

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene
der Universität zu Köln

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Krönke

Molekulare Mechanismen der LC3 assoziierten Phagozytose in der antibakteriellen
Immunantwort mit *Escherichia coli*

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der zahnärztlichen Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Sandra Häck
aus Bergisch Gladbach

promoviert am 08. Dezember 2021

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. M. Krönke
2. Gutachter: Professor Dr. rer. nat. L. Eichinger

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgender Person erhalten:

Dr. Michael Schramm

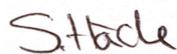
Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 24/2011) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 22.01.2021

Unterschrift: 

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Dr. Michael Schramm von mir selbst ausgeführt worden.

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Michael Schramm, der mir das Projekt in seiner Arbeitsgruppe ermöglichte und mich während der praktischen Phase im Labor, sowie in der schriftlichen Phase der Promotionsarbeit stets betreut und unterstützt hat.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Martin Krönke, danke ich für die Überlassung des Themas, und für die Möglichkeit in seinem Institut zu promovieren.

Meinen besonderen Dank möchte ich an meine Familie richten, insbesondere an meine Eltern, die mir mein Studium und die Promotion ermöglichten und mich in all meinen Entscheidungen bestärkt und unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	4
Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	2
2. Theoretische Grundlagen.....	4
2.1 Angeborene antibakterielle Immunabwehr	4
2.2 Makrophagen	5
2.3 Rezeptoren	8
2.3.1 TLR4 und MyD88	8
2.3.2 Mac-1 ($\beta 2$ integrin macrophage1 antigen).....	10
2.4 NADPH-Oxidase 2 (Nox2).....	10
2.5 ROS (Reaktive Sauerstoffspezies)	11
2.5.1 Zelluläre Abwehr gegen ROS.....	12
2.6 Autophagie	14
2.7 Phagozytose.....	15
2.8 LC3-assoziierte Phagozytose	16
2.8.1 Der Weg von pro-LC3 zu LC3-II.....	17
2.9 Verwendete Mikroorganismen.....	18
2.9.1 Escherichia coli.....	18
2.9.2 Escherichia coli K-12 DH5 α	19
3. Material und Methoden	20
3.1 Materialien	20
3.1.1 Nährmedien und Zusätze	20
3.1.2 Puffer und Lösungen.....	20
3.1.3 Chemikalien.....	21
3.1.4 Antikörper	21
3.1.5 Verwendete Materialien.....	22
3.1.6 Geräte	23
3.1.7 Software.....	24
3.1.8 Kits	24
3.2 Modellorganismen	25
3.3 Methoden.....	26
3.2.1 Isolierung der peritonealen Makrophagen	26
3.2.2 Kultivierung von E.coli.....	27
3.2.3 Immunfluoreszenzfärbung.....	28
3.2.4 Quantifizierung von ROS.....	31
4. Ergebnisse	34
4.1 Escherichia coli als Bakterium für die Analyse der LAP	34
4.2 Nox2 ist notwendig für die Rekrutierung von LC3 zur Phagosomenmembran.....	36
4.3 Mac-1 spielt keine Rolle bei der Aktivierung von Nox2 in E.coli infizierten Makrophagen	40
4.4 Das Adapterprotein MyD88 nimmt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der LAP in E.coli-infizierten Makrophagen ein	42
4.5 Welche ROS-Spezies sind nötig für die LC3-assoziierte Phagozytose?	44
4.5.1 SOD fängt extrazelluläres O $_2^-$ weg	45
4.5.2 SOD erhöht die Synthese von H $_2$ O $_2$	47
4.5.3 SOD senkt die Anlagerung von LC3 an die Phagosomenmembran.....	48

4.5.4 Mäßige Inhibition der Produktion von H ₂ O ₂ durch die Katalase.....	49
4.5.5 H ₂ O ₂ hat keinen Einfluss auf die Rekrutierung von LC3 zum Phagosom	51
4.6 <i>An welchem Ort müssen die ROS wirken?</i>	52
4.7 <i>Entstehen durch die Bildung von Sauerstoffradikalen Lipidperoxide in der Phagosomenmembran und stehen diese im Zusammenhang mit der LC3-Rekrutierung?</i>	56
5. Diskussion	61
6. Zusammenfassung	66
7. Abbildungsverzeichnis	68
8. Tabellenverzeichnis	70
9. Literaturverzeichnis	71
Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

ATG	Autophagy-related
BHI	Brain heart infusion
BMDM	Bone marrow-derived macrophages
BSA	Bovine serum albumin
CD11b	Cluster of differentiation molecule 11b
CD11b ^{-/-}	Cluster of differentiation molecule 11b deficient
CFU	Colony-forming units
DAMP	Damage-associated molecular patterns
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
FCS	Fetal calf serum
GFP	green fluorescent protein
gp91phox	91-kDa glycoprotein component of the phagocyte NADPH oxidase
GTPase	GTP-bindendes Protein
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HBSS	Hank's balanced salt solution
HRP	Horseradish peroxidase
KO	Knockout
LAP	LC3 assoziierte Phagozytose
LC3	Microtubule-associated protein light chain 3
L.m.	<i>Listeria monocytogenes</i>
LPS	Lipopolysaccharid
Mac-1	macrophage1 antigen
MACS	Magnetic activated cell sorting
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
MOI	Multiplicity of infection
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
MyD88 ^{-/-}	Myeloid differentiation primary response gene 88 deficient

NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
n.t	nicht behandelt (engl.: not treated)
Nox2	NADPH-Oxidase 2
Nox2-/-	NADPH-Oxidase 2 deficient
OD	optische Dichte
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PI(3)P	Phosphatidylinositol-3-phosphat
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyde
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PM	Peritoneal macrophages
PRR	Pattern recognition receptors
ROS	Reactive oxygen species
rpm	revolutions per minute
RPMI	Zellkulturmedium (Entwickelt im Roswell Park Memorial Institute)
RT	Raumtemperatur
t	Zeit
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
WT	Wildtyp

1. Einleitung

Entzündungen im Körper sind streng regulierte Prozesse, die vom Zusammenspiel verschiedener Zellen des Immunsystems abhängig sind. Man unterscheidet zwischen angeborener Immunität und adaptiver Immunität. Die meisten Eindringlinge werden von der angeborenen Immunabwehr innerhalb von Minuten bzw. Stunden erkannt und vernichtet. Bei der Erkennung einer Infektion helfen dem angeborenen Immunsystem eine Reihe sezernierter Proteine und zellulärer Rezeptoren. Die zellulären Rezeptoren werden direkt von den Eltern vererbt und sind von Geburt an vorhanden. Im Gegensatz dazu stehen die Antigenrezeptoren der Lymphozyten der adaptiven Immunantwort, die erst durch Genumlagerung im Laufe der Zeit entstehen. Einige Mechanismen der angeborenen Immunität setzen direkt nach Überwindung einer der Körperbarrieren durch einen Krankheitserreger ein. Dazu zählen mehrere Arten von bereits vorhandenen löslichen Molekülen, die in der extrazellulären Flüssigkeit, im Blut und in epithelialen Sekreten vorkommen. Sie sind in der Lage einen Krankheitserreger sofort zu töten oder zumindest seine Wirkung abzuschwächen. Wenn mit diesen Maßnahmen allein die Eindringlinge nicht vernichtet werden können, kommen die Zellen der angeborenen Immunabwehr ins Spiel. Diese erkennen über Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) pathogenassoziierte molekulare Muster (PAMPs) auf der Oberfläche von Mikroorganismen. Durch die Aktivierung dieser Zellen werden Effektormechanismen zur Beseitigung der Infektion ausgelöst. Mit Hilfe der Erkennungsrezeptoren sind die Zellen in der Lage gezielt Mikroorganismen und andere extrazelluläre Partikel in ein Phagosom aufzunehmen und abzubauen. Dieser Prozess wird als Phagozytose bezeichnet. Eine wichtige Gruppe von Zellen des angeborenen Immunsystems stellen die Makrophagen dar, welche zu den Phagozyten gehören.¹ Im Jahre 1908 erhielt Elie Metchnikoff den Nobelpreis für seine Beschreibung der Phagozytose. Er fand heraus, dass die Immunität von der Stimulierung der Phagozyten abhängig ist.² Seither haben sich viele Immunologen der Forschung an Makrophagen gewidmet.

Im Jahre 2007 wurde der Mechanismus der LC3-assoziierten Phagozytose (LAP) identifiziert.³ Namensgebend für die LAP ist das Mikrotubuli-assoziierte Protein 1A/1B-leichte Kette 3 (LC3). Die LAP ist eine Sonderform der Phagozytose, bei der Komponenten der Autophagie-Maschinerie zum Phagosom rekrutiert werden, was dazu führt, dass sich LC3 an die phagosomale Membran anlagert.⁴ Die Autophagie ist ein

¹ Kenneth Murphy (2018, p. 48)

² Gordon (2008)

³ Sanjuan et al. (2007)

⁴ Herb, Gluschnko, and Schramm (2019)

intrazellulärer eukaryotischer Mechanismus, bei dem Zellen gealterte Proteine, Organellen oder makromolekulare Komplexe in ein aus einer Doppelmembran bestehendes Autophagosom aufnehmen und in der Folge abbauen.⁵ Gewissermaßen ist die LAP eine Kombination aus Autophagie und Phagozytose, durch die Mikroorganismen mit einer höheren Effizienz abgetötet werden. An den Mechanismen der LAP ist in den letzten Jahren viel geforscht worden, so dass folgende grundlegende Kenntnisse über die LAP vorhanden sind. Mikroorganismen werden von bestimmten Rezeptoren auf der Oberfläche der Makrophagen erkannt. Anschließend wird das Bakterium in ein Phagosom aufgenommen, an dem sich mit Hilfe der Autophagie-Maschinerie zügig LC3 anlagert. Huang et al. konnten zeigen, dass die LC3-Rekrutierung zusätzlich von radikalen Sauerstoffspezies abhängig ist, die durch die NADPH Oxidase 2 (Nox2) produziert werden. Letztendlich kommt es zu einer verbesserten Fusion zwischen dem mit LC3 dekorierten Phagosom (LAPosom) und dem Lysosom. Der Mikroorganismus wird abgetötet.⁶

In meinem Projekt habe ich mich tiefergehend mit den molekularen Mechanismen der LC3-assoziierten Phagozytose in der antibakteriellen Immunantwort mit *Escherichia coli* beschäftigt. Ich habe untersucht, ob der Prozess der LAP nach Infektion mit *Escherichia coli* von durch Nox2 generierten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) abhängt und inwiefern die Rezeptoren TLR4 und Mac-1 eine Rolle bei der Aktivierung von Nox2 und damit der LAP spielen. Darüber hinaus habe ich untersucht, welche ROS Subspezies für die Induktion der LAP notwendig sind, wo diese wirken müssen und welchen Zusammenhang die Entstehung von ROS und die Rekrutierung von LC3 zu Phagosomen haben.

⁵ Yu, Chen, and Tooze (2018)

⁶ J. Huang et al. (2009)

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Angeborene antibakterielle Immunabwehr

Eine Infektion beginnt, sobald ein Krankheitserreger es geschafft hat eine der Körperbarrieren zu überwinden. Im Blut, in der extrazellulären Flüssigkeit wie auch in epithelialen Sekreten kommen lösliche Moleküle vor, die sofort mit der Bekämpfung des Mikroorganismus beginnen. Antimikrobielle Enzyme, wie Lysozym greifen die Zellwand von Bakterien an, antimikrobielle Proteine wie Defensine lysieren bakterielle Zellmembranen und das Komplementsystem hilft bei der Markierung von Mikroorganismen, sodass diese leichter von Phagozyten erkannt werden. Wenn der Krankheitserreger trotz dieser Maßnahmen nicht eliminiert werden kann, kommen die Zellen der angeborenen Immunabwehr ins Spiel, die über PRRs PAMPs auf der Oberfläche der Mikroorganismen erkennen. Zu den Zellen der angeborenen Immunabwehr gehören u.a. Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen. Makrophagen sind langlebig und kommen in hoher Anzahl im submukösen Bindegewebe vor, so dass sie bei einer Infektion direkt vor Ort sind. Granulozyten haben die stärkste phagozytotische Aktivität, sind jedoch kurzlebig und kommen vorwiegend im Blut vor. Bei Infektionen müssen sie erst ins Gewebe einwandern. Die dendritischen Zellen stellen eine Brücke zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort dar. Sie haben zwar eine phagozytotische Aktivität, ihre primäre Aufgabe ist jedoch die Aktivierung von T-Zellen. Allen Phagozyten gemeinsam sind Rezeptoren, mit denen sie Pathogene identifizieren. Die Rezeptoren erkennen neben PAMPs auch DAMPs (Damage-associated molecular patterns), die durch Stress oder Gewebeschädigung hervorgerufen werden.⁷ Zu den PAMPs, die von den PRRs erkannt werden, gehören Lipoproteine, LPS, Flagellin und Nukleinsäuren.⁸ Bindet ein Pathogen an einen PRR kommt es zur Signalweiterleitung ins Zell-Innere. Der Mikroorganismus wird in ein Phagosom in das Innere des Phagozyten aufgenommen. Das Phagosom reift zum Phagolysosom, indem es mit Lysosomen verschmilzt. Das führt zu einer Übertragung der mikrobiziden sauren Hydrolasen vom Lysosom zum Phagosom und somit zum Abtöten der Mikroben. Durch die Bindung des Pathogens werden zudem Signalwege aktiviert, die unter anderem zur Expression und Sekretion verschiedener Cytokine führen.⁹

⁷ Kenneth Murphy (2018, pp. 10, 48, 96-100)

⁸ Kawai and Akira (2006)

⁹ Kenneth Murphy (2018, p. 14)

2.2 Makrophagen

Makrophagen bilden, wie im vorherigen Abschnitt erwähnt, eine wichtige Phagozytenpopulation, da sie unter homöostatischen Bedingungen in den meisten Körpergeweben anwesend sind. Je nach Gewebe, in dem sie lokalisiert sind, haben Makrophagen unterschiedliche Bezeichnungen. (Tabelle 1)

Tabelle 1: Makrophagenarten (In Anlehnung an Behrends J (2016))

Makrophagenart	Vorkommen
Gewebemakrophagen	Bindegewebe fast aller Organe
Langerhans-Zellen	Epidermis
Makrophagen	lymphatische Organe und Knochenmark
Alveolarmakrophagen	Lunge
Peritonealmakrophagen	Peritonealhöhle
Kupffer-Zellen	Leber
Osteoklasten	Knochen

Sie entwickeln sich entweder aus Vorläuferzellen, die während der Embryonalentwicklung in die Gewebe einwandern und im Sinne eines Fließgleichgewichts immer wieder erneuert werden oder aus Monozyten, die im Blut zirkulieren und bei Infektionen in die Gewebe einwandern. Die zirkulierenden Monozyten entwickeln sich bei Mäusen und beim Menschen im Knochenmark. 90 % der Monozyten exprimieren CD14, einen Corezeptor für einen PRR. Bei einer Infektion wandern sie vom Blut ins Gewebe ein und differenzieren sich zu Entzündungsmonozyten oder Makrophagen. Die restlichen 10 % der Monozyten exprimieren CD14 und CD16 und rollen am Endothel entlang. Man geht davon aus, dass sie Entzündungen des Endothels erkennen, sich aber nicht zu Gewebemakrophagen differenzieren.¹⁰

Makrophagen nehmen verschiedene Funktionen in der Immunabwehr ein. Zum einen fördern sie als M1-Makrophagen Entzündungsreaktionen, indem sie am Ort der Entzündung Cytokine sezernieren (IL-1 β , IL-6, TNF- α). Dadurch initiieren und regulieren sie die Abwehrreaktionen des Körpers. Zusätzlich phagozytieren sie Mikroben und haben die Aufgabe als professionelle antigenpräsentierende Zellen Antigen-Fragmente an MHC-Klasse-II-Proteine gekoppelt für Zellen der adaptiven Immunität zu präsentieren. Zum anderen nehmen sie auch in der Zerstörung von Tumorzellen eine wichtige Rolle ein. Zusätzlich haben sie eine Aufgabe in der Entsorgung von Zellabfall via Phagozytose und fördern als M2-Makrophagen den Heilungsprozess einer Entzündung.¹¹

¹⁰ Kenneth Murphy (2018, pp. 9-13)

¹¹ Horn (2018)

Makrophagen exprimieren Rezeptoren, die nach Aktivierung die Immunantwort einleiten. Einige PRRs, wie die Toll-like Rezeptoren, kommen als Transmembranproteine vor und erkennen somit PAMPs von extrazellulären bzw. im Phagosom befindlichen Bakterien. Der andere Teil der PRRs befindet sich im Cytoplasma, dazu gehören die NOD-like Rezeptoren (NLRs), die eine intrazelluläre Invasion von Bakterien erkennen. Die Rezeptoren sind gegen mikrobielle Oberflächenproteine gerichtet. Wichtige Rezeptoren der Makrophagen sind neben den Toll-like Rezeptoren (TLRs) die Scavenger-Rezeptoren, CD14-Rezeptoren (Cluster of Differentiation 14 (LPS-Rezeptor)), oder Fc-Rezeptoren.¹² Nach Erkennen und Bindung des Bakteriums werden mehrere Signalwege angeschaltet. Durch die Erkennung von PAMPs kommt es zur phagosomalen Aufnahme des Bakteriums und zur Formierung eines Phagosoms.¹³ Beim Prozess der Phagozytose wird durch die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Proteine, wie Kinasen und GTPasen, das Aktin-Skelett reorganisiert.¹⁴ Durch die Interaktion von F-Aktin mit verschiedenen Myosin-Isoformen kommt es zur Vesikelbildung um den gebundenen Liganden und letztendlich zur Aufnahme des Bakteriums in das Zellinnere des Makrophagen.¹⁵ Nach Aufnahme des Bakteriums in das Zellinnere kommt es zum sog. respiratory burst, bei dem der Sauerstoffverbrauch des Makrophagen zunimmt weil durch die NADPH-Oxidase vermehrt das Superoxid anion ins Lumen des Phagosoms hinein gebildet wird.¹⁶ Dieses wird dann zu H₂O₂ umgewandelt. Durch weitere chemische und enzymatische Reaktionen wird aus H₂O₂ eine Reihe von toxischen ROS wie Hydroxylradikal (OH) und Hypochlorit (OCI⁻).¹⁷ ROS haben eine antimikrobielle Wirkung und nehmen eine sehr wichtige Rolle bei der makrophagen-vermittelten Eliminierung der Bakterien ein. Die Synthese von ROS erfolgt durch Nox2. Eine Mutation im Gen der Nox2 verschlechtert die Eindämmung der Infektion und führt somit zu einer deutlich höheren Letalität bei Mäusen, die die Mutation aufweisen.¹⁸ Als nächsten Schritt reift das Phagosom zum Phagolysosom, indem es mit Lysosomen verschmilzt. Dies führt zu einer Übertragung eines Cocktails aus mikrobiziden sauren Hydrolasen, Proteasen, Peptidasen und weiteren Enzymen vom Lysosom ins Phagosom. Zusätzlich werden die Protonenpumpen aktiviert, was zu einer deutlichen Senkung des pH-Wertes im Inneren des Phagosoms führt. Im letzten Schritt wird das Material im Inneren des Phagosoms abgebaut.¹⁹

¹² Kenneth Murphy (2018, pp. 12-13, 99)

¹³ Gordon (2016)

¹⁴ Groves, Dart, Covarelli, and Caron (2008)

¹⁵ Richards and Endres (2014)

¹⁶ Roos, van Bruggen, and Meischl (2003)

¹⁷ Robinson, Ohira, and Badwey (2004)

¹⁸ Pizzolla et al. (2012)

¹⁹ Kenneth Murphy (2018, p. 14)

Peritoneale Makrophagen

Peritoneale Makrophagen entstammen dem Peritonealraum. Der Peritonealraum ist ein flüssigkeitsgefüllter Raum zwischen der Wand des Abdomens und den Organen, welche sich im Abdomen befinden.²⁰ Peritoneale Makrophagen (PM) aus der Maus werden seit 1960 weit verbreitet in der Forschung genutzt. Neben den peritonealen Makrophagen spielen bone marrow-derived macrophages (BMDM) und splenic macrophages (SPM) ebenfalls eine Rolle als Makrophagenquelle in der Forschung. Peritoneale Makrophagen sind reifer als bone marrow derived macrophages (BMDM) und splenic macrophages (SPM) bezogen auf die Morphologie, die molekulare Oberflächen-Charakteristik und auch die ROS-Produktion nach Infektion.²¹ Aus diesem Grund wurden für die Experimente in diesem Projekt ausschließlich peritoneale Makrophagen verwendet.

²⁰ Pannu and Oliphant (2015)

²¹ Wang et al. (2013)

2.3 Rezeptoren

2.3.1 TLR4 und MyD88

Toll-like Rezeptoren erkennen PAMPs, wie Lipoteichonsäure (gram⁺ Bakterien), Lipopolysaccharide (gram⁻ Bakterien), doppelsträngige RNA (Viren) und Flagelline, und nehmen somit eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunabwehr ein.²² Es sind 11 Mitglieder der TLR Familie identifiziert. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, und TLR11 sitzen in der Plasmamembran und erkennen somit Pathogene, die extrazellulär liegen. TLR3, TLR7, TLR8, und TLR9 liegen im endosomalen/lysosomalen Kompartiment und erkennen Pathogene, die im Endosom liegen.²³ Für den TLR-Transduktionsweg sind Adapterproteine notwendig, welche mit der cytoplasmatischen Domäne des TLR assoziieren. Zu den Adapterproteinen gehören MyD88 (myeloid differentiation primary response protein 88), TIRAP (TIR domain-containing adaptor protein), TRIF (TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN β) und TRAM (TRIF-related adaptor molecule). Alle TLR-Rezeptoren nutzen den MyD88-Rezeptor, außer TLR3, der TRIF rekrutiert. TLR4 ist der einzige Rezeptor der TLR-Familie, der beide Wege aktiviert, den MyD88-abhängigen und den MyD88-unabhängigen (TRIF-abhängigen) Signalweg. Basierend auf MyD88 Knockout Studien ist der MyD88-abhängige Weg eher verantwortlich für die Expression von proinflammatorischen Cytokinen, wohingegen der MyD88-unabhängige Weg zur Induktion von Typ I Interferonen führt.²⁴

Der TLR4 Rezeptor spielt in diesem Projekt eine wichtige Rolle, da ihn E.coli als gram⁻ Bakterium aktiviert. Nach Aktivierung rekrutiert TLR4, über den MyD88-abhängigen Signalweg, IRAK1 und IRAK4. Ähnlich wie MyD88 Knockout-Mäuse, zeigen auch IRAK-4 Knockout-Mäuse eine deutlich reduzierte Produktion von Cytokinen nach LPS Stimulation.²⁵ IRAK-4-Knockout Mäuse sind sogar resistent gegen einen LPS-indizierten Schock.²⁶ Außerdem weisen Patienten mit einer Defizienz von IRAK4 häufiger Infektionen mit *Streptococcus pneumoniae* und *Staphylococcus aureus* auf.²⁷ Durch die Rekrutierung von IRAK4 und IRAK1 wird die E3-Ubiquitin-Ligase TRAF6 aktiviert. TRAF6 wird daraufhin polyubiquitiniert, dadurch entsteht ein Gerüst für die Aktivierung von TAK1. TAK1 bindet an den IKK Komplex und phosphoryliert die IKK β -Untereinheit, die wiederum I κ B phosphoryliert. I κ B wird degradiert und gibt damit NF- κ B frei, was nun in den Zellkern diffundiert und die Expression von Cytokinen stimuliert. Zusätzlich aktiviert TAK1 MAPKs, was zur vermehrten Transkription von AP-1 führt und somit

²² Kenneth Murphy (2018, p. 109)

²³ Kawai and Akira (2010)

²⁴ Barton and Kagan (2009)

²⁵ Lu, Yeh, and Ohashi (2008)

²⁶ Suzuki et al. (2002)

²⁷ Picard et al. (2003)

kommt es zur vermehrten Expression von proinflammatorischen Cytokinen.²⁸ Der MyD88-unabhängige Weg aktiviert anstatt MyD88 das Adapterprotein TRIF, was wiederum RIP1 und TRAF3 aktiviert. RIP1 aktiviert die MAPK und führt damit zu einer Zunahme der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B. TRAF3 führt über IRF3 auch zu einer vermehrten Produktion von Typ I Interferon (Abbildung 1).²⁹

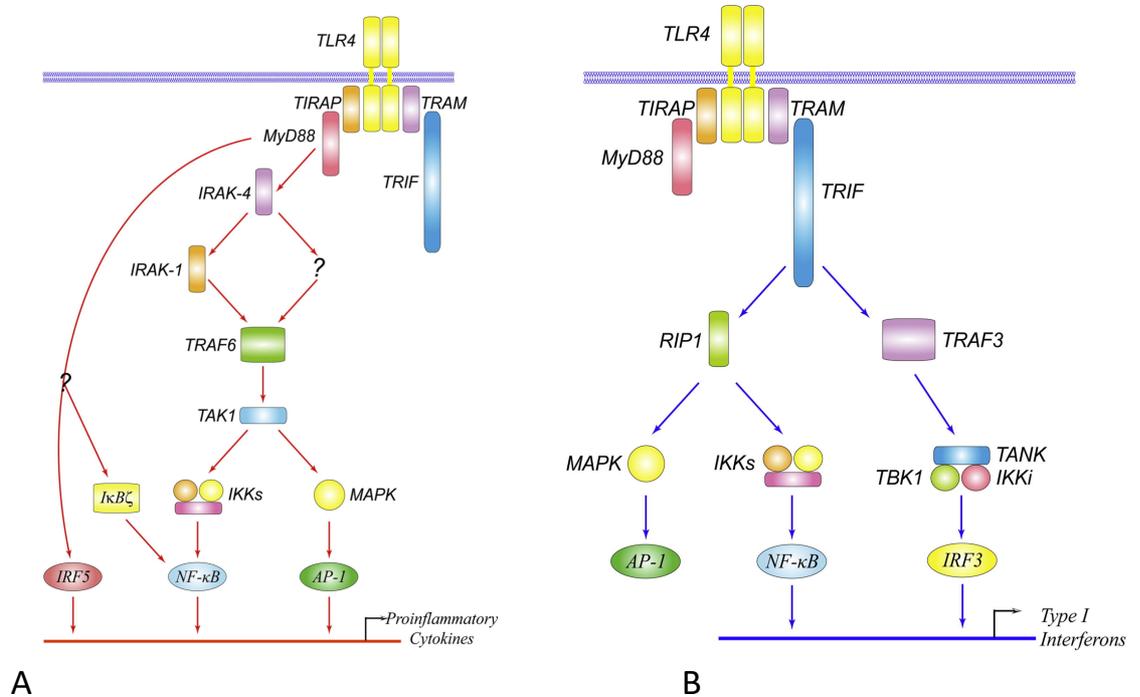


Abbildung 1: **TLR4 Signalweg** MyD88 abhängiger Weg (A) MyD88 unabhängiger Weg (B)
Quelle: Lu et al. (2008)

²⁸ Chang and Karin (2001)

²⁹ Moynagh (2005, pp. 469-476)

2.3.2 Mac-1 ($\beta 2$ integrin macrophage1 antigen)

Mac-1 ist ein heterodimerer Komplex, der aus CD11b und CD18 besteht. Mac-1 erkennt als PRR PAMPs und DAMPs. Der Rezeptor ist auf Zellen der angeborenen Immunabwehr, wie Monozyten, Granulozyten und natürlichen Killerzellen vorzufinden und ist bei vielen Immunprozessen im Körper beteiligt, wie z.B. Zelladhäsion, Migration, Phagozytose und Chemotaxis.³⁰ Bei der Bekämpfung von L.m. haben Drevets *et al.* schon im Jahre 1993 gezeigt, dass Mac-1 eine unerlässliche Rolle spielt. Im weiteren Verlauf wurde dann 2013 festgestellt, dass Mac-1 für die Aktivierung von Nox2 bei Makrophagen bei der Immunantwort auf extrazelluläre dsRNA notwendig ist.³¹ In den folgenden Jahren wurde nachgewiesen, dass der Rezeptor auch bei Infektionen mit Bakterien eine Rolle spielt. Gluschko *et al.* fanden heraus, dass Mac-1 durch die Aktivierung von Nox2 und einer damit verbundenen Generierung von ROS zur Rekrutierung von LC3 zu L.m.-enthaltenden Phagosomen führt.³²

2.4 NADPH-Oxidase 2 (Nox2)

Zur humanen NOX Familie gehören NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 und DUOX2. Alle humanen NOX und DUOX Isoformen, außer NOX5, sind auch in der Maus zu finden. Diese Enzym-Gruppe ist in der Lage Elektronen durch die Plasmamembran zu transportieren und dadurch Superoxid zu produzieren. Zu den Aufgaben dieser Enzyme gehören die Immunabwehr, die zelluläre Signaltransduktion, die posttranslationale Modifikation von Proteinen und die Regulation der Genexpression und die Zelldifferenzierung.³³

Die Nox2 ist ein wichtiges Enzym in der antimikrobiellen Immunabwehr. Patient mit einer septischen Granulomatose (CGD), einer Funktionsstörung der NADPH-Oxidase 2, leiden an lebensbedrohlichen bakteriellen Infektionen und Pilzinfektionen.³⁴ Das Enzym wird umgehend nach Bindung eines Pathogens an einen PRR aktiviert. Die Nox2 besteht aus mehreren Untereinheiten und muss zuerst zusammengesetzt werden. Die cytoplasmatischen Untereinheiten p40^{phox}, p47^{phox} und p67^{phox} und RAC müssen zu der membrangebundenen Domäne Cytochrom b₂₄₅, einem Heterodimer aus den zwei Transmembranproteinen gp91^{phox} und p22^{phox}, rekrutiert werden (Abbildung 2).³⁵ Nach Zusammenbau der Nox2 ist diese aktiv und pumpt Elektronen in das Innere des Phagosoms, wodurch molekularer Sauerstoff in Superoxidanion (O₂⁻) umgewandelt wird.

³⁰ Ho and Springer (1982)

³¹ Zhou et al. (2013)

³² Gluschko et al. (2018)

³³ Bedard and Krause (2007)

³⁴ Segal, Grimm, Khan, Han, and Blackwell (2012)

³⁵ Dusi, Donini, and Rossi (1996)

Nox2 verbindet als Transmembran-Redoxkette den Elektronendonator NADPH mit dem Elektronenakzeptor Sauerstoff. Für die Elektronenübertragung ist ein Flavin-Adenin-Dinukleotid Molekül (FAD) zuständig.³⁶ Das Superoxidanion kann dann in weiteren Prozessen in nachgeschaltete Metabolite mit antimikrobieller Aktivität wie H₂O₂ oder HOCl umgewandelt werden.³⁷ Zusammenfassend werden diese Sauerstoffspezies als „reaktive Sauerstoffspezies“ (ROS) bezeichnet. In neueren Studien wurde gezeigt, dass die Produktion von ROS durch Nox2 auch für die Rekrutierung von LC3 zum Phagosom notwendig ist.³⁸ Die genaueren Mechanismen dieses Prozesses sind allerdings noch unbekannt.

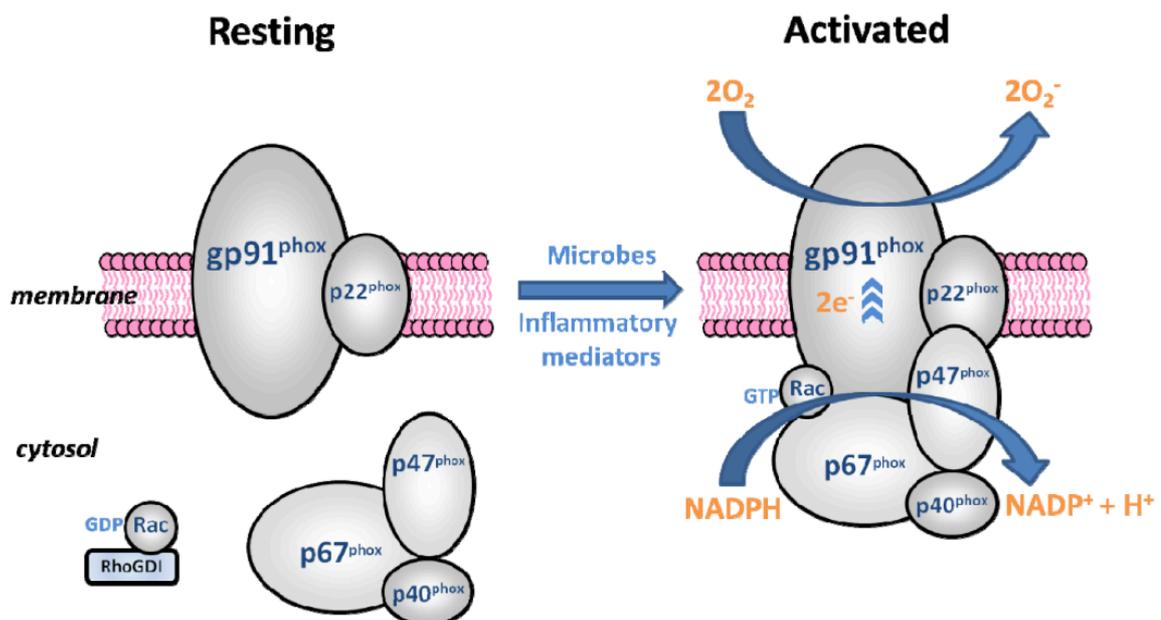


Abbildung 2: **Aktivierungsprozess der Nox2**
Quelle: McCann (2013)

2.5 ROS (Reaktive Sauerstoffspezies)

Mit dem Begriff ROS wird eine Reihe von reaktiven Molekülen und freien Radikalen bezeichnet, die aus molekularem Sauerstoff entstehen.³⁹ Zu den Radikalen zählt man Superoxid (O₂⁻), Hydroxyl (OH), Peroxyl (RO₂) und Alkoxy (RO). Zu den Nicht-Radikalen gehören Hypochlorsäure (HOCl), Ozon (O₃), Singulett-Sauerstoff (O₂) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂). Die ROS Produktion für die Abwehr von Pathogenen beginnt mit der Synthese von O₂⁻ im Phagosom, worauf sich eine Kette von Reaktionen anschließt, die zur Bildung von nachgeschalteten ROS-Metaboliten führt.⁴⁰

³⁶ Bedard and Krause (2007)

³⁷ Robinson et al. (2004)

³⁸ Lam, Cemmanur, Muise, Higgins, and Brumell (2013)

³⁹ Hancock, Desikan, and Neill (2001)

⁴⁰ Bedard and Krause (2007)

ROS können auch oxidativen Stress verursachen. Sie werden dann meist als Nebenprodukt während des mitochondrialen Elektronentransports bei der Zellatmung, bei Oxidoreduktasen oder bei metalkatalysierten Oxidationsreaktionen frei und haben ein zerstörerisches Potential.⁴¹ Wenn die zelluläre Produktion von ROS die antioxidativen Fähigkeiten der Zelle überschreitet, kann es zur Zerstörung von Makromolekülen wie Lipiden, Proteinen und DNA kommen. Um sich vor dieser oxidativen Zerstörung zu schützen, verfügen Zellen über verschiedene antioxidative Enzyme. Zwei sehr wichtige antioxidative Enzyme sind die Superoxiddismutase und die Katalase.⁴²

2.5.1 Zelluläre Abwehr gegen ROS

Die Neutralisierung von reaktiven Sauerstoffspezies ist für das Überleben von allen aeroben Lebensformen notwendig. Die Zellen besitzen Abwehrmechanismen, mit denen es ihnen möglich ist eine Balance zwischen Produktion und Beseitigung von ROS zu schaffen. Zu diesen Abwehrmechanismen zählt die Superoxiddismutase. Sie katalysiert die Umwandlung von zwei Superoxidanionen in ein Molekül Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Sauerstoff (O_2).⁴³ Bei dieser Reaktion kommt es zu einer Reduktion von Metallionen im aktiven Zentrum der SOD.⁴⁴ In Abhängigkeit von dem Metall-Kofaktor, den die SOD besitzt, unterscheidet man vier verschiedene Untergruppen: Eisen SOD (FeSOD), Magnesium SOD (MnSOD), Kupfer-Zink SOD (CuZnSOD), und Nickel SOD (NiSOD). In Prokaryoten findet man alle vier der SOD-Formen. In Eukaryoten ist die FeSOD in Chloroplasten vorzufinden, die MnSOD ist in Mitochondrien und Peroxisomen vorzufinden, und die CuZnSOD findet man in Chloroplasten, im Cytosol und im Extrazellularraum.⁴⁵

Ein weiterer ROS-Fänger ist die Katalase. Man findet sie in den Peroxisomen von Säugetierzellen. Das Enzym ist ein Tetramer, welches aus vier identischen Untereinheiten besteht. Jede Untereinheit hat in seinem aktiven Zentrum eine Häm-Gruppe und NADPH.⁴⁶ Die Katalase weist zwei unterschiedliche enzymatische Aktivitäten auf, die von der H_2O_2 Konzentration abhängen. Bei hohen Konzentrationen von H_2O_2 arbeitet sie katalytisch und wandelt H_2O_2 in H_2O und O_2 um. Bei niedrigen Konzentrationen von H_2O_2 kommt ihre weniger spezifische Funktion zum Einsatz und

⁴¹ Held (2015)

⁴² Fanburg (2000)

⁴³ Held (2015)

⁴⁴ Tainer, Getzoff, Richardson, and Richardson (1983)

⁴⁵ Abreu and Cabelli (2010)

⁴⁶ Zakład Biochemii Akademii Medycznej w Warszawie [Catalase: structure, properties, functions]. Scibior and Czeczot (2006)

verschiedene Wasserstoff-Donatoren wie Alkohole, und Phenole nehmen die Rolle des Wasserstoffperoxids ein und werden oxidiert (Abbildung 3).⁴⁷

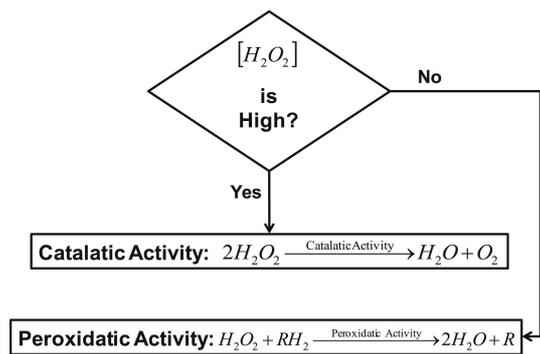


Abbildung 3: **Verschiedene Arbeitsweisen der Katalase**
Quelle: Sepasi Tehrani and Moosavi-Movahedi (2018)

Neben den Enzymen, die gegen ROS vorgehen, gibt es auch nicht-enzymatische kleine Moleküle, die als Antioxidantien fungieren. Das wichtigste Molekül im Intrazellularraum stellt das Glutathion da. Das Tripeptid Glutathion wird im Cytosol von allen Körperzellen in einem zweistufigen Prozess aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin synthetisiert. Das Glutathion kann in einer oxidierten Form (GSSG) und in einer reduzierten Form (GSH) vorliegen.⁴⁸ Oxidiertes Glutathion besteht aus zwei Tripeptiden, die durch eine Disulfidbrückenbindung miteinander verkettet sind. Die reduzierte Form besteht lediglich aus einem Tripeptid, mit einer Sulfhydrylgruppe, die für die Oxidierung von H_2O_2 genutzt wird. Mit der Hilfe der Glutathion-Peroxidase wandelt reduziertes Glutathion schädliches H_2O_2 in Wasser um. Mit Hilfe der Glutathion-Reduktase und FAD wird dann das oxidierte GSH wieder in seine reduzierte Form überführt (Abbildung 4).⁴⁹

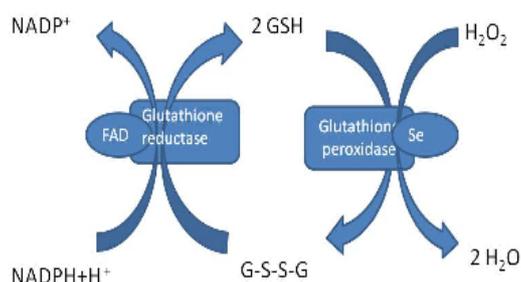


Abbildung 4: **Arbeitsweisen des Glutathions**
Quelle: Chhabra (2016)

⁴⁷ Sepasi Tehrani and Moosavi-Movahedi (2018)

⁴⁸ Held (2015)

⁴⁹ Chhabra (2016)

Vitamin E (Vit E) ist ein weiteres wichtiges natürliches Antioxidant, dessen häufigste Form das α -tocopherol ist. Vit E ist ein fettlösliches Molekül und lagert sich somit gerne zwischen Lipiden in den Membranen an und hat eine bedeutende Funktion bei der Entgiftung von Lipidperoxiden. Es kann, mit Hilfe seiner Hydroxyl-Gruppe, am aromatischen Ring in die Kettenreaktion von freien Radikalen eingreifen und das freie Radikal einfangen. Das Wasserstoffmolekül wird auf das freie Radikal übertragen, dadurch entsteht eine relativ stabile Form eines Vit E Radikals.⁵⁰

Ebselen ist ein Antioxidant, welches die Aktivität der Glutathion-Peroxidase nachahmt. Es katalysiert die Reduktion von ROS, insbesondere H_2O_2 , in einem simplen 3-Schritt Mechanismus, der einen Wechsel des Oxidationsstatus der Se-Gruppe mit sich bringt. Ebselen ist ein lipidlösliches Molekül und kann somit gut die Zellmembran durchqueren.⁵¹

Tempol ahmt das Enzym Superoxiddismutase nach, indem es O_2^- umwandelt. Aufgrund seines niedrigen Molekulargewichtes kann Tempol sehr gut biologische Membranen durchqueren.⁵²

2.6 Autophagie

Der Begriff Autophagie umfasst die Makroautophagie, die Mikroautophagie und die Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA). Die Makroautophagie ist ein intrazellulärer eukaryotischer Mechanismus, bei dem Zellen gealterte Proteine, Organelle, makromolekulare Komplexe in ein aus einer Doppelmembran bestehendes Autophagosom aufnehmen.⁵³ Die Substrate werden alle im Lysosom abgebaut, nur der molekulare Mechanismus unterscheidet sich. Die Zelle ist mit Hilfe der Makroautophagie in der Lage cytoplasmatische Moleküle wie Polysaccharide, Proteine und ganze Zellorganellen in ein Autophagosom aufzunehmen und im Anschluss abzubauen. Bei der Mikroautophagie werden cytoplasmatische Bestandteile durch die Einstülpung der Lysosom-Membran direkt in das Lysosom aufgenommen.⁵⁴ Bei der CMA kommt es zu keiner Vesikelbildung, sondern Chaperonkomplexe im Cytosol und auf der lysosomalen Membran sind in der Lage bestimmte Sequenzen in Proteinen, sogenannte KFERQ-Motive (Aminosäuresequenz; Lysin-Phenylalanin-Glutaminsäure-Arginin-Glutamin) zu erkennen. Nach dem Erkennen des Motivs wird das Protein vom Lysosom aufgenommen.⁵⁵

⁵⁰ Engin (2009)

⁵¹ Sies (1993)

⁵² Bernardy et al. (2017)

⁵³ Yu et al. (2018)

⁵⁴ Ding et al. (2010)

⁵⁵ Kaushik and Cuervo (2012)

Prozess der Makroautophagie

Der Begriff der Makroautophagie wird im nachfolgenden Text als Autophagie bezeichnet. Die Autophagie kann durch verschiedene Signale, wie z.B. Hunger, Wachstumsfaktoren oder Immunsignale eingeleitet werden. Zu Anfang bildet sich eine u-förmige Doppelmembran, das Phagophor. Wie in Abbildung 5 zu erkennen, wird die Autophagie durch den ULK1/2 Komplex gesteuert. Unter nährstoffreichen Bedingungen wird ULK1/2 durch mTORC1 phosphoryliert und damit die Autophagie inhibiert. Bei Hunger löst sich der mTORC1 Komplex von ULK1/2 und leitet damit die Autophagie ein. Downstream von ULK/2 wird die Elongation des Phagophores durch Ubiquitylation-ähnliche Reaktions-Systeme und Proteine der autophagy related genes (ATG) Familie reguliert.⁵⁶ Unerlässliche für den Elongationsprozess ist das zytosolische Protein LC3. Im ersten Schritt wird Pro-LC3 durch Atg4 geschnitten, wodurch LC3-I entsteht. Dann wird LC3-I durch Atg3 in LC3-II konjugiert an Phosphatidylethanolamin (PE). LC3 kann sich nun an die Membran des Phagophores anlagern, wo es die weitere Elongation und letztendlich das Verschließen des Phagophores bewirkt. Anschließend entsteht durch die Fusion von Autophagosom und Lysosom das sogenannte Autolysosom. Durch die lysosomalen Enzyme wird das Autophagosom mit Inhalt abgebaut.⁵⁷

2.7 Phagozytose

Im Laufe der Jahre haben Zellen verschiedene Mechanismen zur Aufnahme von Partikeln und Flüssigkeiten entwickelt. Zu diesen Mechanismen zählt die Pinozytose (Aufnahme von flüssigen oder gelösten Bestandteilen), rezeptorvermittelte Endozytose (Absorption kleiner Partikel über Rezeptoren) und die Phagozytose, welche für die Aufnahme von größeren Partikeln notwendig ist. Die Phagozytose ist ein lebenswichtiger angeborener Immunabwehrmechanismus, bei dem Partikel an bestimmte Membranrezeptoren binden und in der Folge eine Immunreaktion auslösen. Zu den professionellen Phagozyten gehören die Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und dendritischen Zellen. Sie sind in der Lage Partikel die größer sind als $0.5\ \mu\text{m}$ in ein Vesikel, genannt Phagosom aufzunehmen. Phagozyten sind in der Lage Pathogene, aber auch apoptotische Zellen in ihr Inneres aufzunehmen und abzubauen.

Man unterteilt die phagozytotischen Rezeptoren in der Plasmamembran in opsonische und nicht-opsonische Rezeptoren. Zu den nicht-opsonischen Rezeptoren gehören Lektin-ähnliche Erkennungsmoleküle und C-Typ-Lektin-ähnliche Rezeptoren. Zu den Lektin-ähnlichen Rezeptoren zählen CD169 und CD33. Zu der Gruppe der C-Typ-Lektin ähnlichen Rezeptoren gehören Dectin-2, Mincle, und Scavenger-Rezeptoren. Diese

⁵⁶ Wong, Puente, Ganley, and Jiang (2013)

⁵⁷ Florey and Overholtzer (2012)

Rezeptoren erkennen das Pathogen ohne Hilfe. Toll-like Rezeptoren erkennen Pathogene, sie rufen jedoch selbst keine Internalisierung hervor, sondern arbeiten mit nicht-opsonischen Rezeptoren zusammen. Die opsonischen Rezeptoren hingegen brauchen Hilfe bei der Erkennung des Pathogens durch sogenannte Opsonine (z.B. Antikörper), die an die Fremdkörper binden. Nach dem Erkennen des Partikels auf der Oberfläche des Phagozyten, wird eine Signalkaskade eingeleitet, bei der Lipide der Zellmembran umgelagert und das Aktin-Skelett so reguliert wird, dass die Zellmembran sich mit dem gebundenen Inhalt einschnürt. Darauf folgt die Phagosomenreifung, bei der das Phagosom in ein mikrobizides Vesikel, das Phagolysosom, umgewandelt wird. Sobald das Pathogen aufgenommen wurde, kann das frühe Phagosom mit Vesikeln des ER und des Golgi-Apparates fusionieren und das intermediäre Phagosom bilden. Man unterscheidet 4 Stadien: das frühe Stadium, das intermediäre Stadium, das späte Stadium und das Phagolysosom. Während dieses Prozesses bekommt das Phagosom durch vATPasen (Protonenpumpen) einen zunehmend geringeren pH-Wert und immer mehr degradierende Enzyme sammeln sich im Inneren an. Außerdem ändert sich auch die Zusammensetzung der Membran, welche immer mehr Moleküle beinhaltet, die Fusionsprozesse unterstützen.⁵⁸

2.8 LC3-assoziierte Phagozytose

Neben der gewöhnlichen Phagozytose gibt es noch eine weitere Form, die sogenannte LC3-assoziierte Phagozytose (LAP), welche eine Mischung aus Autophagie und kanonischer Phagozytose darstellt. Während der LAP werden Komponenten der Autophagie-Maschinerie zum Phagosom rekrutiert, was dazu führt, dass sich das *Mikrotubuli-assoziierte* Proteine 1/Leichte Kette 3B (Kurzform: LC3) an die phagosomale Membran anlagert. Um die LC3-assoziierten Phagosomen von gewöhnlichen Phagosomen zu differenzieren, nennt man diese LAPosom. Da die Bildung des LAPosoms viele Komponenten der Autophagie-Maschinerie benötigt, spricht man auch von nicht-kanonischer Autophagie. LC3 gilt also nicht nur als Marker für Autophagie. Die LAP wird, wie die herkömmliche Phagozytose, durch rezeptorabhängige Erkennung von Pathogenen bzw. apoptotischen Zellen initiiert. Die internalisierte Ladung wird in ein Einzelmembran-Vesikel aufgenommen. Die Einzelmembran wird von Phosphatidylinosit-3-phosphat (PI(3)P) besetzt, welches von dem Klasse-III-PI (3)-Kinase-Komplex (VPS15, VPS34, Beclin-1, UVRAG und Rubicon) gebildet wird.⁵⁹ Beim Prozess der Autophagie bindet ein Komplex aus WIPI Protein und ATG2 an das generierte PI(3)P in der Plasmamembran. WIPI bindet ATG16L1 und rekrutiert damit den LC3-Konjugationskomplex und das LC3-Konjugationssystem. Für die LAP ist die

⁵⁸ Rosales and Uribe-Querol (2017)

⁵⁹ Schille et al. (2018)

Rekrutierung von ATG16L1 ebenfalls erforderlich. Der Faktor, der an PI(3)P bindet und damit die Verbindung herstellt, ist jedoch noch nicht bekannt. Für die LAP ist, im Gegensatz zur Autophagie, die Bildung von ROS durch Nox2 notwendig.⁶⁰ Für die Aktivierung von Nox2 müssen die zytosolischen Untereinheiten p67^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox} und Rac1/2 zu den membranständigen Anteilen gp91^{phox}, p22^{phox} rekrutiert werden. Rubicon reguliert die Nox2 Aktivität auf zwei Wegen. Zum einen stabilisiert es p22^{phox} über eine direkte Bindung, zum anderen ist die Bindung von p40^{phox} an (PI(3)P), gebildet durch den Rubicon-integrierten Komplex PI3PKC3, notwendig für die komplette Aktivierung von Nox2. Das Phagosom, dekoriert mit LC3-II, wird nun LAPosom genannt. LAPosome können bereits 10 min nach Phagozytose nachgewiesen werden. Durch das Vorhandensein von LC3 auf der Phagosomenmembran kommt es zu einer schnelleren Fusion von LAPosom und Lysosom (Abbildung 5).⁶¹

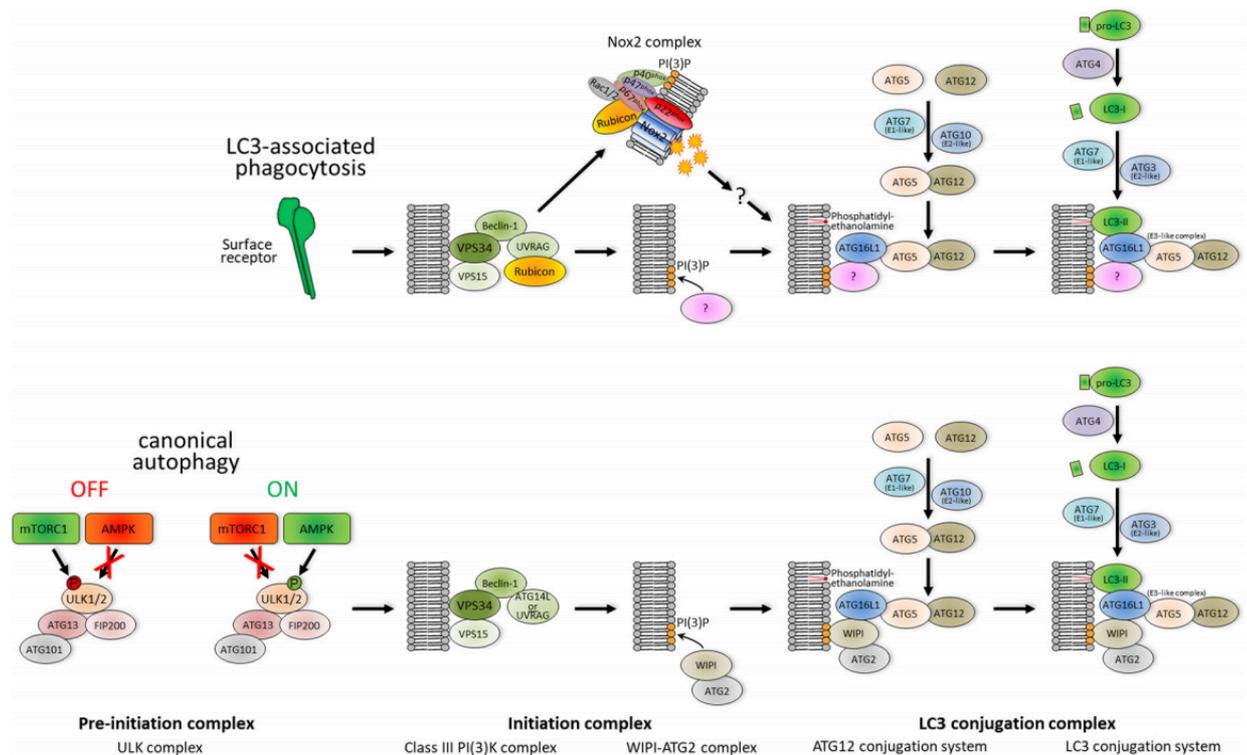


Abbildung 5: **Molekulare Mechanismen der kanonischen Autophagie und der LAP**
Quelle: Herb et al. (2019)

2.8.1 Der Weg von pro-LC3 zu LC3-II

Das Atg8/LC3 Protein spielt eine wesentliche Rolle bei der Elongation des Phagophores bei der Autophagie und hat auch eine wichtige Bedeutung im Prozess der LAP. In Säugetierzellen gibt es mehrere Homologe des Atg8 Proteins wie MAP1LC3A/B/C, GABARAP, GABARAPL1/2.⁶² Am besten charakterisiert ist LC3B, welches sobald es in seiner lipidierten Form vorliegt an das Phagosom bindet und auch dort verbleibt. Wie in Abbildung 5 zu erkennen, besitzen Eukaryoten zwei Ubiquitylation-ähnliche

⁶⁰ Ju Huang et al. (2009)

⁶¹ Herb et al. (2019)

⁶² Y. K. Lee and Lee (2016)

Reaktionen für die feste Verankerung von LC3-II. Bei der ersten Ubiquitylation-ähnlichen Reaktion wird die Bildung eines Atg16L1-Atg5-Atg12-Komplexes katalysiert, welcher für die Bindung von LC3-II notwendig ist. Bei der zweiten ubiquitylierungsartigen Reaktion wird LC3-II aus seiner Vorläuferform gebildet. Der erste Schritt der Umwandlung von pro-LC3 zu LC3-II beinhaltet die Abspaltung der C-terminalen Region des Vorläufer-LC3 durch Atg4. Das lösliche LC3-I befindet sich im Cytosol. Durch die proteolytische Wirkung von Atg4 wird ein Glycinrest frei, der es LC3-I ermöglicht mit Atg7 zu interagieren. Atg7 überträgt dann die LC3-I C-terminale Domäne zu Atg3. Atg3 katalysiert die Konjugation von LC3-I zu dem Lipid Phosphatidylethanolamin. Die Bindung von LC3-II an die Membran ist ein kritischer Schritt. Der Atg16L1 Komplex hat eine essentielle Wirkung auf die Aufnahme von LC3-II in die Phagosomen bzw. Autophagosomenmembran. Der Komplex interagiert mit Atg3 und stellt damit sicher, dass die LC3-Umwandlung in Nachbarschaft zur Membran stattfindet.⁶³

2.9 Verwendete Mikroorganismen

2.9.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli (E.coli) ist ein prädominant fakultativer Anaerobier der menschlichen Darmflora. Das Bakterium besiedelt den Gastrointestinal-Trakt kurz nach der Geburt und lebt ab dann im menschlichen Körper zum gleichseitigen Nutzen. E.coli bleibt unter normalen Bedingungen harmlos, erst wenn der Erreger seinen Lebensraum, den Darm, verlässt oder bei Immunsupprimierten die Oberhand gewinnt, wird er zur Gefahr. Man unterscheidet drei klinische Syndrome, die durch E.coli hervorgerufen werden: Urogenitaltraktinfektionen, Sepsis/Meningitis, und Darminfektionen/Durchfall.⁶⁴ Das Bakterium hat eine sehr hohe Teilungsrage und kann sich ungefähr alle 20 Minuten replizieren. 1997 wurde erstmals eine Analyse der Genomsequenz von E.coli durchgeführt, mittlerweile wurde das Genom vollständig sequenziert. Neben der einfachen Handhabung und der vollständigen Sequenzierung ist E.coli in der Lage unter aeroben und anaeroben Bedingungen zu wachsen.⁶⁵ Einige Stämme des Erregers haben spezifische Virulenzfaktoren entwickelt, die es ihnen ermöglichen sich an neue Nischen anzupassen und ein weiteres Spektrum an Infektionen hervorzurufen. Es gibt sechs intestinale Pathotypen von E.coli. Zu den intestinalen pathogenen Stämmen zählen der enteropathogene E. coli (EPEC), der enterotoxigene E. coli (ETEC), der enteroaggregative E. coli (EAEC), enterohaemorrhagische E.coli (EHEC), der diffus adhärente E. coli (DAEC) und der enteroinvasive E. coli (EIEC).

⁶³ Randall-Demllo, Chieppa, and ERI (2013)

⁶⁴ Nataro and Kaper (1998)

⁶⁵ Allocati, Masulli, Alexeyev, and Di Ilio (2013)

Urogenitaltraktinfektionen sind die am häufigsten vorkommenden extraintestinalen E.coli Infektionen und werden hervorgerufen von uropathogenen E.coli (UPEC). Der für Meningitiden und Sepsen verantwortliche extraintestinale Pathotyp heißt meningitis-assoziierte E.coli (MNEC).⁶⁶

2.9.2 Escherichia coli K-12 DH5α

DH5α ist einer der am häufigsten gebrauchten E.coli K-12 Labor-Stämme. Die E.coli K-12 Stämme können leicht genetisch modifiziert werden und sie sind ein biologisch sicheres Transportmittel für Klonierungs- und Expressionsvektoren.⁶⁷ Der Wildtyp E.coli K-12 Stamm wurde 1922 an der Universität Stanford aus den Faeces von einem geheilten Diphtherie Patienten gewonnen. Im Jahre 1944 sind die ersten Subkulturen und Derivate angelegt worden. Seitdem wurde der Stamm intensiv genutzt und Mutationen unterzogen. Der K-12-Stamm erhält keine bekannten E.coli Virulenz-Gene und wird daher als Prototyp eines sicheren und nicht pathogenen Bakterienstamms angesehen.⁶⁸

⁶⁶ Kaper, Nataro, and Mobley (2004)

⁶⁷ Anton and Raleigh (2016)

⁶⁸ Kuhnert, Nicolet, and Frey (1995)

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Nährmedien und Zusätze

Gelagert bei 4°C (falls nicht anders angegeben)

Tabelle 2: Verwendete Nährmedien und Zusätze

Name	Firma
Brain-Heart-Infusion-Medium (BHI)	Becton Dickinson GmbH
Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) (w 3,7 g/L NaHCO ₃ ; w 4,5 g/L D-Glucose, w stable Glutamine, w/o Natriumpyruvat)	Biochrom GmbH
Hanks balanced salt solution (HBSS)	Thermo Fischer
Fetal Calf Serum (FCS)	Biowest (gelagert : -20 °C, nach Hitzeinaktivierung: 4°C)
Phosphate Buffered Saline (PBS) Dulbecco(w/o Ca ²⁺ ;w/o Mg)	Biochrom GmbH

3.1.2 Puffer und Lösungen

Gelagert bei 4°C (falls nicht anders angegeben)

Tabelle 3: Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Bestandteile/Hersteller
Bovine serum albumin (BSA)	0,3 % BSA in PBS 0,1 % BSA in PBS
BSA/Saponin	0,1 % Saponin in 0,3 % BSA 0,1% Saponin in 0,1 % BSA
DMEM (+)	10 % FCS (h.i.)
MACS-Puffer	0.5 % BSA, 200 mM EDTA in PBS
Paraformaldehyd (PFA)	3 % PFA ind PBS, gelagert: -20 °C
Saponin	0,1 % in PBS

3.1.3 Chemikalien

Gelagert bei 4°C (falls nicht anders angegeben)

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Alpha-Tocopherol	Sigma-Aldrich
Bovine Serum Albumin lyophilized powder, BioReagent, suitable for cell culture	Sigma-Aldrich
Ebselen	Thermo Fischer Scientific
Glutathione ethyl ester	Biomol (gelagert bei -20°C)
Katalase	Sigma-Aldrich (gelagert bei -20 °C)
ProLong Gold Antifade	Invitrogen (gelagert bei -20°C)
Saponin	Carl Roth GmbH und Co.KG (gelagert bei Raumtemperatur)
Superoxid-Dismutase (SOD)	Sigma Aldrich (gelagert bei -20°C)
Tempol	Cayman Chemical
Trypanblau	Sigma Aldrich

3.1.4 Antikörper

Gelagert bei 4°C (falls nicht anders angegeben)

Tabelle 5: Verwendete Antikörper

Antikörper	Firma	Identifizierung
Donkey anti-Goat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 633	Invitrogen Molecular Probes	Cat# A21982
Donkey anti-Goat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 555	Invitrogen Molecular Probes	Cat# A21432

Anti-LC3 mAB Purified igG/Mouse	Sigma-Aldrich	Cat# L7543-200UL (gelagert bei -20°C)
Anti Lipopolysaccharid (LPS gram negative bacteria)	Acris	Cat# BP2235
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	Life Technologies	Cat# A-11031
Anti-Listeria monocytogenes	USBiological Life Science	Cat# L2650-01A
Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Superclonal™ Recombinant Secondary Antibody, Alexa Fluor 647	Invitrogen	Cat# A27040
Alexa Fluor™ 647 Azide, Triethylammonium Salt	Invitrogen	Cat# A10277
4-Hydroxynonenal Monoclonal Antibody (12F7)	Thermo Fischer Scientific	Cat# MA5-27570 (gelagert bei -20°C)

3.1.5 Verwendete Materialien

Tabelle 6: Verwendete Materialien

Name	Firma
96F Mikrotiterplatte unbehandelt (weiß/ schwarz)	Thermo Science, Nunc
Blutagarplatten (Schaf)	Oxoid Deutschland GmbH
Falcon tubes	Greiner Bio-One
Microscope slides	Engelbrecht
MS MACS Separation Columns (LS)	Miltenyi Biotec
Omnifix Syringes (10 ml)	B.Braun
Parafilm	American National Can

Tip One Pipettenspitzen (10, 20, 200, 1000)	Star Lab
Tip One Filterspitzen (10, 20, 200, 1000)	Star Lab
Tissue Culture Test plates (24-, 96U Well)	TPP

3.1.6 Geräte

Tabelle 7: Verwendete Geräte

Name	Spezifikation	Firma
Cell counting chamber	Neubauer Improved	LO Laboroptik
Centrifuges	Eppendorf 5417R	Thermo Scientific
Fluorescence microscope	IX81	Olympus
Incubator (Bacteria)	Kelvitron T	Heraeus Instruments GmbH
Incubator (Cells)	Hera Cell 240	Heraeus Instruments GmbH
Incubator (Shaker)	Innova 4200	New Brunswick Scientific
Laminar flow hood	HERAsafe	Thermo Scientific
Microcentrifuge	GalaxyMiniStar	VWR International
Microtiterplate-reader	TriStar2 LB 942	Berthold Technologies
Photometer	Eppendorf Bio	Thermo Scientific
Thermomixer	Eppendorf comfort	Thermo Scientific
Tumbling table	Biometra WT 12	Biometra GmbH

Vortexer	Omnilab REAX 2000	Heidolph
----------	-------------------	----------

3.1.7 Software

Tabelle 8: Verwendete Software

Programm	Anbieter
Fluoview FV10 ASW 1.7b	Olympus Corporation
GraphPad Prism 5.04	GraphPad Software, Inc.
ImageJ 1.46h	Wayne Rasband
Mirco Win 2000	Berthold technologies
Microsoft Professional 2010	Microsoft
Photoshop CS3	Adobe

3.1.8 Kits

Tabelle 9: Verwendete Kits

Name	Hersteller
Click iT Lipid peroxidation Imaging Kit – Alexa Fluor 488 (Cat# C10446)	Molecular probes by life technologies
Amine-Reactive OxyBURST® Reagents D-2935 OxyBURST® Green H2 DCFDA, succinimidyl ester	Molecular probes

3.2 Modellorganismen

Mäuse

Für die Experimente wurden homozygot transgene Knockout-Mäuse und entsprechende Wildtyp-Wurfgeschwister in einem Alter von 6-12 Wochen verwendet. Die Mäuse werden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (Ausschluss von bestimmten Krankheitserregern) im Tierstall des Zentrums für Molekulare Medizin Köln (ZMMK) gehalten. Die Experimente wurden unter Beachtung des deutschen Tierschutzgesetzes und mit der Einverständnis der Ethikbehörde der Universität Köln durchgeführt. Im Folgenden sind die verschiedenen Mauslinien, die für die Versuche verwendet wurden, aufgelistet und die Eigenschaften zusammengefasst.

GFP-LC3 Mäuse:

Die für die Zucht verwendeten Paare waren heterozygote grün-fluoreszierendes-Protein (GFP)-LC3 transgene Mäuse (entwickelt von Mizushima Gruppe National Institute for Basic Biology, Okazaki, Japan 2004). Das GFP-LC3 Transgen beeinträchtigt keine anderen Gene und homozygote Mäuse sind gesund und fertil ohne einen abnormalen Phänotyp. Das GFP-LC3 ist im Vergleich zum normalen LC3 leicht überexprimiert, was aber keine Auswirkungen auf den Prozess der Autophagie und der LC3-assoziierten Phagozytose hat.⁶⁹

CD11b Mäuse

Für die Zucht wurden Paare verwendet, denen das Gen für die Untereinheit CD11b fehlt.

MyD88 Mäuse

Für die Zucht wurden Paare verwendet, bei welchen das Gen für das Adaptermolekül MyD88 ausgeknockt ist. Die Mäuse wurden von M.Pasparakis (Universität Köln) bereitgestellt.

⁶⁹ Kuma and Mizushima (2008)

Nox2 Mäuse

Für die Zucht wurden Paare verwendet, bei denen das Gen für die gp91^{phox} Untereinheit der NADPH-Oxidase 2 fehlt.

Bakterien

Für die Infektionen der peritonealen Makrophagen wurde der E.coli Stamm K-12 DH5a verwendet. Der Stamm wurde bei -80°C (gelöst in DMSO) in Aliquots gelagert. Die Bakterien wurden bei Gebrauch aufgetaut und auf Blutagarplatten ausgestrichen. Die Platten kamen über Nacht in den Inkubator bei 37°C und wurden anschließend bei 4 °C gelagert. Die Blutagarplatten wurden nach 4 Wochen ausgetauscht.

Bakterienstamm	Firma
E.coli Stamm K-12 DH5a	Invitrogen

3.3 Methoden

3.2.1 Isolierung der peritonealen Makrophagen

Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 650 g für 5 min bei 4°C durchgeführt.

Für die Versuche wurden peritoneale Makrophagen aus dem Bauchraum der Maus benötigt. Für die Gewinnung der Makrophagen wurde den Mäusen nach zervikaler Dislokation der Bauchraum mit PBS gespült. Dazu wurden 8ml PBS + 2ml Luft durch eine Kanüle in eine Spritze aufgezogen, in den Bauchraum der Maus gespritzt und wieder in die Spritze aufgenommen. Die gewonnenen Zellen, gelöst in PBS, wurden in ein Falcon umgefüllt. Mäuse mit demselben Genotyp wurden gepoolt. Anschließend wurden die Falcons zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und bei hoher Anzahl von Erythrozyten im Pellet eine Erylyse durchgeführt. Für die Erylyse wurde das Pellet in 5 ml Puffer 1 (0,2 % NaCl) resuspendiert (Hypotonische Lyse). Nach 30 Sekunden wurde mit Puffer 2 (1,6 % NaCl) ein isotonischer Stopp durchgeführt. Im Anschluss wurden die Falcons wieder zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das gewonnene Zellpellet wurde in MACS Puffer (195 µl/2 Mäuse) resuspendiert. Anschließend wurden die peritonealen Makrophagen mit einem CD11b spezifischen monoklonalen Antikörper, gebunden an paramagnetische Perlen (CD11b MicroBeads), markiert (5 µl/2 Mäuse). Dann wurden die Zellen für 15 min bei 300 rpm auf Eis gestellt. Anschließend wurde das Protokoll des Herstellers ausgeführt. Dafür wurden die Zellen 3x mit MACS-Puffer gewaschen und dann auf die LS-Säulen gegeben. Die gewonnenen peritonealen Makrophagen wurden in 1 ml DMEM + 10% FCS resuspendiert. Hinterher wurden die Zellen 1:5 in Trypan Blau verdünnt und mit einer Neubauer Zählkammer gezählt.

3.2.2 Kultivierung von E.coli

Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 3000g für 5 min bei 4°C durchgeführt.

Für die Infektionen wurden E.coli aufgetaut, auf Blutagarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde 5-12 Kolonien mit einer sterilen Impföse von der Blutagarplatte angepickt und in 5 ml BHI-Medium ausgeschleudert. Darauf folgte eine Inkubation über Nacht bei 37°C. Am nächsten Tag wurde 0,8 ml der Bakteriensuspension in 25 ml vorgewärmtes BHI-Medium überführt und weitere 45 min bei 37°C 180 rpm inkubiert. Bei einer optischen Dichte von ca 0,5 bei 600 nm wurden die Bakterien geerntet. Dazu wurde die 25 ml Bakterienkultur in ein 50 ml Falcon überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Glaspipette abgesaugt und das Pellet anschließend in 10 ml PBS resuspendiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1ml PBS resuspendiert. Die Bakterienzahl wurde durch Photometrie (OD600) bestimmt. Die Bakterien wurden anschließend auf eine CFU von 1×10^9 eingestellt.

Folgende Rechnungen wurden zur Einstellung der CFU herangezogen:

$$OD_{600} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 3,33 \times 10^8 = \left(\frac{CFU}{ml}\right)$$

Um die Bakterien auf 1×10^9 einzustellen wurde der Verdünnungsfaktor berechnet

$$\frac{E.coli \left(\frac{CFU}{ml}\right)}{1 \times 10^9} = \text{Verdünnungsfaktor}$$

Im nächsten Schritt wurde das Volumen an PBS, welches für die Einstellung auf 1×10^9 nötig ist, hinzugegeben.

Im Anschluss wurden die Bakterien auf die gewünschte Multiplizität der Infektion (MOI) (verdünnt in HBSS) eingestellt.

$$\frac{1 \times 10^9 (CFU/ml)}{(\text{Anzahl an Zellen} \times \text{Volumenfaktor} \times \text{MOI})} = 2. \text{Verdünnungsfaktor}$$

3.2.3 Immunfluoreszenzfärbung

Infektion der Makrophagen

Die peritonealen Makrophagen wurden nach Zählung auf Deckplättchen mit einem Durchmesser von 13 mm in einer 24-Well Multiwellplatte ausgesät. Die Dichte betrug $0,35-0,4 \times 10^6$ Zellen/Well. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei gewünschter Stimulation mit Substanzen (GSH, Tempol, Ebselen, Vit E) wurden diese am nächsten Tag 1 Stunde vorinkubiert. Im nächsten Schritt wurde das Medium abgenommen und die Bakterien mit einer MOI 1 verdünnt in HBSS zu den Zellen gegeben. Um die Adhärens der Bakterien an den Makrophagen zu verstärken wurde ein Zentrifugationsschritt durchgeführt (850 g, 4°C, 5'). Anschließend wurden die Zellen 3x mit gekühltem HBSS-Puffer gewaschen und vorgewärmtes DMEM + 10 % FCS zu den Zellen gegeben. Nach der gewünschten Infektionszeit wurde das Deckgläschen aus dem Well entfernt und in eine neue 24-Well Platte mit PFA zur Fixierung überführt. Nach 20 min wurde das PFA entfernt und die Plättchen in PBS bei 4°C gelagert.

Immunfluoreszenzfärbung von Bakterien und Zellen

Im Anschluss an die Infektion wurde zur Detektion eine Färbung von Bakterien und Zellen (LC3 der Zellen) durchgeführt.

Tabelle 10: Extrazelluläre E.coli Färbung

Antikörper	Verdünnung	Lösung
Primärer Antikörper (anti-LPS (goat))	1:250	3 % BSA in PBS
Sekundärer Antikörper (anti-goat, konjugiert an 633 Fluoreszenzfarbstoff)	1:1000	3 % BSA in PBS

Tabelle 11: Intrazelluläre E.coli Färbung

Antikörper	Verdünnung	Lösung
Primärer Antikörper (anti-LPS (goat))	1:250	3 % BSA in 1% Saponin
Sekundärer Antikörper (anti-goat konjugiert an 555 Fluoreszenzfarbstoff)	1:1000	3 % BSA in 1% Saponin

Tabelle 12: Extrazelluläre L.m. Färbung

Antikörper	Verdünnung	Lösung
Primärer Antikörper (anti-LM (rabbit))	1:250	3 % BSA in PBS
Sekundärer Antikörper anti-rabbit-IgG Alexa Fluor 405 konjugiert	1:1000	3 % BSA in PBS

Tabelle 13: Intrazelluläre L.m. Färbung

Antikörper	Verdünnung	Lösung
Primärer Antikörper (anti-LM (rabbit))	1:250	3 % BSA in 1% Saponin
Sekundärer Antikörper anti-rabbit-IgG Alexa Fluor 568 konjugiert	1:1000	3 % BSA in 1% Saponin

Tabelle 14 Färbung von LC3

Antikörper	Verdünnung	Lösung
Primärer Antikörper	1:100	3 % BSA in 1% Saponin
Sekundärer Antikörper	1:500	3 % BSA in 1% Saponin

Alle Färbeschritte wurden mit Hilfe einer Färbekammer durchgeführt. Dazu wurden 2 Papierhandtücher genässt und so geschnitten, dass diese in die Färbekammer passen. Anschließend wurde ein Stück Parafilm zurechtgeschnitten, sodass dieses in die Kammer passt und alle Plättchen darauf Platz finden. Alle Waschschrirte wurden in der 24-Well Platte durchgeführt.

Folgende Lösungen wurden vorbereitet:

3 % BSA in PBS

1% Saponin

3 % BSA in 1% Saponin

Färbung der E.coli/ L.m.

Als erstes wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit je 1 ml 3 % BSA in PBS für eine Einwirkzeit von 15 min blockiert. In der Zwischenzeit wurde der Erstantikörper 1:250 verdünnt und je Plättchen 20 µl auf den Parafilm in der Färbekammer gegeben. Die Plättchen wurden im Anschluss für 30 min in der Färbekammer bei RT gefärbt. Danach wurden die Plättchen mit je 1ml 3x mit PBS gewaschen.

Es folgte eine Zweitantikörperfärbung für 30 min bei RT. Danach wurden die Plättchen erneut 3x mit PBS gewaschen. Für die Färbung der intrazellulären E.coli mussten die Zellen mit jeweils 1 ml/Well 1% Saponin permeabilisiert werden. Darauf folgte ein Blockingvorgang von 15 min mit jeweils 1 ml 3 % BSA in 1% Saponin. Die intrazellulären E.coli wurden anschließend mit dem anti-LPS Primärantikörper, verdünnt in 3 % BSA in 1% Saponin, über Nacht gefärbt. Am nächsten Tag wurden die Plättchen 3-mal mit Saponin gewaschen. Der Zweitantikörper wurde 1:250 verdünnt und die Färbung fand 30 min bei Raumtemperatur statt. Im Anschluss wurden die Plättchen 3-mal mit PBS gewaschen und anschließend mit Prolong Gold auf den Deckgläsern fixiert. Die Proben wurden 24 h lang lichtgeschützt getrocknet und am folgenden Tag mit konfokaler Laser Scanning Mikroskopie analysiert.

Färbung von LC3

Für die Färbung des LC3 mussten die Zellen mit jeweils 1 ml/Well 1% Saponin permeabilisiert werden. Darauf folgte ein Blocking-Vorgang von 15 min mit jeweils 1 ml 3 % BSA in 1% Saponin. Der LC3 Antikörper wurde 1:100 verdünnt und über Nacht bei 4°C gefärbt. Am nächsten Tag wurden die Plättchen 3x mit 0,1 % Saponin gewaschen. Der Zweitantikörper wurde 30 min bei RT gefärbt. Im Anschluss wurden die Plättchen 3-mal mit PBS gewaschen und anschließend mit Prolong Gold auf den Deckgläsern fixiert. Die Proben wurden 24 h lang lichtgeschützt getrocknet und am folgenden Tag mit konfokaler Laser Scanning Mikroskopie analysiert.

Anfärbung von Lipidperoxiden mit Click – iT Lipid Peroxidation Detection Imaging Kit

Für die Detektion von Lipidperoxiden werden die Zellen für den Infektionszeitraum mit LAA inkubiert. LAA gelangt in die Zellen und wird bei der Entstehung von Lipidperoxiden oxidiert wodurch 9- und 13-hydroperoxy-octadecadienoic Säure (HPODE) entsteht. Diese Hydroperoxide zerfallen in reaktive Aldehyde, welche Proteine an nukleophilen Seitenketten modifizieren. Die modifizierten Proteine können dann von einem Farbstoff erkannt und sichtbar gemacht werden.

Auswertung der Immunfluoreszenzmikroskopie

Für die Auswertung der Proben wurden Fotos mit dem Programm Olympus Fluoview FV1000 der Firma Olympus gemacht. Von jeder Probe wurden im Durchschnitt 7 Fotos gemacht, sodass man insgesamt auf eine Zellzahl von 100 Zellen je Genotyp und Zeitpunkt gekommen ist.

Bei der Analyse der Proben wurde folgendermaßen vorgegangen:

Vorerst wurden die infizierten Zellen der Probe durchnummeriert. Im Anschluss wurde jede infizierte Zelle einzeln begutachtet und notiert, ob das Bakterium extrazellulär gelegen oder schon intrazellulär in ein Phagosom aufgenommen wurde. Bei den intrazellulären Bakterien wurde zusätzlich in LC3 positive und LC3 negative Phagosomen unterteilt. Bei einem positiven Befund waren die Bakterien von einem grünen Ring umgeben. Für die statistische und graphische Auswertung wurde das Programm Graph Pad Prism genutzt.

3.2.4 Quantifizierung von ROS

Für die Messung der Sauerstoffspezies wurden zwei verschiedene 96F Platten benutzt. Eine weiße Platte, mit welcher Lumineszenz gemessen wurde, und eine schwarze Platte, mit welcher Fluoreszenz gemessen wurde. Die peritonealen Makrophagen wurden nach Zählung in den 96F Platten mit einer Dichte von $0,5 \times 10^5$ Zellen/Well ausgesät. Darauf folgte eine Inkubation über Nacht bei 37°C. Vor dem Beginn des Experiments wurden, falls benötigt, Substanzen in den gewünschten Konzentrationen angesetzt.

Messung von extrazellulären ROS

Bei einer gewünschten Stimulation mit GSH, Tempol, Ebselen und Vit E wurden diese eine Stunde vor Infektion inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen 3x gewaschen und somit die Substanzen, welche nicht von den Zellen aufgenommen wurde, gewaschen. Zwischen den Waschschrritten erfolgte immer ein Zentrifugationsschritt von 650g, 5', 4°C. Während des letztens Zentrifugationsschrittes wurden die Bakterien auf die richtige MOI in HBSS verdünnt. Es folgte die Infektion. Ab jetzt wurden alle Schritte auf Eis ausgeführt. Die Wells ohne Infektion bekamen ein Volumen von 50 µl, die Wells mit Infektion ein Volumen von 50 µl der Bakteriensuspension. Um die Adhärens der Bakterien an den Zellen zu fördern wurde ein Zentrifugationsschritt durchgeführt von 850g, 5', 4°C. Die Bakteriensuspension, wie auch das reine HBSS, wurden komplett abgenommen. Im nächsten Schritt wurden die entsprechenden Auffüllmengen an HBSS-Puffer in die Wells gegeben. Wenn gewünscht wurden Inhibitoren wie Katalase und SOD hinzugegeben. Als Positivkontrolle wurde PMA, welcher die Proteinkinase C aktiviert und somit zu einer erhöhten Produktion von ROS in Makrophagen führt hinzugegeben.⁷⁰ Die Konzentration betrug 1 ng/ml. Im letzten Schritt wurden 100 µl des für die Messung notwendige Reagens auf die Zellen gegeben und zügig mit der Messung fortgefahren.

⁷⁰ H. B. Lee, Yu, Song, and Ha (2004)

Isoluminol

Extrazelluläres bzw. phagosomales O_2^- kann durch Chemolumineszenz detektiert werden. Als luminogene Substanz wurde das Isoluminol in Kombination mit der Horse Radish Peroxidase verwendet. Die Oxidation von Isoluminol durch O_2^- führt zur Bildung von 3-Aminophthalsäure in einem angeregten Zustand. Wenn das Produkt in einen niedrigeren Energiezustand fällt werden Photonen freigesetzt, welche durch das Luminometer quantitativ erfasst werden. Die Horse Radish Peroxidase ist eine Substanz, welche die Umsetzung von Isoluminol zu 3-Aminophthalsäure katalysiert.⁷¹ Nach Infektion wurde das Reagenz Isoluminol/HRP hinzugegeben und die Chemolumineszenz wurde in Zeitabständen von 60 Sek über einen Zeitraum von 60 Minuten mit Hilfe des Tristar2 multimode plate reader gemessen.

Amplex Red

Extrazelluläres bzw. phagosomales H_2O_2 kann mit Hilfe des Reagens Amplex Red detektiert werden. Amplex Red ist eine farblose Substanz, welche in Anwesenheit von Peroxidasen mit Wasserstoffperoxid zu rot-fluoreszierendem Resorufin reagiert. Das Erregungs- und Emissionsmaximum liegt zwischen 570 und 585 nm.⁷² Auch bei diesem Assay wurde HRP als Katalysator verwendet. HRP benutzt Amplex Red als Elektronendonator für die Umwandlung von H_2O_2 zu H_2O .⁷³ Nach Infektion wurde das Reagens Amplex Red hinzugegeben und die Fluoreszenz wurde in Zeitabständen von 60 Sek über einen Zeitraum von 90 Minuten mit Hilfe des Tristar2 multimode plate reader gemessen.

Quantifizierung von intrazellulären ROS

Bei einer erforderlichen Stimulation mit GSH, Tempol, Ebselen und Vit E wurden diese eine Stunde vor Infektion inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen 3x gewaschen und somit die Substanzen, welche nicht von den Zellen aufgenommen wurden, gewaschen. Zwischen den Waschschritten erfolgte immer ein Zentrifugationsschritt von 650 g, 5', 4°C. Während des letzten Zentrifugationsschrittes wurde die DCF-Lösung angesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit der DCF-Lösung für 15 min bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Platte zentrifugiert und einmalig gewaschen, um das überschüssige DCF zu entfernen. Im Anschluss erfolgte der Infektionsschritt, welcher identisch zu dem Infektionsschritt der extrazellulären Messung ist. Die Wells ohne Infektion bekamen ein Volumen von 50 µl, die Wells mit Infektion ein Volumen von 50 µl der Bakteriensuspension. Um die Adhärenz der Bakterien an den Zellen zu fördern, wurde ein Zentrifugationsschritt von 850g, 5', 4°C durchgeführt. Die

⁷¹ Geschwender (2013)

⁷² Johnson (2005)

⁷³ Held (2003)

Bakteriensuspension, wie auch das reine HBSS, wurden komplett abgenommen. Im nächsten Schritt wurden die entsprechenden Auffüllmengen an HBSS-Puffer in die Wells gegeben. Als Positivkontrolle wurde PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) mit einer finalen Konzentration von 1 ng/ml hinzugegeben. Im letzten Schritt wurde in jedes Well 100 µl HBSS hinzugefügt und zügig mit der Messung fortgefahren.

DCF (2,7-Dichlorofluoreszin)

Intrazelluläre ROS können mit dem DCF-Assay nachgewiesen werden.

Das membranpermeable nicht-fluoreszierende DCFH-diacetate (DCFH-DA) wird von intrazellulären Esterasen hydrolysiert und geht dann in die aktive Form DCFH über. In diesem Zustand kann es die Membran nicht mehr überqueren und verbleibt in der Zelle. Die Oxidation von 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) führt zur Bildung des grün-fluoreszierenden Produkt Dichlorofluorescein (DCF), welches ebenfalls mit dem Tristar2 multimode plate reader LB 942 (Berthold Technologies) gemessen wurde.⁷⁴

⁷⁴ Paige Davis Volk and Moreland (2014)

4. Ergebnisse

4.1 Escherichia coli als Bakterium für die Analyse der LAP

Listeria monocytogenes (L.m.) war eines der ersten Bakterien mit dem man den Prozess der LAP verfolgte und ist auch bis heute noch ein pathogenes Bakterium, welches für den Nachweis von LAP verwendet wird.⁷⁵ Durch seine Humanpathogenität, seine zahlreichen Virulenzfaktoren und die relativ niedrige Kolokalisationsrate mit LC3 ist L.m. für die Analyse des Ablaufs der LAP allerdings ein suboptimales Bakterium. Mit Hilfe der Virulenzfaktoren ist das Bakterium in der Lage aus dem Phagosom zu entfliehen und auch der Autophagie im Cytosol zu entkommen. Die Rate der LC3-positiven Phagosomen in PM nach einer Infektion mit L.m. liegt 30 min nach Infektionszeitpunkt bei nur etwa 20 %.⁷⁶ E.coli hingegen ist nicht humanpathogen und besitzt kaum Virulenzfaktoren. Um zu überprüfen wie hoch die LC3-Kolokalisationsrate nach einer Infektion von PM mit E.coli liegt, wurden PM aus GFP-LC3 transgenen Mäuse genutzt.

Zuerst wurden PM aus GFP-LC3 transgenen-Mäusen isoliert und mit E.coli (MOI 1) infiziert. Die Inkubationszeit betrug 0, 15, 30, 60 bzw. 120 Minuten. Bei der mikroskopischen Auswertung fiel auf, dass der Maximalwert der LC3-Kolokalisation schon nach 15 Minuten mit 28 % erreicht wurde. Im weiteren Verlauf sank der Wert wieder ab. Bei 30 min lag der Wert bei 24 % und nach 60 Minuten waren nur noch 11,5 % der Phagosomen mit LC3 dekoriert (Abbildung 6B). Nach 15 Minuten waren 85 % der E.coli von den Makrophagen aufgenommen. Die Aufnahme stieg im weiteren Verlauf an, sodass 120 Minuten nach Infektion 98 % der Bakterien von den Makrophagen aufgenommen waren (Abbildung 6C). Die Anzahl der E.coli/Zelle lag nach 15 Minuten bei 1,4 und stieg anschließend bis auf 1,8 nach 120 Minuten an (Abbildung 6D).

Den Ergebnissen nach zu urteilen, scheint E.coli als Bakterium für die Untersuchungen bezüglich der LAP besser geeignet zu sein als L.m. Die schnelle und auch höhere Kolokalisation von LC3 macht die Analyse einfacher und aussagekräftiger. Zusätzlich bringt E.coli die Vorteile mit sich, dass es apathogen ist und keine Möglichkeit besitzt aus dem Phagosom zu entfliehen.

⁷⁵ Lam et al. (2013)

⁷⁶ Gluschko et al. (2018)

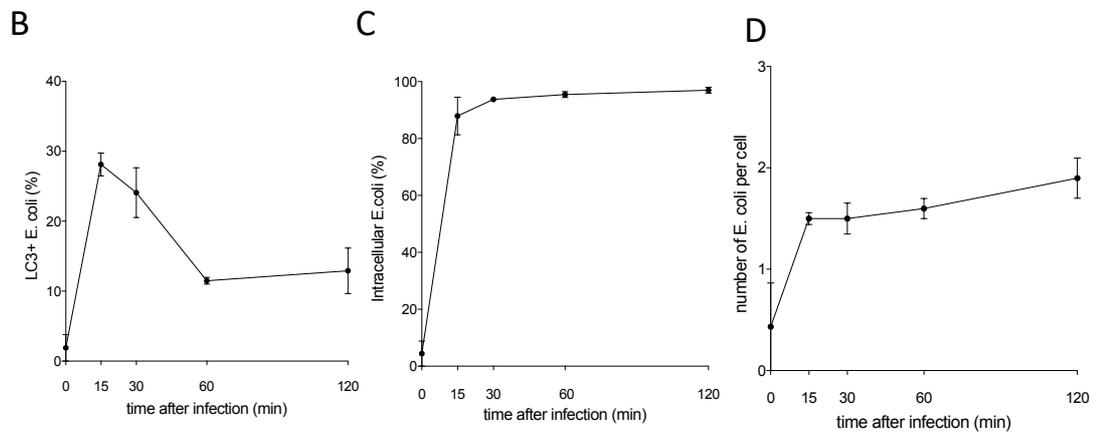
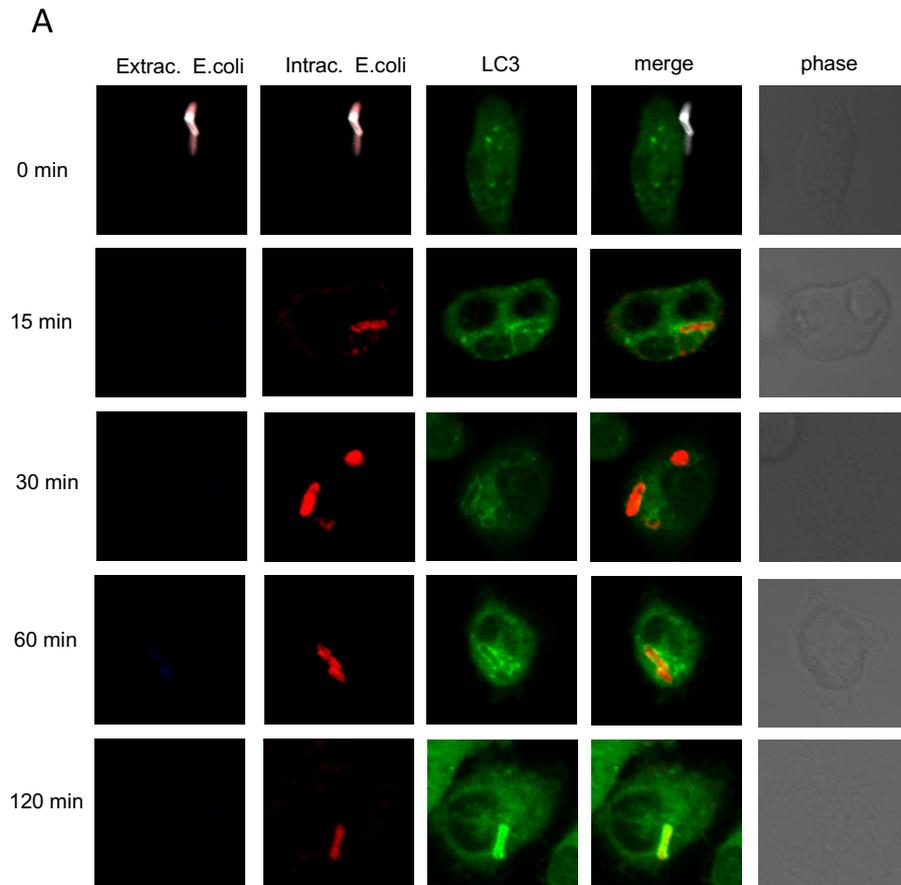


Abbildung 6: Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Kolokalisation von LC3 mit E. coli in PM. Repräsentative mikroskopische Bilder der Kolokalisation von E. coli mit GFP-LC3 in GFP-LC3 transgenen PM (A). Kinetik der Kolokalisation von E. coli mit GFP-LC3 (B) Kinetischer Verlauf der Aufnahme von E.coli durch die Makrophagen (C). Kinetischer Verlauf der Anzahl an E.coli pro Zelle (D)

4.2 Nox2 ist notwendig für die Rekrutierung von LC3 zur Phagosomenmembran

Die Nox 2 generiert ROS während der Reifung des Phagosoms.⁷⁷ Diese durch Nox 2 produzierten ROS sind unerlässlich für die LAP.⁷⁸ Um zu untersuchen, ob Nox2 auch bei E.coli für die Rekrutierung von LC3 zu Phagosomen essentiell ist, wurden GFP-LC3-transgene Nox2^{+/+} und Nox2^{-/-} PM mit E.coli infiziert und mittels IFM ausgewertet. Die LC3-Kolokalisation der GFP-LC3-transgenen Nox2^{+/+} PM stieg innerhalb kurzer Zeit stark an. Nach wenigen Minuten hatte sich LC3 an den Phagosomen angesammelt. Der höchste Wert wurde 15 Minuten nach Beginn der Infektion mit 28 % Kolokalisation erreicht (Abbildung 7C). Danach fiel der Wert kontinuierlich ab, bis er nach 120 Minuten nur noch bei 12 % lag. Die Kinetik der Nox2^{-/-} PM zeigte einen deutlich anderen Verlauf. Im gesamten Verlauf konnte keine Kolokalisation von LC3 mit den Phagosomen festgestellt werden (Abbildung 7C). Dies lässt schlussfolgern, dass in Nox2^{+/+} PM kein LC3 zu den Phagosomen rekrutiert wird. In Bezug auf die Phagozytose der E.coli wurden keine Unterschiede zwischen Wildtyp Nox2^{+/+} und Nox2^{-/-} PM beobachtet (Abbildung 7B/D). Die Schlussfolgerung ist, dass die Phagozytose von E.coli in Nox2^{+/+} und Nox2^{-/-} PM mit der gleichen Effizienz abläuft.

⁷⁷ Lam et al. (2013)

⁷⁸ Heckmann, Boada-Romero, Cunha, Magne, and Green (2017)

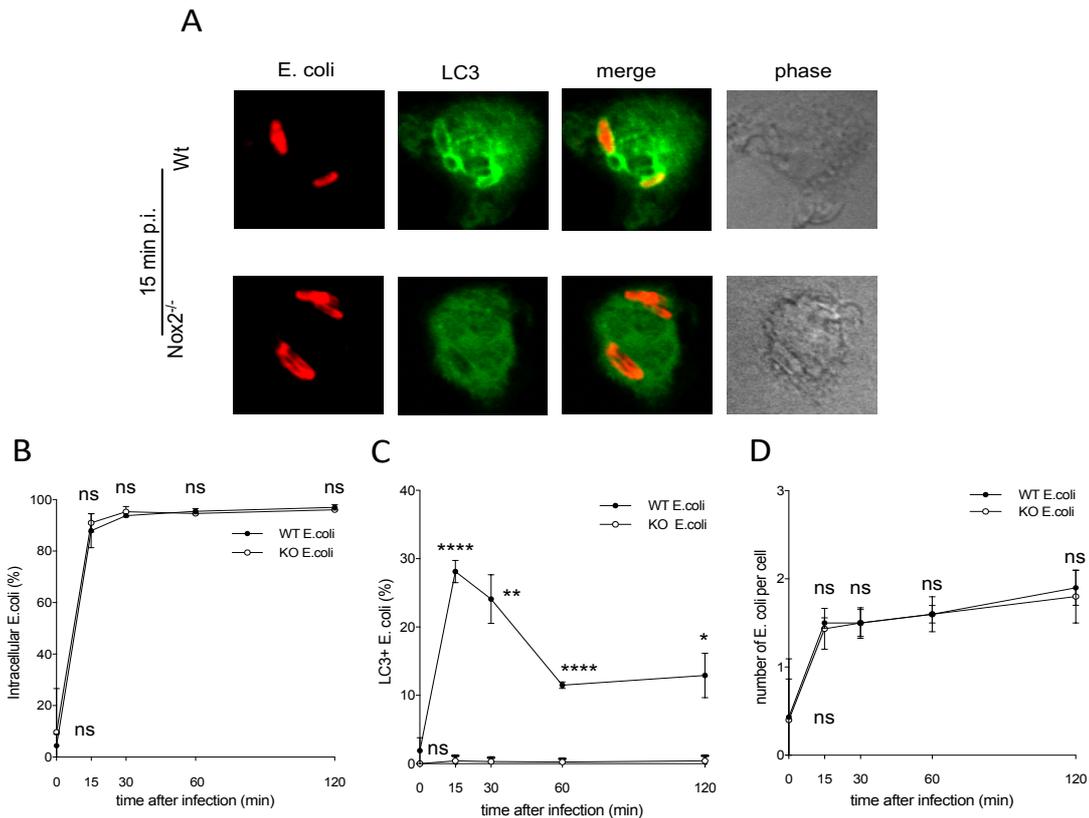


Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Kolokalisation von LC3 an Phagosomen nach E.coli-Infektion in Nox2^{-/-} PM und Nox2^{+/+} PM Repräsentative mikroskopische Bilder der Kolokalisation von E. coli mit GFP-LC3 in Nox2^{+/+} PM und Nox2^{-/-} PM nach 15 Minuten Infektionszeit (A). Kinetischer Verlauf der Aufnahme von E.coli durch die Makrophagen (B). Kinetik der Kolokalisation von phagosomalen E.coli mit GFP-LC3 in GFP-LC3 transgenen Nox2^{-/-} PM im Vergleich zu GFP-LC3 transgenen Nox2^{+/+} PM (C). Kinetischer Verlauf der Anzahl von E.coli/Zelle (D).

Um zu untersuchen, ob der Prozess der LAP bei E.coli ebenfalls ROS-abhängig ist, wurde in den folgenden Versuchen mit Hilfe von Lumineszenz- und Fluoreszenzmessungen die ROS Produktion von PM nach Infektion mit E.coli analysiert. Für die Generierung von ROS ist die Aktivierung der Nox2 unerlässlich. Dafür müssen die cytoplasmatischen Untereinheiten p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} und Rac1/2 zur membrangebundenen Domäne Cytochrom b245, einem Heterodimer aus den zwei Transmembranproteinen gp91^{phox} und p22^{phox}, rekrutiert werden. Nach Zusammenbau der Nox2, ist diese aktiv und pumpt Elektronen in das Innere des Phagosoms, wodurch molekularer Sauerstoff in Superoxidation (O₂⁻) umgewandelt wird.⁷⁹ Um zu untersuchen, ob die Infektion der PM mit E.coli zur Produktion von ROS durch Nox2 führt, wurde extrazelluläres Superoxidation und extrazelluläres Wasserstoffperoxid gemessen. Es wurde eine Chemolumineszenzmessung mittels der luminogenen Substanz Isoluminol in Kombination mit der Horse Radish Peroxidase durchgeführt. Mit Hilfe der Chemolumineszenz kann extrazelluläres bzw. phagosomales O₂⁻ detektiert werden.⁸⁰

⁷⁹ Bedard and Krause (2007)

⁸⁰ Geschwender (2013)

Eine Fluoreszenzmessung wurde mittels des Reagents Amplex Red in Kombination mit der Horse Radish Peroxidase durchgeführt und dient der Detektierung von extrazellulärem bzw. phagosomalem H_2O_2 .⁸¹ In Abbildung 8A sieht man, dass sich der Graph der E.coli infizierten WT-PM nach 10 Minuten langsam von den unbehandelten WT-PM absetzt, nach ungefähr 25 Minuten sein Maximum bei 3000 RLU erreicht und anschließend wieder abfällt. Ein Teil der Zellen wurde mit der pharmakologischen Substanz PMA behandelt, um die ROS-Produktion der Zellen chemisch zu triggern. PMA zeigte den gleichen Effekt, jedoch in einem deutlichen höheren Ausmaß. Das Maximum wurde ebenfalls nach 25 Minuten erreicht, lag jedoch bei $60 \text{ RLU} \times 10^2$. Das stark-positive Signal der $\text{Nox2}^{+/+}$ PM lässt schlussfolgern, dass in $\text{Nox2}^{+/+}$ PM O_2^- produziert wird. In $\text{Nox2}^{-/-}$ PM ließ sich keine messbare Produktion von O_2^- nachweisen. Nach Stimulation kommt es nicht zu einem Anstieg der ROS-Produktion. Die Werte verbleiben gleichbleibend nahe $0 \text{ RLU} \times 10^2$ (Abbildung 8A/8B).

In der Amplex-Red Messung ließen sich ähnliche Ergebnisse feststellen. In Abbildung 8D und 8E lässt sich erkennen, dass in WT-PM nach Infektion bzw. Stimulation mit PMA deutlich mehr H_2O_2 produziert wird als in unbehandelten PM. Der Graph der E.coli bzw. PMA behandelten $\text{Nox2}^{+/+}$ PM steigt nach 10 Minuten deutlich an, wohingegen bei den $\text{Nox2}^{-/-}$ PM ein gleichbleibend niedriges ROS Level und keine Steigerung der ROS Produktion zu verzeichnen ist (Abbildung 8D,8E).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass ausschließlich Nox2 an der Produktion von phagosomalem O_2^- und H_2O_2 nach einer E.coli Infektion beteiligt ist.

⁸¹ Johnson (2005)

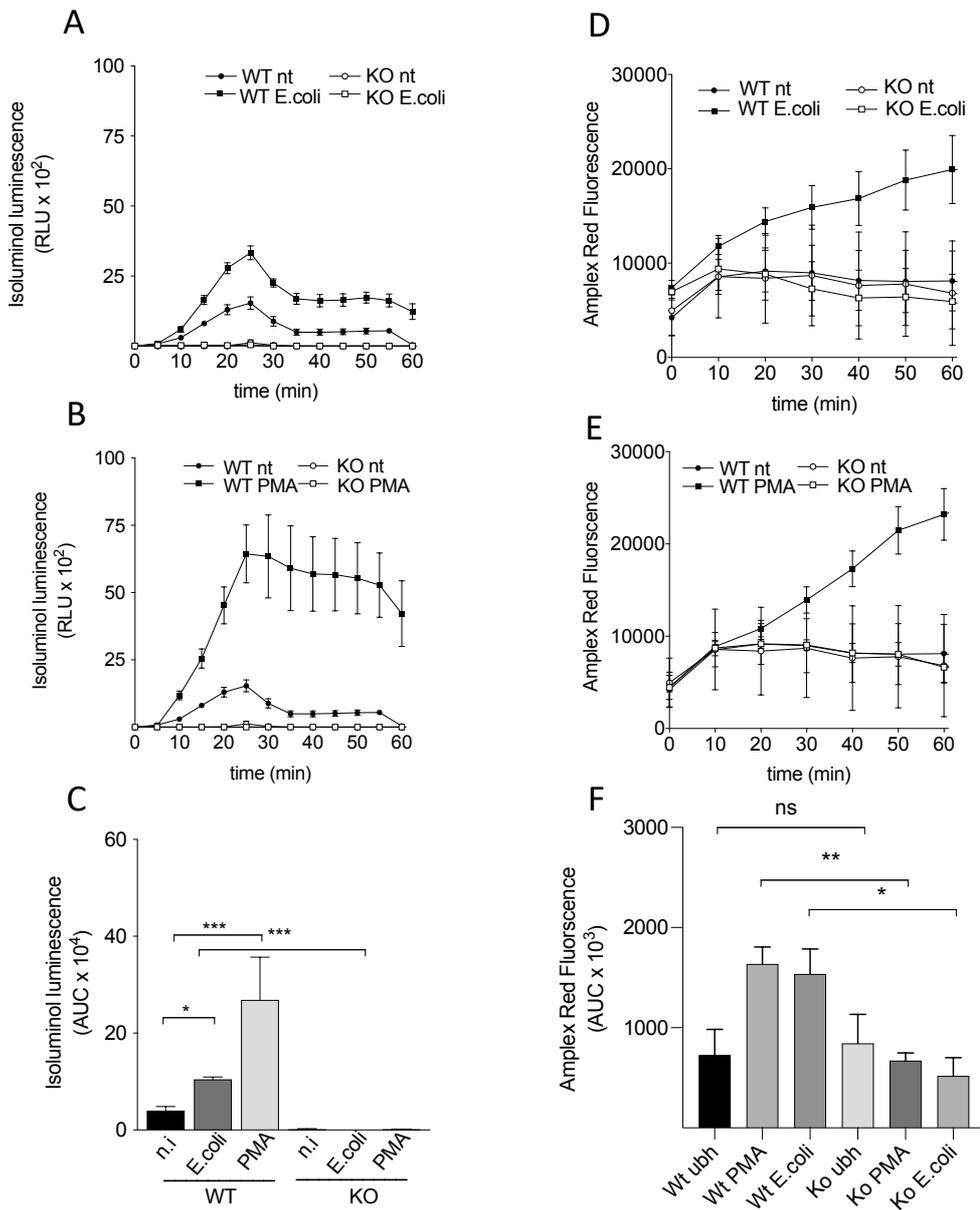


Abbildung 8: **Messung extrazellulärer ROS mittels Isoluminol Chemolumineszenzmessung und AmplexRed Fluoreszenzmessung in Nox2^{+/+} und Nox2^{-/-} PM.** Isoluminol Messung von Nox2^{+/+} und Nox2^{-/-} PM bei Stimulation mit E.coli bei einer MOI=1 im Vergleich zu unbehandelt PMs (A). Isoluminol Messung von Nox2^{+/+} und Nox2^{-/-} PM bei Stimulation mit PMA im Vergleich zu unbehandelten PMs (B). AUC der Isoluminol Messungen (C). Amplex Red Messung von Nox2^{+/+} und Nox2^{-/-} PM bei Stimulation mit E.coli bei einer MOI=1 im Vergleich zu unbehandelt PMs (D). Amplex Red Messung von Nox2^{+/+} und Nox2^{-/-} PM bei Stimulation mit PMA im Vergleich zu unbehandelten PMs (E). AUC der Amplex Red Messungen (F).

4.3 Mac-1 spielt keine Rolle bei der Aktivierung von Nox2 in E.coli infizierten Makrophagen

Da die Aktivierung von Nox2 essentiell für die LAP ist, wurde anschließend der Frage nachgegangen, welche Rezeptoren zur Aktivierung der Nox2 in E.coli infizierten Makrophagen führen. Zuerst wurde der Mac-1-Rezeptor untersucht, bei dem eine entsprechende Funktion nach Infektion mit L.m. (gram⁺ Bakterium) schon nachgewiesen werden konnte. Peritoneale Makrophagen von Mäusen mit einem Knock-out für die CD11b-Untereinheit des Mac-1 Komplexes produzieren signifikant weniger ROS nach Infektion mit L.m. Dahingegen kommt es nach einer Stimulation mit PMA zu einer normalen ROS Produktion. Zusätzlich wurde bereits nachgewiesen, dass nach einer L.m.-Infektion die Rekrutierung von LC3 zu L.m.-enthaltenden Phagosomen bei CD11b^{-/-} PM signifikant reduziert ist.⁸² Die Frage, ob Mac-1 ebenfalls eine Rolle bei der Infektion mit gram-negativen Bakterien, wie z. B. E.coli, spielt, wurde im Folgenden untersucht.

Mac-1 ist ein heterodimerer Komplex, der aus CD11b und CD18 besteht, und in der Lage ist als PRR zu fungieren und PAMPs und DAMPs zu erkennen. Für die volle Funktionstüchtigkeit des Rezeptors sind beide Teile des heterodimeren Komplexes von Nöten.⁸³ Für die Untersuchung wurden Mäuse verwendet, bei denen das Gen für die CD11b Untereinheit ausgeknockt ist und somit über Mac-1 keine extrazellulären Signale in das Innere des Makrophagen weitergeleitet werden können. Um zu untersuchen, ob Mac-1 eine Rolle bei der Aktivierung der Nox2 nach E.coli Infektion spielt, wurde mit CD11b^{+/+} und CD11b^{-/-} PM eine ROS-Messung nach E.coli Infektion bzw. nach Stimulation mit der Substanz PMA durchgeführt. Das Ergebnis zeigte, dass die extrazellulären ROS-Werte bei CD11b^{+/+} und CD11b^{-/-} PM im kinetischen Verlauf nahezu identisch sind (Abb. 8A). Die ROS-Werte der mit E.coli infizierten PM setzten sich nach 5 Minuten von den unbehandelten Proben ab und erreichten nach 40 Minuten ihren Maximalwert mit 20 RLU x 10². Nach Stimulation mit PMA wurde die ROS Produktion in den Makrophagen stark gesteigert und erreichte Maximalwerte von 75 RLU x 10² nach 30 Minuten. Im Anschluss sanken die ROS Mengen wieder und lagen nach weiteren 30 Minuten bei einer RLU von 50 x 10² (Abbildung 9A).

⁸² Gluschko et al. (2018)

⁸³ Ho and Springer (1982)

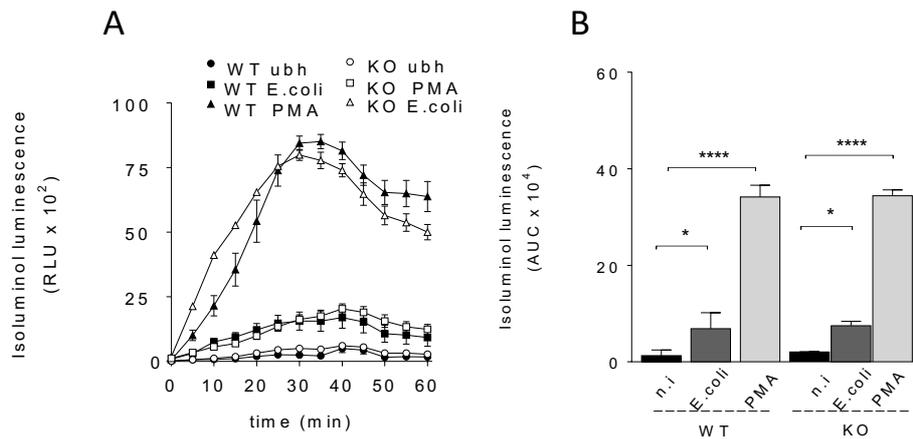


Abbildung 9: Messung von extrazellulären ROS mittels Isoluminol Chemolumineszenzmessung in CD11b^{+/+} und CD11b^{-/-} PMs . Lumineszenzmessung von CD11b^{+/+} und CD11b^{-/-} PM nach Stimulation mit E.coli (MOI=50) oder mit PMA im Vergleich zu unbehandelt PM (A). AUC der Isoluminol Messung (B)

Durch die identischen Messwerte von extrazellulärem ROS bei CD11b^{+/+} und CD11b^{-/-} PM nach Stimulation kann man schließen, dass Mac-1 keine Rolle bei der Aktivierung der Nox2 in E.coli-infizierten Makrophagen spielt.

Da die Produktion von ROS durch Nox2 für die Rekrutierung von LC3 zum Phagosom notwendig ist, wurde im nächsten Versuch die LC3-Kolokalisation von CD11b^{+/+} und CD11b^{-/-} PM untersucht.⁸⁴ Die LC3-Kolokalisation sollte demnach in CD11b^{+/+} und CD11b^{-/-} PM ähnliche Werte annehmen.

Für den Versuch wurden GFP-LC3-transgene CD11b^{+/+} und CD11b^{-/-} PM auf Deckplättchen mit E.coli infiziert und für 15, 30, 60 bzw. 120 Minuten inkubiert. Die Auswertung fand mittels IFM statt. Der kinetische Verlauf der LC3-Kolokalisation war bei beiden Genotypen identisch. Die LC3-Kolokalisation stieg in beiden Genotypen in den ersten 15 Minuten auf 24 % an und fiel anschließend wieder ab. Nach 30 Minuten betrug die Kolokalisation in CD11b^{+/+} PM , wie auch in CD11b^{-/-} PM 12 % und weitere 30 Minuten später war sie in CD11b^{+/+} PM auf 8 % und in CD11b^{-/-} PM auf 10 % abgesunken (Abbildung 10D). Die Aufnahme der E.coli durch die Makrophagen war in den CD11b^{-/-} PM etwas verzögert. Nach 15 Minuten konnte bei den CD11b^{+/+} PM eine Aufnahme von 93 % verzeichnet werden, in den CD11b^{-/-} PM lag die Prozentzahl der aufgenommenen Bakterien bei lediglich 65 % (Abbildung 10B). Die Anzahl von intrazellulären Bakterien in CD11b^{+/+} und CD11b^{-/-} PM wies keine signifikanten Unterschiede auf (Abbildung 10C).

⁸⁴ Lam et al. (2013)

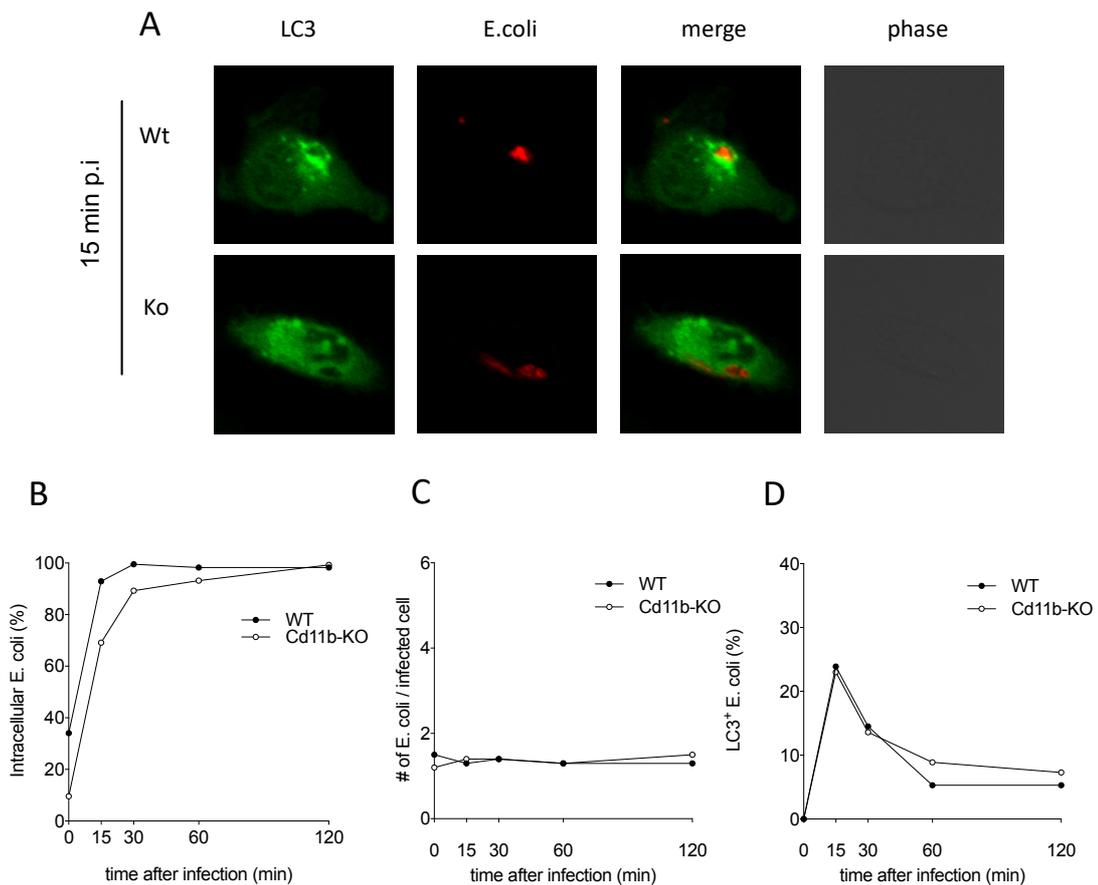


Abbildung 10: Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Kolokalisation von LC3 an Phagosomen nach E.coli-Infektion in CD11b^{-/-} PM und CD11b^{+/+} PM Repräsentative mikroskopische Bilder der Kolokalisation von E. coli mit GFP-LC3 in CD11b^{+/+} PM und CD11b^{-/-} PM nach 15 Minuten Infektionszeit (A). Kinetischer Verlauf der Aufnahme von E.coli durch die Makrophagen (B). Kinetischer Verlauf der Anzahl von E.coli/Zelle (C). Kinetischer Verlauf der Anzahl von E.coli/Zelle Kinetik der Kolokalisation von phagosomalen E.coli mit GFP-LC3 in GFP-LC3 transgenen CD11b^{-/-} PM im Vergleich zu GFP-LC3 transgenen CD11b^{+/+} PM (D).

Mac-1 scheint keine Rolle bei der Erkennung von E.coli und Weiterleitung dieser Information ins Innere der Zelle zu spielen. Weder die Produktion von ROS durch Nox2 noch die LC3-Rekrutierung zum Phagosom sind abhängig von diesem Rezeptor.

4.4 Das Adapterprotein MyD88 nimmt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der LAP in E.coli-infizierten Makrophagen ein

Als nächstes wurde die TLR4-MyD88-Achse untersucht, da der TLR4-Rezeptor spezialisiert auf die Erkennung von gram-negativen Bakterien ist. MyD88 spielt in diesem Signalweg eine wesentliche Rolle als Adaptermolekül. TLR4 ist in der Lage LPS auf der Oberfläche von gram⁻ Bakterien zu erkennen. Er ist als einziger der TLR Rezeptoren in der Lage den MyD88-abhängigen, wie auch den MyD88-unabhängigen Signalweg zu aktivieren. Letztendlich führen beide Signalwege zur Synthese von proinflammatorischen Cytokinen und Typ I Interferonen.⁸⁵ Ob der MyD88-abhängige

⁸⁵ Lu et al. (2008)

TLR auch eine Rolle bei der Aktivierung von Nox2 und somit bei der Rekrutierung von LC3 durch LAP einnimmt, wurde im nächsten Experiment untersucht.

Für dieses Experiment wurden GFP-LC3-transgene MyD88^{+/+} und MyD88^{-/-} PM auf Deckplättchen mit E.coli (MOI 1) infiziert und für 15, 30, 60 bzw. 120 Minuten inkubiert. Die Auswertung fand nach Antikörperfärbung der E.coli mittels IFM statt. Bezeichnend für dieses Experiment war die deutlich niedrigere LC3-Kolokalisation der MyD88^{-/-} PM. Die LC3-Kolokalisation der MyD88^{-/-} PM behielt in der gesamten Kinetik ein niedriges Level. Maximal wurden Werte von 10 % erreicht. In MyD88^{+/+} hingegen konnte ein bekannter Verlauf der LC3-Rekrutierung beobachtet werden. Nach 15 Minuten waren rund 30 % der E.coli enthaltenen Phagosomen mit LC3 umgeben. Im weiteren Verlauf der Kinetik sank der Wert dann wieder ab und lag nach 120 Minuten bei 12 % (Abbildung 11B). Im Hinblick auf die Aufnahme der E.coli in die Makrophagen war zwischen MyD88^{+/+} und MyD88^{-/-} PM kein Unterschied festzustellen (Abbildung 11D). Die Anzahl der E.coli pro Zelle war ebenfalls in beiden Genotypen gleich (Abbildung 11C).

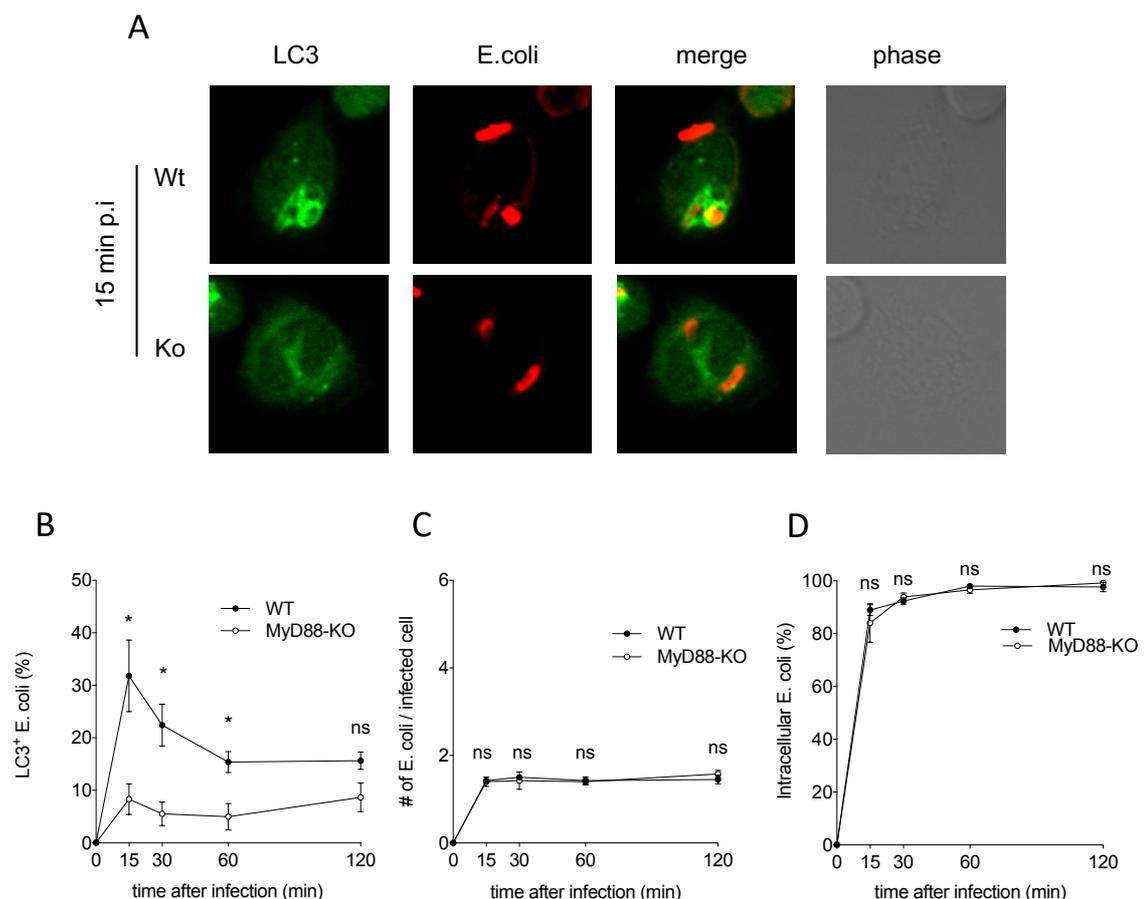


Abbildung 11: Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Kolokalisation von LC3 an Phagosomen nach E.coli-Infektion in MyD88^{-/-} PM und MyD88^{+/+} PM Repräsentative mikroskopische Bilder der Kolokalisation von E. coli mit GFP-LC3 in MyD88^{+/+} PM und MyD88^{-/-} PM nach 15 Minuten Infektionszeit (A). Kinetischer Verlauf der Kolokalisation von phagosomalen E.coli. mit GFP-LC3 in GFP-LC3 transgenen MyD88^{-/-} PM im Vergleich zu GFP-LC3 transgenen MyD88^{+/+} (B). Kinetischer Verlauf der Anzahl an E.coli/Zelle (C). PM Kinetischer Verlauf der Aufnahme von E.coli durch die Makrophagen (D).

In MyD88^{-/-} PM konnte eine deutliche Reduktion der LC3-Kolokalisation festgestellt werden. Jedoch kann die Reduktion nur als Teilreduktion bezeichnet werden, da trotz des Verlustes von MyD88 eine gewisse Rekrutierung von LC3 zustande kommt. Aufgrund der Versuchsergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass MyD88-abhängige TLRs eine wichtige Rolle bei der Induktion der LAP durch E.coli spielen.

4.5 Welche ROS-Spezies sind nötig für die LC3-assozierte Phagozytose?

Mit dem Begriff ROS wird eine Reihe von reaktiven Molekülen und freien Radikalen bezeichnet, die aus molekularem Sauerstoff entstehen.⁸⁶ Dieses Projekt beschränkte sich auf das Radikal Superoxid (O_2^-) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2), da diese in vielen Prozessen innerhalb der Zelle entstehen.⁸⁷ Huang et al. konnte zeigen, dass die LC3-Rekrutierung von durch Nox2 produzierten ROS abhängig ist.⁸⁸ Die ROS Produktion beginnt mit der Synthese von O_2^- im Phagosom, worauf sich eine Kette von Reaktionen anschließt, die zur Bildung von nachgeschalteten ROS-Metaboliten, wie z.B. H_2O_2 führt.⁸⁹ Im folgenden Experiment wurde mit Hilfe von Inhibitoren untersucht, ob das primär produzierte Superoxid oder das in einem späteren Schritt gebildete Wasserstoffperoxid zur Rekrutierung von LC3 führt.

In einem ersten Experiment sollte nachgewiesen werden, dass die Inhibitoren gezielt in der Lage sind O_2^- bzw. H_2O_2 zu eliminieren. Dafür wurden Isoluminol-Messungen, bzw. Amplex Red Messungen durchgeführt. Als Inhibitoren dienten die Superoxiddismutase und die Katalase. Beide Enzyme können die Zellmembran nicht passieren und sind somit gezielt im Phagosom einsetzbar, nachdem sie zusammen mit dem Bakterium in das Phagosom aufgenommen wurden.⁹⁰ Die SOD fungiert in erster Instanz und katalysiert im Phagosom die Umwandlung von zwei Superoxidanionen in je ein Molekül Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Sauerstoff (O_2).⁹¹ Die Katalase hat anschließend die Aufgabe das H_2O_2 in H_2O und O_2 umzuwandeln.⁹² Für dieses Experiment wurden für die Katalase und die Superoxiddismutase unterschiedliche Konzentrationen angesetzt, da vorherige Experimente gezeigt haben, dass die Katalase hohe Konzentrationen benötigt, um ihre Wirkung zu erzielen.

⁸⁶ Held (2015)

⁸⁷ Bedard and Krause (2007)

⁸⁸ Ju Huang et al. (2009)

⁸⁹ Bedard and Krause (2007)

⁹⁰ Chatterjee et al. (2000)

⁹¹ Held (2015)

⁹² Sepasi Tehrani and Moosavi-Movahedi (2018)

Verwendete Konzentrationen von SOD und Katalase

SOD (U/ml)	Katalase (U/ml)
10	5000

4.5.1 SOD fängt extrazelluläres O_2^- weg

Um zu überprüfen, ob und in welchem Maße SOD für das Wegfangen von extrazellulärem O_2^- geeignet ist, wurde SOD zu den Zellen gegeben und anschließend die Synthese von O_2^- mit Hilfe eines Isoluminol Assays analysiert. Nach Infektion bzw. nach Stimulation mit PMA wurde SOD zu den Zellen hinzugegeben und die Produktion von ROS gemessen. Wie in den Abbildungen 12A und 12B zu erkennen ist, wird die Produktion von extrazellulärem O_2^- durch die Behandlung der Zellen mit SOD deutlich reduziert. Mit einer Konzentration von 10 U/ml war es möglich die Messung von ROS fast komplett zu unterbinden, sodass die ROS-Werte der infizierten, wie auch der mit PMA behandelten PM nahe Null lagen. Die unbehandelten PM hatten nach 15 Minuten ihr Maximum erreicht (Abbildung 12 A/B). Die SOD ist somit in der Lage die Produktion von O_2^- im Phagosom signifikant zu unterbinden.

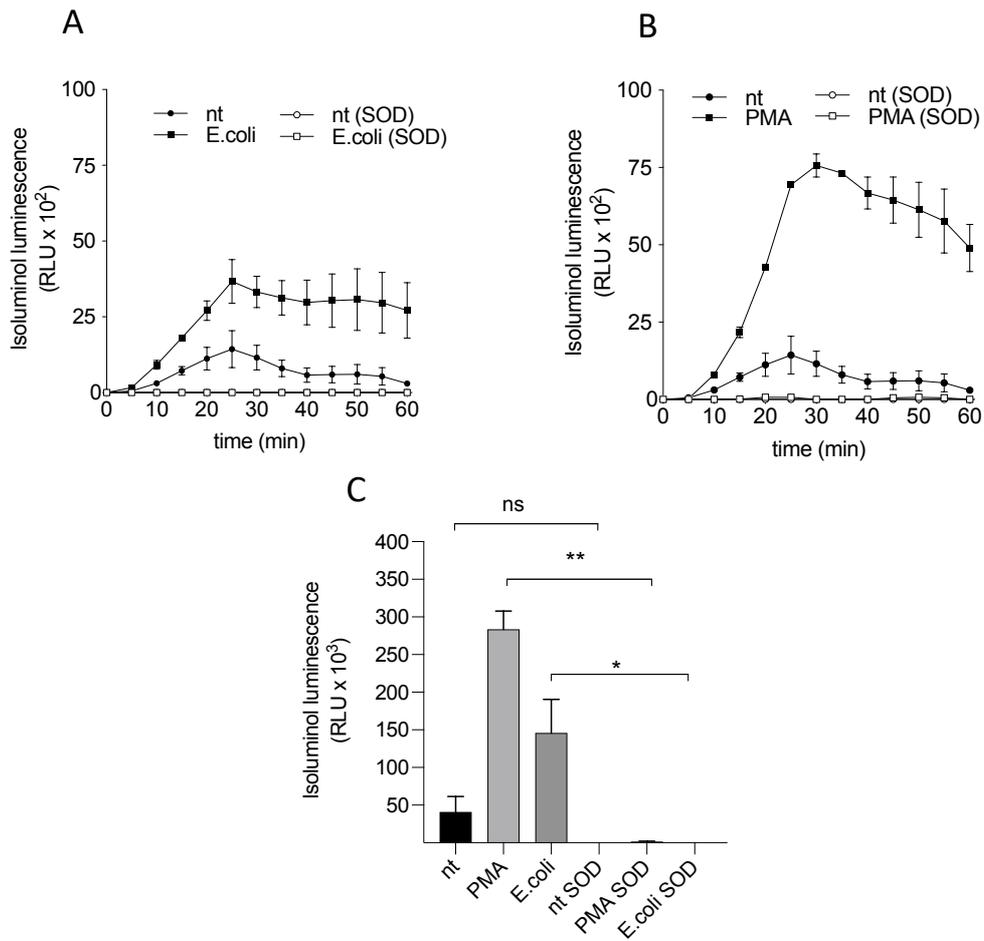


Abbildung 12: Messung extrazellulärer ROS mittels Isoluminol Chemolumineszenzmessung in SOD behandelten PM im Vergleich zu unbehandelten PM. Isoluminol Messung von SOD behandelten und unbehandelten PM bei Stimulation mit E.coli MOI=50 im Vergleich (A). Isoluminol Messung von SOD behandelten und unbehandelten PM bei Stimulation mit PMA im Vergleich (B). AUC der Isoluminol Messungen (C).

4.5.2 SOD erhöht die Synthese von H_2O_2

Um zu bestätigen, dass die SOD spezifisch für das Wegfangen von O_2^- verantwortlich ist, wurde mit WT-PM eine AmplexRed Fluoreszenzmessung durchgeführt. Die Zellen wurden ausplattiert und über Nacht bei $37^\circ C$ inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach E.coli-Infektion und nach Stimulation mit PMA SOD zu den Zellen hinzugegeben und dann die Produktion von ROS gemessen. Nach 25 Minuten konnte man ein deutliches Absetzen der ROS-Produktion von SOD behandelten, E.coli infizierten PM im Vergleich zu den unbehandelten E.coli-infizierten PM beobachten (Abbildung 13A/B). Die SOD scheint die Bildung von H_2O_2 zu erhöhen. Als Erklärungsansatz dient die Reaktion der SOD. Die SOD katalysiert die Umwandlung von Superoxid in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff, damit kommt es zu einer gesteigerten Bildung von H_2O_2 . Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die SOD im Phagosom spezifisch O_2^- wegfängt und in H_2O_2 umwandelt.

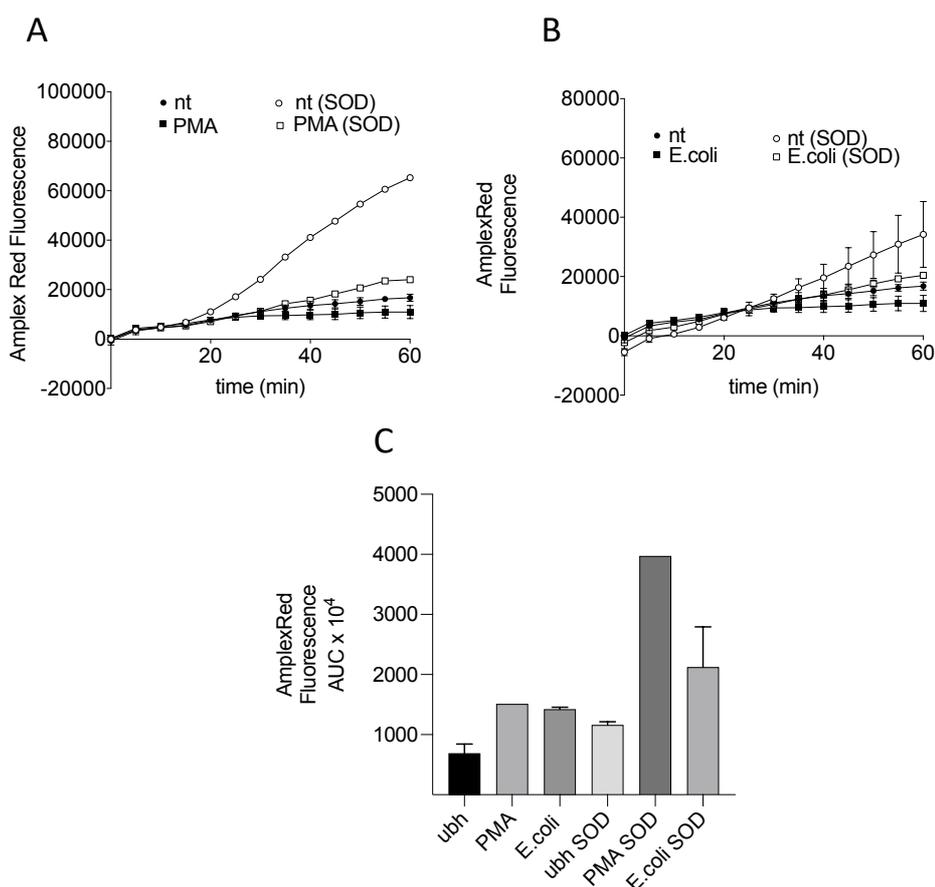


Abbildung 13: **Messung extrazellulärer ROS mittels AmplexRed Fluoreszenzmessung in SOD behandelten PM im Vergleich zu unbehandelten PM.** Amplex Red Messung von SOD behandelten und unbehandelten PM bei Stimulation mit E.coli MOI=50 im Vergleich (A). Amplex Red Messung von SOD behandelten und unbehandelten PM bei Stimulation mit PMA im Vergleich (B). AUC der Amplex Red Messungen (C).

4.5.3 SOD senkt die Anlagerung von LC3 an die Phagosomenmembran

Um herauszufinden, ob O_2^- selbst für die LAP Induktion notwendig ist, oder ein anderes ROS wie H_2O_2 , wurde im nächsten Versuch die LC3-Kolokalisation nach Zugabe von SOD untersucht. Für den Versuch wurden GFP-LC3-transgene Wildtyp PM auf Deckplättchen mit E.coli infiziert, anschließend SOD mit einer Konzentration von 10 U/ml hinzugegeben und für 15 Minuten inkubiert. Die Auswertung fand mittels IFM statt. Es waren deutliche Unterschiede in der LC3-Kolokalisation zu verzeichnen. Die mit SOD behandelten Proben wiesen eine signifikant niedrigere LC3-Kolokalisation auf. Der prozentuale Wert der LC3-Kolokalisation lag bei den unbehandelten Proben bei 24 %, nach Hinzugeben von SOD lag die LC3-Kolokalisation nur noch bei 10 % (Abbildung 14B). Um den Wirkungsort der SOD etwas genauer zu lokalisieren, wurden in einem weiteren Experiment E.coli verwendet, die SOD auf ihrer Oberfläche (über)exprimieren. Die SOD war damit direkt am Wirkungsort von O_2^- am Bakterium im Phagosom. So konnte spezifisch geschaut werden, ob niedrigere O_2^- Konzentration im Phagosom eine Wirkung auf die LC3-Kolokalisation haben. Und auch bei diesem Experiment gab es ähnlich signifikante Unterschiede zwischen den unbehandelten E.coli Proben und den Proben mit den SOD-gekoppelten E.coli. Die Synthese von O_2^- ist also ein unerlässlicher Faktor in der Rekrutierung von LC3 zum Phagosom.

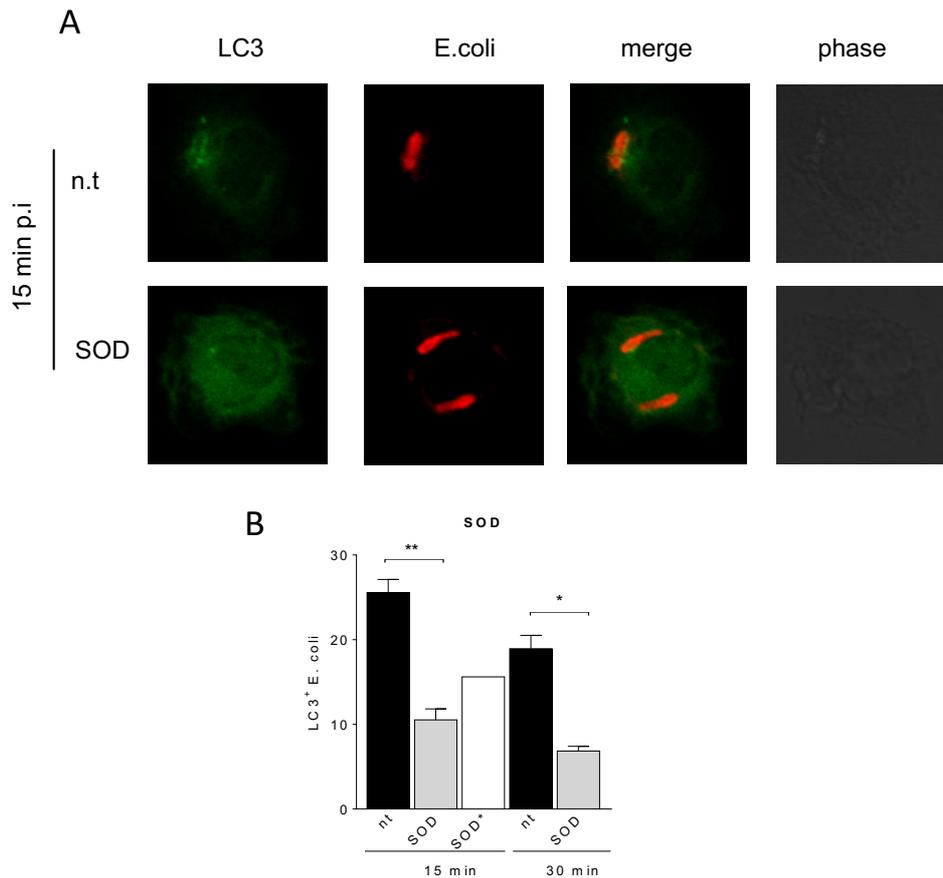


Abbildung 14: **Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Kolokalisation von LC3 an Phagosomen nach E.coli-Infektion in SOD behandelten und unbehandelten PM** Repräsentative mikroskopische Bilder der Kolokalisation von E. coli mit GFP-LC3 in unbehandelten und SOD behandelten PM nach 15 Minuten Infektionszeit (A). Graphische Auswertung der LC3 Kolokalisation (B).

4.5.4 Mäßige Inhibition der Produktion von H₂O₂ durch die Katalase

Im Folgenden wurde geprüft, ob und in welchem Maße die Katalase eine Inhibition von H₂O₂ induziert. Zu den PM wurde nach Infektion bzw. Stimulation mit PMA Katalase in einer Konzentration von 5000 U/ml hinzugegeben. In Abbildung 15B erkennt man eine deutliche Zunahme der ROS durch die Stimulation mit PMA. Bei den PM, die mit Katalase behandelt wurden und die anschließend eine Stimulation mit PMA erfahren haben, ist das ROS-Level im Vergleich zu den unbehandelten Proben um 50 % gesenkt. Bei den infizierten PM war eine Senkung von 25 % zu beobachten (Abbildung 15A). Die Katalase hat dazu geführt, dass mit steigender Konzentration eine signifikante Inhibition des Fluoreszenzsignals zustande kam. Es gab jedoch nur einen geringen Effekt auf das H₂O₂ welches im Inneren des Phagosoms gebildet wurde. Eine Ursache für diesen Effekt könnte sein, dass die Katalase nicht in großen Mengen im Inneren des Phagosoms lokalisiert war. Das H₂O₂ welches durch die Nox2 produziert wurde, wurde nur in einem geringen Maße eliminiert. Da die Katalase aber trotzdem eine ROS-Senkung bewirkt, wurde sie als H₂O₂-Fänger für das folgende Mikroskopie-Experiment genutzt.

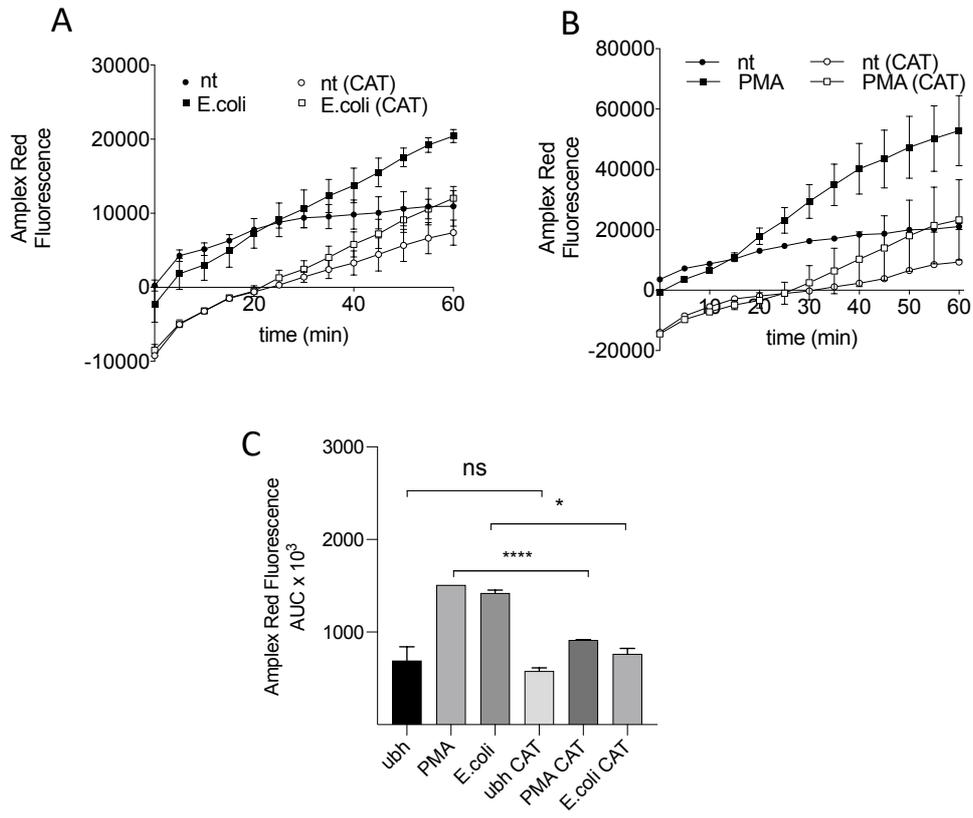


Abbildung 15: **Messung extrazellulärer ROS mittels AmplexRed Fluoreszenzmessung in CAT behandelten PMs im Vergleich zu unbehandelten PMs.** Amplex Red Messung von CAT behandelten und unbehandelten PMs bei Stimulation mit E.coli MOI=50 im Vergleich (A). Amplex Red Messung von CAT behandelten und unbehandelten PMs bei Stimulation mit PMA im Vergleich (B). AUC der Amplex Red Messungen (C).

4.5.5 H₂O₂ hat keinen Einfluss auf die Rekrutierung von LC3 zum Phagosom

Im Mikroskopie-Experiment wurden GFP-LC3-transgene WT-PM auf Deckplättchen mit E.coli infiziert, anschließend Katalase mit einer Konzentration von 5000 U/ml hinzugegeben und für 15 Minuten inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend mit einem Antikörper gefärbt und die Proben mittels IFM ausgewertet. Die unbehandelten PM wiesen nach 15 Minuten eine LC3-Kolokalisation von 25 % auf. Durch die Behandlung mit der CAT konnte kaum eine Senkung erzielt werden (Abbildung 16B).

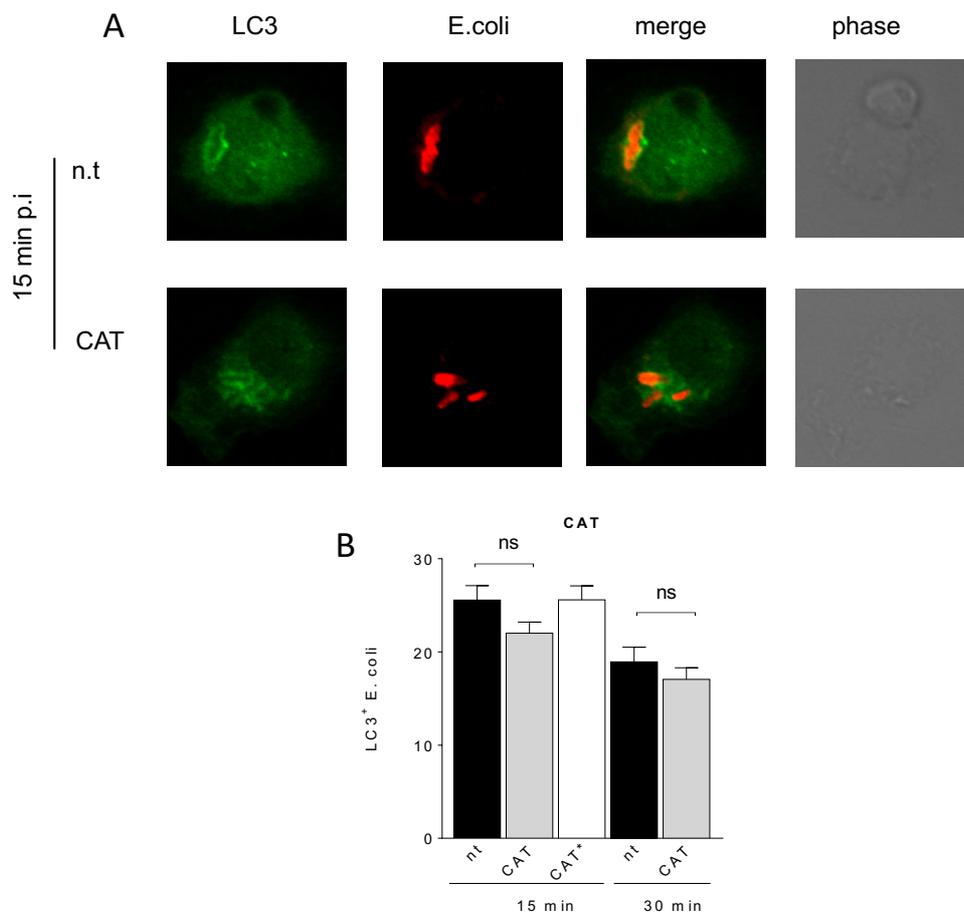


Abbildung 16: Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Kolokalisation von LC3 an Phagosomen nach E.coli-Infektion in CAT behandelten und unbehandelten PM Repräsentative mikroskopische Bilder der Kolokalisation von E. coli mit GFP-LC3 in unbehandelten und mit CAT behandelten PM nach 15 Minuten Infektionszeit (A). Graphische Auswertung der LC3 Kolokalisation (B).

4.6 An welchem Ort müssen die ROS wirken?

Um zu differenzieren, ob die produzierten Sauerstoffspezies im Cytosol oder im Phagosomen wirken müssen, wurden in der folgenden Versuchsreihe verschiedene Substanzen verwendet, die gezielt in bestimmten Kompartimenten ROS wegfangen. Für die Versuchsreihe wurde ein Derivat von GSH, das GSH ethyl ester verwendet. GSH ethyl ester ist ein membrandurchlässiges Derivat von GSH, das im Zellinneren eine Hydrolyse durch intrazelluläre Esterasen erfährt. Erst durch die Hydrolyse wird das GSH aktiv und entfaltet seine Wirkung im Zellinneren.⁹³ Dadurch kann sichergestellt werden, dass das GSH erst im Zellinneren aktiv wird und gezielt im Cytosol H_2O_2 und O_2^- wegfängt.

Um die rein intrazelluläre Wirkung von GSH unter unseren experimentellen Bedingungen zu verifizieren, wurden zuerst ROS-Messungen mittels Isoluminol durchgeführt. Die GFP-LC3-transgenen Wildtyp PM wurden vor der Infektion mit E.coli für eine Stunde mit GSH bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden dann nach der Infektion die extrazellulär produzierten ROS mit Hilfe des Isoluminol Assays gemessen. Mit dieser Messung konnte nachgewiesen werden, dass GSH im Extrazellularraum keine Wirkung entfaltet. Man sieht deutlich, dass die ROS-Werte der unbehandelten und der E.coli infizierten PM sehr ähnlich sind (Abbildung 17A). Die niedrigen Werte der ROS Messung lassen sich damit erklären, dass die Zellen nach der Inkubationszeit von einer Stunde dreimal gewaschen wurden. Durch die häufigen Waschschrte sind vermutlich einige Zellen verloren gegangen. Um die Wirkung von GSH ethyl ester im Inneren der Makrophagen zu bestätigen, wurde eine zweite ROS-Messung mit DCF durchgeführt. Das membranpermeable nicht-fluoreszierende DCFH-DA muss vor Messung und Infektion für 15 Minuten einwirken. Es passiert dann die Zellmembran, wird von intrazellulären Esterasen hydrolysiert und geht in die aktive Form DCFH über. In diesem Zustand kann es die Membran nicht mehr überqueren und verbleibt in der Zelle.⁹⁴ Durch Die Oxidation von DCFH kommt es zu Bildung von dem grün fluoreszierenden Produkt (DCF), welches von einem plate reader gemessen wurde. Das Ergebnis der DCF-Messung zeigte eine partielle ROS Senkung im Cytosol auf (Abbildung 17C). Das GSH ethyl ester entfaltet also seine Wirkung im Zellinneren, jedoch in einem relativ geringen Maße.

⁹³ Wellner, Anderson, Puri, Jensen, and Meister (1984)

⁹⁴ Paige Davis Volk and Moreland (2014)

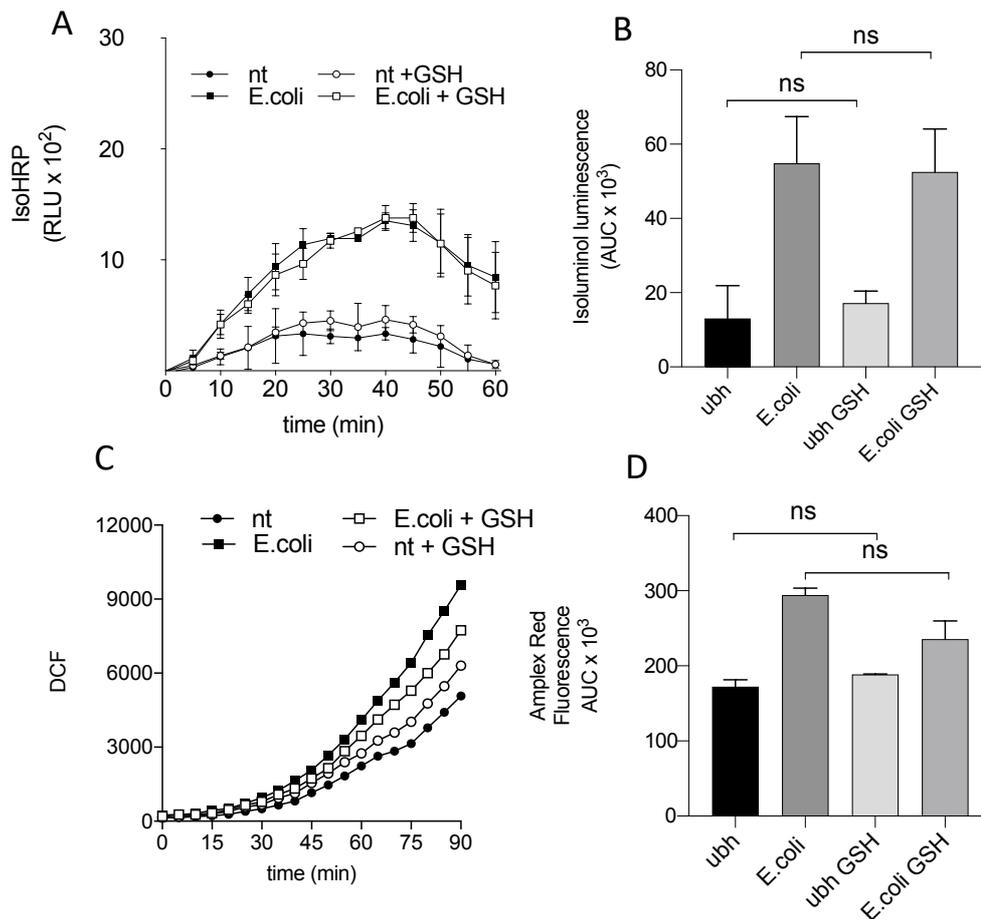


Abbildung 17: Messung extrazellulärer und intrazellulärer ROS mittels AmplexRed Fluoreszenzmessung und DCF Fluoreszenzmessung in GSH behandelten PM im Vergleich zu unbehandelten PM. Isoluminol Messung von GSH behandelten und unbehandelten PMs bei Stimulation mit E.coli MOI=50 im Vergleich (A). AUC der Isoluminol Messung (B). DCF Messung von GSH behandelten und unbehandelten PMs bei Stimulation mit E.coli MOI=50 im Vergleich (C). AUC der DCF Messungen (C).

Anschließend wurde untersucht, ob GSH ,durch das Wegfangen von cytosolischem O_2^- und H_2O_2 , in der Lage ist die LC3-Kolokalisation zu senken. Für das Mikroskopieexperiment wurden GFP-LC3-transgene Wildtyp PM für eine Stunde mit GSH bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Deckplättchen wie gewohnt mit E.coli (MOI 1) infiziert und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das Wegfangen von cytosolischem ROS führte zu einer Senkung der LC3-Kolokalisation. Wie in Abbildung 18B zu erkennen ist, liegt die LC3-Kolokalisation der unbehandelten Proben bei 28 %. Die Behandlung von GSH hat zu einer Reduzierung auf 15 % geführt. Die Versuchsergebnisse zeigen, dass intrazelluläre ROS eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von LC3 zu den Phagosomen einnehmen. Für die genauere Eingrenzung von Sauerstoffradikalen, die im Cytosol wirken, wurden weitere nichtenzymatische Antioxidantien zu Hilfe genommen.

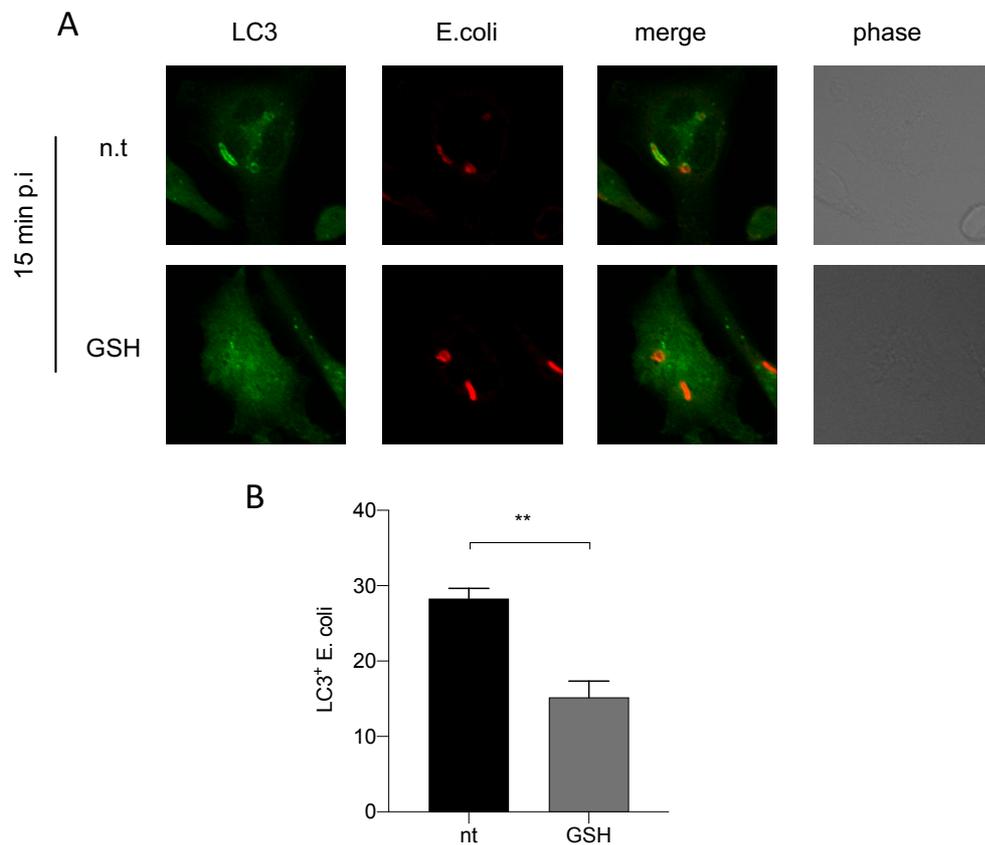


Abbildung 18: Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Kolokalisation von LC3 an Phagosomen nach E.coli-Infektion in GSH behandelten und unbehandelten PM Repräsentative mikroskopische Bilder der Kolokalisation von E. coli mit GFP-LC3 in unbehandelten und GSH behandelten PM nach 15 Minuten Infektionszeit (A). Graphische Auswertung der LC3 Kolokalisation (B).

Für den weiteren Versuchsverlauf wurden die Chemikalien Ebselen und Tempol hinzugezogen. Ebselen ist ein lipidlösliches Molekül, und kann somit die Zellmembran durchqueren. Es katalysiert die Reduktion von H_2O_2 .⁹⁵ Tempol ist eine Chemikalie, die das Enzym Superoxiddismutase nachahmt, indem es O_2^- in H_2O_2 umwandelt. Aufgrund seines niedrigen Molekulargewichtes kann Tempol ebenfalls sehr gut biologische Membranen durchqueren.⁹⁶ Mit den beiden Chemikalien wurden ROS-Messungen durchgeführt. Nach Inkubation mit den Substanzen wurde eine Infektion der Makrophagen durchgeführt und anschließend eine ROS-Messung im plate reader. Im Isoluminol Assay konnte eine deutliche Senkung der ROS-Werte nach Behandlung der Zellen mit Ebselen verzeichnet werden. Die Behandlung mit Tempol hingegen führte zu keiner Senkung der extrazellulären ROS Produktion. Im DCF Assay ließen sich ähnliche Ergebnisse beobachten. Ebselen war auch bei der intrazellulären Messung in der Lage die ROS zu senken, wohingegen Tempol das Level nicht zu senken schien (Abbildung 19). Die Mikroskopieergebnisse hingegen wiesen bei beiden Substanzen

⁹⁵ Sies (1993)

⁹⁶ Bernardy et al. (2017)

eine Senkung der LC3-Kolokalisation auf (Abbildung 20B). Durch diese Ergebnisse war es leider nicht möglich genau abzugrenzen, welche cytosolischen ROS-Spezies für die Rekrutierung verantwortlich sind.

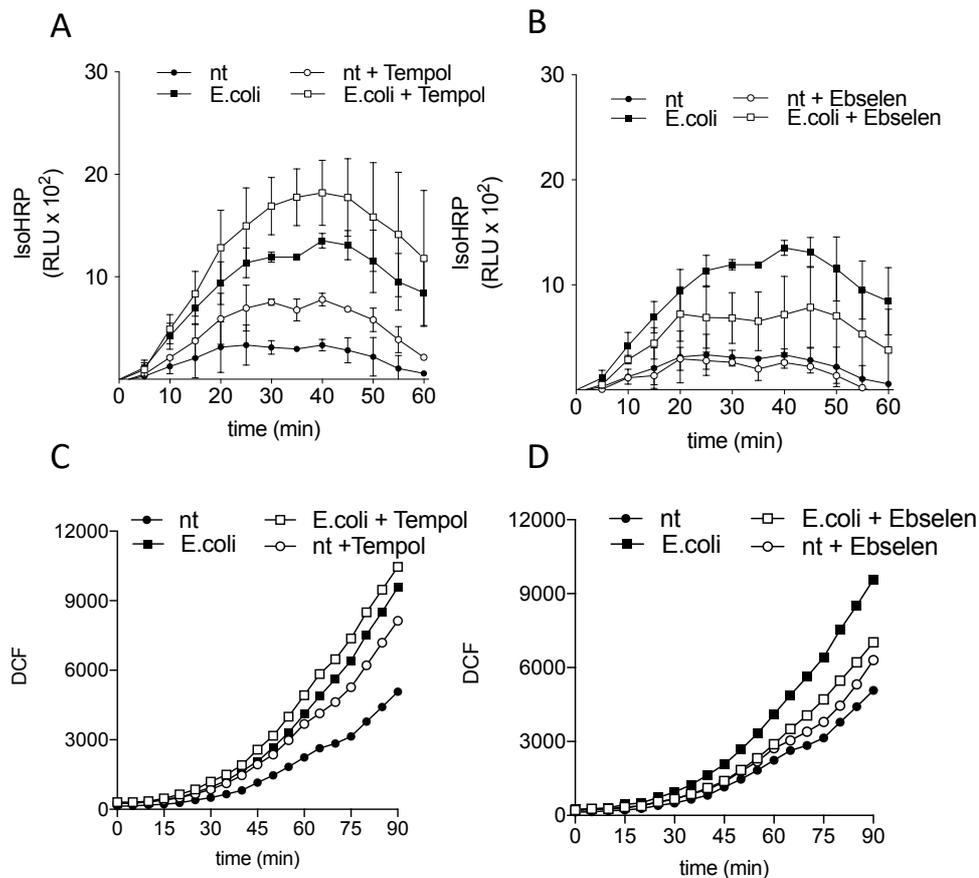


Abbildung 19: Messung extrazellulärer und intrazellulärer ROS mittels Isoluminol Chemolumineszenzmessung und DCF Fluoreszenzmessung in Tempol und Ebselen behandelten PMs im Vergleich zu unbehandelten PM. Isoluminol Messung von Tempol behandelten und unbehandelten PMs bei Stimulation mit E.coli MOI=50 im Vergleich (A). Isoluminol Messung von Ebselen behandelten und unbehandelten PMs bei Stimulation mit E.coli MOI=50 im Vergleich (B). DCF Messung von Tempol behandelten und unbehandelten PMs bei Stimulation mit E.coli MOI=50 im Vergleich (C). DCF Messung von Ebselen behandelten und unbehandelten PMs bei Stimulation mit E.coli MOI=50 im Vergleich (D).

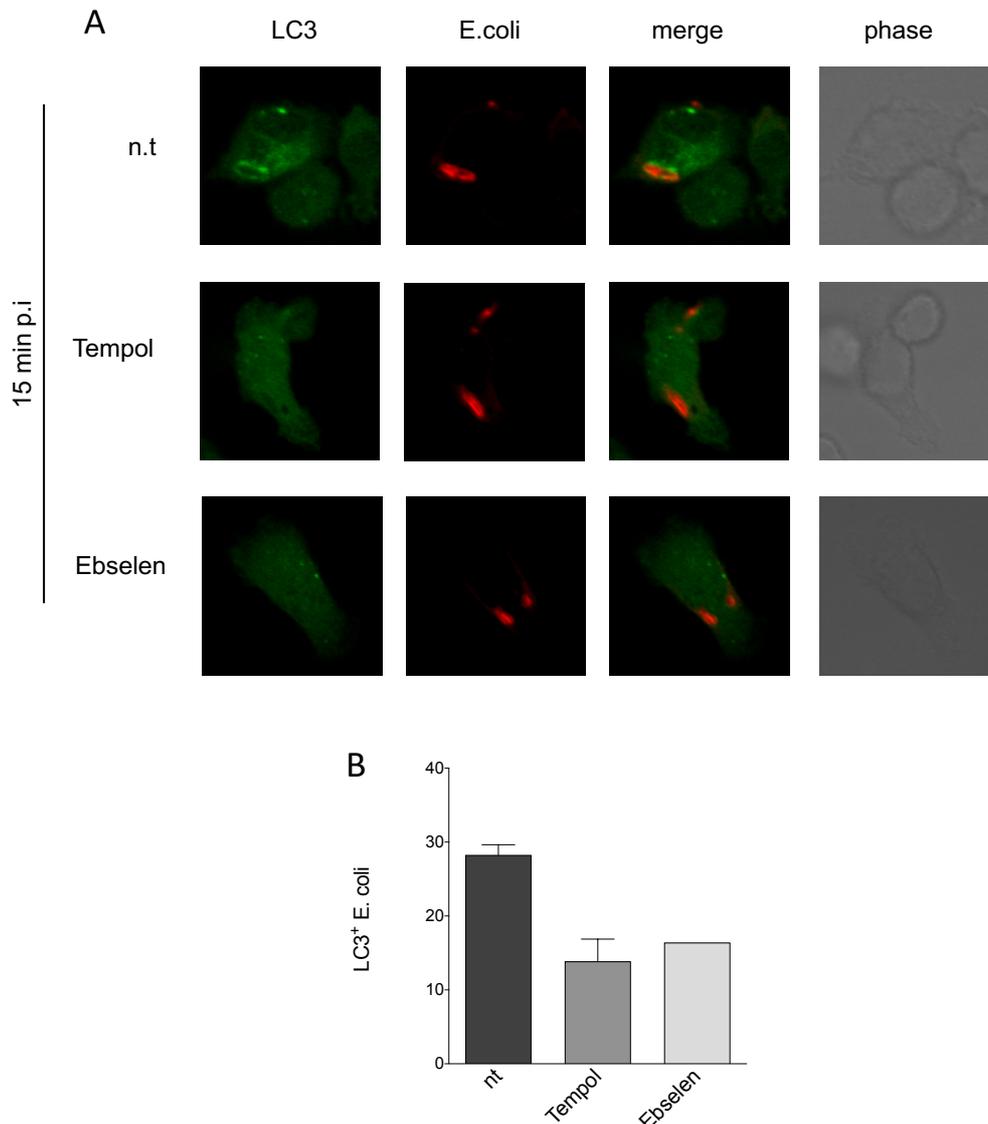


Abbildung 20: Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Kolokalisation von LC3 an Phagosomen nach E.coli-Infektion in Tempol bzw. Ebselen behandelten und unbehandelten PM Repräsentative mikroskopische Bilder der Kolokalisation von E. coli mit GFP-LC3 in unbehandelten und mit Tempol bzw. Ebselen behandelten PM nach 15 Minuten Infektionszeit (A). Graphische Auswertung der LC3 Kolokalisation (B).

4.7 Entstehen durch die Bildung von Sauerstoffradikalen Lipidperoxide in der Phagosomenmembran und stehen diese im Zusammenhang mit der LC3-Rekrutierung?

Schon wenige Minuten nach Aufnahme des Bakteriums kommt es in den Phagosomen zur Bildung von ROS. ROS sind in der Lage mit Membranbestandteilen zu reagieren und diese zu oxidieren. Bevorzugt trifft die Oxidation Membranlipide wie Cholesterin und vorwiegend mehrfach ungesättigte Lipide. Dieser Prozess wird als Lipidperoxidation bezeichnet. Die Lipidperoxidation ist eine Kettenreaktion, welche schnell voranschreitet, da Sauerstoff ein apolares Molekül ist, welches gerne in Membranen akkumuliert. Oxidierte Lipide haben Peroxid- oder Aldehydgruppen in ihren Lipidschwänzen, sind deutliche polarer und auch kürzer. Daraus resultiert, dass

die Lipidperoxidation als destruktiver Prozess angesehen wird, welcher zu undichten Membranen führt. Bekannt ist die Lipidperoxidation in erster Linie für die Einleitung des Zelltodes nach Bildung von Lecks in der Membran. Neben diesem Effekt kann die undichte Membran jedoch auch zu nützlichen Effekten führen. Bei der Rekrutierung von Antigenen über den MHC Klasse I pathway spielt die undichte Endosomenmembran eine entscheidende Rolle. Durch die Destabilisierung der Endosomenmembran kommt es zur Freisetzung von Antigenen ins Cytosol und das Antigen kann zur Plasmamembran transportiert werden.⁹⁷ In diesem Projekt kam die Frage auf, ob es durch die Destabilisierung der Membran zu einer Rekrutierung von LC3 kommt.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden GFP-LC3-transgene Wildtyp Nox2^{+/+} und Nox2^{-/-} PM mit E.coli MOI 1 auf Deckplättchen infiziert und mit Hilfe der IFM ausgewertet. Für den Versuch wurde ein spezielles Kit verwendet, mit dessen Hilfe es möglich ist Lipidperoxide mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie zu detektieren. Das Kit beinhaltet die Substanz Linoleamide Alkyne (LAA), mit der die Zellen für den Infektionszeitraum inkubiert wird. LAA kann die Zellmembran überqueren und wird bei der Entstehung von intrazellulären Lipidperoxiden oxidiert, wodurch 9- und 13-hydroperoxy-octadecadienoic acid (HPODE) entsteht. Dieses Hydroperoxid zerfällt in reaktive Aldehyde, welche Proteine an nukleophilen Seitenketten modifizieren. Die modifizierten Proteine können dann von einem Farbstoff erkannt und sichtbar gemacht werden.⁹⁸

Die Auswertung zeigte, dass in den Nox2^{+/+} PM deutlich mehr Bakterien von einer mit Lipidperoxiden besetzten Membran umgeben waren als in Nox2^{-/-} PM. In Abbildung 21 sieht man einen deutlichen weißen Lipidperoxid-Ring um das Bakterium, der nach einer Infektionszeit von ungefähr 7 Minuten auftritt. Lipidperoxide ließen sich auch nach 15 Minuten noch nachweisen, verschwanden aber im Laufe der weiteren Infektionszeit, so dass nach 30 Minuten keine Lipidperoxide mehr sichtbar waren. In den Nox2^{-/-} PM Proben waren hingegen fast keine Lipidperoxide nachweisbar (Abbildung 21). Um die Lipidperoxide mit der LC3-Kolokalisation in Verbindung zu bringen, wurde im nächsten Schritt ein Blick auf die LC3-Kolokalisation geworfen. Normalerweise ist ein deutlich grüner Ring um das Bakterium zu erkennen, der eine LC3 Anreicherung anzeigt. Durch die Inkubation mit der Substanz LAA scheint es allerdings zu einer Eliminierung und Ausspülung des GFP-LC3 zu kommen, sodass keine LC3-Kolokalisation mehr nachgewiesen werden konnte (Abbildung 21). Aufgrund dieser Tatsache wurde der Versuch unter angepassten Bedingungen durchgeführt. Im Anschluss an die Infektion

⁹⁷ Wilkie-Grantham et al. (2015)

⁹⁸ technologies (2012)

und Färbung der Lipidperoxide wurden das LC3 mit einem Antikörper sichtbar gemacht. Auch dort war keine eindeutige Differenzierung von LC3-positiven zu LC3-negativen Phagosomen möglich, da der LC3-Antikörper auch an die Wand der E.coli gebunden hat. Somit war jedes Phagosom als LC3-positiv anzusehen. Da die LAP nicht nur bei E.coli Infektion, sondern auch bei Infektion mit L.m. stattfindet, wurde das Experiment noch einmal entsprechend angepasst. In diesem Versuch wurden erneut nicht grün-fluoreszierende Wildtyp Nox2^{+/+} und Nox2^{-/-} PM verwendet. Im Anschluss an die Infektion mit L.m. und Färbung der Lipidperoxide wurde das LC3 mit einem Antikörper sichtbar gemacht. In den L.m. Proben konnten keine Lipidperoxide nachgewiesen werden. Es wurden weder in den WT-PM, noch in den KO-PM weiße Ringe um die Bakterien beobachtet. Da die LC3 assoziierte Phagozytose ein gemeinsamer Nenner der E.coli und L.m. Infektion ist, Lipidperoxide jedoch nur bei E.coli auftreten, kann das Vorkommen von Lipidperoxiden nicht der Grund für die LC3-Rekrutierung sein.

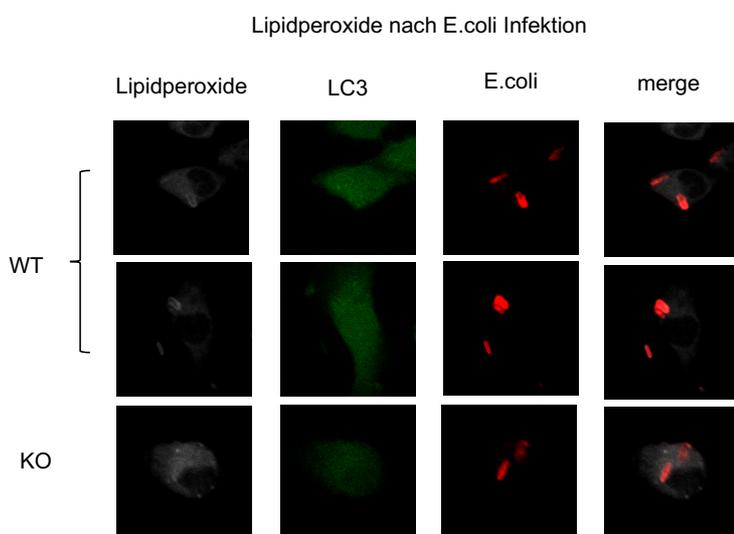


Abbildung 21: **Repräsentative Fluoreszenzmikroskopische Bilder der Bildung von Lipidperoxiden in der phagosomalen Membran nach E.coli Infektion**

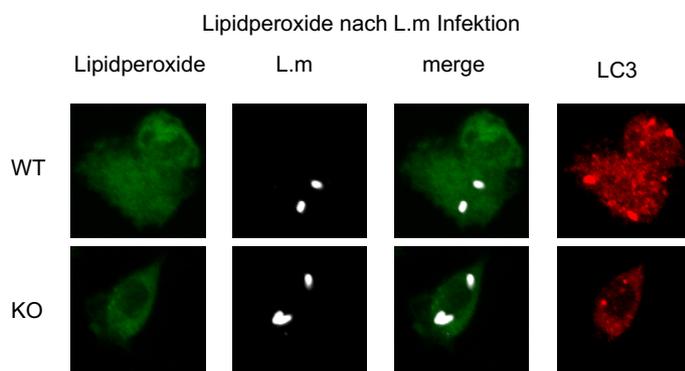


Abbildung 22: **Repräsentative Fluoreszenzmikroskopische Bilder der Bildung von Lipidperoxiden in der phagosomalen Membran nach L.m. Infektion**

Um auf einem anderen Weg zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen Lipidperoxiden und der LC3-Kolokalisation gibt, wurde in einem weiteren Experiment gezielt versucht, eine Verringerung der Lipidperoxide durch die Substanz Vit E zu erreichen. Vit E ist ein fettlösliches Antioxidans und lagert sich aus diesem Grund gerne zwischen Lipiden in den Membranen an. Durch diese Eigenschaft nimmt die Substanz eine bedeutende Rolle in der Entgiftung von Lipidperoxiden ein.⁹⁹ Im folgenden Versuch wurden GFP-transgene Wildtyp PM auf Deckplättchen vor Infektion eine Stunde mit Vit E behandelt. Die Infektion wurde wie gewohnt mit E.coli MOI 1 durchgeführt und nach 15 Minuten Infektionszeit beendet. Im Anschluss wurde die LC3 Kolokalisation mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die LC3-Kolokalisation der unbehandelten PM lag bei 30 %, wohingegen die mit Vit E behandelten Proben nur einen Wert von 10 % erreicht hatten (Abbildung 24). Es wurden zusätzlich noch ROS-Messungen durchgeführt, um auszuschließen, dass Vit E neben der Senkung der Lipidperoxide auch zu einer Senkung von anderen ROS führt. Für die ROS-Messung wurden erneut GFP-transgene Wildtyp PM mit Vit E für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die ROS-Messungen wurden extrazellulär mit Isoluminol und intrazellulär mit DCF durchgeführt. Auch in den ROS-Messungen war eine Senkung zu beobachten (Abbildung 23 A/B). Vit E ist also in der Lage ROS im Phagosom, wie auch im Cytosol wegzufangen. Weder die Detektion der Lipidperoxide mit Hilfe des Kits, noch die gezielte Eliminierung von Lipidperoxiden mittels Vit E führte zu einem Nachweis von Lipidperoxiden in der Membran bzw. ihrer Rolle bei der LAP.

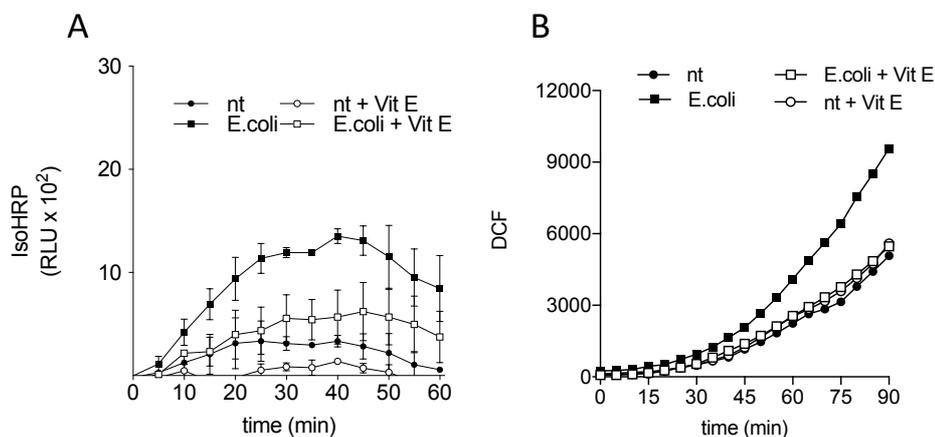


Abbildung 23: Messung extrazellulärer und intrazellulärer ROS mittels Isoluminol Chemolumineszenzmessung und DCF Fluoreszenzmessung in Vit E behandelten PMs im Vergleich zu unbehandelten PMs. Isoluminol Messung von Vit E behandelten und unbehandelten PMs bei Stimulation mit E.coli MOI=50 im Vergleich (A). DCF Messung von Vit E behandelten und unbehandelten PMs bei Stimulation mit E.coli MOI=50 im Vergleich (B).

⁹⁹ Engin (2009)

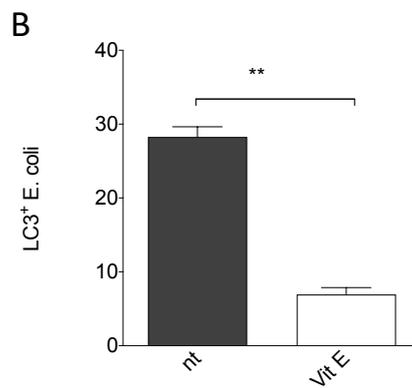
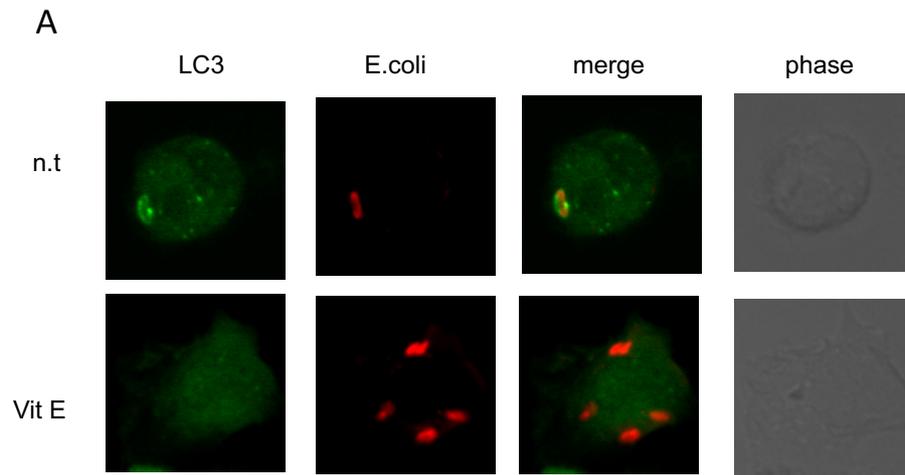


Abbildung 24: Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Kolokalisation von LC3 an Phagosomen nach E.coli-Infektion in Vit E behandelten und unbehandelten PM Repräsentative mikroskopische Bilder der Kolokalisation von E. coli mit GFP-LC3 in unbehandelten und mit Vit E behandelten PM nach 15 Minuten Infektionszeit (A). Graphische Auswertung der LC3 Kolokalisation (B).

5. Diskussion

Die erste Publikationen zur LC3-assoziierten Phagozytose wurde im Jahre 2007 veröffentlicht. Sanjuan *et al.* zeigten, dass es eine Verbindung zwischen dem Prozess der Phagozytose und dem Prozess der Autophagie gibt. In seiner Arbeit beschreibt er, dass es durch die Autophagie-Signalweg Proteine ATG5 und ATG7 zu einer Anlagerung von LC3 an die Phagosomenmembran kommt.¹⁰⁰ Seitdem sind viele neue Details über die LAP ans Licht gekommen und das Wissen über diesen Prozess wurde enorm erweitert.

Listeria monocytogenes war eines der ersten Bakterien mit dem man den Prozess der LAP verfolgte. Gluschko *et al.* konnte zeigen, dass die LAP für die Eliminierung von *L. monocytogenes* notwendig ist und durch den β_2 integrin Mac-1 Rezeptor ausgelöst wird. Der Erreger weist jedoch Nachteile auf, wie seine Virulenzfaktoren, seine Pathogenität und seine niedrigen Werte in der LC3-Kolokalisation, sodass die Frage nach einem Bakterium aufkam, das besser für die Analyse der LAP zugrunde liegenden Mechanismen geeignet ist.¹⁰¹

In der vorliegenden Arbeit wurde daher zunächst untersucht, ob das apathogene gram-negative Bakterium *E.coli* möglicherweise besser für die Analyse der LAP geeignet ist. Die Daten der Auswertung der IFM zeigten, dass bereits kurze Zeit nach Infektion eine Kolokalisation von LC3 mit dem Phagosom stattfindet. Nach 15 Minuten waren 28 % der Phagosomen mit LC3 umgeben. Da diese Ergebnisse bestätigten, dass die LAP auch in *E.coli*-infizierten Makrophagen stattfindet, wurden im weiteren Verlauf die molekularen Mechanismen dieses Prozesses unter Nutzung von *E.coli* genauer untersucht.

Nox2 ist verantwortlich für die Generation von ROS während der phagosomalen Reifung und reguliert den pH-Wert in den Phagosomen.¹⁰² Außerdem wird die Aktivität der Nox2 benötigt, um LC3 zu den Phagosomen zu rekrutieren.¹⁰³ Um zu untersuchen, ob Nox2 für die LAP nach *E.coli* Infektion ebenfalls unverzichtbar ist, wurden Experimente mit *Nox2*^{-/-} PM durchgeführt. Die ROS-Messungen zeigten, dass in *Nox2*^{-/-} PM keine ROS nach *E.coli* Infektion produziert werden. Mittels IFM konnte gezeigt werden, dass in *Nox2*^{-/-} PM ebenfalls keine LC3-Kolokalisation am Phagosom

¹⁰⁰ Sanjuan *et al.* (2007)

¹⁰¹ Gluschko *et al.* (2018)

¹⁰² Bedard and Krause (2007)

¹⁰³ J. Huang *et al.* (2009)

stattfindet. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die LC3-Rekrutierung zum Phagosom in E.coli-infizierten PM ebenfalls von durch Nox2 produzierten ROS abhängt.

In der Membran der Makrophagen sitzen PRRs, die PAMPs auf der Oberfläche von Mikroorganismen erkennen und über die Induktion von Signalkaskaden zu einer Immunreaktion führen.¹⁰⁴ Der Rezeptor Mac-1 ist ein heterodimerer Komplex, der aus den zwei Untereinheiten CD11b und CD18 besteht. Sobald einer der beiden Untereinheiten ausfällt, ist die Funktion des Rezeptors deutlich eingeschränkt.¹⁰⁵ Gluschko et al. fanden heraus, dass die Aktivierung der Nox2 und die Rekrutierung von LC3 zu L.m. enthaltenden Phagosomen in CD11b^{-/-} im Vergleich zu CD11b^{+/+} PM deutlich gesenkt ist.¹⁰⁶ Um zu untersuchen, ob Mac-1 ebenfalls eine essentielle Rolle bei der Aktivierung der Nox2 nach E.coli Infektion spielt, wurde mit CD11b^{+/+} und CD11b^{-/-} PM eine ROS-Messung nach E.coli Infektion durchgeführt. Die Messung zeigte einen identischen Kurvenverlauf der beiden Genotypen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass das Ausschalten der CD11b-Untereinheit des Mac-1 Komplexes keinerlei Einfluss auf die Produktion von reaktiven Sauerstoff-Spezies nach E.coli-Infektion hat. Im weiteren Verlauf konnte mittels IFM belegt werden, dass die Rekrutierung von LC3 in CD11b^{+/+} und CD11b^{-/-} Mäusen ebenfalls keine Unterschiede aufweist. Die Analyse der Ergebnisse zeigte, dass Mac-1 keine Funktion bei der Aktivierung von Nox2 nach E.coli Infektion einnimmt. Aufgrund der Tatsache, dass L.m. durch Mac-1 erkannt wird, E.coli jedoch nicht, kann man schlussfolgern, dass Mac-1 auf die Erkennung von gram⁺-Bakterien spezialisiert ist. Auf der Suche nach dem Rezeptor, der den Prozess der LAP im Falle von E.coli auslöst, bin ich auf den TLR4 Rezeptor gestoßen. TLR4 erkennt LPS in der Zellmembran von gram-negativen Bakterien, wie z.B E.coli. Für den Transduktionsweg sind Adapterproteine notwendig, welche mit der cytoplasmatischen Domäne des TLR assoziieren.¹⁰⁷ Der Rezeptor ist in der Lage eine Signalkaskade über das Adapterprotein MyD88 auszulösen und eine weitere über das Adapterprotein TRIF. Es ist bekannt, dass die Aktivierung der beiden Signalwege zur Produktion von inflammatorischen Cytokinen und zur Induktion von Typ I Interferon führt.¹⁰⁸ In vorherigen Arbeiten wurde gezeigt, dass das Adapterprotein MyD88 nicht für die Rekrutierung von LC3 zu L.m. enthaltenden Phagosomen notwendig ist. Gluschko et al. fanden heraus, dass die LC3-Kolokalisation in MyD88^{+/+} PM und MyD88^{-/-} PM nach L.m. Infektion keine signifikanten Unterschiede aufweist.¹⁰⁹ In Anbetracht der Tatsache, dass TLR4 jedoch eine essentielle Rolle im LPS Signalweg einnimmt wurde überprüft, ob der TLR4 Signalweg bei der Einleitung der LAP nach E.coli Infektion eine Rolle

¹⁰⁴ Kenneth Murphy (2018)

¹⁰⁵ Ho and Springer (1982)

¹⁰⁶ Gluschko et al. (2018)

¹⁰⁷ Kawai and Akira (2010)

¹⁰⁸ Lu et al. (2008)

¹⁰⁹ Gluschko et al. (2018)

spielt.¹¹⁰ Für dieses Experiment wurden PM aus MyD88^{-/-} Mäusen verwendet, um den Signalweg über das Adapterprotein MyD88 auszuschalten. Mit Hilfe der IFM konnte gezeigt werden, dass die Rekrutierung von LC3 zu den Phagosomen in MyD88^{-/-} deutlich niedriger ist. In MyD88^{+/+} PM erreichte die LC3-Kolokalisation 15 Minuten nach Infektion ihr Maximum mit 30 %. Die LC3-Kolokalisation in MyD88^{-/-} PM hingegen behielt im gesamten Verlauf der Kinetik ein niedriges Basallevel, welches maximale Werte von 15% erreichte. Trotz des Verlustes von MyD88 kommt also teilweise eine Rekrutierung von LC3 zum Phagosom zustande. Eine mögliche Erklärung wäre, dass TLR4 auch über den MyD88-unabhängigen Weg zu einer LC3-Kolokalisation führt, welcher trotz des MyD88-Knockouts voll funktionstüchtig ist. Ein weiterer Grund könnte sein, dass es noch andere Rezeptoren gibt, die E.coli erkennen und im Inneren der Zelle eine Aktivierung des LAP-Prozesses hervorrufen.

Nachdem geklärt werden konnte, welcher Rezeptor zur Aktivierung der LAP beiträgt, wurde näher untersucht, welche ROS-Spezies zu einer Rekrutierung von LC3 führen. Um die verantwortlichen ROS-Spezies zu identifizieren, wurden die antioxidativen Enzyme Superoxiddismutase und Katalase zur Hilfe genommen. Beide Enzyme katalysieren die Umwandlung gefährlicher freier Radikale in unschädliche Moleküle, um die Zelle vor oxidativen Stress zu schützen. Die SOD katalysiert die Umwandlung von O₂⁻, die Katalase ist für die Umwandlung von H₂O₂ zuständig.^{111 112} In einem ersten Experiment konnte gezeigt werden, dass die Enzyme gezielt in der Lage sind O₂⁻ bzw. H₂O₂ im Phagosom zu eliminieren. Das gezielte Eliminieren einer ROS-Spezies ermöglicht die genaue Identifizierung der ROS-Spezies, welche für die LC3-Kolokalisation verantwortlich ist. Um die Generierung neugebildeter ROS zu bewirken, wurden ein Teil der Zellen mit PMA stimuliert und der andere Teil mit E.coli infiziert. Anschließend wurde SOD zu den Zellen hinzugegeben. Die Kurven der infizierten, wie auch der PMA stimulierten Zellen wiesen nach SOD-Behandlung keinerlei Steigerung der ROS-Produktion auf. In der Amplex Red Messung hingegen, war der Kurvenverlauf der Zellen nach Inhibition mit SOD steiler. Dieses Ergebnis ist durch die Wirkungsweise der SOD zu erklären, da sie O₂⁻ in H₂O₂ umwandelt und somit das phagosomale H₂O₂ erhöht wird. Mit diesem Experiment wurde bestätigt, dass die SOD als ROS-Fänger gezielt in der Lage ist O₂⁻ im Phagosom zu eliminieren. Nach Inhibition mit Katalase zeigte die Amplex Red Messung hingegen eine eher mäßige Inhibition von H₂O₂. Die Katalase führt unter unseren experimentellen Bedingungen also nicht zu dem Effekt der vollständigen Eliminierung von H₂O₂. Mit Katalase im Ansatz lässt sich zwar eine signifikante Senkung des ROS-Grundlevels erreichen, jedoch ergab die Behandlung nur einen geringen Effekt auf das H₂O₂, welches als Reaktion auf die Infektion, bzw.

¹¹⁰ Kawai and Akira (2010)

¹¹¹ Fridovich (1997)

¹¹² Sepasi Tehrani and Moosavi-Movahedi (2018)

Stimulation mit PMA gebildet wurde. Als Begründung für diesen Effekt kommt in Frage, dass das Enzym nicht in großen Mengen dort lokalisiert war, wo die Nox2 H_2O_2 produziert hat. In einem weiteren Experiment könnte versucht werden, die Katalase gezielt an den Ort der ROS-Produktion zu bringen. Eine Möglichkeit besteht darin, dass Enzym an E.coli zu koppeln, um eine direkt Wirkung im Phagosom zu ermöglichen. Da die Katalase aber trotzdem eine ROS-Senkung bewirkt, wurde sie als H_2O_2 -Fänger für die Überprüfung der LC3-Kolokalisation mittels IFM genutzt.

Da die Funktionalität der beiden Enzyme bestätigt werden konnte, wurde im nächsten Experiment die LC3-Kolokalisation nach Infektion mit E.coli überprüft. Das Ergebnis zeigte, dass die SOD in der Lage ist durch die Eliminierung von O_2^- die LC3-Kolokalisation größtenteils zu unterbinden. Die Mikroskopie-Ergebnisse der Katalase-Proben zeigten hingegen keine Reduktion der LC3-Kolokalisation durch H_2O_2 Eliminierung. Aus den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass O_2^- eine essentielle Rolle bei der Rekrutierung von LC3 besitzt, wohingegen H_2O_2 keine Rolle in der LAP einnimmt.

Um in einem nächsten Schritt zu differenzieren, ob die produzierten Sauerstoffspezies im Cytosol oder im Phagosomen wirken müssen, wurde in den folgenden Experimenten mit der Substanz Glutathion gearbeitet. Glutathion ist in der Lage gezielt ROS im Cytosol wegzufangen.¹¹³ Um die Wirkung zu bestätigen, wurden zuerst Isoluminol und DCF-Messungen durchgeführt. Die Isoluminol-Messung zeigte, dass Glutathion wie erwartet keine Wirkung im Extrazellularraum entfaltet. In der DCF-Messung hingegen konnte man eine Teilreduktion von ROS beobachten. Mit diesem Ergebnis konnte nun als nächstes eine Überprüfung der LC3-Kolokalisation durchgeführt werden. Die IFM zeigte, dass die LC3-Kolokalisation durch GSH um 50 % gesenkt werden konnte. Aufgrund der Versuchsergebnisse lässt sich schließen, dass cytosolische ROS eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von LC3 zu den Phagosomen einnehmen. Die ROS, welche durch Nox2 erzeugt werden, müssen also in der Lage sein die Phagosomenmembran zu überqueren und somit ins Cytosol zu gelangen. Eine mögliche Theorie wäre, die Passage von O_2^- über die Membran des Phagosoms und die darauffolgende Umwandlung von O_2^- in H_2O_2 durch cytosolische SOD. Nach dieser Theorie befinden sich nach Aufnahme des Bakteriums sowohl O_2^- , als auch H_2O_2 im Cytosol. Die Substanzen Ebselen und Tempol sollten bei der Differenzierung der cytosolischen ROS-Spezies helfen. Ebselen war sowohl im Isoluminol Assay als auch im DCF Assay in der Lage die ROS-Produktion zu senken. Tempol hingegen hat weder im einen noch im anderen Assay zu einer Senkung geführt. Ein Aussage über die cytosolischen ROS Subspezies, welche zur Rekrutierung von LC3 führen, war somit schwer zu treffen. Die

¹¹³ Chhabra (2016)

Chemikalien haben nicht die erwünschte Wirkung erzielt. Es scheint, als ob sie die Membran erneut passieren und damit das Zellinnere wieder verlassen. In zukünftigen Versuchen sollte daher versucht werden, über das Einbringen von Vektoren, die Expression endogener ROS-fangender Moleküle zu steigern, sodass eine ausreichende Reduktion der ROS erreicht werden kann.

Graham et al. fanden heraus, dass durch die Produktion von ROS Lipidperoxide entstehen, welche zu einer Destabilisierung der Phagosomenmembran führen.¹¹⁴ Im Jahre 2015 konnten Martinez et al. nachweisen, dass in frühen Stadien der LAP eine Lipidperoxidbildung in der phagosomalen Membran stattfindet. Es ist jedoch nicht geklärt, ob die Bildung von Lipidperoxiden zur Rekrutierung von LC3 führt oder ob es noch einen anderen Grund gibt.¹¹⁵ Aufgrund der Tatsache, dass in $Nox2^{-/-}$ PM wesentlich geringere ROS-Mengen produziert werden, sollte auch die Bildung von Lipidperoxiden in diesem Genotyp eingeschränkt sein. Um zu untersuchen, ob Lipidperoxide für die LAP nötig sind, wurden mittels eines Färbekits Lipidperoxide innerhalb des Makrophagen sichtbar gemacht. Die IFM-Ergebnisse zeigten, dass sich in $Nox2^{+/+}$ PM 7 Minuten nach E.coli-Infektion Lipidperoxide um die Bakterien nachweisen lassen, wohingegen diese in $Nox2^{-/-}$ PM nicht sichtbar waren. Den Ergebnissen nach zu urteilen, gibt es eine Verbindung zwischen der ROS-Produktion und der Bildung von Lipidperoxiden. Leider erwies es sich als schwierig zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen den Lipidperoxiden und der LC3-Kolokalisation besteht. Normalerweise ist in GFP-LC3-transgenen Mäusen ein deutlich grüner Kringel um das Bakterium zu erkennen, welcher eine LC3 Anreicherung anzeigt. Durch die Inkubation mit der Substanz LAA scheint es zu einer Eliminierung und Ausspülung des GFP-LC3 aus der Membran zu kommen, sodass keine LC3-Kolokalisation mehr nachgewiesen werden kann. Um dem Problem aus dem Weg zu gehen, wurden GFP-LC3 negative Mäuse genommen und das LC3 im Anschluss mittels eines Antikörpers gefärbt. Auch dort war keine eindeutige Differenzierung von LC3-positiven zu LC3-negativen Phagosomen möglich, da der LC3-Antikörper auch an die E.coli gebunden hat. Um der Bindung des Antikörpers an E.coli zu entgehen, wurde der Versuch mit dem Bakterium L.m. durchgeführt. In der Durchführung mit Listerien ließen sich keine Lipidperoxide mehr nachweisen. Da die LC3 assoziierte Phagozytose ein gemeinsamer Nenner der E.coli und L.m. Infektion ist, Lipidperoxide jedoch nur bei E.coli auftreten, kann das Vorkommen von Lipidperoxiden nicht der Grund für die LC3-Rekrutierung sein. Um der Hypothese in einem letzten Versuch nachzugehen, wurde gezielt versucht die Lipidperoxide in der phagosomalen Membran zu eliminieren, um sich anschließend anzuschauen, inwiefern dies eine Auswirkung auf die Rekrutierung von LC3 zum

¹¹⁴ Wilkie-Grantham et al. (2015)

¹¹⁵ Heckmann and Green (2019)

Phagosomen hat. Für den Versuch wurde die antioxidative Substanz Vit E genutzt, die sie sich gerne in Membranen anreichert und deshalb gezielt für die Entgiftung von Lipidperoxiden eingesetzt wird.¹¹⁶ Das Ergebnis des Mikroskopie-Experiments zeigte eine deutliche Reduzierung der LC3-Kolokalisation nach Inkubation mit Vit E. In einer darauffolgenden ROS-Messung wurde festgestellt, dass Vit E auch eine antioxidative Wirkung auf cytosolische ROS hat. Vit E ist also in der Lage ROS im Phagosom, wie auch im Cytosol wegzufangen und ist somit nicht als spezifischer Lipidperoxid-Eliminierer einsetzbar. Mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methodik konnten keine Lipidperoxide für die Rekrutierung von LC3 verantwortlich gemacht werden. Jedoch kann in weiteren Experimenten versucht werden die Hypothese durch eine andere Methode zu untersuchen.

6. Zusammenfassung

In diesem Projekt wurden die molekularen Mechanismen der LAP in der antibakteriellen Immunantwort mit *Escherichia Coli* genauer untersucht. Die anfänglichen Fragestellungen, ob der Prozess der LAP nach Infektion mit E.coli von durch Nox2 generierten reaktiven Sauerstoffspezies abhängt und inwiefern die Rezeptoren TLR4 und Mac-1 eine Rolle bei der Aktivierung von Nox2 und damit der LAP spielen, wurden beantwortet. Die Mikroskopie-Ergebnisse zeigten, dass in Nox2^{-/-}PM im Gegensatz zu Nox2^{+/+}PM keine LAP stattfindet. Mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen bzw. Lumineszenzmessungen konnte gezeigt werden, dass Nox2^{-/-} PM nicht mehr in der Lage sind O₂⁻ bzw. H₂O₂ zu produzieren. Die fehlende ROS-Produktion in Kombination mit der ausbleibenden Rekrutierung von LC3 zu den Phagosomen zeigten, dass die von Nox2 produzierten ROS unerlässlich für die LAP nach E.coli Infektion sind. Im Anschluss stand die Frage im Raum, welcher Rezeptor für die Aktivierung der Nox2 verantwortlich ist. Die Hypothese, dass Mac-1, bestehend aus Cd11b+Cd18, für die Aktivierung von Nox2 nach E.coli Infektion notwendig ist, konnte widerlegt werden. Die Fluoreszenzmessungen zeigten nach Infektion identische Werte von extrazellulären ROS bei CD11b^{+/+} und CD11b^{-/-} PM. Das Enzym Nox2 war trotz Inaktivierung von Mac-1 aktiv und produzierte ROS. Das Ergebnis der ROS-Messung harmonierte mit den Mikroskopie-Ergebnissen. Die LC3-Kolokalisation fand in beiden Genotypen statt. Als nächstes wurde die TLR4-Myd88 Achse untersucht. In den Mikroskopie-Ergebnissen konnte in Myd88^{-/-} im Gegensatz zu Myd88^{+/+} PM eine Teilreduktion der LC3-Kolokalisation festgestellt werden. Aus den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern,

¹¹⁶ Engin (2009)

dass Myd88 ein wichtiges Adapterprotein für die LAP nach E.coli Infektion darstellt. Trotz Inaktivierung von Myd88 waren jedoch die PM noch in der Lage in einem gewissen Maße LC3 zu den Phagosomen zu rekrutieren. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass TLR4 noch über Myd88 unabhängige Wege zur LAP führt oder es noch weitere Rezeptoren gibt, die die LAP einleiten. Die zweite anfängliche Fragestellung welche ROS Subspezies für die LAP notwendig sind und in welchem Zellkompartiment sie wirken müssen konnte mit Hilfe von antioxidativen Enzymen und antioxidativen Substanzen beantwortet werden. Die Mikroskopie-Ergebnisse zeigten, dass die Superoxiddismutase, durch das Wegfangen von O_2^- , die LAP deutlich unterbindet. Die Katalase hingegen hatte, durch das Wegfangen von H_2O_2 , keinen hemmenden Effekt auf die Rekrutierung von LC3. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die ROS Subspezies O_2^- für die LAP essentiell ist. Der Wirkungsort der ROS konnte mit Hilfe des Glutathions festgesellt werden. Das Glutathion führte, durch das Wegfangen von intrazellulären ROS, zu einer deutlich niedrigeren LC3 Kolokalisation an den Phagosomen. Neben den phagosomalen ROS sind also auch die ROS im Cytosol für die LC3-Rekrutierung notwendig. Eine Aussage über die cytosolischen ROS Subspezies, welche zur Rekrutierung von LC3 führen, konnte nicht getroffen werden. Die antioxidativen Chemikalien Ebselen und Tempol haben sich nicht im Zellinneren angereichert. In Zukunft sollte versucht werden, über das Einbringen von Vektoren, die Expression endogener ROS-fangender Moleküle zu steigern, sodass eine ausreichende Reduktion der ROS erreicht werden kann. Welchen Zusammenhang die Entstehung von ROS und die Rekrutierung von LC3 zu den Phagosomen haben, konnte nicht vollständig geklärt werden. Mit der von uns verwendeten Methodik konnten keine Lipidperoxide für die Rekrutierung von LC3 verantwortlich gemacht werden. In Zukunft sollte in weiteren Experimenten untersucht werden, ob der Schlüssel der LC3-Rekrutierung in einem anderen Mechanismus liegt, oder ob die Hypothese der Lipidperoxide durch andere Methoden bestätigt werden kann.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: TLR4 Signalweg MyD88 abhängiger Weg (A) MyD88 unabhängiger Weg (B) Quelle: Lu et al. (2008).....	9
Abbildung 2: Aktivierungsprozess der Nox2	11
Abbildung 3: Verschiedene Arbeitsweisen der Katalase	13
Abbildung 4: Arbeitsweisen des Glutathions	13
Abbildung 5: Molekulare Mechanismen der kanonischen Autophagie und der LAP	17
Abbildung 6: Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Kolokalisation von LC3 mit E. coli in PM. Repräsentative mikroskopische Bilder der Kolokalisation von E. coli mit GFP-LC3 in GFP-LC3 transgenen PM (A). Kinetik der Kolokalisation von E. coli mit GFP-LC3 (B) Kinetischer Verlauf der Aufnahme von E.coli durch die Makrophagen (C). Kinetischer Verlauf der Anzahl an E.coli pro Zelle (D)	35
Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Kolokalisation von LC3 an Phagosomen nach E.coli-Infektion in Nox2^{-/-} PM und Nox2^{+/+} PM Repräsentative mikroskopische Bilder der Kolokalisation von E. coli mit GFP-LC3 in Nox2 ^{+/+} PM und Nox2 ^{-/-} PM nach 15 Minuten Infektionszeit (A). Kinetischer Verlauf der Aufnahme von E.coli durch die Makrophagen (B). Kinetik der Kolokalisation von phagosomalen E.coli. mit GFP-LC3 in GFP-LC3 transgenen Nox2 ^{-/-} PM im Vergleich zu GFP-LC3 transgenen Nox2 ^{+/+} PM (C). Kinetischer Verlauf der Anzahl von E.coli/Zelle (D).	37
Abbildung 8: Messung extrazellulärer ROS mittels Isoluminol Chemolumineszenzmessung und AmplexRed Fluoreszenzmessung in Nox2^{+/+} und Nox2^{-/-} PM. Isoluminol Messung von Nox2 ^{+/+} und Nox2 ^{-/-} PM bei Stimulation mit E.coli bei einer MOI=1 im Vergleich zu unbehandelt PMs (A). Isoluminol Messung von Nox2 ^{+/+} und Nox2 ^{-/-} PM bei Stimulation mit PMA im Vergleich zu unbehandelten PMs (B). AUC der Isoluminol Messungen (C). Amplex Red Messung von Nox2 ^{+/+} und Nox2 ^{-/-} PM bei Stimulation mit E.coli bei einer MOI=1 im Vergleich zu unbehandelt PMs (D). Amplex Red Messung von Nox2 ^{+/+} und Nox2 ^{-/-} PM bei Stimulation mit PMA im Vergleich zu unbehandelten PMs (E). AUC der Amplex Red Messungen (F).	39
Abbildung 9: Messung von extrazellulären ROS mittels Isoluminol Chemolumineszenzmessung in CD11b^{+/+} und CD11b^{-/-} PMs . Lumineszenzmessung von CD11b ^{+/+} und CD11b ^{-/-} PM nach Stimulation mit E.coli (MOI=50) oder mit PMA im Vergleich zu unbehandelt PM (A). AUC der Isoluminol Messung (B)	41
Abbildung 10: Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Kolokalisation von LC3 an Phagosomen nach E.coli-Infektion in CD11b^{-/-} PM und CD11b^{+/+} PM Repräsentative mikroskopische Bilder der Kolokalisation von E. coli mit GFP-LC3 in CD11b ^{+/+} PM und CD11b ^{-/-} PM nach 15 Minuten Infektionszeit (A). Kinetischer Verlauf der Aufnahme von E.coli durch die Makrophagen (B). Kinetischer Verlauf der Anzahl von E.coli/Zelle (C). Kinetischer Verlauf der Anzahl von E.coli/Zelle Kinetik der Kolokalisation von phagosomalen E.coli. mit GFP-LC3 in GFP-LC3 transgenen CD11b ^{-/-} PM im Vergleich zu GFP-LC3 transgenen CD11b ^{+/+} PM (D).....	42
Abbildung 11: Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Kolokalisation von LC3 an Phagosomen nach E.coli-Infektion in MyD88^{-/-} PM und MyD88^{+/+} PM Repräsentative mikroskopische Bilder der Kolokalisation von E. coli mit GFP-LC3 in MyD88 ^{+/+} PM und MyD88 ^{-/-} PM nach 15 Minuten Infektionszeit (A). Kinetischer Verlauf der Kolokalisation von phagosomalen E.coli. mit GFP-LC3 in GFP-LC3 transgenen MyD88 PM im Vergleich zu GFP-LC3 transgenen MyD88 ^{+/+} (B). Kinetischer Verlauf der Anzahl an E.coli/Zelle (C). PM Kinetischer Verlauf der Aufnahme von E.coli durch die Makrophagen (D). 43	43
Abbildung 12: Messung extrazellulärer ROS mittels Isoluminol Chemolumineszenzmessung in SOD behandelten PM im Vergleich zu unbehandelten PM. Isoluminol Messung von SOD behandelten und unbehandelten PM bei Stimulation mit E.coli MOI=50 im Vergleich (A). Isoluminol Messung von SOD behandelten und unbehandelten PM bei Stimulation mit PMA im Vergleich (B). AUC der Isoluminol Messungen (C).	46
Abbildung 13: Messung extrazellulärer ROS mittels AmplexRed Fluoreszenzmessung in SOD behandelten PM im Vergleich zu unbehandelten PM. Amplex Red Messung von SOD behandelten und unbehandelten PM bei Stimulation mit E.coli MOI=50 im Vergleich (A). Amplex Red Messung von SOD behandelten und unbehandelten PM bei Stimulation mit PMA im Vergleich (B). AUC der Amplex Red Messungen (C).	47
Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Kolokalisation von LC3 an Phagosomen nach E.coli-Infektion in SOD behandelten und unbehandelten PM Repräsentative mikroskopische Bilder der Kolokalisation von E. coli mit GFP-LC3 in unbehandelten und SOD behandelten PM nach 15 Minuten Infektionszeit (A). Graphische Auswertung der LC3 Kolokalisation (B).	49
Abbildung 15: Messung extrazellulärer ROS mittels AmplexRed Fluoreszenzmessung in CAT behandelten PMs im Vergleich zu unbehandelten PMs. Amplex Red Messung von CAT behandelten und unbehandelten PMs bei Stimulation mit E.coli MOI=50 im Vergleich (A). Amplex Red Messung von CAT	

behandelten und unbehandelten PMs bei Stimulation mit PMA im Vergleich (B). AUC der Amplex Red Messungen (C)	50
Abbildung 16: Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Kolokalisation von LC3 an Phagosomen nach E.coli-Infektion in CAT behandelten und unbehandelten PM Repräsentative mikroskopische Bilder der Kolokalisation von E. coli mit GFP-LC3 in unbehandelten und mit CAT behandelten PM nach 15 Minuten Infektionszeit (A). Graphische Auswertung der LC3 Kolokalisation (B)	51
Abbildung 17: Messung extrazellulärer und intrazellulärer ROS mittels AmplexRed Fluoreszenzmessung und DCF Fluoreszenzmessung in GSH behandelten PM im Vergleich zu unbehandelten PM. Isoluminol Messung von GSH behandelten und unbehandelten PMs bei Stimulation mit E.coli MOI=50 im Vergleich (A). AUC der Isoluminol Messung (B). DCF Messung von GSH behandelten und unbehandelten PMs bei Stimulation mit E.coli MOI=50 im Vergleich (C). AUC der DCF Messungen (C)	53
Abbildung 18: Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Kolokalisation von LC3 an Phagosomen nach E.coli-Infektion in GSH behandelten und unbehandelten PM Repräsentative mikroskopische Bilder der Kolokalisation von E. coli mit GFP-LC3 in unbehandelten und GSH behandelten PM nach 15 Minuten Infektionszeit (A). Graphische Auswertung der LC3 Kolokalisation (B)	54
Abbildung 19: Messung extrazellulärer und intrazellulärer ROS mittels AmplexRed Fluoreszenzmessung und DCF Fluoreszenzmessung in Tempol und Ebselen behandelten PMs im Vergleich zu unbehandelten PM. Isoluminol Messung von Tempol behandelten und unbehandelten PMs bei Stimulation mit E.coli MOI=50 im Vergleich (A). Isoluminol Messung von Ebselen behandelten und unbehandelten PMs bei Stimulation mit E.coli MOI=50 im Vergleich (B). DCF Messung von Tempol behandelten und unbehandelten PMs bei Stimulation mit E.coli MOI=50 im Vergleich (C). DCF Messung von Ebselen behandelten und unbehandelten PMs bei Stimulation mit E.coli MOI=50 im Vergleich (D)	55
Abbildung 20: Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Kolokalisation von LC3 an Phagosomen nach E.coli-Infektion in Tempol bzw. Ebselen behandelten und unbehandelten PM Repräsentative mikroskopische Bilder der Kolokalisation von E. coli mit GFP-LC3 in unbehandelten und mit Tempol bzw. Ebselen behandelten PM nach 15 Minuten Infektionszeit (A). Graphische Auswertung der LC3 Kolokalisation (B)	56
Abbildung 21: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopische Bilder der Bildung von Lipidperoxiden in der phagosomalen Membran nach E.coli Infektion	58
Abbildung 22: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopische Bilder der Bildung von Lipidperoxiden in der phagosomalen Membran nach L.m. Infektion	58
Abbildung 23: Messung extrazellulärer und intrazellulärer ROS mittels AmplexRed Fluoreszenzmessung und DCF Fluoreszenzmessung in Vit E behandelten PMs im Vergleich zu unbehandelten PMs. Isoluminol Messung von Vit E behandelten und unbehandelten PMs bei Stimulation mit E.coli MOI=50 im Vergleich (A). DCF Messung von Vit E behandelten und unbehandelten PMs bei Stimulation mit E.coli MOI=50 im Vergleich (B)	59
Abbildung 24: Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Kolokalisation von LC3 an Phagosomen nach E.coli-Infektion in Vit E behandelten und unbehandelten PM Repräsentative mikroskopische Bilder der Kolokalisation von E. coli mit GFP-LC3 in unbehandelten und mit Vit E behandelten PM nach 15 Minuten Infektionszeit (A). Graphische Auswertung der LC3 Kolokalisation (B)	60

8. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Makrophagenarten (In Anlehnung an Behrends J (2016))</i>	5
<i>Tabelle 2: Verwendete Nährmedien und Zusätze</i>	20
<i>Tabelle 3: Verwendete Puffer und Lösungen</i>	20
<i>Tabelle 4: Verwendete Chemikalien</i>	21
<i>Tabelle 5: Verwendete Antikörper</i>	21
<i>Tabelle 6: Verwendete Materialien</i>	22
<i>Tabelle 7: Verwendete Geräte</i>	23
<i>Tabelle 8: Verwendete Software</i>	24
<i>Tabelle 9: Verwendete Kits</i>	24
<i>Tabelle 10: Extrazelluläre E.coli Färbung</i>	28
<i>Tabelle 11: Intrazelluläre E.coli Färbung</i>	28
<i>Tabelle 12: Extrazelluläre L.m. Färbung</i>	29
<i>Tabelle 13: Intrazelluläre L.m. Färbung</i>	29
<i>Tabelle 14 Färbung von LC3</i>	29

9. Literaturverzeichnis

- Abreu, I. A., & Cabelli, D. E. (2010). Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochim Biophys Acta*, 1804(2), 263-274. doi:10.1016/j.bbapap.2009.11.005
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., & Di Ilio, C. (2013). Escherichia coli in Europe: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(12), 6235-6254. doi:10.3390/ijerph10126235
- Anton, B. P., & Raleigh, E. A. (2016). Complete Genome Sequence of NEB 5-alpha, a Derivative of Escherichia coli K-12 DH5 α . *Genome announcements*, 4(6), e01245-01216. doi:10.1128/genomeA.01245-16
- Barton, G. M., & Kagan, J. C. (2009). A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nature Reviews Immunology*, 9(8), 535-542. doi:10.1038/nri2587
- Bedard, K., & Krause, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, 87(1), 245-313. doi:10.1152/physrev.00044.2005
- Bernardy, C. C. F., Zarpelon, A. C., Pinho-Ribeiro, F. A., Calixto-Campos, C., Carvalho, T. T., Fattori, V., . . . Verri, W. A., Jr. (2017). Tempol, a Superoxide Dismutase Mimetic Agent, Inhibits Superoxide Anion-Induced Inflammatory Pain in Mice. *Biomed Res Int*, 2017, 9584819. doi:10.1155/2017/9584819
- Chang, L. F., & Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410(6824), 37-40. doi:10.1038/35065000
- Chatterjee, P. K., Cuzzocrea, S., Brown, P. A., Zacharowski, K., Stewart, K. N., Mota-Filipe, H., & Thiemermann, C. (2000). Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat. *Kidney Int*, 58(2), 658-673. doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00212.x
- Chhabra, N. (2016). Low Gluathione reductase activity
- Ding, W. X., Ni, H. M., Li, M., Liao, Y., Chen, X. Y., Stolz, D. B., . . . Yin, X. M. (2010). Nix Is Critical to Two Distinct Phases of Mitophagy, Reactive Oxygen Species-mediated Autophagy Induction and Parkin-Ubiquitin-p62-mediated Mitochondrial Priming. *Journal of Biological Chemistry*, 285(36), 27879-27890. doi:10.1074/jbc.M110.119537
- Dusi, S., Donini, M., & Rossi, F. (1996). Mechanisms of NADPH oxidase activation: translocation of p40phox, Rac1 and Rac2 from the cytosol to the membranes in human neutrophils lacking p47phox or p67phox. *Biochem J*, 314 (Pt 2), 409-412. doi:10.1042/bj3140409
- Engin, K. N. (2009). Alpha-tocopherol: looking beyond an antioxidant. *Mol Vis*, 15, 855-860. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19390643>
- Fanburg, V. J. T. a. B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L1005–L1028, 2000.
- Florey, O., & Overholtzer, M. (2012). Autophagy proteins in macroendocytic engulfment. *Trends in Cell Biology*, 22(7), 374-380. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.04.005>
- Fridovich, I. (1997). Superoxide anion radical (O $_2^-$), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem*, 272(30), 18515-18517. doi:10.1074/jbc.272.30.18515
- Geschwender, A. S. (2013). Chemiluminescent Westerns: How film and photochemistry affect experimental results. *Research Gate* Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/255821800>

- Gluschko, A., Herb, M., Wiegmann, K., Krut, O., Neiss, W. F., Utermohlen, O., . . . Schramm, M. (2018). The beta2 Integrin Mac-1 Induces Protective LC3-Associated Phagocytosis of *Listeria monocytogenes*. *Cell Host Microbe*, 23(3), 324-337 e325. doi:10.1016/j.chom.2018.01.018
- Gordon, S. (2008). Elie Metchnikoff: father of natural immunity. *Eur J Immunol*, 38(12), 3257-3264. doi:10.1002/eji.200838855
- Gordon, S. (2016). Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity*, 44(3), 463-475. doi:10.1016/j.immuni.2016.02.026
- Groves, E., Dart, A. E., Covarelli, V., & Caron, E. (2008). Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(13), 1957-1976. doi:10.1007/s00018-008-7578-4
- Hancock, J. T., Desikan, R., & Neill, S. J. (2001). Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans*, 29(Pt 2), 345-350. doi:10.1042/0300-5127:0290345
- Heckmann, B. L., Boada-Romero, E., Cunha, L. D., Magne, J., & Green, D. R. (2017). LC3-Associated Phagocytosis and Inflammation. *J Mol Biol*, 429(23), 3561-3576. doi:10.1016/j.jmb.2017.08.012
- Heckmann, B. L., & Green, D. R. (2019). Correction: LC3-associated phagocytosis at a glance (doi:10.1242/jcs.222984). *J Cell Sci*, 132(5). doi:10.1242/jcs.231472
- Held, P. (2003). Horseradish Peroxidase (HRP) Determination Using Amplex Red and Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader.
- Held, P. (2015). *An Introduction to Reactive Oxygen Species*. Retrieved from
- Herb, M., Gluschko, A., & Schramm, M. (2019). LC3-associated phagocytosis - The highway to hell for phagocytosed microbes. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.04.016>
- Ho, M. K., & Springer, T. A. (1982). Mac-1 Antigen - Quantitative Expression in Macrophage Populations and Tissues, and Immunofluorescent Localization in Spleen. *Journal of Immunology*, 128(5), 2281-2286. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:A1982NL17700061
- Horn, F. (2018). *Biochemie des Menschen*.
- Huang, J., Canadien, V., Lam, G. Y., Steinberg, B. E., Dinauer, M. C., Magalhaes, M. A., . . . Brumell, J. H. (2009). Activation of antibacterial autophagy by NADPH oxidases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(15), 6226-6231. doi:10.1073/pnas.0811045106
- Huang, J., Canadien, V., Lam, G. Y., Steinberg, B. E., Dinauer, M. C., Magalhaes, M. A. O., . . . Brumell, J. H. (2009). Activation of antibacterial autophagy by NADPH oxidases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(15), 6226-6231. doi:10.1073/pnas.0811045106
- Johnson, I. D. (2005). *The Molecular Probes® Handbook—A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123-140. doi:10.1038/nrmicro818
- Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2012). Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol*, 22(8), 407-417. doi:10.1016/j.tcb.2012.05.006
- Kawai, T., & Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death Differ*, 13(5), 816-825. doi:10.1038/sj.cdd.4401850
- Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11(5), 373-384. doi:10.1038/ni.1863
- Kenneth Murphy, C. W. (2018). *Janeway Immunologie*
- Kuhnert, P., Nicolet, J., & Frey, J. (1995). Rapid and accurate identification of *Escherichia coli* K-12 strains. *Applied and environmental microbiology*, 61(11), 4135-4139. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8526531>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC167724/>

- Kuma, A., & Mizushima, N. (2008). Chromosomal mapping of the GFP-LC3 transgene in GFP-LC3 mice. *Autophagy*, 4(1), 61-62. doi:10.4161/aut.4846
- Lam, G. Y., Cemma, M., Muise, A. M., Higgins, D. E., & Brumell, J. H. (2013). Host and bacterial factors that regulate LC3 recruitment to *Listeria monocytogenes* during the early stages of macrophage infection. *Autophagy*, 9(7), 985-995. doi:10.4161/aut.24406
- Lee, H. B., Yu, M. R., Song, J. S., & Ha, H. (2004). Reactive oxygen species amplify protein kinase C signaling in high glucose-induced fibronectin expression by human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int*, 65(4), 1170-1179. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00491.x
- Lee, Y. K., & Lee, J. A. (2016). Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy. *Bmb Reports*, 49(8), 424-430. doi:10.5483/BMBRep.2016.49.8.081
- Lu, Y. C., Yeh, W. C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42(2), 145-151. doi:10.1016/j.cyto.2008.01.006
- McCann, S. K. (2013). NADPH Oxidase as a Therapeutic Target for Neuroprotection against Ischaemic Stroke: Future Perspectives. *Brain Sciences*.
- Moynagh, P. N. (2005). TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway. *Trends Immunol*, 26(9), 469-476. doi:10.1016/j.it.2005.06.009
- Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 11(1), 142-201. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9457432>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC121379/>
- Paige Davis Volk, A., & Moreland, J. G. (2014). Chapter Thirteen - ROS-Containing Endosomal Compartments: Implications for Signaling. In P. M. Conn (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 535, pp. 201-224): Academic Press.
- Pannu, H. K., & Oliphant, M. (2015). The subperitoneal space and peritoneal cavity: basic concepts. *Abdominal Imaging*, 40(7), 2710-2722. doi:10.1007/s00261-015-0429-5
- Picard, C., Puel, A., Bonnet, M., Ku, C. L., Bustamante, J., Yang, K., . . . Casanova, J. L. (2003). Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science*, 299(5615), 2076-2079. doi:10.1126/science.1081902
- Pizzolla, A., Hultqvist, M., Nilson, B., Grimm, M. J., Eneljung, T., Jonsson, I. M., . . . Holmdahl, R. (2012). Reactive Oxygen Species Produced by the NADPH Oxidase 2 Complex in Monocytes Protect Mice from Bacterial Infections. *Journal of Immunology*, 188(10), 5003-5011. doi:10.4049/jimmunol.1103430
- Randall-Demllo, S., Chieppa, M., & ERI, R. (2013). Intestinal Epithelium and Autophagy: Partners in Gut Homeostasis. *Frontiers in Immunology*, 4(301). doi:10.3389/fimmu.2013.00301
- Richards, D. M., & Endres, R. G. (2014). The Mechanism of Phagocytosis: Two Stages of Engulfment. *Biophysical Journal*, 107(7), 1542-1553. doi:10.1016/j.bpj.2014.07.070
- Robinson, J. M., Ohira, T., & Badwey, J. A. (2004). Regulation of the NADPH-oxidase complex of phagocytic leukocytes. Recent insights from structural biology, molecular genetics, and microscopy. *Histochem Cell Biol*, 122(4), 293-304. doi:10.1007/s00418-004-0672-2
- Roos, D., van Bruggen, R., & Meischl, C. (2003). Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect*, 5(14), 1307-1315. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14613774>
- Rosales, C., & Uribe-Querol, E. (2017). Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *BioMed Research International*, 2017, 18. doi:10.1155/2017/9042851

- Sanjuan, M. A., Dillon, C. P., Tait, S. W. G., Moshiah, S., Dorsey, F., Connell, S., . . . Green, D. R. (2007). Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature*, *450*(7173), 1253-1257. doi:10.1038/nature06421
- Schille, S., Crauwels, P., Bohn, R., Bagola, K., Walther, P., & van Zandbergen, G. (2018). LC3-associated phagocytosis in microbial pathogenesis. *International Journal of Medical Microbiology*, *308*(1), 228-236. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.10.014>
- Scibior, D., & Czczot, H. (2006). [Catalase: structure, properties, functions]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, *60*, 170-180. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16618987>
- Segal, B. H., Grimm, M. J., Khan, A. N., Han, W., & Blackwell, T. S. (2012). Regulation of innate immunity by NADPH oxidase. *Free Radic Biol Med*, *53*(1), 72-80. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.022
- Sepasi Tehrani, H., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2018). Catalase and its mysteries. *Prog Biophys Mol Biol*, *140*, 5-12. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2018.03.001
- Sies, H. (1993). Ebselen, a Selenoorganic Compound as Glutathione-Peroxidase Mimic. *Free Radical Biology and Medicine*, *14*(3), 313-323. doi:Doi 10.1016/0891-5849(93)90028-S
- Suzuki, N., Suzuki, S., Duncan, G. S., Millar, D. G., Wada, T., Mirtsos, C., . . . Yeh, W. C. (2002). Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature*, *416*(6882), 750-754. doi:DOI 10.1038/nature736
- Tainer, J. A., Getzoff, E. D., Richardson, J. S., & Richardson, D. C. (1983). Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. *Nature*, *306*(5940), 284-287. doi:10.1038/306284a0
- technologies, m. p. b. l. (2012). Click-iT® Lipid Peroxidation Detection with Linoleamide Alkyne (LAA).
- Wang, C. Q., Yu, X., Cao, Q., Wang, Y., Zheng, G. P., Tan, T. K., . . . Harris, D. C. H. (2013). Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. *Bmc Immunology*, *14*. doi:Artn 6 10.1186/1471-2172-14-6
- Wellner, V. P., Anderson, M. E., Puri, R. N., Jensen, G. L., & Meister, A. (1984). Radioprotection by glutathione ester: transport of glutathione ester into human lymphoid cells and fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(15), 4732-4735. doi:10.1073/pnas.81.15.4732
- Wilkie-Grantham, R. P., Magon, N. J., Harwood, D. T., Kettle, A. J., Vissers, M. C., Winterbourn, C. C., & Hampton, M. B. (2015). Myeloperoxidase-dependent lipid peroxidation promotes the oxidative modification of cytosolic proteins in phagocytic neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(15), 9896-9905. doi:10.1074/jbc.M114.613422
- Wong, P.-M., Puente, C., Ganley, I. G., & Jiang, X. (2013). The ULK1 complex. *Autophagy*, *9*(2), 124-137. doi:10.4161/auto.23323
- Yu, L., Chen, Y., & Tooze, S. A. (2018). Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy*, *14*(2), 207-215. doi:10.1080/15548627.2017.1378838
- Zhou, H., Liao, J. Y., Aloor, J., Nie, H., Wilson, B. C., Fessler, M. B., . . . Hong, J. S. (2013). CD11b/CD18 (Mac-1) Is a Novel Surface Receptor for Extracellular Double-Stranded RNA To Mediate Cellular Inflammatory Responses. *Journal of Immunology*, *190*(1), 115-125. doi:10.4049/jimmunol.1202136

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.