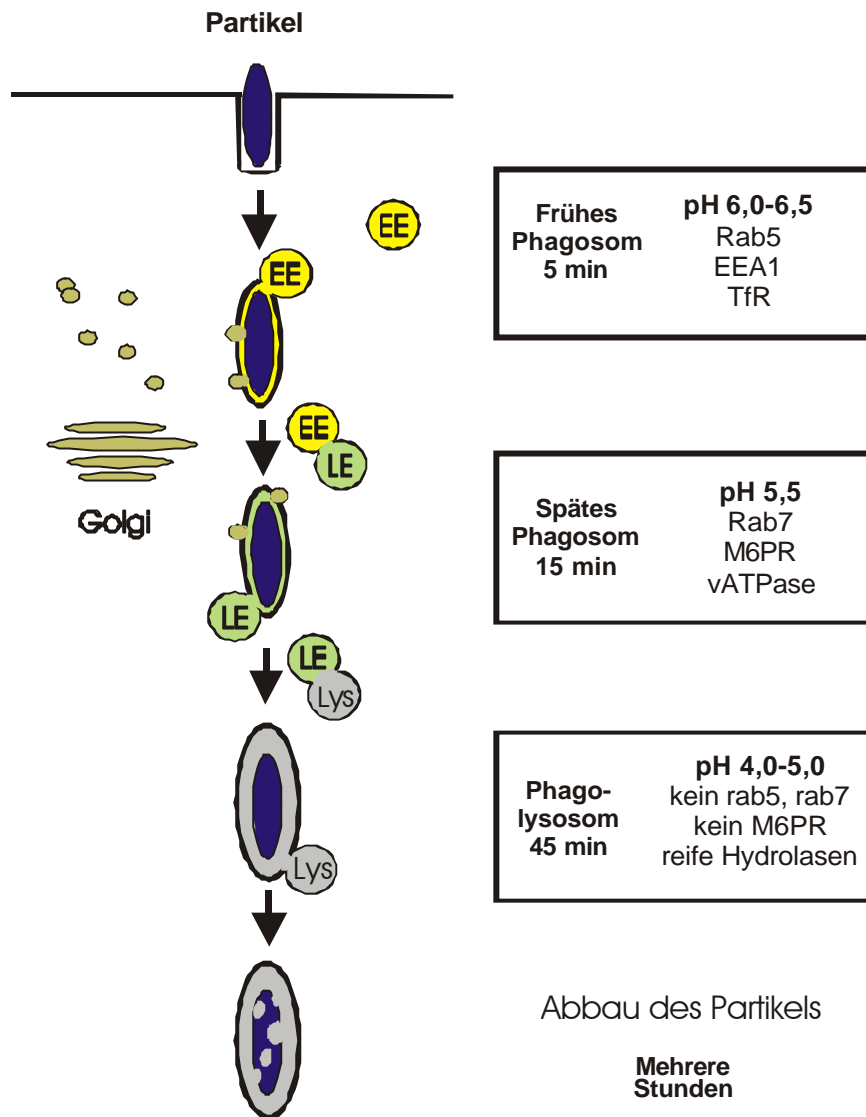


Abb. I: Schematische Darstellung und Kinetik der normalen Phagosomenreifung

Dargestellt sind mögliche Fusionsereignisse eines Phagosoms mit endozytischen Vesikeln sowie die daraus resultierenden Charakteristika der verschiedenen Reifungsstadien.

EE – frühes Endosom; LE – spätes Endosom; Lys – Lysosom; M6PR – Mannose-6-Phosphat Rezeptor.

1.4. Überlebensstrategien von Mikroorganismen

Die Interaktion der Mikroben mit den Makrophagen spielt eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese vieler Infektionen. Um zu überleben und um sich zu vermehren haben viele krankheitserregende Mikroorganismen Strategien entwickelt, die es ihnen erlauben, diesem Teil der Immunabwehr zu entkommen. Dabei ist der Erfolg der Mikroorganismen abhängig von der Vitalität des Mikroorganismus, dem Aktivierungsstatus der Wirtszelle oder dem für die Aufnahme verwendeten Rezeptor bzw. der Aufnahmeform. Die verwendeten Strategien lassen sich in 6

Klassen einteilen, die im folgenden anhand von Beispielen erklärt werden. Bei den beiden erstgenannten Strategien (1.4.1. und 1.4.2.) handelt es sich um Möglichkeiten die Aufnahme durch Phagozyten zu umgehen oder nach erfolgter Aufnahme aus den Wirtszellen auszubrechen. Dagegen handelt es sich bei den in 1.4.3.-1.4.6. aufgeführten und in Abbildung II schematisch dargestellten Strategien, um Möglichkeiten, innerhalb der Phagozyten zu überleben.

1.4.1. Verhinderung der Aufnahme durch Phagozyten

Eine Möglichkeit, dem Abbau in Phagozyten zu entgehen, ist die Verhinderung der Aufnahme durch diese Zellen. Dies geschieht zum Beispiel durch das Eindringen in nicht-professionelle Phagozyten wie Epithelzellen oder Fibroblasten [Pieters 2001], wodurch die Pathogene dem Zugriff der Phagozyten entzogen sind. Einige Gram-negative Bakterien induzieren die Adhäsion und die Aufnahme in nicht phagozytische Zellen durch ein hoch konserviertes sogenanntes Typ III-Sekretionssystem [Galan und Collmer 1999]. Mit Hilfe dieses Sekretionssystems können Bakterien Proteine durch eine nadelartige Struktur in das Zytoplasma der Wirtszelle injizieren.

Auf diesem Wege induziert z.B. *Salmonella typhimurium* ihre Aufnahme in Epithelzellen. Dies ist ein wichtiger Schritt für die Etablierung der Krankheit, da *Salmonella typhimurium* so die schützende Barriere des intestinalen Epithels passieren kann [Jones et al. 1994]. Die ins Zytoplasma der Wirtszelle injizierten Proteine führen zur Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts und damit zu "Membran ruffling", wodurch das Bakterium makropinozytisch internalisiert wird [Galan 1999].

Eine weitere Möglichkeit, dem Abbau in Phagozyten zu entgehen, ist die Verhinderung der Aufnahme in diese Zellen. Bei *Streptococcus pneumoniae* verhindert eine Polysaccharidkapsel die Phagozytose [Hacker und Heesemann 2000]. Andere Bakterien, wie zum Beispiel enteropathogene *Escherichia coli* (EPEC), verhindern die Aufnahme in Phagozyten durch Injektion von Proteinen mit anti-phagozytotischer Wirkung mit Hilfe des Typ III-Sekretionssystems [Goosney et al. 1999].

1.4.2. Tötung der Wirtszellen

Einige pathogene Mikroorganismen können Apoptose oder Nekrose in ihren Wirtszellen induzieren [Navarre und Zychlinsky 2000].

Die Apoptose ist ein körpereigener Mechanismus der schonenden Entsorgung von überflüssigen, selbstreaktiven, fehlerhaften oder maligne entarteten Zellen [Carson und Ribeiro 1993; Barr und Tomei 1994], ohne dabei eine inflammatorische Antwort auszulösen. Dieser aktive Zelltod läuft nach einem genauen Programm ab und ist gekennzeichnet durch starke Faltungen und blasige Ausstülpungen der Zellmembran ("Zeiosis"), die dadurch eine erhöhte osmotische Stabilität aufweist [Dive et al. 1992; Lizard 1995], durch halbmondförmig an der Kernmembraninnenseite angelagertes Chromatin [Wyllie et al. 1984; Martin et al. 1994] und durch die internukleosomale gespaltene DNA [Wyllie 1980; Compton 1992].

Die Nekrose ist eine drastische, pathologische Form des Zelltodes, die mit dem Zusammenbruch des Energiestoffwechsels der betroffenen Zelle verbunden ist [Walker et al. 1988; Dive et al. 1992; Schwartz und Osborne 1993]. Durch starke Noxen, Gewebeschädigungen und Entzündungsreaktionen sowie bei Targetzellen der zytotoxischen T-Zellen und der Aktivierung des Komplementsystems kommt es innerhalb von Minuten zu einem Verlust der osmotischen Stabilität der Membran, einem Ca^{2+} -Influx und passiven H_2O -Einstrom, als deren Folge die Zelle anschwillt und anschließend unter Ausschüttung ihrer Inhaltsstoffe platzt [Tomei und Cope 1991; Lennon et al. 1991; Pettmann und Villa 1994]. Dieser Vorgang wird als "Lysis" bezeichnet. Im umliegenden Gewebe der nekrotischen Zelle kann es dadurch zu inflammatorischen Prozessen kommen. Die DNA bleibt stabil und wird erst später unspezifisch gespalten [Searle et al. 1982; Kubbies et al. 1993].

Zu den Mikroorganismen, die einen Vitalitätsverlust ihrer Wirtszellen auslösen, gehören: *Shigella flexneri* [Zychlinsky et al. 1992; Zychlinsky et al. 1996; Hilbi et al. 1997], *Salmonella typhimurium* [Monack et al. 1996; Hersh et al. 1999; Brennan und Cookson 2000; Watson et al. 2000], *Yersinia enterocolitica* [Monack et al. 1997; Denecker et al. 2001], *Mycobacterium tuberculosis* [Keane et al. 1997; Rojas et al. 1997; Dobos et al. 2000; Keane et al. 2000], *Legionella pneumophila* [Gao und Kwaik 1999a; Gao und Kwaik 1999b; Alli et al. 2000],

Rhodococcus equi [Zink et al. 1987; Hietala und Ardans 1987] und *Francisella tularensis* [Lai et al. 2001].

Shigella flexneri wird von Makrophagen in ein Phagosom aufgenommen und bricht innerhalb von Minuten aus diesem Phagosom aus [High et al. 1992], wodurch die Shigellen ins Wirtszytosol gelangen und die Apoptose ihrer Wirtszelle induzieren [Zychlinsky et al. 1994]. Dazu bindet das von *Shigella flexneri* sekretierte Protein IpaB die Caspase 1. Diese wird dadurch aktiviert und induziert die Apoptose des Phagozyten sowie die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen [Thornberry et al. 1992; Chen et al. 1996; Hersh et al. 1999]. Durch die hohe Konzentration an proinflammatorischen Zytokinen kommt es zu einer Entzündungsreaktion, durch die z.B. benachbartes Mucosaepithel zerstört und den Shigellen der Zugang zur Lamina propria erleichtert wird [Hacker und Heesemann 2000]. Da es bei der durch *Shigella flexneri* induzierten Apoptose zu einer proinflammatorischen Antwort kommt, postulieren Zychlinsky und Sansonetti (1997), dass es neben der herkömmlichen Form der Apoptose, die zu keiner inflammatorischen Antwort führt, auch eine proinflammatorische Form der Apoptose geben muss.

Auch *Salmonella typhimurium* wird von Makrophagen in einem Phagosom aufgenommen. Mit Hilfe des Typ III-Sekretionsapparates können die Salmonellen Proteine ins Wirtszellzytosol sekretieren [Galan 1996]. Eines dieser sekretierten Proteine, SipB, bindet und aktiviert ebenso wie IpaB die Caspase 1 [Hersh et al. 1999]. Die Aktivierung der Caspase 1 führt zur Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-1 und zum Wirtszelltod. Ob es sich bei dem durch Salmonellen induzierten Wirtszelltod um Apoptose oder Nekrose handelt, wird kontrovers diskutiert [Boise und Collins 2001]. In einigen Arbeiten wurden Anhaltspunkte für Apoptose in den mit *Salmonella typhimurium* infizierten Makrophagen gefunden, wie der Caspase 1-abhängige Zelltod und DNA-Fragmentierung [Lindgren et al. 1996; Monack et al. 1996; Richter-Dahlfors et al. 1997; Hersh et al. 1999]. Dagegen deuten die von Brennan und Cookson (2000) und Watson et al. (2000) erzielten Daten eher auf einen durch *Salmonella typhimurium* induzierten nekrotischen Zelltod der infizierten Makrophagen hin.

Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* kann ebenfalls zu einem Vitalitätsverlust der Wirtszelle führen. Ob es sich bei dem durch Mycobakterien induzierten Wirtszelltod um

Apoptose oder Nekrose handelt, scheint vom Wirtszelltyp abzuhängen. So induziert *Mycobacterium tuberculosis* in Epithelzellen Nekrose, wobei dies abhängig vom bakteriellen Wachstum und/oder der Expression von mycobakteriellen Faktoren ist [Dobos et al. 2000]. In Makrophagen hingegen wird der durch *Mycobacterium tuberculosis* induzierte Zelltod als Apoptose klassifiziert und wird wahrscheinlich durch die Sekretion von TNF α ausgelöst [Keane et al. 1997; Balcewicz-Sablinska et al. 1999; Keane et al. 2000].

Für die Tötung von eukaryontischen Wirtszellen durch *Legionella pneumophila* wird ein zweiphasiges Modell postuliert [Gao und Kwaik 1999a; Gao und Kwaik 1999b]. Bei der ersten Phase handelt es sich um eine Induktion der Caspase 3-abhängigen Apoptose, die unabhängig vom Wachstumsstadium der Legionellen ist [Müller et al. 1996; Gao und Kwaik 1999a; Gao und Kwaik 1999b]. In der zweiten Phase induzieren die in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Legionellen den nekrotischen Wirtszelltod [Byrne und Swanson 1998]. Alli et al. (2000) spekulieren, dass die Nekrose der Wirtszellen durch ein von den Legionellen sekretiertes porenbildendes Toxin induziert wird.

Die oben genannten Daten zeigen, dass manche Pathogene eher den einen Typ des Zelltodes, andere den anderen und manche beide gleich stark in ihren Wirtszellen auslösen. Der jeweilige Anteil jedes Mechanismus hängt wahrscheinlich von den Kulturbedingungen, Infektionsraten, Immunstatus der Wirtszelle und ähnlichen äußeren Faktoren ab.

Es gibt aber nicht nur Mikroorganismen, die zu einem Vitalitätsverlust ihrer Wirtszellen führen, sondern auch solche, die ihn verhindern. So inhibieren *Chlamydia spp.* die Apoptose ihrer Wirtszellen [Clifton et al. 1998; Fan et al. 1998].

1.4.3. Blockierung der normalen Phagosomenreifung

Eine weitere Möglichkeit, den für die meisten Bakterien tödlichen Bedingungen in einem Phagolysosom zu entkommen, ist es, den Prozess der Phagosomenreifung zu stoppen. Dadurch arretiert das Bakterien-enhaltende Kompartiment in einem früh phagosomalen/endosomalen Stadium, was ein Überleben der Organismen erlaubt. Beispiel für solche Bakterien sind: *Mycobacterium tuberculosis*, *Ehrlichia chaffensis* und *Brucella abortus*.

Nach der Aufnahme durch den Makrophagen befinden sich pathogene Mycobakterien in einer Vakuole, in der sie bis zum Tod der Wirtszelle verbleiben [Russell 2001]. Dieses von den Mycobakterien etablierte Kompartiment ist gekennzeichnet durch einen pH von 6,1-6,3 [Sturgill-Koszycki et al. 1994], der im Falle der Vermehrung der Bakterien im Phagosom auf pH 6,8 ansteigen kann [De Chastellier et al. 1995]. Dieser relativ neutrale pH ist dadurch bedingt, dass die Mycobakterien-enthaltenden Phagosomen keine vATPasen akquirieren [Sturgill-Koszycki et al. 1994], die zu einer Ansäuerung des Kompartiments führen. Da die Mycobakterien-enthaltenden Phagosomen mit MHC I, MHC II, Transferrin-Rezeptor [Clemens und Horwitz 1995], Plasmamembran-Glykosphingolipiden [Russell et al. 1996], nach der Keimaufnahme internalisiertem Cholera-Toxin [Russell et al. 1996] und Transferrin [Clemens und Horwitz 1996] assoziiert sind, müssen die *Mycobacterium tuberculosis*-enthaltenden Phagosomen in einem ständigen Kontakt bzw. Austausch mit der Plasmamembran stehen. Die ebenfalls mit den Mycobakterien-enthaltenden Phagosomen assoziierten spät endosomalen/lysosomalen Markerproteine LAMP-1 und Cathepsin D kommen nicht von Lysosomen, sondern höchstwahrscheinlich von Vesikeln des biosynthetischen Systems aus dem trans-Golgi [Sturgill-Koszycki et al. 1996]. Somit zeigt das *Mycobacterium tuberculosis*-enthaltende Phagosom Charakteristika eines früh endosomalen Organells, das nicht zu einem spät endosomalen/lysosomalen Organell reift. Dies wird dadurch bestätigt, dass diese Phagosomen mit rab5 assoziiert bleiben, aber nicht rab7-positiv werden [Via et al. 1997]. Da die Mycobakterien-enthaltenden Phagosomen nur mit frühen Endosomen und mit Vesikeln des biosynthetischen Systems fusionieren und den Transferrin-Rezeptor und rab11 [Fratti et al. 2000] akkumulieren, gehören sie wahrscheinlich zu den frühen Recycling- bzw. Sorting-Endosomen [Schaible et al. 1999]. Die Lokalisierung der Mycobakterien in einem solchen Endosom ermöglicht es ihnen nicht nur, dem Abbau im Phagolysosom zu entkommen, sondern bietet ihnen auch ständigen Zugang zu Eisen, das an Transferrin gebunden in die Phagosomen gelangt [Haas 1998]. Diese Verfügbarkeit von Eisen scheint eine sehr wichtiger Überlebensfaktor für die Bakterien zu sein [Schaible et al. 1999].

Wie die Mycobakterien die Phagosomenreifung blockieren, ist bislang unklar. Es gibt verschiedene Erklärungsversuche für dieses Phänomen, von denen vier im folgenden kurz beschrieben werden.

(1) Eine Beobachtung ist, dass die von der bakteriellen Urease produzierten großen Mengen Ammonium sowohl die Ansäuerung der Vakuole [Gordon et al. 1980] als auch die Fusion des Mycobakterien-enthaltenden Phagosoms mit Lysosomen [D'Arcy Hart und Young 1991] verhindern. Dies steht in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass es einen Zusammenhang zwischen Ansäuerung und Reifung bzw. Fusionsereignissen gibt [Clague et al. 1994]. Allerdings zeigen Versuche mit Urease-defizienten Mycobakterien nur eine geringfügige Veränderung im intrazellulären Überleben [Reyrat et al. 1996].

(2) Eine weitere Hypothese ist, dass die hydrophobe Natur der Bakterienoberfläche oder ein von den Bakterien abgegebenes Membranglykolipid (Cord factor) einen hemmenden Einfluss auf die Membranfusionen hat [Spargo et al. 1991; De Castellier et al. 1995; Fujiwara 1997].

(3) Von Ferrari et al. (1999) wurde behauptet, dass TACO (tryptophan-aspartate containing coat protein) die Komponente darstellt, die eine Reifung der Mycobakterien-enthaltenden Phagosomen verhindert, da die Mycobakterien TACO aktiv auf dem Phagosom zurückhalten. Dieses Wirtszellprotein wird bei der Phagozytose zum Aufnahmeort rekrutiert und ist somit mit dem neu entstandenen Phagosom assoziiert. Während der Reifung verliert das Phagosom unter normalen Umständen dieses auch als Coronin bezeichnete Protein [Grogan et al. 1997; Morrissette et al. 1999]. Die Beobachtung von Ferrari et al. (1999) konnte in neueren Studien [Schüller et al. 2001] nur für Phagosomen, die verklumpte Mycobakterien enthalten, bestätigt werden, während Phagosomen, die einzelne Mycobakterien enthalten, nur vorübergehend mit Coronin assoziiert sind.

(4) Eine weitere mögliche Erklärung für die Blockierung der Phagosomenreifung ist, dass durch pathogene Mycobakterien eine Hemmung des Anstiegs des intrazellulären Kalziumspiegels verursacht wird [Malik et al. 2000]. Da bekannt ist, dass eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels zur Fusion von Phagosomen mit Lysosomen führt [Malik et al. 2001], ist die Hemmung des Anstiegs des intrazellulären Kalziumspiegels ein Ursache, aber vielleicht auch nur eine Folge, der Blockierung der Phagosomenreifung.

Die Zusammensetzung der *Ehrlichia chaffensis*-enthaltenden Phagosomen ist jener der *Mycobacterium tuberculosis*-enthaltenden Phagosomen sehr ähnlich [Haas 1998]. Sie sind ebenfalls nicht mit der vATPase assoziiert, weshalb sie auch nur geringfügig ansäuern. Außerdem sind die *Ehrlichia chaffensis*-enthaltenden Phagosomen ebenfalls durch die Assoziierung mit Transferrin gekennzeichnet [Barnewall et al. 1997].

Brucella abortus wird in ein Phagosom aufgenommen und verbleibt dort bis zum Tod der Wirtszelle [Arenas et al. 2000]. In nichtprofessionellen Phagozyten befinden sich die Brucellen in Zisternen des rauhen endoplasmatischen Retikulums [Deltelleux et al. 1990]. Der Hypothese zufolge werden die Bakterien über den "autophagozytotischen Pathway" transportiert, bevor sie im ER akkumulieren und sich vermehren [Pizarro-Cerda et al. 1998]. In Phagozyten befinden sich die Bakterien in einem Phagosom mit saurem pH [Porte et al. 1999], das nicht mit Lysosomen [Frenchick et al. 1985; Naroeni et al. 2001], aber mit frühen Endosomen [Rittig et al. 2001] fusioniert. Dieses Phagosom kolokalisiert nicht oder nur in geringem Umfang mit Markern für ER und Autophagosomen [Arenas et al. 2000], und wird auf Grund der eng um das Bakterium liegenden phagosomale Membran als "tight phagosome" bezeichnet [Rittig et al. 2001]. De Chastellier und Thilo (1997) vermuten, dass eine eng anliegende Phagosomenmembran die Fusiogenität des Kompartiments reduziert, wodurch sich die verzögerte Fusion der Brucellen-enthaltenden Phagosomen mit späten Endosomen [Arenas et al. 2000] erklären lässt.

1.4.4. Etablierung eines nicht endozytischen Kompartiments

Einige wenige Pathogene befinden sich innerhalb ihrer Wirtszelle in einer Vakuole, die komplett vom endozytischen System abgetrennt, und somit weder mit endosomalen Markern noch mit lysosomalen Markern assoziiert ist. Diese Vakuolen fusionieren nicht mit endozytischen Vesikeln [Sinai und Joiner 1997] aber interagieren mit anderen Wirtsorganellen wie Golgi, Mitochondrien oder endoplasmatischem Retikulum [Hackstadt 2000]. Zu den Mikroorganismen, bei denen diese Strategie zum Überleben in Phagozyten beobachtet wird, gehören *Chlamydia trachomatis*, *Toxoplasma gondii* und *Legionella pneumophila*.

Toxoplasma gondii ist ein obligat intrazellulärer Parasit, der sowohl in Phagozyten als auch in nichtprofessionelle Phagozyten eindringen kann. Dabei dringt *Toxoplasma gondii* durch Invagination der Wirtszellmembran aktiv in die Wirtszelle ein [Tjelle et al. 2000]. Sofort nach der Bildung der *Toxoplasma gondii*-enthaltenden Vakuole befinden sich keine Plasmamembranproteine der Wirtszelle auf dieser Vakuole [Suss-Toby et al. 1996]. Dadurch fusionieren diese Vakuolen nicht mit anderen endozytischen Vesikeln. Anschließend sekretiert *Toxoplasma gondii* viele Proteine, die sowohl im Lumen der Vakuole, im tubulivesikulären Netzwerk innerhalb der Vakuole, aber auch in der Vakuolenmembran integriert werden [Sinai und Joiner 1997; Sibley et

al. 1986; Beckers et al. 1994]. Diese Proteine haben eine Funktion bei der Etablierung dieses ungewöhnlichen Kompartiments und sind wahrscheinlich an der Aquirierung von Nährstoffen beteiligt [Hackstadt 2000]. Die Toxoplasma-enhaltenden Vakuolen sind somit nicht mit Markern des endosomalen Systems wie Transferrin-Rezeptor, Mannose-6-Phosphat Rezeptor, LAMP-1 oder vATPase assoziiert [Baca und Kumar 1994]. Dafür sind sie häufig mit Mitochondrien und dem ER der Wirtszelle assoziiert [Schwab et al. 1994].

Chlamydia trachomatis etablieren ein Kompartiment, das als "inclusion" bezeichnet wird [Schramm et al. 1996]. Die "inclusion" Membran wird kurz nach der Bildung durch bakterielle Proteine, die sogenannten "inclusion membrane proteins" (Inc), verändert [Hackstadt 2000]. Dadurch enthält die Membran des *Chlamydia trachomatis*-enthaltenden Kompartiments mehr bakterielle Proteine als Wirtszellproteine [Taraska et al. 1996]. Diese Membran fusioniert nicht mit endozytischen Vesikeln, weshalb diese Einschlüsse negativ für Transferrin, Mannose-6-Phosphat Rezeptor, Cathepsin D, LAMP-1 und vATPase sind [Friis 1972; Wyrick und Brownridge 1978; Heinzen et al. 1996]. Etablierte Chlamydien "inclusions" befinden sich in der Golgi Region und interagieren mit dem exozytotischen System. Durch die Fusion mit Vesikeln, die vom Golgi-Apparat stammen, gelangen zum Beispiel Sphingoglykolipide in das Chlamydien-enthaltende Kompartiment [Scidmore et al. 1996]. Wie die Interaktion der Chlamydien "inclusions" mit dem exozytotischen System reguliert wird, ist bislang noch nicht bekannt.

Legionella pneumophila etablieren sowohl in Phagozyten als auch in Amöben ein Kompartiment, das es ihnen erlaubt, zu überleben und sich zu vermehren [Swanson und Hammer 2000]. Durch Phagozyten werden die Legionellen durch konventionelle Phagozytose [Rechnitzer und Blom 1989] oder durch einen Prozess, der als "coiling phagocytosis" bezeichnet wird [Horwitz 1984], aufgenommen. Dabei wird das Bakterium von einem Pseudopodium der Wirtszelle eingerollt. Diese dabei entstehende multilaminare Membran wird aufgelöst, wodurch ein morphologisch normales Phagosom entsteht. Während dieses Prozesses werden bestimmte Plasmamembranproteine (Alkalische Phosphatase, MHC I und MHC II) von der phagosomalen Membran ausgeschlossen, während andere Plasmamembranproteine (CR-3 und 5'-Nucleotidase) in die phagosomale Membran eingebaut werden [Clemens und Horwitz 1992; Clemens und Horwitz 1993]. Diese Legionellen-enthaltenden Phagosomen fusionieren weder mit

frühen Endosomen [Clemens et al. 2000] noch mit späten Endosomen [Clemens und Horwitz 1995; Roy et al. 1998] oder Lysosomen [Horwitz 1983b]. Statt dessen assoziieren diese Phagosomen zunächst (5 min-2 h nach Aufnahme) mit glatten Vesikeln und Mitochondrien und später (4–12 h nach Aufnahme) mit dem rauhen endoplasmatischen Retikulum [Horwitz 1983a; Swanson und Isberg 1995]. Sechs bis zehn Stunden nach der Aufnahme vermehren sich *Legionella pneumophila* in einem Phagosom, das mit Ribosomen besetzt ist, bis es zur Lyse der Wirtszelle kommt [Horwitz und Silberstein 1980; Horwitz 1983a; Joshi et al. 2001]. In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass die Phagosomen, in denen sich die Legionellen vermehren können, lysosomale Charakteristika aufweisen [Sturgill-Koszycki und Swanson 2000]. Durch welche Mechanismen die Legionellen dieses ungewöhnliche Kompartiment etablieren, ist noch nicht vollständig geklärt. Allerdings wurden viele Gene identifiziert, die dafür wichtig sind. Diese Virulenzgene werden als dot (für “defective for organelle trafficking“) und als icm (für “intracellular multiplication“) bezeichnet [Segal und Shuman 1998; Kirby und Isberg 1998]. Einige dieser Gene kodieren für ein Typ IV-Sekretionssystem [Segal et al. 1998; Vogel et al. 1998]. Es wird vermutet, dass mit Hilfe dieses Sekretionssystems ein Kanal in der phagosomalen Membran entsteht, durch den Proteine ins Wirtszellzytoplasma transportiert werden [Kirby et al. 1998; Coers et al. 2000]. Diese Proteine haben eine wichtige Funktion bei der Etablierung dieses ungewöhnlichen Kompartiments [Wiater et al. 1998; Roy et al. 1998; Coers et al. 1999], wobei der genaue Mechanismus unbekannt ist [Meresse et al. 1999; Duclos und Desjardins 2000].

1.4.5. Lyse der Phagosomenmembran

Eine Möglichkeit, der für die Bakterien tödlichen Umgebung des Phagolysosoms zu entkommen, ist der frühzeitige Ausbruch aus dem Phagosom [Meresse et al. 1999]. Diese Strategie wird von *Trypanosomas cruzi* [Andrews 1994] sowie von *Listeria monocytogenes* [Smith et al. 1995], *Shigella flexneri* [High et al. 1992] und *Rickettsia conorii* [Gouin et al. 1999] verwendet. Diese Organismen gelangen durch die von den Pathogenen gesteuerte Lyse der Vakuolenmembranen ins Wirtszellzytoplasma. Dort sind diese Pathogene in der Lage zu wachsen und sich zu vermehren [Moulder 1985]. Außer *Trypanosomas cruzi* können sich alle hier genannten Bakterien durch Bildung eines Aktin-Komet-Schweifens fortbewegen [Dramsı und Cossart 1998]. Am Beispiel von *Listeria monocytogenes* soll der Vorgang des Ausbruchs aus dem Phagosom näher erläutert werden.

Listeria monocytogenes benutzt verschieden Zelltypen als Wirt. Die Aufnahme in Phagozyten erfolgt über Fc- oder Komplement-Rezeptoren, während für die Aufnahme in nichtprofessionellen Phagozyten unter anderem die Adhäsion der von den Listerien exprimierten Internaline mit E-cadherin verantwortlich ist [Mengaud et al. 1996]. Nach der Aufnahme in die Wirtszellen befinden sich die Listerien in einer Vakuole, die für eine kurze Zeitspanne (circa 30 min) mit frühen Endosomen fusioniert [Alvarez-Dominguez et al. 1997]. Durch die Fusion mit frühen Endosomen wird die Vakuole leicht angesäuert, wodurch Listeriolysin O aktiviert wird [Geoffroy et al. 1987]. Dieses von *Listeria monocytogenes* produzierte Lysin ist ein Toxin, das Risse in der Vakuolenmembran erzeugt, wodurch die Listerien ins Zytoplasma gelangen [Goebel und Kuhn 2000]. Dort induziert *Listeria monocytogenes* die Polymerisierung des Wirtszell-Aktins, das dadurch den sogenannten “comet tail“ bildet. Mit Hilfe dieses Aktinschweifes können sich die Listerien in der Wirtszelle fortbewegen und auch in Nachbarzellen gelangen [Dramsı und Cossart 1998].

1.4.6. Anpassung an ein saures phagolysosomales Kompartiment

Bei allen bisher beschriebenen Strategien haben die Mikroorganismen Möglichkeiten gefunden, nicht in ein Phagolysosom zu gelangen und so ihr Überleben zu gewährleisten. Die im folgenden beschriebenen Pathogene sind dagegen in der Lage, in Phagolysosomen zu überleben und sich zu vermehren. Zu diesen Pathogenen gehören *Leishmania mexicana* und *Coxiella burnetti* [Tjelle et al. 2000].

Der eukaryontische Parasit *Leishmania mexicana* hält sich im Makrophagen in einem Kompartiment auf, das als “parasitophorous vacuole“ (PV) bezeichnet wird. Dieses Kompartiment hat einen pH von 4,7-5,2 [Antoine et al. 1990] und beinhaltet lysosomale Hydrolasen [Prina et al. 1990], die lysosomalen Membran-Glykoproteine LAMP-1 und LAMP-2 [Russell et al. 1992; Chen et al. 1985a] und vATPase [Nelson 1987]. Da die Leishmanien-enthaltenden Vakuolen auch mit rab7 und Mannose-6-Phosphat Rezeptor assoziiert sind [Russell et al. 1992], ist es nicht eindeutig, ob dieses Kompartiment eher einem Phagolysosom oder einem späten Phagosom entspricht [Haas 1998]. Wichtig für das Überleben nicht nur dieses Pathogens ist die Verfügbarkeit von Nährstoffen [Haas 1998], welche in diesem

Fall durch Fusionen der Leishmanien-enhaltenden Vakuolen mit Vesikeln des endosomalen Kontinuums gegeben ist [Alexander und Vickerman 1975; Russell et al. 1992].

Kompartimente, die das obligat intrazelluläre Pathogen *Coxiella burnetii* enthalten, reifen ebenfalls zu Phagolysosomen [Tjelle et al. 2000]. Diese durch ihre Größe auch als “spacious phagosomes“ bezeichneten Kompartimente sind charakterisiert durch einen pH von 5,2 sowie durch die Assoziation mit LAMP-1, LAMP-2, Cathepsin D, sauren Phosphatasen und vATPase [Heinzen et al. 1996; Mege et al. 1997]. Um in diesem für die meisten Mikroorganismen toxischen Kompartiment überleben zu können, produziert *Coxiella burnetii* Enzyme (z. B. saure Phosphatasen), die zur Eliminierung oder Verhinderung der Synthese von toxischen Sauerstoffmetaboliten durch die Wirtszelle führen [Baca et al. 1994].

Anpassung
an ein saures
Phagosomales
Kompartiment

Blockierung
der normalen
Phagosomenreife

Etablierung eines
nicht endozytischen
Kompartiments

Ausbruch aus
dem Phagosom

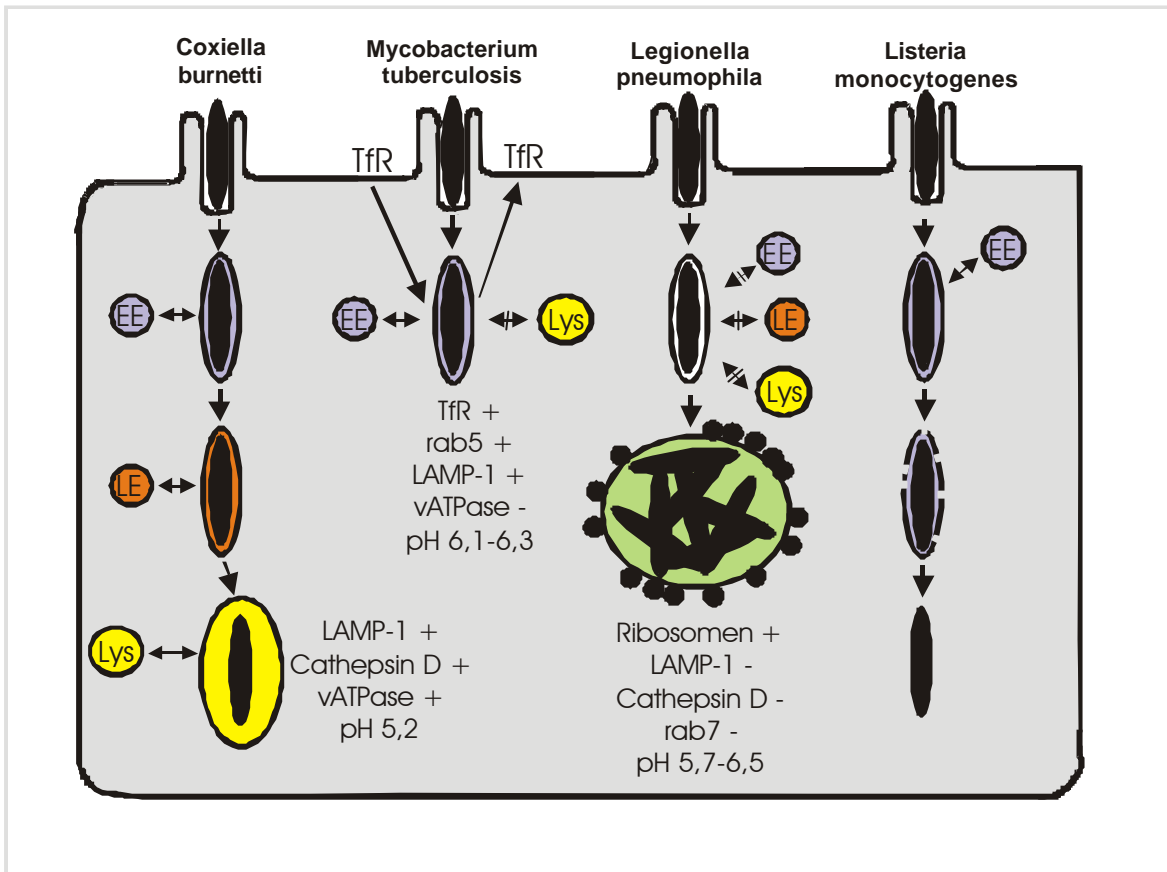


Abb. II: Überlebensstrategien pathogener Mikroorganismen

Jede der in Kapitel 1.4.3.-1.4.6. beschriebenen intrazellulären Überlebensstrategien wird am Beispiel eines Bakteriums repräsentiert. Dabei sind mögliche Fusionsereignisse mit endozytischen Vesikeln sowie die charakteristische Kompartimentierung des jeweiligen Bakteriums schematisch dargestellt.

EE – frühes Endosom; LE – spätes Endosom; Lys – Lysosom; TfR – Transferrin-Rezeptor.

1.5. *Afipia felis*

1.5.1. Die Gattung *Afipia*

Die Mitglieder der Gattung *Afipia* sind Gram-negativ, nicht hämolytisch, Urease-positiv, Oxidase-positiv, nicht fermentierenden Stäbchen, die aufgrund eines einzelnen Flagellums beweglich sind. Ihre DNA hat einen Guanin- und Cytosin-Anteil von 61,5-69%. Die Gattung *Afipia* wird taxonomisch in die 2-Subklasse der Proteobakterien eingeordnet, zu der auch die

Gattungen *Rickettsia*, *Brucella*, *Bartonella* und *Agrobacterium* gehören. Auf der Basis phänotypischer Charakterisierung und DNA Verwandtschaftsbestimmungen wird die Gattung *Afipia* derzeit in 6 Arten eingeteilt: *Afipia felis*, *Afipia clevelandensis*, *Afipia broomeae*, *Afipia Genospecies 1*, *Afipia Genospecies 2* und *Afipia Genospecies 3* [Brenner et al. 1991]. Afipien wachsen bei 25-30°C auf BCYE-Agar und Nutrient Broth-Agar, aber bereits bei 42°C ist ihr Wachstum vollständig gehemmt. Nach 72 h bei 30°C erscheinen 0,5-1,5 mm große Einzelkolonien, die grau-weißlich, glänzend, konvex und undurchsichtig sind [English et al. 1988]. Die Spezies dieser Gattung sind gekennzeichnet durch die Zellwandfettsäure 11-Methyloctadec-12-Enol. Diese Fettsäure kommt nur noch bei einigen *Brucella*- und *Pseudomonas*-Spezies vor und ist deshalb ein nützlicher chemischer Marker für die Gattung *Afipia*. Alle Isolate von Afipien, bis auf den einzigen Vertreter der Spezies *Afipia Genotyp 3*, wurden aus humanem Material (Lymphknoten, Sputum, Pleuralflüssigkeit, Tibialbiopsie oder durch Bronchialspülung) gewonnen. *Afipia Genotyp 3* wurde aus Wasser isoliert [Brenner et al. 1991].

1.5.2. Die Spezies *Afipia felis*

Afipia felis ist die am besten untersuchte Spezies der Gattung *Afipia*. Es handelt sich um pleomorphe Stäbchen mit einem Durchmesser von 0,2-0,5 µm und einer Länge von 0,2-2,0 µm [English et al. 1988], die resistent gegen β-Lactam, Ciprofloxacin und Tetracycline, aber sensitiv für Aminoglycoside, Imipenem und Ceftriaxone sind. Im Gegensatz zu allen anderen *Afipia*-Spezies besitzen die bisher bekannten Isolate von *Afipia felis* ein 44 kbp Plasmid in niedriger Kopiezahl [Brenner et al. 1991]. *Afipia felis* ist ein fakultativ intrazelluläres Bakterium, das zuerst in Makrophagen und Endothelzellen einer Lymphknotenbiopsie bei Patienten mit Katzen-Kratz Krankheit gefunden wurde [English et al. 1988]. Es ist aber auch in der Lage, in Wasser [La Scola und Raoult 1999] oder im Erdboden [Birkness et al. 1992] zu überleben. Dabei unterscheiden sich die intrazelluläre und die extrazelluläre Form von *Afipia felis* morphologisch und wahrscheinlich auch funktionell, so dass die Fähigkeit auf Agar-Nährstoffplatten zu wachsen bei direkt aus eukaryontischen Zellen isolierten Afipien eingeschränkt ist [Birkness et al. 1992].

1.5.3. *Afipia felis* als Erreger der Katzen-Kratz Krankheit

Die Katzen-Kratz Krankheit wurde erstmals von Debre et al. (1950) beschrieben. Bei dieser bakteriellen Infektion, von der vornehmlich Kinder betroffen sind, handelt es sich um eine regionale, subkutane Lymphdrüsenentzündung [Wear et al. 1983]. Häufig kommt leichtes Fieber und Unwohlsein hinzu. Normalerweise heilt die Krankheit nach einigen Wochen oder Monaten spontan ab. In seltenen Fällen, in denen dies nicht geschieht, kann es zu Lungenerkrankungen, entzündlichen Augenerkrankungen, Enzephalopathien oder systemischen Infektionen [English et al. 1988] kommen, die bei immunsuprimierten Personen tödlich enden können [Black et al. 1986]. Seit der Beschreibung dieser Krankheit im Jahre 1950 wurden verschiedenste Bakterien wie Mycobakterien [Boyd und Craig 1961] oder Chlamydien [Emmons et al. 1976] als Verursacher angenommen. Wear et al. (1983) demonstrierten mikroskopisch die Anwesenheit eines pleomorphen, Gram-negativen Bakteriums in den Lymphknoten von 39 Patienten mit Katzen-Kratz Krankheit. Im Jahr 1988 berichteten English et al. von der Isolierung des Erregers dieser Krankheit. Dieses wurde von Brenner et al. (1991) charakterisiert und mit *Afipia felis* bezeichnet. Der Name *Afipia* ist auf das Institut zurückzuführen, an dem die erste Isolierung dieses Keimes gelang, Armed Forces Institute of Pathology. Der Namenszusatz '*felis*' (lat. für Katze) geht auf den Krankheitsüberträger zurück. Die Krankheit tritt meist nach kutaner Inokulation auf, typischerweise nach einem Kratzer oder Biss einer Katze. Aber auch Hunde, Kaninchen oder scharfe Gegenstände, wie Angelhaken oder Holzsplitter, können die Bakterien übertragen [Jerris und Regnery 1996]. Nach der subkutanen Inokulation mit Afipien werden diese von Makrophagen und wahrscheinlich auch von dendritischen Zellen aufgenommen und zum nächstgelegenen Lymphknoten transportiert. Hier gelingt es dem Bakterium sich zu vermehren und andere Zellen wie zum Beispiel Endothelzellen zu infizieren [Birkness et al. 1992]. Inzwischen wurde mit *Bartonella henselae* ein mit *Afipia felis* nahe verwandtes Bakterium identifiziert, das die meisten Fälle der Katzen-Kratz Krankheit verursacht [Dolan et al. 1993]. Trotzdem kann weiterhin davon ausgegangen werden, dass auch *Afipia felis* ein Verursacher der Katzen-Kratz Krankheit ist [Alkan et al. 1995].

1.5.4. Interaktion von *Afipia felis* mit eukaryontischen Zellen

Afipia felis kann in vitro verschiedene Zelltypen als Wirt benutzen. Dabei bindet das Bakterium an die Wirtszellmembran und wird phagozytisch aufgenommen. Innerhalb der Zellen befinden sich

die Afipien in einem Phagosom. Abhängig vom Zelltyp sind die Bakterien in der Lage, innerhalb des Phagosoms zu persistieren oder sich zu vermehren. Eine Vermehrung der Afipien wurde in humanen Monozyten, P388D1-Zellen (murine Makrophagen), HeLa-Zellen (humane Epithelzellen) und HMEC-1-Zellen (humane Endothelzellen) beschrieben, während in U937, A431 (humane Makrophagen-Vorläuferzellen) und L929 (murine Fibroblasten) nur ein zeitlich begrenztes Überleben beobachtet wurde. Die Vermehrung innerhalb der Wirtszellen führt zu einer morphologischen Veränderung von *Afipia felis*. Diese werden länger, pleomorph und verändern außerdem ihre Proteinzusammensetzung. Wahrscheinlich ist dies der Grund dafür, dass die aus Zellen isolierten Afipien nur sehr langsam auf Agar-Nährstoffplatten wachsen [Birkness et al. 1992]. Über die genaue Kompartimentierung von *Afipia felis* ist nur sehr wenig bekannt. Brouqui und Raoult (1993) konnten zeigen, dass in humanen Makrophagen und in P388D1-Mausmakrophagen nur ein geringer Prozentsatz der mit Ferritin beladenen Lysosomen mit den Afipien enthaltenden Phagosomen fusioniert. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die Afipien enthaltenden Phagosomen in J774E-Mausmakrophagen nicht zugänglich für endozytisch aufgenommene Farbstoffe sind [Streker 2000; Schüttfort 2000]. Allerdings sind nur vitale Afipien in der Lage dieses ungewöhnliche Kompartiment zu etablieren [Le Pocher et al. 1998; Streker 2000; Schüttfort 2000]. Wie dies geschieht, ist noch nicht geklärt. Brouqui und Raoult (1993) vermuten, dass die Afipien einen filtrierbaren, Proteinase K sensitiven Faktor produzieren, der die Fusion des Phagosoms mit Lysosomen inhibiert.

1.6. *Rhodococcus equi*

1.6.1. Die Gattung *Rhodococcus*

Die Gattung *Rhodococcus* gehört zur phylogenetischen Gruppe der norcardioformen Actinomyceten, zu der auch die Gattungen *Caseobacter*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium* und *Nocardia* gehören [Goodfellow 1987]. Rhodokokken sind Gram-positive, aerobische, unbewegliche, Mykolsäure-haltige, Katalase-positive Bakterien. Sie sind gekennzeichnet durch eine "rod-to-coccus" Morphologie, d. h. abhängig vom Zellzyklus bilden die Rhodokokken eine myzelartige Struktur oder einzelne Stäbchen oder Kokken [Lechevalier 1989]. Das erste Mal wurde der Gattungsname *Rhodococcus* 1891 von Zopf verwendet. Seit dieser Zeit wurde auf Grund von Neuentdeckungen und besseren Bestimmungsmöglichkeiten die Zusammensetzung der

Gattung ständig verändert [Goodfellow und Alderson 1977]. Rhodokokken sind ubiquitär vorkommende Bakterien, die aus Böden, Gestein, Bohrlöchern, Grundwasser, Meeres-sedimenten, Tierausscheidungen sowie von gesunden und kranken Menschen, Tieren und Pflanzen isoliert werden konnten [Goodfellow 1989; Ivshina et al. 1994]. Diese Gattung ist von großem kommerziellen Interesse, da viele Rhodokokken die Fähigkeit besitzen, Umweltgifte abzubauen und biotechnisch interessante Substanzen zu produzieren [Finnerty 1992; Warhurst und Fewson 1994]. Außerdem sind die Spezies dieser Gattung Krankheitserreger von Tieren, Pflanzen und Menschen [Finnerty 1992; Mc Neil und Brown 1994]. Zur Zeit gehören 12 Spezies zur Gattung *Rhodococcus*: *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. Die Spezies *Rhodococcus equi*

Magnussen isolierte 1923 aus der granulomatösen Lunge eines Fohlens ein Bakterium, dem er den Namen *Corynebacterium equi* gab [Magnussen 1923]. Dieses Bakterium wurde in neuerer Zeit in *Rhodococcus equi* umbenannt [Skerman et al. 1980; Cornish und Washington 1999]. Dabei handelt es sich um ein Gram-positives, aerobes, Katalase-positives, Oxidase-negatives und Urease-positives Bakterium, das säurefest und resistent gegen β -Lactam Antibiotika sein kann [Cornish und Washington 1999]. Es wächst bei Temperaturen von 10°C bis 40°C auf vielen verschiedenen wie BHI Agar und Chocolate Agar [Prescott 1991], aber nicht auf MacConkey Agar [Muller et al. 1988]. Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 30°C [Hughes und Sulaiman 1987]. Nach 24 h sind die Kolonien 1-2 mm und nach 48 h 2-4 mm groß und haben ein charakteristisches Aussehen: rosa, unregelmäßig rund, glatt, semitransparent, schleimig und glänzend [Prescott 1991]. *Rhodococcus equi* ist ein Umweltkeim, der sowohl in der Luft, im Wasser als auch im Erdboden gefunden wird. Außer in der Antarktis ist *R. equi* auf allen Kontinenten verbreitet [Ellenberger und Genetsky 1978]. Am häufigsten wird dieses Bakterium im Boden oder im Dung von Pflanzenfressern gefunden. Wobei *R. equi* sich dort am Besten bei sommerlichen Temperaturen in der gemäßigten Klimazone vermehrt [Prescott 1987]. Unter solchen Bedingungen kann sich das Bakterium in zwei Wochen um den Faktor 10.000 vermehren [Barton und Hughes 1984]. Innerhalb der Gattung *Rhodococcus* besitzt die Spezies *R. equi* das größte pathogene Potential für Tiere und Menschen [Prescott 1991].

1.6.3. *Rhodococcus equi* als Krankheitserreger

Rhodococcus equi ist ein fakultativ intrazelluläres Pathogen, das innerhalb von Makrophagen überleben und eine granulomatöse Entzündung hervorrufen kann. In allen Wirts-Spezies ist die Lunge das am häufigsten betroffene Organ. Dort kann eine Infektion mit *R. equi* von einer granulomatösen Pneumonie bis zu einem Lungenabszess führen. Außerdem verursacht *R. equi* Lymphadenitis, Wundinfektionen, Abszesse in unterschiedlichen Regionen des Körpers und ulzerative Kolitis [Johnson et al. 1983; Zink et al. 1986]. Seit seiner Entdeckung im Jahre 1923 ist dieses Bakterium sehr häufig in der veterinärmedizinischen Literatur als Verursacher einer Bronchopneumonie bei Fohlen beschrieben worden, die jünger als 6 Monate sind [Takai et al. 1997]. Es gibt aber auch Fallbeschreibungen über durch *R. equi* verursachte Lymphadenitis beim Schwein [Prescott 1991; McNeil und Brown 1994] und ulzerative Lymphangitis beim Rind [Neave 1951]. In den letzten Jahren haben die Berichte über durch *R. equi* verursachten Erkrankungen beim Menschen zugenommen [Bell et al. 1998]. Dabei sind die meisten Fälle auf eine Dysfunktion des Immunsystems zurückzuführen. So haben Menschen mit einer HIV-Infektion, einer Krebserkrankung oder durch eine transplantationsbedingte Immunsuppression ein erhöhtes Risiko, an *R. equi* zu erkranken [Verville et al. 1994]. Am häufigsten werden AIDS-Patienten von diesem Bakterium befallen [Mosser und Hondalus 1996; Linder 1997], was zum Teil zu tödlichen Infektionen führt [Emmons et al. 1991; Harvey und Sunstrom 1991; Mastroianni et al. 1994]. Aber es gibt auch vereinzelte Fall-beschreibungen von *R. equi*-Infektionen bei immunkompetenten Patienten [Linares et al. 1997; Kedlaya et al. 2001]. Die Pneumonie ist die häufigste klinische Manifestation einer Erkrankung mit *R. equi*, wobei diese mit Fieber, Nackenschmerzen, unproduktivem Husten und Dyspnoe beginnt [Harvey und Sunstrom 1991]. Die Übertragung geschieht durch *R. equi* enthaltende Aerosole, Erde, Staub und Debris [Hillidge 1987; Prescott 1991; McNeil und Brown 1994].

1.6.4. Interaktion von *Rhodococcus equi* mit eukaryontischen Zellen

Rhodococcus equi ist ein fakultativ intrazelluläres Bakterium, das ausschließlich mononukleäre Phagozyten infiziert [Hondalus 1997]. Das mit Komplement opsonierte Bakterium bindet an den CR 3 (CD11b/CD18), der auch als Mac-1 bezeichnet wird und induziert so seine Aufnahme in die Wirtszelle [Mosser und Hondalus 1996]. Innerhalb des Makrophagen befinden sich die

Rhodokokken in einem Phagosom, das nicht mit Lysosomen fusioniert und dadurch Charakteristika eines frühen Endosoms aufweist [Zink et al. 1987; Hietala und Ardans 1987]. In diesem eng anliegenden Vesikel können sich die Rhodokokken nach einer Ruhephase von einigen Stunden vermehren, wobei die Verdopplungszeit in Mausmakrophagen 6-8 h beträgt [Hondalus und Mosser 1994]. Der Mechanismus der zellulären Aufnahme ist entscheidend für die Etablierung dieses Kompartiments. So können die über den Fc-Rezeptor aufgenommenen *R. equi* nicht die Phagolysosom-Bildung verhindern und werden deshalb sehr schnell von den Makrophagen abgetötet [Hietala und Ardans 1987]. Eine *R. equi* Infektion kann toxisch für den Makrophagen sein. Schon nach einer Infektionszeit von 8 h sind viele der infizierten Makrophagen irreversibel geschädigt [Zink et al. 1987; Hietala und Ardans 1987]. Hietala und Ardans (1987) spekulierten, dass die reduzierte Vitalität der infizierten Makrophagen auf die durch Rhodokokken induzierte nicht spezifische Degranulierung von Lysosomen ins Wirtszytosol zurückzuführen ist. Ob dies die Ursache oder aber die Folge der Schädigung der Makrophagen ist, muss noch geklärt werden. Welche Faktoren zur Etablierung der *R. equi* innerhalb des Makrophagen beitragen, ist noch nicht vollständig erforscht. Zu den mutmaßlichen Virulenzmechanismen gehören die Polysaccharidkapsel, die Cholesterin-Oxidase, die Phospholipasen, die Mykolsäure-haltige Zellwand und VapA, das von einem Virulenz-assoziierten Plasmid kodiert wird [Hondalus 1997], deren Wirkungen im folgenden beschrieben werden. Die Polysaccharidkapsel verhindert die Aufnahme der Bakterien durch Phagozyten [Prescott 1991]. Dadurch können die Wirtszellen nur opsonisierte Bakterien phagozytieren, und dieser Aufnahmeweg ist entscheidend für das Überleben der *R. equi* innerhalb der Makrophagen. Die Cholesterin-Oxidase ist ein Exoenzym, das auch als "equi factor" bezeichnet wird. Sowohl die Cholesterin-Oxidase als auch die Phospholipasen wirken unterstützend auf die Lyse der Wirtszellmembran und wahrscheinlich auch auf die Lyse der Lysosomenmembran [Smola et al. 1994; Hondalus 1997] und somit auf den Vitalitätsverlust der Makophagen. Die Zellwand der Rhodokokken besteht größtenteils aus Mykolsäure-haltigen Glykolipiden, die ebenfalls zur Pathogenität der *R. equi* beitragen. Es wurde beobachtet, dass Stämme mit einer längeren Mykolsäure zur Entstehung eines größeren Granuloms führen und eine höhere Letalität für infizierte Mäuse aufweisen als Mykolsäuren mit einer kürzeren Kohlenstoffkette [Gotoh et al. 1991]. Der bisher am besten untersuchte Virulenzfaktor ist allerdings ein von einem Plasmid kodiertes sehr antigenes Proteolipid, VapA. Es wurde beobachtet, dass nur virulente *R. equi*-Stämme dieses 15-17 kDa

Antigen exprimieren [Chirino-Trejo und Prescott 1987]. Außerdem sind nur die Isolate, die dieses Protein exprimieren, virulent für Mäuse [Takai et al. 1991a]. Sowohl Takai et al. (1991b) als auch Tkachuk-Saad und Prescott (1991) berichteten, dass alle dieses Antigen exprimierenden Isolate auch ein 85 kbp Plasmid enthalten. In weiteren Studien konnte bestätigt werden, dass dieses 85 kbp Plasmid für das als VapA bezeichnete 15-17 kDa Antigen kodiert [Takai et al. 1993; Tan et al. 1995]. Ein *R. equi*-Stamm, der dieses Plasmid enthält und somit VapA exprimiert, kann sich schnell innerhalb des Makrophagen vermehren. Im Gegensatz dazu wird ein isogener Stamm ohne diese 85 kbp Plasmid vom Makrophagen getötet [Hondalus und Mosser 1994]. In der Maus, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, ist das Vorhandensein dieses Plasmids mit Virulenz assoziiert [Mosser und Hondalus 1996]. Auch beim Pferd besitzen praktisch alle klinischen *R. equi*-Isolate dieses Plasmid und exprimieren VapA [Hondalus 1997]. Im Gegensatz dazu wurde in einer Studie gezeigt, dass nur 8 von 39 aus infizierten Menschen isolierten *R. equi* dieses Plasmid enthielten [Takai et al. 1994]. Interessanterweise enthielten 173 von 234 Sand- und Bodenproben von 155 Parkanlagen und 49 Gärten in Japan insgesamt 1.249 *Rhodococcus equi* Isoate, aber kein einziges enthielt das VapA-exprimierende Plasmid [Takai et al. 1996]. Rhodokokken mit VapA-exprimierendem Plasmid kommen wahrscheinlich nur in unmittelbarer Umgebung (infizierter) Pferde und besonders in Pferdedung vor und von dort erfolgt wahrscheinlich die Verbreitung. Auch die kürzlich publizierte Gesamtsequenz des 85 kbp Virulenz-assoziierten Plasmids [Takai et al. 2000] gibt keine offensichtlichen Hinweise, welche plasmidkodierten Faktoren für die Virulenz von Rhodokokken notwendig sind, obwohl VapA und eine 6-Mitglieder-Familie mit ähnlicher Aminosäuresequenz möglicherweise nicht nur Virulenzmarker, sondern für die Virulenz wichtige Proteine sind. VapA alleine kann jedoch nicht das Fehlen des VapA-exprimierenden Plasmids in Virulenz-experimenten funktionell ersetzen [Giguere et al. 1999].

1.7. Ziel dieser Arbeit

Zunächst sollte die intrazelluläre Kompartimentierung von *Afipien felis* in Makrophagen untersucht werden. Da bereits bekannt war, dass die Afipien-enthaltenden Phagosomen nicht zu einem Phagolysosom reifen, sollte der Frage nachgegangen werden, ob Afipien die normale Phagosomenreifung blockieren oder ein nicht endozytisches Kompartiment etablieren. Anschließend sollte dieses ungewöhnliche Kompartiment analysiert werden. Dazu war es nötig, eine Methode zur Isolierung möglichst reiner Phagosomen zu etablieren.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Kompartimentierung von *Rhodococcus equi* in Makrophagen sowie die durch Rhodokokken vermittelte Zytotoxizität zu untersuchen. Dabei sollte vor allem die Rolle des Virulenz-assoziierten Plasmids analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

– 1,10-Phenanthrolin-Monohydrat	Sigma
– 2,4,6-Tris(Dimethylaminomethyl)Phenol	Serva
– 6-Amino-n-Caprinsäure	Merck
– β -Mercaptoethanol	Roth
– ABTS [2,2'-Azinobis(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)]	Sigma
– ACES [N-(Carbamoylmethyl)-2-Aminoethansulfonsäure]	Sigma
– Acrylamidlösung	Roth
– Agar	Difco
– Aktivkohle	Sigma
– APS [Ammoniumperoxodisulfat]	Merck
– Ascorbinsäure	Sigma
– Benzonase	Merck
– BioRad DC Protein Assay	Bio Rad
– Brain Heart Infusion	Difco
– Bromphenol Blau	Merck
– Cacodylsäure Natrium-Trihydrat	Roth
– Casamminosäuren	Difco
– Charcoal Agar	Difco
– Cyclodextrin	Merck
– Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
– DMSO [Dimethylsulfoxid]	Sigma
– Dodeceny succinisches Anhydrid	Serva
– DTT [1,4-Dithiothreitol]	Roth
– E64 [trans-Epoxysuccinyl-L-Leucylamido-(4-Guanidino)Butan]	Sigma
– ECL Chemiluminiscence Kit	Amersham
– EGTA	Sigma
[Ethylen Glykol-bis(β -Aminoethylether)N,N,N',N'-Tetraessigsäure]	

– Eisen(II)sulfat	Merck
– Eisen(III)chlorid Hexahydrat	Roth
– Ethanol	Roth
– FCS [Fetales Kälberserum]	Gibco
– Ficoll – 70.000 Mw	Sigma
– Ficoll-Plaque	Amersham
– Glutardialdehyd	Merck
– Glutathion	Merck
– Glycerin (87%)	Merck
– Glycidether	Serva
– Glycin	Merck
– Hefe-Extrakt	Difco
– Hepes [N-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-N'-(3-Propansulfonsäure)]	Serva
– HRP (Meerrettich Peroxidase)	Sigma
– Kaliumchlorid	Merck
– Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
– Kaliumhydroxid	Merck
– Kalziumchlorid	Merck
– L-Cystein	Sigma
– L-Cystin	Merck
– Leupeptin Hydrochlorid	Sigma
– L-Lysin	Merck
– L-Prolin	Sigma
– Magermilchpulver	Saliter
– Magnesiumchlorid	Ferak
– MES [Morpholinoethansulfonsäure]	Sigma
– Methanol	Roth
– Methylnadid Anhydrid	Serva
– Mowiol	Sigma
– Natriumacid	Merck
– Natriumacetat	Merck

– Natriumcarbonat	Merck
– Natriumchlorid	Roth
– Natrium-Glutamat	Merck
– Natriumjodid	Merck
– Nicotinsäure	Merck
– Osmiumtetroxid	Roth
– Paraformaldehyd	Merck
– Pefabloc	Boehringer Mannheim
– Pepstatin A	Sigma
– PIPES [Piperazin-N,N'-bis(2-Ethansulfonsäure)]	Serva
– <i>p</i> -Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid	Sigma
– Propylenoxid	Merck
– Ribonuklease [RNase Typ I-A]	Sigma
– RPMI	Gibco BRL
– Salzsäure	Merck
– Saponin	Sigma
– SDS [Natriumdodecylsulfat]	Roth
– Saccharose	Sigma
– TEMED [N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin]	Serva
– Tris [2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-1,3-Propanediol]	Roth
– Triton X-100	Sigma
– Trypanblau	Gibco BRL
– Tween 20	Roth
– Uranylacetat Dihydrat	Merck
– Wasserstoffperoxid	Fluka
– Ziegenserum	PAA
– Zitronensäure	Sigma

2.2. Verbrauchsmaterialien

– 1 ml Kryotubes	Greiner bio-one
– 1,5 ml Reagiergefäße	Sarstedt
– 12 mm Deckgläschen	Menzel Gläser
– 15 ml Greinerröhrchen	Greiner bio-one
– 24-well Gewebekulturplatten	Laborbedarf Schubert
– 50 ml Greinerröhrchen	Greiner bio-one
– 96-well Flachbodenplatten	Greiner bio-one
– Einmalküvetten	Hartenstein
– FACS-Röhrchen	Hartenstein
– Objektträger	Marienfeld
– PVDF Membran	Pharmacia Biotech
– Serologische Pipetten	Sarstedt
– SW40Ti Röhrchen	Konrad Beranek
– Whatman Papier	Hartenstein oder Sarstedt
– X-ray Filme 13 x 18 cm, 100NIF	Noras
– Zellkulturschalen (90 mm)	Laborbedarf Schubert

2.3. Geräte

– Autoklaven	Webeco
– Blotkammer	Biotec-Fischer
– Brutschränke	Nunc, Heraeus
– Dura Grind Homogenisator	Zinsser Analytic
– Elektronenmikroskop (TEM 10)	Zeiss
– ELISA-Reader (MR 600)	Dynatech Laboratories
– Fluoreszenzmikroskop (Dialux 20)	Leica
– Gefrierschränke	Privileg, New Brunswick Scientific
– Gummischaber (Rubber policeman)	Hartenstein
– Heizblock	Hartenstein

– Konfokales Lasermikroskop (CLSM)	Leica
– Lichtmikroskop (CK2)	Olympus
– Mikroliter Pipetten	Brand
– pH-Meter (WTW pH 523)	Hartenstein
– Photometer (Ultraspec III)	Pharmacia Biotech
– Röntgenfilm-Entwickler	Kodak
– Schüttelinkubator	Hartenstein
– Spannungsquelle	Pharmacia Biotech
– Sterilbank	Heraeus, Nuair, Gelair, Envirco
– Ultrazentrifuge (L8-55M)	Beckman
– Vortexer	Hartenstein
– Waage	Satorius, Hartenstein
– Wasserbäder	Memmert, Hartenstein
– Westernblot-Apparatur	E-C Apparatus Corporation
– Zählkammer (Neubauer improved)	Brand
– Zentrifugen	Beckman, Heraeus, Eppendorf

2.4. *Verwendete Farbstoffe*

Farbstoff	Stammlösung	Endkonzentration	Firma
OvTR	5 mg/ml H ₂ O	15 µg/ml	Molecular Probes
NHS-CF	10 mg/ml DMSO	200 µg/ml	Molecular Probes
NHS-TR	10 mg/ml DMSO	200 µg/ml	Molecular Probes
7-AAD	wie geliefert	1:50	Pharmingen
Annexin V-PE	wie geliefert	1:50	Pharmingen
PI	1 mg/ml H ₂ O	50 µg/ml	Sigma

OvTR: Ovalbumin Texas Red

NHS-CF: 5-(und-6)Carboxyfluorescein, Succinimidyl Ester, gemischte Isomere

NHS-TR: Texas Red-X, Succinimidyl Ester, gemischte Isomere

7-AAD: 7-Amino-actinomycin D

Annexin V-PE: Annexin V-Phycoerythrin

PI: Propidium Jodid

2.5. Kulturmedien und Agarplatten

BCYE-Medium

Hefe-Extrakt	10 g
ACES	2 g
Aktivkohle	2 g
KOH (1M)	10 ml

ad 1000 ml aqua dest. und nach dem Autoklavieren Zugabe von:

L-Cystein	0,4 g
FeCl ₃ x 6H ₂ O	0,143 g

BCYE-Platten

Hefe-Extrakt	10 g
ACES	2 g
Aktivkohle	2 g
KOH (1M)	10 ml
Agar	18 g

ad 1000 ml aqua dest. und nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf
etwa 50-60°C Zugabe von:

L-Cystein	0,4 g
FeCl ₃ x 6H ₂ O	0,143 g

BHI-Medium

BHI	37 g
-----	------

ad 1000 ml aqua dest.

BHI-Platten

BHI	37 g
Agar	18 g

ad 1000 ml aqua dest.

RPMI-Komplettmedium

RPMI 1640 mit 2mM Glutamin	500 ml
FCS	50 ml

Stainer-Scholle-Flüssigmedium (5x)

Natrium-Glutamat x H ₂ O	53,5 g
Prolin	1,2 g
NaCl	12,5 g
KH ₂ PO ₄	2,5 g
KCl	1,00 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,50 g
Tris	7,63 g

ad 1000 ml aqua dest. und pH mit HCl auf 7,6 einstellen

Supplement

Cystin	200 mg
Konz. HCl	0,5 ml
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	50 mg
Ascorbinsäure	100 mg
Nicotinsäure	20 mg
Glutathion	500 mg

ad 50 ml aqua dest. - danach steril filtrieren

Stainer-Scholle-Flüssigmedium (1x)

Stainer-Scholle-Flüssigmedium (5x)	20 ml
Supplement	1 ml
Casaminosäuren	100 mg
Cyclodextrin	50 mg
CaCl ₂ x H ₂ O	2,64 mg

ad 100 ml aqua dest.

Charcoal Agar

Charcoal Agar	62,5 g
---------------	--------

ad 1000 ml aqua dest.

2.6. Lösungen und Puffer

β-Galaktosidase-Reaktionslösung

Triton X-100 (20%)	700 µl
1 M Zitratpuffer (pH 3,5)	3 ml
p-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid	0,04515 g
aqua dest.	16,3 ml

2D-Lysispuffer (von der AG Desjardins erhalten)

Urea (8 M)	9,6 g
Thiourea (2 M)	3,0 g
CHAPS (4% w/v)	0,8 g
DTT (40 mM)	0,125 g
Tris (20 mM)	0,05 g
IPG Puffer	400 µl
Bromphenol Blau (0,5%)	100 µl

Annexin V-Bindepuffer (pH 7,4)

Hepes	10 mmol/l
NaCl	150 mmol/l
KCl	5 mmol/l
MgCl ₂	1 mmol/l
CaCl ₂	1,8 mmol/l

Anodenpuffer I

Tris	36 g
Methanol	200 ml

ad 1000 ml aqua dest.

Anodenpuffer II

Tris	3,03 g
Methanol	200 ml

ad 1000 ml aqua dest.

Blocking Puffer

Saponin	0,1 %
Ziegenserum	5,0 %
in PBS	

Cacodylatpuffer (0,2 M)

Cacodylatsäure Natrium-Trihydrat	42,8 g
ad 1000 ml aqua dest. und pH auf 7,2 einstellen	

EGTA-Stammlösung (50 mM)

EGTA	19 g/l
pH mit KOH auf 8,0 einstellen	

Einfriermedium

DMSO	14,0 %
in RPMI 1640/2mM Glutamin und 10% FCS	

Epon

Komponente A	12,3 g
Komponente B	10,4 g
2,4,6-Tris(Dimethylaminomethyl)Phenol	0,4 g

Komponente A

Glycidether	37,20 g
Dodecenylsuccinic Anhydrid	50,50 g

Komponente B

Methylnadic Anhydrid	54,25 g
Glycidether	60,00 g

Extraktionspuffer für SubG₁-Technik (pH 7,8)

Na ₂ HPO ₄	9 Teile 50,00 mM
Zitronensäure	1 Teil 25,00 mM
Triton X-100	0,1 %
NaN ₃	0,01 %

Färbepuffer für Apoptosemessung [SubG₁-Technik] (pH 6,8)

PIPES	10,00 mM
NaCl	0,10 N
MgCl ₂	2,00 mM
Triton X-100	0,10 %
NaN ₃	0,02 %

Ficoll-Cushion

Ficoll (70.000)	3 g
Saccharose	1 g
EGTA-Stammlösung	0,2 ml
Hepes/KOH-Stammlösung	2,0 ml

ad 20 ml aqua dest.

Fixierungspuffer für SubG₁-Technik

Ethanol	70%
PBS	20%
aqua dest.	10%

Hepes/KOH-Stammlösung (200 mM)

Hepes	47,66 g/l
-------	-----------

pH mit KOH auf 7,2 einstellen

Homogenisierungspuffer

Saccharose	85,58 g
EGTA-Stammlösung	10 ml
Hepes- KOH-Stammlösung	100 ml

ad 1000 ml aqua dest.

HRP-Reaktionslösung

Triton X-100 (20%)	250 µl
1 M Natriumacetat (pH 5,0)	2,5 ml
aqua dest.	7,5 ml
ABTS	5 mg
H ₂ O ₂ (erst kurz vor Reaktionsstart zugeben)	3,4 µl

Karnovsky-Puffer

PFA-Lösung (8%)	2,5 ml
Glutardialdehydlösung	1,0 ml
Cacodylatpuffer (0,2 M)	5,0 ml
H ₂ O	1,5 ml

Kathodenpuffer

Tris	3,03 g
6-Amino-n-Caprinsäure	5,25 g

ad 1000 ml aqua dest.

KLBM-Puffer (Kyriakis Lysis Buffer Modified)

1 M Hepes/KOH (pH 7,4)	200 µl
0,25 M EGTA (pH 8,0)	80 µl
NaF	21 µg
β-Glycerophosphat	108 µg
Glyzerin (87%)	1,15 ml
Triton X-100	100 µl
NaN ₃ -Stammlösung (10%)	40 µl

ad 10 ml aqua dest.

Vor der Verwendung Zugabe von:

DTT (1M)	10 µl
Protease-Inhibitor Cocktail (50x)	200 µl

Lämmli-Puffer

1 M Tris/HCl (pH 6,8)	5 ml
SDS	0,8 g
Glycerin (87%)	4,6 ml
β-Mercaptoethanol	0,4 ml
Bromphenol Blau	0,01%

ad 25 ml aqua dest.

Laufpuffer (1x)

Laufpuffer (10x)	100 ml
------------------	--------

ad 1000 ml aqua dest.

Laufpuffer (10x)

Tris	30,3 g
Glycin	144,2 g
SDS	10,0 g

ad 1000 ml aqua dest.

Mowiol

Glycerin	6,0 g
Mowiol 4-88 Hoechst	2,4 g

1 h bei RT rühren

aqua dest.	6 ml
------------	------

2 h bei RT rühren

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

10 min bei 50°C rühren, anschließend 15 min bei 5000 U/min zentrifugieren und den Überstand bei -20°C aufbewahren

MPT

Milchpulver	5 g
-------------	-----

ad 100 ml PBS/Tween

PBS (1x)

PBS (20x)	50 ml
ad 1000 ml aqua dest.	

PBS (20x)

NaCl	160 g
KCl	4 g
KH ₂ PO ₄	4 g
Na ₂ HPO ₄	18,35 g
ad 1000 ml aqua dest.	

PBS/Tween

PBS (20x)	50,0 ml
Tween 20	0,5 ml
ad 1000 ml aqua dest.	

PLP (10x)

MES (200 mM)	1,952 g
NaCl (700 mM)	2,045 g
KCl (50 mM)	0,186 g
MgCl ₂ (50 mM)	0,510 g
L-Lysin (700 mM)	6,420 g
EGTA (20 mM)	0,152 g
ad 50 ml aqua dest. und pH auf 7,5 einstellen	

PLPS-Fixierungsmittel

PLP (10x)	1 ml
Paraformaldehyd (8% in aqua dest.)	4,38 ml
aqua dest.	4,62 ml
Saccharose	0,45 g
NaJO ₄	21,4 mg

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 aqua dest.]	1 mM

Sammelgel

1,0 M Tris (pH 6,8)	1,25 ml
Acrylamidlösung	1,7 ml
aqua dest.	6,8 ml
SDS (20%)	0,1 ml
APS (10%)	0,1 ml
TEMED	10 µl

Strippingpuffer

Tris	3,63 g
SDS	10,00 g

ad 500 ml aqua dest. und pH mit HCl auf 7,6 einstellen

vor jedem Gebrauch Zugabe von 700 µl β-Mercaptoethanol je 100 ml Strippingpuffer

Saccharose-Lösungen

65% Saccharose

Saccharose	32,5 g
EGTA-Stammlösung	0,5 ml
Hepes/KOH-Stammlösung	5,0 ml

ad 50 ml aqua dest.

55% Saccharose

Saccharose	27,5 g
EGTA-Stammlösung	0,5 ml
Hepes/KOH-Stammlösung	5,0 ml

ad 50 ml aqua dest.

32,5% Saccharose

Saccharose	16,25 g
EGTA-Stammlösung	0,5 ml
Hepes/KOH-Stammlösung	5,0 ml

ad 50 ml aqua dest.

10% Saccharose

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

ad 50 ml aqua dest.

Trenngel (10%)

1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml
Acrylamidlösung	3,3 ml
aqua dest.	4,0 ml
SDS (20%)	0,1 ml
APS (10%)	0,1 ml
TEMED	10 µl

2.7. Antikörper

2.7.1. Primäre monoklonale Antikörper

Antigen	Spezies	Herkunft	Referenz
LAMP-1 (Klon 1D4B)	Ratte	U.Schaible, Berlin Original: Development Study Hybridoma Bank	[Chen et al. 1985b]
Transferrin Rezeptor (Klon H68.4)	Maus	Zymed	[Cameron et al. 1991]
LAMP-2 (Klon ABL-93)	Ratte	U. Schaible, Berlin Original: Development Study Hybridoma Bank	[Chen et al. 1985a]
<i>Afipia felis</i> (Klon 1B3-2)	Maus	D. Raoult und H. LePochoer, Marseille	[Yu und Raoult 1994]
EEA1	Maus	BD Transduction Labs	[Mu et a. 1995]
LAMP-1(Klon BB6)	Maus	M. Fukuda, La Jolla	[Carlsson et al. 1988]

2.7.2. Primäre polyklonale Kaninchenantikörper

Antigen	Herkunft	Referenz
Calnexin	A. Helenius, Zürich	[Herbert et al. 1996]
GM-130	M. Lowe, Manchester	[Nakamura et al. 1997]
TOM-20	K. Mihara und H. Suzuki, Kyushu	[Iwahashi et al. 1997]
vATPase (33 kDa)	D. Brown, Boston und Y. Moriyama, Osaka	[Moriyama et al. 1995]
Cathepsin D	E. Kominami, Tokyo	[Ishidoh et al. 1999]
EEA1	G. Mills und M. Clague, Liverpool	[Mills et al. 1998]
rab5	P. van der Sluijs, Utrecht	[Bottger et al. 1996]
TACO	J. Pieters, Basel	[Ferrari et al. 1999]
VAMP 8	W. Antonin und R. Jahn, Göttingen	[Fasshauer et al. 1999]

2.7.3. Sekundäre gekoppelte Antikörper

Antigen	Spezies	Herkunft	gekoppelt an
Kaninchen IgG	Ziege	Dianova	HRP
Ratten IgG	Ziege	Dianova	HRP
Maus IgG	Ziege	Dianova	HRP
Kaninchen IgG	Ziege	Molecular Probes	Alexa Fluor 488
Maus IgG	Ziege	Molecular Probes	Alexa Fluor 488
Ratten IgG	Ziege	Molecular Probes	Alexa Fluor 488

2.8. Angaben zu den Herstellern

American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany

Beckman, Palo Alto, CA, USA

Beranek, Weinheim, Germany

Bio Rad Laboratories, München, Germany

Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen, Germany

Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany

Brand, Wertheim a.M., Germany
Carl Zeiss, Oberkochen, Germany
Dianova, Hamburg, Germany
Difco, Sparks, MD, USA
Dynatech Laboratories, Alexandria, VA, USA
E-C Apparatus Corporation, St. Petersburg, FL, USA
Envirco Corporation, Andover, Hampshire, England
Eppendorf, Hamburg, Germany
Ferak, Berlin, Germany
Fluka, Neu-Ulm, Germany
Gelaire Flow Laboratories, Opera, Italy
Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Germany
Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany
Hartenstein, Würzburg, Germany
Heraeus, Hanau, Germany
Kodak, Stuttgart, Germany
Laborbedarf Schubert, Wackersdorf, Germany
Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany
Menzel-Gläser, Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk, Braunschweig, Germany
Merck, Darmstadt, Germany
Molecular Probes, Eugene, OR, USA
New Brunswick Scientific, New Brunswick, NJ, USA
Noras, Würzburg, Germany
Nuair, Integra Biosciences (IBS), Fernwald, Germany
Nunc, Wiesbaden, Germany
Olympus Optical, Hamburg, Germany
PAA, Cölbe, Germany
Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany
Privileg, Quelle AG, Fürth, Germany
Roth, Karlsruhe, Germany
Saliter, J.M. Gabler Saliter - Milchwerk, Obergünzburg, Germany
Sarstedt, Nürnberg, Germany
Serva, Heidelberg, Germany
Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany
Webeco, Bad Schwartau, Germany
Zinsser Analytic, Frankfurt, Germany

2.9. Zellkultur

2.9.1. Lagerung und Kultivierung von J774E und J774A.1

J774 ist eine murine Makrophagen-Zelllinie. Die in 1,0 ml-Kryotubes in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Zellen ($6,0 \times 10^6$ /ml Einfriermedium) wurden in warmen Wasser (37°C) aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in ein mit 10 ml RPMI-Komplettmedium gefülltes 15 ml-Greiner-Röhrchen pipettiert. Nach der Zentrifugation (1200 U/min, 8 min, RT) wurden die Zellen in RPMI-Komplettmedium resuspendiert, gezählt (Trypanblau-Ausschlussmethode) und in 90 mm Zellkulturschalen überführt. Jeden zweiten Tag wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 bzw. 1:3 gesplittet.

Für alle Experimente wurde der Klon J774E, der den Mannoserezeptor auf der Plasmamembran sehr stark exprimiert [Fiani et al. 1998] verwendet. Nur bei der Phagosomenisolierung für die 2D-Gel-Analyse wurde der Klon J774A.1 verwendet. Dieser Klon exprimiert den Mannoserezeptor in wesentlich geringerem Ausmaß.

2.9.2. Isolierung von humanen Monozyten

2.9.2.1. Gewinnung von peripheren Blutlymphozyten durch Dichtegradientenzentrifugation

Venöses humanes Vollblut von gesunden Spendern wurde mit Heparin versetzt und zu gleichen Teilen mit PBS verdünnt. In ein 50 ml-Greiner-Röhrchen wurde 10 ml Ficoll Paque vorgelegt, mit 35 ml Blut-PBS-Gemisch überschichtet und zentrifugiert (1300 U/min, 45 min, RT). Der durch Dichtegradienten-Zentrifugation entstandene Interphasenring wurde mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen, die darin enthaltenen peripheren Blutlymphozyten (PBL) dreimal mit 50 ml PBS gewaschen (1300 U/min, 10 min, 4°C). Anschließend wurden die PBL in RPMI-Komplettmedium aufgenommen und in 24-well-Platten ausgesät.

2.9.2.2. Gewinnung von humanen Monozyten aus PBL

Die PBL wurden in 24-well-Platten mit oder ohne 12 mm Deckgläschen pipettiert und für 3 h inkubiert (37°C, 5% CO₂). Danach wurden die nicht adhärenen Zellen durch dreimaliges Waschen mit warmen PBS entfernt. Bei den verbleibenden adhärenen Zellen handelt es sich mit einer Reinheit von circa 80% um Monozyten.

2.9.3. Anzucht von Bakterien

2.9.3.1. Anzucht von *Afipia felis*

Afipia felis (ATCC 53690) wurde auf BCYE-Platten bei 30°C angezogen. Für alle Infektionsexperimente wurden 3-4 Tage alte Kolonien verwendet. Dazu wurden die Bakterien mittels einer Impföse vom Nährboden entnommen und in 1 ml PBS resuspendiert.

2.9.3.2. Anzucht von *Rhodococcus equi*

Rhodococcus equi (ATCC 33701(+)) und ATCC 33701(-)) wurden auf BHI-Platten bei 30°C angezogen. Für alle Infektionsexperimente wurde *R. equi* als Schüttelkultur (190 U/min) über Nacht bei 37°C in BHI Medium angezogen und durch Zentrifugation in einer Minifuge (8000 U/min, 5 min, RT) geerntet.

2.9.3.3. Anzucht von *Listeria innocua*

Listeria innocua (Serotyp 6b, aus der Stammsammlung des Lehrstuhls für Mikrobiologie der Universität Würzburg) wurde auf BHI-Platten bei 37°C angezogen. Für alle Infektionsexperimente wurde *L. innocua* als Schüttelkultur (190 U/min) über Nacht bei 37°C in BHI Medium angezogen und durch Zentrifugation in einer Minifuge (8000 U/min, 5 min, RT) geerntet.

2.9.3.4. Anzucht von *Bordetella pertussis*

Bordetella pertussis (TI tox und Bp347 von R. Gross, Institut für Mikrobiologie der Universität Würzburg) wurde auf Charcoal Agar-Platten bei 37°C angezogen. Für alle Infektionsexperimente wurde *B. pertussis* als Schüttelkultur (190 U/min) über Nacht bei 37°C in Stainer-Scholle-Flüssigmedium angezogen und durch Zentrifugation in einer Minifuge (8000 U/min, 5 min, RT) geerntet.

2.9.4. Ermittlung der Bakterienzellzahl

Im Bereich geringer Zelldichten ist die Anzahl an Bakterien in einer Kultur direkt proportional zur optischen Dichte der Bakteriensuspension. Deshalb wurden alle verwendeten Bakterien in PBS aufgenommen und die optische Dichte bei 600 nm am Photometer gemessen.

Es ergeben sich folgende Beziehungen zwischen gemessener optischer Dichte und Lebend-Zellzahlen:

<i>Afipia felis</i> :	1 OD ₆₀₀ = 2,8 x 10 ⁸
<i>Rhodococcus equi</i> :	1 OD ₆₀₀ = 2,0 x 10 ⁸
<i>Listeria innocua</i> :	1 OD ₆₀₀ = 2,0 x 10 ⁸
<i>Bordetella pertussis</i> :	1 OD ₆₀₀ = 1,0 x 10 ⁹

2.9.5. Vorbehandlung der Bakterien

2.9.5.1. Vorbehandlung mit Paraformaldehyd

Die Bakterien (*Afipia felis* oder *Rhodococcus equi*) wurden in 1% Paraformaldehyd (PFA) in PBS aufgenommen und für 2 h bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Bakterien einmal mit 50 mM NH₄Cl und dreimal mit PBS gewaschen. Wie A. Schüttfort (dieses Labor) zeigen konnte, werden durch diese Behandlung 99,9-100% der Bakterien getötet [Schüttfort 2000].

2.9.5.2. Opsonisierung

Unbehandelte oder mit PFA getötete Afipien wurden mit 1% monoklonalem Antikörper (Klon 1B6-4) in RPMI-Komplettmedium für 30 min bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert.

2.9.6. Färbung von Bakterien und Zymosan

Vor der Infektion wurden die Bakterien sowie Zymosan mit den Fluoreszenzfarbstoffen NHS-CF (grün) oder NHS-TR (rot) markiert. Dazu wurden die Bakterien und Zymosan einmal mit PBS gewaschen (8000 U/min, 5 min, RT), in 100 mM NaHCO₃ (pH 8,8) aufgenommen und mit dem jeweiligen Farbstoff [200 µg/ml] inkubiert (30 min, 4°C, im Dunkeln). Danach wurden die Bakterien und Zymosan einmal mit Tris/HCl (pH 7) und zweimal mit PBS gewaschen (8000 U/min, 5 min, RT).

2.10. Quantifizierung der Kolokalisierung Bakterien-enthaltender Phagosomen mit endozytiertem Ovalbumin Texas Red

2.10.1. Markierung der Lysosomen mit Ovalbumin Texas Red

Die auf 12 mm Deckgläschen in einer 24-well-Platte adhärenen J774E-Makrophagen wurden mit 15 µg Ovalbumin Texas Red (OvTR) in 1 ml RPMI-Komplettmedium inkubiert. Nach 16 h Inkubation (37°C, 5%CO₂) wurde das farbstoffhaltige Medium entfernt, die Zellen dreimal mit warmen PBS gewaschen und für 2 h mit RPMI-Komplettmedium inkubiert (37°C, 5%CO₂). Dadurch reichert sich der Farbstoff in den lysosomalen Kompartimenten an. Danach wurden die Zellen mit den vorher markierten Bakterien bzw. Zymosan für 1 h mit einer "multiplicity of infection" (MOI) von 10 infiziert (37°C, 5%CO₂), d. h. das Verhältnis der Makrophagen zu den Bakterien ist 1:10. Durch dreimaliges Waschen mit warmen PBS wurden die nicht phagozytierten Bakterien/Zymosan entfernt. Nach der anschließenden Inkubationszeit von 2 h (37°C, 5%CO₂) befanden sich die Bakterien bzw. Zymosan in einem stabilen Kompartiment. Anschließend wurden die Zellen wie unten beschrieben fixiert.

2.10.2. Markierung des endozytischen Systems mit Ovalbumin Texas Red

Die auf 12 mm Deckgläschen einer 24-well-Platte adhärenen J774E-Makrophagen wurden mit den vorher markierten Bakterien/Zymosan für 1 h mit einer MOI von 10 infiziert (37°C, 5% CO₂). Durch dreimaliges Waschen mit warmen PBS wurden die nicht phagozytierten Bakterien/Zymosan entfernt. Anschließend wurden die J774E für weitere 16 h inkubiert (37°C, 5% CO₂). Danach wurde je Kavität 15 µg OvTR zugegeben. Nach der Inkubation (3 h, 37°C, 5% CO₂) wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und wie unten beschrieben fixiert.

2.10.3. Fixierung mit PLPS

Die auf Deckgläschen adhärenen J774E wurden in 24-well-Platten mit frisch hergestelltem PLPS (500 µl) inkubiert (20 min, RT, im Dunkeln). Nach dem Waschen mit PBS wurde 500 µl eiskaltes Methanol für 1 min zugegeben. Danach wurde dreimal mit PBS gewaschen und die Deckgläschen auf einen Tropfen Mowiol, der sich auf einem Objektträger befand, überführt.

2.10.4. Auswertung am Fluoreszenzmikroskop

Zur Auswertung wurden die Präparate am Fluoreszenzmikroskop unter Ölimmersion mit einem 100er Objektiv betrachtet. Repräsentative Gesichtsfelder wurden mit Hilfe einer Kamera auf einen Computer-Bildschirm übertragen. Die Gesamtzahl der Bakterien einer Zelle und der Anteil an Bakterien, die mit OvTR kolokalisieren, wurden gezählt. Daraus wurde der prozentuale Anteil der Bakterien errechnet, die mit OvTR kolokalisieren.

2.11. Phagosomenisolierung

2.11.1. Infektion von J774-Makrophagen

Einen Tag vor der Infektion wurde bei den J774-Makrophagen ein Mediumwechsel vorgenommen. Für jede Probe (Phagosomenisolierung) eines Experimentes wurden 12-13 Schalen mit circa 80% konfluenten Makrophagen verwendet (das entspricht circa $1-2 \times 10^8$ Zellen). Die Makrophagen wurden 60 min bei 37°C und 5% CO₂ mit den jeweiligen Bakterien mit einer MOI von 10 in einem Volumen von 7 ml pro Schale inkubiert. Danach wurden die Zellen vorsichtig

dreimal mit warmen PBS gewaschen, um die nicht phagozytierten Bakterien zu entfernen. Nach Zugabe von 5 ml RPMI-Komplettmedium wurden die Makrophagen für weitere 2 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt, in jede Zellkulturschale 2 ml eiskaltes PBS gegeben und die Zellen mittels eines Gummischabers vorsichtig vom Boden der Zellkulturschalen gelöst. Die Makrophagen wurden durch eine Zentrifugation (700 U/min, 7 min, 4°C) pelletiert. Nach dem Waschen des Pellets mit PBS (700 U/min, 7 min, 4°C) und Homogenisierungspuffer (HP) (1000 U/min, 7 min, 4°C) wurden die Zellen in HP ohne EGTA und mit Protease-Inhibitoren aufgenommen.

2.11.2. Aufschluss der infizierten Zellen

Die infizierten Zellen wurden durch 10 starke Stöße mit dem Dura Grind Homogenisator aufgeschlossen. Dabei wurde die Entstehung von Luftblasen vermieden, da der entstehende Schaum zur Denaturierung von Membranen und Proteinen führen kann. Wenn circa 70-80% der Makrophagen lysiert sind (kontrolliert durch lichtmikroskopische Beobachtung), sollten die J774 nicht weiter lysiert werden, da sonst die Ausbeute intakter Phagosomen reduziert würde.

2.11.3. Herstellung von postnukleärem Überstand (PNS)

Um noch intakte Zellen sowie Zellkerne aus dem Zellhomogenisat zu entfernen, wurde das Lysat zentrifugiert (2000 U/min, 3 min, 4°C). Der entstandene PNS wurde abgenommen, das Pellet vorsichtig in HP resuspendiert und ein weiteres Mal zentrifugiert (2000 U/min, 3 min, 4°C). Der dabei entstandene PNS wurde zum ersten gegeben. Da es sich bei Phagosomen um labile Organellen handelt, sollten diese mit Vorsicht behandelt werden. Deshalb sollten nur abgeschnittene Pipettenspitzen sowie Swing-out-Rotoren benutzt werden.

2.11.4. Behandlung des PNS mit Benzonase

Da DNA zu einer gelartigen Konsistenz des PNS und somit zu einem Verkleben der Phagosomen führen kann, wurde der postnukleäre Überstand mit Benzonase behandelt. Dabei handelt es sich um eine Proteasefreie Enzymmischung, die alle Arten von Polynukleotiden degradiert. Zu je 2 ml

PNS wurden 2 µl (50 U) des Enzyms gegeben und für 5 min auf 37°C erwärmt. Danach wurde der PNS mit der 65% Saccharoselösung auf 39% Saccharose eingestellt.

2.11.5. Erster Ultrazentrifugationsschritt

In ein SW40Ti-Röhrchen wurden nacheinander 1 ml der 65%-igen Saccharoselösung, 2 ml der 55%-igen Saccharoselösung, der auf 39% Saccharose eingestellte postnukleäre Überstand, 2 ml der 32,5%-igen Saccharoselösung sowie 2 ml der 10%-igen Saccharose-lösung pipettiert. In diesem diskontinuierlichen Saccharosegradienten wandern die Phagosomen in der sich anschließenden Zentrifugation (28.400 U/min, 1h, 4°C) in den Bereich von 55–65% Saccharose (Fraktionen 8-10). Für die Routineuntersuchungen wurden nur diese Fraktionen (circa 2 ml) weiter verwendet. Für die Evaluierung dieser Technik wurden alle Fraktionen (1-10 und das Pellet) untersucht.

2.11.6. Zweiter Ultrazentrifugationsschritt

Die Bakterien-enthaltenden Phagosomen befinden sich nach dem ersten Zentrifugationsschritt in den Fraktionen 8-10. Deshalb wurden diese Fraktionen mit HP ohne Saccharose auf eine Saccharosekonzentration von circa 11% eingestellt. Dies muss sehr langsam geschehen, da sonst die Gefahr besteht, dass die Phagosomen osmotisch bedingt platzen könnten. Danach wurde 1 ml einer 15%-igen Ficolllösung (in 5% Saccharose (w/v); 0,5 mM EGTA; 20 mM HEPES/KOH, pH 7,2) in ein SW40Ti-Röhrchen vorgelegt und mit den auf 11% Saccharose eingestellten Fraktionen 8-10 überschichtet. Durch das Zentrifugieren (10.000 U/min, 20 min, 4°C) entstand ein relativ lockeres Pellet, in dem sich die Phagosomen befinden.

2.11.7. Dritter Ultrazentrifugationsschritt

Das bei der zweiten Zentrifugation entstandene Pellet wurde in 11 ml HP aufgenommen und nochmals zentrifugiert (10.000 U/min, 10 min, 4°C). Danach befanden sich circa 40% der Bakterien in dem Pellet F (Finale Pellet), das in 100 µl HP aufgenommen und im 1,5 ml Reagiergefäß bei –80°C eingefroren wurde. Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde F in 200 µl PBS resuspendiert und wie unter 2.13. beschrieben weiter behandelt.

2.12. Bestimmung der Bakterienausbeute in den Phagosomenfraktionen

Je 50 µl der einzelnen Fraktionen (1-10 und F) sowie der postnukleäre Überstand (PNS) als Ausgangskontrolle wurden abgenommen und eine Verdünnungsreihe hergestellt. Die ausgewählten Verdünnungen wurden auf Agar-Nährstoffplatten ausplattiert (*Afipia felis* auf BCYE-Platten, *Listeria innocua* auf BHI-Platten und *Bordetella pertussis* auf Charcoal-Platten). Nach 1-4 Tagen (abhängig vom Wachstum der einzelnen Bakterien) wurden die Einzelkolonien ausgezählt.

2.13. Elektronenmikroskopie

Von der in 200 µl PBS aufgenommenen Phagosomenfraktion F wurden 150 µl in ein 1,5 ml Reagiergefäß gegeben und in einem Swing-out-Rotor zentrifugiert (4000 U/min, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde vorsichtig in 1 ml Karnovskypuffer aufgenommen und über Nacht im Eisbad inkubiert. Danach wurde dreimal mit jeweils 300 µl 0,1 M Cacodylatpuffer gewaschen (4000 U/min, 10 min, 4°C). Anschließend wurde das Pellet in 1% (w/v) Osmiumtetroxid in 50 mM Cacodylatpuffer aufgenommen und nach 1 h bei 4°C dreimal mit jeweils 300 µl aqua dest. gewaschen (4000 U/min, 10 min, 4°C). Das resultierende Pellet wurde in 0,5% (w/v) Uranylacetat in aqua dest. aufgenommen und über Nacht bei 4°C belassen. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde die Phagosomenfraktion mittels einer Ethanolreihe dehydriert (nacheinander mit 30%, 50%, 70%, 90%, 96% Ethanol in deionisiertem Wasser für 30 min bei 4°C, und am Ende zweimal mit 100% Ethanol für 30 min bei RT). Dabei wurde das Pellet vorsichtig mit jeweils 300 µl Ethanol überschichtet, ohne es zu resuspendieren. Danach wurde zweimal jeweils 300 µl Propylenoxid für 5 min bei RT zugegeben und wieder entfernt, ohne das Pellet zu resuspendieren. Nach dem Inkubieren des Pellets über Nacht bei RT in einem Epon-Propylenoxid-Gemisch (150 µl Epon + 150 µl Propylenoxid) wurde zweimal nach 3-4 h das Epon gewechselt. Zum Schluss wurde circa 300 µl frisches Epon zu der Phagosomenfraktion gegeben und für 3-5 Tage bei 60°C ausgehärtet. Anschließend wurden von dem Pellet in einem Mikrotom mit einem Diamantmesser Ultradünnschnitte angefertigt, die auf Kupfernetzchen übertragen und mit 2%-igem methanolischen Uranylacetat und Reynold's Bleizitrat kontrastiert wurden. Die Präparate wurden am Transmissionselektronenmikroskop (TEM) ausgewertet.

2.14. Charakterisierung der bei der Phagosomenisolierung anfallenden Fraktionen

2.14.1. Markieren der Plasmamembran mit HRP

Nachdem die Makrophagen von den Zellkulturschalen abgeschabt und mit eiskaltem PBS gewaschen (700 U/min, 7 min, 4°C) wurden, erfolgte die Inkubation der Zellen mit PBS/HRP (0,25 mg/ml) für 30 min bei 4°C. Dadurch wurde die Plasmamembran mit HRP markiert. Anschließend wurden die J774E jeweils einmal mit PBS (700 U/min, 7 min, 4°C) und HP (1000 U/min, 7 min, 4°C) gewaschen. Die folgende Homogenisierung und die Phagosomenisolierung wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Mittels HRP-Assay wurde danach der Anteil der Plasmamembranproteine an der Phagosomenfraktion F bestimmt.

2.14.2. Markierung der frühen Endosomen mit HRP

Die J774E-Makrophagen wurden von den Zellkulturschalen abgeschabt und mit eiskaltem PBS gewaschen (700 U/min, 7 min, 4°C). Danach wurden die Zellen mit PBS/HRP (0,25 mg/ml) erst für 10 min bei 4°C und dann für 4 min bei 37°C (dabei leicht schütteln) inkubiert. Durch diese Vorgehensweise wurden die frühen Endosomen mit HRP beladen. Anschließend wurden die J774E jeweils einmal mit PBS (700 U/min, 7 min, 4°C) und HP (1000 U/min, 7 min, 4°C) gewaschen. Die folgende Homogenisierung und die Phagosomenisolierung wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Mittels HRP-Assay wurde danach der Anteil der frühen Endosomen an jeder phagosomalen Fraktion bestimmt.

2.14.3. HRP-Assay

Mit Hilfe dieses Assays wurden die HRP-Aktivitäten bestimmt, die je nach verwendeten Protokoll (siehe 2.14.1 und 2.14.2.) entweder die Plasmamembran oder die frühen Endosomen definiert. Dazu wurden die zu testenden Proben mit HP auf ein Volumen von 50 µl gebracht und in je eine Kavität einer 96-well-Platte pipettiert. Nach Zugabe von jeweils 100 µl der HRP-Reaktionslösung und einer Inkubationszeit von 20 min (im Dunkeln), wurde zum Stoppen der

Enzymreaktion 150 μ l eiskaltes aqua dest. zugegeben. Danach wurde die Extinktion umgehend bei 405 nm am ELISA-Reader bestimmt.

2.14.4. Saure β -Galaktosidase-Assay

Mit Hilfe dieses Assays wurde die lysosomale Aktivität in den einzelnen phagosomalen Fraktionen bestimmt. Dazu wurden die zu testenden Proben mit aqua dest. auf ein Volumen von 50 μ l gebracht und in je eine Kavität einer 96-well-Platte pipettiert. Danach wurde jeweils 100 μ l der β -Galaktosidase-Reaktionslösung zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 μ l 0,5 M NaCO₃ gestoppt und die Extinktion bei 405 nm am ELISA-Reader gemessen. Die Aktivitäten wurden in Units (U= gemessene Extinktion bei 405 nm/mg Protein/h) bestimmt.

2.14.5. Bestimmung der Wirtszell-Proteinkonzentration

Um die Wirtszell-Proteinkonzentration bestimmen zu können, mussten die bakteriellen Proteine von den Wirtszellproteinen getrennt werden. Deshalb wurden zu je 50 μ l der einzelnen Fraktionen das Detergenz Triton X-100 (5,5 μ l einer 2%igen Lösung) zugegeben, welches die Phagosomenmembran solubilisiert und so luminale Proteine und Membranproteine des Wirtes verfügbar macht. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 4°C wurden die Bakterien durch eine Zentrifugation (15.000 U/min, 5 min, 4°C) pelletiert. Der Überstand wurde in frische Reagiergefäße überführt und die Proteinkonzentration mittels des BioRad DC Protein Assays bestimmt. Als Standard wurde BSA verwendet.

2.15. SDS-PAGE und Westernblot-Analyse

2.15.1. SDS-PAGE

Das denaturierende Polyacrylamidgel erlaubt die Auftrennung von Proteinen oder Polypeptiden entsprechend ihrem Molekulargewicht. Es besteht aus einem Trenngel, das nach dem Gießen mit Methanol überschichtet wurde, um ein Austrocknen zu vermeiden. Nach vollständiger

Polymerisierung wurde das Methanol verworfen und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. Noch vor der Polymerisierung wurde ein geeigneter Kamm in das Sammelgel hineingesteckt. Die jeweiligen Proben wurden mit 2x Lämmli-Puffer gemischt, denaturiert (95°C für 5 min) und in die vorher mit H₂O ausgewaschenen Taschen des Gels pipettiert. Der Gellauf erfolgte bei 25 mA/Gel in einer mit Laufpuffer gefüllten Westernblot-Apparatur.

2.15.2. Westernblot

Nach Beendigung des Gellaufs wurde das Gel vorsichtig mit H₂O gewaschen und die Proteine im halbtrockenen Blotverfahren auf eine PVDF Membran transferiert (0,8 mA/cm², 1 h). Dazu wurden sowohl die PVDF-Membran als auch die Whatman-Papiere auf die Größe des Gels zugeschnitten. Danach wurden in die Blotkammer 6 Lagen in Anodenpuffer I getränkte Whatman Papiere, 3 Lagen in Anodenpuffer II getränkte Whatman Papiere, die PVDF Membran, das Gel und 6 Lagen in Kathodenpuffer getränkte Whatman Papiere gelegt. Die PVDF-Membran muss vor jeder Verwendung 10 sec in Methanol und danach in aqua dest. gewaschen werden.

2.15.3. Dekorieren der PVDF-Membran

Nach dem Transferieren der Proteine auf die Membran wurde diese mit PBS/Tween für 10 min gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit MPT (5% Milchpulver in PBS/Tween) geblockt (1 h, RT, auf einem Taumler). Die Membran wurde danach mit dem ersten Antikörper, der in der Regel in MPT verdünnt wurde, inkubiert (1 h, RT, auf einem Taumler). Nach dem Waschen mit PBS/Tween (1x 5 min und 3x 10 min) wurde die Membran mit dem zweiten Antikörper, der an HRP-gekoppelt und in MPT verdünnt war, inkubiert (1 h, RT, auf einem Taumler). Anschließend wurde die Membran mit PBS/Tween gewaschen (1x 5 min und 3x 10 min). Die Detektion des HRP-gekoppelten Antikörpers erfolgte mit dem ECL-System nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden die Antikörper mittels Chemolumineszenz auf einem X-ray Film sichtbar gemacht.

2.15.4. Strippen der Membranen

Um eine bereits mit einem Antikörper dekorierte Membran mit einem anderen Antikörper zu dekorieren, der ein Protein mit ähnlichem Molekulargewicht erkennt wie der erste, wurde der erste Antikörper durch Strippen der Membran entfernt. Dazu wurde die Membran mit Strippingpuffer inkubiert (60 U/min, 30 min, 60°C). Danach wurde die Membran dreimal mit PBS/Tween gewaschen und wie unter 2.15.3. dekoriert.

2.16. Präparation der phagosomalen Proteine für die 2D-Gelelektrophorese

Für die 2D-Gel-Analyse von phagosomalen Proteinen wurden die Phagosomen aus infizierten J774A.1-Makrophagen isoliert. Nach der Isolierung (siehe 2.11.) wurden die Phagosomen mit 10 ml PBS gewaschen (4000 U/min, 10 min, 4°C) und in 150 µl PBS aufgenommen. Ein Teil der Phagosomenpräparation (120 µl) wurde zentrifugiert (4000 U/min, 10 min, 4°C), das Pellet in 25 µl 2D-Lysispuffers aufgenommen und für 1 h auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Proben zur Weiterbearbeitung zu unserem Kooperator Dr. Michel Desjardins (Montreal, Kanada) geschickt.

2.17. Immunfluoreszenz

2.17.1. Infektion von J774E mit *Afipia felis* und Zymosan

Die J774E-Makrophagen wurden auf 12 mm Deckgläschen in einer 24-well-Platte ausgesät (1×10^5 Zellen/Kavität). Nachdem die Zellen eine Konfluenz von 80% erreicht hatten (nach 2 Tagen) wurden die Bakterien/Zymosan mit einer MOI von 10 (*Afipia*, *Listeria*, *Bordetella*) oder 5 (Zymosan) im Kalten auf die Makrophagen zentrifugiert (1200 U/min, 30 min, 4°C). Anschließend wurde das Medium und somit die nicht adhärenen Bakterien/Zymosan entfernt und 37°C warmes RPMI-Komplettmedium zugegeben. Nach einer Infektionsdauer von 5 bis 120 min (37°C, 5% CO₂) wurde das Medium verworfen und eiskaltes PBS zugegeben. Danach wurden die Zellen auf den Deckgläschen mit 3% PFA fixiert (30 min, RT, im Dunkeln), dreimal mit PBS

gewaschen und mit 50 mM NH₄Cl inkubiert (20 min, RT, im Dunkeln). Anschließend erfolgte die Antikörper-Inkubation (2.17.3.).

2.17.2. Infektion von humanen Monozyten mit *Afipia felis* und Zymosan

Die vorher markierten Afipien/Zymosan wurden mit einer MOI von 20 im Kalten auf die in 24-well-Platten auf 12 mm Deckgläschen ausgesäten humanen Monozyten zentrifugiert (1200 U/min, 30 min, 4°C). Danach wurde das Medium und somit die nicht adhärenen Bakterien/Zymosan entfernt und 37°C warmes RPMI-Komplettmedium zugegeben. Nach einer Infektionsdauer von 120 min (37°C, 5% CO₂) wurde das Medium verworfen und eiskaltes PBS zugegeben. Danach wurden die Zellen auf den Deckgläschen mit 3% PFA fixiert (30 min, RT, im Dunkeln), dreimal mit PBS gewaschen und mit 50 mM NH₄Cl inkubiert (20 min, RT, im Dunkeln). Anschließend folgt die Antikörper-Inkubation (2.17.3.).

2.17.3. Antikörper-Inkubation

Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die auf den Deckgläschen adhärenen Zellen mit Blocking Puffer inkubiert (50 min, RT, im Dunkeln). Danach wurden die Makrophagen 1 h mit dem entsprechenden 1. Antikörper inkubiert, dreimal mit PBS gewaschen, 50 min mit dem entsprechenden 2. Antikörper inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden dann auf einen Tropfen Mowiol überführt, der sich auf einem Objektträger befand.

2.17.4. Auswertung am konfokalen Lasermikroskop

Zur Auswertung wurden die Präparate am konfokalen Lasermikroskop mit einem Ölimmersionsobjektiv (63x1,4) betrachtet. Repräsentative Gesichtsfelder wurden mit Hilfe einer Kamera auf einen Computerbildschirm übertragen. Die Gesamtzahl der Bakterien einer Zelle und der Anteil an Bakterien, die mit dem zellulären Marker umgeben waren, wurden gezählt. Daraus wurde der prozentuale Anteil der Bakterien, die mit dem zellulären Marker kolokalisieren, errechnet.

2.18. Einfluss von *R. equi* auf die Vitalität von Makrophagen

2.18.1. Infektion von humanen Monozyten mit *Rhodococcus equi*

Die in 24-well-Platten ausgesäten humanen Monozyten wurden für 1 h (37°C, 5% CO₂) mit *Rhodococcus equi* mit einer MOI 30 von infiziert. Danach wurden die nicht phagozytierten Bakterien durch dreimaliges Waschen mit warmen PBS entfernt und RPMI-Komplettmedium mit 10 µg/ml Gentamicin zugegeben. Nach 22 h-iger Inkubation (37°C, 5% CO₂) wurde das Medium verworfen und die Zellen in eiskaltem PBS aufgenommen und mittels Gummischabers abgeschabt. Die Zellvitalität wurde mit Hilfe der Trypanblau-Ausschlussmethode am Lichtmikroskop bestimmt.

2.18.2. Infektion von J774E mit *Rhodococcus equi*

Konfluente J774E-Makrophagen in einer 90 mm Zellkulturschale wurden für 1 h mit *Rhodococcus equi* mit einer MOI von 30 infiziert (37°C, 5% CO₂). Danach wurden die Zellen dreimal mit warmen PBS gewaschen. Nach der Zugabe von RPMI-Komplettmedium mit 40 µg Gentamicin wurden die Zellen für 0 h, 4 h, 6 h inkubiert (37°C, 5% CO₂). Danach wurden die Zellen abgeschabt und mit dem gesamten Medium in ein 15 ml Greinerröhrchen überführt. Nach der anschließenden Zentrifugation (1200 U/min, 10 min, 4°C) wurden die Zellen in 1 ml eiskaltem PBS aufgenommen. Anschließend wurden nekrotische und/oder apoptotische Zellen durch Nachweis des Spaltprodukts der Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP), mittels SubG₁-Technik oder Doppelfärbung mit Annexin V-PE und 7-AAD bestimmt.

2.18.3. Bestimmung der Apoptose durch Nachweis des Spaltprodukts der PARP

Die Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) ist ein 116 kDa Kernprotein, das wichtig bei der Reparatur der DNA ist. Während der Apoptose ist dieses eines der ersten Proteine, die durch Caspasen gespalten werden. Dabei wird die N-terminale DNA Bindungsdomäne (24 kDa) von der C-terminalen katalytischen Domäne (89 kDa) gespalten. Da diese Spaltung ein frühes Ereignis während der Apoptose und die PARP wichtig für die Erhaltung der Zellvitalität ist, dienen die Spaltprodukte der PARP als Nachweis für Apoptose.

Die Zellen (ca. 6×10^6) wurden zentrifugiert (8000 U/min, 1 min, RT) und das entstandene Pellet in 150 μ l KLBM-Puffer aufgenommen. Während der anschließenden 30 min Inkubationszeit, wurden die Proben alle 10 min gevortext. Nach der folgenden Zentrifugation (14.000 U/min, 15 min, 4°C) wurde der Überstand mit 150 μ l 2x Lämmli-Puffer gemischt. Die Proben wurden durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. PARP bzw. deren Spaltprodukte wurden mit einem Antikörper dekoriert und auf einem Röntgenfilm mittels Chemolumineszenz detektiert.

2.18.4. Bestimmung der Apoptoserate mittels SubG₁-Technik

Es wurde eine nach Hotz et al. (1994) modifizierte Methode (SubG₁-Technik) angewandt. Dabei wurden über Permeabilisierung der Membran leichtmolekulare DNA-Fragmente extrahiert und die in den fixierten Zellen verbliebene DNA mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Mit Hilfe der durchflußzytometrischen Messung der Fluoreszenz-Intensität der Zellen ist ein Rückschluss auf den DNA-Gehalt möglich. Im DNA-Histogramm bilden apoptotische Zellen vor dem Zellzyklus (G₀/G₁, S, G₂/M) einen Peak mit vermindertem DNA-Gehalt, den sogenannten SubG₁-Peak.

Zu den Makrophagen (ca. 5×10^5) wurde auf einem Vortexer tropfenweise 3,0 ml des -20°C kalten Fixierungspuffers zugegeben und die Proben über Nacht bei 4°C inkubiert. Das Fixans wurde nach Zentrifugation (1000 U/min, 10 min, RT) abgesaugt, die Zellen in 1,0 ml Extraktionspuffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Nach 20 min Inkubation bei RT wurden die Zellen sedimentiert (1000 U/min, 10 min, RT) und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden in je 400 μ l Färbepuffer, 20 μ l Propidiumjodid-Stammlösung (1,0 mg/ml) und 25 μ l RNase-Lösung (10 mg/ml) resuspendiert. Nach 30 min Inkubation im Dunkeln bei RT erfolgte die Messung am FACScan (siehe 2.18.5.).

Von jeweils 10.000 Zellen wurden Vorwärts- und Seitwärts-Streulicht sowie die Rotfluoreszenz (FL3-Area, -Width, -Height) aufgenommen und im DNA-Histogramm (FL3-Height) der Anteil apoptotischer Zellen bestimmt.

2.18.5. Markierung mit Annexin V-PE und 7-AAD

Die Zellen (ca. 1×10^5) wurden einmal mit PBS und einmal mit Annexin V-Bindepuffer gewaschen (1000 U/min, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde in 150 μ l Annexin V-Bindepuffer aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen überführt. Danach wurden die Zellen mit 3 μ l 7-AAD und 3 μ l Annexin V-PE inkubiert (15 min, RT, im Dunkeln). Nach Zugabe von 200 μ l Bindepuffer wurde am FACScan gemessen.

Annexin V-PE bindet an Phosphatidylserin, das während des Zelltodes von der Innen- zur Außenseite der Zellmembran translokalisiert wird. Allerdings färbt Annexin V-PE nicht nur apoptotische sondern auch nekrotische Zellen, deren Plasmamembran permeabilisiert ist und dem Antikörper somit die Bindung an das Phosphatidylserin auf der Innenseite der Plasmamembran erlaubt. Der Farbstoff 7-AAD färbt die DNA aller permeablen Zellen. Deshalb ist eine Doppelfärbung zu empfehlen, um früh apoptotische (AnnexinV-PE-positiv, 7-AAD-negativ) von spät apoptotischen und nekrotischen Zellen (Annexin V-PE-positiv, 7-AAD-positiv) zu unterscheiden.

Von 5000 Zellen wurden logarithmisch die Orange- und Rotfluoreszenz (FL2-Height, FL3-Height, kompensiert) aufgenommen und im Dot Plot der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen bestimmt.

2.18.6. Auswertung am FACScan

Die Proben wurden an einem FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) gemessen und mit Hilfe der Software Cellquest ausgewertet. Zum Gerätesystem gehört ein 15 mW Argon-Ionenlaser, der die Proben mit 488 nM anregt.

Abhängig von der angewandten Methode wurden folgende Parameter aufgenommen:

Vorwärts-Streulicht (FSC), Seitwärts-Streulicht (SSC), Fluoreszenz FL2 (orange, BP 585/42 nm) und Fluoreszenz FL3 (rot, LP 650 nm), wobei jeweils die Signalhöhe (z. B. FSC-Height) bestimmt wurde. Bei der SubG₁-Technik wurde zusätzlich das Signalintegral (FL3-Area) und die Signalbreite (FL3-Width) analysiert, um in der zweiparametrischen Darstellung (Dot Plot) Zellaggregate auszuschließen und die korrekte DNA-Menge zu bestimmen.

3. Ergebnisse

3.1. *Zugänglichkeit Bakterien-enthaltender Kompartimente für endozytiertes Ovalbumin Texas Red (OvTR)*

Um die Interaktion von Afipien-enthaltenden Kompartimenten mit dem endozytischen System untersuchen zu können, wurde am Fluoreszenzmikroskop die Kolo-kalisierung von *Afipia felis* mit dem endozytisch aufgenommenen Farbstoff Ovalbumin Texas Red (OvTR) bestimmt. Als Positivkontrolle dienten die Bakterien *Listeria innocua* und *Bordetella pertussis* sowie Zymosan, da schon mehrfach gezeigt werden konnte, dass die Reifung der Phagosomen normal verläuft, die den Gram-negativen Keim *B. pertussis* [Schneider et al. 2000] oder den Gram-positiven Keim *L. innocua* [Schwan et al. 1994] enthalten. Zymosan wird schon seit langem verwendet, um die ungestörte Phagosomenreifung zu untersuchen [Oh und Straubinger 1996]. Es wurden zwei verschiedene Fragestellungen und somit Versuchsanordnungen gewählt. (1) Gelangen die Bakterien in ein Lysosom und (2) steht das Bakterien-enthaltende Kompartiment mit irgendeinem endozytischen Kompartiment in Verbindung?

Um die erste Frage zu klären, wurden J774E-Makrophagen über Nacht mit OvTR inkubiert, so dass alle Kompartimente, die zum endozytischen System gehören, mit diesem Farbstoff markiert waren. Danach wurden die Zellen gewaschen und für weitere 2 h mit Medium ohne OvTR inkubiert. Dadurch gelangt solches OvTR, welches sich noch in den frühen endozytischen Kompartimenten befindet, in die späten Kompartimente (späte Endosomen oder Lysosomen). Anschließend wurden die Zellen für 1 h mit den zuvor mit NHS-CF markierten Bakterien bzw. Zymosan infiziert. Durch Waschen wurden die nicht phagozytierten Bakterien bzw. Zymosan entfernt. Danach wurden die Makrophagen für weitere 2 h inkubiert. Dies erlaubt normalerweise Bakterien-enthaltenden Kompartimenten zu einem Phagolysosom zu reifen. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (siehe 2.10.4.). Dabei wurde der prozentuale Anteil der Bakterien und Zymosan bestimmt, der mit dem Farbstoff kolo-kalisiert. Wie A. Schüttfort (dieses Labor) zeigen konnte, ist OvTR bei dieser Versuchsanordnung ein Marker für Lysosomen [Schüttfort 2000]. Der Prozentsatz der Kolo-kalisierung ist somit gleich zu setzen mit dem Anteil der zu Phagolysosomen gereiften Phagosomen. Es zeigte sich, wie aus Abb. 1A zu entnehmen ist,

dass nur 27% der Afipien-enthaltenden Phagosomen positiv für OvTR waren, d.h. zu Phagolysosomen gereift waren. Im Vergleich dazu waren die Phagosomen, die *L. innocua*, *B. pertussis* oder Zymosan enthielten, zu 80-90% zu Phagolysosomen gereift.

Um die Frage zu klären, ob das Bakterium-enthaltende Kompartiment mit anderen endozytischen Kompartimenten in Kontakt steht, wurden J774E-Makrophagen mit vorher markierten Bakterien/Zymosan infiziert. Nach 1 h wurden die nicht phagozytierten Bakterien durch Waschen entfernt und die Zellen für weitere 16 h inkubiert. Dies erlaubt den Bakterien-enthaltenden Kompartimenten zu reifen. Danach wurden die Zellen 3 h mit OvTR inkubiert und anschließend fixiert. Auf diese Weise erfolgte die Markierung des gesamten endozytischen Systems mit OvTR. Am Fluoreszenzmikroskop (siehe 2.10.4.) wurde der prozentuale Anteil der Bakterien/Zymosan bestimmt, der mit dem Farbstoff kolokalisiert. Da Fusion zum größten Teil zwischen Phagosomen und endozytischen Vesikeln des selben Reifestadiums geschieht, sollten alle Phagosomen, die mit endozytischen Vesikeln fusionierten, mit OvTR gefärbt sein. Der Prozentsatz der Kolokalisierung gibt somit den Anteil der Bakterien-enthaltenden Phagosomen an, die innerhalb der dreistündigen Inkubationszeit mit endozytischen Vesikeln fusionierten. Wie in Abb. 1B dargestellt, waren nur 24% der *A. felis*-enthaltenden Phagosomen positiv für OvTR, wohingegen 70-90% der Kontrollpartikel mit dem Farbstoff kolokalisierten. Dies zeigt deutlich, dass *A. felis*-enthaltende Phagosomen nicht für endozytisch aufgenommenes OvTR zugänglich sind. Im Gegensatz dazu sind *L. innocua*-, *B. pertussis*- oder Zymosan-enthaltende Phagosomen für diesen endozytisch aufgenommenen Farbstoff zugänglich. Der größte Teil der Afipien befindet sich somit in einem Kompartiment, welches nicht oder nur in sehr geringem Umfang mit dem endozytischen System in Kontakt steht.

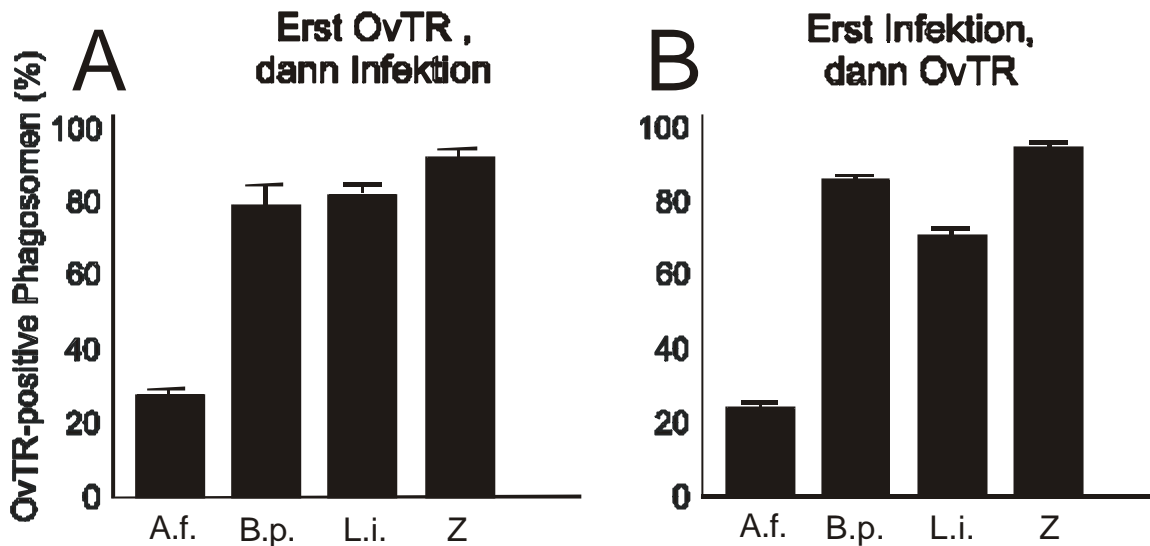


Fig. 1: Die Mehrzahl der Afipien-enhaltenden Phagosomen sind nicht zugänglich für OvTR

(A) Zuerst wurden die Lysosomen der J774E-Makrophagen mit OvTR gefärbt. Danach wurden die Zellen für 1 h mit *A. felis* (A.f.), *L. innocua* (L.i.), *B. pertussis* (B.p.) oder Zymosan (Z) infiziert. Anschließend wurden die Makrophagen für weitere 2 h ohne Bakterien/Zymosan inkubiert. Am Fluoreszenzmikroskop wurde der Anteil der Bakterien bestimmt, die mit dem roten Farbstoff OvTR kolokalisieren. Dargestellt sind die Daten aus 3 Experimenten mit > 110 gezählten Phagosomen je Ansatz.

(B) Nach der Infektion der J774E-Makrophagen mit den oben beschriebenen Bakterien für 16 h wurde das gesamte endozytische System für 3 h mit OvTR angefärbt. Die Auswertung erfolgte wie in (A) mit > 45 gezählten Phagosomen je Ansatz mit insgesamt 3 Experimenten.

3.2. Einfluss der Vitalität und Opsonisierung der Afipien auf die Phagosomenreifung

A. Schüttfort (dieses Labor) konnte mit der OvTR-Methode zeigen, dass das vorherige opsonisieren und töten der Afipien einen entscheidenden Einfluss auf die Phagosomenreifung hat [Schüttfort 2000]. Die Phagosomen, die getötete oder mit Antikörpern opsonisierte Afipien enthielten, reiften demnach zum größten Teil zu einem Phagolysosom. Diese Ergebnisse sollten mit einer anderen Methode (Immunfluoreszenz) verifiziert oder widerlegt werden. Dabei wurde das wirtsspezifische Markerprotein LAMP-1, das auf Membranen von späten Endosomen und Lysosomen vorkommt, mit Antikörpern detektiert und die Kolokalisierung dieses Proteins mit *A. felis* ausgewertet. Die vorher mit NHS-TR markierten Afipien wurden entweder unbehandelt belassen oder mit Paraformaldehyd (PFA) getötet. Je ein Teil der lebenden und PFA-fixierten Afipien wurde mit einem monoklonalen Antikörper opsonisiert. Die auf Deckgläschen adhärenen J774E-Makrophagen wurden mit den so vorbehandelten Afipien für 2 h infiziert. Danach wurden

die Zellen fixiert und mit dem Antikörper gegen späte Endosomen/Lysosomen (LAMP-1) inkubiert. Anschließend wurde am konfokalen Lasermikroskop der Anteil an Afipien bestimmt, die mit einem Ring des zellulären Markers umgeben waren. Wie in Abb. 2 zu sehen ist, kolokalisieren nur 26% der nicht vorbehandelten Afipien (A.f.) mit LAMP-1. Hingegen kolokalisieren 59% der opsonisierten Afipien (A.f. ops), 62% der PFA-fixierten Afipien (A.f. PFA) und 62% der PFA-fixierten und danach opsonisierten Afipien (A.f. PFA + ops) mit diesem Marker für späte Endosomen/Lysosomen. Die Abtötung mit PFA, aber auch die Opsonisierung mit Antikörpern führt zu einer drastischen Veränderung der Phagosomenreifung. Die Phagosomen, die diese so vorbehandelten Afipien enthalten, reifen zum größten Teil (59-62%) zu einem Phagolysosom. Im Gegensatz dazu befinden sich nur 26% der unbehandelten Afipien in einem Phagolysosom. Die mit der OvTR-Methode gewonnenen Ergebnisse von A. Schüttfort konnten somit bestätigt und erweitert werden.

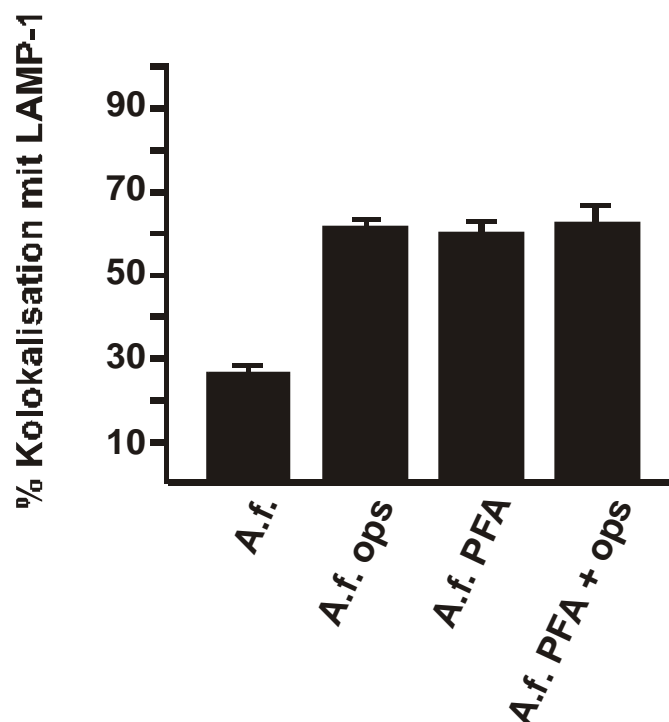


Abb. 2: PFA-Fixierung und Opsonisierung verändern die Kompartimentierung der Afipien

Nach der Infektion der J774E-Makrophagen mit unbehandelten (A.f.), opsonisierten (A.f. ops), PFA-fixierten (A.f. PFA) und PFA-fixierten und opsonisierten Afipien wurden die Makrophagen fixiert. Anschließend wurde LAMP-1 mit einem Antikörper detektiert. Die Auswertung erfolgte am konfokalen Lasermikroskop, wobei der Anteil der Bakterien-enhaltenden Phagosomen bestimmt wurde, die mit einem Ring des zellulären Markers LAMP-1 umgeben sind. Dargestellt sind die Daten aus 3 Experimenten mit > 50 Phagosomen je Ansatz.

3.3. Anwesenheit von zellulären Markern auf Afipien-enthaltenden Phagosomen

Die Ergebnisse, die in 3.1 dargestellt sind, deuten darauf hin, dass die Afipien-enthaltenden Phagosomen nicht zu dem Endosomen-Lysosomen Kontinuum gehören. Um diese These zu untersuchen, wurden J774E-Makrophagen oder primäre humane Monozyten mit vorher markierten Afipien oder Zymosan infiziert. Anschließend wurden einige zelluläre Proteine mit Hilfe von Antikörpern detektiert, die typisch für bestimmte endozytische Vesikel sind. Am konfokalen Lasermikroskop wurde der Anteil Afipien- und Zymosan-enthaltender Phagosomen bestimmt, die mit einem Ring des jeweiligen zellulären Membranmarkers umgeben sind.

3.3.1. Kolokalisierung von zellulären Markern mit Afipien-enthaltenden Phagosomen in J774E-Makrophagen

Die J774E-Makrophagen wurden für 2 h mit vorher markierten *Afipia felis* oder Zymosan infiziert. Danach wurden die Zellen fixiert und mit Antikörpern gegen EEA1 (frühe Endosomen), LAMP-1 (späte Endosomen/Lysosomen) und LAMP-2 (späte Endosomen/Lysosomen) inkubiert. Anschließend wurde am konfokalen Lasermikroskop der prozentuale Anteil der Kolokalisierung von Afipien bzw. Zymosan mit den zellulären Markern bestimmt. Wie aus Tab. 1A hervorgeht, sind nur 26-29% der Afipien-enthaltenden Phagosomen in J774E-Makrophagen positiv für die spät endosomalen/lysosomalen Markerproteine LAMP-1 und LAMP-2. Dagegen sind 90% der Zymosan-enthaltenden Phagosomen positiv für LAMP-1. Weder Afipien- noch Zymosan-enthaltende Phagosomen akkumulieren das früh endosomale Markerprotein EEA1 nach einer zweistündigen Infektionszeit. In Abbildung 3 ist je eine repräsentative Overlay-Aufnahme dargestellt. Die Afipien bzw. das Zymosan sind rot während die beiden Markerproteine (EEA1 und LAMP-1) grün markiert sind. Die Bilder belegen die in Tab. 1A dargestellten Ergebnisse, in der mehrere Experimente detailliert dargestellt sind, auch um die sehr gute Reproduzierbarkeit dieses Versuches zu belegen.

Tab. 1A: Anteil bestimmter Proteine auf Afipien- und Zymosan-enthaltenden Phagosomen in J774E-Makrophagen

J774E-Makrophagen wurden für 2 h infiziert. Danach wurden die jeweiligen zellulären Proteine mit einem Antikörper markiert. Ausgewertet wurde am konfokalen Lasermikroskop, wobei der prozentuale Anteil der Afipien- und Zymosan-enthaltenden Phagosomen bestimmt wurde, die mit einem Ring des jeweiligen zellulären Markers umgeben sind. Angegeben ist jeweils der Prozentsatz der Kolkalisierung aus 3 bzw. 4 Experimenten. In Klammern sind die jeweils gezählten Phagosomen angegeben.

<i>Afipia felis</i>			Zymosan	
EEA1	LAMP-1	LAMP-2	EEA1	LAMP-1
4% (51)	24% (51)	24% (50)	2% (55)	91% (55)
2% (57)	25% (51)	33% (55)	3% (58)	94% (62)
4% (51)	27% (49)	30% (53)	4% (48)	78% (50)
3% ± 1%	25% ± 1%	29% ± 4%	3% ± 1%	88% ± 7%

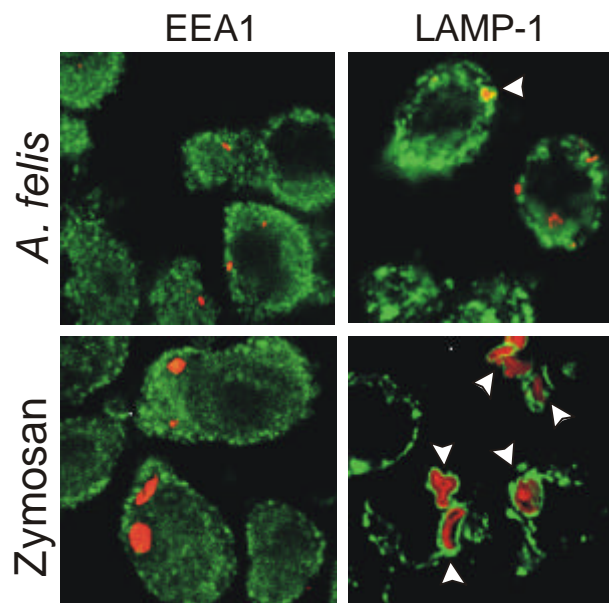


Abb. 3: Die meisten Afipien-enthaltenden Phagosomen kolokalisieren nicht mit endozytischen Markerproteinen

J774E-Makrophagen wurden mit vorher rot (NHS-TR) gefärbten Afipien bzw. Zymosan für 2 h infiziert. Danach wurden die jeweiligen zellulären Proteine (EEA1 und LAMP-1) mit einem Antikörper dekoriert, der mit einem grün markierten zweiten Antikörper detektiert wurde. Die Overlay-Aufnahmen wurden am konfokalen Lasermikroskop erstellt. Es ist je ein exemplarisches Beispiel dargestellt. Mit Pfeilspitzen ist die Akkumulierung des zellulären Markers hervorgehoben.

3.3.2. Kolokalisierung von zellulären Markern mit Afipien-enthaltenden Phagosomen in humanen Monozyten

Die primären humanen Monozyten wurden für 2 h mit vorher fluoreszenzmarkierten *Afipia felis* oder Zymosan infiziert. Danach wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen EEA1 (frühe Endosomen) und LAMP-1 (späte Endosomen/Lysosomen) inkubiert. Anschließend wurde am konfokalen Lasermikroskop der prozentuale Anteil der Kolokalisierung von Afipien bzw. Zymosan mit den zellulären Markern bestimmt. Wie aus Tab. 1B hervorgeht, sind nur 30% der Afipien-enthaltenden Phagosomen in humanen Monozyten positiv für das spät endosomale/lysosomale Markerprotein LAMP-1. Dagegen sind 95% der Zymosan-enthaltenden Phagosomen positiv für LAMP-1. Ebenso wie in J774E-Makrophagen akkumulieren in humanen Monozyten weder Afipien- noch Zymosan-enthaltende Phagosomen nach einer zweistündigen Infektionszeit das früh endosomale Markerprotein EEA1. Deshalb ist davon auszugehen, dass sich die Afipien bei einer etablierten Infektion weder in einem spät endosomalen noch in einem früh endosomalen Kompartiment befinden. Dies gilt wahrscheinlich Spezies übergreifend, da es sowohl für eine Mausmakrophagen-Zelllinie als auch für primäre humane Monozyten gezeigt werden konnte (siehe Tab. 1A und 1B). K. Streker (dieses Labor) konnte die ungewöhnliche Kompartimentierung der Afipien in J774E in weiteren Immunfluoreszenz-Experimenten mit Antikörpern gegen andere zelluläre Proteine bestätigen [Lührmann et al. 2001].

Tab. 1B: Anteil bestimmter Proteine auf Afipien- und Zymosan-enthaltenden Phagosomen in humanen Monozyten

Humane Monozyten wurden für 2 h infiziert. Danach wurden die jeweiligen zellulären Proteine mit einem Antikörper markiert. Ausgewertet wurden 3 Experimente am konfokalen Lasermikroskop, wobei der prozentuale Anteil der *Afipia felis*- und Zymosan-enthaltenden Phagosomen bestimmt wurde, die mit einem Ring des jeweiligen zellulären Markers umgeben waren. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen sowie in Klammern die Anzahl der jeweils gezählten Phagosomen.

<i>Afipia felis</i>		Zymosan	
EEA1	LAMP-1	EEA1	LAMP-1
2% (53)	28% (103)	0% (50)	96% (106)
6% (51)	29% (51)	4% (53)	94% (53)
2% (53)	32% (50)	5% (57)	94% (52)
3% ± 2%	30% ± 2%	3% ± 2%	95% ± 1%

3.4. Kinetik der Akquirierung von frühen und späten endosomalen Proteinen

Etwa 70% der etablierten Afipien-enthaltenden Phagosomen in J774E-Makrophagen zeigen, wie Tab. 1A und den von K. Streker (dieses Labor) erhobenen Daten [Lührmann et al. 2001] zu entnehmen ist, keine Charakteristika eines Kompartimentes, dass zum endozytischen System gehört. Deshalb sollte überprüft werden, ob dieses ungewöhnliche Kompartiment schon direkt nach der Phagozytose existiert, oder ob es erst durch die Manipulation eines normalen frühen Phagosoms durch die Afipien gebildet wird. Zur Klärung dieser Frage wurden Afipien/Zymosan im Kalten sehr sanft auf die J774E-Makrophagen zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Mediums wurde 37°C warmes Medium zugegeben. Der Zeitpunkt der Zugabe wurde als Nullpunkt definiert. Durch diese Vorgehensweise wird die Aufnahme der Partikel synchronisiert. Nach einer Inkubationszeit von 5-120 min wurde entweder das früh endosomale Markerprotein EEA1 oder das spät endosomale/lysosomale Markerprotein LAMP-1 mit Hilfe von Antikörpern markiert. Am konfokalen Lasermikroskop erfolgte die Bestimmung des Anteils der *Afipia felis*- und Zymosan-enthaltenden Phagosomen, die mit einem Ring des jeweiligen zellulären Markers umgeben waren. Zur Veranschaulichung ist je ein Beispiel für die Kolokalisierung der Afipien bzw. des Zymosans mit EEA1 zum Zeitpunkt 10 min in Abb. 4 dargestellt. Wie aus der Grafik hervorgeht, ist die Aufnahme der Afipien im Vergleich zu Zymosan verzögert. Dieses wurde auch

von anderen Mitarbeitern dieses Labors beobachtet (A. Schüttfort und N. Mauder, nicht veröffentlicht). So werden die meisten Zymosanpartikel in den ersten 5 min aufgenommen, wohingegen die Aufnahme der Afipien erst nach 5-10 min beginnt und nach 20 min abgeschlossen ist. EEA1, ein Marker für frühe Endosomen, ist sehr häufig auf frühen Zymosan-enthaltenden Phagosomen zu finden und mit einiger Verzögerung, bedingt durch die verzögerte Aufnahme, auch auf einer Subpopulation der *Afipia felis*-enthaltenden Phagosomen. Nachdem alle Partikel aufgenommen wurden (bei Zymosan nach 5 min und bei *Afipia felis* nach 20 min) ist die jeweilige Summe der Kolo-kalisierung der beiden Marker EEA1 und LAMP-1 auf Afipien- oder Zymosan-enthaltenden Phagosomen nahezu konstant (Abb. 4). Bei den *Afipia felis*-enthaltenden Phagosomen beträgt die Summe 30% und bei den Zymosan-enthaltenden Phagosomen 100%. Da EEA1 und LAMP-1 nicht gleichzeitig auf ein und demselben endozytischen Kompartiment vorkommen [Steele-Mortimer et al. 1999], gibt die Summe der kolo-kalisierenden Phagosomen jeweils die Gesamtzahl der Phagosomen an, die zum endozytischen System gehören. Bei Zymosan sind zu Beginn der Infektion fast alle Zymosan-enthaltenden Phagosomen positiv für EEA1 und damit in frühen Endosomen. Im Laufe der Infektion reifen diese frühen Endosomen zu späten Endosomen/Lysosomen und sind dann zu fast 100% positiv für LAMP-1. Bei einer Infektion mit *Afipia felis* ist nur eine Subpopulation der Afipien-enthaltenden Phagosomen positiv für EEA1 und damit in frühen Endosomen. Im Laufe der Infektion reift diese Subpopulation zu späten Endosomen und ist dann positiv für LAMP-1. Nur 30% der Afipien befinden sich zu allen getesteten Zeitpunkten (5-120 min) in einem Kompartiment, das zum endozytischen System gehört. Dementsprechend befinden sich innerhalb der untersuchten Infektionsdauer circa 70% der Afipien in einem Kompartiment, das nicht zum endosomal-lysosomal-Kontinuum gehört. Dies stimmt sehr gut mit den gezeigten Daten in Abb. 1 und Tab. 1A überein, durch die ebenfalls gezeigt wird, dass nur circa 30% der Afipien nach einer zweistündiger Infektionsdauer in einem endozytischen Kompartiment sind.

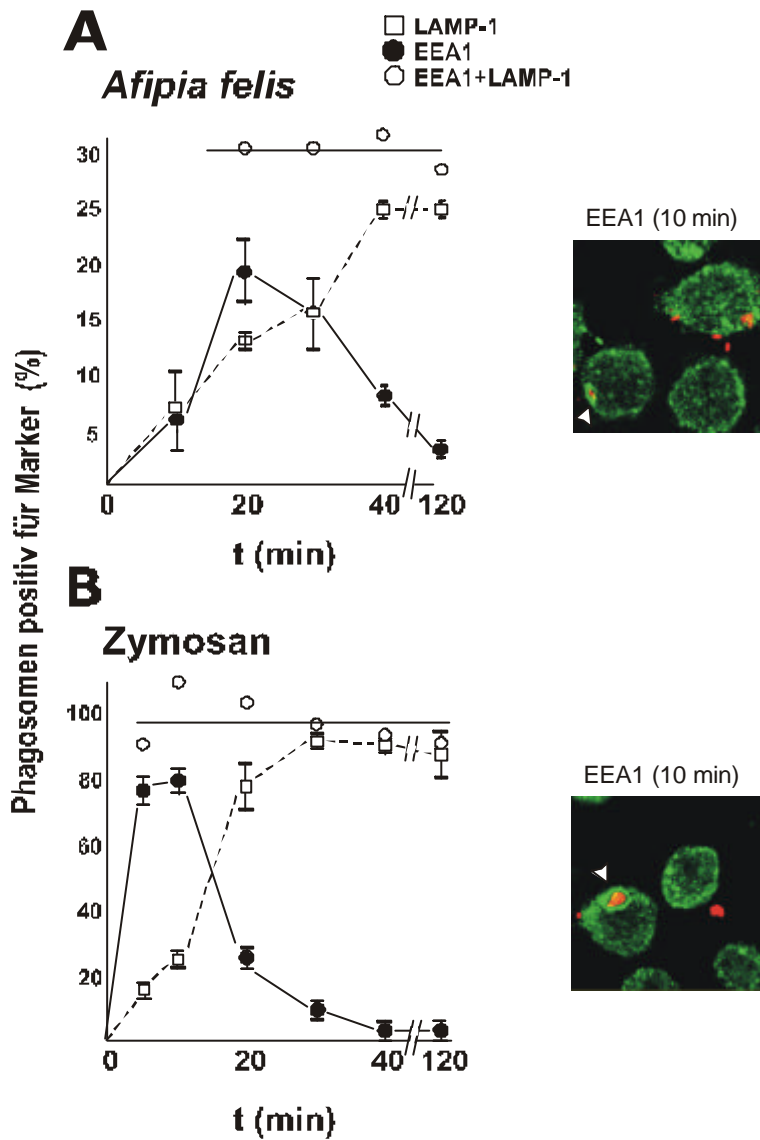


Abb. 4: Nur ein Teil der Afipien befinden sich in einem endozytischen Kompartiment

J774E-Makrophagen wurden für 5-120 min mit *Afipia felis* oder Zymosan infiziert. Danach wurden die zellulären Markerproteine EEA1 (frühe Endosomen) und LAMP-1 (späte Endosomen/Lysosmen) mittels Antikörper detektiert. Die Auswertung erfolgte am konfokalen Lasermikroskop. Dabei wurde der Anteil der Afipien- und Zymosan-enthaltenden Phagosomen bestimmt, die mit einem Ring des jeweiligen zellulären Markers umgeben waren. In den rechts von den jeweiligen Grafen gezeigten Immunfluoreszenzen zeigen die Pfeilspitzen auf Ringe des zellulären Markers EEA1. Dargestellt sind die Daten aus 3 Experimenten mit > 50 gezählten Phagosomen pro Zeitpunkt und Probe. Für jeden getesteten Zeitpunkt sind die prozentualen Anteile der Kolokalisierung der Phagosomen mit EEA1 und LAMP-1 (Abb. 4) sowie der prozentuale Anteil der Phagosomen angegeben, die zum endozytischen System gehören.

3.5. Phagosomenisolierung

Um genauer untersuchen zu können, in welchem Kompartiment sich die Afipien innerhalb des Makrophagen befinden, wurde eine Methode zur Isolierung von Bakterien-enthaltenden Phagosomen etabliert. Mit den isolierten Bakterien-enthaltenden Phagosomen sollte es ermöglicht

werden, weitere Marker subzellulärer Kompartimente zu testen und zukünftig über eine Gesamtproteinanalyse sagen zu können, welche Proteine typisch für ein *Afipia felis*-enthaltendes Phagosom sind.

3.5.1. Die Methode

Mit Hilfe der unter 2.11. beschriebenen Methode wurden *Afipia felis*-, *Listeria innocua*- und *Bordetella pertussis*- enthaltende Phagosomen isoliert. Die beiden Bakterien *Listeria innocua* und *Bordetella pertussis* dienten als Positivkontrolle. Phagosomen, die diese Bakterien enthalten, reifen zu Phagolysosomen (siehe oben).

Die J774-Makrophagen wurden für 1 h mit *Afipia felis* oder *Listeria innocua* oder *Bordetella pertussis* infiziert. Danach wurden die nicht phagozytierten Bakterien entfernt und die Zellen für weitere 2 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Isolierung der Phagosomen. Abb. 5 veranschaulicht die in 2.11. beschriebene Methode.

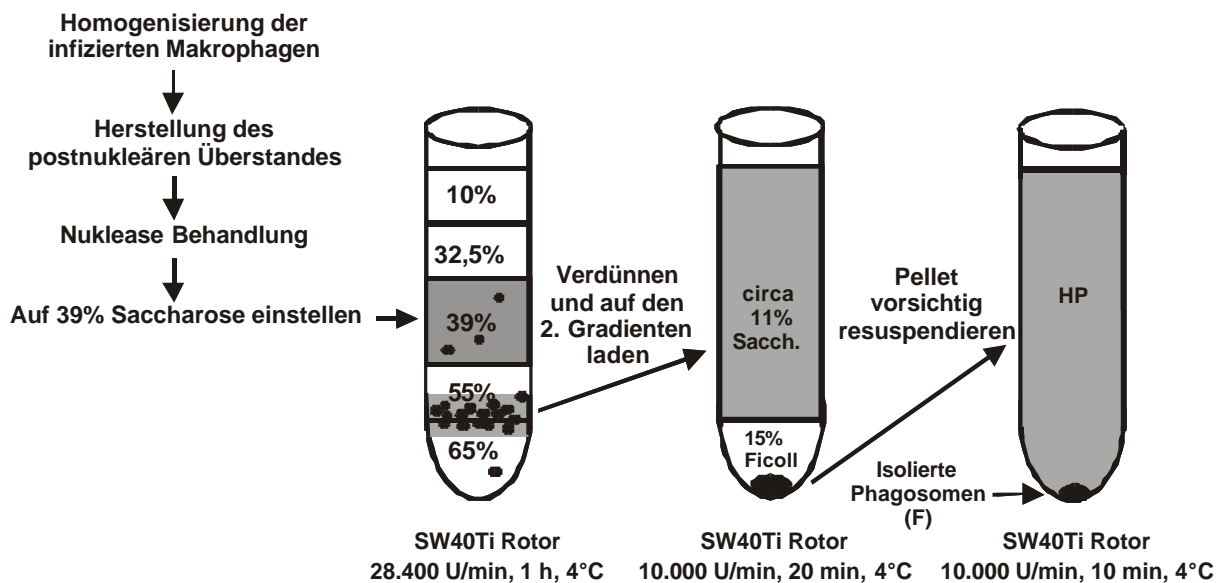


Abb. 5: Schematische Darstellung der Phagosomenisolierung

Die J774-Makrophagen wurden in Gegenwart von Protease-Inhibitoren homogenisiert. Danach wurde der postnukleäre Überstand (PNS) hergestellt und nach der Nuklease-Behandlung auf 39% Saccharose eingestellt. Anschließend wurde der PNS in einem diskontinuierlichen Saccharosegradienten zentrifugiert (28.400 U/min, 1 h, 4°C). Die phagosomale Fraktion (8-10) wurde auf circa 11% Saccharose eingestellt, auf 15% Ficoll geladen und zentrifugiert (10.000 U/min, 20 min, 4°C). Das Pellet wurde in Homogenisierungspuffer (HP) aufgenommen und nochmals zentrifugiert (10.000 U/min, 10 min, 4°C). Das resultierende Pellet (F), welches die Phagosomen enthält, wurde in HP aufgenommen und für weitere Untersuchungen bei -80°C gelagert.

3.5.2. Analyse der Phagosomenfraktionen

Um die Reinheit der angereicherten Phagosomen und damit die Effizienz der hier angewendeten Phagosomenisolierung bestimmen zu können, wurde die Ausbeute an Phagosomen sowie die Kontamination mit anderen endozytischen Kompartimenten analysiert. Besonders bei Bakterien-enthaltenden Phagosomen, die nicht zum endozytischen System gehören, führt schon eine geringe Kontamination mit endozytischen Vesikeln zu einer drastischen Fehlinterpretation der genauen Kompartimentierung des Bakteriums. Da nach den Ergebnissen aus Abb. 1-4 und Tab. 1A und 1B davon auszugehen ist, dass die Afipien-enthaltenden Phagosomen nicht zum endozytischen System gehören, sollte gerade auf diesen Punkt bei der Etablierung einer Methode zur Phagosomenreifung geachtet werden. Deshalb wurden die Fraktionen 1-10, das Pellet (siehe Abb. 6) und das Endprodukt F (siehe Abb. 5) auf Proteinkonzentration, lysosomale Aktivität, Gehalt an frühen Endosomen und Anzahl an Bakterien (Ausbeute) untersucht. Für die Analysen wurden nicht infizierte sowie mit *A. felis* bzw. mit *L. innocua* infizierte J774E-Makrophagen verwendet. Als Positivkontrolle fand *L. innocua* Verwendung, da Phagosomen, die dieses Bakterium enthalten, zu Phagolysosomen reifen. Die aus den nicht infizierten Makrophagen isolierten Vesikel, die im folgenden als Pseudophagosomen bezeichnet werden, dienten als Kontrolle. Die Pseudophagosomen geben an, welches nicht phagosomale Material bei dieser Methode mitisoliert wird und sind somit ein Anhaltspunkt für die Reinheit der Präparation.

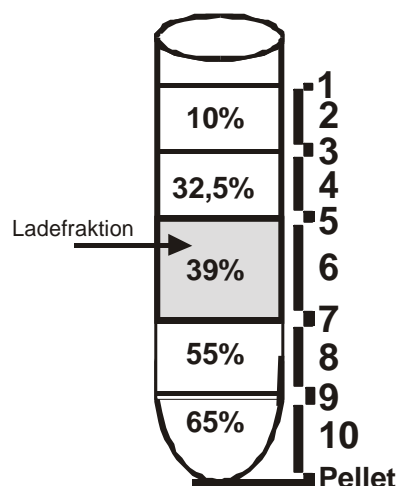


Abb. 6:Schematische Darstellung der Fraktionsnummern

Die Fraktionen wurden nach dem diskontinuierlichen Saccharosegradienten abgenommen und für weitere Analysen verwendet. Die Fraktionsnummern werden so auch in Tabelle 2 verwendet.

3.5.2.1. Bestimmung der Proteinkonzentration in den einzelnen Fraktionen

Von den nicht infizierten, mit *A. felis* bzw. mit *L. innocua* infizierten J774E-Makrophagen wurden Phagosomen mit der in Abb. 5 dargestellten Methode isoliert. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden von den einzelnen Fraktionen (1-10, Pellet, F) Aliquots mit 2% Triton X-100 inkubiert (30 min, 4°C). Nach der anschließenden Zentrifugation (15.000 U/min, 5 min, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und die Proteinkonzentration mittels des BioRad DC Protein Assays bestimmt. Die Angabe des Proteingehalts in den einzelnen Fraktionen erfolgte in Prozent vom Startmaterial (PNS). Wie der Tab. 2 zu entnehmen ist die Verteilung der Proteinkonzentrationen über die Fraktionen bei allen drei Proben gleich. Daran ist unter anderem die Reproduzierbarkeit dieser Methode abzulesen. Der größte Teil der Proteine befindet sich in der Fraktion 6 (Ladefraktion). Nur 45% befinden sich in den Fraktionen 8-10, die auf den zweiten Gradienten geladen und aus denen die Phagosomen gereinigt wurden.

Tab. 2: Proteinkonzentration in den einzelnen Fraktionen der Phagosomenisolierung

Die Pseudophagosomen und die *Afipia felis*- bzw. *Listeria innocua*- enthaltenden Phagosomen wurden mit Triton X-100 inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation wurde im Überstand der Proben die Proteinkonzentration mittels BioRad DC Protein Assays bestimmt. Für jede Fraktion der getesteten Proben wurde der Proteingehalt in Prozent vom Startmaterial (PNS) angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von Daten aus 3 Experimenten.

Fraktionen	Proteine		
	nicht infiziert	<i>Afipia felis</i>	<i>Listeria innocua</i>
1	0,39 +/- 0,16	0,41 +/- 0,12	0,37 +/- 0,02
2	0,86 +/- 0,20	0,69 +/- 0,36	0,70 +/- 0,25
3	1,14 +/- 0,12	0,99 +/- 0,19	1,15 +/- 0,37
4	2,30 +/- 0,31	2,09 +/- 0,13	1,46 +/- 0,28
5	10,71 +/- 2,96	11,74 +/- 3,65	10,14 +/- 2,09
6 (Ladefr.)	61,81 +/- 4,66	62,50 +/- 3,16	65,26 +/- 1,55
7	17,35 +/- 1,55	15,43 +/- 1,44	14,53 +/- 1,70
8	1,58 +/- 0,59	2,28 +/- 0,51	1,80 +/- 0,34
9	1,10 +/- 0,49	1,25 +/- 0,27	1,37 +/- 0,25
10	1,48 +/- 0,59	1,11 +/- 0,34	1,91 +/- 0,22
Pellet	1,28 +/- 0,03	1,51 +/- 0,72	1,32 +/- 0,19
8 - 10	4,17 +/- 1,49	4,64 +/- 0,91	5,08 +/- 0,50
F	0,32 +/- 0,05	0,34 +/- 0,15	0,45 +/- 0,10

3.5.2.2. Bestimmung des Anteiles an frühen Endosomen in den einzelnen Fraktionen

Die nicht infizierten, mit *A. felis* bzw. mit *L. innocua* infizierten J774E-Makrophagen wurden für 10 min bei 4°C und für 4 min bei 37°C mit PBS/HRP inkubiert. Dadurch erfolgte die Markierung der frühen Endosomen mit HRP. Anschließend wurden die Phagosomen mit der in Abb. 5 dargestellten Methode isoliert. In den einzelnen Fraktionen (1-10, Pellet, F) wurden die HRP-Enzymaktivitäten bestimmt. Angegeben sind die HRP-Aktivitäten der einzelnen Fraktionen in Prozent vom Startmaterial (PNS). Die HRP-Aktivität definiert die frühen Endosomen. Wie aus Tab. 3 hervorgeht, ist die Verteilung der HRP-Aktivitäten und damit der frühen Endosomen über die Fraktionen bei den dargestellten Proben gleich.

Tab. 3: Anteil an frühen Endosomen in den einzelnen Fraktionen der Phagosomenisolierung

Aliquots von den Pseudophagosomen und von den *A. felis*- bzw. *L. innocua*-enthaltenden Phagosomen wurden mit der HRP-Reaktionslösung inkubiert. Nach dem Stoppen der Enzymreaktion erfolgte die Bestimmung der Extinktion am ELISA-Reader. Für jede Fraktion der getesteten Proben wurde die HRP-Aktivität in Prozent vom Startmaterial (PNS) angegeben. Die HRP-Aktivität definiert bei dieser Versuchsanordnung frühe Endosomen. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von Daten aus 3 Experimenten.

Fraktionen	frühe Endosomen		
	nicht infiziert	<i>Afipia felis</i>	<i>Listeria innocua</i>
1	0,06 +/- 0,06	0,07 +/- 0,05	0,03 +/- 0,02
2	0,30 +/- 0,04	0,20 +/- 0,15	0,19 +/- 0,11
3	5,40 +/- 1,62	4,21 +/- 0,90	5,04 +/- 2,81
4	8,02 +/- 3,31	6,68 +/- 0,85	4,44 +/- 0,41
5	15,26 +/- 2,64	16,56 +/- 3,35	15,88 +/- 4,37
6 (Ladefr.)	55,68 +/- 7,42	57,41 +/- 2,43	57,71 +/- 6,21
7	11,81 +/- 0,28	10,72 +/- 0,81	9,96 +/- 1,24
8	0,84 +/- 0,23	1,53 +/- 0,35	1,18 +/- 0,22
9	0,53 +/- 0,30	0,72 +/- 0,22	0,85 +/- 0,17
10	1,05 +/- 0,17	0,95 +/- 0,18	1,08 +/- 0,13
Pellet	1,03 +/- 0,08	0,94 +/- 0,17	1,02 +/- 0,05
8 - 10	2,43 +/- 0,47	3,20 +/- 0,55	2,96 +/- 0,30
F	0,13 +/- 0,07	0,21 +/- 0,13	0,20 +/- 0,02

3.5.2.3. Bestimmung der lysosomalen Enzymaktivität in den einzelnen Fraktionen

Von den nicht infizierten, mit *Afipia felis* bzw. mit *Listeria innocua* infizierten J774E-Makrophagen wurden Phagosomen isoliert. Die saure β -Galaktosidase-Enzymaktivitäten wurde in allen Fraktionen bestimmt. Angegeben sind die β -Galaktosidase-Aktivitäten der einzelnen Fraktionen in Prozent vom Startmaterial (PNS). Die Aktivität wurde in Units (U= Extinktion bei 405 nm/mg Protein/h) bestimmt. Aus Tab.4 ist zu entnehmen, dass es in den Fraktionen 8-10 und F deutliche Unterschiede zwischen den Proben gibt, obwohl in den gleichen Fraktionen die Proteinkonzentration (Tab. 2) sowie die HRP-Aktivität und damit der Anteil an frühen Endosomen (Tab. 3) gleich waren. Besonders deutlich ist der Unterschied in der Fraktion F zwischen den Pseudophagosomen und den *L. innocua*-enthaltenden Phagosomen. So ist die lysosomale Aktivität der *Listeria innocua*-enthaltenden Phagosomen circa 4,5x so hoch wie die der Pseudophagosomen. Dies verdeutlicht die Anreicherung von Phago(lyso)somen in den Fraktionen 8-10 und besonders in F.

Tab. 4: Lysosomale Enzymaktivität in den einzelnen Fraktionen der Phagosomenisolierung

Aliquots von Pseudophagosomen und von *Afipia felis*- bzw. *Listeria innocua*-enthaltenden Phagosomen wurden mit der β -Galaktosidase-Reaktionslösung inkubiert. Nach Stoppen der Enzymreaktion wurde die Extinktion am ELISA-Reader bestimmt. Für jede Fraktion der getesteten Proben wurde die β -Galaktosidase-Aktivität in Prozent vom PNS angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von Daten aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

Fraktionen	Lysosomen		
	nicht infiziert	<i>Afipia felis</i>	<i>Listeria innocua</i>
1	0,09 +/- 0,02	0,18 +/- 0,06	0,09 +/- 0,07
2	1,79 +/- 1,06	1,38 +/- 0,86	0,71 +/- 0,31
3	21,52 +/- 10,10	20,76 +/- 11,38	17,79 +/- 9,77
4	14,18 +/- 2,36	11,05 +/- 2,54	7,71 +/- 1,79
5	18,50 +/- 2,29	19,28 +/- 0,60	15,94 +/- 2,18
6 (Ladefr.)	27,56 +/- 7,12	27,97 +/- 7,74	31,12 +/- 7,57
7	12,90 +/- 3,48	15,01 +/- 5,36	18,20 +/- 4,33
8	0,91 +/- 0,38	1,63 +/- 0,72	2,40 +/- 0,98
9	0,68 +/- 0,43	1,02 +/- 0,55	2,60 +/- 1,32
10	1,07 +/- 0,30	0,97 +/- 0,30	2,15 +/- 0,48
Pellet	0,80 +/- 0,06	0,77 +/- 0,21	1,29 +/- 0,30
8 - 10	2,66 +/- 1,10	3,62 +/- 1,51	7,15 +/- 2,78
F	0,19 +/- 0,11	0,42 +/- 0,22	0,89 +/- 0,31

3.5.2.4. Bestimmung der Bakterienzahl in den einzelnen Fraktionen

Von den mit *Afipia felis* bzw. mit *Listeria innocua* infizierten J774E-Makrophagen wurden Phagosomen mit der in Abb. 5 dargestellten Methode isoliert. Zur Bestimmung der Bakterienzellzahl wurden von den einzelnen Fraktionen (1-10 und F) Verdünnungsreihen hergestellt und auf Agar-Platten ausplattiert. Diese Vorgehensweise ist möglich, da die Lebendzellzahlen der intrazellulären Bakterien 2-3 h nach der Aufnahme in die Phagosomen konstant sind. Nach 1-4 Tagen (abhängig vom Wachstum der verschiedenen Bakterienspezies) wurden die Einzelkolonien ausgezählt. Angegeben ist die Bakterienzellzahl der einzelnen Fraktionen in Prozent, ausgehend von der Gesamtbakterienzellzahl. Wie in Tab. 5 aufgelistet, befinden sich circa 80% der Bakterien in den Fraktionen 8-10. Das entspricht der Beobachtung, dass in den Fraktionen 8-10 die Phago(lyso)somen angereichert sind (siehe Tab. 4). Nach dem 2. Gradienten betrug die Ausbeute an Bakterien circa 50%. Das heißt, die Hälfte der Bakterien, die auf diesen Gradienten geladen wurden, befanden sich nach der Zentrifugation im Pellet (F). Gleichzeitig betrug die Ausbeute der früh endosomalen und lysosomalen Aktivität nur circa 5-10% der Aktivität, die auf diesen Gradienten geladen wurde. Dies verdeutlicht, dass ein Großteil der Kontamination mit frühen Endosomen und Lysosomen, aber nur ein vergleichsweise geringer Teil der Bakterien und damit der Phagosomen durch den 2. Gradienten entfernt wurde. Somit ist dieser zweite Schritt für die Reinheit der Phagosomen mitentscheidend. Insgesamt zeigen die in den Tabellen 2-5 dargestellten Ergebnisse, dass diese Methode der Phagosomenisolierung dazu geeignet ist, Bakterien-enthaltende Phagosomen zu isolieren und damit besser zu charakterisieren.

Tab. 5: Bakterienzellzahl in den einzelnen Fraktionen der Phagosomenisolierung

Von den *A. felis*- und den *L. innocua*-enthaltenden Fraktionen wurden Verdünnungsreihen hergestellt und auf Agar-Platten ausplattiert. Die Einzelkolonien wurden gezählt und die Bakterienzellzahl in Prozent vom Startmaterial (PNS) angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von Daten aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten; n. n. = nicht nachweisbar.

Fraktionen	Bakterienzellzahl	
	<i>Afipia felis</i>	<i>Listeria innocua</i>
1	n. n.	n. n.
2	n. n.	n. n.
3	n. n.	n. n.
4	n. n.	n. n.
5	1,3 +/- 0,9	0,6 +/- 0,4
6 (Ladefr.)	2,7 +/- 2,3	1,0 +/- 0,7
7	10,7 +/- 8,4	11,5 +/- 6,0
8	18,5 +/- 1,5	24,0 +/- 4,4
9	30,0 +/- 11,6	34,3 +/- 14,6
10	25,0 +/- 7,5	21,5 +/- 8,8
Pellet	12,0 +/- 7,5	7,7 +/- 3,4
8 - 10	73,4 +/- 4,1	79,8 +/- 3,4
F	36,0 +/- 7,2	39,0 +/- 10,2

3.5.3. Analyse der isolierten Phagosomen

In Kapitel 3.5.2. wurde gezeigt, dass mit der hier vorgestellten Methode Bakterien-enthaltende Phagosomen isoliert und im Verhältnis zu anderen endozytischen Vesikeln angereichert werden. Das Endprodukt dieser Isolierung ist die phagosomale Fraktion F, die im Folgenden detaillierter analysiert werden sollte. Dabei wurde die Anreicherung von bzw. Kontamination mit anderen zellulären Bestandteilen, wie dem Endoplasmatischen Retikulum (ER), dem Golgi-Apparat und der Plasmamembranen in den phagosomalen Fraktionen der nicht infizierten, mit *Afipia felis* oder *Listeria innocua* infizierten Proben untersucht. Eine Anreicherung in nur einer der phagosomalen Fraktionen würde einen Anhaltspunkt über die genaue Kompartimentierung des jeweiligen Phagosomentyps geben. So ist z.B. von den *Legionella pneumophila*-enthaltenden Phagosomen bekannt, dass sie mit rauem ER assoziiert sein können [Swanson und Isberg 1995]. Des Weiteren gibt diese Analyse weitere Hinweise auf die Reinheit der isolierten Phagosomen und erlaubt es, die Intaktheit der Phagosomen mit Hilfe des Elektronenmikroskops zu analysieren.

Die Intaktheit ist für die Analyse der luminalen Inhalte von entscheidender Bedeutung. So wurden die frühen Endosomen und Lysosomen in Kapitel 3.5.2. mit Hilfe zweier Assays für luminalen Inhalte nachgewiesen. Durch eine nicht intakte und damit permeable Phagosomenmembran würden die luminalen Inhalte aus dem Phagosom entweichen und damit nicht mehr nachweisbar sein. Das Ergebnis einer Analyse dieser Phagosomen wäre somit verfälscht.

3.5.3.1. Kontamination der isolierten Phagosomen mit zellulären Bestandteilen

Um die Kontamination mit Plasmamembranbestandteilen bestimmen zu können, wurden die nicht infizierten, zuvor mit *A. felis* bzw. mit *L. innocua* infizierten J774E-Makrophagen für 10 min bei 4°C PBS/HRP inkubiert. Das glykosylierte HRP reichert sich unter diesen Bedingungen auf der Plasmamembran an, ohne endozytiert zu werden, und kann somit als biochemischer Marker für die Plasmamembran dienen. Das Material der verschiedenen Fraktionen wurde auf HRP-Aktivität getestet. Angegeben ist die HRP-Aktivität der einzelnen Fraktionen in Prozent vom Startmaterial (PNS). Wie aus Tab. 6 hervorgeht, befindet sich nur circa 0,1% der HRP-Aktivität des PNS nach der Phagosomenisolierung in der resultierenden Fraktion F. Dies ist unabhängig von dem phagozytierten Bakterium. Da es durch die Versuchsanordnung höchst unwahrscheinlich ist, dass HRP endozytisch von den Makrophagen aufgenommen werden konnte und somit in ein phagosomales Kompartiment gelangt, reflektieren diese Zahlen direkt die geringe Kontamination mit Plasmamembranbestandteilen.

Tab. 6: Nur ein sehr geringer Anteil der Plasmamembran befindet sich in der Endfraktion

Aliquots von den Pseudophagosomen und von den *Afipia felis*- bzw. *Listeria innocua*-enthaltenden Phagosomen wurden mit der HRP-Reaktionslösung inkubiert. Nach dem Stoppen der Enzymreaktion wurde die Extinktion am ELISA-Reader bestimmt. Für jede getestete Probe wurde die HRP-Aktivität in Prozent vom Startmaterial (PNS) angegeben. Die HRP-Aktivität definiert bei dieser Versuchsanordnung die Plasmamembran. Dargestellt sind die Daten aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

nicht infiziert	<i>Afipia felis</i>	<i>Listeria innocua</i>
0,09	0,09	0,12
0,05	0,09	0,13
0,03	0,06	0,08
$0,06 \pm 0,02$	$0,08 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,02$

Die Kontamination der isolierten Bakterien-enthaltenden Phagosomen mit ER oder Membranen des Golgi-Apparates wurde mittels Westernblot bestimmt. Dazu wurden die Wirtszell-Proteinkonzentrationen der Pseudophagosomen, der *Afipia felis*- und der *Listeria innocua*-enthaltenden Phagosomen so bestimmt, wie es unter 2.14.5. beschrieben ist. Anschließend wurden die Wirtszellproteine durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Kontrolle wurden jeweils 2 µg und 40 µg des Startmaterials (PNS) aufgetragen, so dass die Anreicherung bzw. der Verlust des jeweiligen zellulären Markers in der phagosomalen Fraktion im Verhältnis zum PNS deutlich wird. Nach dem Transferieren der Proteine auf eine PVDF-Membran wurden das Golgi-Markerprotein GM130 und das ER-Markerprotein Calnexin mit Antikörpern dekoriert und mittels Chemolumineszenz detektiert. Wie der Abb. 7 zu entnehmen, ist das ER-Markerprotein Calnexin in der phagosomalen Fraktion der infizierten Makrophagen im Vergleich zu der phagosomalen Fraktion der uninfizierten Makrophagen (Pseudophagosomen) und zum Startmaterial angereichert. Die Anreicherung an ER war erwartet worden, da dies bei allen bisher beschriebenen Isolierungsmethoden beobachtet wurde [Garin et al. 2001]. Allerdings gibt es in der Quantität keinen Unterschied zwischen den beiden Bakterien-enthaltenden Phagosomen, so dass dies keinen Hinweis auf die genaue Kompartimentierung der Bakterien gibt. Hingegen ist weder in der phagosomalen Fraktion (F) der infizierten noch der uninfizierten Makrophagen das Markerprotein GM130, für den medialen Golgi, detektierbar. Damit wurde nachgewiesen, dass durch die hier vorgestellte Methode zur Phagosomenisolierung dieses Organell effizient entfernt wird.

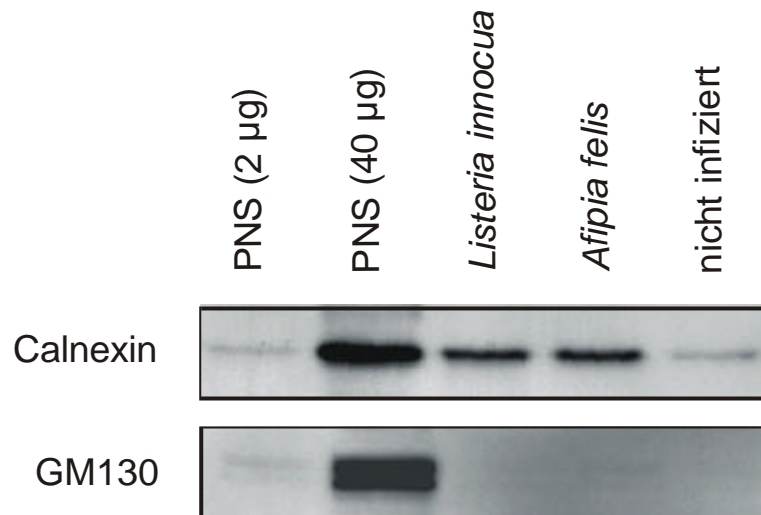


Abb. 7: ER ist und Golgi ist nicht in der phagosomalen Fraktion angereichert

Die Wirtszellproteine der Pseudophagosomen, der *Afipia felis*- und der *Listeria innocua*-enthaltenden Phagosomen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und das Golgi-Markerprotein GM130 sowie das ER-Markerprotein Calnexin mit Antikörpern detektiert. Als Kontrolle wurden jeweils 2 µg und 40 µg des Startmaterials (PNS) aufgetragen. Dargestellt ist je ein repräsentatives Experiment aus 3 unabhängigen Experimenten.

3.5.3.2. Elektronenmikroskopische Darstellung der isolierten Phagosomen

Um die Intaktheit und die Reinheit der Phagosomen beurteilen zu können, wurden von den *A. felis*- und *L. innocua*-enthaltenden Phagosomen elektronenmikroskopische Präparate hergestellt. Dazu wurden J774E-Makrophagen mit *A. felis* und *L. innocua* infiziert und die Phagosomen mit der in Abb. 5 gezeigten Methode isoliert. Anschließend wurden von diesen Bakterien-enthaltenden Phagosomen wie in Kapitel 2.12. beschrieben Ultradünnschnitte hergestellt. Am Transmissionselektronenmikroskop (TEM) wurden von repräsentativen Ausschnitten Aufnahmen angefertigt. Die Abb. 8 zeigt deutlich, dass sowohl die *Listeria innocua*- als auch die *Afipia felis*-enthaltenden Phagosomen intakt sind. Die phagosomale Membran, die durch Pfeile markiert ist, liegt eng um die Afipien und bildet somit kompakte Phagosomen. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei den *Listeria innocua*-enthaltenden Phagosomen um große, volumige Membransäcke, die locker um die Bakterien liegen. Bei Phagosomen mit recht lose um das Bakterium liegender Membran handelt es sich normalerweise um Phagosomen, deren Reifungsstadium dem eines späten Endosoms oder Lysosoms entspricht. Frühe Endosomen bzw. nicht gereifte Phagosomen sind dagegen durch eine eng anliegende Phagosomenmembran

gekennzeichnet [De Chastellier und Thilo 1997]. Somit sind die elektronenmikroskopischen Aufnahmen ein weiterer Hinweis auf die ungewöhnliche Kompartimentierung der Afipien.

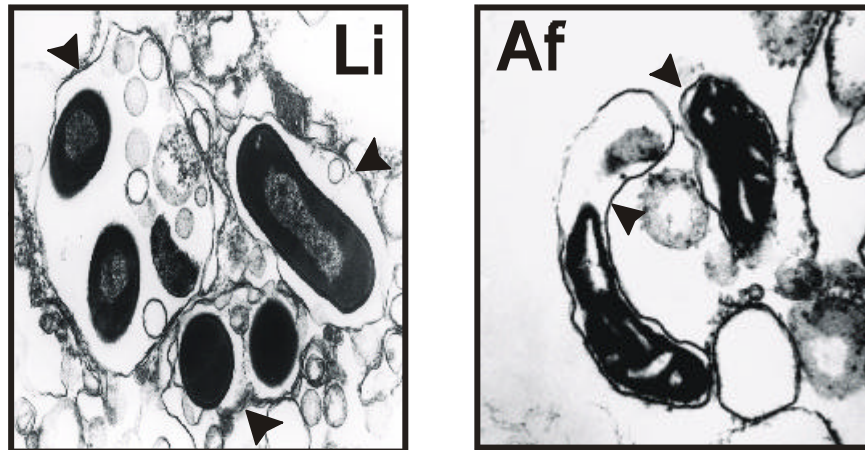


Abb. 8: Die isolierten Bakterien-enthaltenden Phagosomen sind intakt

Von isolierten *Afipia felis*- und *Listeria innocua*-enthaltenden Phagosomen aus J774E-Makrophagen wurden Ultradünnschnitte hergestellt. Am Transmissionselektronenmikroskop wurden anschließend von diesen Präparaten Aufnahmen angefertigt. Die Aufnahme der *Afipia felis*-enthaltenden Phagosomen (Af) ist 52.800x vergrößert, und die Aufnahme der *Listeria innocua*-enthaltenden Phagosomen (Li) ist 34.000x vergrößert. Die Pfeile zeigen auf phagosomale Membranen.

3.5.4. Analyse der isolierten *Afipia felis*-enthaltenden Phagosomen mittels Western-blot

Nachdem gezeigt werden konnte, dass mit der hier vorgestellten Methode intakte und von Kontaminationen relativ freie Bakterien-enthaltende Phagosomen isoliert werden können, sollte die Kompartimentierung der Afipien analysiert werden. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass sich die Afipien in einem ungewöhnlichen Kompartiment befinden. So befinden sich circa 70 % der Afipien in dem untersuchten Zeitintervall (5-120 min) in einem nicht endozytischen Kompartiment. Deshalb wurden die *Afipia felis*-enthaltenden Phagosomen auf die Anwesenheit verschiedener Markerproteine untersucht. Zum einen, um die mittels Immunfluoreszenz erhaltenen Daten mit einer zweiten Methode zu überprüfen und zum anderen, um weitere Markerproteine zu testen, zu denen Antikörper vorhanden waren, die sich aber nicht für die Immunfluoreszenz eignen. Dazu wurden die Wirtszell-Proteinkonzentrationen der Pseudophagosomen, der *Afipia felis*- und der *Listeria innocua*-enthaltenden Phagosomen wie unter 2.14.5. beschrieben

bestimmt. Anschließend wurden gleiche Mengen der Wirtszellproteine durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transferieren der Proteine auf eine PVDF-Membran wurden verschiedene Organellenmarkerproteine mit Antikörpern dekoriert und auf einem Röntgenfilm mittels Chemolumineszenz detektiert. Zur Kontrolle wurden jeweils 2 µg und 40 µg des Startmaterials (PNS) aufgetragen, so dass die Anreicherung bzw. der Verlust des Markers in der phagosomalen Fraktion im Verhältnis zum PNS deutlich wird. Obwohl die Listerien- wie auch die Bordetellen-enthaltenden Phagosomen die spät endosomalen/lysosomalen Markerproteine LAMP-1, vATPase und Cathepsin D (Cath D) akkumulieren, enthalten sie keines der früh endosomalen Markerproteine EEA1 oder Transferrin Rezeptor (TfR). Dies war nach einer Infektionszeit von 2 h erwartet worden. Die *Afipia felis*-enthaltenden Phagosomen dagegen akkumulieren nur geringe Mengen der oben beschriebenen spät endosomalen/lysosomalen Markerproteine (siehe Abb. 9). Diese Anreicherung ist auf die circa 30% der Afipien zurückzuführen, die sich in einem endozytischen Kompartiment befinden. Keine hier untersuchten Bakterien-enthaltenden Phagosomen hatten das Protein TACO (= Coronin) akkumuliert, das als ein wichtiger Faktor für die Biogenese der Mycobakterien-enthaltenden Phagosomen beschrieben wurde [Ferrari et al. 1999]. Vielmehr ist TACO in der pseudophagosomalen Präparation angereichert. VAMP-8 (Endobrevin), ein Marker für das gesamte endozytische System, ist in allen Bakterien-enthaltenden Phagosomen im Vergleich zu den Pseudophagosomen angereichert.

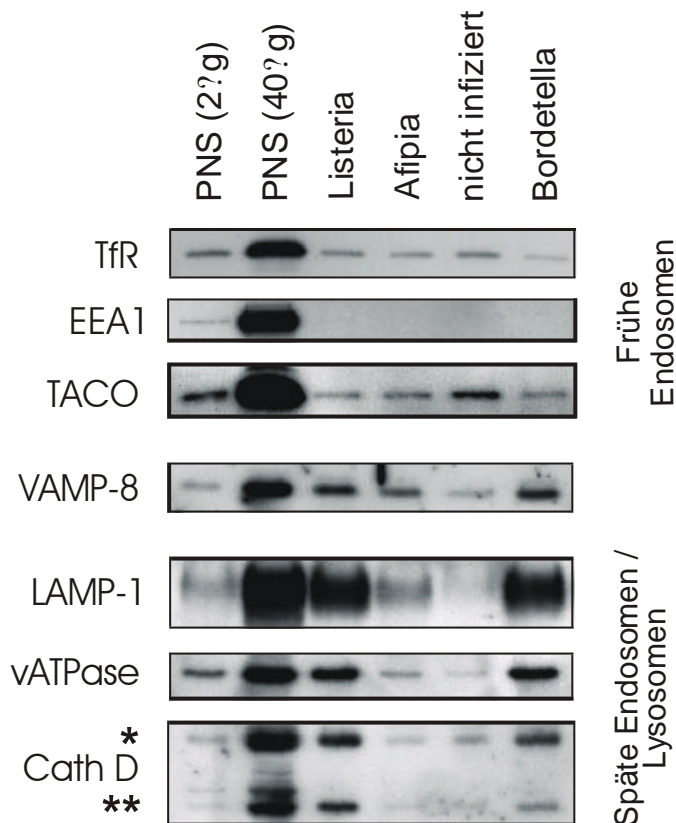


Abb. 9: Afipien akkumulieren nur geringe Mengen spät endosomale Markerproteine

Die Wirtszellproteine der Pseudophagosomen, der *Afipia felis*-, der *Listeria innocua*-, oder der *Bordetella pertussis*-enthaltenden Phagosomen wurden durch eine SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und die verschiedenen Organellenmarkerproteine mit Antikörpern detektiert. Es wurden jeweils 2 µg und 40 µg des Startmaterials (PNS) sowie je 2 µg der jeweiligen phagosomalen Fraktion (F) aufgetragen. Von Cathepsin D ist sowohl die 48 kDa Vorläuferform (*) als auch die gereifte 31 kDa Form (**) markiert. Dargestellt ist je ein repräsentatives Experiment aus mindestens 3 unabhängigen Phagosomen-isolierungen.

3.5.5. 2D-Gelelektrophorese der Afipien-enthaltenden Phagosomen

Mit den bislang gezeigten Methoden konnte kein Protein charakterisiert werden, das spezifisch auf oder in Afipien-enthaltenden Phagosomen angereichert ist. Deshalb wurden in einer Kooperation mit Dr. M. Desjardins (Montreal, Kanada) die Afipien-enthaltenden Phagosomen in einer 2D-Gelelektrophorese untersucht. Dazu wurden von uninfizierten oder mit *Afipia felis* infizierten J774A.1-Makrophagen Phagosomen mit der in 2.11. beschriebenen Methode isoliert. Anschließend wurden die Phagosomen in 2D-Lysispuffer aufgenommen und zur Weiterbearbeitung zu Dr. M. Desjardins geschickt. Die Verwendung von J774A.1-Makrophagen statt der J774E-Makrophagen ist darauf zurückzuführen, dass Dr. M. Desjardins eine 2D-Gel-Karte von aus J774A.1-Makrophagen isolierten Latex Beads-enthaltenden Phagosomen hergestellt hat [Garin et al. 2001]. Die *Afipia felis*-enthaltenden Phagosomen und die Pseudophagosomen

sollten in dem Standard-Proteintrennungssystem dieses Labors analysiert werden, um direkte Vergleiche mit der existierenden Referenzkarte zu ermöglichen. In Abb. 10 ist der erste und bislang einzige Versuch dieser Kooperation dargestellt. Mit Pfeilen sind Spots markiert, die nur auf jenem Gel zu finden sind, auf das die Afipien-enthaltenden Phagosomen aufgetragen wurden. Diese Spots stellen Proteine dar, die spezifisch für *Afipia felis*-enthaltende Phagosomen sind. Deshalb sollen diese Proteine in naher Zukunft analysiert werden. Außerdem soll die Funktionen dieser Proteine bei der Etablierung dieses ungewöhnlichen Kompartimentes untersucht werden.

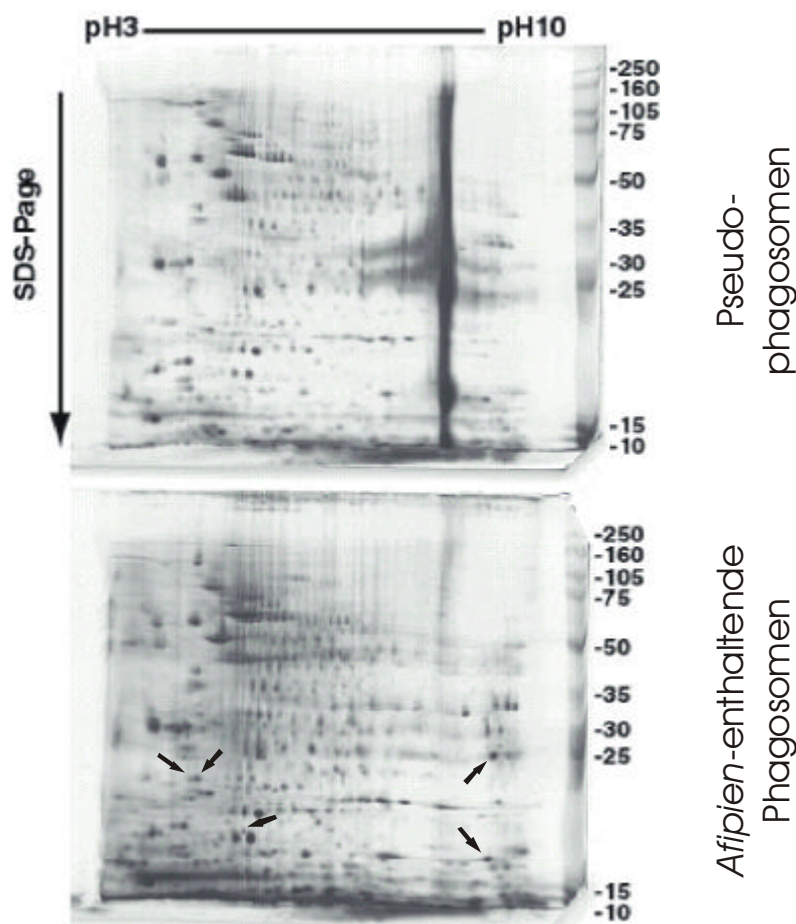


Abb. 10: 2D-Gel-Analyse der Afipien-enthaltenden Phagosomen

Von je circa 4×10^8 uninfizierten oder mit *Afipia felis* infizierten J774A.1-Makrophagen wurden Phagosomen isoliert. Anschließend wurden die Proteine der Pseudophagosomen und der *Afipia felis*-enthaltenden Phagosomen durch eine 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt, mit Coomassie Blau gefärbt und gescannt. Die Pfeile kennzeichnen einige Spots, die sich ausschließlich auf dem Gel befinden, auf dem die Afipien-enthaltenden Phagosomen aufgetrennt wurden. Die Ausdehnung des pH-Gradienten ist über den Gelen und die Molekulargewichte der verwendeten Standardproteine sind rechts neben den Gelen angegeben. Dargestellt ist das einzige bislang durchgeführte Experiment.

3.6. Analyse von *Rhodococcus equi*-enthaltenden Phagosomen

Rhodococcus equi ist ein veterinärmedizinisch relevantes Bakterium, dessen ungewöhnliche Phagosomen bereits vor 15 Jahren mit einfachen Mitteln grob beschrieben wurden [Zink et al. 1987; Hietala und Ardans 1987]. Da E. Fernandez (dieses Labor) zeigen konnte, dass *R. equi*(-)-enthaltende Phagosomen wesentlich häufiger mit lysosomalen Dextran Texas Red kolokalisieren als *R. equi*(+)-enthaltende Phagosomen [Fernandez 2001], konnte angenommen werden, dass die Biogenese der Rhodokokken-enthaltenden Phagosomen auch in unserem Mausemakrophagen-Modell ungewöhnlich ist. Deshalb sollte die Kompartimentierung von *Rhodococcus equi* in Makrophagen untersucht werden. Dazu wurden J774E-Makrophagen für 1 h mit *Rhodococcus equi* infiziert und nach dem Entfernen der nicht phagozytierten Bakterien für weitere 2 h inkubiert. Danach wurden die Bakterien-enthaltenden Phagosomen mit der unter 2.11. beschriebenen Methode isoliert. Anschließend wurden die isolierten Phagosomen charakterisiert. Dabei wurde die Intaktheit der Rhodokokken-enthaltenden Phagosomen durch Transmissions-Elektronenmikroskopie untersucht. Des Weiteren wurden lysosomale Enzymaktivitäten sowie die Anwesenheit verschiedener Markerproteine bestimmt. Als Positivkontrolle dienten wieder *Listeria innocua*-enthaltende Phagosomen. Auch hier dienten Pseudophagosomen als Kontrolle für die Reinheit der Präparation und als Maß für die Anreicherung von Markerproteinen bzw. der Enzymaktivität.

3.6.1. Elektronenmikroskopische Darstellung der isolierten Phagosomen

Von den *R. equi*(+)-enthaltenden Phagosomen wurden Präparate für die Transmissions-Elektronenmikroskopie hergestellt, um die Intaktheit der Phagosomen beurteilen zu können. Deshalb wurden J774E-Makrophagen mit *R. equi*(+) infiziert und die Phagosomen mit der in Abb. 5 dargestellten Methode isoliert. Anschließend wurden von diesen Bakterien-enthaltenden Phagosomen Ultradünnschnitte angefertigt (siehe Kapitel 2.12.). Am Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) wurden von repräsentativen Ausschnitten Aufnahmen angefertigt. Wie in Abb. 11 zu sehen, sind die Rhodokokken-enthaltenden Phagosomen intakt. Die eng um die Bakterien liegende Phagosomenmembran deutet auf eine gestörte oder verzögerte Reifung der *R. equi*(+)-enthaltenden Phagosomen hin.

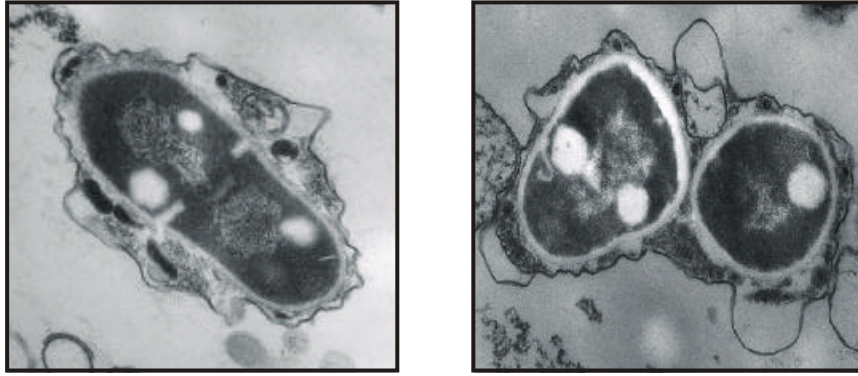


Abb. 11: Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen intakte Rhodokokken-enthaltende Phagosomen

Von isolierten *R. equi*(+)-enthaltenden Phagosomen aus J774E-Makrophagen wurden Ultradünnschnitte hergestellt. Am Transmissionselektronenmikroskop wurden anschließend von diesen Präparaten Aufnahmen mit einer Vergrößerung von 31.500x angefertigt.

3.6.2. Bestimmung der lysosomalen Enzymaktivität der *Rhodococcus equi*-enthaltenden Phagosomen

Um die Rhodokokken-enthaltenden Phagosomen zu charakterisieren, wurde zunächst die Aktivität des lysosomalen Enzyms β -Galaktosidase bestimmt. Es wurden Phagosomen aus den nicht infizierten, mit *Listeria innocua*, mit *R. equi*(+) oder *R. equi*(-) infizierten J774E-Makrophagen Phagosomen mit der in Abb. 5 dargestellten Methode isoliert und die saure β -Galaktosidase-Enzymaktivitäten in den Fraktionen bestimmt. Aus Abb. 12 ist zu entnehmen, dass die Aktivität der *R. equi*(+)-enthaltenden Phagosomen mit 21 U nur wenig höher ist als die Aktivität der als Negativkontrolle dienenden Pseudophagosomen (13,5 U). Dagegen ist die lysosomale Enzymaktivität der *R. equi*(-)-enthaltenden Phagosomen mit 41 U doppelt so hoch wie die β -Galaktosidase-Aktivität der *R. equi*(+)-enthaltenden Phagosomen. Wenn die Enzymaktivität der Pseudophagosomen von denen der anderen Proben abgezogen wird, um die generelle Verunreinigung der Präparationen mit Lysosomen zu korrigieren, fällt der Unterschied zwischen *R. equi*(-) und *R. equi*(+) noch deutlicher aus. Die zu Phagolysosomen reifenden *Listeria innocua*-enthaltenden Phagosomen akkumulieren dieses Enzym in noch stärkerem Umfang (49,5 U) als die *R. equi*(-)-enthaltenden Phagosomen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es einen Unterschied in der Reifung der Rhodokokken-enthaltenden Phagosomen in Abhängigkeit vom 85 kbp Plasmid gibt.

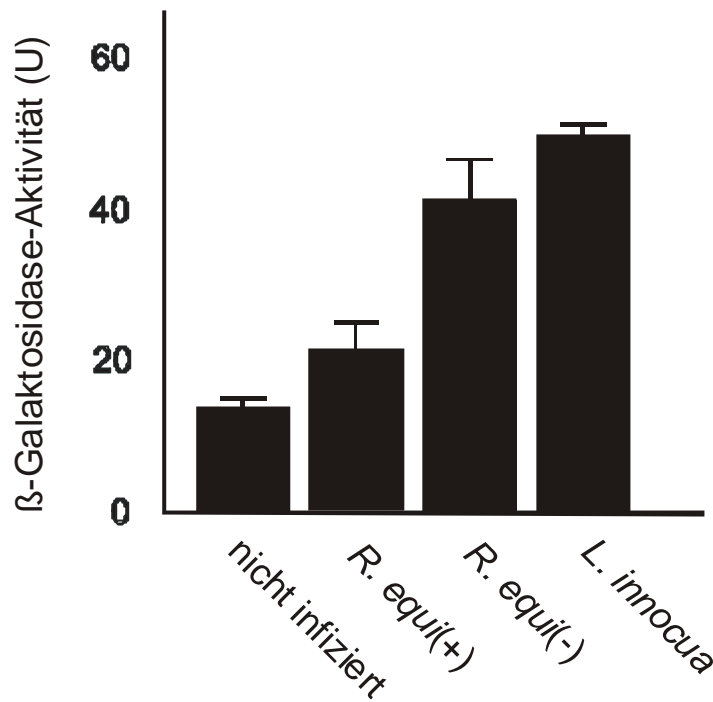


Abb. 12: Die *R. equi*(-)-enthaltenden Phagosomen akkumulieren mehr β-Galaktosidase-Aktivität als die *R. equi*(+)-enthaltenden Phagosomen

Aliquots von den Pseudophagosomen, *L. innocua*-, *R. equi*(+)- und *R. equi*(-)-enthaltenden Phagosomen wurden mit der β-Galaktosidase-Reaktionslösung inkubiert. Anschließend wurde die β-Galaktosidase-Aktivität am ELISA-Reader gemessen. Angegeben ist die β-Galaktosidase-Aktivität in Units (U= Extinktion bei 405 nm/mg Protein/h). Die Mittelwerte und die Standardabweichungen von Daten aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

3.6.3. Analyse der Rhodokokken-enthaltenden Phagosomen mittels Westernblot

Um der Frage nachzugehen, ob es einen Unterschied bei der Kompartimentierung der *Rhodococcus equi*(+) und der *Rhodococcus equi*(-) nach einer zweistündigen Infektionszeit gibt, wurden die *Rhodococcus*-enthaltenden Phagosomen auf die Anwesenheit verschiedener Markerproteine untersucht. Dazu wurde die Wirtszell-Proteinkonzentrationen der *R. equi*(+)-, der *R. equi*(-)- und der *Listeria innocua*-enthaltenden Phagosomen bestimmt (siehe 2.14.5.). Anschließend wurden gleiche Mengen der Wirtszellproteine durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transferieren der Proteine auf eine PVDF-Membran wurden verschiedene Organellenmarkerproteine mit Antikörpern dekoriert und auf einem Röntgenfilm mittels Chemolumineszenz detektiert. Zur Kontrolle wurden jeweils 2 µg und 40 µg des Startmaterials (PNS) aufgetragen, so dass die Anreicherung bzw. der Verlust des Markers in der phagosomalen Fraktion im Verhältnis zum PNS deutlich wird. Die *Listeria innocua*-enthaltenden Phagosomen akkumulieren die spät endosomalen/lysosomalen Markerproteine LAMP-1 und (eine Untereinheit

der) vATPase, während sie wenig früh endosomales rab5 enthalten (siehe Abb. 13). Die Rhodokokken-enthaltenden Phagosomen dagegen akkumulieren das früh endosomale Markerprotein rab5. Außerdem findet sich in Rhodokokken-enthaltenden Phagosomen das spät endosomale/lysosomale Markerprotein LAMP-1, wobei *R. equi*(-) dieses Protein in stärkerem Maße akkumuliert als *R. equi*(+). Insgesamt akkumuliert *R. equi*(+) mehr früh endosomales rab5, während *R. equi*(-) mehr spät endosomales/lysosomales LAMP-1 und vATPase akkumuliert. Dies verdeutlicht, dass die Reifung der Rhodokokken-enthaltenden Phagosomen gestört oder verzögert ist. Diese veränderte Phagosomenreifung lässt sich zum Teil auf das Vorhandensein des 85 kbp Plasmids zurückführen.

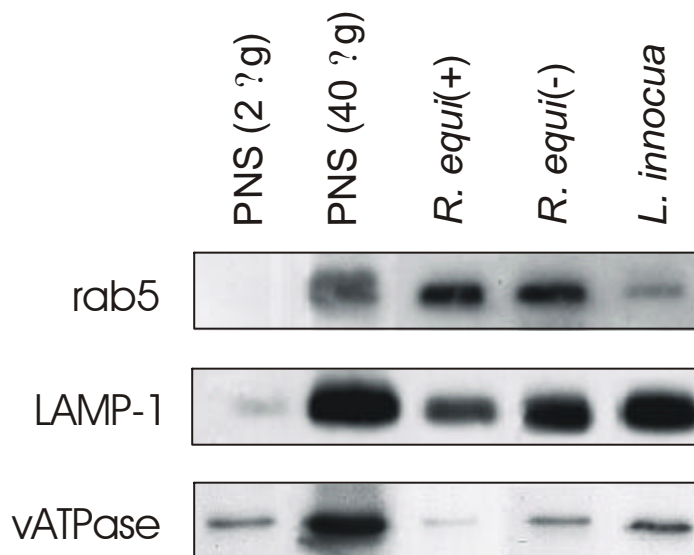


Abb. 13: *R. equi*(-)- und *R. equi*(+)-enthaltenden Phagosomen reichern unterschiedliche endozytischen Markerproteinen an

Die Wirtszellproteine der *Listeria innocua*-, der *Rhodococcus equi*(+)- und der *Rhodococcus equi*(-)-enthaltenden Phagosomen wurden durch eine SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und die verschiedenen Organellenmarkerproteine mit Antikörpern detektiert. Es wurden jeweils 2 µg und 40 µg des Startmaterials (PNS) sowie je 2 µg der jeweiligen phagosomalen Fraktion (F) aufgetragen. Dargestellt ist je ein repräsentatives Experiment aus mindestens 2 unabhängigen Phagosomenisolierungen.

3.7. Einfluss von *Rhodococcus equi* auf die Vitalität von eukaryotischen Zellen

N. Mauder (dieses Labor) konnte mittels Trypanblau-Ausschlussmethode zeigen, dass *Rhodococcus equi* mit dem Virulenz-assoziierten Plasmid einen zytotoxischen Einfluss auf J774E-Makrophagen haben. Nach einer 22-stündigen Infektion mit einer MOI von 30 sind 41% der mit

R. equi(+) und nur 3% der mit *R. equi*(-) infizierten J774E-Makrophagen positiv für Trypanblau [Mauder 2001]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob es sich bei dem durch *R. equi*(+)-induzierten Zelltod um einen apoptotischen oder nekrotischen Zelltod handelt. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob *Rhodococcus equi* auch auf primäre humane Monozyten zytotoxisch wirkt.

3.7.1. Einfluss von *Rhodococcus equi* auf die Vitalität von J774E-Makrophagen

Die J774E-Makrophagen wurden mit *Rhodococcus equi*(+) und *Rhodococcus equi*(-) für 1 h mit einer MOI von 30 infiziert und in Gegenwart von Gentamicin für weitere 0 h, 4 h oder 6 h inkubiert. Da Gentamicin nicht von den Makrophagen aufgenommen wird, verhindert dieses Antibiotikum nur die Vermehrung der nicht phagozytierten Rhodokokken. Es wurde bereits gezeigt, dass thermisch als auch chemisch getötete *R. equi* keinen zytotoxischen Effekt auf J774E-Makrophagen haben [Mauder 2001]. Somit wurde bei dieser Versuchsanordnung ausschließlich der Einfluss der lebend phagozytierten Bakterien auf die Vitalität der Makrophagen bestimmt. Als Kontrolle für apoptotische Zellen dienten J774E-Makrophagen, die für 6 h mit dem Topoisomerase-Hemmer und Apoptose-Induktor Etoposid inkubiert wurden [Walker et al. 1991; Stefanelli et al. 1998]. Die nekrotischen und apoptotischen Zellen wurde anschließend durch den Nachweis des Spaltprodukts der Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP), die SubG₁-Technik und mit Hilfe einer Doppelfärbung mit Annexin V-PE und 7-AAD bestimmt.

3.7.1.1. Apoptosenachweis mittels PARP-Spaltprodukten

Von den mit *R. equi* infizierten bzw. mit Etoposid inkubierten J774E-Makrophagen wurden Zellextrakte hergestellt. Diese wurden durch eine SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und die Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) sowie deren Spaltprodukte mittels Antikörper detektiert. Die Spaltung der PARP ist ein frühes Ereignis während der Apoptose, so dass durch Nachweis der beiden Spaltprodukte (89 kDa und 24 kDa) auch Apoptose nachgewiesen wird. Die PARP der mit Etoposid inkubierten J774E-Makrophagen ist durch Caspasen (apoptotisch relevante Cysteinproteasen) gespalten worden. Die beiden Spaltprodukte (** - 89 kDa und *** - 24 kDa) sind in Abbildung 14 deutlich zu erkennen. Damit sind, wie erwartet, die mit Etoposid inkubierten Makrophagen apoptotisch.

Dagegen sind weder bei den Zellextrakten der mit *R. equi*(-) noch bei den mit *R. equi*(+) infizierten Makrophagen Spaltprodukte der PARP vorhanden. Dies kann nicht mit der unterschiedlich geladenen Proteinmengen (siehe ungespaltenes PARP - *) erklärt werden, sondern nur mit der Tatsache, dass es sich bei der durch Rhodokokken vermittelten Zytotoxizität nicht um Apoptose handelt.

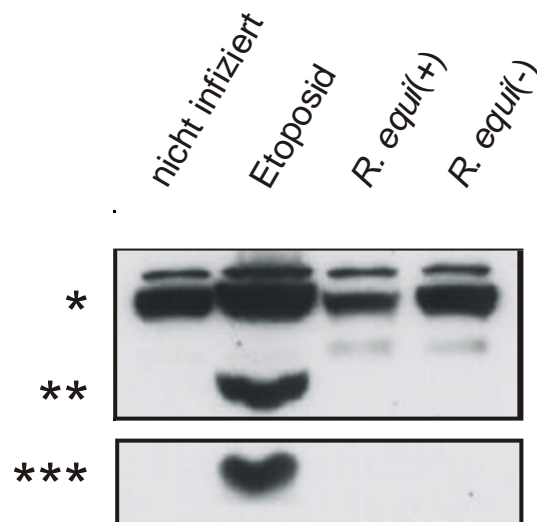


Abb. 14: *Rhodococcus equi* induziert keine Apoptose in J774E-Makrophagen

J774E-Makrophagen wurden mit *R. equi*(+) oder *R. equi*(-) für 1 h infiziert bzw. nicht infiziert und in Gegenwart von Gentamicin für 6 h inkubiert. Als Positivkontrolle wurden J774E-Makrophagen 6 h mit Etoposid (300 µM) inkubiert. Von den anschließend hergestellten Zellextrakten wurden gleiche Volumina durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Mittels Antikörper wurden die 116 kDa Poly(ADP-Ribose) Polymerase (*) sowie die beiden Spaltprodukte: das 89 kDa-Fragment (**) und das 24 kDa-Fragment (***) detektiert. Dargestellt ist das einzige bisher durchgeführte Experiment.

3.7.1.2. Bestimmung der Apoptoserate mittels SubG₁-Technik

Dieser Versuch wurde in Kooperation mit Jan Schulze-Lührmann (Pathologisches Institut, Universität Würzburg) durchgeführt.

Nachdem gezeigt wurde, dass *Rhodococcus equi*(+) keine Apoptose in J774E-Makrophagen auslösen, sollte dieses Ergebnis mit der SubG₁-Technik überprüft werden. Diese Methode basiert auf der Tatsache, dass in apoptotischen Zellen die DNA durch eine induzierte Endonuklease gespalten wird. Die dadurch entstehenden DNA-Fragmente (mit einer Größe von circa 200 bp) werden extrahiert und der verminderte DNA-Gehalt nachgewiesen (siehe 2.18.4.). Die mit *Rhodococcus equi* infizierten bzw. mit Etoposid inkubierten J774E-Makrophagen wurden fixiert

und mit Extraktionspuffer inkubiert. Dadurch wurde die Membran permeabilisiert und leichtmolekulare DNA-Fragmente extrahiert. Die in den Zellen verbliebene DNA wurde mit Propidiumjodid (PI) markiert. Die Auswertung erfolgte am FACScan (siehe 2.18.5.). Nach einer sechsstündigen Inkubationszeit mit Etoposid (300 μ M) sind 14,2% der J774E-Makrophagen apoptotisch (siehe Abb. 15). Von den mit *R. equi*(+) oder *R. equi*(-) infizierten Makrophagen hingegen sind nur 1,1-2,8% und von den nicht infizierten Makrophagen 1,4% (nicht dargestellt) apoptotisch. Diese Werte stimmen gut mit dem Ergebnis überein, das mittels Nachweis von PARP-Spaltprodukten erzielt wurde. Es handelt sich also bei der durch Rhodokokken vermittelten Zytotoxizität nicht um Apoptose.

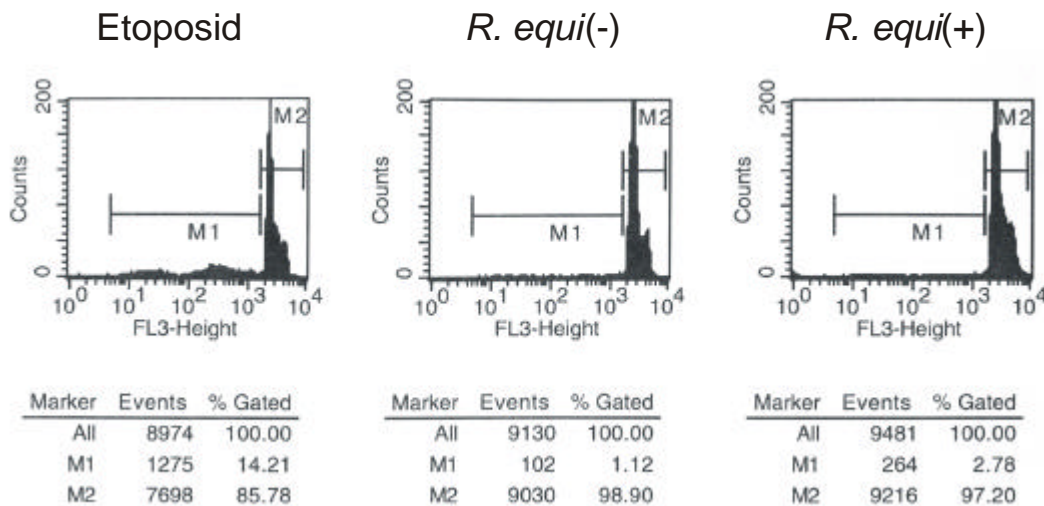


Abb. 15: *Rhodococcus equi* induzieren keine Apoptose in J774E-Makrophagen

J774E-Makrophagen wurden mit *R. equi*(+) und *R. equi*(-) für 1 h infiziert und in Gegenwart von Gentamicin für 6 h inkubiert. Als Positivkontrolle wurden J774E-Makrophagen 6 h mit Etoposid inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, leichtmolekulare DNA-Fragmente extrahiert und die verbliebene DNA mit Propidiumjodid markiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, wobei der Marker M1 den Prozentsatz apoptotischer Makrophagen und der Marker M2 den Prozentsatz der lebenden und nekrotischen Makrophagen angibt. Aufgenommen wurde von circa 9000 Zellen (Events) die Rotfluoreszenz (FL3-Height) in logarithmischer Skalierung.

3.7.1.3. Vitalitätsbestimmung mittels Doppelfärbung mit 7-AAD und Annexin V-PE

Nachdem ausgeschlossen wurde, dass es sich bei der durch *R. equi*(+) vermittelten Zytotoxizität um Apoptose handelt, wurde die mit *Rhodococcus* infizierten Makrophagen mittels Doppelfärbung mit Annexin V-PE und 7-AAD auf Nekrose und/oder Apoptose untersucht. Von den mit Annexin V-PE und 7-AAD inkubierten J774E-Makrophagen wurde am FACScan der

prozentuale Anteil der nekrotischen (definiert als 7-AAD-positiv/Annexin V-negativ und 7-AAD-positiv/Annexin V-positiv) sowie der apoptotischen (definiert als 7-AAD-negativ/Annexin V-positiv) Makrophagen bestimmt. Weder *R. equi*(-) noch *R. equi*(+) zeigen eine proapoptotische Wirkung auf J774E-Makrophagen. So sind bei allen untersuchten Proben im Durchschnitt nur 1% der Makrophagen apoptotisch (siehe Anhang). Dagegen haben die Rhodokokken Einfluss auf die Nekroserate der infizierten Makrophagen, wie aus Abb. 16 hervorgeht. Die *R. equi*(-) verursachen nur einen geringen Vitalitätsverlust der infizierten J774E-Makrophagen. Dagegen führen die das 85 kbp Plasmid enthaltenden *R. equi*(+) zu einem starken Vitalitätsverlust. Dabei nimmt der Anteil der nekrotischen Makrophagen mit der Inkubationsdauer deutlich zu. So steigt die Nekroserate von 2% bei 1 h Infektion ohne anschließende Inkubation auf 29% nach 1 h Infektion und anschließenden 6 h Inkubation an. Damit handelt es sich bei der durch *R. equi*(+) vermittelten Zytotoxizität um Nekrose.

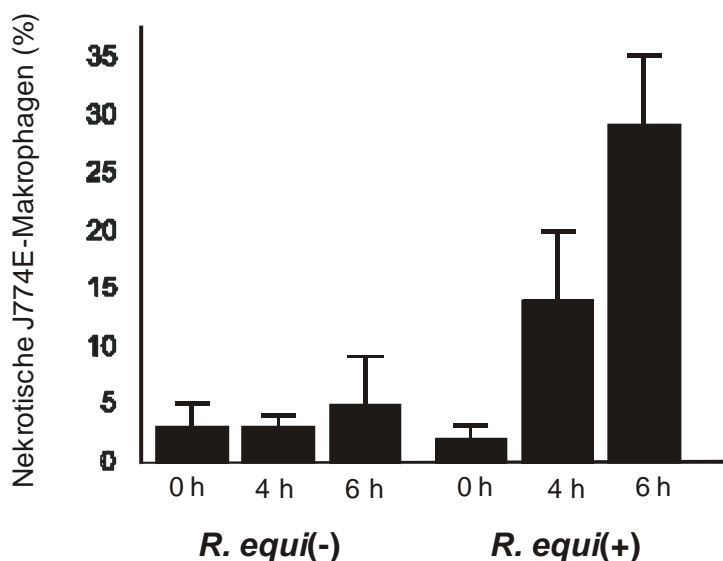


Abb. 16: *R. equi*(+) induziert Nekrose in J774E-Makrophagen

J774E-Makrophagen wurden mit *R. equi*(+) und *R. equi*(-) für 1 h infiziert und in Gegenwart von Gentamicin für 0 h, 4 h, 6 h inkubiert. Anschließend wurden die J774E-Makrophagen mit 7-AAD und Annexin V-PE gefärbt und die Nekroserate bestimmt (definiert als 7-AAD-positiv/Annexin V-PE-negativ und 7-AAD-positiv/Annexin V-PE-positiv). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von Daten aus 3 unabhängigen Experimenten.

Für einige der dargestellten Experimente stellte N. Mauder (dieses Labor) dankenswerterweise mit *Rhodococcus equi* infizierte J774E-Makrophagen zur Verfügung.

3.7.2. Einfluss von *Rhodococcus equi* auf die Vitalität von humanen Monozyten

Nachdem nachgewiesen wurde, dass *R. equi*(+) einen entscheidenden Einfluss auf die Vitalität von J774E-Makrophagen hat, sollte geklärt werden, ob dieses Bakterium eine ähnliche Wirkung auf primäre humane Monozyten zeigt. Dies ist besonders interessant, da es nur wenige Fälle einer *R. equi* Infektion beim Menschen gibt. Des Weiteren sollte geklärt werden ob, ebenso wie bei J774E-Makrophagen, nur vitale Rhodokokken diese Zytotoxizität vermitteln. Aus diesem Grund wurden humane Monozyten für 1 h mit *R. equi*(+), *R. equi*(-) und abgetöteten, Paraformaldehyd-fixierten *R. equi*(+) mit einer MOI von 30 infiziert. Danach wurden die Monozyten für weitere 22 h in Gegenwart von Gentamicin inkubiert. Als Negativkontrolle dienten nicht infizierte Monozyten. Anschließend wurde die Zellvitalität mit Hilfe der Trypanblau-Ausschlussmethode am Lichtmikroskop bestimmt. Trypanblau gelangt nur in Zellen, die keine intakte Membran haben. Somit sind nur tote Wirtszellen mit Trypanblau gefärbt. Wie aus Abb. 17 zu entnehmen, sind 5% der nicht infizierten Monozyten positiv für Trypanblau. Die waagerechte Linie markiert diesen Ausgangswert. Eine Infektion mit Rhodokokken hat nur einen geringen Einfluss auf die Vitalität der humanen Monozyten. Der Unterschied der Wirkung der *R. equi*(+) und *R. equi*(-) auf die Vitalität der Monozyten ist ebenfalls nur gering. So sind nur 13% der mit *R. equi*(+) infizierten Monozyten und nur 8% der mit *R. equi*(-) infizierten Monozyten Trypanblau-positiv. Dies steht im deutlichen Gegensatz zu der Wirkung der Rhodokokken auf die Vitalität der J774E-Makrophagen, bei denen der zytotoxische Effekt viel stärker ausfällt (siehe 3.7.1.3.).

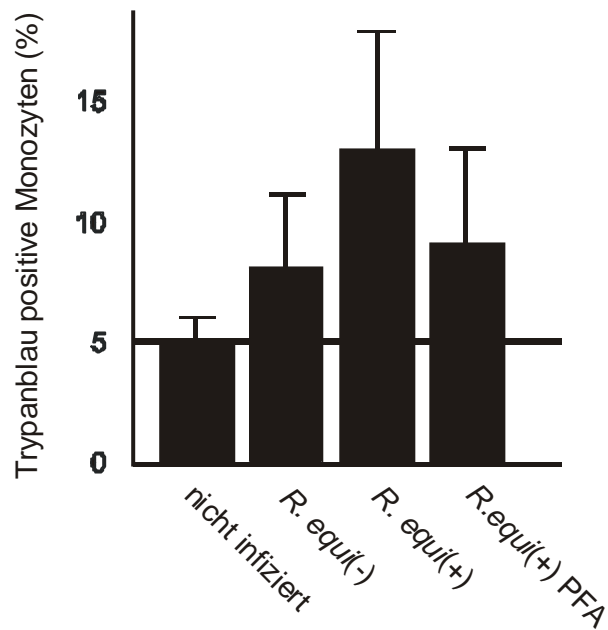


Abb. 17: Rhodokokken haben nur eine geringe zytotoxische Wirkung auf humane Monozyten

Humane Monozyten wurden mit *R. equi*(+), *R. equi*(-) und *R. equi*(+) PFA (Paraformaldehyd-fixiert) für 1 h infiziert und in Gegenwart von Gentamicin für 22 h inkubiert. Als Negativkontrolle dienten nicht infizierte Monozyten. Anschließend wurde die Zellvitalität mit Hilfe der Trypanblau-Ausschlussmethode bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von Daten aus 3 unabhängigen Experimenten.

4. Diskussion

Die Interaktion der Mikroorganismen mit den phagozytischen Zellen des mononukleären und polymorphnukleären Systems ist entscheidend für eine erfolgreiche Infektion. Nach der Aufnahme durch die Phagozyten befinden sich die Mikroorganismen in einem neu gebildeten Organell, dem Phagosom. Das Phagosom wird mit der Zeit modifiziert, wodurch die Mikroorganismen abgetötet und abgebaut werden. Der Prozess der Modifizierung wird von einer Reihe von Molekülen reguliert, die unter anderem die Interaktion mit dem Zytoskelett und damit die Bewegung innerhalb der Zellen sowie die Fusion der Phagosomen mit endozytischen Vesikeln und damit seine Reifung steuern. Allerdings sind einige Mikroorganismen in der Lage, dem Abbau im Phagosom bzw. Phagozyten zu entkommen. Zu den Bakterien, deren Phagosomenreifung gestört ist und die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, gehören *Afipia felis* und *Rhodococcus equi*. Durch Analyse der Kompartimentierung dieser, aber auch anderer, Bakterien mit gestörter Phagosomenreifung ist die Charakterisierung der an der Phagosomenreifung sowie an der Etablierung des ungewöhnlichen Kompartiments beteiligten Moleküle möglich.

4.1. Phagosomenisolierung

Die Isolierung der Phagosomen ermöglicht die biochemische Analyse des Phagosoms sowie der an der Phagosomenreifung beteiligten Moleküle [Desjardins und Scianimanico 1998]. Mit Hilfe der in dieser Promotionsarbeit entwickelten Methode ist es möglich, Bakterien-enhaltende Phagosomen zu isolieren. Diese Methode kombiniert und modifiziert einige bereits beschriebene Verfahren [Sturgill-Koszycki et al. 1996; Alvarez-Dominguez et al. 1996; Alvarez-Dominguez et al. 1997; Mills und Finlay 1998] mit dem Hauptziel, endozytische Vesikel durch Reinigung zu entfernen. Dies ist besonders wichtig bei der Analyse von Bakterien-enhaltenden Phagosomen, die nicht zum endozytischen System gehören oder in einem bestimmten Reifungsstadium arretiert sind. In diesen Fällen führt eine verfahrensbedingte Kontamination mit endozytischen Vesikeln zu einer drastischen Fehlinterpretation der Kompartimentierung. Deshalb wurden die einzelnen Fraktionen des Sacchararosegradienten sowie die phagosomale Fraktion auf ihren Gehalt an Protein, frühen Endosomen und Lysosomen untersucht (Tab. 2-4). Dabei wurden die frühen Endosomen wie in anderen Studien [Alvarez-Dominguez et al. 1996; Mukherjee et al. 2000]

durch einen kurzen "chase" mit HRP definiert. Der Gehalt an Lysosomen wurde durch die Aktivität der sauren β -Galaktosidase definiert, die vorwiegend in Lysosomen, aber auch in geringen Maß in späten Endosomen zu finden ist [Ward et al. 1997; Mukherjee et al. 2000; Hashim et al. 2000]. Die Verteilung der früh endosomalen und lysosomalen Enzymaktivitäten sowie der Proteinkonzentrationen über die einzelnen Fraktionen ist für alle Phagosomentypen sehr ähnlich. Dies beweist die gute Reproduzierbarkeit der vorgestellten Methode. Klare Unterschiede gibt es nur in der lysosomalen Enzymaktivität zwischen den einzelnen Proben in den Fraktionen 8-10 und der aus diesen drei Fraktionen resultierenden Endfraktion F, obwohl die Proteinkonzentration sowie der Gehalt an frühen Endosomen in diesen Fraktionen gleich ist. Besonders deutlich wird dieser Unterschied zwischen der nicht infizierten und der mit *Listeria innocua* infizierten Probe. Da schon mehrfach gezeigt wurde, dass *L. innocua*-enthaltende Phagosomen zu Phagolysosomen reifen [Schwan et al. 1994], demonstriert dies die spezifische Anreicherung von Phago(lyso)somen in diesen Fraktionen. Dies stimmt mit der in Tabelle 5 dargestellten Beobachtung überein, dass sich in den Fraktionen 8-10 ungefähr 80% der auf den Saccharosegradienten geladenen Bakterien befinden. Durch die Einführung eines zweiten Gradienten (Ficoll-Kissen) wurde die Kontamination der Phagosomen mit früh endosomalen und lysosomalen Vesikeln verringert. So befinden sich nur 5-10% des auf diesen Gradienten geladenen Materials (Fraktionen 8-10) in der Endfraktion F, während gleichzeitig die Ausbeute an Bakterien, die ein Maß für die Phagosomen darstellt, circa 50% betrug. Die Phagosomen werden also relativ zu den Lysosomen in diesem letzten Schritt 5-10-fach angereichert. Die Kontamination der Endfraktion F mit frühen Endosomen ist mit circa 0,2% der früh endosomalen Enzymaktivität des Startmaterials (PNS) sehr gering. Die Kontamination mit Lysosomen, die an der Endfraktion der nicht infizierten Probe abgelesen werden kann, ist mit circa 0,2% des Startmaterials ebenfalls niedrig. Da es aber neben den endozytischen Organellen auch noch andere Kontaminationen gibt, und es außerdem kaum möglich ist, vollständig reine Phagosomen zu isolieren [Pasquali et al. 1999], wurden die phagosomalen Fraktionen auf eine mögliche Kontamination mit anderem Wirtszellmaterial wie endoplasmatischem Retikulum, Golgi-Apparat, Plasmamembran (siehe Abb. 7 und Tab. 6) und Mitochondrien [Lührmann und Haas 2000] untersucht. Dabei wurden Kontaminationen mit endoplasmatischem Retikulum und Mitochondrien nachgewiesen. Gleichzeitig war keine Kontamination mit Teilen des Golgi-Apparates feststellbar, so dass davon ausgegangen werden kann, dass dieses Organell effektiv entfernt worden ist. Eine Verunreinigung

der phagosomalen Fraktion mit Mitochondrien war erwartet worden, da Dichte und Form von Mitochondrien und Phagosomen sehr ähnlich sind [Lührmann und Haas 2000]. Eine Kontamination mit ER wird bei jeder phagosomalen Präparation, unabhängig von der gewählten Isolierungsmethode, beobachtet [Fialka et al. 1997]. Dabei ist noch nicht vollständig geklärt, ob das ER wirklich als Kontamination zu betrachten ist, oder ob es vielmehr einen wichtigen Bestandteil der Phagosomen darstellt [Garin et al. 2001]. Für letzteres spricht, dass der ER-Gehalt bei den Pseudophagosomen bedeutend niedriger ist als bei den *Afipia felis*- und den *Listeria innocua*-enthaltenden Phagosomen.

Die Kontamination der Präparation mit Plasmamembranbestandteilen war ebenfalls nur sehr gering. In der phagosomalen Fraktion F befanden sich nur 0,06-0,11% der HRP-Aktivität des PNS. Zum Nachweis der Plasmamembran wurden die infizierten J774E-Makrophagen bei 4°C mit HRP inkubiert [Desjardins et al. 1994a; Alvarez-Dominguez et al. 1996; Hashim et al. 2000]. Durch die niedrige Inkubationstemperatur ist die Endozytose blockiert, HRP bindet demnach an den Mannose-Rezeptor auf der Wirtszellmembran [Dunn et al. 1980; Marsh et al. 1986]. Somit ist die Plasmamembran in dieser Studie definiert als das Kompartiment, das zusammen mit HRP gereinigt wird. Die HRP-Aktivitäten repräsentieren direkt die Kontamination mit Plasmamembranbestandteilen.

Als weiteren Nachweis für die relative Reinheit der phagosomalen Fraktionen sind elektronenmikroskopische Techniken zum Einsatz gekommen. Die resultierenden Aufnahmen machen sehr deutlich, dass die Phagosomen intakt und im Vergleich zu anderen zellulären Bestandteilen angereichert sind (Abb. 8). Damit ist die Phagosomenreinigungsmethode sehr gut dafür geeignet, relativ reine Bakterien-enthaltende Phagosomen zu isolieren. Der Vorteil gegenüber anderen bereits beschriebenen Methoden liegt dabei in der höheren Reinheit des Produktes. Allerdings ist ein direkter Vergleich zum Teil recht schwierig, da selten im gleichen Umfang oder mit ähnlichen Methoden die Reinheit der Phagosomen kontrolliert wurde. So geben Sturgill-Koszycki et al. (1996) an, dass die von ihnen gereinigten Mycobakterien-enthaltenden Phagosomen 6-10% andere Wirtszellproteine enthalten. Bei dieser Kontamination handelt es sich nicht um eine selektive Anreicherung eines spezifischen Proteins, wie die Autoren mittels einer 2D-Analyse nachweisen. Allerdings wird kein Hinweis auf die Ausbeute an Phagosomen gegeben. Bei zwei

anderen Methoden wurden die Kontaminationen mit Plasmamembran und Golgi [Desjardins et al. 1994a] oder mit Plasmamembran, Lysosomen, Endosomen, Golgi und ER [Hasim et al. 2000; Mukherjee et al. 2000] untersucht. Dabei wurde jedoch kein Vergleichsmaß wie Proteingehalt oder Ausbeute (Bakterien) angegeben, sondern lediglich die Anteile bestimmter Markerproteine im Produkt relativ zum Starthomogenat. Eine Aussage über die Reinheit und damit ein direkter Vergleich ist so nicht möglich. Da aber sowohl Hasim et al. (2000) als auch Mukherjee et al. (2000) zur Analyse der Phagosomen im Western Blot pro Spur 40µg phagosomales Protein analysiert haben (in dieser Promotionsarbeit 2 µg), ist davon auszugehen, dass die erzielte Ausbeute geringer ist, da die Signalhöhe trotz 20-fachen Proteineinsatzes in etwa gleich ist. Weiter benutzten führende Labors in der Analyse von Phagosomen generell deutlich weniger als 40 µg/Spur [David Russell, Cornell Univ., USA, pers. Mitteilung]. Von einer wesentlich höheren Ausbeute (Bakterien) als die in dieser Promotionsarbeit erzielten circa 40% (Tab. 5) berichten Alvarez-Dominguez et al. (1996). Bei der von dieser Gruppe verwendeten Methode befinden sich 70% der Ausgangs-Bakterienzellzahl in der phagosomalen Fraktion. Allerdings verwenden die Autoren für die Western Blot Analyse, trotz der fast doppelt so hohen Ausbeute, 15x mehr phagosomales Protein. Dies und die Tatsache, dass die Kontamination mit Plasmamembranbestandteilen und Golgi höher zu sein scheint, erlaubt den Schluss, dass diese Methode eine geringere Reinheit der Phagosomen erzielt. Eine andere Methode zur Phagosomenisolierung [Pitt et al. 1992b] weist mit 30% eine fast gleiche Ausbeute an Bakterien auf. Allerdings befinden sich 4% der Ausgangs-Proteinkonzentration in der phagosomalen Fraktion. Dies ist um den Faktor 10 höher als die Proteinkonzentration in der hier vorliegenden Promotionsarbeit (Tab. 2). Deshalb wird wahrscheinlich auch bei dieser Methode zur Phagosomenisolierung eine wesentlich geringere Reinheit erreicht.

Insgesamt verdeutlichen diese Vergleiche, dass mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit etablierten Methode eine gute Ausbeute und vor allem eine höhere Reinheit an Bakterien-enthaltenden Phagosomen erzielt wird. Allerdings ist trotzdem eine weitere Verbesserung der Reinheit wünschenswert. Dabei sollte die relativ hohe Kontamination mit Mitochondrien und endoplasmatischem Retikulum verringert werden. Das ist besonders wichtig, wenn Bakterien-enthaltende Phagosomen untersucht werden sollen, die mit Mitochondrien oder ER assoziiert sind wie zum Beispiel bei *Legionella pneumophila*-enthaltenden Phagosomen. In diesen Fällen

könnte die verfahrensbedingte Kontamination möglicherweise ein interessantes Signal überdecken. Deshalb sind bereits erste Versuche unternommen worden, die Verunreinigung mit Mitochondrien zu verringern (nicht dargestellt). Dazu wurde das Startmaterial, der postnukleäre Überstand (PNS), mit 1mM CaCl₂ für 5 min bei 37°C inkubiert. Dadurch schwellen die Mitochondrien und werden leichter [Arai et al. 1991]. Dies sollte zu einem anderen Laufverhalten im Saccharosegradienten und damit zu einer geringeren Kontamination der phagosomalen Fraktion mit Mitochondrien führen. Bei Vergleichsuntersuchungen wurde allerdings keine Verminderung der Kontamination mit Mitochondrien festgestellt. Eine weitere Möglichkeit, um die Kontamination mit Mitochondrien und endoplasmatischem Retikulum zu verringern, ist eine Inkubation (2-5 min auf Eis) des PNS mit 10 nM ATP Thierry Soldati (ESF Conference: Membrane Dynamics in Endocytosis, Tomar 2001). Dieser Inkubationsschritt sollte in Zukunft getestet werden, um so vielleicht die Kontamination mit Mitochondrien und ER weiter zu verringern.

4.2. Kompartimentierung von *Afipia felis*

Afipia felis wird von Makrophagen phagozytiert und in ein Phagosom verpackt, in dem sich die Bakterien vermehren [Birkness et al. 1992]. Dieses *Afipia felis*-enthaltende Phagosom fusioniert weder mit Ferritin beladenen Lysosomen [Brouqui und Raoult 1993] noch mit Ovalbumin Texas Red (OvTR) beladenen Lysosomen [Schüttfort 2000; Streker 2000]. *Afipia felis*-enthaltende Phagosomen reifen also nicht zu Phagolysosomen. Deshalb sollte im Rahmen dieser Promotionsarbeit untersucht werden, in welchem Kompartiment sich die Afipien innerhalb des Makrophagen befinden.

Um festzustellen, ob Afipien mit dem endozytischen System kommunizieren, wurden die Lysosomen der J774E-Makrophagen mit dem pinozytotisch aufgenommenen, fluoreszierenden Protein Ovalbumin Texas Red markiert und anschließend mit Bakterien infiziert [Swanson 1989; Swanson und Isberg 1996]. Dabei zeigte sich, dass circa 70% der Afipien-enthaltenden Phagosomen nicht mit OvTR kolokalisieren, d. h. nicht zu Phagolysosomen reifen, während unter gleichen Bedingungen circa 80-90% der *Listeria innocua*- und *Bordetella pertussis*-enthaltenden Phagosomen zu Phagolysosomen reifen (siehe Abb. 1A). Eine Erklärung für dieses

Phänomen wäre, dass die Afipien ebenso wie *Listeria monocytogenes* [Goebel und Kuhn 2000] in der Lage sind, aus dem Phagosom ins Zytosol der Wirtszelle auszubrechen. Da aber auf allen verfügbaren elektronenmikroskopischen Aufnahmen [Brouqui und Raoult 1993 und Abb. 8] eindeutig eine Wirtsmembran um die Afipien zu sehen ist, kann diese Möglichkeit ausgeschlossen werden. Demnach befinden sich die meisten Afipien innerhalb der Makrophagen in einem Organell, das nicht zu einem Phagolysosom reift. Bisher sind zwei Gruppen von Bakterien-enthaltenden Phagosomen bekannt, die nicht zu Phagolysosomen reifen. Phagosomen, die entlang des endozytischen Pathways in einem prälysosomalen Kompartiment arretiert sind oder Phagosomen, die aus dem endozytischen System ausgebrochen sind und neuartige Kompartimente etablieren. Das am besten untersuchte Beispiel für arretierte phagosomale Kompartimente sind Phagosomen, die pathogene Mycobakterien enthalten. Diese Phagosomen fusionieren nicht mit spät endosomalen/lysosomalen Vesikeln, aber mit frühen Endosomen [Sturgill-Koszycki et al. 1996; Rittig et al. 2001], stehen also mit dem frühen endozytischen System in Kontakt. Davon ausgehend wurde in der vorliegenden Promotionsarbeit überprüft, ob etablierte Afipien-enthaltende Phagosomen mit irgendeinem endozytischen Kompartiment fusionieren, sich also ähnlich verhalten wie Mycobakterien-enthaltende Phagosomen. Dabei zeigte sich, dass circa 70% der *Afipia felis*-enthaltenden Phagosomen nicht mit dem endozytischen System in Kontakt stehen (siehe Abb. 1B). Insgesamt lassen die oben angegebenen Daten vermuten, dass die Afipien ein Kompartiment etablieren, das nicht zu einem Phagolysosom reift und das auch nicht mit frühen endozytischen Vesikeln fusioniert. Deshalb ist *Afipia felis* nicht in die Gruppe der Bakterien einzuordnen, die eine Hemmung der normalen Phagosomenreifung induzieren.

Das oben mit der OvTR-Methode erzielte Ergebnis sollte mit einer weiteren Methode (Immunfluoreszenz) abgesichert werden. Dazu wurde die Kolokalisierung der etablierten (2 h alten) *Afipia felis*-enthaltenden Phagosomen mit den beiden endozytischen Markerproteinen EEA1 (frühes Endosom) und LAMP-1 (spätes Endosom/Lysosom) bestimmt. Die etablierten Afipien-enthaltenden Phagosomen kolokalisieren nur in geringem Umfang (circa 30%) mit LAMP-1 und gar nicht (circa 3%) mit EEA1. Dies wurde sowohl in der Mausmakrophagen-Zelllinie J774E (Tab. 1A und Abb. 3) als auch in humanen peripheren Blutmonozyten (Tab. 1B) nachgewiesen und bestätigt sowie erweitert die Ergebnisse, die mit der OvTR-Methode erzielt

wurden. Da auch die Analyse der isolierten Afipien-enthaltenden Phagosomen keine Assoziierung mit den früh endosomalen Markerproteinen TfR, EEA1 und TACO sowie nur eine schwache Assoziierung mit den spät endosomalen/lysosomalen Markerproteinen LAMP-1, vATPase und Cathepsin D gezeigt hat (Abb. 9), ist davon auszugehen, dass die Mehrzahl der Afipien sich in einem Kompartiment befinden, das nicht zum endozytischen System gehört. Somit hat das *Afipia felis*-enthaltende Phagosom Ähnlichkeit mit Kompartimenten, die folgende Mikroorganismen enthalten: *Chlamydia trachomatis*, *Legionella pneumophila* oder *Toxoplasma gondii* [Joshi et al. 2001; Mordue und Sibley 1997; Mordue et al. 1999]. Deren Phagosomen sind, ebenso wie *A. felis*-enthaltende Phagosomen, nicht mit Markerproteinen des endosomalen Systems assoziiert und befinden sich in einem nicht endozytischen Kompartiment. Interessanterweise wurde sowohl für die *Legionella pneumophila*-enthaltende Phagosomen [Joshi et al. 2001] als auch die *Toxoplasma gondii*-enthaltenden Phagosomen [Mordue und Sibley 1997; Mordue et al. 1999] gezeigt, dass sie zu jedem Zeitpunkt der Infektion komplett vom endozytischen System abgekoppelt sind, also direkt in ein nicht endozytisches Kompartiment gelangen. Das gilt wahrscheinlich auch für *Chlamydia trachomatis*, obwohl diese Fragestellung bislang noch nicht untersucht wurde.

Um zu klären, ob *Afipia felis* dieses ungewöhnliche Kompartiment bereits bei der Aufnahme oder zu einem späteren Zeitpunkt umprogrammiert, wurde die Reifung der *Afipia felis*-enthaltenden Phagosomen kinetisch untersucht (Abb. 4A). Dabei zeigt sich, dass nur die circa 30% der Afipien-enthaltenden Phagosomen, die nach 2 h positiv für spät endosomale/lysosomale Markerproteine sind, auch zu einem früheren Zeitpunkt (20 min) positiv für den früh endosomalen Marker EEA1 sind. Die Mehrzahl der Afipien befinden sich dagegen zu keinem Zeitpunkt in einem endozytischen Kompartiment. Somit existiert dieses ungewöhnliche, nicht endozytische Kompartiment ebenso wie das *Legionella pneumophila*- und *Toxoplasma gondii*-enthaltende Kompartiment sofort nach der Aufnahme.

Eine weitere Eigenschaft, die *Afipia felis* z. B. mit *Legionella pneumophila* teilt, ist der Anteil an LAMP-1-positiven Phagosomen. So sind 25-30% der *Afipia felis*- und 20-35% der Legionellen-enthaltenden Kompartimente [Roy et al. 1998; Joshi et al. 2001] positiv für dieses spät endosomale/lysosomale Markerprotein. Allerdings gibt es auch Unterschiede. So gibt es

keinen Hinweis dafür, dass *Afipia felis* ebenso wie *Legionella pneumophila* [Horwitz 1983a; Swanson und Isberg 1995], *Toxoplasma gondii* [Jones et al. 1972; Endo et al. 1981; Sinai et al. 1997] oder *Chlamydia trachomatis* [Matsumoto et al. 1991] Wirtszell-Organellen wie Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum rekrutiert. Da die Frage, ob *Afipia felis* mit endoplasmatischem Retikulum oder Mitochondrien assoziiert ist, noch nie Gegenstand einer Untersuchung war, ist eine eindeutige Aussage auch im Rahmen dieser Promotionsarbeit nicht möglich. Auch das mittels Western Blot erzielte Ergebnis, dass weder ER noch Mitochondrien [Lührmann und Haas 2000] in höherem Maße mit isolierten Afipien-enthaltenden Phagosomen als mit anderen isolierten Bakterien-enthaltenden Phagosomen assoziiert sind, ist kein Beweis für eine fehlende Assoziierung mit diesen Organellen. So könnte es sich um eine lose Assoziierung handeln, die während des Isolierungs-Prozesses verloren geht, oder ein mögliches positives Signal könnte vom Hintergrundsignal überdeckt sein. Die zweite Vermutung liegt nahe, da sowohl ER als auch Mitochondrien die hauptsächliche Kontamination bei der hier angewandten Isolierungsmethode darstellen. Deshalb wäre es sinnvoll, die Assoziierung *A. felis*-enthaltender Phagosomen mit ER und Mitochondrien *in situ* zu untersuchen. Außerdem könnte die gewählte Infektionsdauer eine wichtige Rolle bei der Detektion einer möglichen Assoziierung spielen. So sind Legionellen-enthaltende Kompartimente erst nach circa 4 h Infektionsdauer mit rauhem ER assoziiert. Da die hier untersuchten *Afipia felis*-enthaltenden Phagosomen aber erst 2-3 h alt waren, besteht die Möglichkeit, dass eine Assoziierung erst zu einem späteren Zeitpunkt besteht. Deshalb wäre eine Untersuchung über eine längere Infektionsdauer sinnvoll. Außerdem könnte dann auch die Frage geklärt werden, ob die Afipien-enthaltenen Phagosomen, ähnlich wie die Legionellen-enthaltenden Phagosomen [Sturgill-Koszycki und Swanson 2000], sich nach einer 18 h-igen Infektionsdauer in ein saures endozytisches Kompartiment verwandeln.

Da das Schicksal eines Bakteriums im Makrophagen unter anderem von der Vitalität der Bakterien abhängt, wurde überprüft, ob eine Paraformaldehyd-Fixierung der Afipien einen Einfluss auf die Kompartimentierung der Afipien hat. Die Abtötung der Afipien mit Paraformaldehyd führt zu einer Normalisierung der Phagosomenreifung, d. h. wesentlich mehr *Afipia felis*-enthaltende Phagosomen reifen zu Phagolysosomen. Phagosomen, die lebende Afipien enthalten, reifen nur zu circa 30% zu Phagolysosomen, im Gegensatz zu 60% der Phagosomen, die tote Afipien enthalten (Abb.2). Diese Normalisierung der Reifung der

Phagosomen, die tote Afipien enthalten, konnte bereits für hitzeabgetötete Afipien beobachtet werden [Schüttfort 2000; Streker 2000]. Aber auch bei anderen Mikroorganismen ist eine Abhängigkeit der Phagosomenreifung von der Vitalität der Bakterien beobachtet worden. So sind Phagosomen, die durch Hitze bzw. Gamma-Strahlen getötete *Mycobacterium avium* enthalten, mit lysosomalen Markerproteinen kolokalisiert, während Phagosomen, die lebende *Mycobacterium avium* enthalten, nicht mit lysosomalen Markern assoziiert sind [Frehel et al. 1986; Oh und Staubinger 1996]. Die lebenden Mycobakterien sind in der Lage, die Phagosomenreifung zu verhindern, dies können tote Mycobakterien nicht. Ein ähnlicher Unterschied in der Phagosomenreifung wurde auch bei Phagosomen mit *Mycobacterium marinum* [Barker et al. 1997], *Salmonella typhimurium* [Hashim et al. 2000], *Listeria monocytogenes* [Alvarez-Dominguez et al. 1997], *Brucella suis* [Naroeni et al. 2001] oder *Brucella abortus* [Arenas et al. 2000] beobachtet. Wahrscheinlich ist für die Hemmung der Phagosomenreifung jeweils ein von den Mikroorganismen produzierter Faktor verantwortlich. Dabei kann es sich um ein Oberflächenmolekül oder ein sekretiertes Molekül handeln [Haas 1998]. Und da tote Mikroorganismen keinen Metabolismus mehr betreiben können, sind sie nicht in der Lage, die Reifung zu Phagolysosomen zu hemmen.

Aber nicht nur die Vitalität der Bakterien ist für die Etablierung des jeweiligen Kompartiments entscheidend. Auch die Opsonisierung des Bakteriums mit spezifischen Antikörpern kann zur Normalisierung der Phagosomenreifung führen. Dies wurde für *Mycobacterium tuberculosis* [Armstrong und Hart 1975], *Mycobacterium avium* [Frehel und Rastogi 1989], *Toxoplasma gondii* [Sibley et al. 1985], *Rhodococcus equi* [Hietala und Ardans 1987] und *Escherichia coli* [Baorto et al. 1997] beschrieben. Allerdings ist nicht für alle der hier genannten Bakterien vollständig geklärt, ob die durch die Opsonisierung hervorgerufene Normalisierung der Phagosomenreifung durch die Antikörper vermittelte Inaktivierung der für die Reifungshemmung wichtigen bakteriellen Faktoren [De Chastellier und Thilo 1999] oder durch die veränderte Aufnahme über den Fc-Rezeptor bedingt ist [Haas 1998]. Dabei ist der letztgenannte Mechanismus der wahrscheinlichere und kann z. B. bei *Escherichia coli* beobachtet werden. Dieses Bakterium wird nach der Bindung an CD48 internalisiert und kann durch die anschließende Hemmung der Phagosomenreifung sein Überleben sichern. Mit spezifischen Antikörpern opsonisierte *E. coli* dagegen werden über den Fc-Rezeptor und nicht über CD48

aufgenommen, und dieser veränderte Aufnahmeweg führt zur Reifung der *E. coli*-enthaltenden Phagosomen zu Phagolysosomen und somit zum verminderten Überleben des Bakteriums [Baorto et al. 1997]. Mit monoklonalem Antikörper opsonisierte *Afipia felis* kolokalisieren mit circa 60% doppelt so häufig mit dem spät endosomalen/lysosomalen Markerprotein LAMP-1 wie nicht opsonisierte Afipien (Abb. 2), reifen also zu Phagolysosomen. Diese durch die Opsonisierung mit monoklonalem Antikörper hervorgerufene Normalisierung der Phagosomenreifung ist wahrscheinlich nicht auf eine durch den Antikörper bedingte Inaktivierung bakterieller Faktoren, sondern auf den veränderten Aufnahmeweg zurückzuführen. Bisher ist der Rezeptor, der die Aufnahme der nicht opsonierten Afipien durch den Makrophagen vermittelt, noch nicht bekannt. Opsonierte Afipien werden aber im Vergleich zu nicht opsonierten Afipien wesentlich schneller phagozytiert (persönliche Beobachtung sowie Mitteilung von A. Schüttfort), was eine Beteiligung eines anderen Rezeptors erwarten lässt. Da sowohl Phagosomen, die tote oder opsonierte Afipien enthalten in ihrer Mehrzahl (circa 60%) zu Phagolysosomen reifen, sollte überprüft werden wie sich die Phagosomen verhalten, die opsonierte, Paraformaldehyd-fixierte Afipien enthalten. Die Mechanismen, die bei abgetöteten oder opsonierten Afipien zur Normalisierung der Phagosomenreifung führen, scheinen unterschiedlich zu sein. Deshalb wurde bei abgetöteten und opsonierten Afipien ein synergistischer Effekt erwartet, was allerdings nicht der Fall ist (Abb. 2). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist, dass es durch die Paraformaldehyd-Fixierung zu einer Veränderung der Zelloberfläche der Afipien kommt, wodurch der monoklonale Antikörper nicht mehr binden kann. Dadurch würden dann diese so vorbehandelten Afipien nicht über den Fc-Rezeptor aufgenommen. Diese Möglichkeit ist aber unwahrscheinlich, da sowohl die opsonierten, Paraformaldehyd-fixierten als auch die opsonierten Afipien schneller von den Makrophagen phagozytiert werden als nicht opsonierte Afipien. Vielmehr scheint es, dass nur lebende *Afipia felis* ein Oberflächenmolekül exprimieren, das die Aufnahme über einen bislang unbekanntem Rezeptor induziert. Somit werden tote ebenso wie opsonierte Afipien nicht über diesen unbekanntem Rezeptor aufgenommen. Da aber der Aufnahmeweg entscheidend für die Etablierung eines ungewöhnlichen Kompartimentes ist, reift die Mehrzahl der Phagosomen, die tote oder opsonierte Afipien enthalten, zu Phagolysosomen. Bei dem Oberflächenmolekül, das die Aufnahme vermittelt, könnte es sich um ein Protein handeln, wie es auch von Schüttfort (2000) postuliert wird. Brouqui und Raoult (1993) nehmen ebenfalls an, dass es sich bei dem Faktor, der die Phagolysosom-Bildung inhibiert, um ein Protein handelt. Allerdings postulieren

Brouqui und Raoult (1993), dass es sich bei diesem Proteinase K-sensitiven Faktor um einen filtrierbaren und damit löslichen Faktor handelt und nicht um ein Oberflächenmolekül. Diese letzte Behauptung lässt sich aber aus der Versuchsanordnung nicht ablesen, da nur Bakterienlysat und nicht der Überstand der Afipien verwendet wurde.

Anhand der in dieser Promotionsarbeit vorgestellten Ergebnisse lässt sich folgende Hypothese zur Kompartimentierung von *Afipia felis* in J774E-Makrophagen aufstellen:

Afipia felis wird nach der Bindung eines bislang unbekanntes Liganden an einen ebenfalls unbekanntes Makrophagen-Rezeptor vom Makrophagen in ein Phagosom aufgenommen. Dieses *Afipia felis*-enthaltende Phagosom fusioniert nicht mit Endosomen und gehört somit nicht zum endozytischen System [Lührmann et al. 2001]. Da aber nur lebende Afipien in der Lage sind, dieses ungewöhnliche Kompartiment zu etablieren, ist davon auszugehen, dass ein von *Afipia felis* produzierter Faktor dafür verantwortlich ist. Wie dieser Faktor allerdings die Fusion der Afipien-enthaltenden Phagosomen mit Endosomen inhibiert ist noch unklar. Vorstellbar ist, dass *Afipia felis* ebenso wie *Legionella pneumophila*, *Brucella spp.* und *Agrobacterium tumefaciens* über ein Typ IV-Sekretionsapparat verfügt. *Legionella pneumophila* kann mit Hilfe dieses Sekretionssystems wahrscheinlich Proteine ins Wirtszellzytosol injizieren, die eine Fusion des *Legionella pneumophila*-enthaltenden Phagosoms mit Endosomen inhibiert [Coers et al. 2000; Tilney et al. 2001]. Da es aber für das Überleben der Afipien nicht ausreicht, ein nicht endozytisches Kompartiment zu etablieren, ist es sehr wahrscheinlich, dass *Afipia felis*-enthaltende Phagosomen, mit anderen Vesikeln fusionieren um Zugang zu Nährstoffen zu bekommen. Deshalb sollte es möglich sein, charakteristische Proteine für dieses *Afipia felis*-enthaltende Phagosom zu finden. Ein erster Schritt zur Identifizierung von Markerproteinen ist mit der 2D-Gelelektrophorese der *Afipia felis*-enthaltenden Phagosomen (Abb. 10) bereits unternommen worden.

In Abb. III ist ein schematisches Modell der Reifung von *Afipia felis*-enthaltenden Phagosomen dargestellt.

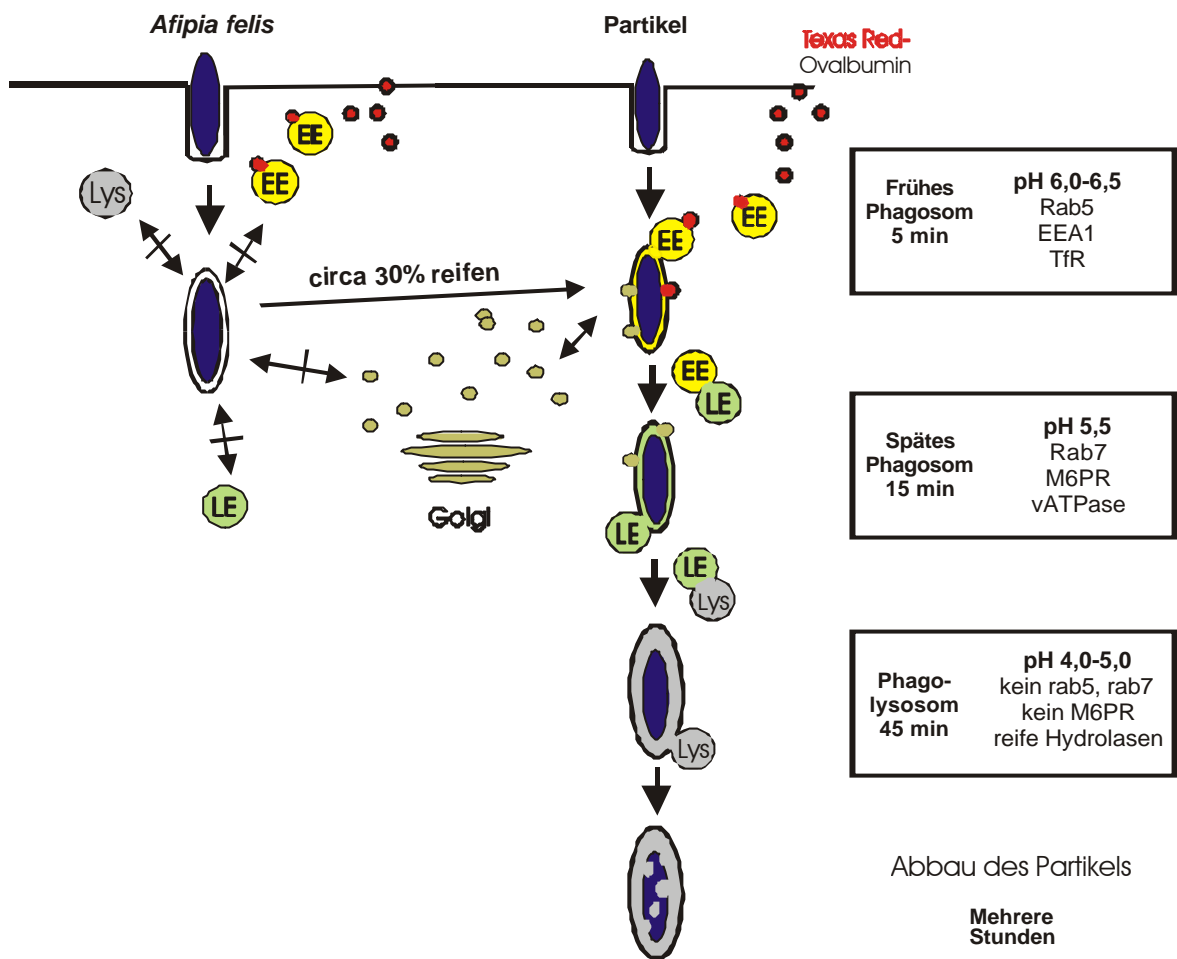


Abb. III: Schematische Darstellung der Reifung von *Afipia felis*-enthaltenden Phagosomen

Dargestellt ist die Reifung eines *Afipia felis*-enthaltenden Phagosoms im Vergleich zur ungestörten, normalen Phagosomenreifung sowie die möglichen Fusionsereignisse mit endozytischen Vesikeln und die daraus resultierenden Charakteristika der verschiedenen Reifungsstadien.

EE – frühes Endosom; LE – spätes Endosom; Lys – Lysosom; M6PR – Mannose-6-Phosphat Rezeptor.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um den für die Aufnahme verwendeten Makrophagen-Rezeptor sowie die Natur des Liganden und damit den Aufnahmeweg aufzuklären. Außerdem sollte es mit Hilfe der 2D-Analyse möglich sein, das *Afipia felis*-enthaltende Phagosom besser zu charakterisieren. Zudem sollte überprüft werden, ob die Afipien Zugang zu Nährstoffen haben, um sich innerhalb des Makrophagen zu vermehren. Diese Fragestellung ist wichtig für das Verständnis der Pathogenese dieses Bakteriums und würde Auskunft über Fusionspartner der *Afipia felis*-enthaltenden Phagosomen geben. Die Untersuchung der Reifung von *Afipia felis*-enthaltenden Phagosomen in Endothel-, Epithel- oder dendritischen Zellen könnte ebenfalls zum

Verständnis der Pathogenese dieses Keimes beitragen. Außerdem könnte der Vergleich der Phagosomenreifung innerhalb der unterschiedlichen Wirtszelltypen zur Identifikation von Faktoren führen, die zur Etablierung des Afipien-enhaltenden Kompartiments beitragen.

4.3. Kompartimentierung von *Rhodococcus equi*

Rhodococcus equi ist ein fakultativ intrazelluläres Bakterium, das von Makrophagen phagozytiert und dabei in ein Phagosom verpackt wird. Dieses *R. equi*-enthaltende Phagosom fusioniert nicht mit Lysosomen und weist Charakteristika eines frühen Endosoms auf [Zink et al. 1987; Hietala und Ardans 1987; Armstrong und D'Arcy Hart 1971].

Wahrscheinlich ermöglicht die Inhibierung der Phagolysosom-Bildung den Rhodokokken sich innerhalb eines Phagosoms zu vermehren [Zink et al. 1987; Hondalus und Mosser 1994]. Die Vermehrung innerhalb des Makrophagen ist mit dem Vorhandensein eines 15-17 kDa Antigens (VapA) assoziiert [Hondalus und Mosser 1994]. VapA, das von einem 85 kbp Plasmid kodiert wird, ist sowohl bei Infektionen von Pferden [Chirino-Trejo und Prescott 1987] als auch bei Mäusen [Takai et al. 1991a] mit Virulenz assoziiert. Deshalb ist es naheliegend anzunehmen, dass auch die Fähigkeit, die Phagolysosom-Bildung zu inhibieren mit dem Vorhandensein des 85 kbp Plasmids bzw. mit der Expression von VapA assoziiert ist. Ob das aber so ist, ist nicht erforscht, da das Virulenz-assozierte Antigen VapA zum Zeitpunkt der Untersuchungen zur Hemmung der Fusion der *Rhodococcus equi*-enthaltenden Phagosomen mit Lysosomen [Zink et al. 1987; Hietala und Ardans 1987] noch nicht bekannt war. Da die Antwort auf diese Frage aber besonders wichtig für das Verstehen der Virulenz von *Rhodococcus* sein dürfte, wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit bei der Untersuchung der Reifung Rhodokokken-enthaltender Phagosomen besonders auf mögliche Unterschiede zwischen Infektionen mit *Rhodococcus equi* mit Plasmid (*R. equi*(+)) bzw. ohne Plasmid (*R. equi*(-)) geachtet.

Als ein Maß für die Reifung der Bakterien-enthaltenden Phagosomen zu Phagolysosomen wurde die Enzymaktivität der sauren β -Galaktosidase in isolierten *Rhodococcus equi*-enthaltenden Phagosomen bestimmt. Dieses lysosomale Enzym wurde in der Literatur schon mehrfach zum Nachweis von Lysosomen bzw. Phagolysosomen beschrieben [Ward et al. 1997; Mukherjee et al. 2000; Hashim et al. 2000]. So lässt sich anhand der β -Galaktosidase-Aktivität ablesen, ob die

Bakterien-enthaltenden Phagosomen zu Phagolysosomen gereift sind oder nicht. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Enzymaktivitäten in *R. equi*(+)- gegenüber *R. equi*(-)-enthaltenden Phagosomen (Abb. 12). Die lysosomale Enzymaktivität der *Rhodococcus equi*(-)-enthaltenden Phagosomen ist doppelt so hoch wie die der *R. equi*(+)-enthaltenden Phagosomen. Dieser Unterschied wird noch größer, wenn die Enzymaktivität der als Negativkontrolle dienenden Pseudophagosomen von denen der anderen Proben abgezogen wird. Wird so die durch die Isolierung bedingte, generelle Kontamination mit Lysosomen korrigiert, ist die lysosomale Enzymaktivität der *R. equi*(-)-enthaltenden Phagosomen 3,7x so hoch wie die Enzymaktivität der *R. equi*(+)-enthaltenden Phagosomen. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Makrophagen wesentlich schneller und vor allem mehr *R. equi*(-) phagozytierten als *R. equi*(+). Dadurch könnte es zu einer wesentlich höheren Ausbeute an *R. equi*(-)-enthaltenden Phagosomen und damit auch an lysosomalen Aktivitäten kommen. Diese Annahme wird durch Ergebnisse von Giguère und Prescott (1998) unterstützt, die mit murinen peritonealen Makrophagen und dem Rhodokokken-Stamm (*R. equi* 103) eine höhere Phagozytoserate der avirulenten *R. equi* feststellten. Aber in Experimenten mit der murinen Makrophagenzelllinie J774E, die mit dem *Rhodococcus equi*-Stamm ATCC 33701 infiziert wurde, konnte kein Unterschied der Phagozytosekinetik abhängig vom 85 kbp Plasmid festgestellt werden [Mauder 2001; persönliche Beobachtung]. Da in dieser Promotionsarbeit die murine Zelllinie J774E und der Rhodokokken-Stamm ATCC 33701 unter gleichen Infektionsbedingungen verwendet wurden, kann die unterschiedliche Enzymaktivität nicht auf unterschiedliche Phagozytoserate und -geschwindigkeit zurückgeführt werden. Vielmehr ist davon auszugehen, dass die unterschiedlichen lysosomalen Aktivitäten durch ein unterschiedliches Reifungsverhalten der Rhodokokken-enthaltenden Phagosomen bedingt ist. Die *Rhodococcus equi*(-)-enthaltenden Phagosomen scheinen zu reifen, während die *Rhodococcus equi*(+)-enthaltenden Phagosomen die Phagosomenreifung inhibieren. Also ist die Hemmung der Phagosomenreifung mit dem Vorhandensein des 85 kbp Plasmids bzw. des von diesem kodierten VapA assoziiert.

Um zu überprüfen, ob *R. equi* (+) wie manche andere Pathogene wie *Listeria monocytogenes* [Smith et al. 1995], *Shigella flexneri* [High et al. 1992] oder *Rickettsia conorii* [Gouin et al. 1999] aus seinem Phagosom ausbrechen kann, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von isolierten *R. equi*(+)-enthaltenden Phagosomen angefertigt. Dabei zeigte sich, dass die

Rhodokokken nicht die Fähigkeit besitzen, aus ihrem Phagosom auszubrechen. Die *R. equi*(+) befinden sich in einem intakten und eng anliegenden Phagosom (Abb. 11). Dies wird durch Beobachtungen von Hondalus (1997) und anhand von in vivo EM-Aufnahmen im eigenen Labor [N. Mauder, pers. Mitteilung] bestätigt. Eine eng das Bakterium umschließende Phagosomenmembran wird auch bei anderen Mikroorganismen beobachtet. So befinden sich Mycobakterien [De Chastellier und Thilo 1997], *Afipia felis* [Lührmann et al. 2001] oder *Brucella suis* [Rittig et al. 2001] ebenfalls in einem engen Phagosom.

Die Rhodokokken haben viele Ähnlichkeiten mit den phylogenetisch verwandten Mycobakterien [Hondalus und Mosser 1994; Giguère et al. 1999]. Unter anderem besitzen beide Gattungen Mykolsäure- [Barry et al. 1998] und Lipoarabinomannan-haltige Zellwände [Flaherty et al. 1996] und sowohl *Mycobacterium tuberculosis* [Deretic und Fratti 1999; Murray 1999] als auch *Rhodococcus equi* [Zink et al. 1987; Bell et al. 1998] können zu Erkrankungen der Atemwege bei Mensch und Tier führen. Deshalb sollte der Fragestellung nachgegangen werden, ob die *R. equi*(+) ebenso wie *Mycobacterium tuberculosis* in der Lage sind, die Phagosomenreifung in einem früh phagosomalen/endosomalen Stadium zu arretieren. Dazu wurde untersucht, ob es zwischen *Rhodococcus equi*(-)- und *Rhodococcus equi*(+)-enthaltenen Phagosomen Unterschiede bei der Assoziierung mit dem früh endosomalen Markerprotein rab5 und den spät endosomalen/lysosomalen Markerproteinen LAMP-1 und vATPase gibt. Dabei zeigte sich, dass sowohl *R. equi*(-)- als auch *R. equi*(+)-enthaltende Phagosomen mit dem früh endosomalen Markerprotein rab5 assoziiert sind (Abb. 13). Das spät endosomale/lysosomale Markerprotein LAMP-1 ist mit den *Rhodococcus equi*(+)-enthaltenden Phagosomen in geringerem Ausmass assoziiert als mit *Rhodococcus equi*(-)-enthaltenden Phagosomen. Im Gegensatz dazu ist die vATPase deutlich mit den *R. equi*(-)- und kaum mit den *R. equi*(+)-enthaltenden Phagosomen assoziiert. Die *R. equi*(+) befinden sich somit in einem Kompartiment, das negativ für vATPase, wenig positiv für LAMP-1 und vor allem stark positiv für rab5 ist. Sie sind deshalb in die Gruppe der Mikroorganismen einzuordnen, die eine Blockierung der normalen Phagosomenreifung induzieren können. Damit hat dieses von *Rhodococcus equi*(+) etablierte Kompartiment große Ähnlichkeit mit dem Mycobakterien-enthaltenden Phagosomen. Auch die Mycobakterien-enthaltenden Phagosomen sind assoziiert mit rab5 [Via et al. 1997], LAMP-1 [Sturgill-Koszycki et al. 1996], aber nicht mit der vATPase [Sturgill-Koszycki et al. 1994]. *Mycobacterium*

tuberculosis-enthaltende Phagosomen sind positiv für rab11 [Fratti et al. 2000], ein Markerprotein für perinukleäre Recycling-Endosomen [Sheff et al. 1999; Sönnichsen et al. 2000; Zerial und McBride 2001; De Renzis et al. 2002], deshalb wird angenommen, dass sich die Mycobakterien in einem frühen Recycling- bzw. Sorting-Endosom befinden [Schaible et al. 1999]. Für die Etablierung dieses *Mycobacterium tuberculosis*-enthaltenden Phagosoms scheint der Ausschluss des rab5 Effektorproteins EEA1 von der phagosomalen Membran von entscheidender Bedeutung zu sein [Fratti et al. 2000; Fratti et al. 2001]. Aufgrund der hier dargestellten Daten ist es möglich, dass sich *R. equi*(+) ebenfalls in einem Recycling-Endosom befinden. Für den Nachweis dieser Hypothese sind weitere Untersuchungen der Rhodokokken-enthaltenden Phagosomen notwendig.

Die Assoziierung der *R. equi*(-)-enthaltenden Phagosomen mit den beiden spät endosomalen/lysosomalen Markerproteinen LAMP-1 und vATPase war erwartet worden, da Phagolysosomen mit diesen beiden Proteinen assoziiert sind [Desjardins 1995]. Dagegen sind Phagolysosomen nicht mit dem früh endosomalen Markerprotein rab5 assoziiert [Storrie und Desjardins 1996]. Somit scheint es sich bei den *R. equi*(-)-enthaltenden Phagosomen um eine heterogene Population zu handeln. Eine kinetische Untersuchung des Reifungsverhaltens der *R. equi*(-)-enthaltenden Phagosomen würde Aufschluss über die Ursachen für die Assoziierung mit rab5, LAMP-1 und vATPase geben. Ein Grund für die Assoziierung mit dem früh endosomalen Markerprotein rab5 könnte sein, dass auch *R. equi*(-) die Phagosomenreifung inhibieren bzw. in einem früh endosomalen/phagosomalen Stadium arretieren kann. Diese Inhibierung der Phagosomenreifung wäre allerdings zeitlich begrenzt, d. h. nach einiger Zeit fusionieren diese *R. equi*(-)-enthaltenden Phagosomen mit späten Endosomen und Lysosomen und werden positiv für LAMP-1 und vATPase. Da sich in der Gesamtpopulation der isolierten *Rhodococcus equi*(-)-enthaltenden Phagosomen sowohl rab5 als auch LAMP-1 und vATPase befindet, ist anzunehmen, dass es sich um einen sehr langsamen Reifungsprozess handelt. Dadurch würde sich eine Subpopulation der *R. equi*(-)-enthaltenden Phagosomen in einem frühen endosomalen/phagosomalen Stadium befinden, während eine andere Subpopulation bereits zu einem Phagolysosom gereift wäre.

Anhand der hier dargestellten Ergebnisse der *R. equi*(+)- und *R. equi*(-)-enthaltenden Phagosomen lässt sich folgende Hypothese aufstellen:

Rhodokokken sind unabhängig vom Vorhandensein des 85 kbp Plasmids in der Lage, die Phagosomenreifung zu verlangsamen bzw. das Rhodokokken-enthaltende Phagosom für einen bislang unbekanntem Zeitraum in einem frühen Stadium zu arretieren. Diese Fähigkeit der Rhodokokken würde auch die von E. Fernandez (dieses Labor) erzielten Ergebnisse erklären, die unabhängig vom Plasmid nur eine geringe Kolo-kalisierung (20-30%) der Rhodokokken-enthaltenden Phagosomen mit 10 kDa Dextran Texas Red markierten Lysosomen feststellte. Dass auch Phagosomen, die tote *R. equi*(+) enthalten, nur zu circa 30% mit Dextran Texas Red markierten Lysosomen kolo-kalisieren, lässt vermuten, dass die Hemmung bzw. die Verlangsamung der Fusion der Rhodokokken-enthaltenden Phagosomen mit Lysosomen nicht auf ein vom 85 kbp Plasmid kodiertes Molekül zurückzuführen ist [Fernandez 2001]. Die Hemmung der Fusiogenität könnte unter anderem durch den Cord Faktor bedingt sein, da für dieses Zellwand-Glykolipid der Rhodokokken eine fusionshemmende Wirkung nachgewiesen wurde [Spargo et al. 1991]. Aber da *R. equi*(-) die Phagosomenreifung zwar verlangsamen, aber letztendlich nicht verhindern kann reifen die Phagosomen, die *R. equi*(-) enthalten, nach einiger Zeit zu Phagolysosomen. Im Gegensatz dazu kann *R. equi*(+) wahrscheinlich ein frühes Recycling-Endosom etablieren, und verhindert so langfristig die Phagolysosom-Bildung. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass mindestens ein vom 85 kbp Plasmid kodiertes Molekül für die weitere Reifungshemmung bzw. Etablierung der *R. equi*(+)-enthaltenden Phagosomen verantwortlich ist. Dieses Molekül könnte direkt oder indirekt die Fusion mit späten Endosomen und Lysosomen hemmen und/oder die Fusion mit Recycling-Endosomen induzieren. So könnte dieses Molekül den Ausschluss des früh endosomalen Antigens 1 (EEA1) von der phagosomalen Membran induzieren und so wie bei *Mycobacterium tuberculosis*-enthaltenden Phagosomen, zur Etablierung eines Recycling-Endosoms führen [Fratti et al. 2000; Fratti et al. 2001]. Die Etablierung eines Recycling-Endosoms schützt die Rhodokokken vor den tödlichen Bedingungen in den Phagolysosomen und gewährleistet ihnen gleichzeitig den Zugang zu Nährstoffen. Diese Versorgung mit Eisen und anderen Nährstoffen ist wichtig für die Vermehrung der Rhodokokken.

Um diese Hypothese zu bestätigen bzw. zu widerlegen, sind folgende Versuche notwendig:

1. Untersuchung, ob die isolierten Rhodokokken-enthaltenden Phagosomen zu irgendeinem Zeitpunkt mit Markern der Recycling-Endosomen (rab4, rab11) assoziiert sind. So könnte nachgewiesen werden, dass *R. equi*(+) aber nicht *R. equi*(-) ein Recycling-Endosom etabliert.
2. Kinetik der Assoziation der *R. equi*(+)-enthaltenden Phagosomen mit EEA1. Dadurch könnte festgestellt werden, ob ebenso wie bei *Mycobacterium tuberculosis* ein Ausschluss von EEA1 von der phagosomalen Membran für die Etablierung eines Recycling-Endosoms entscheidend ist.
3. Kinetik der Assoziation der Rhodokokken-enthaltenden Phagosomen mit spät endosomalen/lysosomalen Markerproteinen (z. B. LAMP-1, vATPase, rab7 und Cathepsin D). So würde die Reifung der *R. equi*(-)-enthaltenden Phagosomen zu Phagolysosomen nachgewiesen.
4. Kinetik der Kollokalisierung der Rhodokokken-enthaltenden Phagosomen mit Dextran Texas Red. So könnte nachgewiesen werden, dass *R. equi*(-) im Gegensatz zu *R. equi*(+)-enthaltende Phagosomen nach einiger Zeit zu Phagolysosomen reifen.

Durch die in den Punkten 1-4 genannten Untersuchungen könnte außerdem festgestellt werden, wie lange die Rhodokokken unabhängig vom Plasmid die Phagosomenreifung hemmen.

4.4. Einfluss von Rhodococcus equi auf die Vitalität ihrer Wirtszellen

In einigen Arbeiten wurde ein zytotoxischer Einfluss phagozytierter Rhodokokken auf ihre Wirtszellen beschrieben [Hietala und Ardans 1987; Zink et al. 1987; Nordmann et al. 1994; Mauder 2001]. Jedoch wurde nur in einer Arbeit die Rolle des 85 kbp Plasmids bei der durch Rhodokokken vermittelten Zytotoxizität untersucht. So fand Mauder (2001), dass *R. equi*(+) stark zytotoxisch und *R. equi*(-) nur sehr gering zytotoxisch auf J774E-Mausmakrophagen wirken. Allerdings können nur vitale Rhodokokken einen Vitalitätsverlust ihrer Wirtszellen induzieren. Ob es sich bei dem durch *R. equi* induzierten Tod der Wirtszellen um Apoptose oder Nekrose handelt, wurde bislang in keiner der genannten Arbeiten untersucht. Da sowohl die

Frage, ob *R. equi*(+) und *R. equi*(-) unterschiedlich zytotoxisch für ihre Wirtszellen sind, als auch die Frage, ob es sich bei der durch Rhodokokken vermittelten Zytotoxizität um Apoptose oder Nekrose handelt, für das Verständnis der Immunantwort des Wirtsorganismus und der Pathogenese des Mikroorganismus von entscheidender Bedeutung ist, wurde beides in dieser Promotionsarbeit untersucht.

Um festzustellen, ob es sich bei der durch Rhodokokken vermittelten Zytotoxizität um Apoptose handelt, wurden die mit *Rhodococcus equi* infizierten Mausmakrophagen auf eine Spaltung ihrer DNA untersucht. Es wurde vermutet, dass es sich bei dem durch Rhodokokken induzierten Zelltod um Apoptose handelt, da die mit *Rhodococcus equi* nahe verwandten sowie bei der Phagosomenreifung sich ähnlich verhaltenden *Mycobacterium tuberculosis* in Makrophagen Apoptose induzieren können [Keane et al. 1997; Balcewicz-Sablinska et al. 1999; Keane et al. 2000]. Zum Nachweis eines verminderten DNA-Gehaltes wurde die Wirtzellmembran permeabilisiert, um leichtmolekulare DNA-Fragmente zu extrahieren. Anschließend wurde die in den fixierten Zellen verbliebene DNA mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff markiert [Nicolettiet al. 1991; Telford et al. 1992]. Mit Hilfe der durchflusszytometrischen Messung der Fluoreszenz-Intensität der Zellen ist so ein Rückschluss auf den DNA-Gehalt möglich [Del Bino et al. 1992; Telford et al. 1994]. Da bei der Apoptose die DNA internukleosomal gespalten wird [Wyllie 1980; Compton 1992], während bei der Nekrose die DNA stabil bleibt [Searle et al. 1982; Kubbies et al. 1993], ist es mit dieser SubG₁-Technik genannten Methode möglich, den apoptotischen Zelltod anhand des DNA-Verlustes nachzuweisen. Dabei zeigte sich, dass die Inkubation mit dem Topoisomerase-Inhibitor und Apoptose-Induktor Etoposid [Steffanelli et al. 1998] bei Makrophagen Apoptose induziert, während weder eine Infektion mit *Rhodococcus equi*(+) noch mit *Rhodococcus equi*(-) zu einem apoptotischen Zelltod der J774E-Mausmakrophagen führte (Abb. 15).

Um eindeutig ausschließen zu können, dass es sich bei dem durch Rhodokokken vermittelten Vitalitätsverlust der infizierten Zellen um Apoptose handelt, wurde ein weiteres Kriterium des apoptotischen Zelltodes untersucht. Dies ist notwendig, da es auch Formen der Apoptose gibt, bei denen die DNA intakt bleibt und keine Strangbrüche aufweist [Cohen et al. 1992]. Deshalb wurde untersucht, ob die Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) der mit *R. equi* infizierten

J774E-Mausmakrophagen gespalten wurde. Die PARP ist ein 116 kDa Kernprotein, das ein wichtiges DNA Reparaturenzym darstellt [Shah et al. 1996]. Während der Apoptose ist PARP eines der ersten Proteine, das durch Caspasen gespalten wird [Rosen und Casciola-Rosen 1997]. Dabei wird die N-terminale DNA Bindungsdomäne (24 kDa) von der C-terminalen katalytischen Domäne (89 kDa) abgespalten. Da PARP nur in apoptotischen und nicht in nekrotischen Zellen gespalten wird [Ha und Snyder 1999], dienen die Spaltprodukte der PARP als Apoptosenachweis. Dabei zeigte sich, dass weder die mit *R. equi*(+) noch die mit *R. equi*(-) infizierten Makrophagen, im Gegensatz zu Makrophagen, die mit dem Apoptose-Induktor Etoposid inkubiert wurden, Spaltprodukte der PARP aufwiesen (Abb. 14). Mit Hilfe der oben beschriebenen Methoden kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem durch Rhodokokken vermittelten Vitalitätsverlust der Wirtszellen um Apoptose handelt. Deshalb wurden die mit *Rhodococcus equi* infizierten Mausmakrophagen auf Nekrose untersucht. Dazu wurden die mit Rhodokokken infizierten J774E-Makrophagen mit dem Fluoreszenzfarbstoff 7-AAD inkubiert, der die DNA aller permeablen Zellen färbt. Da vitale und apoptotische Zellen intakte Membranen besitzen und somit diesen Farbstoff ausschließen, wird nur die DNA nekrotischer Zellen mit diesem Farbstoff gefärbt. Dabei zeigte sich, dass die mit *R. equi*(+) infizierten J774E-Mausmakrophagen nach einer 6 h-igen Inkubationszeit zu circa 30% 7-AAD-positiv sind. Dagegen sind nur circa 5% der mit *R. equi*(-) infizierten Mausmakrophagen positiv für 7-AAD (Abb. 16). Somit handelt es sich bei dem durch *R. equi*(+) vermittelten Vitalitätsverlust der infizierten Mausmakrophagen um Nekrose. Durch den nekrotischen Wirtszelltod kann es zu einer schädlichen Entzündungsreaktion kommen [Alberts et al. 2001], in deren Folge es zur Granulomabildung kommen kann. Diese wird bei einer Infektion mit Rhodokokken sehr häufig beobachtet [Takai et al. 1995].

Bisher ist nicht genau geklärt, wie die Rhodokokken den nekrotischen Zelltod ihrer Wirtszellen induzieren und welche Funktion dabei das 85 kbp Plasmid hat. Nordmann et al. (1994) stellten fest, dass der Überstand von virulenten Rhodokokken zytotoxisch für L929-, Vero- und HeLa-Zellen ist. Dieser lösliche und toxische Faktor wurde allerdings nur von virulenten *Rhodococcus equi* produziert, die bei 37°C kultiviert wurden. Da das vom 85 kbp Plasmid kodierte VapA nur bei Temperaturen von 34-41°C [Takai et al. 1992] exprimiert wird, liegt nahe anzunehmen, dass es sich bei dem toxischen Faktor um VapA oder um ein ebenfalls temperaturabhängig exprimiertes, vom 85 kbp Plasmid kodiertes Molekül handelt. Allerdings hatte der Überstand der

bei 37°C kultivierten *R. equi*(+) keinen zytotoxischen Einfluss auf die Mausmakrophagenlinie J774E [Mauder 2001]. Trotzdem ist sehr wahrscheinlich, dass es sich bei dem zytotoxischen Agens um ein von den Rhodokokken ständig neu produzierten Faktor handelt, da Nekrose im Gegensatz zur Apoptose ein passiver Prozess ist, und tote *R. equi*(+) nicht zytotoxisch für J774E-Makrophagen sind [Mauder 2001]. Es könnte sich bei diesem toxischen Faktor um ein porenbildendes Molekül handeln. So wird vermutet, dass es sich bei dem von *Mycobacterium tuberculosis* produzierten und für infizierte Lungenepithelzellen nekrotisch wirkenden Faktor um ein solches Molekül handelt [Dobos et al. 2000]. Dieses porenbildende Molekül könnte von dem 85 kbp Plasmid kodiert werden. Allerdings ist auch denkbar, dass dieses toxische Molekül unabhängig von dem 85 kbp Plasmid, aber abhängig von der Wachstumsphase der Rhodokokken exprimiert wird. So wird bei *Legionella pneumophila* beobachtet, dass nur in der exponentiellen Wachstumsphase befindliche Legionellen ein für die Wirtszellen toxisches Molekül exprimieren [Byrne und Swanson 1998; Gao und Kwaik 1999a]. Sollte das für die Wirtszellen toxische Molekül von den Rhodokokken ebenso wie jenes der Legionellen in Abhängigkeit von der Wachstumsphase und unabhängig vom Virulenzplasmid exprimiert werden, wäre das 85 kbp Plasmid der Rhodokokken ausschließlich für die Etablierung eines Kompartimentes verantwortlich, in dem sich die Bakterien teilen bzw. vermehren können.

Da nur virulente und das 85 kbp Plasmid-enthaltende *R. equi* zytotoxisch für Mausmakrophagen sind, wurde untersucht, ob es einen ähnlichen Zusammenhang auch in humanen Monozyten gibt. Diese Fragestellung ist deshalb besonders interessant, da immunkompetente Menschen nur in den seltensten Fällen von *R. equi* erfolgreich infiziert werden [Kedlaya et al. 2001]. In Abbildung 17 ist dargestellt, dass Rhodokokken unabhängig vom Vorhandensein des 85 kbp Plasmids nur geringfügig zytotoxisch für humane Monozyten sind.

Somit erlauben die in dieser Promotionsarbeit dargestellten Ergebnisse folgende Arbeitshypothese:

Das 85 kbp Plasmid ist in phagozytischen Zellen der Maus für die Etablierung eines Kompartimentes notwendig, in dem sich die Rhodokokken vermehren können. Somit können sich nur *R. equi*(+) in ihren Wirtszellen vermehren. Abhängig von der Wachstumsphase exprimieren die Rhodokokken dann allerdings unabhängig vom Vorhandensein des 85 kbp Plasmid einen toxischen Faktor, der zum nekrotischen Zelltod der Wirtszelle führt. Da die *R.*

equi(-) nicht in der Lage sind, ein Kompartiment zu etablieren, in dem sie sich vermehren können, produzieren sie auch keinen zytotoxischen Faktor. Somit ist die durch Rhodokokken vermittelte Zytotoxizität nur indirekt mit Virulenz assoziiert.

Durch Herstellung rekombinanter Rhodokokken-Stämme sollte es möglich sein, den oder die Faktoren zu bestimmen, die für die Vermittlung der Zytotoxizität wichtig sind. Gleichzeitig könnte so auch zwischen den Faktoren, die für die Kompartimentierung und Zytotoxizität der Rhodokokken entscheidend sind, unterschieden werden.

5. Zusammenfassung

Die Isolierung von Phagosomen ermöglicht die biochemische Analyse der Phagosomen-Zusammensetzung sowie der an der Phagosomenreifung beteiligten Moleküle. Deshalb wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, Bakterien-enthaltende Phagosomen zu isolieren. Diese Methode erzielt im Vergleich zu anderen in der Literatur beschriebenen Methoden eine gute Ausbeute (fast 40%) und vor allem eine höhere Reinheit an Bakterien-enthaltenden Phagosomen. So besteht keine Kontamination mit Teilen des Golgi-Apparates und nur eine sehr geringe Kontamination mit endosomalen und lysosomalen Proteinen sowie Plasmamembranbestandteilen. Allerdings wurde eine Kontamination mit Mitochondrien und ER detektiert. Letzteres muss nicht unbedingt eine Kontamination darstellen, sondern könnte ein wichtiger Bestandteil von Phagosomen sein.

Afipia felis ist ein Gram-negatives Bakterium, das für einige Fälle der Katzen-Kratz Krankheit verantwortlich ist. Es kann innerhalb von Makrophagen überleben und sich vermehren. Die genaue Kompartimentierung der *Afipia felis*-enthaltenden Phagosomen in Makrophagen war allerdings unbekannt und sollte deshalb in der vorliegenden Promotionsarbeit analysiert werden. Ovalbumin Texas Red, mit dem Lysosomen vor der Infektion markiert wurden, gelangt nicht in die Afipien-enthaltenden Phagosomen, und die Afipien-enthaltenden Phagosomen sind auch nicht zugänglich für Ovalbumin Texas Red, mit dem das gesamte endozytische System nach der etablierten Infektion markiert wurde. Außerdem sind etablierte, isolierte *Afipia felis*-enthaltende Phagosomen nur in geringem Umfang positiv für spät endosomale/lysosomale Markerproteine und negativ für früh endosomale Markerproteine. Die Afipien, die ein nicht endozytisches Kompartiment etablieren, werden vom Makrophagen in ein EEA1-negatives Kompartiment aufgenommen, das auch zu späteren Zeitpunkten negativ für LAMP-1 ist. Nur die circa 30% der Afipien, die sich in einem Kompartiment befinden, das zum endozytischen System gehört, gelangen nach der Aufnahme durch den Makrophagen in ein EEA1-positives Kompartiment, das zu einem späteren Zeitpunkt positiv für LAMP-1 wird. Tötung der Afipien oder Opsonisierung mit Antikörpern vor der Infektion normalisiert die Reifung der *Afipia felis*-enthaltenden Phagosomen in den J774E-Makrophagen.

Somit konnte nachgewiesen werden, dass die Mehrzahl der Phagosomen (70%), die *Afipia felis* enthalten, nicht zum endozytischen System gehören. Diese ungewöhnliche Kompartimentierung besteht bereits bei der Aufnahme und kann nur von lebenden Afipien etabliert werden.

Rhodococcus equi ist ein Gram-positives Bakterium, das unter anderem Bronchopneumonien beim Fohlen verursacht. Aber auch Menschen und andere Säugetiere sind von Infektionen mit *R. equi* betroffen. Die Fähigkeit der Rhodokokken, innerhalb der Makrophagen zu überleben und sich zu vermehren, ist mit dem Vorhandensein eines 85 kbp Plasmids assoziiert. Da über die genaue Kompartimentierung von *R. equi* im Mausmakrophagen wenig bekannt war, und der Frage, ob es einen Unterschied zwischen der Kompartimentierung von *R. equi*(+)- und *R. equi*(-)-enthaltenden Phagosomen gibt, noch nicht nachgegangen wurde, war beides Thema dieser Promotionsarbeit. Dabei zeigt sich, dass *R. equi*(-)-enthaltende Phagosomen wesentlich stärker mit den spät endosomalen/lysosomalen Markerproteinen vATPase und LAMP-1 assoziiert sind sowie eine höhere β -Galaktosidase-Aktivität aufweisen als die *R. equi*(+)-enthaltenden Phagosomen. Da sowohl die isolierten *R. equi*(-)- als auch die *R. equi*(+)-enthaltenden Phagosomen mit dem früh endosomalen Markerprotein rab5 assoziiert sind, ist anzunehmen, dass Rhodokokken unabhängig vom Vorhandensein des 85 kbp Plasmids in der Lage sind, die Phagosomenreifung zu verzögern. Aber *R. equi*(-) kann die Reifung zwar verzögern, aber letztendlich nicht verhindern. Wahrscheinlich reifen die Phagosomen, die *R. equi*(-) enthalten, zu einem späteren Zeitpunkt zu Phagolysosomen, wohingegen *R. equi*(+) ein ungewöhnliches Kompartiment etabliert und dadurch die Phagosomenreifung endgültig zu verhindern scheint. Somit ist anzunehmen, dass mindestens ein vom 85 kbp Plasmid kodiertes Molekül für die Etablierung dieses ungewöhnlichen, *R. equi*(+)-enthaltenden Kompartimentes, verantwortlich ist.

Da eine Infektion mit *Rhodococcus equi* zytotoxisch für die infizierte Zelle sein kann, wurde die von den Rhodokokken vermittelte Zytotoxizität näher analysiert. Die in dieser vorliegenden Promotionsarbeit dargestellten Ergebnisse zeigen deutlich, dass nur die Plasmid-enthaltenden Rhodokokken zur Nekrose, aber nicht zur Apoptose ihrer Wirtszellen führen, während *R. equi*(-) keinen Einfluss auf die Vitalität ihrer Wirtszellen haben. Dieses Phänomen ist allerdings abhängig vom Wirtszelltyp. So sind *R. equi*(-) als auch *R. equi*(+) für humane Monozyten nur geringfügig zytotoxisch.

6. Summary

The isolation of phagosomes from phagocytes enables their fine biochemical analysis as well as the determination of the role of various molecules in phagosome biogenesis. Therefore, a method to purify bacteria-containing phagosomes from infected macrophages has been established in this study. In comparison with previously described methods a good yield (40%) and a higher level of purity of bacteria-containing phagosomes were obtained using this phagosome isolation method. No Golgi-derived contamination and only very little endosomal or lysosomal and plasma membrane-derived contaminations was found. Furthermore, some mitochondrial and ER contaminations were detectable.

Afipia felis is a Gram-negative bacterium that causes some cases of human Cat Scratch Disease. It can survive and multiply in macrophages, but the precise intracellular compartmentalization of *Afipia felis*-containing phagosomes is unknown. In this study we show evidence, that 70% of *Afipia felis*-containing phagosomes do not belong to the endocytic pathway. This is supported by the facts that neither did ovalbumin preloaded into lysosomes enter most *Afipia felis*-containing phagosomes, nor did ovalbumin loaded into the endocytic system after infection. Furthermore the percentage of isolated *Afipia felis*-containing phagosomes positive for late endosomal/lysosomal markerproteins were very low and early endosomal marker proteins were rarely detectable. Those bacteria that were to be found in a nonendosomal compartment entered the macrophage via an EEA1-negative compartment, which remained negative for LAMP-1. The small population of *Afipia felis* whose phagosomes were part of the endocytic system entered into an EEA1-positive compartment which also subsequently acquired LAMP-1. Killing of *Afipia felis* or opsonization with antibodies before infection lead to a strong increase in the percentage of *Afipia felis*-containing phagosomes that interact with the endocytic system.

We conclude that most phagosomes containing *Afipia felis* are disconnected from the endocytic system. This unusual compartalization is decided at uptake and can only be established by viable *Afipia felis*.

Rhodococcus equi is a Gram-positive bacterium that causes granulomatous pneumonia in foals. It is also a pathogen for other animals and human beings. The pathogenicity of *Rhodococcus equi* is

depending on its ability to exist and multiply inside macrophages and this correlates with the presence of a 85 kbp plasmid. The aim of this study was to elucidate the intracellular compartmentation of *Rhodococcus equi* and the mechanism by which the bacteria might avoid the destruction in host macrophages. The importance of the virulence-associated plasmid was also evaluated. In this study it is shown that *R. equi*(-)-containing phagosomes contained much more of the late endosomal/lysosomal marker proteins vATPase or LAMP-1 and also a larger amount of the lysosomal enzyme β -galactosidase than *R. equi*(+)-containing phagosomes. Both *R. equi*(+)- and *R. equi*(-)-containing phagosomes associated with the early endosomal marker protein rab5. Based on these results it can be speculated that *Rhodococcus equi* is able to slow down or arrest the maturation of its phagosome independently of the 85 kbp virulence-associated plasmid. Whereas *R. equi*(-) is able to slow down but not to arrest its phagosomes, *R. equi*(+) establishes an unusual compartment, which possibly represents a recycling-endosome. Therefore, for the long term establishment of the unusual *R. equi*(+)-containing phagosomes at least one of the molecules encoded by the 85 kbp plasmid is necessary.

Since *Rhodococcus equi* infection ultimately proves toxic for macrophages, the *R. equi* mediated cytotoxicity was analyzed. In this study it is shown that *Rhodococcus equi* induce necrosis in their host cells and which is dependent on the presence of the virulence-associated 85 kbp plasmid. But the *Rhodococcus* induced necrosis can only be observed in mouse macrophages and not in human monocytes.

7. Literaturverzeichnis

Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2001). Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie. Wiley-VCH Weinheim · New York · Chichester · Brisbane · Singapore · Toronto, 2. korrigierte Auflage.

Alexander J, Vickerman K (1975). Fusion of host cell secondary lysosomes with the parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. *J Protozool* 22: 502-508.

Al-Haddad A, Shonn MA, Redlich B, Blocker A, Burkhardt JK, Yu H, Hammer JA 3rd, Weiss DG, Steffen W, Griffiths G, Kuznetsov SA (2001). Myosin Va bound to phagosomes binds to F-actin and delays microtubule-dependent motility. *Mol Biol Cell* 12: 2742-2755.

Alkan S, Morgan MB, Sandin RL, Moscinski LC, Ross CW (1995). Dual role for *Afipia felis* and *Rochalimaea henselae* in cat-scratch disease. *Lancet* 345: 385.

Alli OA, Gao LY, Pedersen LL, Zink S, Radulic M, Doric M, Abu Kwaik Y (2000). Temporal pore formation-mediated egress from macrophages and alveolar epithelial cells by *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 68: 6431-6440.

Alvarez-Dominguez C, Barbieri AM, Beron W, Wandinger-Ness A, Stahl PD (1996). Phagocytosed live *Listeria monocytogenes* influences Rab5-regulated in vitro phagosome-endosome fusion. *J Biol Chem* 271: 13834-13843.

Alvarez-Dominguez C, Roberts R, Stahl PD (1997). Internalized *Listeria monocytogenes* modulates intracellular trafficking and delays maturation of the phagosome. *J Cell Sci* 110: 731-743.

Andrews NW (1994). From lysosomes into the cytosol: the intracellular pathway of *Trypanosoma cruzi*. *Braz J Med Biol Res* 27: 471-475.

Antoine JC, Prina E, Jouanne C, Bongrand P (1990). Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. *Infect Immun* 58: 779-787.

Arai K, Kanaseki T, Ohkuma S (1991). Isolation of high purified lysosomes from rat liver: identification of electron carrier components on lysosomal membranes. *J Biochem* 110: 541-547.

Arenas GN, Staskevich AS, Aballay A, Mayorga LS (2000). Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages. *Infect Immun* 68: 4255-4263.

Armstrong JA, D'Arcy Hart P (1971). Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J Exp Med* 134: 713-740.

Armstrong JA, Hart PD (1975). Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. *J Exp Med* 142: 1-16.

Baca OG, Li YP, Kumar H (1994). Survival of the Q fever agent *Coxiella burnetii* in the phagolysosome. *Trends Microbiol* 2: 476-480.

- Balcewicz-Sablinska MK, Gan H, Remold HG (1999). Interleukin 10 produced by macrophages inoculated with *Mycobacterium avium* attenuates mycobacteria-induced apoptosis by reduction of TNF-alpha activity. *J Infect Dis* 180: 1230-1237.
- Baorto DM, Gao Z, Malaviya R, Dustin ML, van der Merwe A, Lublin DM, Abraham SN (1997). Survival of FimH-expressing enterobacteria in macrophages relies on glycolipid traffic. *Nature* 389: 636-639.
- Barker LP, George KM, Falkow S, Small PL (1997). Differential trafficking of live and dead *Mycobacterium marinum* organisms in macrophages. *Infect Immun* 65: 1497-1504.
- Barnewall RE, Rikihisa Y, Lee EH (1997). *Ehrlichia chaffeensis* inclusions are early endosomes which selectively accumulate transferrin receptor. *Infect Immun* 65: 1455-1461.
- Barr PJ, Tomei LD (1994). Apoptosis and its role in human disease. *Bio/Technology* 12, 487-493.
- Barry CE 3rd, Lee RE, Mdluli K, Sampson AE, Schroeder BG, Slayden RA, Yuan Y (1998). Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Prog Lipid Res* 37: 143-179.
- Barton MD, Hughes KL (1984). Ecology of *Rhodococcus equi*. *Vet Microbiol* 9: 65-76.
- Beckers CJ, Dubremetz JF, Mercereau-Puijalon O, Joiner KA (1994). The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. *J Cell Biol* 127: 947-961.
- Bell KS, Philip JC, Aw DWJ, Christofi N (1998). The genus *Rhodococcus*. *Journal of Applied Microbiology* 85: 195-210.
- Béron W, Colombo MI, Mayorga LS, Stahl PD (1995). In vitro reconstitution of phagosomendosome fusion: evidence for regulation by heterotrimeric GTPases. *Arch Biochem Biophys* 317: 337-342.
- Birkness KA, George VG, White EH, Stephens DS, Quinn FD (1992). Intracellular growth of *Afipia felis*, a putative etiologic agent of cat scratch disease. *Infect Immun* 60: 2281-2287.
- Black JR, Herrington DA, Hadfield TL, Waer DJ, Margileth AM, Shigekawa B (1986). Life-threatening cat-scratch disease in an immunocompromised host. *Arch Intern Med* 146: 394-396.
- Blocker A, Severin FF, Habermann A, Hyman AA, Griffiths G, Burkhardt JK (1996). Microtubule-associated protein-dependent binding of phagosomes to microtubules. *J Biol Chem* 271: 3803-3811.
- Blocker A, Severin FF, Burkhardt JK, Bingham JB, Yu H, Olivo JC, Schroer TA, Hyman AA, Griffiths G (1997). Molecular requirements for bi-directional movement of phagosomes along microtubules. *J Cell Biol* 137: 113-129.
- Boise LH, Collins CM (2001). *Salmonella*-induced cell death: apoptosis, necrosis or programmed cell death? *Trends Microbiol* 9: 64-67.
- Bottger G, Nagelkerken B, van der Sluijs P (1996). Rab4 and Rab7 define distinct nonoverlapping endosomal compartments. *J Biol Chem* 271: 29191-29197.

- Bouvier G, Benoliel AM, Foa C, Bongrand P (1994). Relationship between phagosome acidification, phagosome- lysosome fusion, and mechanism of particle ingestion. *J Leukocyte Biol* 55: 729-734.
- Boyd GL, Craig G (1961). Etiology of cat scratch fever. *J Pediatr* 59: 313-317.
- Brennan MA, Cookson BT (2000). *Salmonella* induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol Microbiol* 38: 31-40.
- Brenner DJ et al. (1991). Proposal of *Afipia* gen. nov., with *Afipia felis* sp. nov. (formerly the cat scratch disease bacillus), *Afipia clevelandensis* sp. nov. (formerly the Cleveland Clinic Foundation strain), *Afipia broomeae* sp. nov., and three unnamed genospecies. *J Clin Microbiol* 29: 2450-2460.
- Brouqui P, Raoult D (1993). Proteinase K-sensitive and filterable phagosome-lysosome fusion inhibiting factor in *Afipia felis*. *Microb Pathog* 15: 187-195.
- Bucci C, Thomsen P, Nicoziani P, McCarthy J, van Deurs B (2000). Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell* 11: 467-468.
- Burkhardt J, Huber LA, Dieplinger H, Blocker A, Griffiths G, Desjardins M (1995). Gaining insight into a complex organelle, the phagosome, using twodimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 16: 2249-2257.
- Byrne B, Swanson MS (1998). Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. *Infect Immun* 66: 3029-3034.
- Cameron PL, Sudhof TC, Jahn R, De Camilli P (1991). Colocalization of synaptophysin with transferrin receptors: implications for synaptic vesicle biogenesis. *J Cell Biol* 115: 151-164.
- Carlsson SR, Roth J, Piller F, Fukuda M (1988). Isolation and characterization of human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2. Major sialoglycoproteins carrying polylectosaminoglycan. *J Biol Chem* 263: 18911-18919.
- Carson DA, Ribeiro JM (1993). Apoptosis and disease. *Lancet* 341, 1251-1254.
- Chakraborty P, Sturgill-Koszycki S, Russell DG (1994). Isolation and characterization of pathogencontaining phagosomes. *Methods Cell Biol* 45: 261-276.
- Chen JW, Murphy TL, Willingham MC, Pastan I, August JT (1985a). Identification of two lysosomal membrane glycoproteins. *J Cell Biol* 101: 85-95.
- Chen JW, Pan W, D'Souza MP, August JT (1985b). Lysosome-associated membrane proteins: characterization of LAMP-1 of macrophage P388 and mouse embryo 3T3 cultured cells. *Arch Biochem Biophys* 239: 574-586.
- Chen Y, Smith MR, Thirumalai K, Zychlinsky A (1996). A bacterial invasin induces macrophage apoptosis by binding directly to ICE. *EMBO J* 15: 3853-3860.
- Chirino-Trejo JM, Prescott JF (1987). Antibody response of horses to *Rhodococcus equi* antigens. *Can J Vet Res* 51: 301-305.

Cohen GM, Sun XM, Snowden RT, Dinsdale D, Skilleter DN (1992). Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem J* 286: 331-334.

Christoforidis S, Miaczynska M, Ashman K, Wilm M, Zhao L, Yip SC, Waterfield MD, Backer JM, Zerial M (1999). Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nat Cell Biol* 1: 249-252.

Clague MJ, Urbe S, Aniento F, Gruenberg J (1994). Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation. *J Biol Chem* 269: 21-24.

Claus V, Jahraus A, Tjelle T, Berg T, Kirschke H, Faulstich H, Griffiths G (1998). Lysosomal enzyme trafficking between phagosomes, endosomes, and lysosomes in J774 macrophages. Enrichment of cathepsin H in early endosomes. *J Biol Chem* 273: 9842-9851.

Clemens DL, Horwitz MA (1992). Membrane sorting during phagocytosis: selective exclusion of major histocompatibility complex molecules but not complement receptor CR3 during conventional and coiling phagocytosis. *J Exp Med* 175: 1317-1326.

Clemens DL, Horwitz MA (1993). Hypoexpression of major histocompatibility complex molecules on *Legionella pneumophila* phagosomes and phagolysosomes. *Infect Immun* 61: 2803-2812.

Clemens DL, Horwitz MA (1995). Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J Exp Med* 181: 257-270.

Clemens DL, Horwitz MA (1996). The *Mycobacterium tuberculosis* phagosome interacts with early endosomes and is accessible to exogenously administered transferrin. *J Exp Med* 184: 1349-1355.

Clemens DL, Lee BY, Horwitz MA (2000). *Mycobacterium tuberculosis* and *Legionella pneumophila* phagosomes exhibit arrested maturation despite acquisition of Rab7. *Infect Immun* 68: 5154-5166.

Clifton DR, Goss RA, Sahni SK, van Antwerp D, Baggs RB, Marder VJ, Silverman DJ, Sporn LA (1998). NF-kappa B-dependent inhibition of apoptosis is essential for host cell survival during *Rickettsia rickettsii* infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4646-4651.

Coers J, Monahan C, Roy CR (1999). Modulation of phagosome biogenesis by *Legionella pneumophila* creates an organelle permissive for intracellular growth. *Nat Cell Biol* 1: 451-453.

Coers J, Kagan JC, Matthews M, Nagai H, Zuckman DM, Roy CR (2000). Identification of Icm protein complexes that play distinct roles in the biogenesis of an organelle permissive for *Legionella pneumophila* intracellular growth. *Mol Microbiol* 38: 719-736.

Compton MM (1992). A biochemical hallmark of apoptosis: Internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metast. Rev.* 11, 105-119.

Cornish N, Washington JA (1999). *Rhodococcus equi* infections: clinical features and laboratory diagnosis. *Curr Clin Top Infect Dis.* 19: 198-215.

Cossart P, Boquet P, Normark S, Rappuoli R (1996). Cellular microbiology emerging. *Science* 271: 315-316.

Debré R, Lamy ML, Jammert ML, Costil L, Mozziconacci P (1950). La maladie des griffes de chat. Bull Mem Soc Med Hop Paris 66: 76-79.

De Chastellier C, Lang T, 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: 167-182.

De Chastellier C, Thilo L (1997). Phagosome maturation and fusion with lysosomes in relation to surface property and size of the phagocytic particle. Eur J Cell Biol 74: 49-62.

De Chastellier C, Thilo L (1999). Mycobacteria and the endocytic pathway. Advances in Cell and Molecular Biology of Membranes and Organelles 6: 107-135.

Defacque H, Egeberg M, Habermann A, Diakonova M, Roy C, Mangeat P, Voelter W, Marriott G, Pfannstiel J, Faulstich H, Griffiths G (2000). Involvement of ezrin/moesin in de novo actin assembly on phagosomal membranes. EMBO J 19: 199-212.

Del Bino G, Bruno S, Yi P-N, Darzynkiewicz Z (1992). Apoptotic cell death triggered by camptothecin or teniposide: The cell cycle specificity and effects of ionizing radiation. Cell Prolif 25: 537-548.

Denecker G, Declercq W, Geuijen CA, Boland A, Benabdillah R, van Gurp M, Sory MP, Vandenameele P, Cornelis GR (2001). *Yersinia enterocolitica* YopP-induced apoptosis of macrophages involves the apoptotic signaling cascade upstream of bid. J Biol Chem 276: 19706-19714.

De Renzis S, Sonnichsen B, Zerial M (2002). Divalent Rab effectors regulate the sub-compartmental organization and sorting of early endosomes. Nat Cell Biol 4: 124-133.

Deretic V, Fratti RA (1999). *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. Mol Microbiol 31: 1603-1609.

Desjardins M, Celis JE, van Meer G, Dieplinger H, Jahraus A, Griffiths G, Huber LA (1994a). Molecular characterization of phagosomes. J Biol Chem 269: 32194-32200.

Desjardins M, Huber LA, Parton RG, Griffiths G (1994b). Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. J Cell Biol 124: 677-688.

Desjardins M (1995). The kiss and run hypothesis of phagosome maturation. Trends Cell Biol 5: 183-186.

Desjardins M, Scianimanico S (1998). Isolation of phagosomes from professional and non-professional phagocytes. Cell Biology: A Laboratory Handbook, Second Edition. Vol. 2.

Detilleux PG, Deyoe BL, Cheville NF (1990). Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro. Infect Immun 58: 2320-2328.

Dive C, Gregory CD, Phipps DJ, Evans DL, Milner AE, Wyllie AH (1992). Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. Biochem. Biophys. Acta 1133, 275-285.

- Dobos KM, Spotts EA, Quinn FD, King CH (2000). Necrosis of lung epithelial cells during infection with *Mycobacterium tuberculosis* is preceded by cell permeation. *Infect Immun* 68: 6300-6310.
- Dolan MJ, Wong MT, Regnery RL, Jorgensen JH, Garcia M, Peters J, Drehner D (1993). Syndrome of *Rochalimaea henselae* adenitis suggesting cat scratch disease. *Ann Intern Med* 118: 331-336.
- Dramsi S, Cossart P (1998). Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 137-166.
- Drössler K (1988). *Immunologie*. VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 2. überarbeitete Auflage.
- Duclos S, Desjardins M (2000). Subversion of a young phagosome: the survival strategies of intracellular pathogens. *Cell Microbiol* 2: 365-377.
- Dunn WA, Hubbard AL, Aronson NN (1980). Low temperature selectively inhibits fusion between pinocytic vesicles and lysosomes during heterophagy of 125I-asialofetuin by the perfused rat liver. *J Biol Chem* 255: 5971-5978.
- Dunne DW, Resnick D, Greenberg J, Krieger M, Joiner KA (1994). The type I macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1863-1867.
- Edelstein PH, Edelstein MA (1991). Comparison of different agars used in the formulation of buffered charcoal yeast extract medium. *J Clin Microbiol* 29: 190-191.
- Ellenberger MA, Genetsky RM (1978). *Rhodococcus equi* infections; literature review. *Compend Continuing Ed Pract Vet* 8: 414-423.
- Emans N, Nzala NN, Desjardins M (1996). Protein phosphorylation during phagosome maturation. *FEBS Lett* 398: 37-42.
- Emmons RW, Riggs JL, Schachter J (1976). Continuing search for the etiology of cat scratch disease. *J Clin Microbiol* 4: 112-114.
- Emmons W, Reichwein B, Winslow DL (1991). *Rhodococcus equi* infection in the patient with AIDS: literature review and report of an unusual case. *Rev Infect Dis* 13: 91-96.
- Endo T, Pelster B, Piekarski G (1981). Infection of murine peritoneal macrophages with *Toxoplasma gondii* exposed to ultraviolet light. *Z Parasitenkd* 65: 121-129.
- English CK, Wear DJ, Margileth AM, Lissner CR, Walsh GP (1988). Cat Scratch disease: isolation and culture of the bacterial agent. *Journal of the American Medical Association* 259: 1347-1352.
- Fan T, Lu H, Hu H, Shi L, McClarty GA, Nance DM, Greenberg AH, Zhong G (1998). Inhibition of apoptosis in *chlamydia*-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. *J Exp Med* 187: 487-496.
- Fasshauer D, Antonin W, Margittai M, Pabst S, Jahn R (1999). Mixed and non-cognate SNARE complexes. Characterization of assembly and biophysical properties. *J Biol Chem* 274: 15440-15446.

- Feng Y, Press B, Wandinger-Ness A (1995). Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J Cell Biol* 131: 1435-1452.
- Fernandez Mora E (2001). Analysis of the intracellular lifestyle of *Rhodococcus equi*. Arbeitsbericht, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg.
- Ferrari G, Langen H, Naito M, Pieters J (1999). A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell* 97: 435-447.
- Fialka I, Pasquali C, Lottspeich F, Ahorn H, Huber LA (1997). Subcellular fractionation of polarized epithelial cells and identification of organelle-specific proteins by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 18: 2582-2590.
- Fiani ML, Beitz J, Turvy D, Blum JS, Stahl PD (1998). Regulation of mannose receptor synthesis and turnover in mouse J774 macrophages. *J Leukoc Biol* 64: 85-91.
- Finnerty WR (1992). The biology and genetics of the genus *Rhodococcus*. *Annu Rev Microbiol* 46: 193-218.
- Flaherty C, Minnikin DE, Sutcliffe IC (1996). A chemotaxonomic study of the lipoglycans of *Rhodococcus rhodnii* N445 (NCIMB 11279). *Zentralbl Bakteriologie* 285: 11-19.
- Fratti RA, Vergne I, Chua J, Skidmore J, Deretic V (2000). Regulators of membrane trafficking and *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation block. *Electrophoresis* 21: 3378-3385.
- Fratti RA, Backer JM, Gruenberg J, Corvera S, Deretic V (2001). Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J Cell Biol* 154: 631-644.
- Frehel C, de Chastellier C, Lang T, Rastogi N (1986). Evidence for inhibition of fusion of lysosomal and prelysosomal compartments with phagosomes in macrophages infected with pathogenic *Mycobacterium avium*. *Infect Immun* 52: 252-262.
- Frehel C, Rastogi N (1989). Phagosome-lysosome fusions in macrophages infected by *Mycobacterium avium*: role of mycosides-C and other surface components. *Acta Leprologica* 7: 173-174.
- Frenchick PJ, Markham RJ, Cochrane AH (1985). Inhibition of phagosome-lysosome fusion in macrophages by soluble extracts of virulent *Brucella abortus*. *Am J Vet Res* 46: 332-335.
- Friis RR (1972). Interaction of L cells and *Chlamydia psittaci*: entry of the parasite and host responses to its development. *J Bacteriol* 110: 706-721.
- Fujiwara N (1997). Distribution of antigenic glycolipids among *Mycobacterium tuberculosis* strains and their contribution to virulence. *Kekkaku* 72: 193-205.
- Galan JE (1996). Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol Microbiol* 20: 263-271.
- Galan JE (1999). Interaction of *Salmonella* with host cells through the centisome 63 type III secretion system. *Curr Opin Microbiol* 2: 46-50.

- Galan JE, Collmer A (1999). Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284: 1322-1328.
- Gao LY, Abu Kwaik Y (1999a). Apoptosis in macrophages and alveolar epithelial cells during early stages of infection by *Legionella pneumophila* and its role in cytopathogenicity. *Infect Immun* 67: 862-870.
- Gao LY, Abu Kwaik Y (1999b). Activation of caspase 3 during *Legionella pneumophila*-induced apoptosis. *Infect Immun* 67: 4886-4894.
- Garin J, Diez R, Kieffer S, Dermine JF, Duclos S, Gagnon E, Sadoul R, Rondeau C, Desjardins M (2001). The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol* 152: 165-180.
- Geisow MJ, D'Arcy Hart P, Young MR (1981). Temporal changes of lysosome and phagosome pH during phagolysosome formation in macrophages: studies by fluorescence spectroscopy. *J Cell Biol* 89: 645-652.
- Geoffroy C, Gaillard JL, Alouf JE, Berche P (1987). Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 55: 1641-1646.
- Giguere S, Prescott JF (1998). Cytokine induction in murine macrophages infected with virulent and avirulent *Rhodococcus equi*. *Infect Immun* 66: 1848-1854.
- Giguere S, Hondalus MK, Yager JA, Darrah P, Mosser DM, Prescott JF (1999). Role of the 85-kilobase plasmid and plasmid-encoded virulence-associated protein A in intracellular survival and virulence of *Rhodococcus equi*. *Infect Immun* 67: 3548-3557.
- Goebel W, Kuhn M (2000). Bacterial replication in the host cell cytosol. *Curr Opin Microbiol* 3: 49-53.
- Goodfellow M, 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 (1989). Genus *Rhodococcus*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 4: 2362-2371.
- Goosney DL, Celli J, Kenny B, Finlay BB (1999). Enteropathogenic *Escherichia coli* inhibits phagocytosis. *Infect Immun* 67: 490-495.
- Gordon AH, Hart PD, Young MR (1980). Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. *Nature* 286: 79-80.
- Gotoh K, Mitsuyama M, Imaizumi S, Kawamura I, Yano I (1991). Mycolic acid-containing glycolipid as a possible virulence factor of *Rhodococcus equi* for mice. *Microbiol Immunol* 35: 175-185.
- Gouin E, Gantelet H, Egile C, Lasa I, Ohayon H, Villiers V, Gounon P, Sansonetti PJ, 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: 1697-1708.

- Griffiths G (1996). On vesicles and membrane compartments. *Protoplasma* 195: 37-58.
- Grogan A, Reeves E, Keep N, Wientjes F, Totty NF, Burlingame AL, Hsuan JJ, Segal AW (1997). Cytosolic phox proteins interact with and regulate the assembly of coronin in neutrophils. *J Cell Sci* 110: 3071-3081.
- Ha HC, Snyder SH (1999). Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13978-13982.
- Haas A, Goebel W (1992). Microbial strategies to prevent oxygen-dependent killing by phagocytes. *Free Radic Res Commun* 16: 137-157.
- Haas A (1998). Reprogramming the phagocytic pathway – intracellular pathogens and their vacuoles. *Mol Membr Biol* 15: 103-121.
- Hacker J, Heesemann J (2000). *Molekulare Infektionsbiologie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg · Berlin, 1. Auflage.
- Hackstadt T, Rockey DD, Heinzen RA, Scidmore MA (1996). *Chlamydia trachomatis* interrupts an exocytic pathway to acquire endogenously synthesized sphingomyelin in transit from the Golgi apparatus to the plasma membrane. *EMBO J* 15: 964-977.
- Hackstadt T (2000). Redirection of host vesicle trafficking pathways by intracellular parasites. *Traffic* 1: 93-99.
- Harricane MC, Caron E, Porte F, Liautard JP (1996). Distribution of annexin I during non-pathogen or pathogen phagocytosis by confocal imaging and immunogold electron microscopy. *Cell Biol Int* 20: 193-203.
- Hart PD, Young MR (1991). Ammonium chloride, an inhibitor of phagosome-lysosome fusion in macrophages, concurrently induces phagosome-endosome fusion, and opens a novel pathway: studies of a pathogenic *mycobacterium* and a nonpathogenic yeast. *J Exp Med* 174: 881-889.
- Harvey RL, Sunstrum JC (1991). *Rhodococcus equi* infection in patients with and without human immunodeficiency virus infection. *Rev Infect Dis* 13: 139-145.
- Hashim S, Mukherjee K, Raje M, Basu SK, Mukhopadhyay A (2000). Live *Salmonella* modulate expression of rab proteins to persist in a specialized compartment and escape transport to lysosome. *J Biol Chem* 275: 16281-16288.
- Hebert DN, Foellmer B, Helenius A (1996). Calnexin and calreticulin promote folding, delay oligomerization and suppress degradation of influenza hemagglutinin in microsomes. *EMBO J* 15: 2961-2968.
- Heinzen RA, Scidmore MA, Rockey DD, Hackstadt T (1996). Differential interaction with endocytic and exocytic pathways distinguish parasitophorous vacuoles of *Coxiella burnetii* and *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 64: 796-809.
- Hersh D, Monack DM, Smith MR, Ghori N, Falkow S, Zychlinsky A (1999). The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2396-2401.

Hietala SK, Ardans AA (1987). Interaction of *Rhodococcus equi* with phagocytic cells from R. equi-exposed and non-exposed foals. *Vet Microbiol* 14: 307-320.

High N, Mounier J, Prevost MC, Sansonetti PJ (1992). IpaB of *Shigella flexneri* causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole. *EMBO J* 11: 1991-1999.

Hilbi H, Chen Y, Thirumalai K, Zychlinsky A (1997). The interleukin 1beta-converting enzyme, caspase 1, is activated during *Shigella flexneri*-induced apoptosis in human monocyte-derived macrophages. *Infect Immun* 65: 5165-5170.

Hilbi H, Moss JE, Hersh D, Chen Y, Arondel J, Banerjee S, Flavell RA, Yuan J, Sansonetti PJ, Zychlinsky A (1998). *Shigella*-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB. *J Biol Chem* 273: 32895-32900.

Hillidge CJ (1987). Use of erythromycin-rifampin combination in treatment of *Rhodococcus equi* pneumonia. *Vet Microbiol* 14: 337-342.

Hondalus MK, Diamond MS, Rosenthal LA, Springer TA, Mosser DM (1993). The intracellular bacterium *Rhodococcus equi* requires Mac-1 to bind to mammalian cells. *Infect Immun* 61: 2919-2929.

Hondalus MK, Mosser DM (1994). Survival and replication of *Rhodococcus equi* in macrophages. *Infect Immun* 62: 4167-4175.

Hondalus MK (1997). Pathogenesis and virulence of *Rhodococcus equi*. *Vet Microbiol* 56: 257-268.

Horwitz MA, Silverstein SC (1980). Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiples intracellularly in human monocytes. *J Clin Invest* 66: 441-450.

Horwitz MA (1983a). Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *J Exp Med* 158: 1319-1331.

Horwitz MA (1983b). The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J Exp Med* 158: 2108-2126.

Horwitz MA (1984). Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. *Cell* 36: 27-33.

Hotz, M. A., Gong, J., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z. (1994). Flow cytometric detection of Apoptosis: Comparison of the assays of in situ DNA degradation and Chromatin changes. *Cytometry* 15, 237-244.

Hughes KL, Sulaiman I (1987). The ecology of *Rhodococcus equi* and physicochemical influences on growth. *Vet Microbiol* 14: 241-250.

Ishidoh K, Takeda-Ezaki M, Watanabe S, Sato N, Aihara M, Imagawa K, Kikuchi M, Kominami E (1999). Analysis of where and which types of proteinases participate in lysosomal proteinase processing using bafilomycin A1 and *Helicobacter pylori* Vac A toxin. *J Biochem (Tokyo)* 125: 770-779.

Ivshina IB, Kamenskikh TN, Liapunov YE (1994). IEGM Catalogue of Strains of Regional Specialised Collection of Alkanotrophic Microorganisms. Moscow: Russian Academy of Sciences.

Iwahashi J, Yamazaki S, Komiya T, Nomura N, Nishikawa S, Endo T, Mihara K (1997). Analysis of the functional domain of the rat liver mitochondrial import receptor Tom20. *J Biol Chem* 272: 18467-18472.

Jahraus A, Tjelle TE, Berg T, Habermann A, Storrie B, Ullrich O, Griffiths G (1998). In vitro fusion of phagosomes with different endocytic organelles from J774 macrophages. *J Biol Chem* 273: 30379-30390.

Janeway CA (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* 13: 11-16.

Janeway CA, Travers P (1997). *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg · Berlin · Oxford, 2. Auflage.

Jerris RC, Regnery RL (1996). Will the real agent of cat-scratch disease please stand up? *Annu Rev Microbiol* 50: 707-725.

Johnson JA, Prescott JF, Markham RJ (1983). The pathology of experimental *Corynebacterium equi* infection in foals following intragastric challenge. *Vet Pathol* 20: 450-459.

Jones BD, Ghori N, Falkow S (1994). *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med* 180: 15-23.

Jones TC, Yeh S, Hirsch JG (1972). The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. I. Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite. *J Exp Med* 136: 1157-1172.

Joshi AD, Sturgill-Koszycki S, Swanson MS (2001). Evidence that Dot-dependent and -independent factors isolate the *Legionella pneumophila* phagosome from the endocytic network in mouse macrophages. *Cell Microbiol* 3: 99-114.

Karlsson K, Carlsson SR (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: 18966-18973.

Keane J, Balcewicz-Sablinska MK, Remold HG, Chupp GL, Meek BB, Fenton MJ, Kornfeld H (1997). Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun* 65: 298-304.

Keane J, Remold HG, Kornfeld H (2000). Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J Immunol* 164: 2016-2020.

Kedlaya I, Ing MB, Wong SS (2001). *Rhodococcus equi* infections in immunocompetent hosts: case report and review. *Clin Infect Dis* 32: E39-46.

Kirby JE, Isberg RR (1998). Legionnaires' disease: the pore macrophage and the legion of terror within. *Trends Microbiol* 6: 256-258.

Kirby JE, Vogel JP, Andrews HL, Isberg RR (1998). Evidence for pore-forming ability by *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* 27: 323-336.

Klein J (1991). *Immunologie*. VCH Weinheim · New York · Basel · Cambridge, 1. Auflage.

Kubbies M, Eckert HG, Trauth B, Goller B (1993). Flow cytometric analysis of cell death pattern of apoptosis and necrosis. *Cytometry* 14, 14-22.

La Scola B, Raoult D (1999). *Afipia felis* in hospital water supply in association with free-living amoebae. *Lancet* 353: 1330.

Lai XH, Golovliov I, Sjostedt A (2001). *Francisella tularensis* induces cytopathogenicity and apoptosis in murine macrophages via a mechanism that requires intracellular bacterial multiplication. *Infect Immun* 69: 4691-4694.

Lang T, de Chastellier C, Ryter A, Thilo L (1988). Endocytic membrane traffic with respect to phagosomes in macrophages infected with non-pathogenic bacteria: phagosomal membrane acquires the same composition as lysosomal membrane. *Eur J Cell Biol* 46: 39-50.

Lang T, de Chastellier C, Frehel C, Hellio R, Metzseau P, Leao Sde S, Antoine JC (1994a). Distribution of MHC class I and of MHC class II molecules in macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J Cell Sci* 107: 69-82.

Lang T, Hellio R, Kaye PM, Antoine JC (1994b). *Leishmania donovani*-infected macrophages: characterization of the parasitophorous vacuole and potential role of this organelle in antigen presentation. *J Cell Sci* 107: 2137-2150.

Lechevalier MA (1989). Norcardioform actinomycetes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 4: 2348-2350.

Le Pocher H, Brouqui P, Raoult D (1998). Killing kinetics of intracellular *Afipia felis* treated with amikacin. *J Antimicrob Chemother* 42: 825-829.

Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG (1991). Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif.* 24, 203-214.

Leusen JHW, Verhoeven AJ, Roos D (1996). Interactions between the components of the human NADPH oxidase: A review about the intrigues in the phox family. *Front Biosci* 1: d72-90.

Linares MJ, Lopez-Encuentra A, Perea S (1997). Chronic pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in a patient without impaired immunity. *Eur Respir J* 10: 248-250.

Linder R (1997). *Rhodococcus equi* and *Arcanobacterium haemolyticum*: two "coryneform" bacteria increasingly recognized as agents of human infection. *Emerg Infect Dis* 3: 145-153.

Lindgren SW, Stojiljkovic I, Heffron F (1996). Macrophage killing is an essential virulence mechanism of *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4197-4201.

Lizard G, Fournel S, Genestier L, Dhedin N, Chaput C, Flacher M, Mutin M, Panaye G, Revillard J-P (1995). Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis. *Cytometry* 21, 275-283.

- Lührmann A, Haas A (2000). A method to purify bacteria-containing phagosomes from infected macrophages. *Methods Cell Sci* 22: 329-341.
- Lührmann A, Streker K, Schüttfort A, Daniels J, Haas A (2001). *Afipia felis* induces uptake by macrophages directly into a non-endocytic compartment. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 7271-7276.
- Lukacs GL, Rotstein OD, Grinstein S (1990). Phagosomal acidification is mediated by a vacuolartype H(+)-ATPase in murine macrophages. *J Biol Chem* 265: 21099-21107.
- Lutz DA, Chen XM, McLaughlin BJ (1993). Isolation of the phagocytic compartment from macrophages using a paramagnetic, particulate ligand. *Anal Biochem* 214: 205-211.
- Magnusson H (1923). Spezifische infektiöse Pneumonie beim Fohlen. Ein neuer Eitererreger beim Pferde. *Arch Wiss Praht Tierheilkd* 50: 22-38.
- Malik ZA, Denning GM, Kusner DJ (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 ZA, Iyer SS, Kusner DJ (2001). *Mycobacterium tuberculosis* phagosomes exhibit altered calmodulin-dependent signal transduction: contribution to inhibition of phagosome-lysosome fusion and intracellular survival in human monocytes. *J Immunol* 166: 3392-3401.
- Marsh M, Griffiths G, Dean GE, Mellman I, Helenius A (1986). Three-dimensional structure of endosomes in BHK-21 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2899-2903.
- Martin SJ, Green DG, Cotter TG (1994). Dicing with death: Dissecting the components of the apoptosis machinery. *TIBS* 19, 26-30.
- Mastroianni CM, Lichtner M, Vullo V, Delia S (1994). Humoral immune response to *Rhodococcus equi* in AIDS patients with R. equi pneumonia. *J Infect Dis* 169: 1179-1180
- Matsumoto A, Bessho H, Uehira K, Suda T (1991). Morphological studies of the association of mitochondria with chlamydial inclusions and the fusion of chlamydial inclusions. *J Electron Microsc (Tokyo)* 40: 356-363.
- Mauder N (2001). Interaktion von *Rhodococcus equi* mit J774E Mausmakrophgen und Charakterisierung immunglobulin-bindender Aktivitäten bei Rhodokokken. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg.
- Mayorga LS, Bertini F, Stahl PD (1991). Fusion of newly formed phagosomes with endosomes in intact cells and in a cell-free system. *J Biol Chem* 266: 6511-6517.
- McNeil MM, Brown JM (1994). The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev* 7: 357-417.
- Mege JL, Maurin M, Capo C, Raoult D (1997). *Coxiella burnetii*: the 'query' fever bacterium. A model of immune subversion by a strictly intracellular microorganism. *FEMS Microbiol Rev* 19: 209-217.

Mengaud J, Lecuit M, Lebrun M, Nato F, Mazie JC, Cossart P (1996). Antibodies to the leucine-rich repeat region of internalin block entry of *Listeria monocytogenes* into cells expressing E-cadherin. *Infect Immun* 64: 5430-5433.

Meresse S, Steele-Mortimer O, Moreno E, Desjardins M, Finlay B, Gorvel JP (1999). Controlling the maturation of pathogen-containing vacuoles: a matter of life and death. *Nat Cell Biol* 1: E183-188.

Mills IG, Jones AT, Clague MJ (1998). Involvement of the endosomal autoantigen EEA1 in homotypic fusion of early endosomes. *Curr Biol* 8: 881-884.

Mills SD, Boland A, Sory MP, van der Smissen P, Kerbouch C, Finlay BB, Cornelis GR (1997). *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis in macrophages by a process requiring functional type III secretion and translocation mechanisms and involving YopP, presumably acting as an effector protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12638-12643.

Mills SD, Finlay BB (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.

Monack DM, Raupach B, Hromockyj AE, Falkow S (1996). *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9833-9838.

Monack DM, Meccas J, Ghori N, Falkow S (1997). *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 10385-10390.

Montgomery RR, Webster P, Mellman I (1991). Accumulation of indigestible substances reduces fusion competence of macrophage lysosomes. *J Immunol* 147: 3087-3095.

Mordue DG, Sibley LD (1997). Intracellular fate of vacuoles containing *Toxoplasma gondii* is determined at the time of formation and depends on the mechanism of entry. *J Immunol* 159: 4452-4459.

Mordue DG, Desai N, Dustin M, Sibley LD (1999). Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J Exp Med* 190: 1783-1792.

Moriyama Y, Yamamoto A, Yamada H, Tashiro Y, Tomochika K, Takahashi M, Maeda M, Futai M (1995). Microvesicles isolated from bovine posterior pituitary accumulate norepinephrine. *J Biol Chem* 270: 11424-11429.

Morrisette NS, Gold ES, Guo J, Hamerman JA, Ozinsky A, Bedian V, Aderem AA (1999). Isolation and characterization of monoclonal antibodies directed against novel components of macrophage phagosomes. *J Cell Sci* 112: 4705-4713.

Mosser DM, Hondalus MK (1996). *Rhodococcus equi*: an emerging opportunistic pathogen. *Trends Microbiol* 4: 29-33.

Moulder JW (1985). Comparative biology of intracellular parasitism. *Microbiol Rev* 49: 298-337.

- Mu FT, Callaghan JM, Steele-Mortimer O, Stenmark H, Parton RG, Campbell PL, McCluskey J, Yeo JP, Tock EP, Toh BH (1995). EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif. *J Biol Chem* 270: 13503-13511.
- Mukherjee K, Siddiqi SA, Hashim S, Raje M, Basu SK, Mukhopadhyay A (2000). Live *Salmonella* recruits N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein on phagosomal membrane and promotes fusion with early endosome. *J Cell Biol* 148: 741-753.
- Muller A, Hacker J, Brand BC (1996). Evidence for apoptosis of human macrophage-like HL-60 cells by *Legionella pneumophila* infection. *Infect Immun* 64: 4900-4906.
- Muller F, Schaal KP, von Graevenitz A, von Moos L, Woolcock JB, Wust J, Yassin AF (1988). Characterization of *Rhodococcus equi*-like bacterium isolated from a wound infection in a noncompromised host. *J Clin Microbiol* 26: 618-620.
- Muller WA, Steinman RM, Cohn ZA (1980). The membrane proteins of the vacuolar system. II. Bidirectional flow between secondary lysosomes and plasma membrane. *J Cell Biol* 86: 304-314.
- Muller WA, Steinman RM, Cohn ZA (1983). Membrane proteins of the vacuolar system. III. Further studies on the composition and recycling of endocytic vacuole membrane in cultured macrophages. *J Cell Biol* 96: 29-36.
- Murray PJ (1999). Defining the requirements for immunological control of mycobacterial infections. *Trends Microbiol* 7: 366-372.
- Nakamura N, Lowe M, Levine TP, Rabouille C, Warren G (1997). The vesicle docking protein p115 binds GM130, a cis-Golgi matrix protein, in a mitotically regulated manner. *Cell* 89: 445-455.
- Naroeni A, Jouy N, Ouahrani-Bettache S, Liautard JP, Porte F (2001). *Brucella suis*-impaired specific recognition of phagosomes by lysosomes due to phagosomal membrane modifications. *Infect Immun* 69: 486-493.
- Navarre WW, Zychlinsky A (2000). Pathogen-induced apoptosis of macrophages: a common end for different pathogenic strategies. *Cell Microbiol* 2: 265-273.
- Nelson N (1987). The vacuolar proton-ATPase of eukaryotic cells. *Bioessays* 7: 251-254.
- Neave RMS (1951). An outbreak of ulcerative lymphangitis in young heifers in Kenya. *Vet Rec* 63: 185.
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Meth* 139: 271-279.
- Nordmann P, Zinzendorf N, Keller M, Lair I, Ronco E, Guenounou M (1994). Interaction of virulent and non-virulent *Rhodococcus equi* human isolates with phagocytes, fibroblast- and epithelial-derived cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 9: 199-205.
- Oh YK, Straubinger RM (1996). Intracellular fate of *Mycobacterium avium*: use of dual-label spectrofluorometry to investigate the influence of bacterial viability and opsonization on phagosomal pH and phagosome-lysosome interaction. *Infect Immun* 64: 319-325.

- Pasquali C, Fialka I, Huber LA (1999). Subcellular fractionation, electromigration analysis and mapping of organelles. *Journal of Chromatography B* 722: 89-102.
- Pettmann B, Villa P (1994). Neuronal programmed cell death (Apoptosis). *FUTURA* 3, 152-158.
- Pfeffer SR (1999). Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs. *Nat Cell Biol* 1: E17-22.
- Pieters J (2001). Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes Infect* 3: 249-255.
- Pitt A, Mayorga LS, Schwartz AL, Stahl PD (1992a). Transport of phagosomal components to an endosomal compartment. *J Biol Chem* 267: 126-132.
- Pitt A, Mayorga LS, Stahl PD, Schwartz AL (1992b). Alterations in the protein composition of maturing phagosomes. *J Clin Invest* 90: 1978-1983.
- Pizarro-Cerda J, Meresse S, Parton RG, van der Goot G, Sola-Landa A, Lopez-Goni I, Moreno E, Gorvel JP (1998). *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun* 66: 5711-5724.
- Pommier CG, Inada S, Fries LF, Takahashi T, Frank MM, Brown EJ (1983). Plasma fibronectin enhances phagocytosis of opsonized particles by human peripheral blood monocytes. *J Exp Med* 157: 1844-1854.
- Porcelli SA, Modlin RL (1999). The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu Rev Immunol* 17: 297-329.
- Porte F, Liautard JP, Kohler S (1999). Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect Immun* 67: 4041-4047.
- Prescott JF (1987). Epidemiology of *Rhodococcus equi* infection in horses. *Vet Microbiol* 14: 211-214.
- Prescott JF (1991). *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 4: 20-34.
- Press B, Feng Y, Hoflack B, Wandinger-Ness A (1998). Mutant Rab7 causes the accumulation of cathepsin D and cation-independent mannose 6-phosphate receptor in an early endocytic compartment. *J Cell Biol* 140: 1075-1089.
- Prina E, Antoine JC, Wiederanders B, Kirschke H (1990). Localization and activity of various lysosomal proteases in *Leishmania amazonensis*-infected macrophages. *Infect Immun* 58: 1730-1737.
- Rabinowitz S, Horstmann H, Gordon S, Griffiths G (1992). Immunocytochemical characterization of the endocytic and phagolysosomal compartments in peritoneal macrophages. *J Cell Biol* 116: 95-112.
- Ravetch JV (1997). Fc receptors. *Curr Opin Immunol* 9: 121-125.

- Rechnitzer C, Blom J (1989). Engulfment of the Philadelphia strain of *Legionella pneumophila* within pseudopod coils in human phagocytes. Comparison with other *Legionella* strains and species. *APMIS* 97: 105-114.
- Reyrat JM, Lopez-Ramirez G, Ofredo C, Gicquel B, Winter N (1996). Urease activity does not contribute dramatically to persistence of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *Infect Immun* 64: 3934-3936.
- Richter-Dahlfors A, Buchan AM, Finlay BB (1997). Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella typhimurium* resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo. *J Exp Med* 186: 569-580.
- Rittig MG, Alvarez-Martinez MT, Porte F, Liautard JP, Rouot B (2001). Intracellular survival of *Brucella spp.* in human monocytes involves conventional uptake but special phagosomes. *Infect Immun* 69: 3995-4006.
- Rojas M, Barrera LF, Puzo G, Garcia LF (1997). Differential induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in resistant and susceptible murine macrophages: role of nitric oxide and mycobacterial products. *J Immunol* 159: 1352-1361.
- Rosen A, Casciola-Rosen L (1997). Macromolecular substrates for the ICE-like proteases during apoptosis. *J Cell Biochem* 64: 50-54.
- Roy CR, Berger KH, Isberg RR (1998). *Legionella pneumophila* DotA protein is required for early phagosome trafficking decisions that occur within minutes of bacterial uptake. *Mol Microbiol* 28: 663-674.
- Russell DG, Xu S, Chakraborty P (1992). Intracellular trafficking and the parasitophorous vacuole of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. *J Cell Sci* 103: 1193-1210.
- Russell DG, Dant J, Sturgill-Koszycki S (1996). *Mycobacterium avium*- and *Mycobacterium tuberculosis*-containing vacuoles are dynamic, fusioncompetent vesicles that are accessible to glycosphingolipids from the host cell plasmalemma. *J Immunol* 156: 4764-4773.
- Russell DG (2001). *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 569-577.
- Schaible UE, Collins HL, Kaufmann SH (1999). Confrontation between intracellular bacteria and the immune system. *Adv Immunol* 71: 267-377.
- Schneider B, Gross R, Haas A (2000). Phagosome acidification has opposite effects on intracellular survival of *Bordetella pertussis* and *B. bronchiseptica*. *Infect Immun* 68: 7039-7048.
- Schramm N, Bagnell CR, Wyrick PB (1996). Vesicles containing *Chlamydia trachomatis* serovar L2 remain above pH 6 within HEC-1B cells. *Infect Immun* 64: 1208-1214.
- Schüller S, Neefjes J, Ottenhoff T, Thole J, Young D (2001). Coronin is involved in uptake of *Mycobacterium bovis* BCG in human macrophages but not in phagosome maintenance. *Cell Microbiol* 3: 785-793.
- Schüttfort A (2000). Untersuchung zur Biogenese Afipien-enthaltender Phagosomen in Makrophagen. Dissertation, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg.

Schwab JC, Beckers CJ, Joiner KA (1994). The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. Proc Natl Acad Sci USA 91: 509-513.

Schwan WR, Demuth A, Kuhn M, Goebel W (1994). Phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Listeria monocytogenes* contributes to intracellular survival and growth of *Listeria innocua*. Infect Immun 62: 4795-4803.

Swanson MS, Isberg RR (1996). Analysis of the intracellular fate of *Legionella pneumophila* mutants. Ann N Y Acad Sci 797: 8-18.

Schwartz LM, Osborne BA (1993). Programmed cell death, apoptosis and killer genes. Immunol. Today 14, 582-590.

Scidmore MA, Rockey DD, Fischer ER, Heinzen RA, Hackstadt T (1996). Vesicular interactions of the *Chlamydia trachomatis* inclusion are determined by chlamydial early protein synthesis rather than route of entry. Infect Immun 64: 5366-5372.

Searle R, Kerr JFR, Bishop CJ (1982). Necrosis and apoptosis: Distinct modes of cell death with fundamentally different significance. Pathol. Ann. 17, 229-259.

Segal G, Purcell M, Shuman HA (1998). Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome. Proc Natl Acad Sci USA 95: 1669-1674.

Segal G, Shuman HA (1998). How is the intracellular fate of the *Legionella pneumophila* phagosome determined? Trends Microbiol 6: 253-255.

Shah GM, Shah RG, Poirier GG (1996). Different cleavage pattern for poly(ADP-ribose) polymerase during necrosis and apoptosis in HL-60 cells. Biochem Biophys Res Commun 229: 838-844.

Shatwell KP, Segal AW (1996). NADPH oxidase. Int J Biochem Cell Biol 28:1191-1195.

Sheff DR, Daro EA, Hull M, Mellman I (1999). The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions. J Cell Biol 145: 123-139.

Sibley LD, Weidner E, Krahenbuhl JL (1985). Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. Nature 315: 416-419.

Sibley LD, Krahenbuhl JL, Adams GM, Weidner E (1986). *Toxoplasma* modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface proteins. J Cell Biol 103: 867-874.

Silbernagl S, Despopoulos A (1991). Taschenatlas der Physiologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York, 4. überarbeitete Auflage.

Sinai AP, Joiner KA (1997). Safe haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles. Annu Rev Microbiol 51: 415-462.

Skerman VDB, McGowan V, Sneath PHA (1980). Approved list of bacteria names. Int J Syst Bacteriol 30: 225-400.

- Smith GA, Marquis H, Jones S, Johnston NC, Portnoy DA, 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: 4231-4237.
- Smola J, Katerov V, Schalen C (1994). Haemolytic and phospholipase C (PLC) activities of *Rhodococcus equi*. *J Appl Bacteriol* 77: 325-333.
- Sonnichsen B, De Renzis S, Nielsen E, Rietdorf J, Zerial M (2000). Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol* 149: 901-914.
- Spargo BJ, Crowe LM, Ionedo T, Beaman BL, Crowe JH (1991). Cord factor (alpha,alpha-trehalose 6,6'-dimycolate) inhibits fusion between phospholipid vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 737-740.
- Stahl PD, Ezekowitz RA (1998). The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol* 10: 50-55.
- Steele-Mortimer O, Meresse S, Gorvel JP, Toh BH, Finlay BB (1999). Biogenesis of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles in epithelial cells involves interactions with the early endocytic pathway. *Cell Microbiol* 1: 33-49.
- Steffanelli C, Bonavita F, Stanic I, Pignatti C, Farruggia G, Masotti L, Guarnieri C, Caldarera CM (1998). Inhibition of etoposide-induced apoptosis with peptide aldehyde inhibitors of proteasome. *Biochem J* 332: 661-665.
- Stein M, 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: 431-437.
- Steinman RM, Mellman IS, Muller WA, Cohn ZA (1983). Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *J Cell Biol* 96: 1-27.
- Storrie B, Desjardins M (1996). The biogenesis of lysosomes: is it a kiss and run, continuous fusion and fission process? *Bioessays* 18: 895-903.
- Streker K (2000). Reifung von Makrophagen-Phagosomen, die fakultativ intrazelluläre Bakterien enthalten. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg.
- Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russell DG (1994). Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 263: 678-681.
- Sturgill-Koszycki S, Schaible UE, Russell DG (1996). *Mycobacterium*-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis. *EMBO J* 15: 6960-6968.
- Sturgill-Koszycki S, Swanson MS (2000). *Legionella pneumophila* replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. *J Exp Med* 192: 1261-1272.

- Suss-Toby E, Zimmerberg J, Ward GE (1996). Toxoplasma invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore. Proc Natl Acad Sci USA 93: 8413-8418.
- Swanson JA (1989). Fluorescent labeling of endocytic compartments. Methods Cell Biol 29: 137-151.
- Swanson MS, Isberg RR (1995). Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic reticulum. Infect Immun 63: 3609-3620.
- Swanson MS, Hammer BK (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, Tsubaki S (1991a). Identification of 15- to 17-kilodalton antigens associated with virulent *Rhodococcus equi*. J Clin Microbiol 29: 439-443.
- Takai S, Sekizaki T, Ozawa T, Sugawara T, Watanabe Y, Tsubaki S (1991b). Association between a large plasmid and 15- to 17-kilodalton antigens in virulent *Rhodococcus equi*. Infect Immun 59: 4056-4060.
- Takai S, Lie M, Watanabe Y, Tsubaki S, Sekizaki T (1992). Virulence-associated 15- to 17-kilodalton antigens in *Rhodococcus equi*: temperature-dependent expression and location of the antigens. Infect Immun 60: 2995-2997.
- Takai S, Watanabe Y, Ikeda T, Ozawa T, Matsukura S, Tamada Y, Tsubaki S, Sekizaki T (1993). Virulence-associated plasmids in *Rhodococcus equi*. J Clin Microbiol 31: 1726-1729.
- Takai S, Sasaki Y, Ikeda T, Uchida Y, Tsubaki S, Sekizaki T (1994). Virulence of *Rhodococcus equi* isolates from patients with and without AIDS. J Clin Microbiol 32: 457-460.
- Takai S, Madarame H, Matsumoto C, Inoue M, Sasaki Y, Hasegawa Y, Tsubaki S, Nakane A (1995). Pathogenesis of *Rhodococcus equi* infection in mice: Roles of virulence plasmids and granulomagenic activity of bacteria. FEMS Immunol Med Microbiol 11: 181-190.
- Takai S, Fukunaga N, Ochiai S, Sakai T, Sasaki Y, Tsubaki S (1996). Isolation of virulent and intermediately virulent *Rhodococcus equi* from soil and sand on parks and yards in Japan. J Vet Med Sci 58: 669-672.
- Takai S, Takeda K, Nakano Y, Karasawa T, Furugoori J, Sasaki Y, Tsubaki S, Higuchi T, Anzai T, Wada R, Kamada M (1997). Emergence of rifampin-resistant *Rhodococcus equi* in an infected foal. J Clin Microbiol 35: 1904-1908.
- Takai S, Hines SA, Sekizaki T, Nicholson VM, Alperin DA, Osaki M, Takamatsu D, Nakamura M, Suzuki K, Ogino N, Kakuda T, Dan H, Prescott JF (2000). DNA sequence and comparison of virulence plasmids from *Rhodococcus equi* ATCC 33701 and 103. Infect Immun 68: 6840-6847.
- Talstad I, Dalen H, Lehmann V (1983). Degranulation and enzyme release during phagocytosis of inert particles and of bacteria by polymorphonuclear neutrophil granulocytes. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [C] 91: 403-411.

Tan C, Prescott JF, Patterson MC, Nicholson VM (1995). Molecular characterization of a lipid-modified virulence-associated protein of *Rhodococcus equi* and its potential in protective immunity. *Can J Vet Res* 59: 51-59.

Taraska T, Ward DM, Ajioka RS, Wyrick PB, Davis-Kaplan SR, Davis CH, Kaplan J (1996). The late chlamydial inclusion membrane is not derived from the endocytic pathway and is relatively deficient in host proteins. *Infect Immun* 64: 3713-3727.

Telford WG, King LE, Fraker PJ (1992). Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis-associated chromatin degradation by flow cytometry. *Cytometry* 13: 137-143.

Telford WG, King LE, Fraker PJ (1994). Rapid quantitation of apoptosis in pure and heterogeneous cell populations using flow cytometry. *J Immunol Meth* 172: 1-16.

Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, et al. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356: 768-774.

Tilney LG, Harb OS, Connelly PS, Robinson CG, Roy CR (2001). How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. *J Cell Sci* 114: 4637-4650.

Tjelle TE, Saigal B, Froystad M, Berg T (1998). Degradation of phagosomal components in late endocytic organelles. *J Cell Sci* 111: 141-148.

Tjelle TE, Lovdal T, Berg T (2000). Phagosome dynamics and function. *Bioessays* 22: 255-263.

Tkachuk-Saad O, Prescott J (1991). *Rhodococcus equi* plasmids: isolation and partial characterization. *J Clin Microbiol* 29: 2696-2700.

Tomei LD, Cope FO (eds.) (1991). Apoptosis: The molecular basis of cell death. *Curr. Commun. Cell and Mol. Biol.*, Vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.

Verville TD, Huycke MM, Greenfield RA, Fine DP, Kuhls TL, Slater LN (1994). *Rhodococcus equi* infections of humans. 12 cases and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 73: 119-132.

Via LE, Deretic D, Ulmer RJ, Hibler NS, Huber LA, 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: 13326-13331.

Vogel JP, Andrews HL, Wong SK, Isberg RR (1998). Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science* 279: 873-876.

Wada R, Kamada M, Anzai T, Nakanishi A, Kanemaru T, Takai S, Tsubaki S (1997). Pathogenicity and virulence of *Rhodococcus equi* in foals following intratracheal challenge. *Vet Microbiol* 56: 301-312.

Walker NI, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JFR (1988). Patterns of cell death. *Methods Arch. Exp. Pathol.* 13, 18.

- Walker PR, Smith C, Youdale T, Leblanc J, Whitfield JF, Sikorska M (1991). Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. *Cancer Res* 51: 1078-1085.
- Ward DM, Leslie JD, Kaplan J (1997). Homotypic lysosome fusion in macrophages: analysis using an *in vitro* assay. *J Cell Biol* 139: 665-673.
- Warhurst AM, Fewson CA (1994). Biotransformations catalyzed by the genus *Rhodococcus*. *Crit Rev Biotechnol* 14: 29-73.
- Watson PR, Gautier AV, Paulin SM, Bland AP, Jones PW, Wallis TS (2000). *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Dublin can lyse macrophages by a mechanism distinct from apoptosis. *Infect Immun* 68: 3744-3747.
- Wear DJ, Margileth AM, Hadfield TL, Fischer GW, Schlagel CJ, King FM (1983). Cat scratch disease: a bacterial infection. *Science* 221: 1403-1405.
- Wiater LA, Dunn K, Maxfield FR, Shuman HA (1998). Early events in phagosome establishment are required for intracellular survival of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 66: 4450-4460.
- Wyllie AH (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endonuclease activation. *Nature* 284, 555-556.
- Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D (1984). Chromatin cleavage in apoptosis: Association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathol.* 142, 67-77.
- Wyrick PB, Brownridge EA (1978). Growth of *Chlamydia psittaci* in macrophages. *Infect Immun* 19: 1054-1060.
- Yamamoto Y, Klein TW, 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 attachment of *Candida albicans* to macrophages. *Infect Immun* 65: 1077-1082.
- Yu X, Raoult D (1994). Monoclonal antibodies to *Afipia felis*--a putative agent of cat scratch disease. *Am J Clin Pathol* 101: 603-606.
- Zerial M, McBride H (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 107-117.
- Zink MC, Yager JA, Prescott JF, Fernando MA (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.
- Zychlinsky A, Prevost MC, Sansonetti PJ (1992). *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* 358: 167-169.

Zychlinsky A, Kenny B, Menard R, Prevost MC, Holland IB, Sansonetti PJ (1994). IpaB mediates macrophage apoptosis induced by *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* 11: 619-627.

Zychlinsky A, Thirumalai K, Arondel J, Cantey JR, Aliprantis AO, Sansonetti PJ (1996). In vivo apoptosis in *Shigella flexneri* infections. *Infect Immun* 64: 5357-5365.

Zychlinsky A, Sansonetti PJ (1997). Apoptosis as a proinflammatory event: what can we learn from bacteria-induced cell death? *Trends Microbiol* 5: 201-204.

Lebenslauf

- Name** : Lührmann
- Vorname** : Anja
- Geburtstag** : 29.07.1969
- Geburtsort** : Harderberg/Niedersachsen
- Familienstand** : verheiratet
- Schulbildung** : 1976 - 1980 Theodor-Heuss-Grundschule in Osnabrück
1980 - 1982 Orientierungsstufe Sebastopol in Osnabrück
1982 - 1983 Wittekind-Realschule in Osnabrück
1983 - 1987 Kardinal-von-Galen-Realschule in Mettingen
Abschluss: qualifizierter Realschulabschluss
1987 - 1990 Kardinal-von-Galen-Gymnasiums in Mettingen
Abschluss: Abitur
- Hochschulstudium** : 1990 - 1991 Studium an der Universität Bielefeld
Fachrichtung: Diplom-Chemie
Oktober 1991 Studium an der Universität Leipzig
- April 1997 Fachrichtung: Diplom-Biologie
Abschluss: Diplom-Biologin
- Diplomarbeit** : Einfluß von Novobiocin und anderen immunmodulierenden Sub-stanzen
auf die Monozytenaktivierung - Betreuerin: Prof. Dr. S. Hauschildt
- Berufspraxis** : Mai 1997 - Dez. 1997 wissenschaftliche Hilfskraft an der
Universität Leipzig
Feb. 1998 - Mai 1999 wissenschaftliche Hilfskraft an der
Universität Würzburg
Mai 1999 - Jan. 2002 Promotionsstudium am Lehrstuhl für
Mikrobiologie der Universität Würzburg
- Promotionsarbeit:** Analyse der Reifung von Afipien- und Rhodokokken-enthaltenden
Phagosomen in Makrophagen - Betreuer: Prof. Dr. A. Haas

Publikationsliste:

Lührmann A, Thölke J, Behn I, Schumann J, Tiegs G, Hauschildt S (1998). Immunomodulating Properties of the Antibiotic Novobiocin in Human Monocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1911-1916.

Lührmann A, Haas A (2000). A method to purify bacteria-containing phagosomes from infected macrophages. *Methods Cell Sci* 22: 329-341.

Lührmann A, Streker K, Schüttfort A, Daniels J, Haas A (2001). *Afipia felis* induces uptake by macrophages directly into a non-endocytic compartment. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 7271-7276.

Teile der Arbeit wurden präsentiert:

Lührmann A, Streker K, Schüttfort A, Daniels J, Haas A. *Afipia felis* induces uptake by macrophages directly into a non-endocytic compartment.
Euresco Conference “Membrane Dynamics in Endocytosis“, Tomar, Portugal, 2001.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Albert Haas möchte ich für eine sehr schöne Doktorandenzeit danken. In vielen Gesprächen mit meinem Doktorvater habe ich sehr viel gelernt, nicht nur, aber vor allem über die Wissenschaft und wie man diese betreiben sollte. Er ließ mir auch ab und an die Freiheit, eigene Ideen in die Tat umzusetzen, und hat mich in meiner wissenschaftlichen Entwicklung immer stark unterstützt, auch wenn dafür manchmal kleine Stupser seinerseits von Nöten waren. Insgesamt war es eine schöne und erfolgreiche Zeit. Danke Albert!

Herrn Prof. Dr. Georg Krohne möchte ich dafür danken, dass er sich die Zeit nimmt, diese Arbeit zu begutachten.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen Kollegen aus C229, Eugenia Fernandez, Biju Joseph, Norman Mauder, Anja Schüttfort und Karin Streker bedanken. Viele wissenschaftliche und natürlich auch nicht wissenschaftliche Gespräche mit ihnen haben für eine gute Zusammenarbeit und eine freundschaftliche Arbeitsatmosphäre gesorgt.

Den Mitarbeitern der Mikrobiologie spreche ich meinen Dank für die freundliche Aufnahme, die vorbehaltlose Unterstützung und die Hilfestellung bei der Lösung aller möglicher technischer Probleme aus. Hervorzuheben sind hier: Andrea, Birgit, Claudia, Christoph, Jenny, Jörg, Justin, Marcus, Monika, Silke, Siwe, Steffi und Ted.

Außerdem möchte ich mich bei Claudia Gehrig für die praktische Hilfe bei der Herstellung von Präparaten für die Elektronenmikroskopie bedanken.

Meine beiden F2-Studenten Barbara Gareis und Jürgen Brand möchte ich hier ebenfalls erwähnt wissen. Es hat Spaß gemacht mit Euch.

Und nun das Wichtigste: Ma, Katrin, Jan ich liebe Euch!