

Abstract

Autophagy is an innate immune defense mechanism against various intracellular pathogens. *S. aureus*, a major human pathogen, upon infection of professional and non-professional phagocytes localizes to compartments, positive for autophagic marker LC3, avoids lysosomal degradation and finally autophagosomes are used as replicative niches.

The present work shows that increase of autophagosome numbers in *S. aureus*-infected cells and *S. aureus* localization to LC3-positive compartments are two distinct processes. Although both processes depend on ROS, the overall induction of autophagic compartments by *S. aureus*-infection was unaffected by NADPH oxidase-deficiency in both MEFs and BMDMs. In contrast, the LC3-recruitment to *S. aureus* containing phagosomes requires NADPH-oxidase in both professional (bone marrow-derived macrophages, BMDMs) and non-professional phagocytes (murine embryonic fibroblasts, MEFs). In professional phagocytes the recruitment of LC3 depends on Nox2 NADPH-oxidase activity, whereas in non-professional cells, Nox4 and to a lesser extent Nox1 NADPH-oxidase activity is necessary. Ultrastructural properties of the *S. aureus*-containing vesicles differ significantly between MEFs and BMDMs. In MEFs multimembrane myelin-like stacks were associated with *S. aureus* phagosomes, morphology distinct from canonical autophagosomes. Nevertheless the formation of such membrane structures was dependent both on autophagy proteins and NADPH oxidase. In BMDMs *S. aureus* were contained in the single membrane vesicles. We found that *S. aureus* co-localization with autophagy-like compartments relies on function of phosphatidylinositid-3-kinase class III (PI3K), whereas it is independent of the ULK complex, a prerequisite for starvation-induced autophagy. *S. aureus* LC3 co-localization was completely abolished by downregulation of vps34, the catalytic subunit of PI3K, or adapter proteins essential for its activity. Finally, in Nox4^{-/-} deficient non-professional phagocytes a clear impairment of PI3K activity on *S. aureus*-containing phagosomes was observed. Moreover, Nox4^{-/-} deficiency results in altered recruitment of Ambra1 and Rubicon to the PI3K complex on *S. aureus*-phagosomes. Taken together, our results identify a previously unrecognized role of NADPH oxidase-derived ROS as necessary factor for selective targeting of autophagy-like compartments to *S. aureus*-containing phagosomes in professional and non-professional phagocytes. The mechanism depends on the stabilization of the PI3K complex by ROS, maintaining PI3K activity on bacterial phagosomes.

Zusammenfassung

Autophagie ist ein Abwehrmechanismus der angeborenen Immunantwort, der dazu dient verschiedenartige intrazelluläre Bakterien zu kontrollieren. Einige Pathogene jedoch sind in der Lage Autophagie zu nutzen, um intrazellulär überleben zu können. *S. aureus* ist ein bedeutsamer menschlicher Erreger, der zwar sowohl in professionellen als auch in nicht-professionellen Phagozyten mit LC3 gekennzeichneten Kompartimenten lokalisiert, aber den anschließenden autophagosomalen Abbau verhindert.

Diese Arbeit zeigt, dass der Anstieg der Anzahl von Autophagosomen in *S. aureus* infizierten Zellen und die Lokalisation von *S. aureus* mit LC3 positiven Kompartimenten zwei unterschiedliche Prozesse sind. Obwohl beide Prozesse abhängig von ROS sind, ist die durch die Infektion mit *S. aureus* stattfindende Induktion von autophagischen Kompartimenten in den untersuchten Zelltypen unabhängig von NADPH Oxidasen. Im Gegensatz zur Induktion von Autophagie, ist in professionellen (Knochenmark-generierten Makrophagen, BMDMs) und in nicht-professionellen Phagozyten (embryonale Maus Fibroblasten, MEFs), die Rekrutierung von LC3 zu *S. aureus*-enthaltenden Phagosomen abhängig von durch NADPH Oxidasen generiertem ROS. Es konnte gezeigt werden, dass die Rekrutierung von LC3 zu *S. aureus* enthaltenden Phagosomen in Abhängigkeit der NADPH Oxidase Nox2 geschieht, während in nicht-professionellen Phagozyten Nox4 und zu einem deutlich geringeren Anteil auch Nox1 Aktivität notwendig ist. Zusätzlich wurde beobachtet, dass die ultrastrukturellen Eigenschaften der *S. aureus* enthaltenden Vesikel sich deutlich zwischen BMDMs und MEFs unterscheiden. *S. aureus* ist in MEFs von mehreren Membranstapel umgeben, die eine Myelin-ähnliche Struktur aufweisen, diese Membranstrukturen unterscheiden sich deutlich von Membranstrukturen kanonischer Autophagosomen. Es konnte gezeigt werden, dass die Bildung dieser Membranstrukturen in Abhängigkeit von Autophagie Proteinen und zusätzlich auch von NADPH Oxidasen entsteht. Dagegen ist *S. aureus* in BMDMs von einer Einzelmembran umgeben. Zusätzlich haben wir beobachtet, dass die Kolokalisation von *S. aureus* mit Autophagie ähnlichen Kompartimenten unabhängig vom ULK Komplex erfolgt, aber abhängig von der Aktivität der Klasse III Phosphoinositid-3-Kinase ist. Vollständig aufgehoben ist die Kolokalisation von *S. aureus* mit LC3, wenn die katalytische PI3 Kinase Untereinheit, vps34 oder auch Adapter Proteine, die für die Aktivität der Kinase notwendig sind, wie Ambra1,

Rubicon, Beclin1, UVRAG und Atg14 herunterreguliert werden. Letztendlich, wurde in Nox4-defizienten, nicht-professionellen Phagozyten gezeigt, dass die PI3K Aktivität am *S. aureus* enthaltenen Phagosom deutlich vermindert ist. Zusätzlich führt die Defizienz von Nox4 zu einem beschleunigten Ablösen von Ambra1 und Rubicon vom *S. aureus* enthaltenden Phagosom, was auf eine Destabilisierung des PI3K Komplex durch die Abwesenheit von ROS hinweist. Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse eine bisher unbekannte Rolle für NADPH Oxidasen hergestelltes ROS, die in professionellen und nicht-professionellen Phagozyten ein notwendiger Faktor für das selektive Targeting von Autophagie ähnlichen Kompartimenten mit *S. aureus* enthaltenden Phagosomen sind. Der Mechanismus ist von der Stabilisierung des PI3K Komplexes durch ROS abhängig, was letztendlich zu einer PI3K Aktivierung am bakteriellen Phagosom führt.