Screening und Charakterisierung neuer Virulenzfaktoren des Lungenpathogens *Legionella pneumophila*

vorgelegt von
Diplom-Ingenieur
Enrico Siegbrecht

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin

zur Erlangung des akademischen Grades
- Dr.rer.nat. -
genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:
Vorsitzender: Prof.Dr. Jens Kurreck
1. Berichter: Prof.Dr. Antje Flieger
2. Berichter: Prof.Dr. Roland Lauster
3. Berichter: Prof.Dr. Vera Meyer
Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 10.01.2012

Berlin 2012
D 83

„Nicht der Beginn wird belohnt, sondern einzig und allein das Durchhalten."

Katharina von Siena

Meiner Tochter, Lenia.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen Menschen bedanken, die mich bei meiner Promotion unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Antje Flieger, zum einen für die Möglichkeit dieses interessante Thema zu bearbeiten und zum anderen für die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit, die konstruktiven Diskussionen, den wissenschaftlichen Freiraum und das angenehme Arbeitsklima.

Herrn Prof. Dr. Roland Lauster möchte ich sehr herzlich für die langjährige Betreuung dieser Arbeit von Seiten der Technischen Universität danken.

Bedanken möchte ich mich natürlich auch bei allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der NG5 bzw. des FG11-Legionellen für die tolle Arbeitsatmosphäre und die tatkräftige Unterstützung. Mit den Kollegen Dr. Philipp Auraß, Dr. Sangeeta Banerji, Dr. Jennifer Bender, Markus Broich, Ferda Ersöz, Dr. Stefanie Klar, Dr. Christina Lang, Birgit Pless, Dr. Elena Rastew und Kerstin Rydzewski hatte ich eine unvergessliche Zeit.

Allen voran möchte ich meiner Tochter Lenia, meiner Familie und meinen Freunden danken, die mein Leben erst komplett machen und die die Sonne auch an trüben Tagen aufgehen lassen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Christiana Siegbrecht und Ingolf Staron, die mich immer bei meinen Plänen unterstützt haben.

Jana Rudolph danke ich herzlich für das Korrekturlesen und all die sonstige Unterstützung.

INHALTSVERZEICHNIS

DANKSAGUNG III
INHALTSVERZEICHNIS IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS IX
1 Einleitung 1
1.1 Die Rolle von *Legionella pneumophila* als Krankheitserreger 1
1.2 Entdeckung von *L. pneumophila* 1
1.3 Mikrobiologie und Ökologie 1
1.4 Legionellose – Pathogenese, Diagnostik und Therapie 3
1.5 Epidemiologie und Prävention 4
1.6 Lebenszyklus und Virulenzfaktoren von Legionellen 5
1.7 Zytolytische Virulenzfaktoren intrazellulärer Pathogene 8
1.7.1 Zytolytische Faktoren von *L.pneumophila* 9
1.7.1.1 Bedeutung von zytolytischen Faktoren für den Lebenszyklus von *L. pneumophila* 9
1.7.1.2 Enzymatisch wirkende zytolytische Faktoren von *L.pn.* 10
1.7.1.3 Porenbildende zytolytische Proteine von *L.pn.* 12
1.7.2 Proteolytische Virulenzfaktoren 13
1.7.2.1 Bakterielle Proteasen als Virulenzfaktoren 13
1.7.2.2 Proteasen von *L. pneumophila* 16
1.7.2.3 Zinkmetalloprotease ProA von *L. pneumophila* 18
1.7.3 Ziel der Arbeit 21
2 Material 23
2.1 Laborausstattung 23
2.2 Spezielle Materialien 24
2.3 Chemikalien 24
2.4 Lipidsubstrate 26
2.5 Puffer und Lösungen 26
2.6 Enzyme und Standards 27
2.7 Analyse-Kits 28
2.8 Plasmide, Oligonukleotide, Bakterienstämme und Zellen 28
2.8.1 Verwendete Plasmide 28
2.8.2 Verwendete Oligonukleotide 30

2.8.3 Verwendete Bakterien und Zellen 33
2.9 Verwendete und erzeugte gentechnisch veränderte Organismen (GVO) 34
2.10 Kulturmedien für Bakterien und Zellen 38
2.11 Verwendete Software 40
3 Methoden 41
3.1 Anzucht von Bakterien 41
3.1.1 *Legionella pneumophila* 41
3.1.2 *E.coli* 41
3.1.3 Herstellung von Glyzerolgefrierkulturen 42
3.1.4 Anzucht von A549 Lungenepithelzell-, U937 Makrophagen- und *Acanthamoeba*-Zellkulturen 42
3.2 Isolierung von Nukleinsäuren 42
3.2.1 DNA-Isolierung 42
3.2.1.1 Präparative Reinigung genomischer DNA 42
3.2.1.2 Isolierung extrachromosomaler DNA 43
3.2.2 RNA-Isolierung 43
3.2.3 Fällung von Nukleinsäuren mittels Ethanol 43
3.2.4 Nukleinsäure-Gelelektrophorese 44
3.3 Modifikation von Nukleinsäuren 44
3.3.1 Verdau mit Restriktionsendonukleasen/Dephosphorylierung 44
3.3.2 Ligation von DNA-Fragmenten 45
3.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 45
3.3.4 Reverse Transkriptase–Polymerase Kettenreaktion 46
3.3.5 Sequenzierungs-Polymerase Kettenreaktion 47
3.4 Herstellung und Transformation von elektrokompetenten Zellen 48
3.4.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* 48
3.4.2 Herstellung elektrokompetenter *L. pneumophila* 48
3.4.3 Transformation von DNA 48
3.4.3.1 *E. coli* 49
3.4.3.2 *L. pneumophila* 49
3.5 Mutagenese von *L. pneumophila* 49
3.6 Konstruktion und Screening der *Legionella pneumophila* Genbank in *Escherichia coli* 50

3.6.1 Partialverdau genomischer DNA 50
3.6.2 Größenfraktionierung der Restriktionsfragmente mittels Saccharose-Gradienten-Ultrazentrifugation 50
3.6.3 Klonierung der Plasmide für die *L.pn.* Genbank in *E.coli* 51
3.6.4 Transformation des Ligationsansatzes 51
3.6.5 Anlegen von Glyzerolgefrierkulturen der Einzelklone 51
3.6.6 Screening der Genbank in *E.coli* 52
3.6.7 Identifizierung der *L.pn.* Philadelphia-1 Genfragmente in *E.coli*-Klonen 52
3.7 Screening der *L. pneumophila* Philadelphia-1 EZ-Tn5 Klonbank 52
3.7.1 Ermittlung des Transposoninsertionslokus im Chromosom von *L.pn.* Philadelphia-1 53
3.8 Hämolyseassay 54
3.9 Nachweis von Phospholipaseaktivität 55
3.9.1 Gewinnung von Zellpelletlysaten und Kulturüberständen 55
3.9.2 Verdau von Lipidsubstraten 55
3.9.3 Bestimmung der Menge an freien Fettsäuren 56
3.10 Koinfektion von *A. castellanii* Amöben, A549 Lungenepithelzellen und U937 Makrophagen mit *L. pneumophila* 56
3.10.1 Test der intrazellulären Vermehrungsfähigkeit in *A.castellanii* 56
3.10.2 Infektion von U937 Makrophagenzellen 57
3.11 Bestimmung der Minimalen Hemm Konzentration (MHK) 58
3.11.1 Bouillon-Makrodilutionsmethode 58
3.11.2 Epsilometertest (E-TEST) 59
3.12 Proteinanalytik 59
3.12.1 Bestimmung der Proteinkonzentration 59
3.12.2 Eindimensionale (1D) - SDS-PAGE 59
3.12.3 Coomassie-Färbung von Proteinen 59
3.12.4 Silberfärbung von Proteinen 60
3.12.5 Expression und Reinigung von Proteinen 60
3.13 Reinigung der Zinkmetalloprotease ProA aus dem Kulturüberstand .. 60
3.14 Bestimmung der Aktivität von ProA 60
3.15 Differenzielle 2D-Gelelektrophorese 61
3.16 Protease Substrat Assay (JPT) 62

3.17 Protease Peptide Microarray 62
3.18 PlaC Peptid-Microarray – Identifizierung der Schnittstellen von ProA in PlaC 63
4 Ergebnisse 64
4.1 Screeningverfahren zur Identifizierung neuer hydrolytischer Faktoren von *Legionella pneumophila* Philadelphia-1 64
4.2 Konstruktion einer Genbank von *Legionella pneumophila* Philadelphia-1 in *Escherichia coli* 65
4.2.1 Screening der *L.pn.* Philadelphia-1 Klonbank in *E.coli* auf hämolytische, lipolytische und proteolytische Aktivität 66
4.2.2 Identifizierung der für die hämolytische und proteolytische Aktivität verantwortlichen Gene in den gescreenten *E.coli* – Klonen 67
4.3 Screening der TN5-mutagenisierten Klonbank von *L.pn.* Philadelphia-171
4.3.1 Lokalisation der Tn5-Insertion 74
4.3.2 Replikationsfähigkeit von Mutanten mit reduzierter und erhöhter Aktivität auf den Screeningmedien in *Acanthamobaea castellanii* 81
4.3.3 Quantifizierung der hämolytischen Aktivität 83
4.3.4 Quantifizierung der lipolytischen Aktivität von Klonen mit reduzierter Aktivität auf Eigelbagar 85
4.3.5 Auswahl der Mutanten für weitere Analysen 86
4.4 Beschreibung und Charakterisierung von ausgewählten Mutanten 88
4.4.1 Mutante P5A1 - (*lpg2166*) 88
4.4.1.1 Replikation in U937 Makrophagen 90
4.4.1.2 Erzeugung weiterer *lpg2166* Mutanten 91
4.4.1.3 RT-PCR zur Überprüfung der Mutation 91
4.4.1.4 Phänotyp der neu generierten Mutanten 92
4.4.1.5 Überexpression von *lpg2166* in *L.pn.* Phil-1 und 130b führt zur Reduzierung der hämolytischen Aktivität und Attenuierung in *A.c.* 94
4.4.2 Mutante P5A2 - (*lpg1369*: *htpG*) 96
4.4.2.1 Erzeugung neuer *htpG*-Mutanten 99
4.4.2.2 Phänotyp der neu generierten *htpG*-Mutanten in *L.pn.* Phil-1 und *L.pn.* JR32 konnte nur partiell komplementiert werden 100
4.4.3 Mutante P8C2 - (*lpg0721*: RND efflux protein) 104

4.4.3.1 Erzeugung neuer *lpg0721* Mutanten in *L.pn.* Phil-1 und *L.pn.* JR32 108
4.4.3.2 Phänotyp der neu generierten Mutanten.....109
4.4.3.3 Vergleich der minimalen Hemmkonzentration von Ampicillin für *L.pn.* Wildtyp und *lpg0721* Mutante 111
4.4.4 Mutante P6C5 - (*lpg0467*: proA) 116
4.4.4.1 Vergleich Sekretome Wildtyp vs. *proA*-Mutante.....118
4.4.4.2 Protease Substrat Test (JPT) 122
4.4.5 Identifizierung putativer Schnittstellen von ProA im C-terminalen Bereich der sekretierten Phospholipase PlaC mittels eines Peptid-Micro-Arrays 126
5 Diskussion.....130
5.1 Screening der Genbank von *L.pn.* Philadelphia-1 in *E.coli* 130
5.2 Screening einer EzTn5-mutagenisierten *L.pn.* Philadelphia-1 Genbank 131
5.3 Quantifizierung der hämolytischen und lipolytischen Aktivität 135
5.4 Korrelation zwischen hydrolytischem Phänotyp der Mutanten und der Kolonisationsfähigkeit in *Acanthamobaea castellanii* 137
5.5 Auswahl der Mutanten zur weiteren Charakterisierung 139
5.6 *lpg2166* und sein Einfluss auf die Virulenz von *L. pneumophila* 139
5.7 Das Hitzeschockprotein HtpG und seine putative regulatorische Funktion auf Hydrolysom und Virulenz von *L.pneumophila*.....142
5.8 *lpg0721/0720*: Gene eines putativen Multidrug-Efflux-Systems mit hämolytischer Eigenschaft und Bedeutung für die Kolonisation von Amöben und Makrophagen.....145
5.9 Die sekretierte Zinkmetalloprotease ProA: Neue Ansätze zur Bedeutung dieses Proteins für die Virulenz von *L. pneumophila*.....150
ANHANG.....156
PUBLIKATIONSLISTE.....158
REFERENZEN.....159
ZUSAMMENFASSUNG 172
ABSTRACT.....173

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

% (v/v)	Volumenprozent pro Volumen
% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
A.c.	*Acanthamobae castellanii*
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
BCYE	*Buffered Charcoal Yeast Extract*
BMGY/BMMY	*Buffered Glycerol or Methanol-complex Medium*
BYE	*Buffered Yeast Extract*
bp	Basenpaare
°C	Grad Celcius
ca.	circa
CFU	*colony forming units* (Koloniebildende Einheiten)
1,2-DG	1,2-Dipalmitoylglyzerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
et al.	*et alias,* und andere
FKS	fötales Kälberserum
FFA	freie Fettsäuren
g	Gramm
GCAT	Glyzerophospholipid-Cholesterol Azyltransferase
h	Stunde
H2Obidest	bidestilliertes Wasser
IL-8	Interleukin-8
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
kDa	kilo-Dalton
L. pn.	*Legionella pneumophila*
***L. pn.* Phil-1**	*Legionella pneumophila* Philadelphia-1
LB	Luria-Bertani
LPLA	Lysophospholipase A
m	milli (10-3)
µ	mikro (10-6)
M	Molar
MALDI	Matrix-assistierte Laser-Desorption/Ionisation
Min	Minute
mRNA	*messenger* RNA
Mw	*molecular weight* (Molekulargewicht)
OD (in nm)	optische Dichte
ORF	*open reading frame* (offener Leserahmen)
PAGE	*Polyacrylamid gel electrophoresis*
pmol	Pikomol
PBS	*Phosphate Buffer Saline*
PFA	Paraformaldehyd
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pI	Isoelektrischer Punkt
ProA	Zinkmetalloprotease ProA = Msp (Major secreted protein)
PLA	Phospholipase A
PYG	*Peptone Yeast Extract Glucose*
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute*
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
SDS	Sodium Dodezyl Sulfat
SOB	*Super Optimal Broth*
SOC	Derivat von *Super Optimal Broth*
S/P	Verhältnis von Probe (Sample) zu Positivkontrolle
s.	Siehe
sek	Sekunde
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TPG	Tripalmitin
U	Units (Enzymaktivität)
UV	Ultra Violett
V	Volt
WT	Wildtyp
× g	ein Vielfaches der Erdbeschleunigung (g)
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Die Rolle von *Legionella pneumophila* als Krankheitserreger

1.2 Entdeckung von *L. pneumophila*

Im Jahre 1976 kam es in Philadelphia (USA) beim Veteranentreffen der „American Legion" zu einem, durch einen bis dato unbekannten Erreger verursachten, folgenschweren Ausbruch einer Pneumonie. Insgesamt wurden 221 Personen infiziert, von denen 34 an der Erkrankung verstarben (Diederen 2008). Nur 6 Monate nach dieser Epidemie präsentierten McDade und Shepard ein Bakterium als ätiologisches Agens, das nach den Erkrankten und der Lokalisation in der Lunge als *Legionella pneumophila* benannt wurde (McDade, Shepard et al. 1977). Rückblickend konnten etliche Fälle dieser Lungenentzündung, der Legionärskrankheit, unbekannten Ursprungs mit Legionellen in Verbindung gebracht werden. Der bisher älteste beschriebene Fall geht auf das Jahr 1943 zurück. Dabei konnte die Spezies *L. micdadei* (früher als Tatlock-Stamm bezeichnet) als Erreger ermittelt werden. Der erste *L. pneumophila* Stamm wurde zwar 1947 isoliert, konnte aber erst 1979 bestimmt werden (McDade, Shepard et al. 1977; Hebert, Moss et al. 1980). Neben schwerwiegenden Pneumonien ist dem Erreger eine zweite, mildere Verlaufsform einer Infektion zuzuweisen, das sogenannte Pontiac Fieber. Die selbstlimitierende, Grippe ähnliche Krankheit, ohne Anzeichen einer Lungeninfektion, wurde nach dem Ausbruch einer fieberhaften Erkrankung von 144 Personen in Pontiac (Michigan) im Jahre 1968 benannt (Glick, Gregg et al. 1978). Ob es sich beim Erreger des Pontiac Fiebers allerdings um „lebendige" Legionellen und nicht um die Inhalation toter Mikroorganismen, assoziierter Endotoxine und einer nur geringen Dosis an *Legionella* Bakterien handelt, ist nach wie vor umstritten (Edelstein 2007).

1.3 Mikrobiologie und Ökologie

Wie von McDade, aber auch von Benson beschrieben, handelt es sich bei Legionellen um Gram negative, stäbchenförmige und obligat aerobe Bakterien, die polar oder lateral begeißelt sind (McDade, Shepard et al. 1977; Benson and Fields 1998). Gegenwärtig sind über 50 verschiedene Spezies des Genus *Legionella* beschrieben, von denen allein *L. pneumophila* in mindestens 15 Serogrup-

pen unterteilt werden kann (Feeley, Gibson et al. 1979; Benson and Fields 1998; Diederen 2008). Von diesen sind die Serogruppen 1, 4 und 6 am häufigsten mit einer Legionelleninfektion assoziiert. Neben *L. pneumophila*, verantwortlich für ca. 90% der Infektionen, wurden bislang 19 weitere Spezies als humanpathogen eingestuft (Muder and Yu 2002). Eine repräsentative, USA-weite Studie von 508 bestätigten Kulturen ambulant erworbener („community-acquired pneumonia", CAP) Legionärskrankheit belegte, dass 91,5% der Fälle dem Erreger *L. pneumophila*, 3,9% *L. longbeachae*, 2,4% *L. bozemanii* und weitere *L. micdadei*, *L. feeleii*, *L. dumoffi*, *L. wadsworthii* und *L. anisa* zugeordnet werden konnten (Yu, Plouffe et al. 2002). Wasser stellt das hauptsächliche Reservoir für Legionellen dar. Neben Süßwasserquellen, wie z.B. Seen, spielen dabei vor allem von Menschenhand erschaffene Wasserreservoirs, so z.B. Wasserleitungen, Klimaanlagen, Kühltürme, Whirlpools und sogar Gemüsebefeuchtungsanlagen eine Rolle (Mouchtouri, Goutziana et al.; Fliermans, Cherry et al. 1981; Mahoney, Hoge et al. 1992; Steinert, Ockert et al. 1998; Benkel, McClure et al. 2000). Weiterhin wurden atmungsunterstützende Apparaturen mit nosokomial erworbenen Legionellenpneumonien in Verbindung gebracht (Woo, Goetz et al. 1992). Letztendlich stellen alle kontaminierten Wasserquellen, die Aerosole erzeugen können, potentielle Ausbruchsquellen dar, da diese neben einigen Fällen an Aspiration den Hauptübertragungsweg der Bakterien repräsentieren (Stout and Yu 1997).

Legionellen stellen hohe Anforderungen an ihr Nährmedium und benötigen Aminosäuren als primäre Energiequelle. Des Weiteren zeigen sie sich anfällig gegenüber freien Sauerstoffradikalen, weswegen bei der Anzucht dem Medium Aktivkohle zugesetzt wird (Hoffman, Pine et al. 1983). Daraus ist ein Kulturmedium hervorgegangen, bestehend aus Hefeextrakt-Aktivkohleagar, L-Cysteinhydrochlorid, Eisenpyrophosphat, ACES-Puffer und α-Ketoglutarat mit einem finalen pH Wert zwischen 6,85 und 6,95 (Feeley, Gibson et al. 1979; Pasculle, Feeley et al. 1980; Edelstein 1981). Diese Ansprüche an komplexe Nährstoffe sind in den vielfältigen Reservoirs, in denen Legionellen vorzufinden sind, nur sehr selten allgegenwärtig. Tatsächlich wurde belegt, dass sich die Bakterien vor allem im nährstoffreichen intrazellulären Raum in freilebenden Protozoen vermehren. Bisher wurden mindestens 15 verschiedene Spezies an Amöben, zwei begeißelte Protozoen und ein Schleimpilz (eine Amöbenunterart, hier *Dictyostelium*) als Replikationsort nachgewiesen (Rowbotham 1986; Fields 1996; Hagele,

Kohler et al. 2000; Shadrach, Rydzewski et al. 2005). Weiterhin sind Spezies beschrieben, die sich ausschließlich in Amöben kultivieren lassen und demnach zuerst als „*Legionella-like amoebal pathogens*" (LLAPs) bezeichnet, später aber immer wieder dem Genus *Legionella* zugeordnet werden konnten (Adeleke, Fields et al. 2001; La Scola, Birtles et al. 2004). Eine zusätzliche Quelle komplexer Nährstoffangebote und somit ein möglicher Vermehrungsort der Bakterien außerhalb von Wirtszellen stellt der Biofilm dar. Legionellen konnten bereits in solchen Mikroorganismen-Konglomeraten nachgewiesen werden (Rogers and Keevil 1992). Eine Studie von Murga und Mitarbeitern belegte die Persistenz der Legionellen in Abwesenheit von Wirtszellen, eine Vermehrung fand aber nur nach Zugabe von *Hartmanella vermiformis* statt (Murga, Forster et al. 2001). Somit ist bis heute umstritten, ob sich die Bakterien auch außerhalb ihres Wirtes unter Umweltbedingungen vermehren können. Neben dem Vorhandensein von Protozoen ist die Umgebungstemperatur für eine erfolgreiche Vermehrung der Legionellen ausschlaggebend. Trotz des relativ breiten Spektrums zwischen 25 und 42°C replizieren sie bei einer Optimaltemperatur von ca. 35°C (Katz and Hammel 1987). Dies unterstützt die These, dass die meisten Legionellosefälle auf durch Menschen hergestellte Wasserquellen zurückzuführen sind. Bei diesen ist die durchschnittliche Temperatur höher als unter natürlichen Bedingungen. Zudem ist bewiesen, dass sich die Bakterien bei höheren Temperaturen besser intrazellulär replizieren können (Smith-Somerville, Huryn et al. 1991). Dadurch kommt es zu einem Anstieg und zur Freisetzung der Bakterien, welches die Infektionslast der jeweiligen putativen Quellen deutlich erhöht.

1.4 Legionellose – Pathogenese, Diagnostik und Therapie

Manifestationen einer Legionärskrankheit können sowohl ambulanten oder nosokomialen, aber auch Reise assoziierten Ursprungs sein (Levin 2009). Sporadische oder auch epidemische Infektionen treten vor allem in den Sommer- und Herbstmonaten auf, da hier das Wachstum der Erreger durch warme Temperaturen gefördert wird. Durch Inhalation kontaminierter Aerosole gelangen die Erreger in die Lunge und replizieren in Makrophagen und Zellen des Epithelsystems (Swanson and Hammer 2000). Die Schwere des Infektionsverlaufs, hängt neben der Quantität an eingeatmeten Erregern auch von dem Immunstatus des Patienten ab. Ältere Menschen, Suppression der respiratorischen Leistung und des Immunsystems, starkes Rauchen, aber auch das männliche Geschlecht stellen Risi-

kofaktoren für eine Legionelleninfektion dar (Broome and Fraser 1979; Marston, Lipman et al. 1994). Zudem wurde festgestellt, dass amöbenpassagierte Legionellen ein höheres Virulenzpotential besitzen als in Medium angezogene Bakterien und die Ko-Inokulationen beider Organismen (Legionellen + Amöben) schwerwiegendere Erkrankungen nach sich ziehen (Brieland, McClain et al. 1996; Cirillo, Cirillo et al. 1999). Anhand klinischer Symptome ist es nicht möglich, eine Legionellenpneumonie von einer durch Pneumococcen ausgelösten Lungenentzündung zu unterscheiden. Unspezifische Symptome, wie z. B. Fieber, Übelkeit, Appetitlosigkeit und Kopfschmerzen oder auch Durchfall und mentale Verwirrtheit, sind häufig bei der Legionärskrankheit feststellbar (Broome and Fraser 1979; Stout and Yu 1997). Hyponatriämie (ein zu niedriger Natriumspiegel im Blut) und alveoläre Infiltrate werden jedoch wesentlich häufiger als bei anderen Pneumonien diagnostiziert (Macfarlane, Miller et al. 1984; Stout and Yu 1997). Der Nachweis einer Legionelleninfektion geschieht in erster Linie durch Kultivierung der Bakterien. Zwar sind nicht alle Spezies auf diese Weise detektierbar, doch erlaubt die Methode, bei Zugabe spezieller Farbstoffe, die parallele Diagnose verschiedenster Legionellen (Muder, Yu et al. 1983). Neben serologischer Testung, Gen-spezifischen PCRs und direkter Fluoreszenz-Antikörper Färbung hat sich der Urin-Antigen-Test als Detektionsmethode herauskristallisiert (Plouffe, File et al. 1995). Dieser reagiert zwar fast ausschließlich mit *L. pneumophila* der Serogruppe 1, doch da diese für bis zu 90% der Legionellosen verantwortlich ist, gilt er heute als zuverlässige diagnostische Methode (Fields, Benson et al. 2002; Helbig, Bernander et al. 2002). Die Legionärskrankheit ist durch Antibiotikagabe heilbar. Durch verspäteten Beginn der Therapie steigt die Mortalitätsrate jedoch signifikant an (Heath, Grove et al. 1996). Daher wird empfohlen, in schwerwiegenden Pneumoniefällen ein gegen Legionellen gerichtetes Antibiotikum, auch ohne Legionellendiagnostik, in die Behandlung mit einzuschließen. Diese könnte Makrolide, Quinolone, Rifampicin oder auch Tetrazykline beinhalten (Stout and Yu 1997). Bis zum heutigen Datum ist noch kein multi-resistenter Legionellenstamm aufgetreten.

1.5 Epidemiologie und Prävention

Das Robert Koch-Institut berichtete in seinem infektionsepidemiologischen Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2009 von insgesamt 503 Fällen einer Legionelleninfektion in Deutschland (2009). Das entspricht einer bundesweiten Inzi-

denz von 0,6 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner (Vorjahr: 0,6). Von insgesamt 79,1% der gemeldeten Fälle konnten 97,0% *L. pneumophila*, die restlichen 3,0% anderen *Legionella* Spezies zugeordnet werden. Nur 39,1% der Infektionen mit *L. pneumophila* wurde subtypisiert und konnte zu insgesamt 78,8% als Vertreter der Serogruppe 1 definiert werden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Zahl der tatsächlichen Legionelleninfektionen die der gemeldeten deutlich übersteigt. Nach Angaben des Kompetenznetzwerks für ambulant erworbene Pneumonien („CAPNETZ") wurde bei ca. 4% der insgesamt 2503 teilnehmenden Patienten eine Legionellenpneumonie festgestellt (von Baum, Ewig et al. 2008). Dies würde, Hochrechnungen zur Folge, zwischen 15.000 und 30.000 Fälle sporadischer Lungenentzündungen bedeuten, die auf Legionellen zurückzuführen sind. Eine Schutzimpfung wird bis dato nicht angeboten. Um den Bakterientiter nach Trinkwasserverordnung in öffentlichen Gebäuden (<100 CFU/100ml) so gering wie möglich zu halten, wurden folgende Präventionsmaßnahmen entwickelt: Erhitzen des Wassers (70-80°C), Kupfer-Silber-Ionisationsbehandlung und Hyperchlorierung, wobei von letzterem wegen der an Wasserleitungen entstehenden Korrosionsschäden vermehrt Abstand genommen wird (Stout and Yu 1997; Muder and Yu 2002).

1.6 Lebenszyklus und Virulenzfaktoren von Legionellen

Rowbotham bemerkte erstmalig im Jahre 1986, dass sich der intrazelluläre Lebenszyklus von *Legionella* in zwei unterschiedliche Phasen gliedert (Rowbotham 1986). Dies trifft auch auf extrazelluläre, in Medium kultivierte Bakterien zu (Byrne and Swanson 1998). Durch eine Verknappung des Nährstoffangebotes an Aminosäuren akkumulieren die Zellen das Alarmon ppGpp und treten von dem als „replikative Phase" bezeichneten Zustand in die sogenannte „transmissive Phase" über (Hammer and Swanson 1999). Zellen dieser Phase zeichnen sich phänotypisch durch Natriumsensitivität, Zytotoxizität, osmotische Resistenz und der Fähigkeit, Phago-Lysosomfusionen zu entgehen, aus (Swanson and Hammer 2000). Bei Kontakt mit einer Wirtszelle kommt es zur Aufnahme der Legionellen. Diese erfolgt größtenteils nach dem Mechanismus der „*coiling*" Phagozytose, bei dem Pseudopodien die Bakterienzelle wie eine Spindel umschließen (s. Abb. 1.1, (Horwitz 1984)), sie kann aber auch auf konventionelle Weise geschehen (Rechnitzer and Blom 1989).

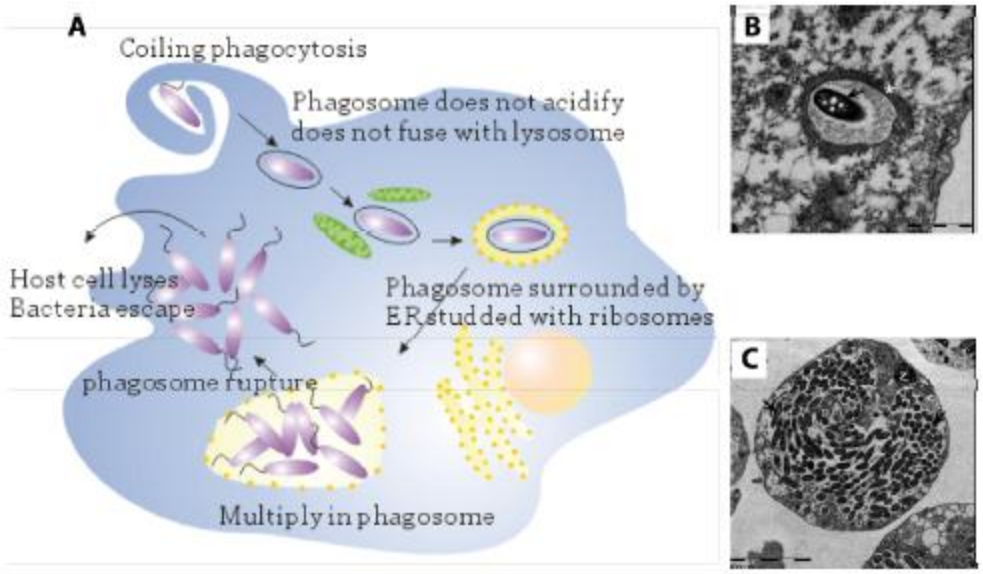


Abbildung 1-1: Übersicht des intrazellulären Infektionszyklus' von Legionellen.
Dargestellt sind die verschiedenen Stadien einer Wirtszellinfektion durch *Legionella* Bakterien (A). Nachdem die Erreger mittels Phagozytose in die Wirtszelle aufgenommen wurden (B), verhindern sie die Phago-Lysosomfusion und replizieren in einem eigens modellierten Kompartiment, der *Legionella*-enthaltenen Vakuole (C). Nach Beendigung der Vermehrung treten die Bakterien in die transmissive Phase über. Durch Lyse der Wirtszellen werden die flagellierten Legionellen entlassen, bereit einen neuen Infektionszyklus zu starten. Bildquellen: A) http://microbewiki.kenyon.edu/images/a/a0/Legionella.png. B+C)(Flieger 2003).

Die dafür notwendige Adhäsion an die Wirtszelle kann durch das „*major outer membraneprotein*" (MOMP), gebunden an den Komplementrezeptor C3, vermittelt werden (Bellinger-Kawahara and Horwitz 1990). Da sich dieser jedoch nicht auf Protozoen befindet, werden komplementunabhängige Mechanismen, wie z.B. Lektinbindung (in Protozoenmembran) oder Typ IV Pili induzierte Adhäsion, diskutiert (Venkataraman, Haack et al. 1997; Stone and Abu Kwaik 1998). Nicht ausschlaggebend für die Adhäsion, aber doch für eine gesteigerte Aufnahme ist das Typ IVB Sekretionssystem, welches die Schlüsselrolle der Virulenz von *Legionella pneumophila* übernimmt (Hilbi, Segal et al. 2001). Das System wird von insgesamt 25 Genen des *icm/dot* Komplexes (*intracellular multiplication/defective for organelle trafficking*) kodiert und ist in der Lage, sowohl DNA als auch eine enorme Anzahl an Proteinen in Wirtszellen zu injizieren (Segal, Purcell et al. 1998; Vogel, Andrews et al. 1998; Franco, Shuman et al. 2009). Bis dato sind mehr als 300 verschiedene Effektorproteine beschrieben (Hubber and Roy 2010; Jermy 2011). Damit kodieren ca. 10% der offenen Leseraster des *L. pneumophila* Genoms für Effektoren des Typ IVB Sekretionssystems. Es zeigte sich, dass das System an sich für die intrazelluläre Vermehrungsfähigkeit essen-

tiell ist, die meisten Effektoren alleine aber keinen Einfluss auf die Viabilität der Bakterien im Wirtsorganismus ausüben (Berger, Merriam et al. 1994; Roy, Berger et al. 1998; Nagai, Kagan et al. 2002; Conover, Derre et al. 2003; Kubori, Hyakutake et al. 2008). Eine Gemeinsamkeit der Effektoren liegt in der Manipulation der Wirtszelle zur Etablierung einer replikativen Nische, der *Legionella*-enthaltenen Vakuole (*Legionella-containing vacuole* = LCV) (Jermy 2011). Diese weist eine besondere Morphologie auf und fusioniert vorerst nicht, wie durch das endozytotische Netzwerk vorgegeben, mit säurehaltigen Lysosomen (Horwitz 1983; Horwitz 1983). Die so verhinderte Degradation sichert das Überleben des Erregers. Die Bildung der spezialisierten Vakuole beginnt schon 5min nach erfolgter Phagozytose der Bakterien. In einem Zeitraum von ca. 2h binden vermehrt, dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) entstammende, Vesikel und auch Mitochondrien an der Phagosomenoberfläche und hüllen diese bis zu 98% ein (Tilney, Harb et al. 2001; Robinson and Roy 2006). Im Anschluss erfolgen die Anlagerung von Ribosomen und die Veränderung der ursprünglichen Plasmamembran in eine ER-ähnliche Struktur. Die Abschottung der LCV durch Vesikel und Ribosomen wurde als möglicher Mechanismus zur Verhinderung der Phago-Lysosomfusion diskutiert, konnte aber experimentell nicht belegt werden, da z.B. Mutanten im *sidC* Gen oder auch *L. micdadei* kein ER rekrutieren, sich aber intrazellulär vermehren können (Gao, Susa et al. 1999; Ragaz, Pietsch et al. 2008). Dies wurde durch *icmS* oder *icmW* Mutanten bestätigt, die zur Anlagerung von ER-Vesikeln befähigt sind, trotz allem aber einer Fusion der LCV mit Lysosomen nicht entgehen können (Coers, Kagan et al. 2000). Für die Rekrutierung vesikulärer Partikel oder Störung des Transportweges wurde eine Reihe Typ IVB sekretierter Proteine beschrieben (Bruggemann, Cazalet et al. 2006; Franco, Shuman et al. 2009; Ge and Shao 2011; Jermy 2011) und ihr Mechanismus und eukaryotische Interaktionspartner im Detail untersucht. Zu ihnen gehören die Guaninnukleotid- Austauschfaktoren (GEFs) RalF und SidM/DrrA, die durch Bindung an die kleinen GTPasen ARF und Rab1 den vesikulären Transport umleiten (Fliermans, Cherry et al. 1981; Nagai, Kagan et al. 2002; Machner and Isberg 2006; Murata, Delprato et al. 2006). Neben der Beeinflussung sekretorischer Wege wurden andere Effektorproteine wie SidF und SdhA mit der Inhibition bzw. dem verspäteten Auslösen von Apoptose in Verbindung gebracht (Laguna, Creasey et al. 2006; Banga, Gao et al. 2007). Die LCV wird solange aufrechterhalten, bis die Legionellen ihre

replikative Phase abgeschlossen haben und Nährstoffe knapp werden. Mit Übergang in die transmissive Phase kommt es durch Expression zytolytischer Faktoren, wie IcmT oder durch einen nichtzytolytischen Weg, vermittelt durch LepA und LepB, zum Austritt der Bakterien aus ihrer Wirtszelle (Alli, Gao et al. 2000; Molmeret, Alli et al. 2002; Chen, de Felipe et al. 2004). Interessanterweise zeigen sich Legionellen dieser Phase neben den bereits erwähnten Merkmalen auch säureresistent. Dies ist notwendig, da Phagosomen bestimmter Zelltypen trotz anfänglicher Blockierung der Lysosomenfusion nach 12 bis 24h Infektionszeit lysosomale Marker rekrutieren und eine Absenkung des pH Wertes aufweisen (Sturgill-Koszycki and Swanson 2000). Die nun ausgetretenen Bakterien sind zudem flagelliert und somit in der Lage, neue Wirtszellen zu erreichen und diese als neue Replikationsnische auszubeuten. Neben den Effektoren und ihrem Typ IVB Sekretionssystem sind weitere Virulenzfaktoren von *L. pneumophila* beschrieben worden. Zu diesen zählen der „*macrophage infectitvity potentiator*" Mip und das Lsp Typ II Sekretionssystem, welches unter anderem auch hydrolytische Enzyme, wie z. B. Proteasen und Phospholipasen, transportiert (Cianciotto, Eisenstein et al. 1990; Banerji, Aurass et al. 2008; Rossier, Dao et al. 2009). Da es Ziel dieser Arbeit war mit Hilfe eines einfachen und robusten Screeningsystem neue zytolytisch und hydrolytisch wirkende Faktoren von *Legionella* zu identifizieren und deren Einfluss auf die Virulenz von *L. pneumophila* näher zu charakterisieren, werden in den folgenden Abschnitten die Reaktionsmechanismen und Einflüsse zytolytischer und hydrolytischer Proteine auf die Pathogenität von Bakterien näher erläutert.

1.7 Zytolytische Virulenzfaktoren intrazellulärer Pathogene

Nach der Definition handelt es sich bei Zytolysinen um Substanzen, die Zellen zum Teil oder komplett zerstören können. Die Art und Weise wie die Zerstörung der Zelle, die auch als Lyse bezeichnet wird, durch das Zytolysin induziert wird, ist sehr vielfältig. Die Einteilung von Zytolysinen erfolgt oft gemäß des Zelltyps welchen sie zerstören. So werden Zytolysine, die in der Lage sind Erythrozyten zu lysieren, häufig als Hämolysine bezeichnet. Da Hämolysine, oft auch auf andere Zelltypen zytolytisch wirken, werden *in vitro* Hämolyseassays häufig zum Auffinden neuer Zytolysine verwendet.

Zytolysine sind allgemein wichtige Virulenzfaktoren pathogener Organismen. Basierend auf ihrer Wirkungsweise werden Zytolysine in drei Gruppen unterteilt (Rowe and Welch 1994): (i) Zytolysine, die durch enzymatische Zerstörung der Wirtszellmembran zur Lyse der Zielzelle führen, (ii) Hämolysine, die als Detergenzien auf die Wirtszellmembran wirken und (iii) porenbildende Zytolysine, die Poren in die Zellmembran der Wirtszelle insertieren. Der Benefit von Zytolysinen für ein Pathogen kann sehr vielfältig sein. So können sie z.B. durch Lyse von Erythrozyten (Hämolyse), intrazelluläres Eisen freisetzen und somit das eigene bakterielle Wachstum stimulieren. Darüber hinaus können Zytolysine durch Zerstörung von Gewebezellen die Disseminierung von Pathogenen in Gewebe und Organe ermöglichen. Außerdem können Zytolysine durch Destruktion von Zellen des Immunsystems eine Schädigung der Abwehrmechanismen des Wirtsorganismus verursachen oder wie bei *L. monocytogenes*, durch Lyse von phagozytischen Kompartimenten ein Überleben der Bakterien innerhalb von Makrophagen gewährleisten (Schnupf and Portnoy 2007).

1.7.1 Zytolytische Faktoren von *L.pneumophila*

1.7.1.1 Bedeutung von zytolytischen Faktoren für den Lebenszyklus von *L. pneumophila*

Wie schon erwähnt, sind die Lyse und der Austritt aus der Wirtszelle für intrazelluläre Pathogene wichtiger Bestandteil ihres Lebenszyklus. Dies trifft auch auf *L. pneumophila* zu. Nach Beendigung der intrazellulären Replikation (replikative Phase) kommt es zur Lyse der Wirtszelle und zum Austritt der Bakterien (transmissive Phase). Die Mechanismen welche die Lyse und den Austritt aus der Wirtszelle induzieren sind bislang nicht eindeutig bekannt. Eine Vermutung ist, dass allein die physikalische und metabolische Last, die durch die Vielzahl der Bakterien innerhalb der Zelle verursacht wird ausreicht, um die Wirtszellen durch unspezifische Mechanismen abzutöten (Alli, Gao et al. 2000). Da im Genom von *L. pneumophila* eine große Anzahl zytolytischer Proteine kodiert ist, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass diese auch bei der Lyse der Wirtszelle involviert sind. Dies bestätigen auch die Untersuchungen mehrerer Gruppen die zeigen, dass die Fähigkeit von *L.pneumophila* aus der replikativen Vakuole ins Zytoplasma zu gelangen durch Porenbildung und Lyse der Membran hervorgerufen wird (Katz and

Hashemi 1982; Kirby, Vogel et al. 1998; Alli, Gao et al. 2000; Molmeret and Abu Kwaik 2002). Neben dem Austritt aus der Wirtszelle, können zytolytische Faktoren auch noch an anderen Stellen des Lebenszyklus von *L. pneumophila* von Bedeutung sein. Das Potenzial von *L. pneumophila* auch nicht professionell phagozytierende Zelltypen wie A549 Lungenepithelzellen, CHO-K1 und HeLA-Zellen zu invadieren (Dreyfus 1987; Garduno, Garduno et al. 2002; Newton, Sansom et al. 2008) zeigt, dass es Faktoren geben muss, die *L. pneumophila* dazu befähigen aktiv in die Wirtzelle zu gelangen. Dazu könnten auch zytolytische Faktoren gehören, wie z.B. Phospholipasen, welche durch Zerstörung natürlicher Barrieren, wie z.B. dem Lungensurfactant, die Invasion von *L.pneumophila* unterstützen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass proteolytisch wirkende Faktoren in der Lage sind die extrazelluläre Matrix zu beschädigen (Baskerville, Conlan et al. 1986). Die dadurch entstehenden Lücken im Zellverband ermöglichen dem Pathogen die Disseminierung in tiefere Gewebsschichten. Die Gewinnung von Nährstoffen während des Infektionszyklus stellt eine weitere putative Funktion von zytolytischen Faktoren von *L. pneumophila* dar. *In vitro* werden von *L. pneumophila* Aminosäuren als Kohlenstoffquelle präferiert (Tesh and Miller 1981; Tesh, Morse et al. 1983). Dass diese auch für das intrazelluläre Überleben wichtig sind, konnten Sauer et al. zeigen, in dem sie den als phagosomalen Transporter bezeichneten PhtA, welcher einen Threonin-Transporter darstellt, mutierten. Die *phtA*-Mutanten waren nicht mehr in der Lage sich in Makrophagen zu replizieren (Sauer, Bachman et al. 2005). Aufgrund dieser Befunde könnten zytolytisch wirkende Proteine, wie z.B. Proteasen, nicht nur für die Nährstoffgewinnung in ubiquitären Habitaten, sondern auch *in vivo* eine Rolle spielen.

Nachdem im letzten Abschnitt kurz die Bedeutung von zytolytischen Faktoren für den Lebenszyklus von *L.pneumophila* beleuchtet wurde, werden nachfolgend einige bekannte zytolytische Faktoren und deren Bedeutung erörtert.

1.7.1.2 Enzymatisch wirkende zytolytische Faktoren von *L.pn.*

L. pneumophila besitzt ein großes Repertoire an sekretierten und zellassozierten enzymatisch wirkenden Proteinen, die auch putative Zytolysine darstellen könnten. Eine Gruppe dieser Proteine stellen die sekretierten Proteasen dar. Auf diese wird später noch ausführlich eingegangen. Eine andere Gruppe von putativen

Zytolysinen bilden lipolytische Enzyme, zu denen auch Phospholipasen zählen. Phospholipasen sind Esterasen, die die Esterbindungen von Phospholipiden hydrolysieren. Da Phospholipide den Hauptbestandteil von biologischen Membranen darstellen, können Phospholipasen stark zytotoxisch wirken, indem sie die Integrität von Membranen durch eben besagte Hydrolyse der Phospholipide oder Porenbildung stark schädigen können. Flieger et al. konnten über biochemische Reinigungsmethoden von *L. pneumophila* Kulturüberstand mit anschließender N-terminaler Sequenzierung, über Sequenzvergleiche von bekannten Phospholipasen mit den verfügbaren Genomdaten von *Legionella* und über Screening auf hämolytische Faktoren von *L. pneumophila* mindestens 15 verschiedene Phospholipase A (PLA)-Proteine identifizieren(Lang and Flieger 2011). Diese konnten drei Gruppen zugeordnet werden. Die erste Gruppe umfasst die GDSL-Hydrolasen, PlaA, PlaC und PlaD. GDSL-Hydrolasen weisen 5 aufeinander folgende homologe Regionen auf, die als Blöcke I-V bezeichnet werden. Das GDSL Motiv, welches das nukleophile Serin enthält, befindet sich im Block I. GDSL-Hydrolasen unterscheiden sich in wesentlichen strukturellen Merkmalen von den ausgiebig erforschten α/β-Hydrolasen. Zwei dieser Gruppe zugehörige Phospholipasen von *L.pn*., PlaA und PlaC, besitzen Sec-Signalpeptide und werden vom Typ II Sekretionssystem Lsp sekretiert. PlaA ist die wichtigste sekretierte LPLA und wird für die Detoxifizierung von toxischen Lysophospholipiden benötigt (Flieger, Neumeister et al. 2002). PlaC besitzt zusätzlich zur PLA/LPLA-Aktivität eine Azyltransferaseaktivität, die es ermöglicht die abgespaltenen Fettsäuren an Cholesterol oder Ergosterol zu binden (Lang C. 2011). Diese Modifikation von Cholesterol, welches ein Hauptbestandteil von eukaryotischen Membranen darstellt, kann die Integrität dieser verändern und somit zur Schädigung der Zelle führen. Eine weitere stark hämolytisch wirkende Phospholipase wurde von Heuner et al. durch das Screening einer *L. pneumophila* Genombank in *E. coli* mit Humanerythrozyten gefunden (Flieger, Rydzewski et al. 2004). Diese als PLA Protein B (PlaB) bezeichnete, membranassoziierte Lipase ist hauptsächlich für die zellassoziierte Phospholipase A- und Lysophospholipase A-Aktivität verantwortlich. Darüber hinaus besitzt PlaB eine starke zellkontaktabhängige hämolytische Aktivität. PlaB lässt sich keiner bisher bekannten Gruppe von Lipasen zuordnen. Durch die Analyse des katalytischen Zentrums konnte Bender et al. zeigen, dass PlaB eine neue Gruppe von Phospholipasen repräsentiert (Bender, Rydzewski et

al. 2009). Anders als bei den meisten bekannten eu- und prokaryotischen Lipasen oder Esterasen, die die charakteristischen Motive, GXSGX oder GDSL aufweisen (Jaeger, Ransac et al. 1993; Arpigny and Jaeger 1999), ist das aktive Serin in PlaB in das THSTG-Motiv eingebettet. Trotz der starken lipolytischen Aktivität, ist PlaB für die intrazelluläre Replikation in Protozoen und Monozyten, wie Makrophagen, nicht essentiell. *In vivo* Experimente im Meerschweinchen zeigten jedoch, dass die Mutation von *plaB* dazu führt, dass die Replikation in der Lunge sowie die Disseminierung zur Milz reduziert ist. Die histologische Betrachtung von Gewebe zeigte darüber hinaus eine verringerte Entzündung und Zerstörung des Lungengewebes (Schunder, Adam et al. 2010). Anhand dieser Ergebnisse ist PlaB zu den Virulenzfaktoren von *L. pneumophila* zu zählen. Durch Genomanalyse konnten neben den GDSL-Lipasen und PlaB elf weitere Phospholipasen A identifiziert werden, die eine Homologie zur eukaryotischen Phospholipase A aufweisen. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit zum Kartoffelprotein „Patatin" werden diese als Patatin ähnliche Proteine (PLP) bezeichnet. Das am beste charakterisierte Patatin ähnliche Protein von *L.pneumophila* ist VipD/PatA (VanRheenen, Luo et al. 2006). VipD ist ein Effektorprotein des Typ IVB Sekretionsapparates und beeinflusst den Vesikeltransport innerhalb der Wirtszelle (Shohdy, Efe et al. 2005). Dem Patatin PatA, welches zusammen mit der putativen 2-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase BdhA exprimiert wird, konnte durch Aurass et al. ein Einfluss auf die intrazelluläre Vermehrung in Amöben und Makrophagen zu gewiesen werden (Aurass, Pless et al. 2009).

1.7.1.3 Porenbildende zytolytische Proteine von *L.pn.*

Eine große Familie von porenbildenden zytolytischen Proteinen, die in einer Vielzahl von pathogenen Bakterien vorkommen, stellen die RTX (*repeats in structural toxin*)-Proteine dar. Als Prototyp dieser Familie gilt das Hämolysin (HlyA) von *Escherichia coli* (Ludwig 1996). Es wird in der Form eines inaktiven Protoxins (Pro-HlyA, 110kDa) synthetisiert und posttranslational mit Hilfe eines spezifischen, zytoplasmatischen *E. coli*-Proteins (HlyC) in das aktive Toxin umgewandelt. Die Sekretion des Hämolysins aus der *E. coli*-Zelle erfolgt mit Hilfe eines spezifischen Transportapparats, der aus zwei integralen Proteinen der bakteriellen Zytoplasmamembran (HlyB und HlyD) sowie dem in der äußeren Membran lokalisierten TolC zusammengesetzt ist. HlyA wirkt zytotoxisch und zytolytisch

auf eine Vielzahl von Human- und Animalzellen, indem es Poren in der Zytoplasmamembran dieser Zellen erzeugt. Diese Poren können zu funktionalen Störungen in den angegriffenen Zellen führen bzw. eine osmotische Zelllyse verursachen (Ludwig, Garcia et al. 1996; Ludwig and Goebel 2000). *L. pneumophila* besitzt ebenfalls ein RTX-Protein, welches durch das Gen *rtxA* kodiert wird. Dieses wurde während eines Screens, der Gene mit Einfluss auf die Invasion von Monozyten identifizieren sollte, von Cirillo et al. gefunden (Cirillo, Lum et al. 2000). In weiterführenden Experimenten mit einer *rtxA*-Mutante, konnte die Gruppe zeigen, dass RtxA neben dem Einfluss bei der Invasion von Monozyten, auch in Adhärenz, Porenbildung und Zytotoxizität von *L.pneumophila* involviert ist. Darüber hinaus ist eine *rtxA*-Mutante auch in der intrazellulären Replikation in Monozyten sowie in der Virulenz im Mausmodell attenuiert (Cirillo, Bermudez et al. 2001). Dass *rtxA* einen wichtigen Virulenzfaktor darstellt, wird durch die Tatsache unterstützt, dass das *rtxA*-Gen überwiegend in *Legionella*-Spezies vorkommt, die mit humanen Erkrankungen in Verbindung stehen (Cirillo, Yan et al. 2002). Auch in Amöben, dem natürlichen Habitat von *Legionellen*, hat *rtxA* einen wesentlichen Einfluss auf die Adhärenz und die Invasion.

Ein anderes putatives porenbildendes Toxin von *L.pneumophila* ist das von Molmeret postulierte Rib toxin. Ausschlaggebend für dieses Postulat war ein Screening von 5000 *L. pneumophila* Transposoninsertionsmutanten, durch Alli et al., die fünf Mutanten identifizierten, welche zwar in der Lage waren sich intrazellulär in U937 Makrophagen zu vermehren, aber beim Austritt aus der Wirtszelle stark attenuiert waren. Diese wurden als *rib*-Mutanten (*release of intracellular bacteria*) bezeichnet. Diese fünf Mutanten wiesen auch einen starken Defekt bei der kontaktabhängigen Porenbildung auf, welche mit Hilfe eines Hämolyseassays gemessen wurde (Alli, Gao et al. 2000). Molmeret et al. konnten zeigen, dass alle fünf *rib*-Mutanten eine Punktmutation im *icmT*-Gen aufweisen, und dass *icmT* essentiell für die porenvermittelte Lyse und dem anschließenden Austreten von *L.pn.* aus U937 Makrophagen als auch aus der Amöbe, *A.polyphaga*, ist (Molmeret, Alli et al. 2002).

1.7.2 Proteolytische Virulenzfaktoren

1.7.2.1 Bakterielle Proteasen als Virulenzfaktoren

Proteasen haben vielfältige zelluläre Funktionen, wie Proteindegradation, Aktivierung von Vorläuferproteinen und Spaltung von Nährstoffen. In pathogenen Mikroorganismen sind Proteasen zudem wichtige Virulenzfaktoren. Sie unterstützen z.B. die Invasion des Wirtsgewebes und tragen zum Umgehen der Immunantwort bei. Darüber hinaus können Proteasen, wie z.B. das Neurotoxin von *Clostridium botulinum,* als Exotoxine wirken (Montecucco and Schiavo 1993). Fortfolgend werden einige Proteasen und deren Bedeutung bezüglich der Virulenz näher beschrieben.

Eine häufig in Mikroorganismen vorkommende Protease ist z.B. die zytoplasmatische ATP-abhängige Lon-Protease. Sie gehört zur Gruppe der Serinproteasen. Lon-Proteasen sind häufig mit der Virulenz von pathogenen Bakterien assoziiert worden. So konnten Marr et al. zeigen, dass die Lon-Protease von *Pseudomonas aeruginosa* für Motilität und Biofilmbildung, beides wichtige Virulenzeigenschaften dieses Organismus, von Bedeutung ist (Marr, Overhage et al. 2007). Boddicker und Jones zeigten, dass die Lon-Protease von *Salmonella typhimurium*, essentiell für das intrazelluläre Überleben ist (Boddicker and Jones 2004). Dieser Einfluss der Lon-Protease auf den Infektionszyklus *von Salmonella typhimurium* ist zumindest teilweise auf die Degradation der regulatorischen Faktoren HilC und HilD zurückzuführen, welche eine veränderte Transkription der Pathogenitätsinsel 1 von *Salmonella* zur Folge hat (Takaya, Kubota et al. 2005). Die von *Brucella abortus* exprimierte Lon-Protease ist als wichtiger Faktor für das Überleben in murinen Makrophagen und von verschiedenen Stressbedingungen beschrieben. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Lon-Protease-Mutante von *Brucella abortus* im Mausmodell attenuiert ist (Robertson, Kovach et al. 2000). Der genaue Wirkmechanismus der Lon-Protease in *Brucella* ist jedoch noch nicht aufgeklärt.

Eine andere Protease, mit Einfluss auf die Virulenz von intrazellulären pathogenen Bakterien, ist die temperatur-induzierbare Protease HtrA/DegP. HtrA/DegP wurde als erstes in *E.coli* identifiziert. Die entsprechende Mutante wies zwei Phänotypen auf. Unter Erhöhung der Temperatur war die Mutante nicht mehr in der Lage zu wachsen. Daher auch die Bezeichnung HtrA, für *„High temperature requirement*" (Lipinska, Sharma et al. 1988). Darüber hinaus stellten Strauch und Beckwith fest, dass sich im Periplasma der Mutante, inkorrekt gefaltete Proteine

akkumulierten und nicht abgebaut wurden. Aus dieser Beobachtung resultiert die zweite Bezeichnung dieser Protease als DegP (Strauch and Beckwith 1988). HtrA/DegP ist eine membranassoziierte Serinendoprotease. Lowe et al. zeigten, dass die von *Salmonella* exprimierte homologe Protease HtrA, einen Virulenzfaktor darstellt (Lowe, Savidge et al. 1999). Weiterführende Untersuchungen durch Lewis et al. zeigten, dass sowohl die Funktion von HtrA als Chaperon, als auch die proteolytische Aktivität für die Virulenz von *Salmonella* wichtig sind (Lewis, Skovierova et al. 2009). Außer *Salmonella*, kodieren auch andere intrazelluläre Pathogene wie *Legionella, Brucella, Chlamydia* und *Mycobakterium* mindestens für eine HtrA-Protease, welche mit der Virulenz dieser Organismen assoziiert ist (Pedersen, Radulic et al. 2001; Phillips and Roop 2001; Roop, Phillips et al. 2001; Huston, Theodoropoulos et al. 2008; Mohamedmohaideen, Palaninathan et al. 2008).

Wie bereits erwähnt, gibt es Proteasen, die die Immunantwort des Wirtes zugunsten des parasitären Organismus modulieren. Eine dieser Proteasen ist z.B. die sekretierte IgA1-Protease. Diese ist auf die Spaltung der schweren Kette von humanen IgA1-Immunoglobulin spezialisiert. IgA1-Proteasen werden von einer Vielzahl von humanpathogenen Bakterien, wie z.B. *Neisseria gonorrhoeae, Haemophilus influenzae* oder auch *Streptoccocus pneumoniae* exprimiert (Plaut 1983). Durch die proteolytische Degradation von sekretierten IgA wird die mukosale Immunabwehr entscheidend geschwächt. Dies erleichtert den pathogenen Mikroorganismen die Infektion über die Schleimhäute. Eine weitere immunregulierende Protease ist die von *Streptococcus pyogenes* produzierte Protease C5a. Substrate dieser Protease sind wichtige Signalmoleküle des Komplementsystems. Durch Spaltung dieser, wird die Aktivierung dieses Teils des Immunsystems umgangen (Chen and Cleary 1990).

Die mit der Virulenz von *Pseudomonas aeruginosa* assoziierten Metalloproteasen, Elastasen LasA und LasB besitzen ein breites Substratspektrum. Elastase spaltet nicht nur Elastin, sondern auch Kollagen (Heck, Morihara et al. 1986),inaktiviert Bestandteile des Immunsystems, wie Immunglobulin A (Heck, Alarcon et al. 1990), Lysozym (Jacquot, Tournier et al. 1985) und Komplementkomponenten (Hong and Ghebrehiwet 1992) und Substanzen, die am Schutz des Respirationstraktes vor Proteasen beteiligt sind, wie der humane alpha1-Proteaseinhibitor

(Morihara, Tsuzuki et al. 1979). Elastin ist ein wichtiger Bestandteil von Lungengewebe und Blutgefäßen und bedingt in beiden Organen die Elastizität und Widerstandsfähigkeit des Gewebes. Daher ist die Fähigkeit, Elastin zu spalten, ein bedeutsamer Virulenzfaktor bei akuten Infektionen. Die beiden Elastasen wirken synergistisch (Galloway 1991). Im Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass *lasB*-Mutanten deutlich weniger invasiv waren als der Wildtyp (Tamura, Suzuki et al. 1992).

1.7.2.2 Proteasen von *L. pneumophila*

In den sequenzierten Genomen von *L.pneumophila* sind jeweils 136 bisher bekannte und putative Peptidasen kodiert (Rawlings, Barrett et al.). Die am besten charakterisierte Protease von *L. pneumophila* ist die sekretierte Zinkmetalloprotease ProA/Msp. Auf diese wird im nächsten Abschnitt ausführlich eingegangen. Trotz der hohen Anzahl an putativen Proteasen im Genom von *L.pneumophila*, wurden erst wenige näher untersucht und ihre Funktion für die Vitalität und die Virulenz von *L. pneumophila* beschrieben. Eine dieser Proteasen ist die HtrA/DegP stressinduzierte Protease von. *L. pneumophila*. Wie in 1.7.2.1 bereits erwähnt, handelt es sich dabei um ein bifunktionales Protein, das einerseits als Chaperon dient und auf der anderen Seite missgefaltete Proteine proteolytisch degradiert. Expressionsstudien von Pedersen et al. zeigten, dass die Expression von HtrA/DegP während der Infektion von Protozoen als auch von humanen Monozyten deutlich erhöht ist (Pedersen, Radulic et al. 2001). Die Induktion bei der Infektion von Makrophagen ist dabei noch Mal um ein 100faches erhöht. Dieses Ergebnis deutete auf eine potentielle Rolle von HtrA/DegP bei der Infektion von Wirtszellen hin, zeigt aber auch, dass diese in Abhängigkeit von der Wirtszelle unterschiedlich sein kann. Genau dieses konnten Pedersen et al. durch Infektion mit *htrA*-Mutanten in verschiedenen Modellsystemen zeigen. Im Gegensatz zu *A. polyphaga*, in denen die *htrA*-Mutante nur einen geringen Replikationsdefekt zeigte, erwies sich HtrA für die Replikation in U937 Makrophagen und WI-26 Epithelzellen als unerlässlich. Eine deutliche Attenuierung der *htrA*-Mutante wurde daraufhin auch nach intratrachaeller Inokulation von Mäusen beobachtet. Die beobachtete Attenuierung in den Säugerzell-Infektionsmodellen ist auch unabhängig von der Wachstumsphase der für die Infektion benutzten Bakterienzellen. Die unterschiedlichen Effekte der *htrA*-Mutationen in Säugerzellen und Protozoen,

führen Pedersen et al. auf unterschiedliche Bedingungen in den entsprechenden Phagosomen zurück. Diese könnten das Auslösen differenzierter Stressantworten durch *Legionella* zur Folge haben, wobei HtrA in Säugerzellen eine größere Bedeutung zukommt als in Protozoen. Eine weitere charakterisierte Protease von *L.pneumophila*, ClpP, ist ebenfalls in die Stressantwort involviert. ClpP ist die proteolytische Komponente des ATP-abhängigen Proteasekomplexes ClpXP. Die zweite Komponente, häufig ClpA oder ClpX genannt, entfaltet unter ATP-Verbrauch die Substrate für die proteolytische Einheit ClpP. Untersuchungen zur Funktion des ClpXP Komplexes zeigten, dass neben der Regulation der Stressantwort auch Sporulation und Zellteilung durch diesen Protease/Chaperonkomplex beeinflusst werden (Butler, Festa et al. 2006; Frees, Savijoki et al. 2007). Durch die Regulation der genannten und eventuell weiterer Prozesse in der Zelle, scheint ClpP auch in die Regulation der Virulenz von vielen Pathogenen, wie *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae* und *Staphylococcus aureus* involviert zu sein (Gaillot, Pellegrini et al. 2000; Frees, Qazi et al. 2003; Frees, Chastanet et al. 2004; Butler, Festa et al. 2006). Die von *L.pneumophila* kodierte ClpP wurde von Li et al. näher charakterisiert (Li, Zeng et al.). Dafür wurde eine nichtpolare *clpP*-Mutante im Stamm *L. pneumophila* JR32 konstruiert. *In vitro* Wachstumsanalysen zeigten, dass das Wachstum der *clpP*-Mutante bei hohen Temperaturen (42°C) im Vergleich zum Wildtyp verringert ist. Neben dem Wachstumdefekt bei hohen Temperaturen konnten Li et al. zeigen, dass die *clpP*-Mutante auch in der Toleranz gegenüber verschiedenen Stressstimuli, wie z.B. H_2O_2, niedriger pH oder osmotischer Stress, attenuiert ist. Auch die Zellteilung von *L. pneumophila* war in der Mutante gestört. Neben den *in vitro* Defekten, die durch das Fehlen von ClpP hervorgerufen wurden, zeigten Li et al. mittels Koinfektion mit *A.castellanii*, dass ClpP für die intrazelluläre Replikation in diesen Amöben essentiell ist. Die beschriebenen Defekte ließen sich durch eine plasmidkodierte Kopie der ClpP komplementieren. Fasst man die beobachten Phänotypen der *clpP*-Mutante in der stationären Phase zusammen, stellt man fest, dass der Phänotyp der replikativen Form der Legionellen gleicht. Wildtypische Legionellen in der stationären Phase entsprechen dagegen der transmissiven Form. Anhand dieser Beobachtung schlussfolgerten Li et al., dass ClpP eine entscheidende Rolle bei der Transition vom replikativen zum transmissiven Stadium von *Legionella* spielt.

Vranckx et al. charakterisierten eine weitere Protease von *L.pneumophila*. Aufgrund der Homologie zum Plasminogen Aktivator (Pla), wurde sie als Lpa, für „*Legionella plasminogen activator*" bezeichnet (Vranckx, De Buck et al. 2007). Lpa gehört zur Familie der Omptine, die eine Klasse von Oberflächen-Proteasen/Adhäsine bilden und in der äußeren Membran von enterobakteriellen Pathogenen lokalisiert sind. Plasminogen Aktivatoren wurden z.B. in *Yersinia pestis* und *Salmonella enterica* den Virulenzfaktoren zugeordnet. Die Aktivierung von Plasminogen durch Pla, ist für proteolytische Degradation von Gewebe und die damit verbundene Disseminierung von *Yersinia pestis* unverzichtbar (Sodeinde, Subrahmanyam et al. 1992; Kukkonen and Korhonen 2004). PgeT, das Homolog von Pla in *Salmonella enterica* trägt über Interferenz mit proteolytischen Systemen des Wirtes und über die proteolytische Modifikation der extrazellulären Matrix ebenfalls zur Pathogenität bei (Kukkonen, Suomalainen et al. 2004; Lahteenmaki, Kyllonen et al. 2005; Ramu, Tanskanen et al. 2007). Die Analysen von Vranckx et al. zeigten, dass der durch *Legionella* kodierte Pla ähnliche Funktionen besitzt. Lpa ist in der Lage Plasminogen zu prozessieren und in die aktive Form Plasmin zu überführen. Diese Aktivität ist jedoch abhängig vom LPS-Status des Bakteriums. Wie bei den homologen Proteinen in *Y.pestis* und *S.enterica* scheint auch in *L.pneumophila* die Lpa-Aktivität durch lange O-Antigen Polymere sterisch gehindert zu sein. Mittels des Amöben-Platten-Test konnten Vranckx et al. zeigen, dass *lpa*-Mutanten einen Wachstumsdefekt in *A.castellanii* aufweisen. Anhand der Ergebnisse vermuten Vranckx et al. eine Rolle von Lpa in spätem Stadium einer Legionelleninfektion, die durch Disseminierung in das Lungengewebe und Zerstörung dieses gekennzeichnet ist. Inwieweit sich diese These bestätigt, muss jedoch durch weitere Versuche geklärt werden.

1.7.2.3 Zinkmetalloprotease ProA von *L. pneumophila*

Zum ersten Mal wurde ProA im Jahre 1986 durch Dreyfus et.al beschrieben (Dreyfus and Iglewski 1986). ProA wurde in großen Mengen im Kulturüberstand von *L. pneumophila* gefunden. Daher auch die häufig zu findende Bezeichnung Msp für „major secretory protein" (Szeto and Shuman 1990). Die Sekretion von ProA erfolgt über das Typ II Sekretionssystem Lsp (Hales and Shuman 1999; Liles, Edelstein et al. 1999). Die Zinkmetalloprotease ProA gehört zur Familie der M4 Peptidasen, welche vor allem Metalloendopeptidasen enthält. Thermolysin

von *Bacillus thermoproteolyticus* war die erste sequenzierte Protease dieser Familie (Titani, Hermodson et al. 1972). Die Tertiärstruktur von Thermolysin ist ebenfalls bekannt und in Abbildung 1-2 dargestellt (Matthews, Jansonius et al. 1972). Wie alle Peptidasen der Familie (Jongeneel, Bouvier et al. 1989), bindet ProA ein einziges katalytisches Zinkion. Allen Proteasen der Familie gemein ist das HEXXH-Motiv, in welchen die Histidine zwei Zinkliganden bilden und Glutamat eine katalytisch aktive Aminosäure. Wie die meisten anderen Mitglieder der Gruppe, ist ProA bei neutralem pH am aktivsten.

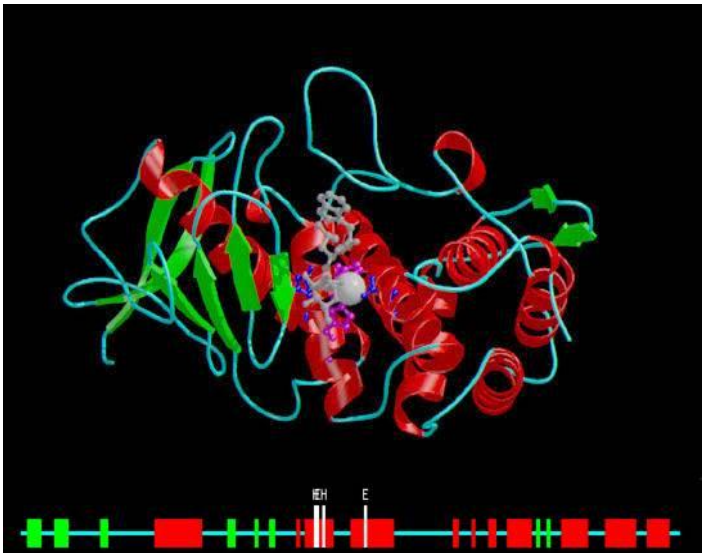


Abbildung 1-2 **Tertiärstruktur Thermolysin von *Bacillus thermoproteolyticus***. In der Mitte ist das Zinkion als graue Kugel zu sehen.(von http://merops.sanger.ac.uk)

Die DNA-Sequenz des Gens, welches in *L. pneumophila* ProA kodiert, enthält einen einzigen offenen Leserahmen von 1629Bp Länge. Das daraus abgeleitete Polypetid besteht aus 543 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 60,775kDa. Es handelt sich dabei jedoch noch nicht um die aktive Protease, sondern um ein inaktives Proenzym. N-terminal befindet sich, die für die Sec abhängige Typ II Sekretion notwendige Signalsequenz. Das anschließende Propeptid, dient als Inhibitor für die proteolytische Aktivität, wird jedoch nach dem Transport des Proenzyms ins Periplasma autokatalytisch abgespalten (Moffat, Black et al. 1994). Die aktive sekretierte ProA hat ein Molekulargewicht von rund 38kDa. Strukturell und funktionell ähnelt ProA der Elastase von *Pseudomonas aeruginosa* (Black, Quinn et al. 1990). Die Elastase ist von vielen Wissenschaftlern als wichtiger Virulenzfaktor von *Pseudomonas* beschrieben (Holder and Haidaris 1979; Pavlovskis and Wretlind 1979; Woods, Cryz et al. 1982; Blackwood, Stone et al.

1983; Elsheikh, Kronevi et al. 1987; Holder and Neely 1989; Mohr, Rust et al. 1990; Tamura, Suzuki et al. 1992; Azghani 1996; Thibodeaux, Caballero et al. 2007). So wurde gezeigt, dass die Elastase von *Pseudomonas „Tight Junctions*" zwischen den Zellen zerstört und Gewebe proteolytisch schädigt. Zu den Substraten der Elastase gehören neben Zytokinen, wie dem alpha-Proteinase-Inhibitor, auch Immunoglobuline und Teile des Komplementsystems (Schultz and Miller 1974; Morihara, Tsuzuki et al. 1979; Fick, Baltimore et al. 1985; Parmely, Gale et al. 1990). Der proteolytische Verdau dieser immunologischen Faktoren verringert die Fähigkeit von Neutrophilen die Bakterien durch Phagozytose zu eliminieren. Für die Zinkmetalloprotease ProA gibt es bezüglich der Virulenz kontroverse Ergebnisse und Meinungen. Zwar wurde gezeigt, dass ProA hämolytische und zytotoxische Eigenschaften besitzt (Keen and Hoffman 1989; Quinn and Tompkins 1989) und Faktoren des wirtseigenen immunologischen Systems proteolytisch degradiert (Conlan, Williams et al. 1988; Rechnitzer, Diamant et al. 1989; Mintz, Miller et al. 1993; Sahney, Summersgill et al. 2001; McCoy-Simandle, Stewart et al. 2011), ein direkter Einfluss auf die als Indikator für die Virulenz der Legionellen benutzte, intrazelluläre Vermehrungsfähigkeit in Zellkultur- bzw. im Tiermodell konnte bisher aber nicht eindeutig festgestellt werden. Obwohl *proA* während der Infektion von *A. castellanii* und Makrophagen exprimiert wird (Rechnitzer, Diamant et al. 1989; Moffat, Edelstein et al. 1994), berichten Shuman et al., dass ProA keinen Einfluss auf die intrazelluläre Vermehrung in Makrophagen (Szeto and Shuman 1990) hat. Auch die intrazelluläre Replikation in *A. castellanii* wird durch Mutation von *proA* nicht beeinflusst. Dagegen konnten Rossier et al. zeigen, dass ProA für die Kolonisierung von *H. vermiformis* essentiell ist und somit einen wirtsspezifischen Virulenzfaktor darstellt (Rossier, Dao et al. 2008). *In vivo* Versuche mit Meerschweinchen ergaben teils gegensätzliche Ergebnisse. Im Gegensatz zu Horwitz et al., die ProA nicht als Virulenzfaktor in diesem Modell beschreiben (Blander, Szeto et al. 1990), konnten Tompkins et al. feststellen, dass eine isogene *proA*-Mutante zur Attenuierung im Meerschweinchen führt (Moffat, Edelstein et al. 1994). Alle bisherigen Arbeiten, die sich mit dem Einfluss von ProA auf die Virulenz beschäftigten, fokussierten vor allem die Auswirkungen der proteolytischen Aktivität auf den jeweiligen Wirt. Die mögliche Aktivierung eigener Virulenzfaktoren durch proteolytische Prozessierung wurde lange Zeit nicht mit in die Betrachtung einbezogen. Banerji et.al

konnten zeigen, dass ProA direkt oder indirekt die sekretierte Phospholipase PlaC, vermutlich proteolytisch, prozessiert (Banerji, Bewersdorff et al. 2005). Erst durch die putative Prozessierung entfaltet die Phospholipase eine zusätzliche Glycerophospholipid:Cholesterol Azyltransferase (GCAT) Aktivität. Ein Einfluss von PlaC und die durch ProA, aktivierte GCAT-Aktivität, auf die intrazelluläre Replikationsfähigkeit in Amöben und humanen Makrophagen konnte bislang zwar noch nicht festgestellt werden, aber es ist denkbar, dass die durch PlaC mögliche Modifikation von Cholesterol, welches ein wichtiger Bestandteil eukaryotischer Membranen darstellt, das Überleben von *L. pneumophila in vivo* beeinflusst.

1.7.3 Ziel der Arbeit

Die Entschlüsselung des Genoms des Lungenpathogens *Legionella pneumophila* ermöglichte, durch den Vergleich mit bereits charakterisierten Genen anderer pathogener Bakterien, die Identifizierung vieler Gene, die für putative Virulenzfaktoren kodieren. Darunter auch eine Vielzahl von Genen die putative hydrolytische Proteine kodieren. Hydrolytische Proteine und deren Regulatoren können die Pathogenität eines Krankheitserregers, wie *L. pneumophila* auf verschiedene Art und Weise beeinflussen. Proteine die direkt oder indirekt die lipolytische, hämolytische und proteolytische Aktivität von *L. pneumophila* beeinflussen, könnten z.B. Zell- und Gewebeschäden regulieren oder unterstützen. Darüber hinaus können anfallende Sekundärprodukte von hydrolytischen Reaktionen Wirtszellprozesse modulieren und zur Virulenz beitragen. Daher war es ein Ziel dieser Arbeit ein Screeningsystem zu entwickeln, mit dem hydrolytisch wirkende Proteine von *L.pneumophila* Phil-1 identifiziert werden können. Da besonders Hämolysine, Proteasen und Lipasen zur Pathogenität beitragen können, lag der Fokus dieser Arbeit auf der Identifikation ebensolcher Proteine und derer putativen Regulatoren. Ein möglicher Einfluss auf die Virulenz von *L. pneumophila* aller identifizierten Gene bzw. deren Expressionsprodukte sollte anschließend in einem Infektionsmodell mit *A.castellanii* untersucht werden. Anhand der so erhaltenen Resultate wurde eine Auswahl von Mutanten getroffen, die anschließend näher charakterisiert wurden.

Um die Bedeutung der sekretierten Zinkmetalloprotease, ProA für *L. pneumophila* weiter aufzuklären, wurde im zweiten Teil der Arbeit versucht diese näher zu charakterisieren. Dabei sollte zunächst das Substratspektrum dieser Protease

untersucht werden. Da bekannt ist, dass auch zelleigene Proteine proteolytisch aktiviert werden können, sollte neben der Identifikation von synthetischen potentiellen eukaryotischen Substraten, auch der Einfluss von ProA auf das Sekretom von *L. pneumophila* untersucht werden. Frühere Untersuchungen in unserer Gruppe haben gezeigt, dass die sekretierte Phospholipase PlaC, durch proteolytische Prozessierung, durch ProA eine zusätzliche Glycerophospholipid:Cholesterol-Azyltransferase aufweist. Da der genaue Mechanismus dieser Prozessierung noch nicht aufgeklärt ist, war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit über die Identifikation der Schnittstellen von ProA in PlaC, diesen weiter zu analysieren.

2 Material

2.1 Laborausstattung

Tabelle 2-1: Auflistung der verwendeten Geräte

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Absorptionsmessgerät für Mikrotiterplatten	Tecan Sunrise	Tecan
Brutschränke	a) B20	Heraeus
	b) HeraCell 240	Heraeus
Drehrad	neoLab-Rotator 2-1175	neoLab
Elektroporationsgerät	Cell Porator	Life Technologies
FPLC	ÄKTAprime	Amersham Bioscience
Gelelektrophorese-Apparaturen	a) Gelkammer (Mini) SubCell GT	Bio-Rad
	b) Spannungsgerät PowerPack 300	Bio-Rad
	c) Mini Protean 3	Bio-Rad
	d) Ettan IPGphor II	Amersham Bioscience
Heizschüttler	Thermomixer Comfort	Eppendorf
Inkubatoren	a) Innova™ 4230	New Brunswick Scientific
	b) Innova™ 43	New Brunswick Scientific
	c) TH25	Edmund Bühler
Kamera	EasyShare CX7430	Kodak
Koloniezählgerät	Acolyte	Synbiosis
Mikroskope	a) Axiovert 200M	Carl Zeiss Jena
	b) IMT	Olympus
pH-Elektrode	Toledo MP225 pH Meter	Mettler
PCR-Cycler	a) Thermocycler T-Gradient	Biometra
	b) FlexCycler	Analytik Jena
Plattiergerät	Whitley Spiral Plater	Meintrup DWS
Sterilbank	Herasafe	Heraeus
Tisch-Schüttler	a) WT12	Biometra
	b) S410	mLw
	c) Unimax 1010 (in Inkubator TH25)	Heidolph
Ultraschallgerät	Sonoplus	Bandelin
UV/VIS Spektrophotometer	a) NanoDrop® ND-1000	NanoDrop
	b) NanoPhotometer	Implen
	c) DU®520 Spectrophotometer	Beckman Coulter
UV-Transluminator	Gel Doc 2000	Bio-Rad
Vortex Mixer	Vortex Mixer 7-2020	neoLab
Waagen	a) CP64; b) 1212 MP	Sartorius AG
Zellzahl-Zählkammer	Neubauer Zählkammer	Roth
Zentrifugen	a) Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf
	b) Sorvall RC-5 Superspeed Refrigerated Centrifuge	Du Pont Instruments
	c) Labofuge400	Heraeus
	d) Kühlzentrifuge 5810R	Eppendorf
	Rotoren: A-4-62; F-34-6-38	
Microarray-Scanner	GenePix 4000B	Axon Instruments

2.2 Spezielle Materialien

Tabelle 2-2: Auflistung spezieller Materialien

Materialbezeichnung	Name/Beschreibung	Artikelnummer	Hersteller
AEX-Säulchen	HiTrap Q FF	17-6002-33	Amersham Bioscience
Cryo-Gefäße	Zur Lagerung von Glyzerolgefrierkulturen	E309.1	Roth
Isoelektrische Fokussierungsstreifen	Immobiline DryStrip pH 3-11 NL, 24 cm	17-6003-77	GE Healthcare
Elektroporationsküvetten	Küvetten für den CellPorator	11608-031	Whatman
Filter	a) Rotilabo®Spritzenfilter 13mm	T056.1	Roth
	b) FP30/0.3 CA-S Sterilfilter	10462200	Schleicher & Schuell
48-Pin Replikator	48-Pin Replikator	VP 481-P13	V&P Scientific, Inc
Glasröhrchen	Gefäß zur Bakterienkultivierung	231721197	Schott
Kanüle	26-gauge Sterican Gr.17	-	B/Braun
Küvetten	Einmal-Küvetten aus PMMA	P95.1	Roth
Mikrotiterplatten	96-well, F-Form	3911925	Anicrin
	Immuno-Platten, MaxiSorp, 96-well	439454	Nunc
Reaktionsgefäße	a) 1,5/2ml Safe-Lock Tubes	0030.120.086/ 0030 120.094	Eppendorf
	b) PCR Tubes	683201	Greiner bio-one
	c) 15/50ml Tubes	188271/227270	Greiner bio-one
Serologische Pipetten	10/25ml, steril, BD Falcon	357530/356 535	BD Bioscience
Spritze (Feindosierung)	Omnifix®-F ohne Kanüle	9161406V	B/Braun
Zellkulturflaschen	a) 25cm^2	a) 156367	Nunc
	b) 75 cm^2	b) 178891	Nunc
	c) 175 cm^2	c) 159910	Nunc
Zellkulturplatten	24-well Cellstar	662160	Greiner bio-one
Zählkammer, Neubauer	Neubauer Zählkammer, improved	T729.1	Roth

2.3 Chemikalien

Tabelle 2-3: Auflistung der verwendeten Chemikalien

Chemikalienbezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
Acrylamid-Bisacrylamid Rotiphorese® Gel 30	3029.2	Roth
Agar	101618	Merck
Agarose	V3125	Promega
Ammonium-Eisen(II)-Sulfat	F-1543	Sigma-Aldrich
Ammoniumpersulfat (APS)	0486	Amresco
Ampicillin Natriumsalz	A9518	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau/Xylencyanol	B3269	Sigma-Aldrich
BSA (Rinderserum Albumin)	K41-001	PAA
Carbenicillin	69101-3	VWR
Chloramphenicol	C-1919/ C-0378	Sigma-Aldrich
Chloroform	102445	Merck
Coomassie, kolloidal (Roti®-Blue)	A152.1	Roth
Dithiothreitol (DTT)	P2325	Invitrogen
DMSO; Dimethylsulfoxid	20385	Merck
DNA Isolation Reagent for Genomic DNA	A3418,0050	AppliChem
dNTP, Nukleotid Mix 10mM	BIO-39043	Bioline
Eisen (III)-Chlorid	12321	Riedel-de Haën
Eisessig	100063	Merck
Ethanol, zur Analyse	100983	Merck

Ethidiumbromid	111608	Merck
FKS (Fötales Kälberserum)	A-15-043	PAA
D-(+)-Glukose	G7021	Sigma-Aldrich
Glyzerol 86%	7533.3	Roth
Glyzin	3908.2	Roth
Hefeextrakt	212720	BD Bioscience
Isopropyl-β-D-thiogalaktosid (IPTG)	BIO-37036	Bioline
Kaliumchlorid	104936	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	104873	Merck
Di-Kaliumhydrogenphosphat	105104	Merck
Kaliumhydroxid Plätzchen	105033	Merck
Kanamycinmonosulfat	K-1377	Sigma-Aldrich
Legionella BCYEα Agarplatten	1860e	Heipha
Legionella Basis Agar	110242	Merck
Legionella Wachstums-Supplement	SR 0110C	Oxoid
Lysozym	L7651	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid Hexahydrat	105833	Merck
Magnesiumsulfat Heptahydrat	105886	Merck
β-Mercaptoethanol	M7522	Sigma-Aldrich
Methanol	T909.1	Roth
Mucasol	60434	Brand
Naphtolblauschwarz	195243	Sigma-Aldrich
Natriumazetat-Trihydrat	106267	Merck
Natriumazid	106688	Merck
Natriumcarbonat	106392	Merck
Natriumchlorid	3957.2	Roth
Natriumcitrat	S-4641	Sigma-Aldrich
Natriumdeoxycholat	D6750	Sigma-Aldrich
Natrium EDTA (Triplex III)	108418	Merck
Di-Natriumhydrogenphosphat	106575	Merck
Natriumhypochlorid-Lösung	105614	Merck
Natriumthiosulfat	106512	Merck
Nonidet P-40	74385	Fluka
PeqGOLD RNA Pure™	30-1020	peqLab
Pepton	LP0085	Oxoid
Phenol	A156.2	Roth
2-Propanol, Isopropanol	6752.4	Roth
Protease Inhibitor Mix FY	39104.02	Serva
Roti-Nanoquant (zur Proteinbestimmung)	K880.1	Roth
RPMI 1640 Pulver/Flüssig	51800-043/E15-840	Invitrogen/PMA
Salzsäure, rauchend	100317	Merck
Saponin	4185.1	Roth
Silbernitrat	101512	Merck
Sodium-Dodezylsulfat (SDS)	CN30.2	Roth
Sorbitol	S3755	Sigma-Aldrich
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	2367.3	Roth
Trichloressigsäure	8789.2	Roth
Tris Base	T8,760-2	Sigma-Aldrich
Triton X-100	T8787	Sigma-Aldrich
Trypanblau (0,4%)	T8154	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA	L11-004	PAA
Trypton	L47	Oxoid
Tween20	817072	Merck
Wasserstoffperoxid (H2O2), 30%	216763	Sigma-Aldrich
X-gal, 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside	1161	Diagnostic Chemicals Ltd.
YNB (yeast nitrogen base)	Q300-09	Invitrogen

2.4 Lipidsubstrate

Tabelle 2-4: Auflistung der verwendeten Lipidsubstrate

Bezeichnung	Kürzel	Artikelnummer	Hersteller
Cardiolipin	-	840012P	Avanti Polar Lipids
1,2-Dipalmitoyl-sn-Glyzero-3-Phosphocholin	DPPC	850355P	Avanti Polar Lipids
1,2-Dipalmitoyl-sn-Glyzero-3-Phospho-rac-1-Glyzerol	DPPG	840455P	Avanti Polar Lipids
1-Palmitoyl-2-Hydroxy-sn-Glyzero-3-Phosphocholin	MPLPC	855675P	Avanti Polar Lipids
1-Monopalmitoyl-rac-Glyzerol	1-MPG	M1640	Sigma-Aldrich

2.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 2-5: Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Bestandteile	Menge/Konzentration
PBS Puffer (pH 7,2)	KCl	0,2 g
zu 1000ml H_2O_{bidest}	KH_2PO_4	0,2 g
	Na_2HPO_4	1,15 g
	NaCl	8 g
Tris Puffer (pH 7,5) für Lipidanalyse	Tris Base	40 mM
Kaliumphosphatpuffer 1M, pH 6,0	K_2HPO_4 (1M)	132 ml
	KH_2PO_4 (1M)	868 ml
	Puffer für die DNA-Gelelektrophorese	
50 × TAE Puffer (pH 8,0)	Tris Base	2,0 M
	Eisessig	1,0 M
	Na_2EDTA	0,1 M
DNA Probenpuffer	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
	Glyzerin	30 %
	Puffer für die Protein-Gelelektrophorese	
SDS PAGE Probenpuffer	Tris Base (pH 6,8)	62,5 mM
	SDS	2 %
	Glyzerol	10 %
	β-Mercaptoethanol	5 %
	Bromphenolblau	0,001 %
SDS PAGE Laufpuffer (5×)	Tris Base	25 mM
	Glyzin	384 mM
	SDS	0,2 %
Dehydratisierungslösung für Proteinge-	EtOH	20 %
le	Glyzerin (86%)	10 %
	Puffer für die Silberfärbung	
Fixierlösung	Ethanol	40 %
	Eisessig	5 %
Sensibilisierungslösung	Natriumthiosulfat ($Na_2S_2O_3$)	0,2 %
Färbelösung	Silbernitrat ($AgNO_3$)	0,2 %
Entwicklerlösung	Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	2 %
	Formalin	0,04 %
Stoplösung	Eisessig	5 %
	Puffer für Reinigung genomischer DNA	
STE-Puffer	Tris Base (pH7,5)	10 mM
	EDTA	1 mM
	Sucrose	250mM

Puffer zur Proteinreinigung		
Resuspensionspuffer für den Zellaufschluss	Tris Base	50 mM
	NaCl	100 mM
	Na_2EDTA	1 mM
AEX Protein-Bindepuffer (pH 9,2)	Tris Base	20 mM
	Na_2EDTA	5 mM
AEX Protein-Elutionspuffer (pH 9,2)	Tris Base	20 mM
	Na_2EDTA	5 mM
	NaCl	1 M

SDS-Trenngel			SDS-Sammelgel	
	10 %	12,5 %		4 %
Acrylamid/Bisacrylamid 30%	3,3 ml	4,2 ml	Acrylamid/Bisacrylamid 30%	530 µl
1,5M Tris Base (pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml	0,5 M Tris Base (pH 6,8)	1 ml
H_2O	4 ml	3,1 ml	H_2O	2,4 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	10% SDS	40 µl
10% APS	100 µl	100 µ	10% APS	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl	TEMED	4 µl

2.6 Enzyme und Standards

Tabelle 2-6: Auflistung verwendeter Enzyme und Standards

Enzymbezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
Klenow Fragment	M0210S	NEB
Lysozym	L-7651	Sigma-Aldrich
PCR-Sequenzierungs-Polymerase (BigDye 3.1)	4337035	Applied Biosystems
Pfu DNA Polymerase	EP0501	Fermentas
Platinum®Taq DNA Polymerase	10966-034	Invitrogen
Proteinase K	D3350-02 (Kit)	Omega Bio-Tek
Proteinase K	70663	Merck
Protease von *Bacillus polymyxa* (Dispase I)	D4818-2MG	Sigma-Aldrich
Restriktionsendonukleasen	-	NEB
RNase OUT™ Ribonuclease (RNase) Inhibitor	10777019	Invitrogen
Shrimp alkalische Phosphatase (SAP)	11 758 250 001	Roche
T4 DNA Ligase	M0202	NEB
T4 Polynukleotidkinase	M0236 S	NEB
Taq DNA Polymerase	M0267	NEB
Standards für Elektrophoresen		
Standard	Bereich	Hersteller
Gene Ruler DNA Laddermix	0,1 – 10 kb	Fermentas
PageRulerTM Unstained Protein Ladder	10 – 200 kDa	Fermentas
Magic Mark™ XP	200 – 220 kDa	Invitrogen

2.7 Analyse-Kits

Tabelle 2-7: Auflistung der verwendeten Analyse-Kits

Produktbezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
BigDye Terminator V.3.1 Ready Cycle Sequencing Kit	4337035	Applied Biosystems
Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kit	K160-01	Invitrogen
Human IL-8 ELISA Set	555244	BD Bioscience
Nefa C Kit	994-75409	Wako Chemicals
M.I.C.Evaluator Strips (Ampicillin)	MA0110D	OXOID
OneStep RT-PCR Kit	210212	Qiagen
Silver Staining Kit Protein	17-1150-01	Amersham Bioscience
Wizard Plus Minipreps	A1460	Promega
Wizard SV Gel und PCR cleanup system	A9282	Promega
Protease Substrat Set	-	JPT
Protease Peptide Microarray	-	JPT

2.8 Plasmide, Oligonukleotide, Bakterienstämme und Zellen

2.8.1 Verwendete Plasmide

Tabelle 2-8: Auflistung erworbener Plasmide

Plasmidbezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
pBAD202/D/TOPO	K4202-01	Invitrogen
pBCKS+	212217	Stratagene
pET28b (+)	69865-3	Novagen
pET160/GW/D-TOPO	K160-01	Invitrogen
PGEMTez	A1360	Promega
pJQ200	77482	ATCC

Tabelle 2-9: Auflistung erzeugter Plasmide der Genbank von *L.pn.* Phila-1 in *E.coli.* Alle Klonierungsfragmente stammen aus SauIIIA Verdau gDNA von *L.pn.* Phila-1. Genaue Charakterisierung der klonierten chromosomalen Fragmente in Tab. 4-1

Plasmid-bezeichnung	Konstrukt	Größe des Inserts (bp)	AB-Resistenz
DH5a(p2C3)	pBCKS + *lpg 2218-2220*	3321	Cm
DH5a(p2B8)	pBCKS + *lpg 2083-2087*	4141	Cm
DH5a(p3H12	pBCKS + *lpg 0466-0471*	6636	Cm
DH5a(p4B4)	pBCKS + *lpg 0986-0989*	5902	Cm
DH5a(p4D5)	pBCKS + *lpg 0711-0714*	3804	Cm
DH5a(p3E10)	pBCKS + *lpg 2629-2634*	4642	Cm
DH5a(p5A1)	pBCKS + *lpg 1602-1603*	1494	Cm
DH5a(p5C2)	pBCKS + *lpg 0983-0986*	3525	Cm
DH5a(p5E5)	pBCKS + *lpg 0418-0422*	4012	Cm
DH5a(p5F5)	pBCKS + *lpg 0711-0713*	3723	Cm

DH5a(p6H4)	pBCKS + *lpg 0029-0033*	3564	Cm
DH5a(p6F7)	pBCKS + *lpg 2297-2298*	1822	Cm
DH5a(p7D5)	pBCKS + *lpg 0697-0699*	2842	Cm
DH5a(p7G2)	pBCKS + *lpg 1240-1245*	7672	Cm
DH5a(p7A9)	pBCKS + *lpg 0961-0962*	1957	Cm
DH5a(p7B10	pBCKS + *lpg 2524-2527*	4321	Cm
DH5a(p8F4)	pBCKS + *lpg 694*	1188	Cm
DH5a(p8A8)	pBCKS + *lpg 2754; 2584*	149	Cm
DH5a(p8B8)	pBCKS + *lpg 1320-1321*	2484	Cm
DH5a(p8C8)	pBCKS + *lpg 2244*	103	Cm
DH5a(p8E7)	pBCKS + *lpg 0992-0998*	2383	Cm
DH5a(p1G2)	pBCKS + *lpg 0469-0471*	2746	Cm
DH5a(p11A7)	pBCKS + *lpg 0688-0691*	5377	Cm
DH5a(p11B10)	pBCKS + *lpg 1683*	60	Cm
DH5a(p11C12)	pBCKS + *lpg 2224-2227*	6305	Cm
DH5a(p11E12)	pBCKS + *lpg 0803-0805*	3859	Cm
DH5a(p12A5)	pBCKS + *lpg 0226-0229*	4229	Cm
DH5a(p12B2)	pBCKS + *lpg 0998-1006*	5092	Cm
DH5a(p12D6)	pBCKS + *lpg 0234; 0023*	746	Cm
DH5a(p12F3)	pBCKS + *lpg 1592-1597*	4689	Cm
DH5a(p12H4)	pBCKS + *lpg 2528-2529*	2664	Cm
DH5a(p12C11)	pBCKS + *lpg 1036-1048*	8837	Cm
DH5a(p13B4)	pBCKS + *lpg 2156*	505	Cm
DH5a(p13B5)	pBCKS + *lpg 1331*	269	Cm
DH5a(p13D3)	pBCKS + *lpg 2695-2698*	3708	Cm
DH5a(p13E3)	pBCKS + *lpg 0293-0296*	2769	Cm
DH5a(p13G6)	pBCKS + *lpg 1607; 2061*	458	Cm
DH5a(p13A9)	pBCKS + *lpg 0099*	1367	Cm
DH5a(p13E7)	pBCKS + *lpg 1509-1514*	5154	Cm
DH5a(p13H7)	pBCKS + *lpg 2645-2647*	1225	Cm
DH5a(p9D6)	pBCKS + *lpg 0419*	811	Cm
DH5a(p9C2)	pBCKS + *lpg 0549-0553*	4746	Cm
DH5a(p9E11)	pBCKS + *lpg 2037-2040*	2410	Cm
DH5a(p10A2)	pBCKS + *lpg 0200-0203*	2852	Cm
DH5a(p10B5)	pBCKS + *lpg 1461-1463*	2928	Cm
DH5a(p10F7)	pBCKS + *lpg 2043-2049*	5013	Cm
DH5a(p4G5)	pBCKS + *lpg 0553-0557*	3904	Cm
DH5a(p9F3)	pBCKS + *lpg 2304-2311*	5268	Cm
DH5a(p9F11)	pBCKS + *lpg 1868-1874*	5982	Cm
DH5a(p10C12)	pBCKS + *lpg 1978*	656	Cm
DH5a(p10E7)	pBCKS + *lpg 2043-2049*	5015	Cm
DH5a(p10F8)	pBCKS + *lpg 0293*	649	Cm

Tabelle 2-10: Auflistung erzeugter Plasmide für Mutagenese und Komplementation. Die verwendeten Klonierungsfragmente stammen aus *L.pn*. Phil-1.

Plasmid-bezeichnung	Konstrukt	Größe des Inserts (bp)	AB-Resistenz	Restriktionsfragment/Amplifizierungs-Primer
DH5a(pES50)	pGEMTez + *lpg 2166:tn5*		Amp	*2166*reIntNotfw / *2166*reIntXmarv
DH5a(pES56)	pGEMTez + *lpg 0721:tn5*		Amp	*lpg721*fw / *lpg721*rv
DH5a(pES57)	pGEMTez + *lpg 1369:tn5*		Amp	*lpg1369*fw / *lpg1369*rv
DH5a(pES62)	pJQ200 ΔsacB		Genta	
DH5a(pES65)	pES62 + *lpg 2166*		Genta	*lpg2166*PSacIfw / *lpg2166*rv
DH5a(pES64)	pES62 + *lpg 1369*		Genta	*lpg1369* PfwSacI / *lpg1369* rv
DH5a(pES63)	pES62 + *lpg 0721*		Genta	*lpg0721*fw_SacI / l*pg0721*_XbaI rv

2.8.2 Verwendete Oligonukleotide

Tabelle 2-11: Auflistung verwendeter Oligonukleotide

Primer	Primer Nr.	Sequenz	Anwendung
Inv-1 EZTN	378	5´-ATggCTCATAACACCCCTTgTATTA-3´	Inverse PCR
Inv-2 EZTN	379	5´-gAACTTTTgCTgAgTTgAAggATCA-3´	Inverse PCR
kAn_A1_f	70	5´-gACgCTCAgTggAACgAAAAC-3´	Inverse PCR
kAn_b1_r	71	5´-ATgTgCgCggAACCCCTATT-3´	Inverse PCR
KAN-2FP-1	72	5´-ACCTACAACAAAgCTCTCATCAACC-3´	Inverse PCR
KAN-2RP-1	73	5´-gCAATgTAACATCAgAgATTTTgAg-3´	Inverse PCR
KANeztn FP	460	5´-ggCAATCAggTgCgACAATCTATC-3´	Inverse PCR
KANeztn RP	461	5´-AACTCACCgAggCAgTTCCATAgg-3´	Inverse PCR
lpg0089fw	962	5´-TTCCggAACACCAATgATAAg-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg0089rv	963	5´-gCAACTgCTCTgATAACTCTCg-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg0203fw	805	5´-ACCAggTAgCgAgCCATATCATTCTT-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg0203rv	806	5´-CCCAgCAAAggATAgCCATAAgAg-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg0226fw	914	5´-TCCTACAgATAATgggTTTggTT-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg0226rv	915	5´-ATgACATCTgTATACTCCCTTTTAg-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg0275fw	807	5´-TgTTAATAAATgCTTCAggTTgC-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg0275rv	808	5´-ATgCAATTAATgACAACAAACgACTT-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg0293fw	916	5´-AACCAgTCTTTgCATTATTAgTATTTCA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg0293rv	917	5´-CAgCggCTTCAATggATgTTT-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg0518fw	839	5´-TgTgTTCATAAATAAggATAgAgACg-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg0518rv	840	5´-TTCTTgTCTTACCATTTgTTTTCAT-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg0721RTfw	1060	5´-gCCTgCTTTAATgCCTTTCTTg-3´	RT-PCR
lpg0721RTrv	1061	5´-CATCTTAACCAgCCTgTgACCTT-3´	RT-PCR
lpg0731fw	960	5´-AATTACCTTTCCTggCTgTTTTg-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg0731rv	961	5´-TATgCggCAAATTTggCTTAC-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg1115fw	893	5´-gACTACCTCgATATCgCACAAAT-3´	Verifizierung TN5-Insertion

lpg1115rv	894	5´-TTAAACgATTCAACCCCAAACC-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg1335fw	964	5´-gTTAACgTATAAATTCgCTgTgTgA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg1335rv	965	5´-CAAACCATgggAAgCgTAAAg-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg1340fw	809	5´-ATCgggTACAgTAAATTCACAACAA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg1340rv	810	5´-TACTCATTTTTCTTACTCCTTTTTAT-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg1352fw	759	5´-TAgCCAATggTAAgTgCCTgTT-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg1352rv	760	5´-CTACATATACgTCAgTCATCCTAATTC-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg135fw	739	5´-CgCAATTggATgATCTgATAgCTgAAAAC-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg135rv	740	5´-ATTCgATTTCACCTTCTTgCCCTTCT-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg1366fw	871	5´-TAATgATAAAggggATgTgCT-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg1366rv	872	5´-CCgCAATAATAATgAgATgTCg-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg1369fw	813	5´-TTTTTAgCgCTATCCCCTTgAA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg1369PfwSAcI	1029	5´-ACgAgCTCTgCCAACAACCCCAC-3´	Klonierung pES64
lpg1369RTfw	1056	5´-AgTTgggAAgAggCAgTAgAAAAT-3´	RT-PCR
lpg1369RTrv	1057	5´-CAAATCgTAAATATCggggTAAAA-3´	RT-PCR
lpg1369RTrv_1	1088	5´-TgCgACTAACATATTCCTCCAg-3´	RT-PCR
lpg1369rv	814	5´-ATTTTTgAgCCTTTTTATTTTATgTT-3´	Verifizierung TN5-Insertion; Klonierung pES64
lpg1379fw	761	5´-ggAggTAgTTgACTggTgTATgAT-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg1379rv	762	5´-TTCTgACATAAACCTgCTCCTT-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg1489fw	815	5´-TTTggTAAgAATAATATAAgCACAC-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg1489rv	816	5´-gCAgAAACgggCAAATAAATAgTA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg150fw	741	5´-AgTgAgTTTAgCTTTgCCTgATTTTgAA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg150rv	742	5´-ATCAgCTTTTCATATgTCCATTTCgTgT-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg1588fw	928	5´-CAggCTTTggATTgCTTATT-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg1588rv	929	5´-TATAATgCgAgCACACTAACCA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg1602fw	910	5´-CTgCTAAgggAgTATgggAgAAATC-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg1602rv	911	5´-TTATgCggCTTTgAAgTTTTgAA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg1639fw	920	5´-CTTTgTTgCAgCAggTTTAgg-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg1639rv	921	5´-CCAgAAggAAggCgAgTAAT-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg1754fw	817	5´-TAAgCCTAAAgAAAATAATCAAAAA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg1754rv	818	5´-ATgTCAgATTgCAATgCTAAAgTgg-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg1831fw	926	5´-CAAAgCACTAgggCgAAAAA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg1831rv	927	5´-CTCTTgCAgTTgCCCTTTCT-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg1890fw	895	5´-TggAgACAATATgCCCCTTACTT-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg1890rv	896	5´-CTATTTggggATTgCCgTTATT-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg2080fw	891	5´-ACCAATAATCAgTgCTgTTCTAAAA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg2080rv	892	5´-gCTTTTTACCATCCTTTCCTgA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg2116fw	1034	5´-TgATCAAATCACCTCTTTTTgAgg-3´	RT-PCR
lpg2116rv	1035	5´-CTATCCTAAgCCCTTCTACTCgTTC-3´	RT-PCR
lpg2150fw	819	5´-ATTggATAAAAACATACACAgAAAAA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg2150rv	820	5´-gAgTgTAAgCATTgTTTgTTCAT-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg2166fw	444	5´-gAAgACCggTgTAAATTTATgACTC-3´	Verifizierung TN5-Insertion; RT-PCR

lpg2166PSAcIfw	690	5´-ggAgCTCCTgATTAATAATCACgACT-3´	Klonierung pES65
lpg2166rv	445	5´-CgTgCTgAACTCCCACTTATTCCTg-3´	Verifizierung TN5-Insertion; Klonierung pES65; RT-PCR
lpg2251fw	821	5´-AAAAATgATTgCTACCTTAAAAACCTAT-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg2251rv	822	5´-TAAggCgTAggTAATCgTAggTATCA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg227fw	743	5´-TTACCCACAggCgAggCAAAAgAT-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg227rv	744	5´-TgCCAAAgCCTCATCAgACTCCAAACC-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg241fw	745	5´-TATAgTgTCCCTCATCATTTTgTTTCCAgA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg241rv	746	5´-ggCTCACCATTCTATAACgCTCTTTTT-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg2450fw	956	5´-TggTTTTgTTAATTACCCCAgAgAA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg2450rv	957	5´-gAATCTTCCCCAgCCAATAAAAC-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg2452fw	823	5´-TTggCAgTgTTTgTAAATAATAgg-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg2452rv	824	5´-ACAAAAATCAAgggTTCCATAgA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg2511fw	922	5´-CggTTgTgTTgAggCgTATg-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg2511rv	923	5´-TAATCCTCTCACAgCCAAATAgTg-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg2567fw	825	5´-TTTTTATTTgCCTACTgCTgTCTTATTA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg2567rv	826	5´-CTggATAAAggAgTACAACgACgAA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg2589fw	827	5´-TTggAACTAACTCAgAAATTgTCACTAT-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg2589rv	828	5´-CTCCTCAgCCCAAACgACTCA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg2625fw	924	5´-CgTgATATTCCgCATTTTCTTT-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg2625rv	925	5´-AAgTTATTTAATgCCgTTggATgT-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg2660fw	829	5´-TATCTTTAAATTggCAgggTTgTT-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg2660rv	830	5´-ATAAATCgCggCTTCATACTgC-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg2803fw	873	5´-CTTgATgAggAACCACCgTAAT-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg2803rv	874	5´-TTgCTCTCgAAAgTggCTAAT-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg2886_A1_fw	609	5´-gTCgCCCggAgTTTATTgA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg2886_b1_r	610	5´-ACTCCgggCgACAATCAg-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg2911fw	833	5´-ggATCCCCATgAgTATTTTTC-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg2911rv	834	5´-TTCTCCAAATCTAgCATAAgg-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg2944fw	835	5´-CAAgCgTgAATTCATAgACAA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg2944rv	836	5´-CTCgACTCATCCAATCAAAAC-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg2971fw	837	5´-CAAggAgTgTTCTAATggCAATCAA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg2971rv	838	5´-TTCCAgCAATTTCTACATCggTTTA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg376fw	747	5´-ATAAAgACggggTTCCATTCA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg376rv	748	5´-ATgATAATTgAAgAggggAAACT-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg483fw	749	5´-AAggAAgTATTATTATggATTTTgTA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg483rv	750	5´-AATTATTTTAggACAACTCgTg-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg643fw	751	5´-TCCTgACTATACAAAAACgAgCAT-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg643rv	752	5´-TAgTCCTTTTACCTTgTTTTTATTATTg-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg643rv	752	5´-TAgTCCTTTTACCTTgTTTTTATTATTg-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg646fw	753	5´-CACgTTATTAAAATgATgAAAAA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg646fw	753	5´-CACgTTATTAAAATgATgAAAAA-3´	Verifizierung TN5-Insertion

lpg646rv	754	5´-ggggAgAgggTAAgggAgAggggTAA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg646rv	754	5´-ggggAgAgggTAAgggAgAggggTAA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg720/21fwSAcI	1032	5´-ATgAgCTCTTCATgAgCTTCCCCTTAgTA-3´	Klonierung pES63
lpg720/21fwSAcI	1032	5´-ATgAgCTCTTCATgAgCTTCCCCTTAgTA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg720/21rvApAI	1033	5´-gAgggCCCCTTgTCgCAggTATCCAC-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg720/21rvXbAI	1092	5´-gATCTAgACTTgTCgCAggTATCCACA-3´	Klonierung pES63
lpg720/21rvXbAI	1092	5´-gATCTAgACTTgTCgCAggTATCCACA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg721fw	755	5´-TCAAgCATTAACAggggAAgATA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg721fw	755	5´-TCAAgCATTAACAggggAAgATA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg721rv	756	5´-gTTggTTgggATCACTgTCTg-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg721rv	756	5´-gTTggTTgggATCACTgTCTg-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg769fw	757	5´-gTCgCgCAATACAAgAACTACTA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg769fw	757	5´-gTCgCgCAATACAAgAACTACTA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg769rv	758	5´-ATggACCAATTgTAAAAggCTgAC-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg769rv	758	5´-ATggACCAATTgTAAAAggCTgAC-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg960fw	958	5´-CTgAACgTAACCAACTgCgAAgAT-3´	Verifizierung TN5-Insertion
lpg960rv	959	5´-ACTgATTgCTAACggCCTTTgTAA-3´	Verifizierung TN5-Insertion
pBC_A1_f	212	5´-ggTTTTCCCAgTCACgA-3´	Sequenzierung
pBC_b1_r	213	5´-CgCgCAATTAACCCTCAC-3´	Sequenzierung
pES62_fw	1100	5´-gTgCgTAACTAACTTgCCATCTTC-3´	Sequenzierung
pES62_rv	1099	5´-CgCggAgTTgTTCggTAAA-3´	Sequenzierung
pGEMT_A1_f	218	5´-CCAgTCACgACgTTgTAAAA-3´	Sequenzierung
pGEMT_b1_r	219	5´-TTCCggCTCgTATgTTgTgT-3´	Sequenzierung
pJQ200fw	1030	5´-gCACgTAgATCACATAAgCACCAA-3´	Sequenzierung
pJQ200rv	1031	5´-gTgTAgCTCTTTggCATCgTCTCT-3´	Sequenzierung
RTgyr_A1f	285	5´-CACATATggCCggCTTTAgAg-3´	RT-PCR
RTgyr_b1r	286	5´-TCgCgCTTgTTTTgCTgAg-3´	RT-PCR

2.8.3 Verwendete Bakterien und Zellen

Tabelle 2-12: Auflistung verwendeter Bakterien und Zellen

Bakterienstamm / Zelllinie	Katalog-Nr.	Herkunft
Escherichia coli BL21	C161003	Invitrogen
Escherichia coli DH5α	18258-012	Invitrogen
Escherichia coli Top10	C664-55	Invitrogen
Escherichia coli DH5α (pKH192=pBC-KS + *plaB*Corby),	-	K.Heuner
L. pneumophila Sg1 Philadelphia-1	33152	ATCC
L. pneumophila Sg1 130b	Baa-74	Stamm Wadsworth, ATCC

L. pneumophila Sg1 Corby	-	Jepras et al., 1985
L. pneumophila Sg1 Philadelphia-1 JR32	-	Tamara McNealy, Ulm
L. pneumophila Sg1 Paris		C.Buchrieser
L. pneumophila Sg1 Philadelphia-1 *proA-Mutante Kl. 1-1*	-	A.Flieger
A. castellanii	30234	ATCC
U937 Makrophagen	CRL-1593.2	ATCC
A549 Epithelzellen	CCL-185	ATCC

2.9 Verwendete und erzeugte gentechnisch veränderte Organismen (GVO)

Tabelle 2-13: Auflistung verwendeter und erzeugter GVOs für die *Lpn*. Phil-1 Genbank in *E.coli* DH5α.

Bezeichnung GVO	Klon-Nr.	Konstrukt	Bemerkung
E. coli			
DH5α (pBCKS)	1	pBCKS	Kontrollklon Screen *E.coli*-Bank
DH5α (p2C3)	1	pBCKS + *lpg 2218-2220*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p2B8)	1	pBCKS + *lpg 2083-2087*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p3H12)	1	pBCKS + *lpg 0466-0471*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p4B4)	1	pBCKS + *lpg 0986-0989*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p4D5)	1	pBCKS + *lpg 0711-0714*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p3E10)	1	pBCKS + *lpg 2629-2634*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p5A1)	1	pBCKS + *lpg 1602-1603*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p5C2)	1	pBCKS + *lpg 0983-0986*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p5E5)	1	pBCKS + *lpg 0418-0422*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p5F5)	1	pBCKS + *lpg 0711-0713*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p6H4)	1	pBCKS + *lpg 0029-0033*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p6F7)	1	pBCKS + *lpg 2297-2298*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p7D5)	1	pBCKS + *lpg 0697-0699*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p7G2)	1	pBCKS + *lpg 1240-1245*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p7A9)	1	pBCKS + *lpg 0961-0962*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p7B10)	1	pBCKS + *lpg 2524-2527*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p8F4)	1	pBCKS + *lpg 694*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p8A8)	1	pBCKS + *lpg 2754; 2584*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p8B8)	1	pBCKS + *lpg 1320-1321*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p8C8)	1	pBCKS + *lpg 2244*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α

DH5α (p8E7)	1	pBCKS + *lpg 0992-0998*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p1G2)	1	pBCKS + *lpg 0469-0471*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p11A7)	1	pBCKS + *lpg 0688-0691*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p11B10)	1	pBCKS + *lpg 1683*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p11C12)	1	pBCKS + *lpg 2224-2227*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p11E12)	1	pBCKS + *lpg 0803-0805*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p12A5)	1	pBCKS + *lpg 0226-0229*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p12B2)	1	pBCKS + *lpg 0998-1006*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p12D6)	1	pBCKS + *lpg 0234; 0023*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p12F3)	1	pBCKS + *lpg 1592-1597*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p12H4)	1	pBCKS + *lpg 2528-2529*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p12C11)	1	pBCKS + *lpg 1036-1048*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p13B4)	1	pBCKS + *lpg 2156*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p13B5)	1	pBCKS + *lpg 1331*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p13D3)	1	pBCKS + *lpg 2695-2698*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p13E3)	1	pBCKS + *lpg 0293-0296*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p13G6)	1	pBCKS + *lpg 1607; 2061*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p13A9)	1	pBCKS + *lpg 0099*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p13E7)	1	pBCKS + *lpg 1509-1514*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p13H7)	1	pBCKS + *lpg 2645-2647*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p9D6)	1	pBCKS + *lpg 0419*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p9C2)	1	pBCKS + *lpg 0549-0553*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p9E11)	1	pBCKS + *lpg 2037-2040*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p10A2)	1	pBCKS + *lpg 0200-0203*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p10B5)	1	pBCKS + *lpg 1461-1463*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p10F7)	1	pBCKS + *lpg 2043-2049*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (p10F8)	1	pBCKS + *lpg 0553-0557*	Klon aus *Lpn*. Phil-1 Genbank in DH5α
DH5α (pES50)	1	pGEMTez + *lpg 2166:tn5*	Klonierungswirt Plasmid für Homologe Rekombination
DH5α (pES56)	8	pGEMTez + *lpg 0721:tn5*	Klonierungswirt Plasmid für Homologe Rekombination
DH5α (pES57)	4	pGEMTez + *lpg 1369:tn5*	Klonierungswirt Plasmid für Homologe Rekombination

Tabelle 2-14: Auflistung verwendeter und erzeugter GVOs in *L. pneumophila*.Genauer Insertionsort des Transposons siehe Tab.4-4.

Bezeichnung GVO	Klon-Nr.	Konstrukt	Bemerkung
L. pneumophila			
Philadelphia-1			
D33		*lpg2686*::EZ-Tn5	P.Bless
P6C5		EZ-Tn5 Insertionsort unbekannt	Mutante aus Screen
P16D1		EZ-Tn5 Insertionsort unbekannt	Mutante aus Screen
P16B5		*lpg0025*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P3C6		*lpg0089*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P4D1		*lpg0135*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P17A5		*lpg0150*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P25B6		*lpg0203*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P23D3		*lpg0226*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P23D1		*lpg0227*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P19A5		*lpg0241*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P21A4		*lpg0275*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P23D2		*lpg0275*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P21C5		*lpg0293*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P6C6		*lpg0376*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P7B3		*lpg0483*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P21B4		*lpg0518*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P19C2		*lpg0643*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P7A4		*lpg0646*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P8C2		*lpg0721*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P6D3		*lpg0731*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P12A6		*lpg0769*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P14D4		*lpg0960*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P15B2		*lpg1115*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P23A1		*lpg1115*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P16A3		*lpg1335*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P14D1		*lpg1340*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P24B6		*lpg1352*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P26A3		*lpg1366*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P5A2		*lpg1369*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P20C1		*lpg1379*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P16C5		*lpg1489*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P7D6		*lpg1588*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P17C2		*lpg1602*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P14C4		*lpg1639*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P10A3		*lpg1754*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P8A1		*lpg1831*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P4B4		*lpg1890*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P4C5		*lpg1890*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P18C3		*lpg2080*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P17B5		*lpg2150*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P5A1		*lpg2166*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P9A6		*lpg2251*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen

P6D6		*lpg2450*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P14A6		*lpg2452*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P14A3		*lpg2511*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P18C4		*lpg2567*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P19A1		*lpg2589*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P11C5		*lpg2625*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P10C4		*lpg2660*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P16B2		*lpg2803*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P8D2		*lpg2886*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P11B3		*lpg2911*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P25D6		*lpg2944*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P15B3		*lpg2944*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
P7B1		*lpg2971*::EZ-Tn5	Mutante aus Screen
Wildtyp (pES62)	1	pES62 = pJQ200 ΔsacB	
lpg2166::EZ-Tn5	1		Insertionsmutante homologe Rekombination mit pES50
lpg2166::EZ-Tn5	1	pES62 = pJQ200 ΔsacB	Leervektor
lpg2166::EZ-Tn5	1	pES65 = pES62 + *lpg2166*	Komplementation
htpG::EZ-Tn5	1		Insertionsmutante homologe Rekombination mit pES57
htpG::EZ-Tn5	1	pES62= pJQ200 ΔsacB	Leervektor
htpG::EZ-Tn5	1	pES64= pES62 + *htpG*	Komplementation
lpg0721::EZ-Tn5	1		Insertionsmutante homologe Rekombination mit pES56
lpg0721::EZ-Tn5	1	pES62 = pJQ200 ΔsacB	Leervektor
lpg0721::EZ-Tn5	1	pES63 = pES62 + *lpg0721*	Komplementation
Philadelphia-1 JR32			
Wildtyp (pES62)	1	pES62 = pJQ200 ΔsacB	
lpg2166::EZ-Tn5	1		Insertionsmutante homologe Rekombination mit pES50
htpG::EZ-Tn5	1		Insertionsmutante homologe Rekombination mit pES57
htpG::EZ-Tn5 (pES62)	1	pES62 = pJQ200 ΔsacB	Leervektor
htpG::EZ-Tn5 (pES64)	1	pES64 = pES62 + *htpG*	Komplementation
lpg0721::EZ-Tn5	1		Insertionsmutante homologe Rekombination mit pES56
lpg0721::EZ-Tn5 (pES62)	1	pES62 = pJQ200 ΔsacB	Leervektor
lpg0721::EZ-Tn5 (pES63)	1	pES63 = pES62 + *lpg0721*	Komplementation
130b			
Wildtyp (pES62)	1	pES62 = pJQ200 ΔsacB	
lpg2166::EZ-Tn5	1		Insertionsmutante homologe Rekombination mit pES50
lpg2166::EZ-Tn5 (pES62)	1	pES62 = pJQ200 ΔsacB	Leervektor
lpg2166::EZ-Tn5 (pES65)	1	pES65 = pES62 + *lpg2166*	Komplementation
Paris			
Wildtyp (pES62)	1	pES62 = pJQ200 ΔsacB	
lpp2104::EZ-Tn5	1		Insertionsmutante homologe Rekombination mit pES50

2.10 Kulturmedien für Bakterien und Zellen

Tabelle 2-15: Auflistung verwendeter Nährmedien zur Anzucht von *L. pneumophila*

BYE-Flüssigmedium (BYE: Buffered Yeast Extract)	BCYE-Agar-Platten (BCYE: Buffered Charcoal Yeast Extract)
10 g Hefeextrakt **14,45 g *Legionella* Wachstums-Supplement:** 10 g ACES Puffer 2,8 g KOH 1,0 g α-Ketoglutarat-Monoessigsäure-Salz 0,4 g L-Cystein HCl H_2O_{bidest} zu 1000 ml Das *Legionella* Wachstums-Supplement wurde mit Hefeextrakt in H_2O_{bidest} gelöst und sterilfiltriert.	**27,5 g *Legionella* Basis-Agar**: 10 g Hefeextrakt 1,5 g Aktivkohle 16 g Agar **14,45 g *Legionella* Wachstums-Supplement:** 10 g ACES 2,8 g KOH 1,0 g α-Ketoglutarat-Monoessigsäure Salz 0,4 g L-Cystein HCl H_2O_{bidest} zu 1000 ml Der *Legionella* Basis Agar wurde in H_2O_{bidest} suspendiert und autoklaviert. Das Legionella Wachstums-Supplement wurde wie beschrieben angesetzt und nach dem Autoklavieren steril bei 50°C zugegeben.

Tabelle 2-16: Auflistung verwendeter Nährmedien zum Screening von *L. pneumophila*

Legionella-Blut-Agar-Platten	*Legionella*-Casein-Agar-Platten
10 g Hefeextrakt 1,5g Stärke 50ml humanes Erythrozytenkonzentrat **14,45 g *Legionella* Wachstums-Supplement:** 10 g ACES Puffer 2,8 g KOH 1,0 g α-Ketoglutarat-Monoessigsäure-Salz 0,4 g L-Cystein HCl H_2O_{bidest} zu 1000 ml Der *Legionella* Basis Agar wurde in H_2O_{bidest} suspendiert und autoklaviert. Das Legionella Wachstums-Supplement wurde wie beschrieben angesetzt und nach dem Autoklavieren steril bei 50°C zugegeben. Das humane Erythrozytenkonzentrat wurde ebenfalls nach dem Autoklavieren dem Medium zugefügt.	10 g Hefeextrakt 1,5g Stärke 10g Casein **14,45 g *Legionella* Wachstums-Supplement:** 10 g ACES Puffer 2,8 g KOH 1,0 g α-Ketoglutarat-Monoessigsäure-Salz 0,4 g L-Cystein HCl H_2O_{bidest} zu 1000 ml Der *Legionella* Basis Agar wurde in H_2O_{bidest} suspendiert und autoklaviert. Das Legionella Wachstums-Supplement wurde wie beschrieben angesetzt und nach dem Autoklavieren steril bei 50°C zugegeben.
Legionella-Eigelb-Agar-Platten	
10 g Hefeextrakt 1,5g Stärke 30ml Eigelbemulsion (OXOID) 14,45 g Legionella Wachstums-Supplement: 10 g ACES Puffer 2,8 g KOH 1,0 g α-Ketoglutarat-Monoessigsäure-Salz 0,4 g L-Cystein HCl H_2Obidest zu 1000 ml Der *Legionella* Basis Agar wurde in H2Obidest suspendiert und autoklaviert. Das Legionella Wachstums-Supplement wurde wie beschrieben angesetzt und nach dem Autoklavieren steril bei 50°C zugegeben. Das Eigelb wurde ebenfalls nach dem Autoklavieren dem Medium zugefügt.	

Tabelle 2-17: Auflistung der Nährmedien zur Anzucht von *E. coli*

Luria-Bertani (LB)-Flüssigmedium	Luria-Bertani (LB)-Agar-Platten
10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl H_2O_{bidest} zu 1000 ml	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 15 g Agar H_2O_{bidest} zu 1000 ml
Die Bestandteile der beiden Medien wurden zunächst in H_2O_{bidest} gelöst und anschließend autoklaviert.	
SOB-Medium (pH 7,0) (Super Optimal Broth Medium)	**SOC-Medium (Super Optimal Broth-Derivat)**
20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,584 g NaCl 0,186 g KCl H_2O_{bidest} zu 1000 ml	98 ml SOB-Medium 1 ml 2M Mg^{2+} Stammlösung (20,33 g $MgCl_z \times H_2O$ und 24,65 g $MgSO_4$ x 7 H_2O je 100ml Stammlösung) 1 ml 2M Glukose Stammlösung (36,04 g Glukose je 100 ml Stammlösung)
Die Bestandteile wurden zunächst in H_2O_{bidest} gelöst und anschließend autoklaviert.	Vor der Zugabe der Lösungen zum SOB-Medium wurden die Mg^{2+}-Stammlösung autoklaviert und die Glukose Stammlösung sterilfiltriert.

Tabelle 2-18: Auflistung verwendeter Nährmedien zum Screening der *L.pn* Philadelphia Genbank in *E.coli*

LB-Blut-Agar-Platten	LB-Casein-Agar-Platten
10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 15 g Agar H_2O_{bidest} zu 950 ml 50 ml humanes Erythrozytenkonzentrat Das humane Erythrozytenkonzentrat wurde dem Medium nach dem Autoklavieren zugefügt.	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 15 g Agar 10g Casein H_2O_{bidest} zu 1000ml Das humane Erythrozytenkonzentrat wurde dem Medium nach dem Autoklavieren zugefügt.
LB-Eigelb-Agar-Platten	
10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 15 g Agar H_2O_{bidest} zu 970 ml 30 ml Eigelbemulsion (OXOID) Die Eigelbemulsion wurde dem Medium nach dem Autoklavieren zugefügt.	

Tabelle 2-19: Auflistung verwendeter Nährmedien zur Anzucht von *A. castellanii* und zur Infektion der Amöben mit *L. pneumophila*

PYG Kulturmedium (PYG: Peptone-Yeast Extract-Glucose)	Infektionsmedium
20 g Pepton	Bestandteile wie PYG Kulturmedium ohne Pepton,

1 g Hefeextrakt 10 ml 400mM $MgSO_4 \times 7\ H_2O$ 10 ml 40mM $CaCl_2 \times 2\ H_2O$ 10 ml 250mM $Na_2HPO_4 \times 7\ H_2O$ 10 ml 250mM KH_2PO_4 10 ml 5mM $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \times 6\ H_2O$ 2,5 g NaCitrat $\times 2\ H_2O$ 50 ml 2M Glukose 900 ml H_2O_{bidest}	Hefeextrakt und Glukose alle Bestandteile, außer Glukose, wurden in H_2O_{bidest} gelöst und autoklaviert. anschließend wurde die sterilfiltrierte Glukoselösung dazugegeben.

Tabelle 2-20: Auflistung des Nährmediums für die Kultivierung und Infektion von U937 Makrophagen und A549 Lungenepithelzellen

RPMI Kultur- und Infektionsmedium mit 10 % FKS (Roswell Park Memorial Institute Medium)
RPMI 1640 Pulver oder Flüssigmedium 10 % hitzeinaktiviertes FKS Das Medium wurde nach Angaben des Herstellers angesetzt.

Tabelle 2-21: Auflistung verwendeter Antibiotika und deren Endkonzentration im Medium

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration für *L. pneumophila* (µg/ml)	Endkonzentration für *E. coli* (µg/ml)
Ampicillin (amp)	100 g/l H_2O_{bidest}	-	100
Carbenicillin (Carb)	100 g/l H_2O_{bidest}	-	100
Chloramphenicol (Cm)	30 g/l EtOH	6	30
Kanamycinmonosulfat (Km)	50 g/l H_2O_{bidest}	25	50
Gentamycin (Genta)	50 g/l H_2O_{bidest}	5-10	5-10

Die Stammlösungen wurden sterilfiltriert, Aliquots bei -20°C gelagert und den autoklavierten Medien in den angegebenen Endkonzentrationen zugesetzt.

2.11 Verwendete Software

Tabelle 2-22: Auflistung verwendeter Software

Datenbank	Adresse
Biocyc	http://www.biocyc.org/
Compute pI/MW tool	http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html
KEGG	http://www.genome.jp/kegg/
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
PEDANT	http://pedant.gsf.de/
PSORT	http://www.psort.org/psortb
Sequenz-Alignment	http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html
SignalP 3.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
VirulentPred	http://www.bioinfo.icgeb.res.in/virulent/submit.html
Programme	**Hersteller**
Acolyte (Koloniezählprogramm)	Symbiosis
Bio 1D	Vilber Lourmat
Delta 2D	Decodon
Lasergene 8	DNASTAR, Inc.
Magellan V5.03	Tecan
PrimeView & PrimeView Evaluation	Amersham
Quantity One	Bio-Rad

3 Methoden

3.1 Anzucht von Bakterien

3.1.1 *Legionella pneumophila*

Bei –80°C gelagerte Legionellen wurden mittels einer sterilen Impföse auf BCYEα Agar ausgestrichen („Mutterplatte") und nach 2 Tagen Inkubation bei 37°C entweder für ca. 1 Monat bei 4°C gelagert oder wiederum auf BCYEα Agar überimpft („Tochterplatte"). Plasmid tragende Bakterien wurden auf BCYE-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotikakonzentrationen angezogen (s. Tabelle 2-21)
Für Infektionen wurden die Kulturen für 2 bis 3 Tage bei 37°C auf Festagar inkubiert. Flüssigkulturen hingegen wurden auf Festmedium für 1 1/2 Tage bei 37°C bebrütet und anschließend zum Animpfen einer Vorkultur in BYE-Nährbouillon mit/ohne Antibiotika verwendet. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C und 250rpm geschüttelt. Nach photometrischer Bestimmung der optischen Dichte bei 660nm wurde die Hauptkultur auf eine OD_{660} von 0.3-0.4 eingestellt und unter Schütteln bis zur späten (OD_{660} ~2,0) exponentiellen Phase kultiviert.
Zur Herstellung von Zellpelletlysaten und Kulturüberständen für Aktivitätstests erfolgte die Zellernte mittels Zentrifugation bei 5000×g für 5min. Kulturüberstände wurden mit 1/50 Volumen an 300mM NaN_3 versetzt und bei 4°C, Bakterienpellets bis zum Zellaufschluss bei –20°C gelagert.

3.1.2 *E.coli*

Die Kultivierung von *E.coli* Wildtypen (s. Tabelle 2-12) und die der mit Plasmiden transformierten Stämme (s. Tabelle 2-13) erfolgte aus Glyzerolstockkulturen (s. 3.2.1.4) auf entsprechenden LB-Agarplatten für 18-24h bei 37°C. Ebenso wie bei *L. pneumophila* wurden *E. coli* Stämme auf Tochterplatten überimpft. Von diesen wurden Vorkulturen inokuliert und anschließende Hauptkulturen bei Erreichen einer OD_{660} ~2.0 geerntet.
Zur Anzucht der *E. coli* Zellen für die Präparation von extrachromosomaler DNA wurden entsprechende Kolonien gepickt und auf eine frische Antibiotika-haltige LB-Agarplatte überimpft, bevor diese zur Inokulation der Präparationskultur verwendet wurde. 2ml einer Übernachtkultur (OD_{600nm}~1,8-2) wurden pelletiert und anschließend die Plasmid-DNA extrahiert.

3.1.3 Herstellung von Glyzerolgefrierkulturen

Zur Erzeugung von Langzeitkulturen wurden *L. pneumophila* und *E. coli* 1-2 Tage auf den zugehörigen Selektivagarplatten angezogen, bis sich ein gut bewachsener Rasen gebildet hatte. Anschließend wurde eine volle Impföse des jeweiligen Stammes in der zugehörigen Nährbouillon ohne Antibiotika resuspendiert und im Volumenverhältnis 1:1 mit sterilem Glyzerol vermischt. Die Lagerung der Kulturen erfolgte bei -80°C.

3.1.4 Anzucht von A549 Lungenepithelzell-, U937 Makrophagen- und *Acanthamoeba*-Zellkulturen

Die in flüssigem Stickstoff in Kulturmedium (PYG bzw. RPMI) + 10%DMSO eingefrorenen Zellen wurden bei 37°C im Brutschrank aufgetaut und 2min bei 1000×g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in Kulturmedium resuspendiert und erneut bei 1000×g für 10min pelletiert. Daraufhin wurden die Zellen erneut in Kulturmedium resuspendiert (10ml) und in ein Kulturgefäß überführt. Nach 3 (*A. castellanii*) bzw. 10 Tagen Inkubation (U937, A549) bei 37°C und 5% CO_2 wurden die Zellen erstmalig passagiert. Anschließend wurden die Zellen in Intervallen von 3 bis 4 Tagen regelmäßig passagiert (maximal 30-mal), wobei das Verhältnis von 1:10 bis 1:12 (v/v), Zellen zu Wachstumsmedium, bei den jeweiligen Inkubationslängen berücksichtigt wurde.

3.2 Isolierung von Nukleinsäuren

3.2.1 DNA-Isolierung

3.2.1.1 Präparative Reinigung genomischer DNA

Für die Erstellung der Genbank in *E.coli* wurde genomische DNA von *L.pn.* Phil-1 präparativ gereinigt. Eine 100ml ü.N. Kultur von *L.pn.* Phil-1 wurde dazu bei 4000rpm 15min bei 4°C pelletiert. Das Pellet wurde in 3ml STE-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit 300µl einer frischen Lysozymlösung (10mg/ml Lysozym in 10mM Tris-HCL) und 30µl RNase (10mg/ml) versetzt und für 90min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 210µl SDS (10%) und 60µl Proteinase K (18,6mg/ml) wurde die Suspension weitere 45min bei 65°C inkubiert. Nach Lyse der Zellen wurde 600µl einer übersättigten NaCl-Lösung (6M) dazugegeben und die Lösung durch invertieren vorsichtig durchmischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zugabe von 4,5ml RotiPhenol, vorsichtiges Mischen und

Zentrifugation für 15min bei 8500rpm und 4°C. Die obere Phase, welche die genomische DNA enthält wurde abgenommen und mit 2,88ml Isopropanol versetzt und mehrmals invertiert. Mittels einer Spitze wurde das DNA-Knäuel in ein neues Eppendorfgefäß überführt und zweimal mit Ethanol (70%) gewaschen. Anschließend wurde die gDNA in der Speedvac getrocknet und in 500µl ddH_2O ü.N. durch Schütteln bei RT resuspendiert. Die DNA wurde anschließend durch Messung der Absorption bei 260nm im Spektrophotometer quantifiziert. Die qualitative Bewertung erfolgte durch Bildung des Quotienten der Absorptionen bei 260nm und 280nm.

3.2.1.2 Isolierung extrachromosomaler DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mittels des Kits „*Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System*" der Firma Promega nach dem Protokoll des Herstellers. Die hiermit gewonnene DNA wurde quantitativ durch Messung der Absorption bei 260nm im Spektrophotometer bestimmt und für weitere Experimente, wie z.B. Restriktion durch Endonukleasen und Sequenzierreaktionen verwendet.

3.2.2 RNA-Isolierung

Die Isolierung erfolgte mit Hilfe des peqGOLD RNAPure™ Reagenz (PeqLab), einer optimierten Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode zur Extraktion von RNA humanen, tierischen und bakteriellen Ursprungs. Hierbei wurde, nach Angaben des Herstellers, 1ml peqGOLD RNAPure™ zu 500µl einer Bakterienkultur der OD_{660}=2 und mit dem empfohlenen Protokoll fortgefahren. Isolierte RNA wurde in 40µl H_2O gelöst und quantitativ/qualitativ im Spektrophotometer bestimmt.

3.2.3 Fällung von Nukleinsäuren mittels Ethanol

Um nach erfolgter Ligation von Fragmenten reine und aufkonzentrierte DNA zu erhalten, wurde die Nukleinsäure mittels EtOH gefällt. Die zu fällende Lösung wurde mit einer Endkonzentration an 0,3M NaAc pH7,0 und dem doppelten Volumenanteil an unvergälltem 95%igen (v/v) EtOHs vermischt und anschließend für 15min bei 16000×g und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das unsichtbare DNA-Präzipitat mit 70% (v/v) EtOH versetzt und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend für ca. 15min bei 37°C getrocknet, in 2µl

sterilem 10%igem (v/v) Glyzerol aufgenommen und sofort in *E. coli* DH5α transformiert.

3.2.4 Nukleinsäure-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte mittels 1 bis 2%igen (w/v) Agarosegelen in 1×TAE-Puffer. Die Proben wurden mit etwa 0,2 Volumenanteilen Probenpuffer (s. Tabelle 2-5) versetzt und bei 105 bis 140V bis zur angestrebten Laufstrecke aufgetrennt. Die anschließende Färbung der Nukleinsäurebanden erfolgte für ca. 20min im Ethidiumbromid-Bad (2μg/ml EtBr in TAE) und wurde im UV-Transilluminator bei 254nm dokumentiert.
Bei präparativen Gelen wurden die Banden mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und unter Verwendung des „*Wizard SV Gel & PCR cleanup System*" eluiert.

3.3 Modifikation von Nukleinsäuren

3.3.1 Verdau mit Restriktionsendonukleasen/Dephosphorylierung

Die Restriktion mittels TypII Restriktionsendonukleasen erfolgt spezifisch innerhalb ihrer Erkennungssequenz an doppelsträngiger DNA. Alle Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs (NEB) erworben und mit den zugehörigen Puffern in die jeweiligen Reaktionen eingesetzt. Für den Verdau von 1µg DNA wurden 10U an Enzym in einem Reaktionsvolumen von meist 20µl verwendet und für 2-12h bei 37°C (Temperatur ist abhängig von dem verwendeten Enzym) inkubiert. Zur Überprüfung erfolgter Restriktion wurden die Fragmente auf ein 1%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch ihrer Größe nach aufgetrennt.
Für die Ligation glatter Enden wurde der geschnittene Vektor mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase (Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP, Roche) dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors zu minimieren. Hierzu konnte der hitzeinaktivierte Restriktionsenzym/DNA-Mix ohne einen zusätzlichen Reinigungsschritt verwendet werden. Nach Zugabe von SAP-Puffer und 1U an SAP-Enzym wurde der Ansatz 60min bei 37°C inkubiert und anschließend für 15min bei 65°C inaktiviert.
Um die Puffer- und Enzymreste zu entfernen, wurden die Fragmente mittels des „*Wizard SV Gel & PCR cleanup System*" (Promega) entweder direkt aus dem

PCR-Ansatz oder nach erfolgter Elektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten und gereinigt. Die Konzentrationsbestimmung für anschließende Ligationsansätze wurde photometrisch mit Hilfe eines NanoDrop-Gerätes durchgeführt.

3.3.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe der DNA Ligase des Bakteriophagen T4. Dabei wurde die Ligation meist in einem Reaktionsvolumen von 10µl durchgeführt. Ungefähr 50ng an Vektor-DNA wurde im molaren Verhältnis von 1:3 mit dem zu insertierenden DNA-Fragment vermischt und unter Zugabe von 400U T4 DNA Ligase für 15-18h bei 16°C oder für 3h bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze für 10min bei 65°C hitzeinaktiviert und mittels EtOH-Fällung für die Transformation in die jeweiligen Bakterienstämme vorbereitet.

3.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der exponentiellen Amplifikation von Nukleotid-Fragmenten. In dieser Arbeit wurde zu Klonierungszwecken die DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (*Pfu* DNA-Polymerase) und zur Überprüfung positiver Klone, mittels Kolonie-PCR, die DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (*Taq* DNA-Polymerase) verwendet. Die Reaktionsansätze wurden in einem Volumen von 25µl angesetzt und hatten folgende Zusammensetzung:

Tabelle 3-1: Reaktionsansatz für eine Standard- und Kolonie-PCR

Komponente	[µl]	Stocklösung	Finale Konzentration
DNA	1 Kolonie (Kolonie-PCR) oder 20-200ng DNA	-	-
Puffer	2,5	10-fach konzentriert	1-fach konzentriert
dNTPs	0,25	10mM jedes dNTP	0,1mM jedes dNTP
Oligonukleotid 1	0,25	50µM	0,1µM
Oligonukleotid 2	0,25	50µM	0,1µM
DNA-Polymerase	1µl (*Pfu*) oder 0,25µl (*Taq*)	2,5U/µl oder 5U/µl	2,5U oder 1,25U
steriles H_2O	zu 25µl Gesamtansatz	-	-

Die Annealingtemperatur wurde den Oligonukleotiden spezifisch angepasst. Für die Kolonie-PCR wurden die zu untersuchenden Zellen vor der PCR mit PCR-Puffer und Wasser für 10min bei 99°C lysiert. Anschließend wurde der Enzym-

Primer-Mix zugegeben und folgendes Standard-Programm zur Amplifikation der gewünschten Produkte verwendet:

Tabelle 3-2: Programm für eine Standard-und Kolonie-PCR

Reaktionsschritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	1	95°C	4 min
2. Dentaurierung	30	95°C	40 sek
3. Primer-Bindung (Annealing)	30	50-65°C	40 sek
4. Synthese (Elongation)	30	72°C	1-2 min
5. Finale Elongation	1	72°C	10 min
6. Pause	∞	4°C	∞

Amplifizierte DNA-Fragmente wurden auf 1%igen (w/v) Agarosegelen elektrophoretisch überprüft und gegebenenfalls weiter gereinigt.

3.3.4 Reverse Transkriptase–Polymerase Kettenreaktion

Für die Bestimmung der Gen-Expression wurde die Methodik der Reversen Transkription angewandt. Hierzu wurde isolierte RNA von DNA-Kontaminationen durch den Einsatz von TurboTM DNase (Ambion) befreit. 2U Enzym pro 1µg RNA und 1µl RNaseOUT^{TM} wurden in einem Reaktionsvolumen von 10µl für 1h bei 37°C inkubiert, bevor die DNase durch Temperaturerhöhung auf 75°C für 10min inaktiviert wurde. 1µl des DNase-Restriktionsansatzes wurde in weiterführenden RT-PCR-Experimenten eingesetzt. Einzelsträngige cDNA-Synthese und anschließende Amplifikation des Produktes wurde mit Hilfe des „OneStep RT-PCR" Kits der Firma Qiagen durchgeführt.

Tabelle 3-3: Reaktionsansatz für eine RT-PCR

Komponente	[µl]	Stocklösung	Finale Konzentration
RNA	1	~ 100ng/µl	100ng
OneStep RT-PCR Puffer	4	5-fach konzentriert	1-fach konzentriert
dNTP Mix	0,8	10mM jedes dNTP	0,4mM jedes dNTP
RT-PCR Enzym-Mix	0,8	-	-
Oligonukleotid 1	0,3	50µM	0,75µM
Oligonukleotid 2	0,3	50µM	0,75µM
steriles H_2O	12,8	-	-

Das RT-PCR-Profil wurde nach Angaben des Herstellers erstellt, wobei die Annealing-Temperatur der Oligonukleotide an das jeweilige Experiment angepasst wurde.

Tabelle 3-4: Programm für eine Einschritt-RT-PCR

Reaktionsschritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1. Reverse Transkription	1	50°C	30 min
2. Initiale PCR-Aktivierung	1	95°C	15 min
3. Denaturierung	30-50	95°C	40 sek
4. Primer-Bindung (Annealing)	30-50	54-60°C	40 sek
5. Synthese (Elongation)	30-50	72°C	1 min
6. Finale Elongation	1	72°C	10 min
7. Pause	∞	4°C	∞

Um noch vorhandene DNA-Kontaminationen auszuschließen, wurde bei jedem Experiment ein Ansatz mitgeführt, der nach dem Schritt der „Reversen Transkription" zu den anderen Proben in den Thermocycler gestellt wurde. Falls die Proben eine DNA-Kontamination aufweisen, wird auch in diesen Proben ein spezifisches Produkt amplifiziert. Nach erfolgter Reaktion wurden die Amplifikate auf einem 2%igen (w/v) Agarosegel analysiert.

3.3.5 Sequenzierungs-Polymerase Kettenreaktion

Basierend auf der Didesoxy-Methode nach Sanger (4) wurde die DNA-Sequenzierung mit Hilfe von *„ABI BigDye Terminator 3.1 Premix*" (s. Tabelle 3.6) und Plasmid-DNA (in H_20_{bidest} gelöst) durchgeführt. Der Reaktionsansatz und das PCR-Profil wurden wie folgt zusammengesetzt:

Tabelle 3-5: Reaktionsansatz für eine Sequenzierungs-PCR

Komponente	[µl]	Stocklösung	Finale Konzentration
DNA	variabel	~ 300ng/µl	300ng
ABI Puffer	1,5	5-fach konzentriert	0,75-fach konzentriert
BigDye 3.1	1	-	-
Oligonukleotid	0,5	10µM	0,5µM
steriles H_2O	variabel	-	-

Tabelle 3-6: PCR-Programm für eine Sequenzierungs-Reaktion

Reaktionsschritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	1	96°C	2 min
2. Dentaurierung	25	96°C	10 sek
3. Primer-Bindung (Annealing)	25	50-58°C	5 sek
4. Synthese (Elongation)	25	60°C	4 min
6. Pause	∞	4°C	∞

Die elektrophoretische Auftrennung und Fluoreszensdetektion erfolgte durch Mitarbeiter der Sequenziereinheit des Robert Koch-Institutes. Die Analyse der Daten wurde mit Hilfe der Lasergene SeqMan Software (s. Tabelle 2-22) durchgeführt.

3.4 Herstellung und Transformation von elektrokompetenten Zellen

Damit Zellen in der Lage sind, ein DNA-Molekül aufzunehmen, muss deren physiologischer Zustand an die Transformationsbedingungen angepasst werden. Dies kann unter Anwendung der folgenden Methoden geschehen.

3.4.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*

E. coli DH5α und BL21 Stämme wurden über Nacht auf LB-Agarplatten angezogen und zum Animpfen einer 50ml SOB-Vorkultur verwendet. Diese wurde für ca. 16h unter Schütteln bei 37°C inkubiert, um anschließend 0,5ml der Kultur in 500ml frisches SOB-Medium zu überführen und sie für weitere 2-3 Stunden bis zum Erreichen einer OD_{660} von 0,8 schütteln zu lassen. Anschließend wurde das gesamte Kulturvolumen in der gekühlten (4°C) Sorvall RC-5 Zentrifuge für 10min bei 5000×g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet zweimal mit je 500ml eiskaltem 10%igen (v/v) Glyzerol suspendiert und erneut 20min bei 13000×g und 4°C abzentrifugiert. Das nach dem letzten Waschschritt erhaltene Zellpellet wurde in 2ml eiskaltem 10%igen (v/v) Glyzerol aufgenommen, zügig in 20-80µl Aliquots aufgeteilt und bis zum Gebrauch bei –80°C gelagert.

3.4.2 Herstellung elektrokompetenter *L. pneumophila*

Zur Erzeugung elektrokompetenter *L. pneumophila* wurde Koloniematerial, von einer 2-3 Tage auf BCYE-Agar gewachsenen Kultur, mit einer Impföse entnommen und in 1,5ml PBS Puffer suspendiert und bei 4500×g abzentrifugiert. Das so gewonnene Zellpellet wurde zweimal mit 1,5ml eiskaltem 10%igen (v/v) Glyzerol gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 45µl 10%igem (v/v) Glyzerol resuspendiert, in 2 Aliquots aufgeteilt und bis zum Gebrauch bei -80°C aufbewahrt.

3.4.3 Transformation von DNA

Um DNA als linearisiertes Fragment oder als zirkuläres Plasmid in die Zellen einzubringen und diese damit zu „transformieren", muss die Zellemembran temporär permeabilisiert werden. Dies geschieht durch das Anlegen eines elektrischen

Feldes im so genannten Elektroporator und führt zur Porenentstehung, welche mit einer erleichterten Aufnahme von DNA Molekülen verbunden ist.

3.4.3.1 *E. coli*

20µl elektrokompetenter Zellen (s. 3.4.1) wurden mit 2µl, in Glyzerol resuspendiertem, Ligationsansatz in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette und auf Eis vermischt. Die DNA-Aufnahme erfolgte im eisgekühlten Cell Porator bei 330µF, 200 DC Volt und 4kΩ. Transformierte Zellen wurden in 1ml vorgewärmtem SOC-Medium für 1h bei 37°C geschüttelt und anschließend 100µl der Suspension auf Selektivagar ausgebracht. Die restlichen 900µl wurden für 2min bei 3200×g pelletiert, der Überstand abgenommen und die Zellen im Mediumrücklauf erneut resuspendiert und als Ganzes ausplattiert. Die Platten wurden für 18-24h bei 37°C im Brutschrank inkubiert und gewachsene Kolonien in anschließender Kolonie-PCR auf die Aufnahme des Plasmides überprüft.

3.4.3.2 *L. pneumophila*

Die Elektroporation von Legionellen wurde ähnlich zu der von *E. coli* Zellen durchgeführt. 20µl elektrokompetenter *L. pneumophila* wurden mit 20ng des entsprechenden Plasmides vermischt und anschließend im Cell Porator bei 330µF, 400 DC Volt und 4kΩ transformiert. Die Inkubation der Zellen in 2ml BY-E-Bouillon erfolgte für 4-5h unter ständigem Schütteln bei 37°C. Ausplattiert wurde analog zu der Vorgehensweise von *E. coli*, wobei die Inkubation der Platten für 3-4 Tage bei 37°C vollführt wurde.

3.5 Mutagenese von *L. pneumophila*

Zur Mutagenese von *L. pneumophila* wurde die Ausbildung der natürlichen Kompetenz ausgenutzt (Stone and Abu Kwaik 1998; Flieger, Neumeister et al. 2002). 2ml BYE-Flüssigmedium wurden in sterile 15ml Plastik-Röhrchen gegeben. Dabei wurden je Ansatz 2 Parallelproben pipettiert, um unabhängige Mutanten zu erzeugen. Zusätzlich wurden Steril- und Negativkontrollen (ohne DNA) pipettiert. Die Medien wurden auf eine OD_{660} von 0,2 mit 2-3 Tage altem Kulturmaterial angeimpft. Zusätzlich wurden je Ansatz 5 bis 10µg des Plasmids, welches das entsprechende Knockout-Konstrukt trug, zugegeben. Die Kulturen wurden ü.N. (ca. 18h) bei 30°C unter leichtem Schütteln (130rpm) bis zum Erreichen einer OD_{660}

von 1,4 bis 1,9 inkubiert und anschließend auf selektiven Medium (BCYE mit Kanamycin) ausplattiert. Gewachsene Klone wurden mittels Kolonie-PCR auf das Vorhandensein der mutagenisierten DNA Region und auf Abwesenheit der Wildtyp Region überprüft.

3.6 Konstruktion und Screening der *Legionella pneumophila* Genbank in *Escherichia coli*

3.6.1 Partialverdau genomischer DNA

Für die Konstruktion einer Genbank von *L. pn.* Phil-1 in *E.coli* wurde zunächst genomische DNA von *L.pn*. Philadephila mittels eines Restriktionsenzyms in DNA-Abschnitte gewünschter Größe geschnitten. Die angestrebte Größe der DNA-Fragmente lag zwischen 3-5kb. Zur Generierung dieser Fragmente wurde präparativ gereinigte genomische DNA von *L.pn.* Phil-1 partiell mit dem Restriktionsenzym SauIIIA wie folgt restringiert.

Tabelle 3-7: Reaktionsansatz für Partialverdau gDNA *L.pn*. Phil-1

Komponente	[µl]	Stocklösung	Finale Konzentration
gDNA	100µl	940ng/µl	~94µg /100µl
Puffer	100µl	10-fach konzentriert	1-fach konzentriert
BSA	10µl	100-fach konzentiert	1-fach konzentriert
SauIIIA	1µl	4U/µl	~0,04 U/µg DNA
steriles H_2O	zu 1000 µl Gesamtansatz	-	-

Der partielle Verdau erfolgte für eine Stunde bei 37°C. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 40µl EDTA (0,5M) gestoppt. Die verdaute DNA wurde mittels Phenol-Extraktion und anschließender Ethanol-Fällung gereinigt und konzentriert.

3.6.2 Größenfraktionierung der Restriktionsfragmente mittels Saccharose-Gradienten-Ultrazentrifugation

Die durch den Partialverdau mit SauIIIA erhaltenen gDNA-Fragmente von *L.pn.* Phil-1 wurden mittels Saccharose-Gradienten-Zentrifugation der Größe nach getrennt. Dazu wurde in einem Ultrazentrifugationsröhrchen mit Hilfe eines Gradientenmixers ein Saccharosegradient (10-40%) gegossen. Die partiell verdaute gDNA wurde auf den Gradienten pipettiert. Durch Ultrazentrifugation mit 25000g für 18h wurden die Fragmente der Größe nach getrennt. Mit Hilfe einer Kanüle

wurde an der unteren Seite ein Loch in das Zentrifugationsröhrchen gestochen, über welches Fraktionen von je ca. 500µl gesammelt wurden. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen in den einzelnen Fraktionen wurden Aliquots jeder Fraktion mittels eines 1%igen DNA-Agarosegels analysiert. Die Fraktionen, die die Fragmente der gewünschten Größe (3-5kB) enthielten, wurden mittels Ethanol-Fällung gereinigt und konzentriert.

3.6.3 Klonierung der Plasmide für die *L.pn.* Genbank in *E.coli*

Die durch SauIIIA Partialverdau erhaltenen und größenfraktionierten gDNA-Fragmente von *L.pn.* Phil-1 wurden in den Vektor pBCKS kloniert, welcher sowohl in *E.coli* als auch in *Legionella* replizierend ist. Dazu wurde dieser mit BamHI geschnitten und mit SAP dephosphoryliert. SauIIIA und BamHI hinterlassen nach Restriktion zueinander kompatible Enden. Der so präparierte Vektor wurde mit den gDNA-Fragmenten im Verhältnis 1:3 mittels T4 DNA-Ligase ligiert. Die Inkubation erfolgte ü.N. bei 16°C. Abschließend wurde der Ligationsansatz gefällt.

3.6.4 Transformation des Ligationsansatzes

Der komplette Ligationsansatz wurde durch Elektroporation in *E.coli* DH5a transformiert. Die Regeneration erfolgte in 1ml SOC-Medium. Die Selektion rekombinanter Klone wurde mittels LB-Agar mit X-Gal und Chloramphenicol Supplementation durchgeführt. Damit die Kolonien zum Picken von Einzelkolonien gut differenzierbar sind (50-100 Klone/Platte), wurden je 100µl einer 1:4 Verdünnung des Transformationsansatzes auf das entsprechende Selektionsmedium ausplattiert und für 24h bei 37°C inkubiert.

3.6.5 Anlegen von Glyzerolgefrierkulturen der Einzelklone

Rekombinante Klone wurden mittels eines sterilen Zahnstochers von den Selektionsplatten in 96-Loch-Platten überführt und in 100µl vorgelegtem LB-Medium mit Chloramphenicol resuspendiert. Anschließend wurden die Platten ü.N. bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von jeweils 100µl sterilem Glycerin. Nach kurzer Inkubationszeit bei Raumtemperatur (RT) wurden die Platten bei -80°C gelagert.

3.6.6 Screening der Genbank in *E.coli*

Die vereinzelten Klone der Genbank wurden mit Hilfe eines 48-Pin Replikators aus den 96-Loch-Platten der Gefrierkulturen auf die entsprechenden Screeningmedien überführt. Um die Transkription der Genfragmente zu induzieren wurden die Medien mit IPTG (40mM) supplementiert. Als potentieller Kofaktor für Metalloproteasen wurde auf den Caseinagar zusätzlich 100µl einer sterilen 10mM Zinkchloridlösung aufgetragen. Als Positivkontrolle für die hämolytische sowie lipolytische Aktivität wurde auf dem Blut- und Eigelbagar jeweils der PlaB exprimierende Stamm, *E.coli* DH5α (pKH192), mit aufgetragen. Als Negativkontrolle diente der Stamm *E.coli* DH5α (pBCKS). Kulturüberstand von *L.pn.* Phil-1 diente als Positivkontrolle auf dem Caseinagar. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über 3 Tage.

3.6.7 Identifizierung der *L.pn.* Philadelphia-1 Genfragmente in *E.coli*-Klonen

Die in den einzelnen Klonen der Genbank enthaltenen Genfragmente von *L.pn.* Phil-1 wurden durch Sequenzierung der Plasmide und anschließendem Vergleich mit der Genomsequenz von *L.pn.* Phil-1 identifiziert. Dazu wurde aus den jeweiligen *E.coli* Klonen zunächst Plasmid-DNA isoliert. Mit Hilfe der pBCKS spezifischen Primer, pBCKS-fw und pBCKS-rev wurden die enthaltenen Genfragmente sequenziert. Die so erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (GenBank, NCBI) mit dem Genom von *L.pn.* Phil-1 verglichen.

3.7 Screening der *L. pneumophila* Philadelphia-1 EZ-Tn5 Klonbank

Die in dieser Arbeit verwendete Transposon-Mutations-Genbank wurde durch B.Pless generiert (Diplomarbeit B.Pless, (Aurass, Pless et al. 2009). Insgesamt wurden 3 Mutagenesen durchgeführt, bei denen insgesamt 11.300 Insertionsmutanten erzeugt wurden. Die Mutagenesen erfolgten mit dem EZ-Tn5 Transposom-Komplexen (Epigenomics). Für das Screening dieser Genbank wurden zunächst Klone vereinzelt. Dazu wurde die als Glyzeringefrierkultur gelagerte Genbank auf BCYE Platten mit Kanamycin so ausplattiert, dass sich auf jeder Platte ca. 300 Kolonien befanden. Die Einzelkolonien wurden anschließend mit einem sterilen Zahnstocher in eine mit BYE Kanamycin Flüssigmedium befüllte Platte überführt. Nach ü.N. Inkubation dieser Platte bei 37°C und 150rpm, wurde in jede Kavität der Platte 100µl Glyzerin pipettiert. Die so behandelten Platten wurden nach kur-

zer Inkubation bei RT bei -80°C gelagert. Für das Screening wurden die vereinzelten Mutanten zunächst reaktiviert. Dazu wurde mit Hilfe des 48-Pin-Replikators Zellmaterial aus der Glyzerinkulturplatte in eine mit BYE-Kanamycin Medium befüllte Platte überführt. Diese wurde dann für 48h bei 37°C und 150rpm bebrütet. Die so reaktivierten Einzelmutanten wurden anschließend mittels des 48 well Replikator auf die Screeningmedien überimpft. Zur Desinfektion des Replikators wurde dieser nach jedem Schritt mit Ethanol abgeflammt. Auf jede Screeningplatte wurden so 15 Mutanten überführt. *L.pn.* Phil-1 Wildtyp diente als Referenz zur relativen Quantifizierung der untersuchten hydrolytischen Aktivitäten und wurde auf jede Platte links oben mitgeführt. Das Screening auf hämolytische Aktivität erfolgte auf *Legionella* Blut-Agar. Die proteolytische Aktivität der Mutanten wurde auf *Legionella* Casein-Agar überprüft. Als Screeningmedium für die lipolytische Aktivität der Mutanten diente *Legionella* Eigelb-Agar. Die beimpften Screeningmedien wurden für mindestens 72h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die einzelnen Aktivitäten der Mutanten auf dem entsprechenden Medium qualitativ bewertet und dokumentiert. Die Bewertung der hämolytischen Aktivität erfolgte anhand der Durchmesser der gebildeten Hämolysehöfe auf dem *Legionella* Blut-Agar. Die proteolytische Aktivität der Mutanten wurde anhand des Durchmessers, des durch Caseinhydrolyse entstandenen para-Caseinat gemessen. Durch lipolytische Aktivität der Mutanten bildete sich um die Kolonien auf dem *Legionella* Eigelb-Agar ein opaleszentes Präzipitat welches zur relativen Quantifizierung der lipolytischen Aktivität genutzt wurde.

3.7.1 Ermittlung des Transposoninsertionslokus im Chromosom von *L.pn.* Philadelphia-1

Die genaue chromosomale Lokalisation der Transposoninsertionen wurde nach dem in Abbildung 3.1 gezeigten Schema analysiert. Dazu dienten „inverse PCRs" (Ochmann et al. 1988), die mit auf dem Transposon lokalisierten und von dort nach „außen" gerichteten Primer-Bindestellen durchgeführt wurden (KAN-2 FP-1 und KAN-2 RP-1 bzw. Inv-1 und Inv-2). Zunächst wurde genomische DNA der entsprechenden Mutante isoliert und anschließend mit dem Restriktionsenzym HindIII ü.N. bei 37°C verdaut. Nach 12h wurde der Restriktionsverdau inaktiviert (20min 65°C) und über Nacht mit T4 Ligase zirkularisiert. Nach Fällung der zirkularisierten DNA wurden Inverse PCRs mit den Primern Inv-1 und Inv-2 angesetzt. Die Produkte der inversen PCR wurden im Agarose Gel aufgetrennt und auf das

Vorhandensein eines spezifischen Amplifikats hin untersucht. Wenn dies der Fall war, wurde das entsprechende Amplifikat ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert (Wizard SV Gel & PCR cleanup Kit, Promega). Die extrahierten Amplifikate wurden schließlich in Sequenzierreaktionen mit dem Primerpaar KAN-2 FP-1 und KAN-2 RP-1 eingesetzt. Die Sequenzierproben wurden im Sequenzierlabor des Robert Koch-Instituts aufgetrennt und analysiert. Die ermittelten Sequenzen, die das integrierte Transposon flankierten, wurden durch Blast-Analyse den Genen zugeordnet, in die die Insertion erfolgt war.

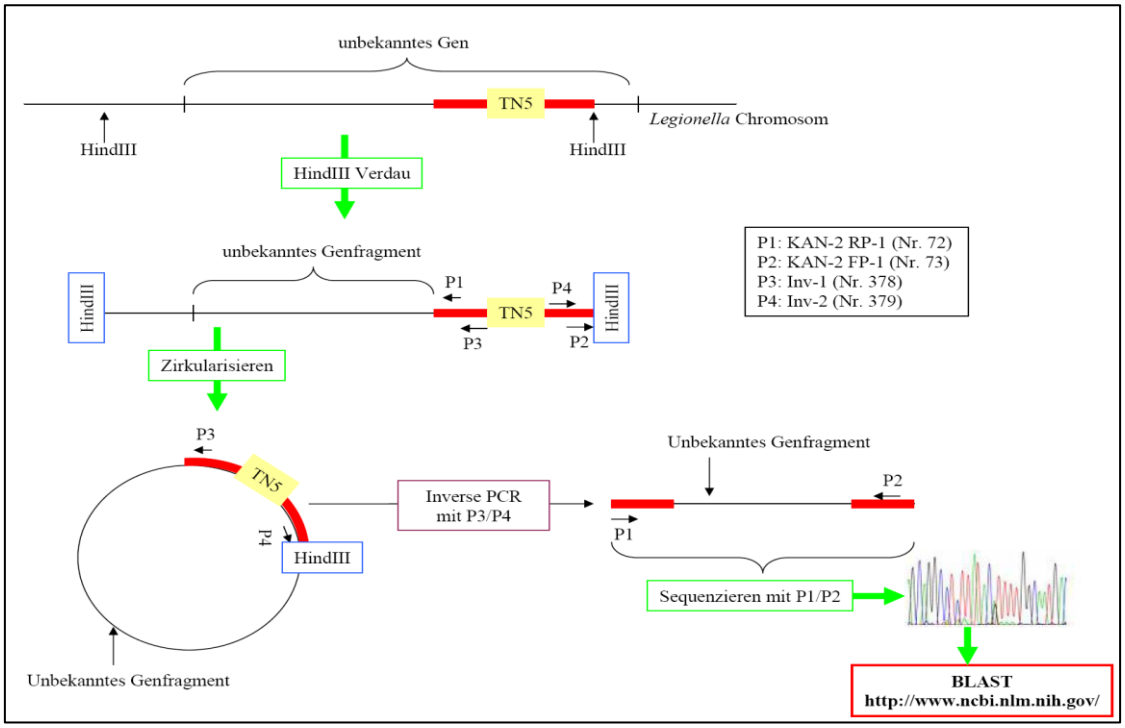


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung der inversen PCR zur Bestimmung des Transposoninsertionslokus

3.8 Hämolyseassay

In Anlehnung an Kirby und Mitarbeiter (Kirby et al. 1998) wurden 37,5µl humanes Erythrozytenkonzentrat (Charité, Berlin) in 10ml PBS für 5min bei 10.000×g sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zweimal in je 10ml PBS gewaschen und letztendlich in 10ml an PBS resuspendiert. Zu untersuchende Bakterien wurden für 1 Tag auf Platte kultiviert und in PBS-Puffer auf eine OD600 von 0,3 (~1x10^8 Zellen) eingestellt. Anschließend wurden 400µl der Blutzellsuspension mit 400µl der Bakterienlösung vermischt, 2min bei 16.000×g pelletiert und bis zur Vermessung bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Bei den ange-

gebenen Zeitpunkten (s. Ergebnisse) wurde die Suspension für 5sek stark geschüttelt (Vortexer), erneut abzentrifugiert und je 100µl in einer Mikrotiterplatte und bei einer Wellenlänge von 415nm (Absorptionsmaximum von Hämoglobin) vermessen. Als Lysekontrolle wurden anstelle der Bakterien 400µl Ethanol (100%) eingesetzt, als Negativkontrolle diente PBS-Puffer.

3.9 Nachweis von Phospholipaseaktivität

3.9.1 Gewinnung von Zellpelletlysaten und Kulturüberständen

Nach dem Erreichen der gewünschten Zelldichte (meist OD_{660}=2) in den angezogenen Flüssigkulturen wurde 1ml Kulturvolumen entnommen und bei 5000×g für 5min abzentrifugiert. Anschließend wurden die Kulturüberstände von den Zellpellets getrennt. Die Kulturüberstände wurden mit einer finalen Konzentration von 3mM mit Natriumazid versetzt und bei 4°C gelagert. Die Zellpellets wurden bis zur Verwendung bei -20°C weggefroren. Die Zelllyse wurde durch Zugabe von 0,1% Triton X-100 und 50µl Lysozym (10mg/ml) für 30min bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurden die lysierten Zellpellets mit einer 26-gauge Kanüle homogenisiert und mit 40mM Tris-HCl pH 7,5 auf das Ausgangsvolumen (1ml) aufgefüllt.

3.9.2 Verdau von Lipidsubstraten

Zur Untersuchung der lipolytischen Aktivität wurden verschiedene Substrate (s. Tabelle 2-4) mit *L. pneumophila* Zelllysaten und Kulturüberständen inkubiert. Hierzu wurden die Lipide mit einer Endkonzentration von 13,4mM und unter Zusatz von 6mM NaN_3, 1% Triton X-100 und 40mM Tris-HCl (pH 7,5, 25°C) angesetzt. Die Substrate wurden für 10min bei RT und anschließend für 30min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Zur Förderung der Mizellen-Bildung erfolgte eine Ultraschallbehandlung von jeweils drei 15sek andauernden Intervallen bei einer Intensität von 65%. Danach wurden die Substrate in einem Verhältnis 1:1 mit den zu analysierenden Proben versetzt (je 25µl) und variable Zeitspannen in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte bei 37°C und 150rpm oder 100rpm ü.N. inkubiert. Dabei richteten sich die Inkubationsdauer und die jeweiligen Verdünnung nach den spezifischen experimentellen Bedingungen.
Die Negativkontrollen der Kulturüberstände, BYE-Bouillon für *L. pneumophila* und 40mM Tris-Puffer für die Zellpelletlysate wurden stets mitgeführt und als Basis-

wert bei anschließenden Kalkulationen vom Probenwert subtrahiert. Im Anschluss an die Inkubation der Lipid-Proben-Suspension erfolgte die Bestimmung der Menge freigesetzter Fettsäuren.

3.9.3 Bestimmung der Menge an freien Fettsäuren

Die durch lipolytische Enzymaktivitäten freigesetzten Fettsäuren konnten mit Hilfe des „*Nefa C*" Kits der Firma Wako Chemicals nachgewiesen werden. Hierbei wird die Fettsäure durch ein in der Reaktionslösung enthaltenes Enzym, der Azyl-CoA-Synthase, an Coenzym A (CoA) gebunden. Das azylierte CoA wird anschließend durch die Azyl-CoA Oxidase oxidiert, wobei Protonen abgespalten werden, die sich mit Sauerstoffmolekülen zu Wasserstoffperoxid verbinden. Wasserstoffperoxid stellt ein starkes Oxidationsmittel dar und oxidiert den in Farbreagenz A enthaltenden Farbstoff 4-Aminophenazon zu einem Chinonimin Farbstoff. 4-Aminophenazon besitzt ein Absorptionsmaximum im Bereich des ultravioletten Lichts. Durch die Oxidation in den Chinonimin Farbstoff verschiebt sich das Absorptionsmaximum in den sichtbaren Bereich zu 550nm. Es vollzieht sich also bei vorhandenen freien Fettsäuren durch die Generierung von Wasserstoffperoxid ein Farbumschlag, dessen Intensität bei 550nm messbar ist. Zur Bestimmung der freien Fettsäuren wurden jeweils 10µl der inkubierten Lipid-Proben-Suspension mit 50µl Farbreagenz A für 15min bei RT inkubiert. Beim 2. Inkubationsschritt wurden 100µl Farbreagenz B zu den Ansätzen gegeben und für weitere 15min leicht geschüttelt. Der Farbumschlag konnte anschließend im Mikrotiterplattenleser bei einer Wellenlänge von 550nm gemessen werden. Durch den im Kit enthaltenen Oleinsäurestandard wurde die Konzentration der freien Fettsäuren anhand einer Standardkurve mit Hilfe der folgenden Standardkonzentrationen 0/ 0,2/ 0,4/ 0,6/ 0,8/ 1,0mM bestimmt.

3.10 Koinfektion von *A. castellanii* Amöben, A549 Lungenepithelzellen und U937 Makrophagen mit *L. pneumophila*

3.10.1 Test der intrazellulären Vermehrungsfähigkeit in *A.castellanii*

A. castellanii Amöben wurden für 3 Tage in PYG-Medium bei 37°C + 5% CO_2 kultiviert, anschließend durch Klopfen von der Kulturflasche gelöst und die Zellzahl in einer Neubauer Zählkammer durch Gegenfärbung mit Trypanblau bestimmt. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/ml in

Infektionsmedium resuspendiert und je 1ml in die entsprechenden Reaktionsplatten gegeben.
Die 2 Tage bei 37°C auf BCYEα-Agar inkubierten *L. pneumophila* wurden mit einer sterilen Impföse in PBS überführt und auf eine OD_{660} von 0,3 (1-5×10^8 Zellen je ml) eingestellt. Die Suspension wurde anschließend 10^5-fach mit Infektionsmedium verdünnt und so auf eine Zellzahl von 1×10^3 Bakterien/ml gebracht. Das Verhältnis von Bakterien zu Amöben wird als MOI (*multiplicity of infection*) bezeichnet und entspricht in diesem Ansatz einem Wert von 0,01, da je 1ml der Bakterienlösung zu den sich in einer Kavität einer 24 well-Mikrotiterplatten befindlichen, Amöben zugegeben wurde. Pro Zeitpunkt wurden zwei bzw. drei Parallelwerte koinfiziert. Die Probenentnahme erfolgte nach 0, 24, 48 und 72h, wobei 100µl abgenommen, der Inkubationszeit entsprechend verdünnt und 50µl zur Ermittlung der Bakterienzahl auf BCYEα-Agarplatten in logarithmisch abnehmender Menge ausplattiert wurden. Dies erfolgte unter Verwendung des „Whitley Spiral Plater" der Firma Meintrup DWS. Anhand der Zählung der Kolonie bildenden Einheiten CFU (*colony forming units*) auf der Platte, mit Hilfe des Acolyte-Koloniezählgerätes, konnte die Entwicklung der Zellzahl jedes getesteten Klons rekonstruiert werden. Dieses ist als Maßstab für die intrazelluläre Vermehrung der Legionellen anzusehen.

3.10.2 Infektion von U937 Makrophagenzellen

Neben der Replikationsfähigkeit in *A. castellanii* wurde die Vermehrung der Klone in U937 Makrophagenzellen untersucht. Hierzu wurden die passagierten Monozyten 1 Tag vor der Infektion durch Zugabe von 50ng/ml Phorbol-Ester (Phorbol-12-Mystrate-13-Azetat, PMA) zu phagozytierenden Makrophagen ausdifferenziert. Der nun adhärente Zellrasen konnte durch die Inkubation in 10ml 0,2% EDTA in 1×PBS für 5min bei 37°C und durch zusätzliches Klopfen vom Kulturschalenboden gelöst werden. Nach der Überführung in ein Plastikröhrchen wurde die Flasche mit RPMI-Medium ohne FKS-Zusatz gespült und das Zellvolumen auf 50ml aufgefüllt. Die Zellen wurden dann durch 2 Zentrifugationsschritte bei 800 rpm für 10min in der Labofuge400 gewaschen. Nach erfolgter Zellzählung in einer Neubauer-Kammer wurden die Zellen mit einer Endkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml in die jeweiligen Wells gegeben und zur erneuten Zelladhäsion für 2h bei 37°C/ 5% CO_2 inkubiert.

Für die U937-Infektion wurden die Legionellen ähnlich vorbereit, wie es oben bereits (s 3.10.1) beschrieben wurde. Von der verdünnten Legionellen-Suspension (~2×10^6/ml) wurden 0,5ml entnommen und zu den adhärenten U937 Zellen gegeben (MOI=1). Nach gemeinsamer Inkubation (2h/ 37°C/ 5% CO_2) wurden die Legionellen, die bis dahin nicht in die Wirtszellen eingedrungenen bzw. adhäriert waren, durch dreimaliges Waschen mit RPMI ohne FKS-Zusatz abgespült. Anschließend wurde 1ml RPMI mit 10% FKS zugegeben und die Infektion bis zu 96h inkubiert. Um zu überprüfen, wie sich die Bakterien intrazellulär vermehren, wurde die Koinfektion bei den angegebenen Zeitpunkten mit 10µl Saponin [10% (w/v) in PBS] versetzt und 5min bei 37°C/ 5% CO_2 inkubiert. Dies führte zur Lyse der U937 Zellen und zur Freisetzung der Bakterien. Ein entsprechend verdünntes Aliquot konnte dann, wie bereits in 3.10.1 beschriebener Vorgehensweise, auf BCYEα-Agar ausplattiert werden.

3.11 Bestimmung der Minimalen Hemm Konzentration (MHK)

3.11.1 Bouillon-Makrodilutionsmethode

Beim Bouillon-Dilutionsverfahren handelt es sich um einen Reihenverdünnungstest, bei dem flüssige Nährmedien zur Empfindlichkeitsprüfung verwendet werden. Die antimikrobiellen Wirkstoffe werden meist in zweifachen Verdünnungsreihen mit dem zu untersuchenden Erreger inokuliert. Die Minimale Hemmkonzentration (MHK) ist definiert als die niedrigste Konzentration des antimikrobiellen Wirkstoffes in einer definierten Verdünnungsreihe, bei der kein sichtbares Bakterienwachstum mehr feststellbar ist. Der MHK-Wert stellt dabei keinen absoluten Wert dar. Die „wahre" MHK liegt zwischen der niedrigsten Testkonzentration des antimikrobiellen Wirkstoffes, die den Testorganismus vollständig hemmt und der nächst niedrigeren Konzentration in der jeweiligen Verdünnungsreihe. Die MHK beziffert quantitativ den *in vitro* Empfindlichkeitsgrad des Erregers. Das Bakterienwachstum ist nach der Inokulation durch Trübung zu erkennen. Für die MHK-Bestimmungen in dieser Arbeit wurde eine zweifache Verdünnungsreihe des antimikrobiellen Wirkstoffes (Ampicillin) in BYE-Medium hergestellt. 1ml jeder Verdünnung wurde in ein neues Reagenzglas überführt und mit 1ml Bakteriensuspension (OD_{660nm}: 0,5) angeimpft. Nach Inkubation der Röhrchen bei 37°C und 220rpm wurde anhand der Trübung die MHK der entsprechenden Substanz ermittelt.

3.11.2 Epsilometertest (E-TEST)

Beim E-Test wird ein, mit einem Gradienten eines stabilisierten antimikrobiellen Wirkstoffs, getränkter Plastikstreifen auf eine mit einer Bakteriensuspension beimpfte Petrischale gelegt. Nach Auflegen des Streifens auf den beimpften Nährboden beginnt die Freisetzung des Antibiotikums von dem Plastikstreifen, wodurch sich ein definierter Konzentrationsgradient im Bereich um den Streifen bildet. Nach der entsprechenden Inkubation des Tests wird sich, um den im Zentrum liegenden Streifen, eine Hemmzone ausgebildet haben. Anhand der graduierten Skala kann die MHK, als der Punkt bei der das Wachstum des Testorganismus den Streifen berührt, abgelesen werden. In dieser Arbeit wurden E-Test Streifen der Firma OXOID verwendet (M.I.C.E.). Die Streifen wurden mittig auf eine mit 100µl einer *Legionella*-Kultur (OD_{660nm}:0,1) beimpften BCYE-Platte aufgelegt. Nach 72h Inkubation bei 37°C wurde die MHK wie oben beschrieben abgelesen.

3.12 Proteinanalytik

3.12.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte nach der Bradford-Methode und nach den Angaben des Herstellers der Färbelösung „Roti Nanoquant".

3.12.2 Eindimensionale (1D) - SDS-PAGE

Um die größenabhängige Auftrennung von Proteinen zu erreichen, wurden 10 oder 12,5%ige SDS-Tris-Polyacrylamidgele nach der Methode von Laemmli (6) verwendet. Die Proben wurden mit je 5µl reduzierendem Protein-Probenpuffer versetzt, 90s bei 99°C denaturiert und in SDS-Laufpuffer (s. Tabelle 2-5) bei konstanten 40mA und bei RT aufgetrennt. Zur Detektion der Proteine im Gel wurden die zwei folgenden Färbemethoden angewandt.

3.12.3 Coomassie-Färbung von Proteinen

Nach der Elektrophorese wurde das Gel ü.N. in kolloidaler Coomassie-Färbelösung nach dem Rezept des Herstellers und unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Entfärbung des Hintergrundes wurde durch anschließende Inkubation in H_2O_{bidest} vollführt und das Gel nach 30min in Fixierlösung (s. Tabelle 2-5) zwischen zwei Cellophanfolien getrocknet und so konserviert.

3.12.4 Silberfärbung von Proteinen

Zur Erhöhung der Detektionsgrenze bei geringem Proteinanteil wurde die Nachweismethode der Silberfärbung entweder mit Hilfe des „Silver Staining Kit" nach den Vorgaben des Herstellers (Amersham) oder nach *Gharahdaghi et al.* und eigens hergestellten Lösungen (s. Tabelle 2-5) angewandt. Die Reaktionszeiten richteten sich nach dem kommerziell erworbenen System von Amersham.

3.12.5 Expression und Reinigung von Proteinen

Proteine können nach erfolgter Expression ihren biochemischen Eigenschaften nach, über verschiedene chromatographische Verfahren zur Reinheit gebracht werden. Folgende Expressionssysteme und Reinigungsmethoden wurden nach Angaben der Hersteller oder nach eigenem Protokoll durchgeführt.

3.13 Reinigung der Zinkmetalloprotease ProA aus dem Kulturüberstand

Zur Charakterisierung der Zinkmetalloprotease ProA wurde diese aus dem Kulturüberstand von *L.pn.* 130b gereinigt. Dazu wurde der Kulturüberstand einer 1,5l Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase (OD_{660}: 1,5) durch Zentrifugation bei 5000rpm (4°C) für 30min gewonnen. Anschließend wurde der Überstand sterilfiltriert. Mittels einer Pellicon XL50 Ultrazentrifugationsanlage (Ausschlussgröße 30kDa) wurde der Kulturüberstand zehnfach aufkonzentriert. Nach Aufkonzentrierung des Kulturüberstandes wurde ProA über Anionen-Austausch Chromatographie gereinigt. Dazu wurde eine bereits gepackte Säule (Resource Q, Amersham) mit dem Retentat aus der Ultrazentrifugation beladen. Die Elution der Proteine erfolgte durch stufenweise Erhöhung der NaCl-Konzentration:10%, 20%, 30%, 40% 50%, 60% und 100%. Dabei wurden Fraktionen von je 2ml gesammelt. 10µl jeder Fraktion wurden auf eine mit Zinkchlorid (10mM) supplementierten Casein-Agar-Platte aufgetropft und für 24h bei 37°C inkubiert. Die proteolytische Aktivität der einzelnen Fraktionen konnte anhand des Präzipitates ermittelt werden. Fraktionen mit proteolytischer Aktivität wurden gepoolt und durch EtOH-Fällung konzentriert. Mit SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung wurde die Reinheit der gereinigten ProA überprüft.

3.14 Bestimmung der Aktivität von ProA

Die Aktivität der gereinigten ProA wurde mittels des Azocaseinassays quantifiziert (Tomarelli, Charney et al. 1949). Durch Degradation des Azocaseins werden Pep-

tide freigesetzt, die in der nachfolgenden Säurefällung in Lösung bleiben und colorimetrisch gemessen werden können. Durch die Erstellung einer Eichgeraden mit einer Protease bekannter Aktivität, kann so die Aktivität der zu untersuchenden Protease ermittelt werden. Als Standardprotease zur Erstellung der Eichgerade dienten in dieser Arbeit zum einen Dispase I, eine Protease von *Bacillus polymyxa* (1U/mg, Sigma) und zum anderen Proteinase K (30mAnsonUnits/ml, Merck). Ausgehend von einer Stocklösung wurden für die Standardkurve folgende Verdünnungen erstellt: 1:100; 1:40; 1:20. 50µl der Standardlösungen sowie 50µl der zu untersuchenden Probe wurde mit 100µl einer frisch angesetzten Azocaseinlösung (2% w/v in 40mM Tris-HCL pH 7,5) in 1,5ml Eppendorfgefäßen für 1h bei 37°C und 300rpm inkubiert. Die anschließende Säurefällung erfolgte mit 200µl Perchlorsäure (7% w/v). Nach 5min Zentrifugation bei 5000g wurde der Überstand (150-200µl) in eine 96-Well-Platte überführt. Nach Neutralisation mit 50µl NaOH wurde die Absorption bei 450nm gemessen. Mittels der erstellten Standardkurve konnte die Aktivität der untersuchten Protease ermittelt werden.

3.15 Differenzielle 2D-Gelelektrophorese

Um die Sekretome des Wildtyps und der isogenen *proA*-Mutante zu vergleichen, wurden die Proteine der entsprechenden Überstände gelelektrophoretisch zweidimensional getrennt. Diese Methodik ist als differenzielle 2D-Gelelektrophorese (kurz DIGE) bekannt (Unlu, Morgan et al. 1997). Dazu wurde der Kulturüberstand von spätlogarithmischen Kulturen (OD_{600nm}= 2,0) sterilfiltriert und mittels Isopropanolfällung gereinigt und konzentriert. Die Proteinkonzentration in den Kulturüberständen wurde mit dem Nanoquant©-Assay (Roth) ermittelt. Für die 2D-Gelelektrophorese wurden jeweils 75µg Gesamtprotein verwendet. Die gefällten Proteine der Überstände wurde in 450µl Rehydrierungspuffer (8M Harnstoff, 0,5% CHAPS, 0,2% DTT, 0,5% Pharmolyte (Amersham), 0,002% Bromphenolblau) aufgenommen. Die Rehydration erfolgte für 12h bei 20°C. Anschließend wurden die Proben auf einen IPG-Streifen (pH 3-11, nicht linear, 24cm) aufgetragen und mit 500µl Überschichtungslösung übergossen. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte mit einem Ettan IPGphorII Gerät (Amersham Bioscienes) nach Angaben des Herstellers. Nach der isoelektrischen Trennung der Proteine wurden diese nach ihrer Größe (2. Dimension) weiter differenziert. Dazu wurde der IPG-Streifen vorsichtig auf ein 12,5%iges SDS Gel gelegt. Die gelelektrophoretische Trennung der Proteine, entsprechend ihrer Größe, erfolgte dann in einer

Ettan Daltix Elektrophoresekammer (Amersham) nach Angaben des Herstellers. Im Anschluss an die zweidimensionale Gelelektrophorese wurden die Proteine mittels Silberfärbung der Gele nach Blum et al. sichtbar gemacht und eingescannt. Die Auswertung der eingescannten Gele erfolgte mit Hilfe der Software Delta2D (DECODON).

3.16 Protease Substrat Assay (JPT)

Für die Untersuchung der Substratspezifität der ProA wurde das Protease-Substrate-Set der Firma JPT verwendet. Dabei handelt es sich um eine Auswahl von 360 oktameren Peptiden, die Schnittstellen bereits charakterisierter Proteasen beinhalten. Diese Peptide wurden HPLC gereinigt und gefriergetrocknet in die Kavitäten einer 384 well Platte vorgelegt.

C-terminal sind die Peptide mit dem Fluorophor Glu(EDANS)-Amid getaggt. N-terminal wurden sie mit dem Quencher DABCYL fusioniert. Die auf diese Weise intern gequenchten Peptide fluoreszieren erst nachdem sie proteolytisch degradiert wurden. Putative Substrate lassen sich so anhand des Fluoreszenssignals detektieren. Zur Durchführung des Tests wurde die bei -20°C gelagerte 384 well Platte mit den darin enthaltenen Peptiden zunächst bei RT equilibriert. Anschließend wurden die gefriergetrockneten Peptide durch 3h Inkubation bei RT in Reaktionspuffer (20mM TrisHCL (pH 7.5), 6,6µM $ZnCl_2$) gelöst.

Mit einem Mikrotiterplattenlesegerät (TECAN) wurde dann das emittierte Fluoreszenssignal bei 490nm gemessen. Dieser Wert wurde als Nullwert gespeichert. Danach erfolgte die Zugabe von 5µl gereinigter ProA (9mU/well). Als Kontrolle wurden je 3 Wells, die keine Peptide enthielten mit der Proteaselösung, Puffer bzw. 6µM $ZnCl_2$-Lösung befüllt. Die so befüllte Platte wurde für 2h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde erneut die Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 490nm ausgelesen. Anhand des Anstiegs der Fluoreszenzsignale der einzelnen Kavitäten wurde die Spezifität von ProA gegenüber den verwendeten Peptiden ausgewertet.

3.17 Protease Peptide Microarray

Zusätzlich zum Protease Substrat-Test wurde die Substratspezifität von ProA mittels eines Protease Peptide Microarrays (JPT) untersucht. Dabei handelt es sich um einen Chip auf den 1768 Peptide gespottet wurden. Wie beim Protease Substrat-Test, handelt es sich dabei um Peptide, die die Aminosäuren P4 bis P4´

(Position der Aminosäuren vor P und nach P´der Schnittstelle einer spezifischen Protease, entspricht der Erkennungssequenz) von bereits beschriebenen Proteasesubstraten repräsentierten. Die Peptide sind C-terminal mit Phosphotyrosin markiert. Durch Inkubation mit monoklonalen Antikörpern, die hochspezifisch an Phosphotyrosin binden, kann der Chip nach Inkubation mit der entsprechenden Protease ausgelesen werden. Dabei korreliert die Abnahme des Signals in Bezug auf die Kontrolle mit einer proteolytischen Degradation des entsprechenden Peptids. Um sterische Einflüsse zu minimieren, wurden die Peptide über einen hydrophoben Linker auf die Chipoberfläche gespottet. Der gleiche Linker befindet sich auch zwischen Peptid und dem Phosphotyrosinlabel.
Das gesamte Experiment wurde in Zusammenarbeit mit JPT gemäß der Arbeitsanleitung durchgeführt. Dabei wurde 350µl der Proteaselösung (ProA 200mAnson Units in TBS mit 10µM $ZnCl_2$) mit dem Chip für 15,33h bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde ein äquivalenter Chip mit einer BSA-Lösung (10mg/ml) unter den gleichen Bedingungen inkubiert.

3.18 PlaC Peptid-Microarray – Identifizierung der Schnittstellen von ProA in PlaC

Die Identifizierung von putativen Schnittstellen von ProA im C-terminalen Bereich (Aminosäuren 300-433) der Phosholipase A /Azyltransferase PlaC aus *L.pn.* 130b erfolgte ebenfalls mit Hilfe eines Peptide-Microarrays (JPT). Auf diesem wurden synthetisierte oktamere Peptide gespottet, welche die Aminosäuren 300-433 von PlaC (*L.pn.* 130b) repräsentieren. Um die genaue Schnittstelle besser zu identifizieren wurden diese Peptide mit überlappender Sequenz synthetisiert. Die Überlappung betrug dabei jeweils 5 Aminosäuren. Die Inkubation und Auswertung des Microarrays erfolgte genauso wie beim Protease Peptide Microarray beschrieben. Auch dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit der Firma JPT durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Screeningverfahren zur Identifizierung neuer hydrolytischer Faktoren von *Legionella pneumophila* Philadelphia-1

Ein Ansatz zur Identifizierung von Proteinen des Lungenpathogens *L.pn.* Phil-1 die hydrolytische Aktivität besitzen, ist die Erstellung und das Screening einer Genbank in einem anderen Organismus. Besonders gut, für eine sogenannte heterologe Genbank, geeignet ist das Bakterium *Escherichia coli* (*E.coli*). Unter anderem zeichnet sich *E.coli* durch einfache Kultivierungsbedingungen, eine hohe Wachstumsrate und leichte genetische Manipulierbarkeit aus. Eine solche heterologe Genbank hat neben den genannten Vorteilen jedoch auch Nachteile. Dazu gehört z.B., dass für den Wirt toxische Produkte aus dem Spenderorganismus nicht analysierbar sind. Das Auffinden regulatorisch wirkender Faktoren ist auch erheblich erschwert. Die Tatsache, dass häufig mehr als ein Gen pro Insertionsfragment vorhanden ist, macht eine eindeutige Zuordnung einer beobachteten Eigenschaft des entsprechenden Klons deutlich umständlicher.

Ein andere Möglichkeit der Funktionsanalyse von einzelnen Genen eines Organismus bietet das Screening einer Knock out Genbank. Bei einer solchen Genbank werden Klone erzeugt, in denen jeweils ein bestimmtes Gen mutiert wurde. Eine häufig angewandte Methode zur Generierung einer Knock out Genbank ist die Herstellung von Insertionsmutanten mittels Transposonmutagenese. Das Screening einer solchen Insertions-Genbank bietet folgende Vor- und Nachteile. Der Einfluss der Mutation ist direkt im Organismus messbar. Mit einer Knock out Genbank ist es einfacher regulatorische Proteine zu identifizieren. Auf der anderen Seite können für den Organismus essentielle Gene bzw. Faktoren nicht identifiziert werden, da durch Mutation dieser kein Wachstum mehr erfolgt. Darüber hinaus können durch Mutation einzelner Gene komplette Operonstrukturen betroffen sein, was wiederum die Zuordnung eines durch die Mutation hervorgerufenen Effektes schwer macht.

4.2 Konstruktion einer Genbank von *Legionella pneumophila* Philadelphia-1 in *Escherichia coli*

Für die Erstellung der Genbank von *L.pn.* Phil-1 in *E.coli* DH5α wurde zunächst genomische DNA aus *L.pn.* Phil-1 isoliert und anschließend mit dem Restriktionsenzym SauIIIa partiell verdaut. Mittels Saccharose-Gradienten-Ultrazentrifugation erfolgte anschließend eine Größenfraktionierung der erhaltenen Restriktionsfragmente. Fragmente, die eine Größe von 3-5kB aufwiesen wurden in den mit SauIIIa verdauten Vektor (pBCKS) kloniert und anschließend in *E.coli* DH5α transformiert. Nach erfolgreicher Transformation wurden 4896 Klone in 96 well Platten vereinzelt und als Dauergefrierkultur gelagert.

Zur Bestimmung der Anzahl an Klonen, die eine Genbank enthalten muss, damit das entsprechende Genom repräsentiert wird, benutzt man die Carbon-Clarke-Formel (Clarke and Carbon 1976).

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-f)}$$

N: Anzahl der Klone

P: Wahrscheinlichkeit

f: Klongröße/Genomgröße

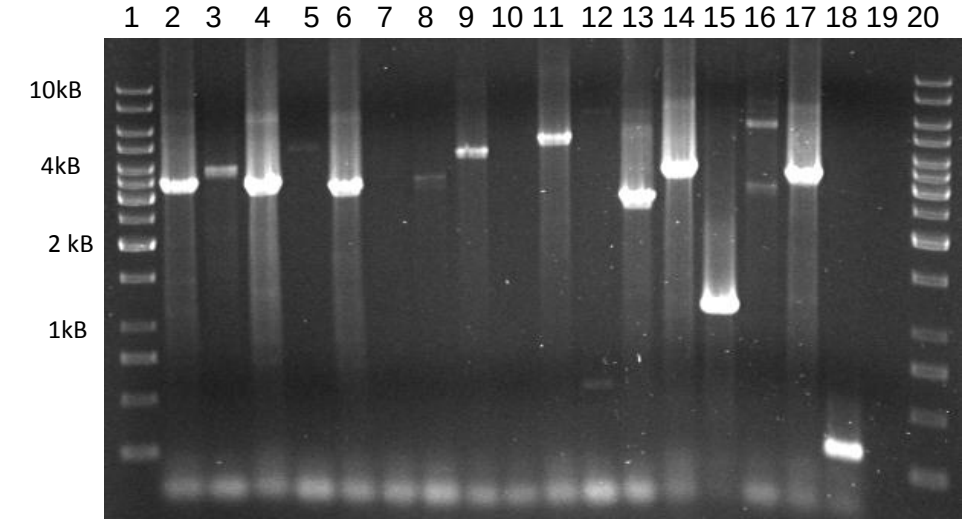


Abbildung 4-1: **Durschnittlichen Insertgröße der *L.pn.* Phil-1 Genbank in DH5α *E.coli*** Die Größe der Fragmente wurde über Kolonie-PCR mit den Primern pBC_A1_f und pBC_b1_r bestimmt. Spur 1 und 20: 5µl 1kb DNA-Ladder. Spur 2-17: Klone aus der Genbank. Spur 18: Leervektor. Spur 19: Negativkontrolle (H_2O)

Die für die Berechnung der Abdeckung der konstruierten Genbank notwendige durchschnittliche Insertionsfragmentgröße der Klone wurde mittels Kolonie-PCR von insgesamt 36 Klonen ermittelt. Abbildung 4-1 zeigt das Ergebnis von 18 dieser 36 Klone.
Nach Analyse der einzelnen Amplifikate der Kolonie-PCR, ergab sich eine durschnittliche Fragmentgröße von 3,6kB. *L.pn.* Phil-1 hat eine Genomgröße von 3.397.754Bp. Mittels der Carbon-Clarke Formel errechnet sich die Genomabdeckung mit einer Wahrscheinlichkeit von P=0.99, die Anzahl der zu screenenden Klone zu 4344. Insgesamt besteht die konstruierte heterologe Genbank aus 4896 Klonen. Die daraus resultierende Wahrscheinlichkeit der Genomabdeckung beträgt P=99,44.

4.2.1 Screening der *L.pn.* Philadelphia-1 Klonbank in *E.coli* auf hämolytische, lipolytische und proteolytische Aktivität

Zur Identifizierung von Hydrolase-Genen wurden die vereinzelten Klone der *E.coli*-Genbank auf LB-Blut-, LB-Casein und LB-Eigelb-Agar überimpft. Nach 48h Inkubation bei 37°C wurde optisch die Aktivität der Klone, im Vergleich zur Negativkontrolle *E.coli* (pBCKs), auf den einzelnen Medien bestimmt. Die hämolytische Aktivität wurde anhand der Größe des Hämolysehofes um die einzelnen Kolonien beurteilt (s. Abbildung 4-2). Proteolytische Aktivität wurde durch milchiges Präzipitat (verursacht durch para-Caseinat) um die entsprechende Kolonie sichtbar. Die lipolytische Aktivität sollte ebenfalls anhand eines opaleszenten Präzipitates auf Eigelb-Agar um die Kolonien quantifizierbar sein. Als Positivkontrolle für hämolytische und lipolytische Aktivität diente *E.coli* (pKH192), welcher die membranassozierte Phospholipase PlaB von *Legionella pneumophila* exprimiert. Als Kontrolle für proteolytische Aktivität wurde *E.coli* (pAF13) mit auf die Casein-Agar-Platten aufgetragen. Das Plasmid pAF13 trägt das Gen für die Zinkmetalloprotease ProA von *Legionella pneumophila*. Hämolytische und proteolytische Aktivität waren bereits nach 48h Inkubation bei 37°C deutlich zu erkennen. Lipolytische Aktivität konnte in einem geringen Ausmaß nach 2 Tagen Inkubation bei 37°C und anschließender Inkubation bei RT über 5 Tage nur bei der Positivkontrolle, *E.coli* (pKH192), festgestellt werden. In der Tabelle 4-1 sind die Ergebnisse der Testung von 960 Klonen zusammengefasst.

Tabelle 4-1:Zusammenfassung des Screenings von 960 Klonen der *L.pn.* Phila-1 Genbank in *E.coli*.

Anzahl Klone	**Hämolytisch aktiv**	**Proteolytisch aktiv**	**Lipolytisch aktiv**
960	601	1	0

601 Klone wiesen auf der LB-Blut-Platte einen Hämolysehof auf und wurden somit als hämolytisch eingestuft. Proteolytische Aktivität konnte nur bei einem der gescreenten Klone festgestellt werden. Auf den LB-Eigelb-Platten zeigte keiner der Klone eine lipolytische Aktivität.

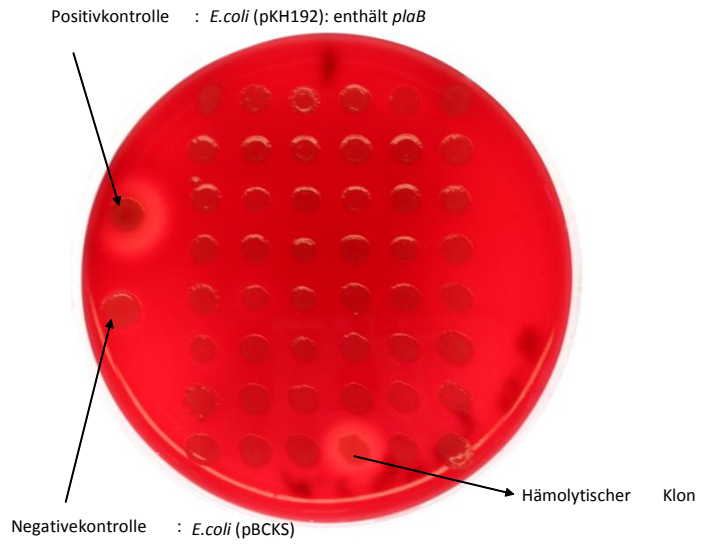


Abbildung 4-2: **Hämolyse-Screen der *L.pn.* Philadelphia-1 *E.coli* Klonbank.** Die hämolytische Aktivität der Klone wurde anhand des Hämolysehofes um die entsprechende Kolonie im Vergleich zur Positivkontrolle *E.coli* (pKH192) und zur Negativkontrolle *E.coli* (pBCKS) beurteilt.

4.2.2 Identifizierung der für die hämolytische und proteolytische Aktivität verantwortlichen Gene in den gescreenten *E.coli* – Klonen

Um die, für die hämolytische und proteolytische Aktivität verantwortlichen chromosomalen Abschnitte von *L.pn.* Phil-1 mit den kodierten Genen zu identifizieren, wurde von den hämolytischen *E.coli*- Klonen Plasmid-DNA isoliert, anschließend mit Hilfe der Sequenzierprimer pBC_A1_f und pBC_b1_r sequenziert und mittels Blast-Suche die entsprechenden Gene identifiziert. Aufgrund der großen Anzahl an hämolytischen Klonen, wurden die entsprechenden Gene zunächst nur bei einer begrenzten Anzahl von Klonen (51) identifiziert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-2 zusammengefasst.

Tabelle 4-2: Identifikation der chromosomalen Fragmente von *L.pn.* Phila-1 in den hämolytischen und proteolytischen *E.coli* – Klonen. Die Fragmente wurden durch Sequenzierung der Inserts mit den Primern pBC_fw und pBC_rv und anschließender BLAST- Suche identifiziert. (*Position im Genom von *L.pn*. Phil-1 (NC_002942))

Klon	Lokalisation* (pBC_fw)	Lokalisation* (pBC_rv)	Länge Fragment in bp	lpg-Nr.	Gene auf den Fragment
P2C3	2507096	2503775	3321	2218-2220	choline monooxygenase ,hypothetical protein ,hypothetical protein ,
P2B8	2337445	2333304	4141	2083-2087	TraN ,putative conjugative transfer protein TrbC ,TraU ,TraW ,TraC
P3H12	514531	507895	6636	0466-0471	oxaloacetate decarboxylase alpha subunit ,zinc metalloprotease ,lipase A ,endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein ,fructose bisphosphate aldolase ,phenol hydroxylase
P4B4	1084775	1078873	5902	0986-0989	membrane protein ,membrane protein, Tfp pilus assembly, pilus retraction ATPase PilT ,hypothetical protein ,membrane protein
P4D5	780065	776261	3804	0711-0714	imidazolonepropionase ,endo-1,4-beta-xylanase-like ,oligopeptide transporter ,sensor histidine kinase
P3E10	2971128	2975770	4642	2629-2634	permease ,permease ,aminopeptidase A/I ,DNA polymerase III, chi subunit ,hypothetical protein ,leucine aminopeptidase
P5A1	1770153	1768659	1494	1602-1603	FLJ00180 protein ,plaB
P5C2	1079786	1076261	3525	0983-0986	conjugative coupling factor TraD ,hypothetical protein ,hypothetical protein ,membrane protein
P5E5	462579	458567	4012	0418-0422	6-phosphogluconate dehydratase ,glucokinase ,multifunctional: 2-keto-3-deoxygluconate 6-phosphate aldolase/(4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase ,D-xylose (galactose, arabinose)-proton symporter ,glucoamylase
P5F5	779320	775597	3723	0711-0713	imidazolonepropionase ,endo-1,4-beta-xylanase-like ,oligopeptide transporter
P6H4	40994	37430	3564	0029-0033	sensory box (GGDEF/EAL domain) regulatory protein ,hypothetical protein ,hypothetical protein ,leucine aminopeptidase ,hypothetical protein
P6F7	2594862	2596684	1822	2297-2298	ribonuclease E ,inclusion membrane protein A
P7D5	763417	760575	2842	0697-0699	sulfate transporter ,hypothetical protein ,outer membrane protein TolC
P7G2	1376204	1368532	7672	1240-1245	hypothetical protein ,conjugal transfer protein TraA ,transposase, ISSod13 ,hypothetical protein ,LvrE ,LvhD4
P7A9	1049717	1051674	1957	0961-0962	peptide ABC transporter, permease protein ,DNA polymerase III, alpha subunit
P7B10	2856479	2852158	4321	2524-2527	transcriptional regulator, LuxR family ,hypothetical protein ,hypothetical protein ,hypothetical protein with coiled coil domain
P8F4	753312	754500	1188	694	prolyl-tRNA synthase
P8A8fw	3104127	3104276	149	2754	DNA polymerase III subunits gamma and tau
P8A8rv	2914900	2915109	209	2584	SidF, inhibitor of growth family, member 3
P8B8	1455344	1452860	2484	1320-1321	type II protein secretion LspD ,oxidoreductase
P8C8fw	-	-	-	-	Keine auswertbare Sequenz
P8C8rv	2543450	2543553	103	2244	hypothetical protein
P8E7	1089798	1087415	2383	0992-0998	hypothetical protein ,hypothetical protein ,hypothetical protein ,hypothetical protein ,hypothetical protein ,hypothetical protein ,hypothetical protein

Tabelle 4-2: Identifikation der chromosomalen Fragmente von *L.pn.* Phila-1 in den hämolytischen und proteolytischen *E.coli* – Klonen. Die Fragmente wurden durch Sequenzierung der Inserts mit den Primern pBC_fw und pBC_rv und anschließender BLAST- Suche identifiziert. (*Position im Genom von *L.pn*. Phil-1 (NC_002942))

P1G2	511785	514531	2746	0469-0471	endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein ,fructose bisphosphate aldolase ,phenol hydroxylase
P11A7	746372	740995	5377	0688-0691	Hsp60, 60K heat shock protein HtpB ,DNA binding stress protein ,hypothetical protein ,DNA topoisomerase IV subunit B
P11B10rv	1873448	1873388	60	1683	hypothetical protein
P11C12	2518759	2512454	6305	2224-2227	UVB-resistance protein UVR8 ,expressed protein (GH3 homolog) ,isovaleryl CoA dehydrogenase ,acetyl CoA carboxylase alpha subunit
P11E12	880151	884010	3859	0803-0805	acyl CoA dehydrogenase, short chain specific ,choloylglycine hydrolase ,phosphoenolpyruvate synthase ,
P12A5	264579	260350	4229	0226-0229	multidrug efflux protein, outer membrane component ,hypothetical protein ,amino acid permease family protein ,heme oxygenase
P12B2	1095011	1089919	5092	0998-1006	hypothetical protein ,hypothetical protein ,putative exported protein ,hypothetical protein ,putative exported protein ,carbon storage regulator ,hypothetical protein ,LvrA ,cobalt/zinc/cadmium efflux RND transporter, outer membrane protein
P12D6fw	273350	272889	461	0234	SidE
P12D6rv	30171	30456	285	0023	transmembrane protein
P12F3	1764431	1759742	4689	1592-1597	30S ribosomal protein S6, carbon storage regulator CsrA, hypothetical protein, hypothetical protein, enoyl CoA hydratase, thiolase
P12H4	2859160	2861824	2664	2528-2529	putative alpha-amylase, hypothetical protein
P12C11	1146938	1138101	8837	1036-1048	outer membrane lipoprotein ,hypothetical protein ,VrrB ,hypothetical protein ,putative S-isoprenylcysteine methyltransferase ,hypothetical protein ,hypothetical protein ,hypothetical protein ,oxidoreductase, FAD-binding ,hypothetical protein ,hypothetical protein ,ATP synthase gamma subunit C-terminus ,ATP synthase F1, subunit alpha ,
P13B4fw	2415180	2415685	505	2156	SdeB
P13B5rv	1468609	1468878	269	1331	protease DO
P13D3	3051364	3047656	3708	2695-2698	heptosyl transferase, glycosyltransferase family 9 protein
P13E3	350185	352954	2769	0293-0296	long chain acyl-CoA dehydrogenase ,hypothetical protein ,mannose-1-phosphate guanyltransferase ,hypothetical phosphotransferase
P13G6rv	1772535	1772620	85	1607	phosphoenolpyruvate carboxylase
P13G6fw	2301686	2302059	373	2061	major facilitator family transporter
P13A9	113534	114901	1367	0099	DNA polymerase I
P13E7	1676249	1671095	5154	1509-1514	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase
P13H7	2994740	2993515	1225	2645-2647	excinuclease ABC subunit ,response regulator GacA ,phenylalanine-4-hydroxylase
P9D6	460329	459518	811	0419	glucokinase
P9C2	593558	588812	4746	0549-0553	gamma-glutamyltranspeptidase
P9E11	2283917	2281507	2410	2037-2040	enolase ,transmembrane protein ,putative mevalonate kinase ,mevalonate diphosphate decarboxylase

Tabelle 4-2: Identifikation der chromosomalen Fragmente von *L.pn.* Phila-1 in den hämolytischen und proteolytischen *E.coli* – Klonen. Die Fragmente wurden durch Sequenzierung der Inserts mit den Primern pBC_fw und pBC_rv und anschließender BLAST- Suche identifiziert. (*Position im Genom von *L.pn*. Phil-1 (NC_002942))

P10A2	232050	234902	2852	0200-0203	cytochrome D ubiquinol oxidase subunit II, cyanide insensitive ,hypothetical protein ,hypothetical protein ,fusion of two types of conserved hypothetical protein
P10B5	1615538	1612610	2928	1461-1463	single stranded DNA specific exonuclease RecJ ,zinc binding TIM barrel protein, YjbN family ,preprotein translocase; secretion protein SecA
P10F7	2291996	2286983	5013	2043-2049	peptidoglycan associated lipoprotein ,conserved domain protein ,ABC transport system periplasmic substrate binding protein ,ABC transporter, ATP binding protein ,ABC transporter, permease ,hypothetical protein ,hypothetical protein
P4G5	593762	597666	3904	0553-0557	aminoglycoside phosphotransferase ,DNA-damage inducible protein P ,tRNA-Gly ,hypothetical protein ,formamidopyrimidine DNA glycosylase
P9F3	2606676	2611944	5268	2304-2311	adenine specific methylase ,Smr domain protein, DNA mismatch repair protein-like ,rhodanese domain protein ,glutaredoxin 3 ,protein export protein SecB ,glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+] ,glutamate racemase ,interaptin
P9F11	2095771	2089789	5982	1868-1874	ABC transporter, ATP-binding component ,ribonuclease III ,transmembrane protein ,signal peptidase I (lepB-1) ,GTP binding elongation factor LepA ,membrane bound lytic murein transglycosylase ,general secretion pathway protein L
P10C12 fw	2217760	2217104	656	1978	hypothetical teichoic acid biosynthesis protein
P10C12 rv	-	-	-	-	Keine auswertbare Sequenz
P10E7	2291996	2286981	5015	2043-2049	peptidoglycan associated lipoprotein ,conserved domain protein ,ABC transport system periplasmic substrate binding protein ,ABC transporter, ATP binding protein ,ABC transporter, permease ,hypothetical protein ,hypothetical protein
P10F8	349955	349306	649	0293	long chain acyl-CoA dehydrogenase

Die durchschnittliche Fragmentgröße der sequenzierten Klone beträgt 3,87kb und ist übereinstimmend mit den Ergebnissen aus der Kolonie-PCR (siehe 4). Neben einer Vielzahl von Genen, die für hypothetische Proteine kodieren, wurden bei vielen Klonen Gene identifiziert, die für membranassoziierte Proteine oder Proteine von putativen Transportsystemen kodieren. Die Insertion des einzigen proteolytischen Klons P3H12, welcher auch eine starke hämolytische Aktivität aufwies, enthält das Gen für die Zinkmetalloprotease ProA, die für die hauptsächliche sekretierte proteolytische Aktivität von *L.pn.* Phil-1 verantwortlich ist (Szeto and Shuman 1990; Moffat, Black et al. 1994). Neben ProA konnte mit Hilfe des Screenings ein weiterer bekannter hämolytischer Faktor von *Legionella pneumophila* gefunden werden. Es handelt sich um die membranassoziierte Phospholipase PlaB, welche sich u.a. durch eine starke hämolytische Aktivität auszeichnet

(Flieger, Rydzewski et al. 2004; Bender, Rydzewski et al. 2009). Diese wurde zusammen mit einem weiteren Protein (FLJ00180) auf dem Plasmid von Klon P5A1 identifiziert. Das Auffinden von bereits bekannten proteolytischen und hämolytischen Proteinen bzw. den kodierenden Genen, zeigt die prinzipielle Wirksamkeit des beschriebenen Screenings. Dennoch weist die hohe Anzahl an hämolytischen *E.coli*-Klonen und die Tatsache, dass nur ein proteolytischer und kein lipolytischer Klon identifiziert wurde darauf hin, dass das Screening-System für die gezielte Suche nach neuen hydrolyseassozierten Genen von *L.pn.* Phil-1 nur bedingt geeignet ist und einen enormen Material und Zeitaufwand zum Nachweis der eigentlich bedeutsamen Gene, bei größeren Insertionen bedarf. Daher wurde beschlossen, die Suche mit einer Transposon-mutagenisierten Genbank von *L.pn.* Phil-1 fortzuführen.

4.3 Screening der TN5-mutagenisierten Klonbank von *L.pn.* Philadelphia-1

Ein weiterer Ansatz zur Identifizierung von Genen, die für hydrolytische Proteine von *L.pn.* Phil-1 kodieren, bestand im Screening einer TN5-mutagenisierten Klonbank. Diese wurde durch B.Pless im Rahmen einer Diplomarbeit erstellt (Diplomarbeit B.Pless; (Aurass, Pless et al. 2009). Um zu testen, ob das beabsichtigte Screeningverfahren zur Identifizierung hydrolytischer Proteine auf Insertionsmutanten von *L.pn.* Phil-1 anwendbar ist, wurden aus der insgesamt 11300 Klone umfassenden Bank zunächst 648 Klone in MTPs vereinzelt. Die vereinzelten Klone wurden dann auf ihre hämolytische, proteolytische sowie lipolytische Aktivität, auf entsprechend supplementierten BCYE-Agar getestet. Als Kontrolle wurde auf jede der Screeningplatten der Wildtyp in der oberen linken Ecke mitgeführt. Im Gegensatz zum Screening mit der *L.pn.* Phil-1 Genbank in *E.coli*, wo nach erhöhter Aktivität auf den entsprechenden Platten gesucht wurde, wurden die TN5-mutagenisierten Klone vor allem in Hinblick auf reduzierte Aktivitäten gescreent.

Grundlage für die relative Quantifizierung der einzelnen Aktivitäten, bildeten die entstehenden Höfe um die Kolonien (siehe Abbildung 4-3).

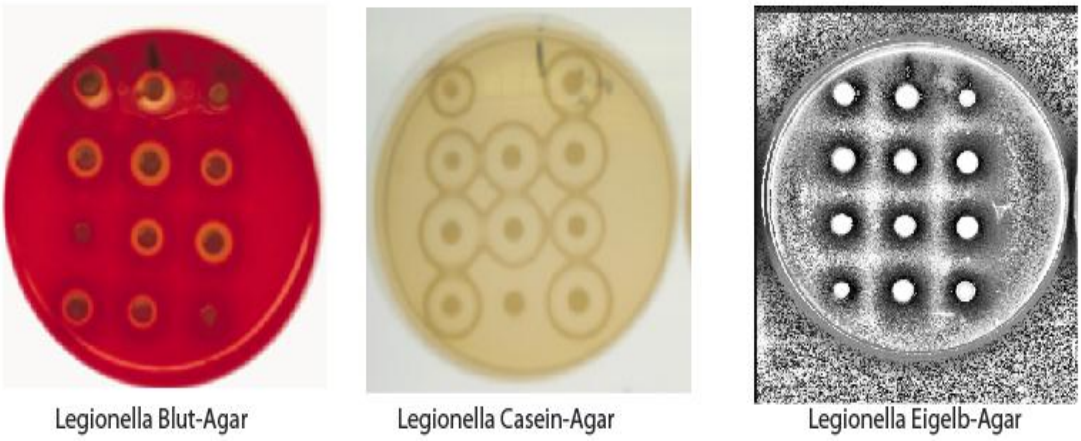


Abbildung 4-3: **Screening vereinzelter Klone der *L.pn.* Phil-1 TN5-Bank auf *Legionella* Blut-, *Legionella* Casein- und *Legionella* Eigelb-Agar**. Die Aktivität Tn5-mutagenisierten Klone auf den Screeningmedien wurde anhand der entstehenden Höfe ermittelt. In der oberen linken Ecke ist jeweils *L.pn.* Phil-1 Wildtyp aufgetragen.

Eine Übersicht der Anzahl an Mutanten, die eine reduzierte Aktivität auf den Screeningmedien aufwiesen ist in Tabelle 4-3 dargestellt.

Tabelle 4-3: Anzahl der gescreenten Mutanten mit reduzierter Aktivität im Vergleich zu *L.pn.* Philadelphia-1 Wildtyp auf einem der Screening-Medien.

Anzahl gescreenter Klone	Reduzierte Hämolyse	Reduzierte Proteolyse	Reduzierte Lipolyse
648	39	10	20

Insgesamt konnten 46 (7,1%) Mutanten identifiziert werden, die in mindestens einer der Aktivitäten reduziert waren. Dabei zeigten 39 (6,0 %) Mutanten eine Reduktion der hämolytischen Aktivität (P3C6, P4B4, P5A1, P5A2, P6C5, P6D3, P6D6, P7A4, P8C2, P8D2, P9A6, P10C4,P11B3, P11C5, P12A6, P14A3, P14A6 P14D1, P15B2, P16B5, P16D1, P17A5, P18C3, P18C4, P19A1, P19A5, P19C2, P20C1, P21A4, P21B4, P23D1, P23A1, P23D2, P23D3, P24B6, P25B6, P25D6, P26A3, P21C5). 10 (1,5%) der Mutanten wiesen im Vergleich zum Wildtyp eine verringerte Proteolyse auf den *Legionella*-Casein-Platten auf (P6C5, P7A4, P10A3, P10C4, P11C5, P14C4, P14D4 P17A5, P25D6, P26A3). Bei 20 (3,1%) der gescreenten Klone führte die Transposoninsertion zu einer Reduktion der lipolytischen Aktivität, die durch eine Verringerung des Präzipitates um die entsprechenden Kolonien auf den *Legionella*-Eigelb-Platten zu erkennen war (P4B4,

P6C5, P7B3, P7D6, P8A1, P8C2, P10C4, P10A3, P11B3, P11C5, P12A6, P16B2, P16D1, P21C5, P23A1, P23D1, P23D3, P24B6, P25D6, P26A3).

Das Venn-Diagramm in Abbildung 4-4 zeigt, bei wie vielen Mutanten die Transposoninsertion zu einer Reduktion in mehr als einer der gescreenten Aktivitäten geführt hat. 10 der insgesamt 39 Mutanten, die eine reduzierte Hämolyse zeigten, wiesen auch eine verringerte Lipolyse auf (P4B4, P8C2 P11B3, P12A6, P16D1, P21C5, P23A1, P23D1, P23D3, P24B6). Bei der Mutante P10A3 ging die Reduzierung der Lipolyse mit einer Reduzierung der proteolytischen Aktivität einher. Zwei Mutanten (P7A4, P17A5) waren zugleich in Hämolyse und Proteolyse weniger aktiv. Fünf der gescreenten Mutanten (P6C5, P10C4, P11C5, P25D6, P26A3) waren im Vergleich zum Wildtyp in allen drei Aktivitäten reduziert.

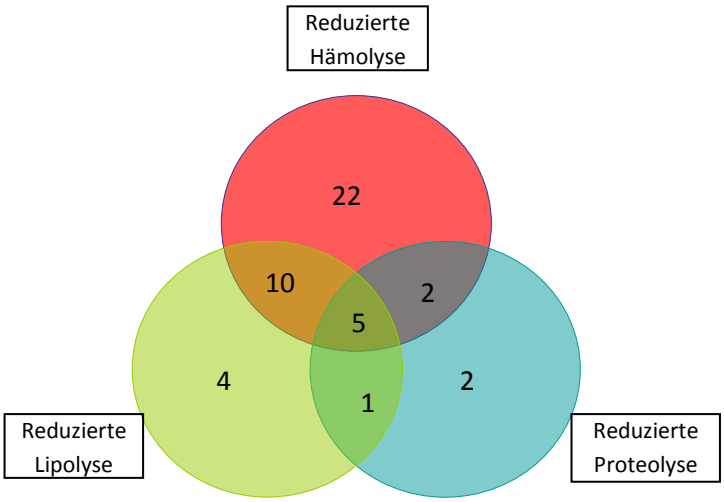


Abbildung 4-4: **Anzahl der Mutanten mit reduzierter Aktivität im Vergleich zu *L.pn.* Philadelphia-1 Wildtyp**. Die Schnittmengen geben die Anzahl der Mutanten wieder, die in mehr als einer der gescreenten Aktivitäten reduziert waren.

Neben der Reduktion der hämolytischen-, lipolytischen und proteolytischen Aktivität durch die Insertion des Transposons, führte diese bei einigen der Mutanten zu einer Erhöhung der Aktivitäten. In Tabelle 4-4 ist die Anzahl dieser Klone festgehalten.

Tabelle 4-4: Anzahl der gescreenten Mutanten mit erhöhter Aktivität im Vergleich zu *L.pn.* Philadelphia-1 Wildtyp auf einem der Screening-Medien.

Anzahl Klone	Erhöhte Hämolyse	Erhöhte Proteolyse	Erhöhte Lipolyse
648	9	0	0

Mit insgesamt 9 Mutanten, die eine Erhöhung der Aktivität aufwiesen (P4C5, P4D1, P6C6, P7B1, P15B3, P16A3, P16C5, P17B5, P17C2), ist die Anzahl wesent-

lich geringer als die der Mutanten mit einer Transposonmutation, die sich negativ auf die gescreenten Aktivitäten auswirkte. Wie die Tabelle 4-4 zeigt, konnte eine Erhöhung nur in der hämolytischen Aktivität auf *Legionella*-Blut-Agar festgestellt werden. Mutanten mit erhöhter Lipo- bzw. Proteolyse wurden nicht detektiert.

4.3.1 Lokalisation der Tn5-Insertion

Um den Phänotyp der Mutanten mit reduzierter und erhöhter Aktivität im Screen einen Genotyp zuzuweisen, wurde die Insertionsstelle des Transposons mittels inverser PCR und Single Primer-PCR in den einzelnen Mutanten bestimmt. Die so erhaltenen Insertionsstellen wurden anschließend über PCR mit spezifischen Primern verifiziert. Abbildung 4-5 zeigt beispielhaft das Ergebnis einer solchen spezifischen PCR. Bei korrekter Lokalisation des Transposons sollten demnach die Amplifikate um 1221Bp größer sein als das entsprechende wildtypische Genamplifikat. Von den insgesamt 55 Mutanten mit reduzierter bzw. erhöhter Aktivität konnte bei 53 die Insertionsstelle des Transposons mittels der o.g. Methoden bestätigt werden.

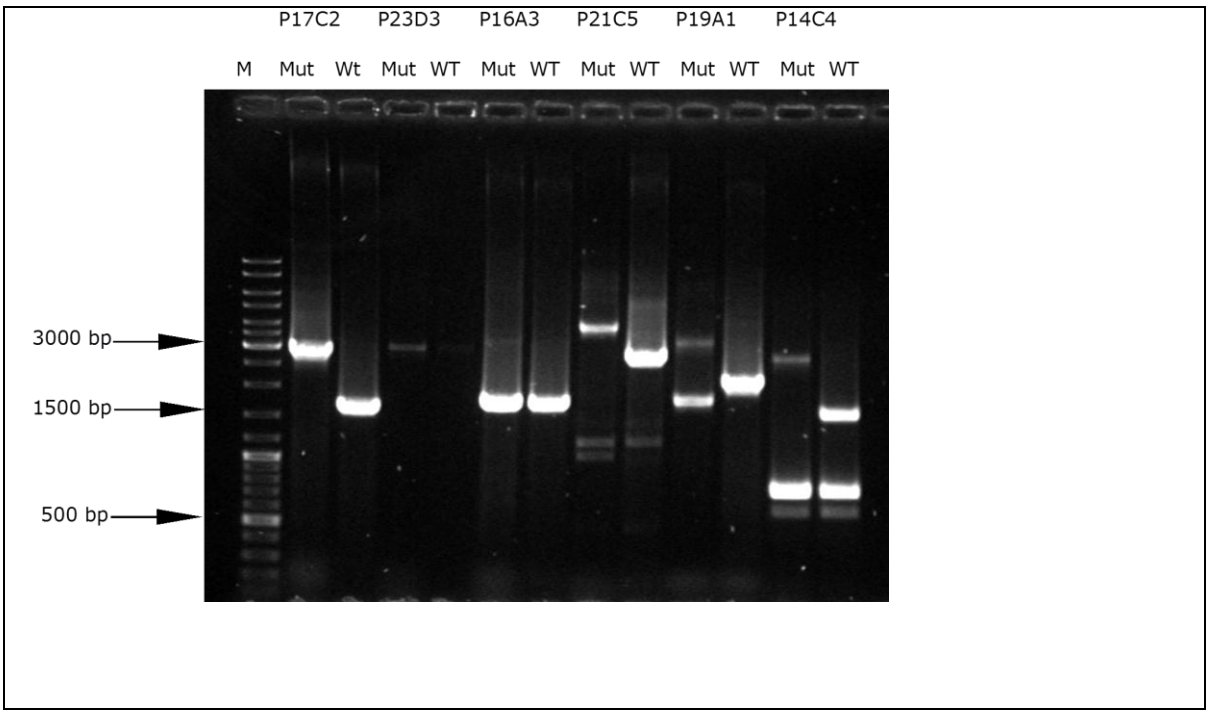


Abbildung 4-5: **Beispiel Verifizierung der Tn5-Insertion. Amplifikate aus der PCR mit genspezifischen Primern**. Als Kontrolle wurde das entsprechende Wildtypgen mit denselben Primern amplifiziert. Mut: Mutante, WT: Wildtyp

In Tabelle 4-5 sind die Ergebnisse der Lokalisation des Transposons in den einzelnen Mutanten aufgeführt. Neben den lpg-Nummern und dem entsprechenden kodierten Protein sind die Resultate von *in silico* Analysen über Transkriptions-

einheit (Operons), die Funktion des kodierten Proteins, die subzelluläre Lokalisation, die Einstufung als putativer Virulenzfaktor sowie der Phänotyp auf dem Screeningmedien ebenfalls mit in der Tabelle 4-5 vermerkt.

In 47 Fällen konnte die Insertionsstelle über einen Shift in der PCR mit spezifischen Primern verifiziert werden. Bei zwei der verifizierten Mutanten (P3C6: *lpg0089*::eztn5, P8A1: *lpg1831*::eztn5) war neben dem um 1221Bp größeren Amplifikat auch die Wiltypbande zu sehen, was auf eine Kontamination mit einer anderen Mutante hinweist. Die ermittelte Insertionsstelle konnte bei sechs der 53 Mutanten (P4B4, P4C5, P6D3, P7B3, P9A6, P15B3) nicht bestätigt werden. Diese Mutanten wiesen in der spezifischen PCR keinen Shift gegenüber dem Wildtyp auf.

Tabelle 4-5: Lokalisation der Tn5-Insertion der Mutanten im Genom von *L.pn.* Philadelphia-1, die im Screening eine reduzierte bzw. erhöhte Aktivität aufwiesen. (m.c.- monocistronisch)

Klon	**lpg-Nr.**	**Kodiertes Protein**	**Insertionsstelle (Bp)**	**Transkriptionseinheit[1]**	**Funktionale Kategorie[2]**	**Subzellulare Lokalisation[3]**	**Putativer Virulenzfaktor[4]**	**Phänotyp Screening Häm/Prot/Lipo[5]**
P6C5	467	ProA	509219		Protease	Sekretiert	ja	↓/↓/↓
P16D1	n.d.		n.d.	.				↓/→/→
P16B5	25	Rcp	31226	m.c.	Detoxifikation / Adaptation, / Hydrolase / Sekretion	Sekretiert	ja	↓/→/→
P3C6	89	Hypothetisches Protein	99413	m.c.	Hypothetisches Protein	Zytoplasma	nein	↓/→/→
P4D1	135	SdhB	159605	m.c.	T4SS EffeKtor	Membran	nein	↑/→/→
P17A5	150	putatives Phagen Protein	n.d.	m.c.	Virale Funktion / Phage / Transposase	Zytoplasma	ja	↓/↓/→
P25B6	203	Hypothetisches Protein	233922	m.c.	Hypothetisches Protein	Zytoplasma	ja	↓/→/→

[1] http://www.microbesonline.org/operons

[2] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/

[3] http://www.psort.org/psortb/

[4] http://bioinfo.icgeb.res.in/virulent/submit.html

[5] Häm: Hämolyse, Lipo: Lipolyse, Prot: Proteolyse; →: Aktivität wie Wildtyp (*L.pn.* Philadelphia-1, ↑: erhöhte Aktivität; ↓ reduzierte Aktivität

Klon	lpg-Nr.	Kodiertes Protein	Insertionsstelle (Bp)	Transkriptionseinheit[1]	Funktionale Kategorie[2]	Subzellulare Lokalisation[3]	Putativer Virulenzfaktor[4]	Phänotyp Screening Häm/Prot/Lipo[5]
P23D3	226	Multidrug Efflux Protein, äußere Membrankomponente	259346	m.c.	Transport und Bindung	Membran	nein	↓/→/↓
P23D1	227	Hypothetisches Protein	261171	m.c.	Hypothetisches Protein	Zytoplasma	nein	↓/→/↓
P19A5	241	Glutaminase	285321	m.c.	AS- und Energie- Metabolismus	Zytoplasma	nein	↓/→/→
P21A4	275	SdbA	324708	m.c.	T4SS Effektor	Zytoplasma	nein	↓/→/→
P23D2	275	SdbA	325185	m.c.	T4SS Effektor	Zytoplasma	nein	↓/→/→
P21C5	293	Acyl-CoA Dehydrogenase	349135	m.c.	Lipid Metabolismus	Membran	nein	↓/→/↓
P6C6	376	SdhA	415474	m.c.	T4SS Effektor	Zytoplasma	ja	↑/→/→
P7B3	483	Hypothetisches Protein	523520	m.c.	Hypothetisches Protein	Zytoplasma	nein	→/→/↓
P21B4	518	Hypothetisches Protein	559680	m.c.	Hypothetisches Protein	Membran	nein	↓/→/→
P19C2	643	Ribonuklease BN	683271	m.c.	DNA/RNA Degradation / Restriktion, Translation	Membran	nein	↓/→/→
P7A4	646	WrbA	693419	m.c.	TransKription-faktor / DANN-bindendes Protein	Sekretiert	nein	↓/↓/→
P8C2	721	RND Efflux Membran-Fusion-Protein	791260	Operon mit *lpg0720*	Transport und Bindung	Sekretiert	nein	↓/→/↓
P6D3	731	Hypothetisches Protein	798503	m.c.	Hypothetisches Protein	Sekretiert	ja	↓/→/→
P12A6	769	Hypothetisches Protein	841083	m.c.	Hypothetisches Protein	Zytoplasma	nein	↓/→/↓
P14D4	960	Peptid ABC-Transporter	1048433	m.c.	Transport und Bindung	Membran	nein	→/↓/→
P15B2	1115	KaiC2	1222683	m.c.	Replikation and Reparatur	Zytoplasma	nein	↓/→/→
P23A1	1115	KaiC2	1222710	m.c.	Replikation und Reparatur	Zytoplasma	nein	↓/→/↓
P16A3	1335	*Major facilitator family* Transporter	1473435	m.c.	Transport und Bindung	Membran	nein	↑/→/→

Klon	lpg-Nr.	Kodiertes Protein	Insertionsstelle (Bp)	Transkriptionseinheit[1]	Funktionale Kategorie[2]	Subzellulare Lokalisation[3]	Putativer Virulenzfaktor[4]	Phänotyp Screening Häm/Prot/Lipo[5]
P14D1	1340	Flagellin	1478733	m.c.	Motilität	Sekretiert	Ja	↓/→/→
P24B6	1352	FadB	1494126	Operon mit *lpg1351,1353*	Lipid Metabolismus, AS-Metabolismus	Zytoplasma	Nein	↓/→/↓
P26A3	1366	Hypothetisches Protein	1511286	m.c.	Hypothetisches Protein	Zytoplasma	Nein	↓/↓/↓
P5A2	1369	HtpG	1516012	m.c.	DetoxifiKation / Adaptation, Hydrolase / Sekretion	Zytoplasma	nein	↓/→/→
P20C1	1379	*Urocanate* Hydratase	n.d.	Operon mit *lpg1380*	AS-Metabolismus	Zytoplasma	nein	↓/→/→
P16C5	1489	Hypothetisches Protein	1646284	m.c.	Hypothetisches Protein	Zytoplasma	nein	↑/→/→
P7D6	1588	LegC6	1757825	m.c.	T4SS Effektor	Zytoplasma	nein	→/→/↓
P17C2	1602	LegL2	1766991	m.c.	T4SS Effektor	Zytoplasma	nein	↑/→/→
P14C4	1639	Hypothetisches Protein	1811696	m.c.	Hypothetisches Protein	Zytoplasma	ja	→/↓/→
P10A3	1754	Hypothetisches Protein	1957319	m.c.	Hypothetisches Protein	Membran	nein	→/↓/↓
P8A1	1831	Acetoacetyl-CoA Synthetase	2051670	m.c.	Kohlenhydrat-Metabolismus	Zytoplasma	nein	→/→/↓
P4B4	1890	LegLC8	2106416	m.c.	T4SS Effector	Zytoplasma	ja	↓/→/↓
P4C5	1890	LegLC8	2106874	m.c.	T4SS Effector	Zytoplasma	ja	↑/→/→
P18C3	2080	TraH	2331126	*tra*-Operon	Transport and binding	Sekretiert	ja	↓/→/→
P17B5	2150	Hypothetisches Protein	2397887	m.c.	Hypothetisches Protein	Sekretiert	nein	↑/→/→
P5A1	2166	Hypothetisches Protein	2431683	m.c.	T4SS Effektor	Zytoplasma	nein	↓/→/→
P9A6	2251	Succinat Dehydrogenase	2553490	Operon mit *lpg2250,2252*	Kohlenhydrat-Metabolismus, AS-Metabolismus	Zytoplasma	nein	↓/→/→
P6D6	2450	Integrales Membranprotein	2762032	m.c.	Hydrolase / Sekretion	Membran	nein	↓/→/→
P14A6	2452	Hypothetisches Protein	2766096	m.c.	Hypothetisches Protein	Zytoplasma	nein	↓/→/→
P14A3	2511	SidC	2836986	m.c.	T4SS Effector	Zytoplasma	ja	↓/→/→
P18C4	2567	ISI-Transposase B	2899912	m.c.	Virale Function / Phage / Transposase	Zytoplasma	nein	↓/→/→

Klon	lpg-Nr.	Kodiertes Protein	Insertionsstelle (Bp)	Transkriptionseinheit[1]	Funktionale Kategorie[2]	Subzellulare Lokalisation[3]	Putativer Virulenzfaktor[4]	Phänotyp Screening Häm/Prot/Lipo[5]
P19A1	2589	d-alanyl-d-alanine carboxy-peptidase	2921711	m.c.	Hydrolase/Sekretion, Biosynthese Sekundärer Metabolite	Sekretiert	ja	↓/→/→
P11C5	2625	CarB	2968824	Operon mit *lpg2624*	Nukleotid-Metabolism, AS-Metabolismus	Zytoplasma	nein	↓/↓/↓
P10C4	2660	Transmembranprotein	3008255	m.c.	Hypothetisches Protein	Zytoplasma	nein	↓/↓/↓
P16B2	2803	Hypothetisches Protein	3158057	m.c.	Hypothetisches Protein	Zytoplasma	nein	→/→/↓
P8D2	2886	QueC	3266728	m.c.	Queuosine Biosynthese	Zytoplasma	nein	↓/→/→
P11B3	2911	Serin-carboxypeptidase	3296293	m.c.	Detoxifikation/Adaptation/Hydrolase/Sekretion	Sekretiert	nein	↓/→/↓
P25D6	2944	*Udp-3-0 glucosamin* N-acyltransferase	3329959	m.c.	LPS-Synthese	Zytoplasma	nein	↓/↓/↓
P15B3	2944	*Udp-3-0 glucosamin* N-acyltransferase	3330462	m.c.	LPS-Synthese	Zytoplasma	nein	↑/↓/↓
P7B1	2971	Malat-Dehydrogenase	3360497	m.c.	Calvin-Zyklus	Membran	nein	↑/→/→

In Abbildung 4-6 ist die Lokalisation der Transposoninsertionsstellen von Mutanten mit verändert hämolytischer, proteolytischer und lipolytischer Aktivität auf dem Chromosom von *L.pn.* Phil-1 dargestellt.

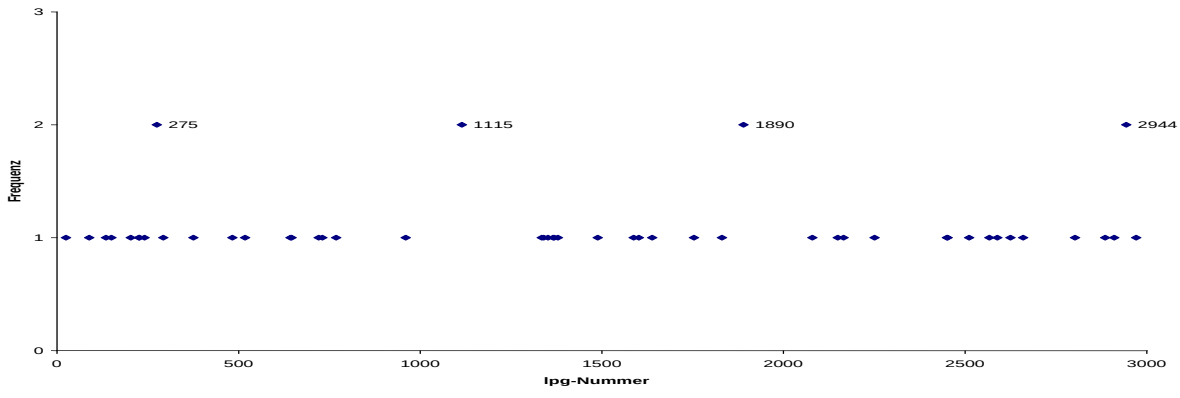


Abbildung 4-6: **Verteilung der identifizierten Tn5-Insertionsstellen im Chromosom von *L.pn.* Philadelphia-1.**

Auf der Ordinate ist zudem die Häufigkeit, mit der ein bestimmtes Gen getroffen wurde, aufgetragen. Es ist deutlich zu erkennen, dass es keine Prävalenzen für die Insertion des Transposons in das Genom gab. Die bestimmten Insertionen sind relativ gleichmäßig über das Genom verteilt. Vier Gene (*lpg0275, lpg1115, lpg1890, lpg2944*) wurden zweimal durch Transposoninsertion mutiert und während des Screenings identifiziert.

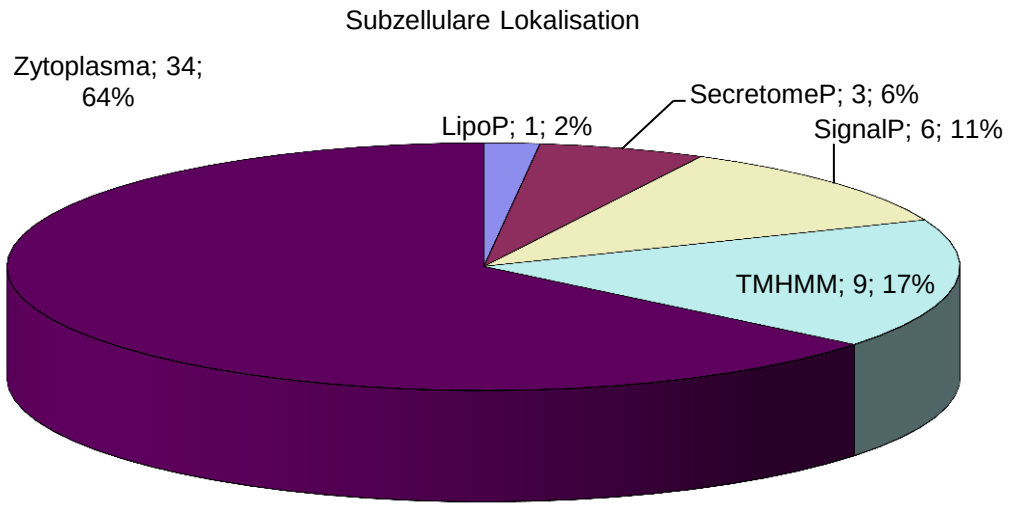


Abbildung 4-7: Vorhergesagte subzellulare Lokalisation der Proteine mit putativem Einfluss auf das Hydrolysom von *L.pn*. Philadelphia-1, welche durch die im Screening identifizierten Gene codiert werden. Vorhersage mittels „PSortB": http://www.psort.org/psortb/.

Abbildung 4-7 stellt die vorhergesagte Lokalisation der Proteine dar. Zwei Drittel der Proteine (64%) sind laut Vorhersage zytoplasmatisch lokalisiert. Die restlichen während des Screens identifizierten Proteine sind entweder membranassoziert (17%) oder werden sekretiert (17%). Um einen ersten Hinweis darauf zu bekommen, inwiefern die im Screening identifizierten Gene für virulenzassozierte Proteine kodieren, wurde mit Hilfe des Webdienstes „VirulentPred" eine Vorhersage diesbezüglich durchgeführt. Abbildung 4-8 zeigt das Ergebnis dieser Vorhersage. Elf der 52 (21%) Proteine werden demnach als putative Virulenzfaktoren betrachtet. Im Gegensatz dazu wird für die restlichen 41 (79%) Proteine keine Virulenzassoziation vorhergesagt.

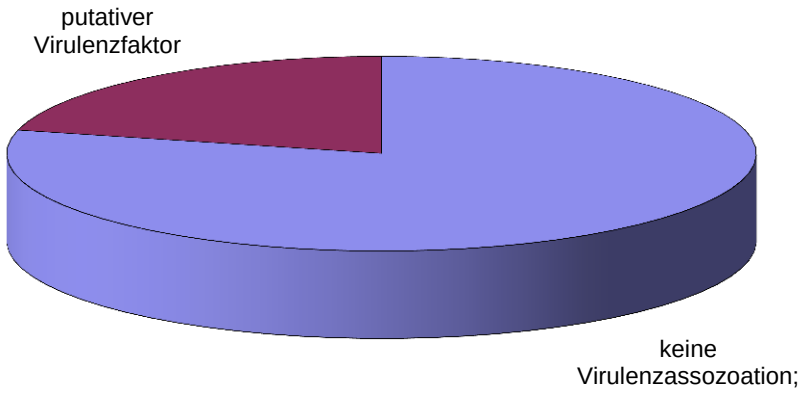


Abbildung 4-8**: Verteilung der im Screen identifizierten Gene, die einen putativen Virulenzfaktor kodieren.** Einstufung erfolgte anhand von in silico Analyse mit „VirulentPred".

Um die Proteine einer funktionellen Kategorie zuzuordnen wurde eine phylogenetische Klassifizierung durchgeführt. Die Ergebnisse dieser sind in Abbildung 4-9 dargestellt. Elf der Proteine partizipieren möglicherweise am Metabolismus von *L.pn.* Phil-1. Zehn der identifizierten Proteine konnten nach Literaturrecherche als putativ virulenzassoziiert eingestuft werden. Neben fünf Proteinen, die der Kategorie der Hydrolasen zugeordnet wurden, finden sich auch Proteine mit Transport- und Bindungs- sowie regulatorischer Funktion. Diese könnten indirekt die hydrolytischen Eigenschaften des Organismus beeinflussen. Ein Drittel der im Screen identifizierten Proteine konnte jedoch keine putative Funktion zugeordnet werden. Die Funktion dieser Proteine ist daher als hypothetisch deklariert.

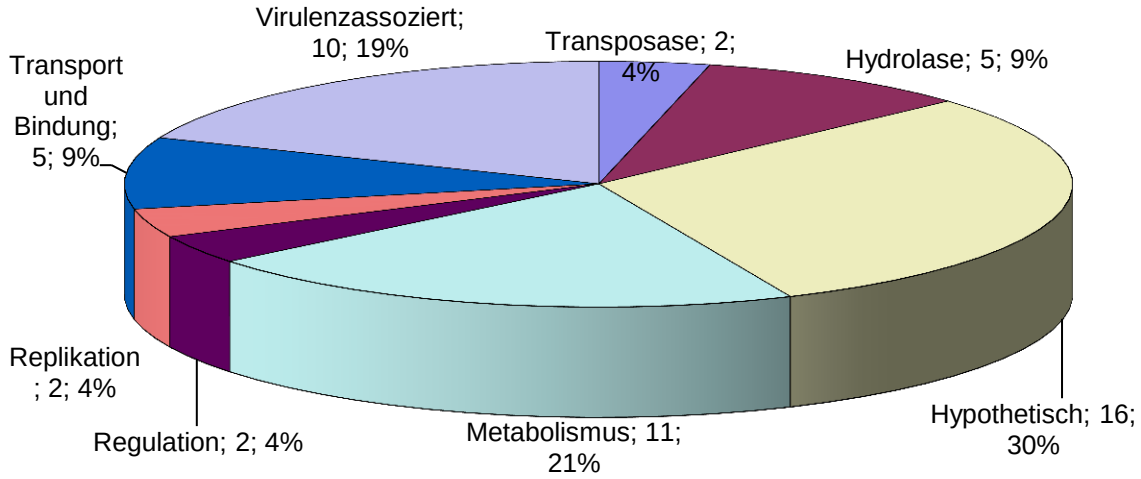


Abbildung 4-9: Putative Funktionsklasse der durch die identifizierten Gene kodierten Proteine. Zuordnung erfolgte anhand einer phylogenetischen Klassifizierung (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/) und Literaturrecherche. Neben den Funktionen sind die absoluten und prozentualen Zahlen der Proteine angegeben, die der jeweiligen Funktionsgruppe zugeordnet wurden

4.3.2 Replikationsfähigkeit von Mutanten mit reduzierter und erhöhter Aktivität auf den Screeningmedien in *Acanthamobaea castellanii*

Die Fähigkeit von Legionellen sich innerhalb von Amöben zu vermehren, bietet ihnen eine einzigartige ökologische Nische mit vielen Vorteilen. Neben dem Schutz vor äußeren Einflüssen innerhalb der Zellkompartimente der Amöben, führte die Anpassung an diesen Lebensraum auch dazu, dass Legionellen in der Lage sind sich in anderen Zelltypen, wie z.B. humanen Makrophagen oder Epithelzellen intrazellulär zu replizieren (Cianciotto and Fields 1992; Maruta, Miyamoto et al. 1998). Dabei wird die sogenannte Wirtszelle derart moduliert, dass die unter normalen Umständen ablaufende Phagosom-Lysosom Fusion nicht stattfindet. Diese Fähigkeit zur Modulation der Wirtszelle und der damit verbundenen intrazellulären Vermehrung spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenität der Legionellen. Um herauszufinden ob die im Screening gefundenen Transposoninsertionen bei den Klonen mit reduzierter bzw. erhöhter Aktivität auch einen Effekt auf die intrazelluläre Replikation in Amöben haben, wurden diese in einer Koinfektion mit *A.castellanii* getestet. Eine Attenuierung der intrazellulären Replikation als auch eine Erhöhung der Replikationsrate können wichtige Hinweise auf die Virulenzeigenschaften der betreffenden Klone liefern. In Abbildung 4-10 sind die Ergebnisse der Ko-Infektionsexperimente der einzelnen Insertionsmutanten zu sehen. Die Bewertung der Ergebnisse erfolgte anhand des Verhältnisses von Inokulat und 72h Wert (CFU 72h/0h). Eine Mutante wurde demnach als attenuiert betrachtet, wenn das Verhältnis der CFU von 72h zu 0h-Wert nicht größer als fünf betrug. Alle anderen wurden als replizierend eingestuft. Grundlage für diese Einteilung bildete die Vermehrungsfähigkeit des Wildtyps *L.pn.* Phil-1. Diese liegt innerhalb 72h nach Infektion zwischen dem 30-40fachen des Inokulums. Um die biologische und methodische Varianz zu berücksichtigen, wurde die untere Grenze, bei der noch von Replikation in *A. castellanii* ausgegangen werden kann auf das 5fache des Inokulums festgesetzt. Demnach sind etwas mehr als die Hälfte der getesteten Mutanten (29) in der Lage sich in *A.castellanii* zu vermehren. Die restlichen 27 Mutanten dagegen sind in Bezug auf die intrazelluläre Vermehrungsfähigkeit in *A.castellanii* attenuiert.

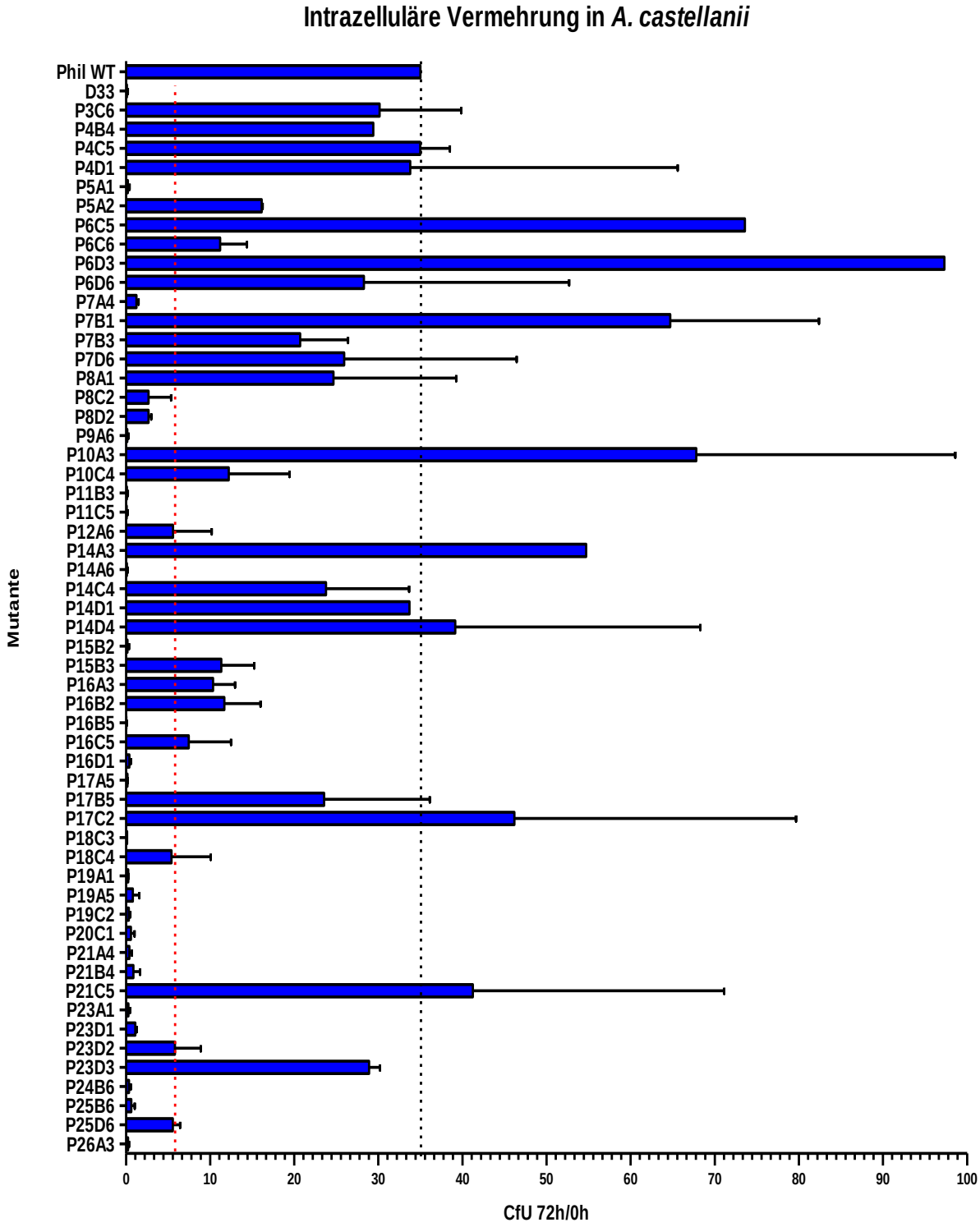


Abbildung 4-10: Koinfektion von *A. castellanii* mit den *L. pneumophila* Philadelphia-1 Mutanten mit reduzierter oder erhöhter Aktivität auf den Screening-Medien. *L.pn.* Philadelphia-1 diente als Positivkontrolle, *L.pn.* Philadelphia-1 dotA-Mutante D33 (Typ IV Sekretionsmutante) als Negativkontrolle. Die intrazelluläre Vermehrung wurde als Ratio zwischen CFU/ml vom 72h-Wert zur CFU vom 0h-Wert ermittelt. (MOI: 0,1; n=2, eine Wiederholung). Rote gestrichelte Linie: 5 fache Replikation des 0h_wertes (Inokulums); Schwarze gestrichelte Linie: Replikation des Wildtyps = 35-fach

4.3.3 Quantifizierung der hämolytischen Aktivität

Die hämolytische Aktivität der 55 getesteten Klone wurde mit Hilfe eines quantitativen Hämolyse-Assays detaillierter untersucht. Als Kontrolle dienten zum einen der *L.pn.* Phil-1 Wildtyp und zum anderen eine *dotA*-Mutante (D33, Typ-IVB-Sekretionsmutante) von der bekannt ist, dass sie eine reduzierte hämolytische Aktivität aufweist (Kirby, Vogel et al. 1998). Abbildung 4-11 zeigt eine Übersicht der hämolytischen Aktivität der getesteten Mutanten. 19 der Mutanten wiesen keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Wildtyp auf. Eine reduzierte Aktivität konnte bei 24 der untersuchten Mutanten festgestellt werden. Zu einer Erhöhung der hämolytischen Aktivität führte die Tn5-Insertion bei 14 der getesteten Mutanten. Die Werte der einzelnen Mutanten sind in Abbildung 4-12 zu sehen.

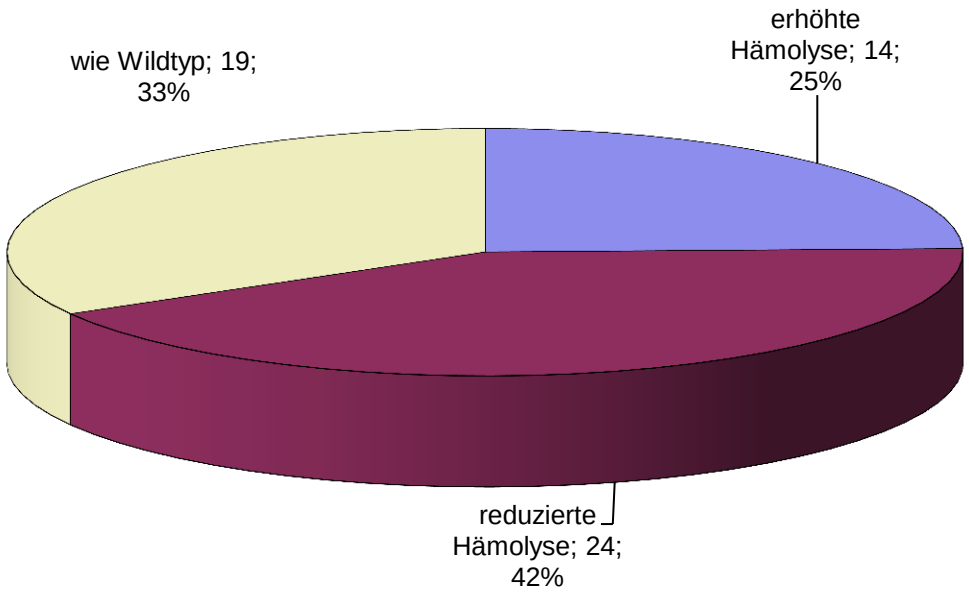


Abbildung 4-11: **Übersicht hämolytische Aktivität der getesteten Klone.** Die Aktivität im Vergleich zum Wildtyp wurde wie folgt eingestuft. 0.8-1.2 fache Wildtypaktivität=wie Wildtyp; Aktivität<0.8fache Wildtypaktivität=reduzierte Hämolyse; Aktivität>1.2 fache Wildtypaktivität=erhöhte Aktivität

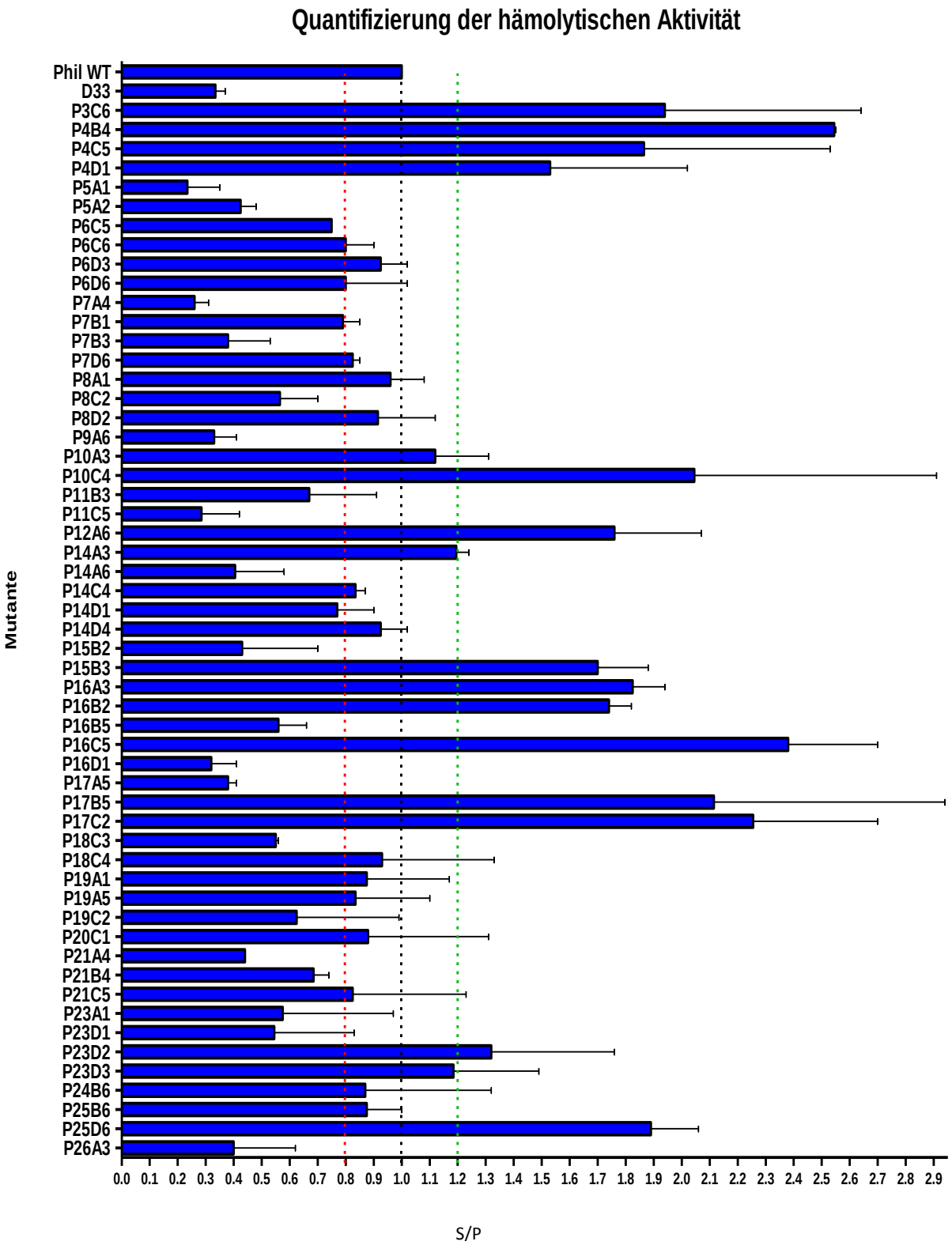


Abbildung 4-12: **Quantifizierung der hämolytischen Aktivität mittels Hämolyseassay**. Kulturen OD_{660}: 2.0 wurden 2h mit humaner Blutsuspension inkubiert. Aktivität relativ zum *L.pn.* Philadelphia-1 WT (Ratio Sample zu Positivkontrolle = S/P) Schwarze Linie: Wildtypaktivität=wie Wildtyp (S/P=1); rote Linie (S/P < ,8) = reduzierte Hämolyse; grüne Linie (S/P > 1,2) = erhöhte Aktivität; (n=2, 2 Wiederholungen)

4.3.4 Quantifizierung der lipolytischen Aktivität von Klonen mit reduzierter Aktivität auf Eigelbagar

Mit Hilfe eines quantitativen Lipid-Hydrolyse Assays wurden diejenigen Mutanten, welche auf dem *Legionella*-Eigelbagar eine verringerte Aktivität im Vergleich zum *L.pn.* Phil-1 Wildtyp aufwiesen, genauer auf ihre lipolytische Aktivität hin untersucht. Bei den Mutanten P4B4 und P25D6 konnte der Assay aufgrund von Wachstumsdefekten in der Flüssigkultur nicht durchgeführt werden. Da eine verringerte lipolytische Aktivität als Resultat einer Mutation im Gen (*lpg0467*), welches für die sekretierte Zinkmetalloprotease ProA kodiert, bekannt ist (Flieger, Neumeister et al. 2002), wurde die Mutante P6C5, bei welcher die Transposoninsertion eben dieses Gen betraf, ebenfalls nicht mit dem beschriebenen Assay untersucht. Um zwischen zellassozierter und sekretierter lipolytischer Aktivität zu differenzieren, wurden von den 17 Mutanten jeweils die aufgeschlossenen Zellen sowie der Kulturüberstand im Assay eingesetzt. Getestet wurde neben der phospholipolytischen (PLA) Aktivität mittels des Substrats PC auch die lysophospholipolytische (LPLA) Aktivität mittels LPC. Die Ergebnisse der differenzierten lipolytischen Aktivitäten sind in Abbildung 4-13 zu sehen.

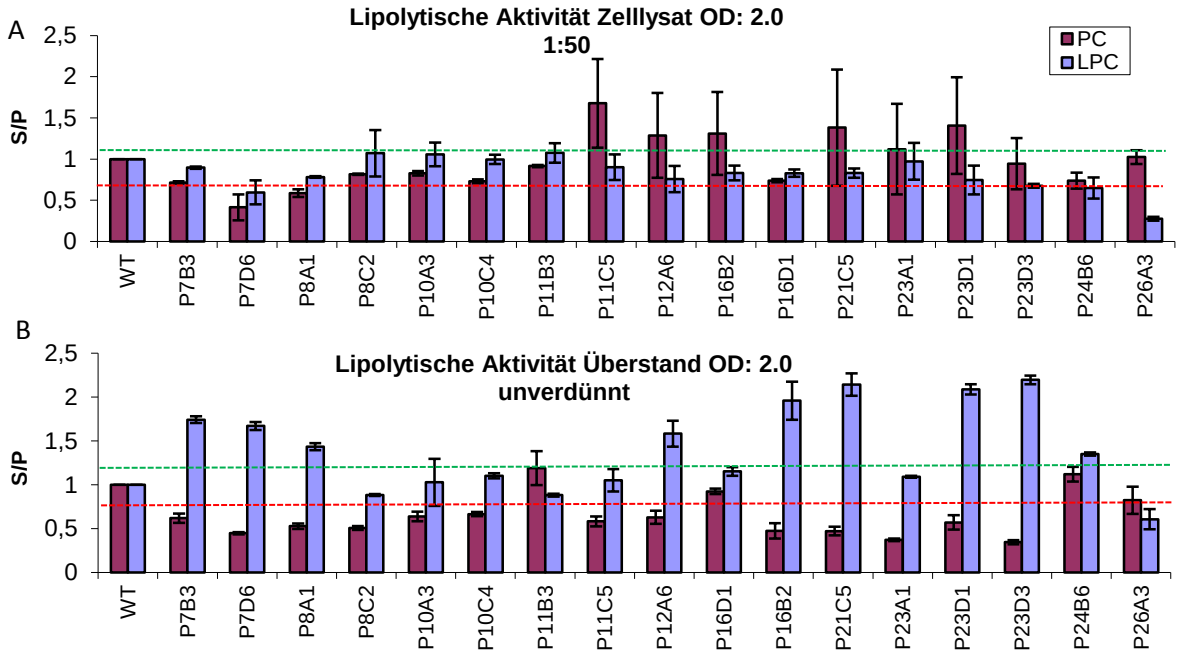


Abbildung 4-13: **Zellassozierte und sekretierte phospho- und lysophospholipolytische Aktivität der Mutanten mit reduzierter Aktivität auf den *Legionella*-Eigelb-Agar**. A: Zellassozierte lipolytische Aktivität. B: Sekretierte lipolytische Aktivität. Die Aktivität ist als S/P Ratio mit *L. pn.* Philadelphia-1 (WT) als Positivkontrolle angeben. Grüne Linie (S/P = 1.2): alle Werte über dieser Linie werden als signifikant erhöht bewertet. Rote Linie (S/P = 0.8): alle Werte die darunter liegen werden als signifikant reduziert bewertet. Substrate: Phosphatidycholin (PC), Lysophosphatidylcholin (LPC). Inkubationszeit 4h. (OD(660nm): 2.0; n=3, mindestens eine Wiederholung)

Um die Aktivitäten besser mit einander vergleichen zu können, wurden nicht die absoluten Werte sondern das Verhältnis zur Aktivität des Wildtyps (S/P) aufgetragen. Wenn dieser Wert kleiner als 0,8 betrug (rote gestrichelte Linie), wurde die Aktivität als verringert angesehen. Wiesen die Mutanten ein S/P Verhältnis von mehr als 1,2 auf (grüne gestrichelte) wurden diese als lipolytisch aktiver beurteilt. Wie zu erkennen ist, konnte eine Reduktion der zellassozierten PLA-Aktivität nur bei den Mutanten P7B3, P7D6, P8A1, P10C4 und P16D1 festgestellt werden. Die Transposoninsertion in den Mutanten P11C5; P12A6, P16B2, P21C5 und P23D1 führte dagegen zu einer Erhöhung der zellassozierten PLA-Aktivität. Die LPLA-Aktivität war bei den Mutanten P7D6, P8A1, P12A6, P23D1, P23D3, P24B6 und P26A3 entsprechend den Kriterien signifikant reduziert. Die sekretierte PLA-Aktivität war beim Großteil der getesteten Mutanten reduziert. Ausnahmen bildeten die Mutanten P11B3, P16D1 und P24B6. Bei diesen konnte kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden. Bei der Untersuchung der sekretierten LPLA-Aktivität war zu beobachten, dass ein Großteil der Mutanten (P7B3, P7D6, P8A1, P12A6, P16B2, P21C5, P23D1, P23D3, P24B6) mit reduzierter sekretierter PLA-Aktivität, eine erhöhte LPLA-Aktivität zeigte. Eine signifikante Reduktion konnte nur bei Mutante P26A3 festgestellt werden.

4.3.5 Auswahl der Mutanten für weitere Analysen

Basierend auf den Ergebnissen der quantitativen Analyse der hämolytischen und lipolytischen Aktivität sowie der Resultate der Koinfektion mit *A. castellanii* (siehe Tabelle 4-6), wurden folgende Mutanten für eine weitere Charakterisierung ausgewählt.

Tabelle 4-6: **Überblick der Ergebnisse aus dem Screen, der quantitativen Analyse der hämolytischen und lipolytischen Aktivität sowie der Replikationsfähigkeit in A.c.** Aufgeführt sind die Insertionsmutanten, die für eine weitere Charakterisierung ausgewählt wurden.+++: erhöhte Aktivität; ++: WT-Aktivität; +: reduzierte Aktivität; - : stark reduzierte Aktivität;

Klon	lpg	Blut-Agar	Casein-Agar	Eigelb-Agar	Hämolyseassay	Sekretierte PLA-Aktivität	Sekretierte LPLA-Aktivität	Replikation in *A.c.*
Phil WT	-	++	++	++	++	++	++	++
P5A1	2166	+	++	++	-	+	++	-
P5A2	1369	-	++	++	+	+	+++	+
P6C5	0467	-	-	+	-	n.d	n.d	++
P8C2	721	-	++	-	+	+	++	-

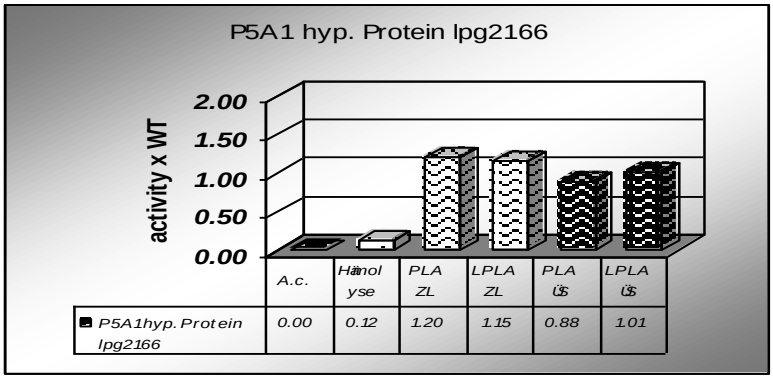
- **P5A1:** Mutante weist einen starken Defekt in Hämolyse und intrazellulärer Replikation in *A.c.* auf. Leichte Reduktion in sekretierter PLA-Aktivität. *lpg2166* kodiert für ein hypothetisches Protein, welches als Substrat des TypIVB Sekretionssystems identifiziert wurde (Burstein, Zusman et al. 2009).
- **P5A2:** Mutante mit hämolytischem Defekt. Die sekretierte PLA-Aktivität ist reduziert. Die Mutation führt zur verringerten Replikation in *A.c.*. *lpg1369* kodiert für das zytoplasmatische Hitzeschockprotein HtpG.
- **P6C5:** Mutante weist reduzierte proteolytische, hämolytische und lipolytische Aktivität auf den Screeningmedien auf. Wachstum in *A.c.* wie Wildtyp Aktiviert eine sekretierte Phospholipase (Banerji, Bewersdorff et al. 2005). Gen *lpg0467* kodiert für die sekretierte Zinkmetalloprotease ProA.
- **P8C2:** Starker hämolytischer und lipolytischer Defekt auf den Screeningmedien. Reduzierte Hämolyse als auch sekretierte phospholipolytische Aktivität konnten in den quantitativen Assay bestätigt werden. Mutante ist in der Koinfektion mit *A.c.* attenuiert. *lpg0721* codiert für Protein eines Multi-Drug-Efflux (MDE) Systems. Bildet putatives Operon mit *lpg0720*.

Ausschlaggebend für die Auswahl der drei Mutanten (P5A1, P5A2, P8C2) waren vor allem ein hämolytischer Defekt sowie ein Defekt in der Fähigkeit der intrazellulären Replikation in *A.castellanii*. Mutante P6C5 (*lpg0467*) wurde hier mit aufgeführt, da sich der zweite Teil dieser Arbeit mit der Charakterisierung der durch *lpg0467* kodierten Zinkmetalloprotease ProA beschäftigt. Die Identifikation der *proA*-Mutante P6C5 zeigte auch die Wirksamkeit des Screens.

4.4 Beschreibung und Charakterisierung von ausgewählten Mutanten

4.4.1 Mutante P5A1 - (*lpg2166*)

a)



b)

Synonym:	lpg2166
Länge:	1260 bp
Position:	2431605-2432864 (+)
GC-Gehalt:	35,48 %
Protein:	hypothetisches Protein (419 AS)
Funktion:	unbekannt
Lokalisation:	Zytoplasma
Operon:	nein

c)

Paraloge in *L. pneumophila* Philadelphia-1 (http://www.genome.jp/kegg/kegg1.html)

Entry	len	SW-score	bits	identity	overlap
lpn:lpg2490 hypothetical protein	1294	153	41	0.233	287
lpn:lpg2620 chromosome segregation SMC protein	1164	133	36	0.224	245
lpn:lpg0940 Lida	729	129	35	0.214	379
lpn:lpg0135 hypothetical protein	1875	126	35	0.200	405
lpn:lpg1965 hypothetical protein	988	126	35	0.203	325
lpn:lpg2639 enhanced entry protein EnhC	1200	124	34	0.232	289

d)

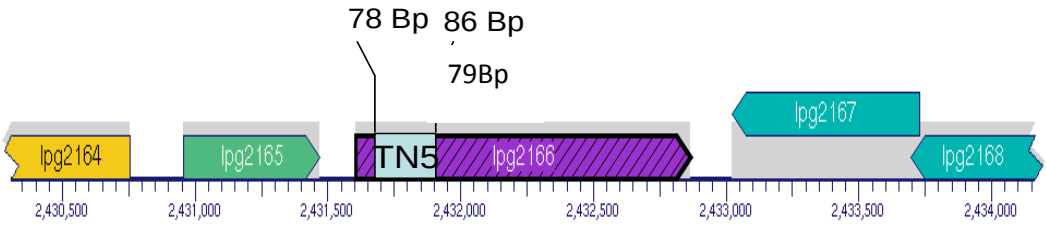


Abbildung 4-14:**Charakterisierung des Gens und der korrespondierenden Mutante.** Phänotyp der Mutante P5A1 (a). Eigenschaften des Gens: *lpg2166* und des kodierten Proteins (b). Paraloge des Gens in *L.pn.* Philadelphia-1 (c). Genauer Tn5-Insertionsort und genomische Umgebung (d).

Das Transposon in der Mutante P5A1 konnte mittels inverser PCR im Gen *lpg2166* lokalisiert werden. Die genaue Lokalisation wurde durch Klonierung des mutierten Gens in den Vektor pGEMTez und anschließender Sequenzierung zwischen den Basenpaaren 78 und 79 bestimmt, also im N-terminalen Bereich des kodierten Proteins. Insgesamt ist das Gen 2160Bp lang und befindet sich auf dem Chromosom von *L.pn.* Phil-1 an Position 2431605–2432864. Der GC-gehalt beträgt 35,48%. Lpg2166 kodiert für ein 419 Aminosäuren langes hypothetisches Protein mit bislang unbekannter Funktion. Die *in silico* Vorhersage der Lokalisation[6] kam zum Ergebnis, dass das Protein zytoplasmatisch lokalisiert ist. Kürzlich konnte jedoch von Burstein et al. gezeigt werden, dass Lpg2166 ein Substrat des Type IVB-Sekretionssystems ist (Burstein, Zusman et al. 2009). Lpg2166 befindet sich in keinem Genkluster und stellt dementsprechend eine unabhängige Transkriptionseinheit dar. Wie in Abbildung 4-14 c) zu erkennen ist existieren in *L.pn.* Phil-1 keine Paraloge zu *lpg2166*. Die Homologie der in der Tabelle aufgeführten Gene ist zu gering um von echten Paralogen zu sprechen.

Tabelle 4-7: Orthologe zu *lpg 2166* in den sequenzierten Stämmen von *L.pn*. In Klammern ist die Identität auf Protein-Ebene zu Lpg2166 angegeben

L.pn. Philadelphia	*L.pn.* Paris	*L.pn.* Lens	*L.pn.* Corby	*L.pn. 130b*	*L.pn. Alcoy*	*L. longbeachae*	*L. drancourtii*
lpg2166	*lpp2104* (99%)	Lpl2093 (100%)	*LPC_1626* (98%)	*LPW23451 (99%)*	*Lpa_03107 (99%)*	*LLO_2398 (99%)*	*LDG_1629 (35%)*

Orthologe zu *lpg2166* sind in allen bisher sequenzierten *L.pn.* Stämmen vorhanden. Darüber hinaus ist ein orthologes Gen auch im ebenfalls humanpathogenen Stamm *L. longbeachae* vorhanden. Das Genom von *L. drancourtii* weist kein Gen mit annähernd so hoher Homologie, wie bei den anderen sequenzierten Stämmen auf. Die Genbezeichnung sowie die prozentuale Identität auf Protein-Ebene zu *lpg2166* im jeweiligen Stamm sind in Tabelle 4-7 zu sehen.

[6] http://www.psort.org/psortb/

4.4.1.1 Replikation in U937 Makrophagen

Die Mutation des Gens *lpg2166* in der Mutante P5A1 führte zu einem signifikanten Replikationsdefekt in der Koinfektion mit *A.c.* (siehe Abbildung 4-15 a). Dieses Ergebnis ist ein erster Indikator dafür, dass das Genprodukt von *lpg2166* einen Einfluss auf die Virulenz von *L.pn.* Phil-1 hat. Um diese Hypothese weiter zu untermauern, wurde mit der Mutante P5A1 eine Koinfektion mit U937 Makrophagen durchgeführt. Das Ergebnis der Koinfektion der Mutante P5A1 mit U937 Makrophagen ist in Abbildung 4-15 b) zu sehen. Auch in U937 Makrophagen führt die Mutation von *lpg2166* zu einer Attenuierung von *L.pn.* Phila-1.

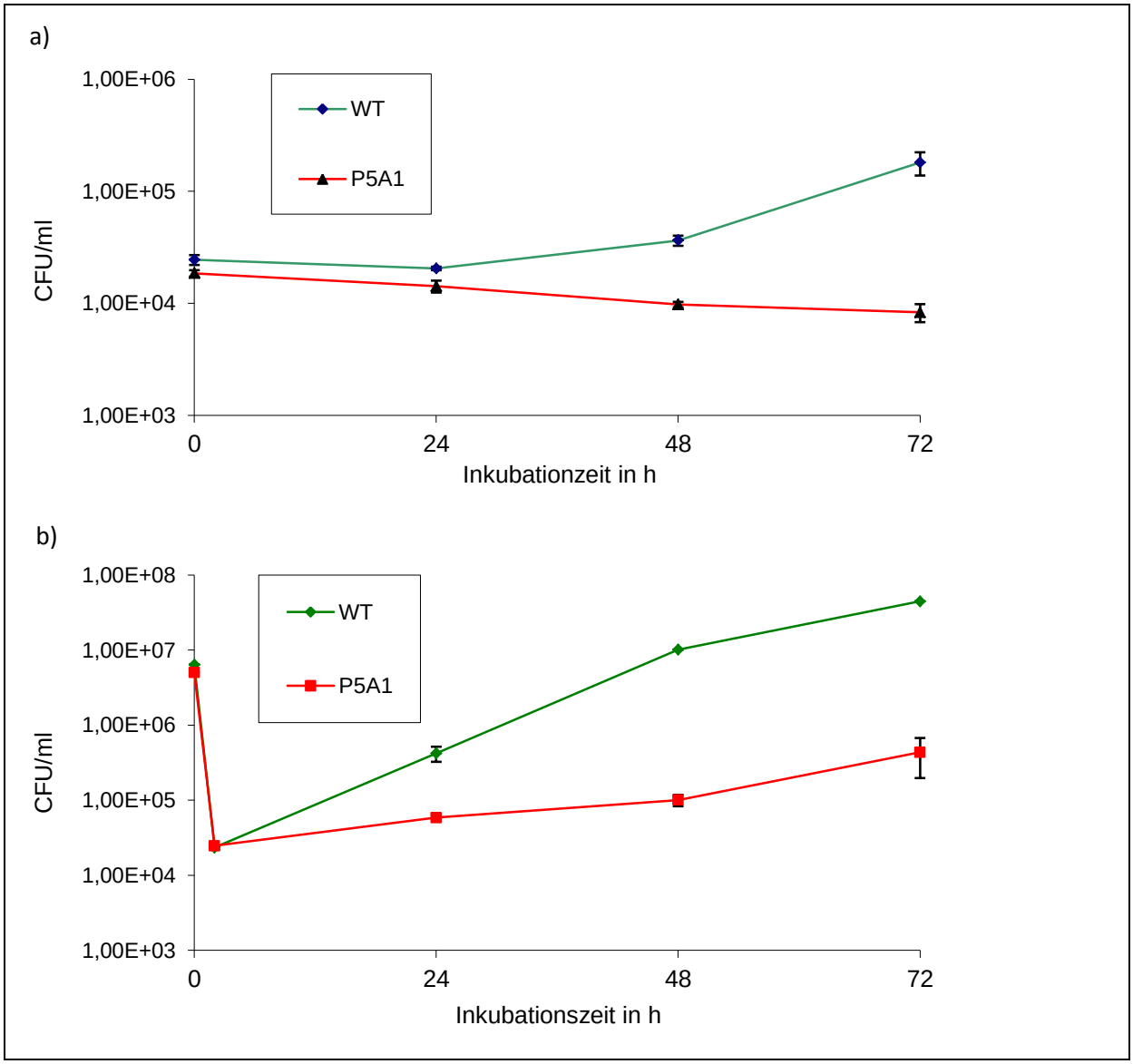


Abbildung 4-15: **Attenuierung der Kolonisationsfähigkeit der Mutante P5A1** (lpg2166::tn5). Koinfektion mit *A.c.* und U937-Makrophagen. a) Koinfektion mit *A.c.* (MOI = 0.1). b) Koinfektion mit U937 Makrophagen. (MOI = 1); (n=3, mindestens 2 Wiederholungen)

4.4.1.2 Erzeugung weiterer *lpg2166* Mutanten

Die Mutation von *lpg2166* führte in *L.pn.* Phil-1 zu einem starken Hämolysedefekt und einer Attenuierung in *A.c.* und U937 Makrophagen. Um zu verifizieren, dass die beschriebenen Defekte der Mutante P5A1 tatsächlich durch die Mutation von *lpg2166* hervorgerufen werden, wurde versucht diese durch die Erzeugung neuer *lpg2166*-Mutanten zu bestätigen. Eine andere Möglichkeit zur Verifikation wäre die Komplementierung des Gens *in trans*. Da dies in *L.pn.* Phil-1 aufgrund unzureichender Plasmidstabilität der zur Verfügung stehenenden Vektoren schwierig ist, wurde zusätzlich der Weg über neue Mutanten gewählt. Da es in den anderen *L. pneumophila*–Stämmen Orthologe zu *lpg2166* gibt, lag es nahe zu untersuchen, welche Effekte eine Mutation dieser Orthologe in den entsprechenden Stämmen hat. Um dies zu untersuchen, wurde versucht Mutanten in *L.pn.* JR32, *L.pn.* 130b, *L.pn.* Corby und *L.pn.* Paris zu erzeugen. Dazu wurde zunächst mittels Kolonie-PCR überprüft, ob die Orthologe zu *lpg2166* in den o.g. Stämmen vorhanden sind. In allen ausgewählten Stämmen existiert ein Homolog zu *lpg2166,* welches auch mit den Phil-1 spezifischen Primern amplifizierbar ist (Daten nicht gezeigt). Da die Genomdaten der sequenzierten Stämme zeigen, dass die einzelnen Orthologe eine Identität auf Proteinebene von mehr als 98% besitzen, wurde das mutagenisierte *lpg2166* aus der Mutante P5A1 amplifiziert, kloniert und für die Mutagenese mittels natürlicher Transformation eingesetzt. Die so erzeugten Mutanten wurden über Kolonie-PCR überprüft. Bei erfolgreicher Mutagenese der jeweiligen Orthologe über homologe Rekombination des Konstrukts aus der Mutante P5A1, sollte die jeweilige Wildtypbande mit *lpg2166* spezifischen Primern nicht mehr zu amplifizieren sein. Bei erfolgreicher Insertion des Transposons vergrößert sich das PCR-Amplifikat um 1221 Bp. Die Kolonie-PCR zeigte, dass mit Ausnahme von *L.pn.* Corby, die Mutagenese von *lpg2166* bzw. dessen Homologen erfolgreich war (Daten nicht gezeigt).

Auch weitere Versuche Mutanten vom *lpg2166* Homolog in *L.pn.* Corby (*LPC_1626*) zu generieren verliefen erfolglos (Daten nicht gezeigt).

4.4.1.3 RT-PCR zur Überprüfung der Mutation

Zur Überprüfung der neu generierten Mutanten, *L.pn.* Phil-1 *lpg2166*::tn5 Kl.1; *L.pn*. 130b *lpg2166*::tn5 Kl.1 *L.pn.* Paris *lpp2104*::tn5 Kl.1 und *L.pn.* JR32 *lpg2166*::tn5 Kl.1 wurde mit Hilfe der RT-PCR untersucht, ob *lpg2166* und des-

sen Homologe in *L.pn.* Paris und 130b exprimiert werden. Das Ergebnis dieser RT-PCR ist in Abbildung 4-16 zu sehen. Es ist zu erkennen, dass die Expression von *lpg2166* im *L.pn.* Phil-1 Wildtyp und dessen Homologe in *L.pn.* Paris und 130b sowie in JR32 sehr schwach ist. Das Gyrase-Gen, welches als Positivkontrolle mitgeführt wurde ist dagegen in allen vier untersuchten Stämmen gleich stark exprimiert. In keiner der Mutanten konnte ein Transkript von *lpg2166* und dessen Homologen nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass die neu generierten Mutanten *lpg2166* nicht exprimieren.

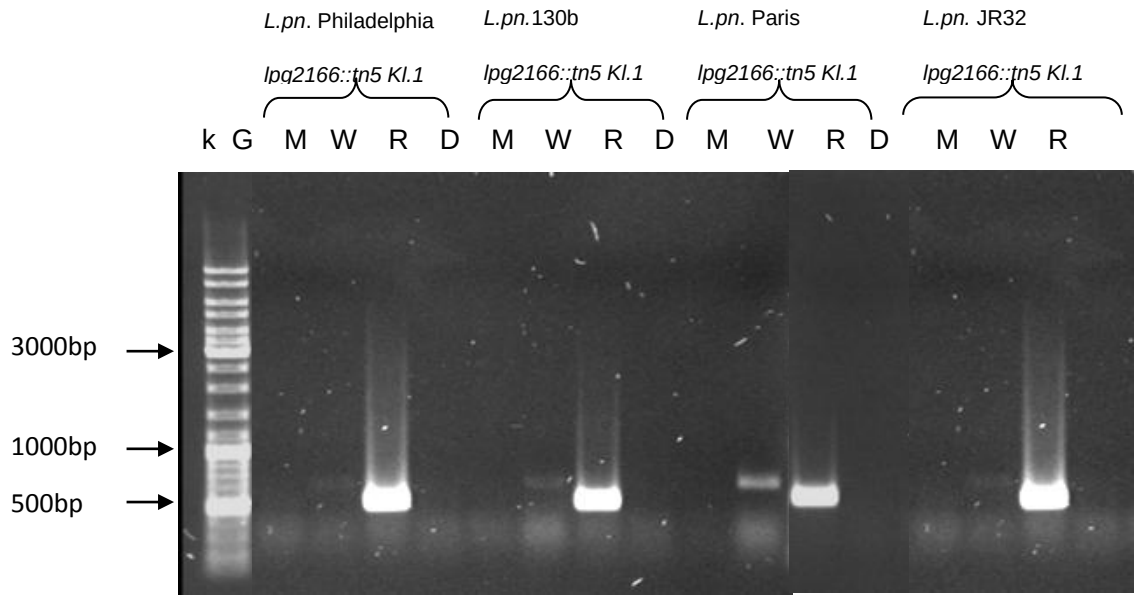


Abbildung 4-16: **RT-PCR zur Überprüfung der Mutanten.** *L.pn.* Philadelphia *lpg2166*::tn5 Kl.1; *L.pn* 130b *lpg2166*::tn5 Kl.1 *L.pn.* Paris *lpp2104*::tn5 Kl.1 *L.pn.* JR32 *lpg2166*::tn5 Kl.1. G: GeneRuler; M: Mutante; W: Wildtyp; R: RNA-Kontrolle (Gyrase); D: DNA-Kontrolle (Gyrase) Primer: lpg2166fw, lpg2166rv; gyrAfw;gyrArv

4.4.1.4 Phänotyp der neu generierten Mutanten

Die neuen *lpg2166* Mutanten von *L.pn.* Phil-1 sowie die Mutanten der Homologe in *L.pn.* 130b, *L.pn.* JR32, *L.pn.* Paris wurden auf ihre hämolytische Aktivität (s. Abbildung 4-17) und Vermehrungsfähigkeit in *A.c.* untersucht. Wie erwartet wiesen die neu generierten Mutanten in *L.pn.* Phil-1 einen signifikanten Defekt in der hämolytischen Aktivität auf. Dieser fällt bei der Mutante in *L.pn.* Paris noch deutlicher aus. In *L.pn.* 130b und JR32 führte die Mutagenese des *lpg2166* Homologs

ebenfalls zu einer verringerten Hämolyse. Die Reduktion ist jedoch nicht so deutlich wie bei den Stämmen Phil-1 und Paris.

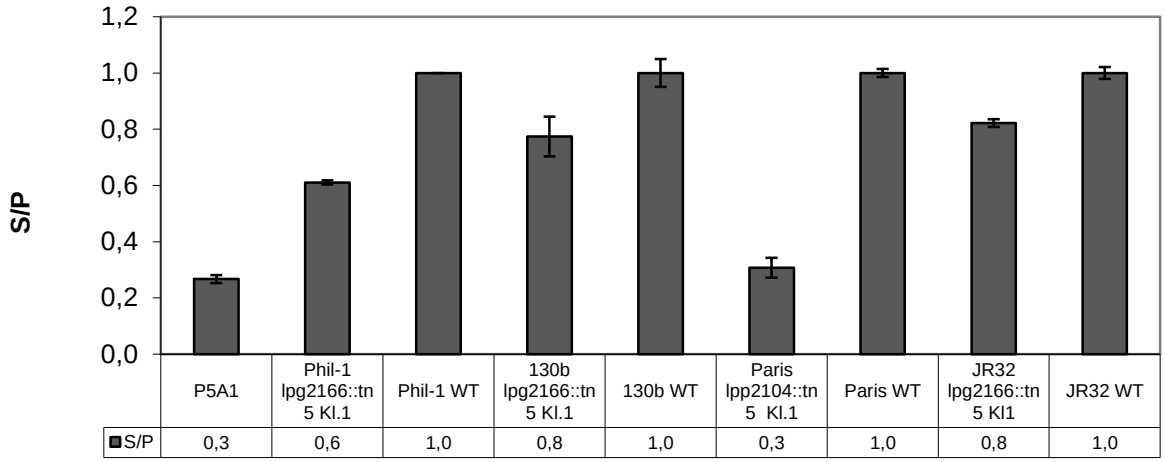
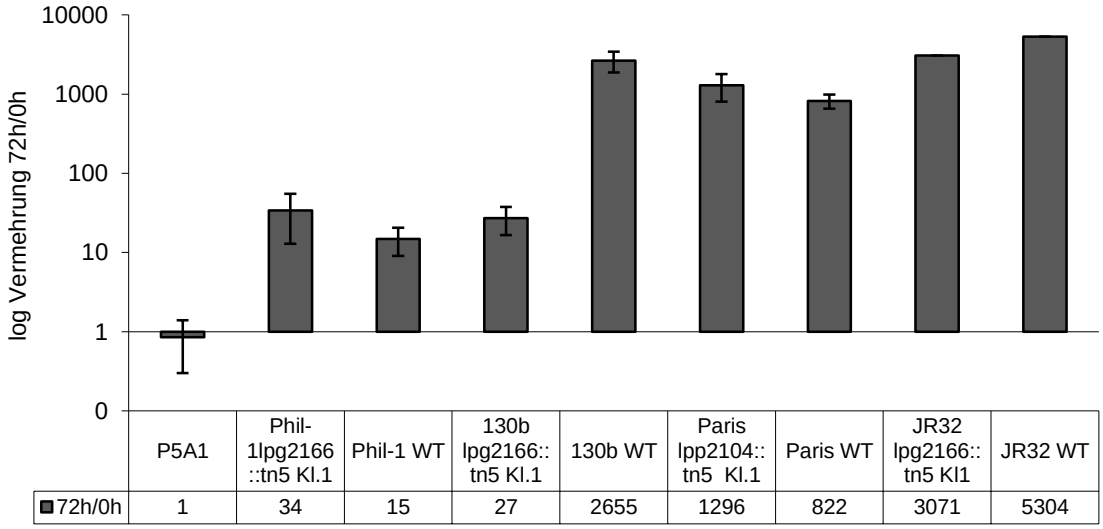


Abbildung 4-17: **Hämolytische Aktivität der *lpg2166* –Mutanten und der korrespondierenden WT.** . Die Werte (Sample) wurden auf den jeweiligen Wildtyp (Positivkontrolle) normiert (S/P Ratio). (n=2, 2 Wiederholungen)

Der Vermehrungsdefekt während der Koinfektion mit *A.c.* von Mutante P5A1 konnte mit *L.pn.* Phil-1 *lpg2166*::tn5 Kl.1 nicht bestätigt werden (Abbildung 4-18). Die neu generierte Mutante vermehrte sich wie der Wildtyp. Dies war auch bei den Mutanten *L.pn.* Paris *lpp2104*::tn5 Kl.1 und *L.pn.* JR32 *lpg2166*::tn5 Kl.1 der Fall. Eine Attenuierung konnte hingegen mit der Mutante in *L.pn.* 130b *lpg2166*::tn5 Kl.1 festgestellt werden. Bei dieser führte die Mutation des *lpg2166* Homologs zu einer Reduktion der Vermehrung um zwei Log-Stufen. Auch in der Koinfektion mit U937 Makrophagen wurde ein signifikanter Defekt in der intrazellulären Vermehrung der *lpg2166* Mutante von *L.pn.* 130b festgestellt (Daten nicht gezeigt).



	P5A1	Phil-1lpg2166::tn5 Kl.1	Phil-1 WT	130b lpg2166::tn5 Kl.1	130b WT	Paris lpp2104::tn5 Kl.1	Paris WT	JR32 lpg2166::tn5 Kl1	JR32 WT
72h/0h	1	34	15	27	2655	1296	822	3071	5304

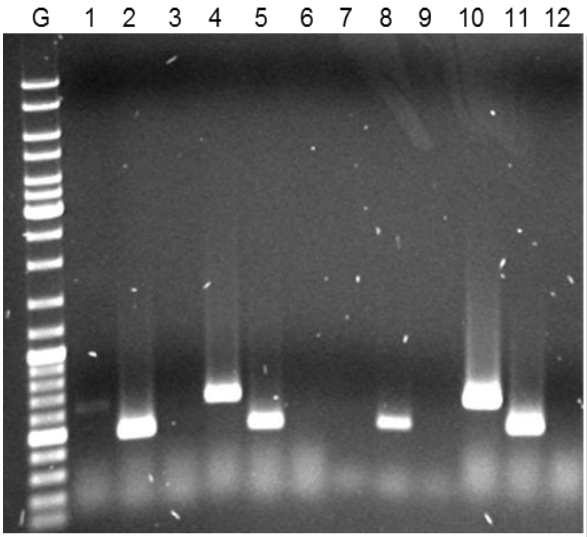
Abbildung 4-18**: Replikation der *lpg2166* Mutanten und des korrespondierenden Wildtypen während einer Koinfektion mit *A.castellanii***. Vermehrung ist als Ratio von CFU zum Zeitpunkt 72h zu CFU zum Zeitpunkt 0h (Inokulum) dargestellt. (MOI = 0.1; n=2; 2 Wiederholungen)

Die Ergebnisse zeigen, dass sich der Hämolysedefekt durchgängig reproduzieren lässt, jedoch nicht der Defekt in der Ko-Infektion mit *A.c.*.

4.4.1.5 Überexpression von *lpg2166* in *L.pn.* Phil-1 und 130b führt zur Reduzierung der hämolytischen Aktivität und Attenuierung in *A.c.*

Um zu zeigen, dass die gefundenen Defekte der *lpg2166*-Mutanten das Resultat der Mutation von *lpg2166* sind, wurde versucht diese zu komplementieren. Dazu wurde das Gen *lpg2166* von *L.pn.* Phil-1 inklusive putativen Promotor in einen „Low Copy"- Vektor (pJQ200) kloniert. Der resultierende Vektor (pES65) wurde durch Sequenzierung überprüft und anschließend mittels Elektroporation in den Wildtyp und die Mutante transformiert. Gleiches erfolgte mit dem Leervektor (pES62). Zur Überprüfung der Komplementationsklone wurde von diesen RNA isoliert und eine RT-PCR durchgeführt. Die Auswertung dieser (s. Abbildung 4-19) zeigt, dass *lpg2166* im Komplementationsklon exprimiert wird. In der Mutante ist wie erwartet keine Transkription von *lpg2166* nachweisbar. Im Gegensatz zum Wildtyp mit Leervektor, bei dem *lpg2166* nur schwach transkripiert wird, ist die Transkription in der Mutante mit Komplementationsvektor und dem Wildtyp mit Komplementationsvektor deutlich stärker. Ein vergleichbares Expres-

sionsmuster wurde bei den Komplementationsklonen von *L.pn.* Phil-1 beobachtet (Daten nicht gezeigt).



Spur	Stamm	Primer	Kontrolle
1	*L.pn.* 130b WT (pES62)	2166fw+2166rv	
2	*L.pn.* 130b WT (pES62)	gyrAfw+gyrArv	RNA
3	*L.pn.* 130b WT (pES62)	gyrAfw+gyrArv	DNA
4	*L.pn.* 130b WT (pES65)	2166fw+2166rv	
5	*L.pn.* 130b WT (pES65)	gyrAfw+gyrArv	RNA
6	*L.pn.* 130b WT (pES65)	gyrAfw+gyrArv	DNA
7	*L.pn.*130b *lpg2166*::tn5 Kl.1 (pES62)	2166fw+2166rv	
8	*L.pn.*130b *lpg2166*::tn5 Kl.1 (pES62)	gyrAfw+gyrArv	RNA
9	*L.pn.*130b *lpg2166*::tn5 Kl.1 (pES62)	gyrAfw+gyrArv	DNA
10	*L.pn.*130b *lpg2166*::tn5 Kl.1 (pES65)	2166fw+2166rv	
11	*L.pn.*130b *lpg2166*::tn5 Kl.1 (pES65)	gyrAfw+gyrArv	RNA
12	*L.pn.*130b *lpg2166*::tn5 Kl.1 (pES65)	gyrAfw+gyrArv	DNA

Abbildung 4-19: **RT- PCR mit Komplementationsklonen *lpg2166*- Mutante 130b.** Im WT mit LV (pES62) wird das *lpg2166* Homolog schwach transkribiert. Dagegen ist die Transkription im WT und der Mutante mit Komplementationsvektor (pES65) stark erhöht. Als Positivkontrolle wurde *gyrA* mit den angegebenen Primer amplifiziert. Eine DNA-Kontamination lag nicht vor.

Die Ergebnisse der Komplementationsversuche sind exemplarisch an der *lpg2166* Mutante von 130b, *L.pn*. 130b *2166*::tn5 Kl1 gezeigt.

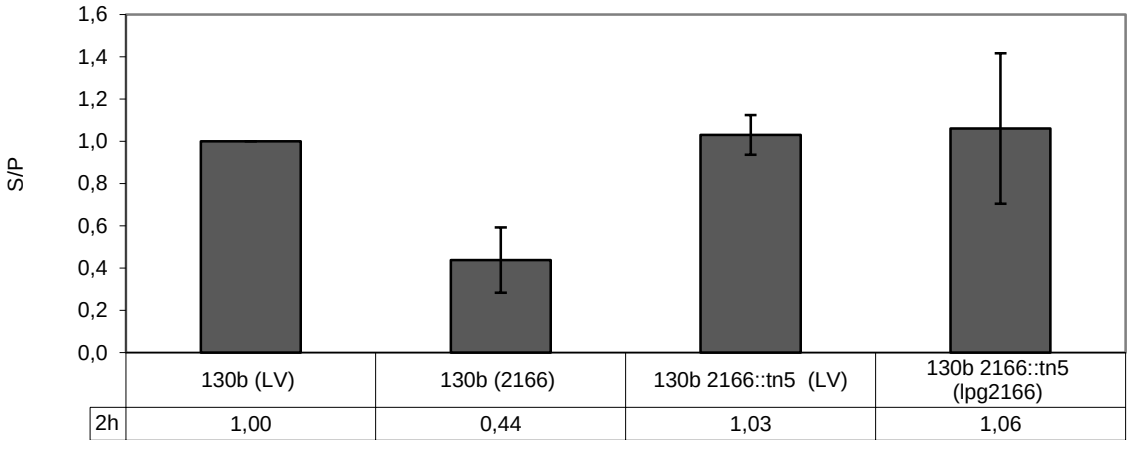


Abbildung 4-20: **Quantitativer Hämolyseassay mit Komplementationsklonen von *L.pn.*** 130b. 130b= *L.pn.*130b; 130b *2166*::tn5= *L.pn.* 130b *2166*::tn5 Kl.1 LV: Leervektor(LV)=pES62, Komplementationsvektor(2166)=pES65. Die Ergebnisse wurden auf den Wildtyp (S/P Ratio) normiert. (n=2; 2 Wiederholungen)

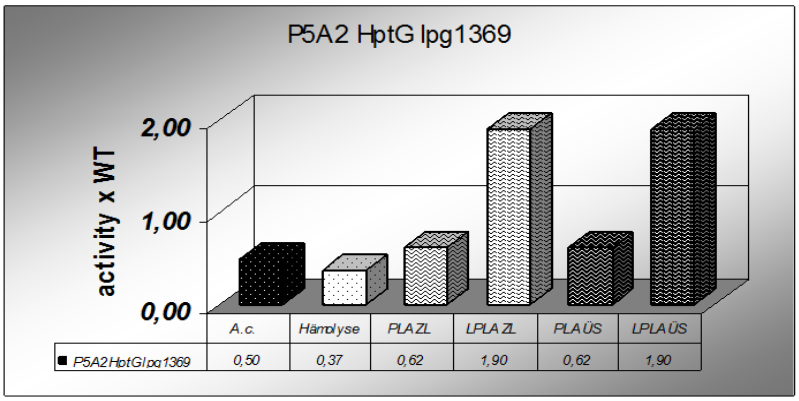
Abbildung 4-20 zeigt das Ergebnis des quantitativen Hämolyseassay mit dem Komplementations- und Überexpressionsklon von *L.pn.* 130b. Die Werte sind durch Bildung des Sample zu Positivkontrolle Ratios auf den Wildtyp (Positivkontrolle) mit Leervektor (LV) normiert. Allein der LV führt dazu, dass der zuvor beobachtete hämolytische Defekt in der *lpg2166*-Mutante nicht mehr nachweisbar ist. Dies wurde auch in den Stämmen Phil-1 und Paris beobachtet (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu ruft die Überexpression von *lpg2166* in *L.pn.* 130 Wildtyp eine starke Reduktion der hämolytischen Aktivität hervor. Gleiches wurde auch bei der Überexpression im Stamm Phil-1 festgestellt.
Im Gegensatz zur Hämolyse konnte der Wachstumsdefekt während der Koinfektion mit *A.castellanii* auch mit dem LV beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Durch Einbringen von *lpg2166 in trans* in die *lpg2166*-Mutante konnte der Defekt jedoch nicht komplementiert werden (Daten nicht gezeigt). Dagegen konnte beobachtet werden, dass die Überexpression von *lpg2166* im Wildtyp, einen negativen Einfluss auf die Replikation im Infektionsmodell hat (Daten nicht gezeigt).
Die erzielten Resultate legen den Verdacht nahe, dass es sich bei *lpg2166* um ein Gen handelt, das für ein regulatorisches Protein kodiert, bei dem die Quantität der Transkription einen entscheidenden Einfluss auf die intrazelluläre Replikationsfähigkeit von *L.pn.* Phil-1 und 130b hat.
Alle weiteren Versuche, plasmidbasierend die Defekte zu komplementieren, waren nicht erfolgreich.

4.4.2 Mutante P5A2 - (*lpg1369*: *htpG*)

Die Transposoninsertion erfolgte bei der Mutante P5A2 im Gen *lpg1369* (*htpG*) zwischen den Basenpaaren 1115 bis 1116. Das Gen besteht aus insgesamt 1872Bp (624AS) und befindet sich auf dem Chromosom von *L.pn.* Phil-1 an Position 1514897–1516768. Der GC-Gehalt beträgt 37,7%. *Lpg1369* enthält drei konservierte Motive. Das erste erstreckt sich von AS 26–35 und stellt eine Signatur von Proteinen der Hsp90 Familie dar. Das zweite Motiv von AS 28–184 beinhaltet eine Hsp90-artige ATPase Struktur. Durch die Hydrolyse von ATP und der daraus resultierenden Energie kommt es vermutlich zu einer Konformationsänderung, welche wiederum die Bindung von Substraten und Co-Chaperonen beeinflusst (Owen, Sullivan et al. 2002). Das letzte und größte Motiv findet sich in *lpg1369* zwischen AS 187–623. Es handelt sich um das Hsp90 Protein-Motiv. In diesem erfolgte die Transposoninsertion. Aufgrund der vorliegenden Motive han-

delt es sich, bei dem von *lpg1369* kodierten Protein, um ein Hitzeschock-Protein, dessen putative Funktion die stressabhängige Regulation darstellt. Laut *in silico* Analyse ist HtpG zytoplasmatisch lokalisiert. *Lpg1369* konnte keinem Genkluster zugeordnet werden und stellt daher eine unabhängige Transkriptionseinheit dar. Paraloge mit einer Sequenzübereinstimmung von mehr als 30% sind in *L.pn.* Phil-1 nicht vorhanden. In den bisher sequenzierten Stämmen von *L.pn.* sind jedoch Homologe zu *lpg1369* zu finden. Diese sind in Tabelle 4-8 aufgeführt. Wie zu erkennen ist, ist die Sequenz von *lpg1369* in den Stämmen Paris, Lens und Corby hoch konserviert (>99%). Auffälling ist, dass *L.pn. 130b* kein HtpG-Homolog besitzt.

a)



b)

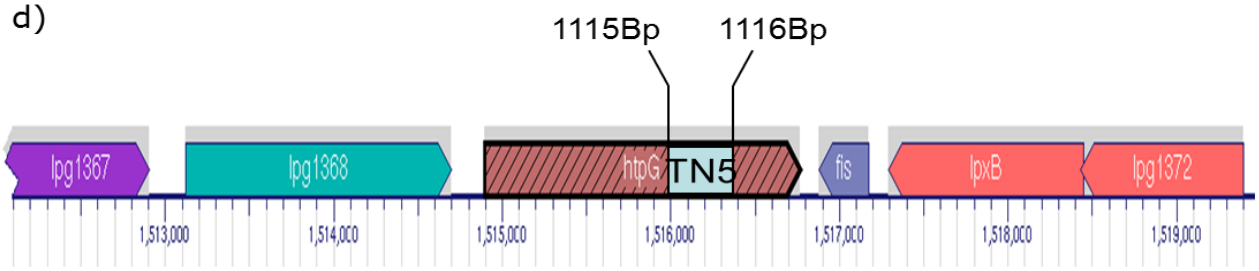
Synonym:	htpG, lpg1369
Länge:	1260 bp
Position:	1514897-1516768 (+)
GC-Gehalt:	37,77 %
Protein:	Hitze-Schock-Protein 90 (623 AS)
Funktion:	Stress-Antwort
Lokalisation:	Zytoplasma
Operon:	nein

c)

Paraloge in *L. pneumophila* Philadelphia-1 (http://www.genome.jp/kegg/kegg1.html)

Entry	len	SW-score	bits	identity	overlap
lpn:lpg1312 coiled-coil-containing protein	1135	113	32	0.234	205
lpn:lpg0135 hypothetical protein	1875	104	30	0.178	377
lpn:lpg2511 SidC, interaptin	917	104	30	0.227	410
lpn:lpg1126 calcium-transporting ATPase (EC:3.6.3.8)	1153	103	29	0.216	283
lpn:lpg2490 hypothetical protein	1294	101	29	0.219	228
lpn:lpg0663 soluble lytic murein transglycosylase (EC:3	606	101	29	0.213	362

d)



e)

Motive in lpghptG (http://www.genome.jp/kegg/kegg1.html)

Motif id	From	To	Definition	E value	Score
ps:HSP90	26	35	Heat shock hsp90 proteins family signature.	-	-
pf:HATPase_c	28	184	Histidine kinase-, DNA gyrase B-, and HSP90-like ATPase	4.5e-07	-
pf:HSP90	187	623	Hsp90 protein	1.8e-98	-

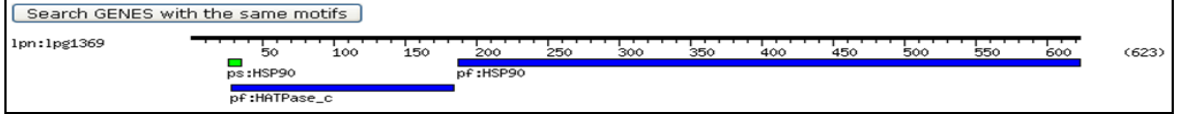


Abbildung 4-21: **Charakterisierung des Gens und der korrespondierenden Mutante.** Phänotyp der Mutante P5A2 (a). Eigenschaften des Gens: *lpg1369* und des kodierten Proteins (b). Paraloge des Gens in *L.pn.* Philadelphia-1 (c). Genauer Tn5-Insertionsort und genomische Umgebung (d) Motive in Lpg1369 (e).

Tabelle 4-8: **Orthologe zu Lpg1369 in den sequenzierten *Legionella* Stämmen.** Die Identität auf Protein-Ebene ist in Klammern angegeben.

L.pn. Philadelphia	*L.pn.* Paris	*L.pn.* Lens	*L.pn.* Corby	*L.pn. 130b*	*L.pn. Alcoy*	*L. longbeachae*	*L. drancourtii*
Lpg1369	*Lpp1323* (99%)	Lpl1320 (99%)	*LPC_0785* (98%)	*Kein Ortho-log*	*Lpa_02019 (99%)*	*LLO_2398 (86%)*	*LDG_1629 (86%)*

4.4.2.1 Erzeugung neuer *htpG*-Mutanten

Um sicher zustellen, dass der Phänotyp von Mutante P5A2 durch die Transposonmutagenese von *htpG* hervorgerufen wird, wurden neue Mutanten in *L.pn.* Phil–1 und *L.pn.* JR32 erzeugt. Da keine Sequenzdaten von Stamm JR32 vorhanden sind, wurde zunächst mittels spezifischer Kolonie-PCR überprüft, ob das Gen für HptG in diesem Stamm vorhanden ist. Mit für *lpg1369* spezifischen Primern ließ sich ein Homolog in JR32 amplifizieren (Daten nicht gezeigt). Für die Mutagenese wurde zunächst das mutierte *htpG* aus P5A2 amplifiziert und in den Vektor pGEMTez kloniert. Über natürliche Transformation wurde dieser Vektor in die Wildtypen der Stämme *L.pn.* Phil-1 und *L.pn.* JR32 transferiert. Auf diesem Weg konnten erfolgreich neue Mutanten in *L.pn.* Phil-1 und *L.pn.* JR32 generiert werden. Diese neuen Mutanten wurden dann zunächst mittels Kolonie-PCR auf erfolgreiche Mutagenese von *htpG* im jeweiligen Stamm hin überprüft. Dabei sollte das Amplifikat der Mutante, durch das integrierte Transposon, einen Shift von 1221Bp im Vergleich zum Amplifikat des Wildtyps aufweisen. Dieses war in beiden Mutanten der Fall (Daten nicht gezeigt). Zur vollständigen Verifizierung der Mutanten wurde darüber hinaus der Transkriptionsstatus der *htpG*-Gene mittels RT-PCR untersucht. Sowohl in der neuen *htpG*-Mutante von *L.pn.* Phil-1 als auch in der *hptG*-Mutante vom Stamm JR32 konnte, im Gegensatz zu den jeweiligen Wildtypen, keine mRNA von *htpG* nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

4.4.2.2 Phänotyp der neu generierten *htpG*-Mutanten in *L.pn.* Phil-1 und *L.pn.* JR32 konnte nur partiell komplementiert werden

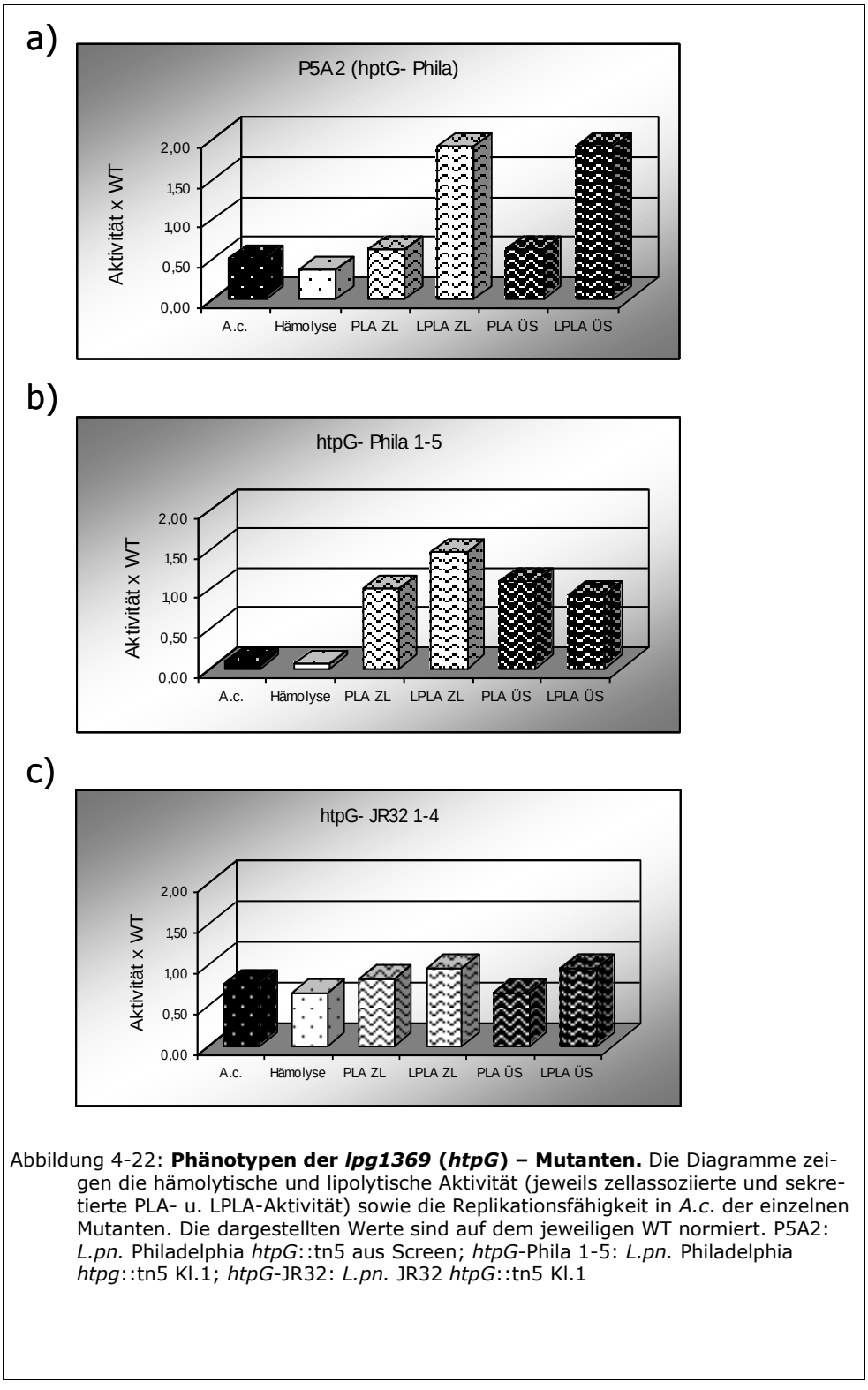
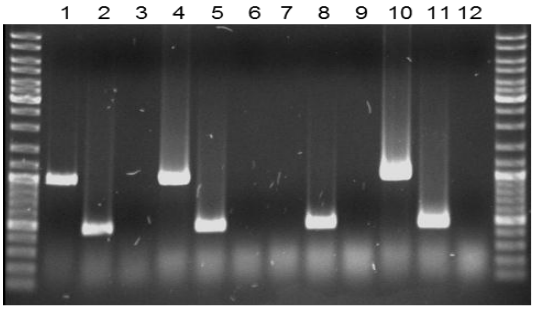
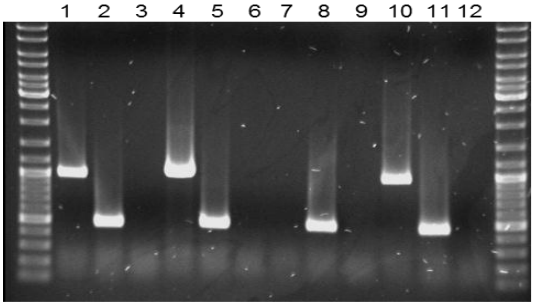


Abbildung 4-22: **Phänotypen der *lpg1369* (*htpG*) – Mutanten.** Die Diagramme zeigen die hämolytische und lipolytische Aktivität (jeweils zellassoziierte und sekretierte PLA- u. LPLA-Aktivität) sowie die Replikationsfähigkeit in *A.c.* der einzelnen Mutanten. Die dargestellten Werte sind auf dem jeweiligen WT normiert. P5A2: *L.pn.* Philadelphia *htpG*::tn5 aus Screen; *htpG*-Phila 1-5: *L.pn.* Philadelphia *htpg*::tn5 Kl.1; *htpG*-JR32: *L.pn.* JR32 *htpG*::tn5 Kl.1

Die neu generierten Mutanten wurden hinsichtlich ihrer hämolytischen und lipolytischen Aktivität als auch ihrer Vermehrungsfähigkeit in *A.c*. untersucht. Die Ergebnisse dieser Analysen wurden in den Diagrammen in Abbildung 4-22(b, c) zusammenfassend dargestellt. Zum Vergleich ist ein äquivalentes Diagramm der Mutante P5A2 mit aufgeführt (siehe Abbildung 4-22 a). Der Phänotyp der neuen Mutante in *L.pn.* Phil-1 ist vergleichbar mit dem der Mutante P5A2. Neben der Attenuierung in *A.c*. führte die Mutation des *hptG* erneut zu einer starken Reduktion der hämolytischen Aktivität. Nicht ganz so prägnant sind dagegen die Unterschiede in zellassoziierter und sekretierter PLA- und LPLA-Aktivität. Im Stamm JR32 führt die Mutagenese des *hptG* zu einer minimalen Reduktion der intrazellulären Vermehrungsfähigkeit in *A.c.*. Die hämolytische Aktivität ist zwar deutlich höher als bei den Mutanten im Stamm Phil-1, fällt aber dennoch signifikant geringer aus als bei *L.pn.* JR32 WT. Die PLA- und LPLA-Aktivitäten von Stamm JR32 wurden durch das mutierte *hptG* nur unwesentlich beeinflusst. Die genannten Defekte konnten jedoch nur partiell komplementiert werden. Für die Komplementation wurde das intakte *htpG* von *L.pn.* Phil-1 inklusive putativen Promotor in den Vektor pJQ200 kloniert. Dieser wurde anschließend sequenziert und in die Mutanten der Stämme Phil-1 und JR32 sowie in die korrespondierenden Wildtypen elektroporiert. Gleiches geschah mit dem Leervektor. Um sicher zu gehen, dass die so erhaltenen Komplementations- und Überexpressionsklone sowie Mutanten bzw. Wildtypen mit dem LV in Ordnung sind, wurde RNA isoliert und mit *htpG*-spezifischen Primern eine RT-PCR durchgeführt (s. Abbildung 4-23). Wie erwartet ist in den beiden Mutanten mit LV kein Amplifikat entstanden. In allen anderen untersuchten Klonen, inklusive der Komplementationsklone, konnte ein Transkript von *htpG* detektiert werden. Dies bedeutet, dass die Komplementationsklone in Ordnung sind.



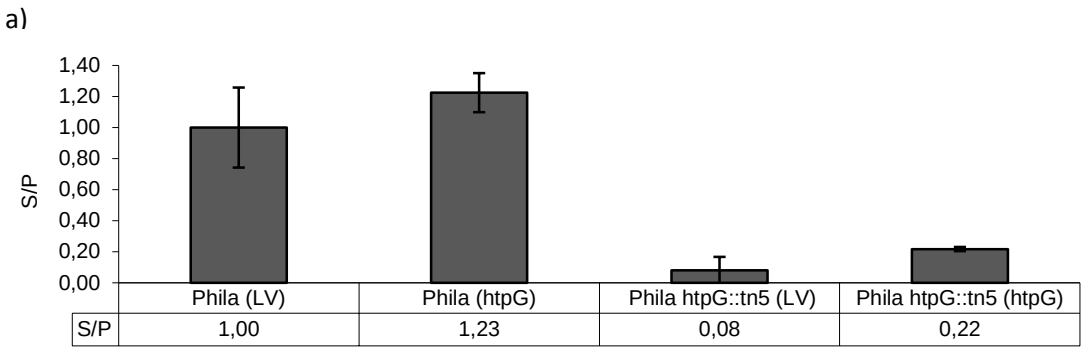
Spur	Stamm JR32	Primer	Kontrolle
1	WT (LV)	lpg1369fw + lpg1369rv	
2		gyrAfw + gyrArv	RNA
3		gyrAfw + gyrArv	DNA
4	WT (htpG)	lpg1369fw + lpg1369rv	
5		gyrAfw + gyrArv	RNA
6		gyrAfw + gyrArv	DNA
7	htpG::tn5 (LV)	lpg1369fw + lpg1369rv	
8		gyrAfw + gyrArv	RNA
9		gyrAfw + gyrArv	DNA
10	htpG::tn5 (htpG)	lpg1369fw + lpg1369rv	
11		gyrAfw + gyrArv	RNA
12		gyrAfw + gyrArv	DNA



Spur	Stamm Phila-1	Primer	Kontrolle
1	WT (LV)	lpg1369fw + lpg1369rv	
2		gyrAfw + gyrArv	RNA
3		gyrAfw + gyrArv	DNA
4	WT (htpG)	lpg1369fw + lpg1369rv	
5		gyrAfw + gyrArv	RNA
6		gyrAfw + gyrArv	DNA
7	htpG::tn5 (LV)	lpg1369fw + lpg1369rv	
8		gyrAfw + gyrArv	RNA
9		gyrAfw + gyrArv	DNA
10	htpG::tn5 (htpG)	lpg1369fw + lpg1369rv	
11		gyrAfw + gyrArv	RNA
12		gyrAfw + gyrArv	DNA

Abbildung 4-23: **RT-PCR zur Überprüfung der Komplementanten.** Transkript von *htpG* konnte in allem Komplementanten und den Wildtypen mit Leervektor (LV) und Komplementationsvektor (htpG) mit *htpG* spezifischen Primern (lpg1369fw+lpg1369rv) nachgewiesen werden. In den Mutanten mit (LV) konnte keine mRNA von *htpG* amplifiziert werden. Als positive RNA-Kontrolle diente *gyrA*. Kontrolle auf DNA-Kontamination ebenfalls *gyrA*. JR32 WT= *L.pn.* JR32; JR32 *htpG*::tn5=L.pn. JR32 htpG::tn5 Kl.1; Phila WT= *L.pn.* Philadelphia; Phila *htpG*::tn5=*L.pn.* Philadelphia *htpG*::tn5 Kl.1; (LV)=pES62; (hptG)=pES64

Wie in Abbildung 4-24a) zu sehen ist, konnte der hämolytische Defekt der *L.pn*. Phil-1 Mutante (*L.pn.* Phil-1 htpG::tn5 Kl.1) nicht vollständig durch trans Komplementierung auf das Niveau des Wildtyps gebracht werden. Die Komplementante weist jedoch eine stärkere Hämolyse als die Mutante auf. Die Überexpression vom *htpG* in *L.pn.* Phil-1 führt ebenfalls zu einer Erhöhung der hämolytischen Aktivität. Gleiches gilt für die Überexpression im Stamm JR32 (Abbildung 4-24b). Der im Vergleich zur Philadelphia Mutante geringe hämolytische Defekt in der JR32 Mutante (*L.pn.* JR32 *htpG*::tn5 Kl.1) konnte jedoch vollständig komplementiert werden.



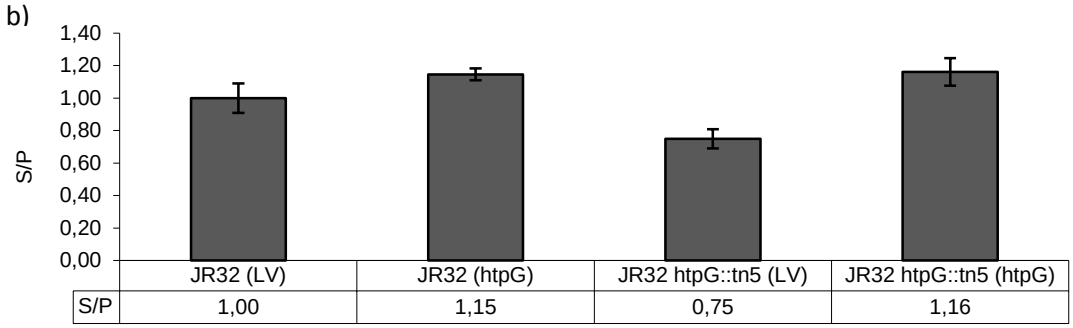
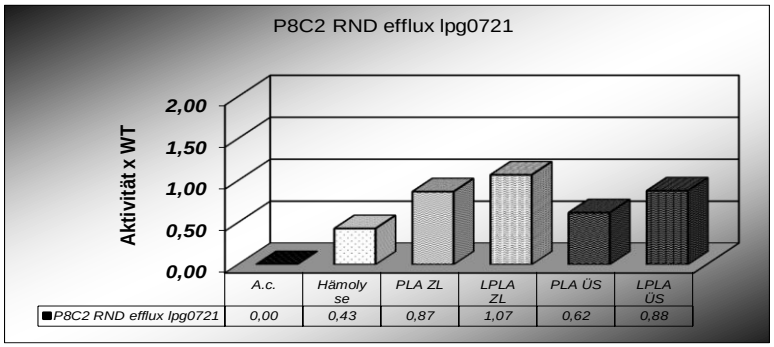


Abbildung 4-24: **Quantitativer Hämolyse-Assay mit Komplementations- und Überexpressionsklonen der *htpG* Mutanten und korrespondierenden Wildtypen**. a) *L.pn.* Philadelphia-1; Phila=*L.pn.* Philadelphia; Phila *htpg*::tn5 = *L.pn.* Philadelphia *htpG*::tn5 Kl.1 b) *L.pn.* JR32; JR32=*L.pn.* JR32; JR32 *htpg*::tn5 = L.pn. JR32 *htpG*::tn5 Kl.1; Leervektor(LV)=pES62; Komplementationsvektor (*htpG*)= pES64; (n=3; 2 Wiederholungen), S/P=Sample/Positivkontrolle (WT)

Die beobachtete Attenuierung der *htpG* Phil-1 Mutante (*L.pn.* Phil-1 *htpG*::tn5 Kl.1) in der Koinfektion mit *A.c.* konnte durch trans Komplementation nicht behoben werden (Daten nicht gezeigt). Selbiges gilt für die Koinfektion mit U937 Makrophagen (Daten nicht gezeigt). Die Überexpression von *htpG* in *L.pn.* Phil-1 hatte in keinem der beiden Infektionsmodelle einen sichtbaren Einfluss auf die Vermehrungsfähigkeit (Daten nicht gezeigt).

4.4.3 Mutante P8C2 - (*lpg0721*: RND efflux protein)

a)



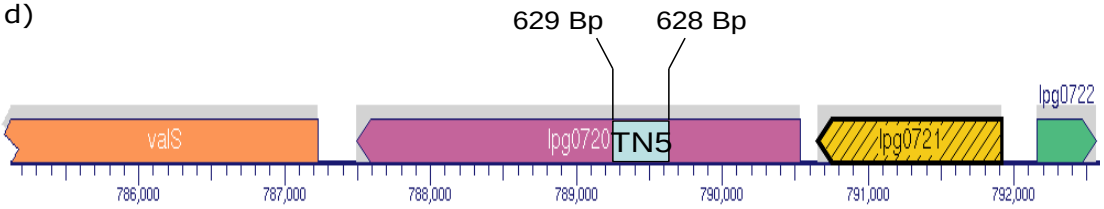
b)

Synonym:	lpg0721
Länge:	1263 bp
Position:	790655-797917 (-)
GC-Gehalt:	41,25 %
Protein:	RND efflux membrane fusion Protein (420 AS)
Funktion:	Transport
Lokalisation:	Membran
Operon:	mit lpg0720

c) Paraloge in *L. pneumophila* Philadelphia-1 (http://www.genome.jp/kegg/kegg1.html)

Entry	len	SW-score	bits	identity	overlap
lpn:lpg2513 RND multidrug efflux membrane fusion protei	388	365	89	0.245	417
lpn:lpg2177 HlyD family secretion protein	368	287	71	0.213	422
lpn:lpg0851 membrane fusion protein	338	257	64	0.235	344
lpn:lpg0658 HlyD family secretion protein	285	179	47	0.216	245

d)



e) Motive in *lpg0721* (http://www.genome.jp/kegg/kegg1.html)

Motif id	From	To	Definition	E value	Score
pf:Biotin_lipoyl	31	100	Biotin-requiring enzyme	0.21	-
ps:CHITINASE_18	67	75	Chitinases family 18 active site.	-	-
pf:HlyD	68	287	HlyD family secretion protein	0.0079	-

Search GENES with the same motifs

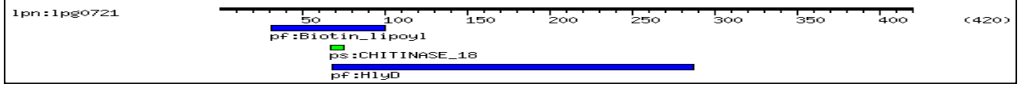


Abbildung 4-25: **Charakterisierung des Gens und der korrespondierenden Mutante.** Phänotyp der Mutante P8C2 (a). Eigenschaften des Gens: *lpg0721* und des kodierten Proteins (b). Paraloge des Gens in *L.pn.* Philadelphia-1 (c). Genauer Tn5-Insertionsort und genomische Umgebung (d) Motive in Lpg0721 (e).

Das in Mutante P8C2 durch Transposoninsertion mutierte Gen konnte über inverse PCR als *lpg0721* bestimmt werden. Durch Sequenzierung konnte der genaue Insertionsort des Tn5-Transposons zwischen den Bp 628 und 629 bestimmt wer-

den. *Lpg0721* erstreckt sich auf dem Chromosom von *L.pn.* Phil-1 von Bp 797917 bis Bp 790655. Das entspricht einer Länge von 1263Bp. Der GC-Gehalt liegt mit 41,25% deutlich über dem durchschnittlichen GC-Gehalt des *L.pn.* Phil-1 Chromosoms von 38%. Laut *in silico* Analyse ist das Genprodukt von *lpg0721* in der Membran lokalisiert. Vermutlich bildet *lpg0721* mit *lpg0720* ein Operon. *Lpg0721* kodiert ein Membranfusion-Protein, eines putativen RND-Efflux-Komplexes. Das putative Expressionsprodukt von *lpg0720* ist ein Multidrug-Resistance Protein, welches den eigentlichen Transporter des RND-Efflux-Komplexes darstellt. Zu *Lpg0721* homologe Proteine sind auch in den bisher sequenzierten *Legionella* Stämmen zu finden (siehe Tabelle 4-9).

Tabelle 4-9: **Orthologe zu *Lpg0721* in den sequenzierten *Legionella* Stämmen.** Die Identität auf Protein-Ebene ist in Klammern angegeben.

L.pn. Philadelphia	*L.pn.* Paris	*L.pn.* Lens	*L.pn.* Corby	*L.pn. 130b*	*L.pn. Alcoy*	*L. longbeachae*	*L. drancourtii*
Lpg0721	*Lpp0787* (100%)	Lpl0758 (99%)	*LPC_2571* (99%)	*LPW_07991 (100%)*	*Lpa_1120 (99%)*	*LLO_0620 (74%)*	*LDG_2519 (75%)*

Effluxsysteme haben die Aufgabe, Moleküle (u. a. sekundäre Stoffwechselprodukte und toxische Stoffe) aktiv aus der Zelle in die Umgebung zu transportieren. Sie kommen in der Natur ubiquitär vor und sind zum größten Teil chromosomal kodiert (Saier, Paulsen et al. 1998). Die Transporter sind entweder spezifisch für ein Substrat bzw. eine Substratklasse oder besitzen ein sehr breites Substratspektrum, diese werden als „Multi-Drug-Resistance" (MDR)-Pumpen bezeichnet (Borges-Walmsley and Walmsley 2001). Effluxsysteme wurden beim Menschen, bei Pilzen, bei Parasiten und auch bei Bakterien nachgewiesen (Van Bambeke, Glupczynski et al. 2003; Van Bambeke, Michot et al. 2003). Die bakteriellen Proteine, welche Antibiotika transportieren, werden folgenden Familien zugeordnet: ATP-Binding-Cassette (ABC) Transporter, Major Facilitator Superfamily (MFS), Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE) Transporter, Small Multidrug Resistance (SMR) Transporter und Resistance-Nodulation-Division (RND) Transporter (Kumar and Schweizer 2005). Der unterschiedliche Aufbau der Transporter ist in Abbildung 4-26 schematisch dargestellt.

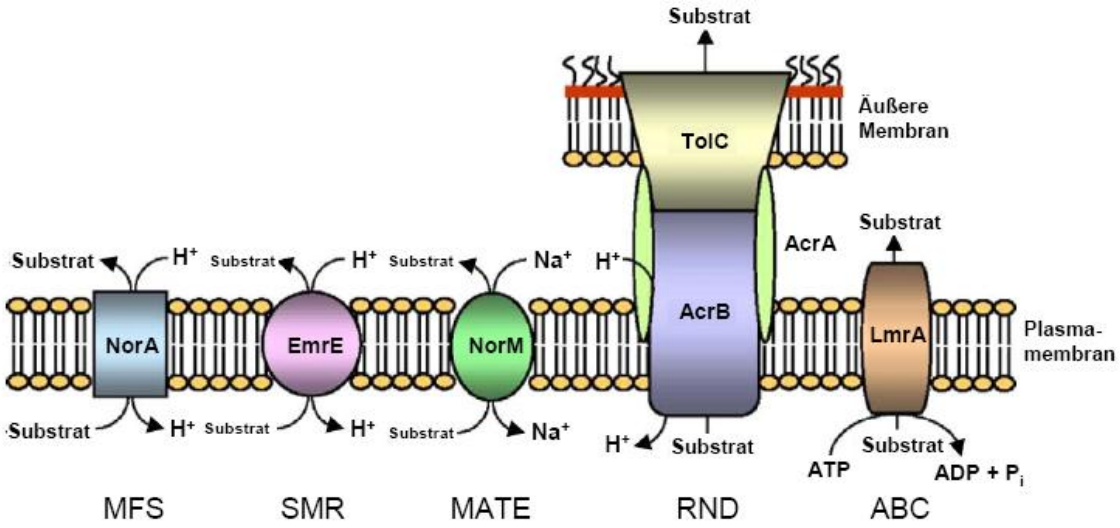


Abbildung 4-26: **Schematischer Aufbau der unterschiedlichen Transporterfamilien**. Dargestellt sind NorA (*Staphylococcus aureus*, MFS), EmrE (*E. coli*, SMR), NorM (*Vibrio parahaemolyticus*, MATE), AcrAB-TolC (*E. coli*, RND) und LmrA (*Lactococcus lactis*, ABC). Die Substrate werden chemisch unverändert, in Abhängigkeit vom Protonengradienten oder ATP, aus der Zelle gepumpt (Kumar und Schweizer, 2005)

RND-Transporter bilden in gram-negativen Bakterien mit zwei weiteren Proteinen einen Komplex, welcher sich über die innere und äußere Membran erstreckt. Von RND-Transportern, die zunächst in gram-negativen Bakterien nachgewiesen wurden (Saier, Tam et al. 1994), sind mittlerweile auch Vertreter in grampositiven Bakterien, Archaebakterien und Eukaryoten bekannt. Sie werden aufgrund phylogenetischer Untersuchungen, in sieben Familien eingeteilt (Tseng et al., 1999). Das von *lpg0720* und *lpg0721* kodierte putative RND-Efflux System gehört zur Gruppe der hydrophoben/amphiphilen Efflux-1-Familie (HAE1) (Tseng et al., 1999). Am besten untersucht sind bisher die Effluxsysteme von *Pseudomonas aeruginosa* (MexAB/OprM) und *E. coli* (AcrAB/TolC) (Ma, Cook et al. 1993; Poole, Heinrichs et al. 1993). Hier bildet das RND-Transporterprotein (MexB bzw. AcrB) eine Multikomponentenpumpe mit einem Membranfusions- (MexA bzw. AcrA) und einem äußeren Membranprotein (OprM bzw. TolC). Anhand dieses Beispiels soll der Aufbau und die Funktion der RND-Effluxpumpen vorgestellt werden. Um die Substrate durch die innere und äußere Membran in den extrazellulären Raum zu transportieren, ist der komplexe dreiteilige Aufbau der RND-Pumpen essentiell (Lomovskaya, Zgurskaya et al. 2002). Die Substrate, die durch das RND-Protein in den periplasmatischen Raum gepumpt werden können, würden ohne das äußere Membranprotein wieder ins Innere der Zelle aufgenommen.

Außerdem wurde durch Versuche mit verschiedenen Knockout-Mutanten bewiesen, dass der Efflux von Substanzen nur stattfindet, wenn alle drei beteiligten Proteine ausgebildet werden, ansonsten reagiert der entsprechende Stamm empfindlich auf Antibiotika, Farbstoffe, Gallensalze etc. (Ma, Cook et al. 1995; Fralick 1996; Zgurskaya and Nikaido 2000).

Die RND-Proteine bestehen aus zwölf membranspannenden α-Helices und zwei hydrophilen periplasmatischen Domänen. Der Transporter liegt als Trimer vor, dessen obere periplasmatische Domäne einen Trichter bildet, der an das untere Ende des Membranproteins TolC passt. Dieser Trichter mündet in eine Pore, welche sich wiederum zu einem Hohlraum öffnet. Wahrscheinlich gelangen die Pumpensubstrate sowohl vom Zytoplasma als auch vom Periplasma in diesen Hohlraum, um über den Trichter in das äußere Membranprotein und anschließend weiter ins Medium transportiert zu werden (Murakami, Nakashima et al. 2002). Das Membranfusionsprotein (MFP) ist ein Lipoprotein, welches über den N-terminalen Lipidrest in der inneren Membran verankert ist. Aufgrund der Röntgenstrukturanalyse von MexA, ein Membranfusionsprotein von *P. aeruginosa*, wird vermutet, dass ein ringförmiges MFP-Nonamer die beiden anderen Pumpenkomponenten umschließt, um den durch RND-Transporter und äußeres Membranprotein gebildeten Kanal abzudichten und zu stabilisieren (Higgins, Bokma et al. 2004) .

Die dritte Komponente der RND-Pumpen ist das äußere Membranprotein, bei *E. coli* z.B. TolC, welches Substrate auch unabhängig von AcrAB transportieren kann (Sulavik, Houseweart et al. 2001). Substrate von TolC sind neben Antibiotika, Farbstoffen und Gallensalzen auch Proteine, wie z.B. das Hämolysin, HlyA von *E.coli* (Wandersman and Delepelaire 1990). TolC bildet ein Trimer mit einer β-Barrel-Struktur in der äußeren Membran, welche zum Medium hin geöffnet ist. Wie die MDR-Pumpen der anderen Transporterfamilien transportieren auch die RND-Systeme ein sehr breites Spektrum an unterschiedlichen Substraten. Neben diversen Antibiotikaklassen (β-Lactamatibiotika, Makrolide, Fluorchinolone, Tetracycline, Chloramphenicol) werden auch Desinfektionsmittel (z.B. Benzalkoniumchlorid, Triclosan) und Farbstoffe (z. B. Ethidiumbromid, Pyronin Y, Acriflavin) sowie Lösungsmittel, Tenside und Gallensäuren aus der Zelle gepumpt (Nikaido 1996; Sulavik, Houseweart et al. 2001; Mao, Warren et al. 2002). Daher wird auch die physiologische Rolle dieser Transporter diskutiert, die vermutlich im Ex-

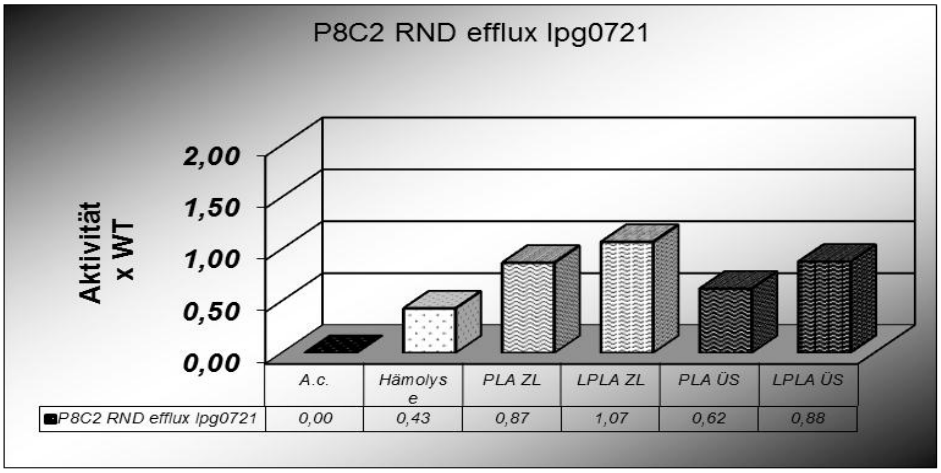
port von Metaboliten oder toxischen Substanzen liegt (Grkovic, Brown et al. 2002). Die dritte Komponente des RND-Efflux-Systems, das äußere Membranprotein, konnte in der unmittelbaren Umgebung von *lpg0721* nicht lokalisiert werden. Durch gezielte Blast-Suche mit dem äußeren Membranprotein TolC von *E.coli* gegen das Genom von *L.pn.* Phila-1, konnte jedoch *lpg0699* als mögliches Tunnelprotein für den Komplex identifiziert werden.

4.4.3.1 Erzeugung neuer *lpg0721* Mutanten in *L.pn.* Phil-1 und *L.pn.* JR32

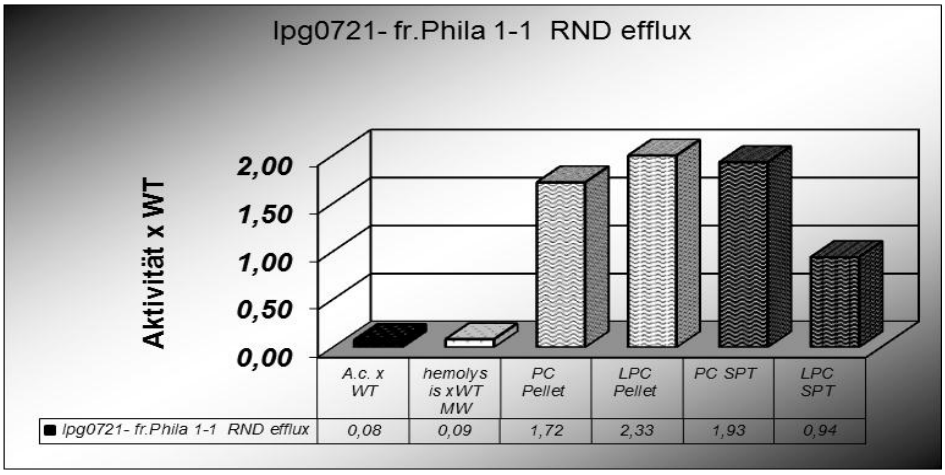
Zur Verifizierung des durch Mutation von *lpg0721* hervorgerufenen Phänotyps in Mutante P8C2, wurden neue Mutanten in den Stämmen Phil-1 und JR32 erzeugt. Die Mutagenese erfolgte über natürliche Transformation eines nicht replizierenden Plasmids, welches das mutierte *lpg0721* aus Mutante P8C2 trägt. Zur Überprüfung der Mutagenese wurde als erstes eine Kolonie-PCR mit gepickten Klonen von der jeweiligen Mutageneseplatte durchgeführt. Falls die Mutagenese erfolgreich war, sollte ein Shift in Bezug zum Wildtypgen um 1221Bp zu sehen sein. Sowohl in *L.pn.* Phila-1 als auch in *L.pn.* JR32 konnten erfolgreich neue *lpg0721* Mutanten erzeugt werden (Daten nicht gezeigt).
Um sicher zu gehen, dass die neu generierten Mutanten kein *lpg0721* mehr exprimieren, wurde von den entsprechenden Klonen RNA isoliert und mittels RT-PCR das Vorhandensein einer mRNA von *lpg0721* untersucht. In den Mutanten *L.pn.* Phil-1 *lpg721*::tn5 Kl.1 und *L.pn*. JR32 *lpg721*::tn5 Kl.1 konnte kein Transkript mehr festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

4.4.3.2 Phänotyp der neu generierten Mutanten

a)



b)



c)

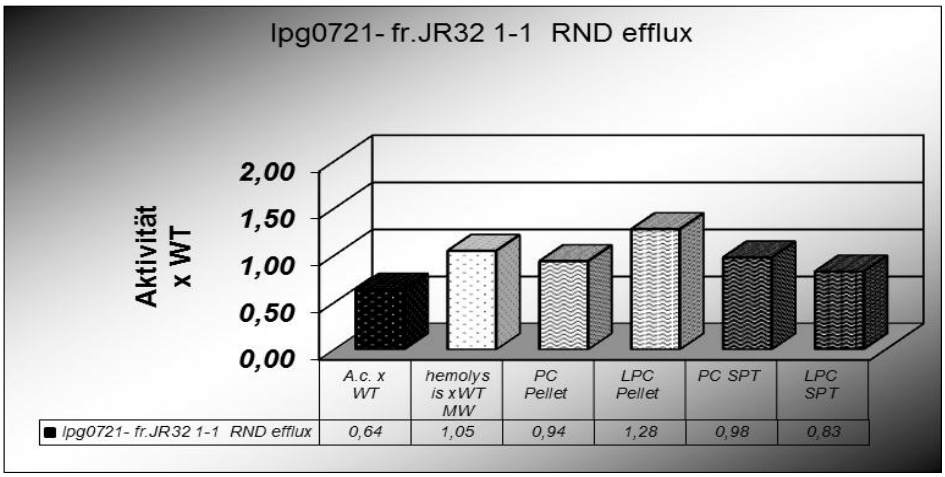


Abbildung 4-27: **Phänotypen der *lpg0721* – Mutanten.** a) Mutante P8C2 (*L.pn.* Philadelphia *lpg721*::tn5)aus dem Screen. b) Mutante *L.pn.* Philadelphia *lpg721*::tn5 Kl.1 c) Mutante in *L.pn.* JR32 *lpg721*::tn5 Kl.1. Die Diagramme zeigen die hämolytische und lipolytische Aktivität (jeweils zellassoziierte und sekretierte PLA- u. LPLA-Aktivität) sowie die Replikationsfähigkeit in *A.c.* der einzelnen Mutanten. Die dargestellten Werte sind auf den jeweiligen Wildtyp normiert.

Die in Abbildung 4-27 dargestellten Diagramme zeigen die gekennzeichneten Aktivitäten der einzelnen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Wie zu erkennen ist, sind bei der neu generierten Mutante in *L.pn.* Phil-1 *lpg721*::tn5 Kl.1 sowohl die Fähigkeit zur intrazellulären Vermehrung in *A.c.* als auch die hämolytische Aktivität stark reduziert. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der im Screen identifizierten Mutante P8C2. Die bei Mutante P8C2 beobachtete Reduktion der sekretierten PLA- Aktivität konnte in der *L.pn.* Phil-1 *lpg721*::tn5 Kl.1 nicht bestätigt werden. Der Einfluss des *lpg0721* Homologs von Stamm JR32 auf die intrazelluläre Vermehrungsfähigkeit in *A.c.* scheint aufgrund der Ergebnisse der Infektion wesentlich geringer zu sein als bei Stamm Phil-1. Die hämolytische sowie die getesteten lipolytischen Aktivitäten wurden durch die Mutation von *lpg0721* in *L.pn.* JR32 nicht beeinflusst.

Durch das Einbringen von *lpg0721* in trans in die entsprechenden Mutanten, wurde versucht die beobachteten Defekte dieser zu komplementieren. Bezüglich des hämolytischen Defektes, konnte zwar die Hämolyse gegenüber der Leervektorkontrolle gesteigert werden, das Wildtypniveau wurde jedoch nicht erreicht. Die Überexpression von *lpg0721* Phila (*lpg0721*) führt zu einer erhöhten Aktivität

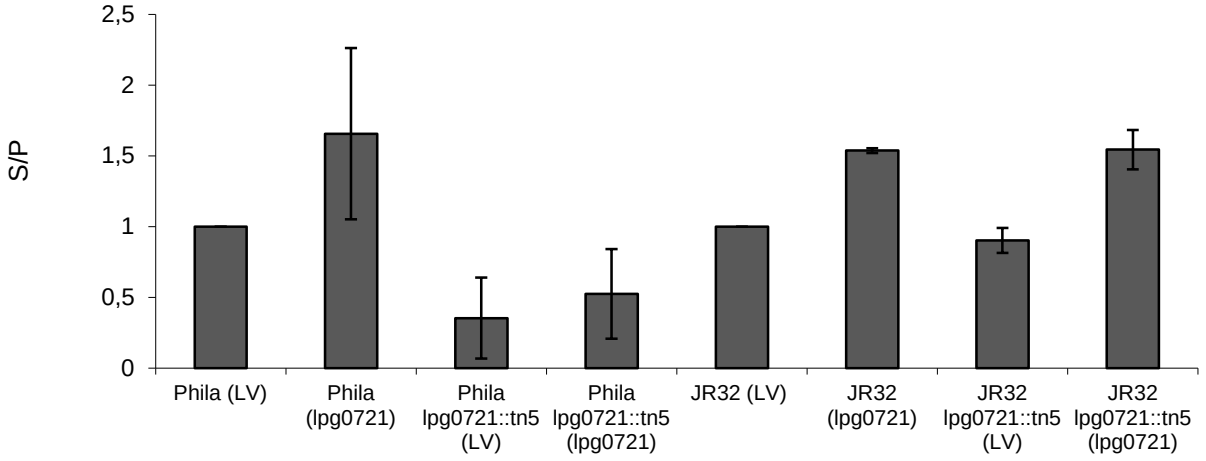


Abbildung 4-28: **Quantitativer Hämolyse-Assay mit Komplementations- und Überexpressionsklonen der *lpg0721* Mutanten und der korrespondierenden Wildtypen.** Phila=*L.pn.* Philadelphia; Phila *lpg721*::tn5 = *L.pn.* Philadelphia *lpg721*::tn5 Kl.1; JR32=*L.pn*. JR32; JR32 *lpg721*::tn5 = *L.pn.* JR32 *lpg721*::tn5 Kl.1; Leervektor(LV)=pES62; Komplementationsvektor (lpg721)= pES63;Werte sind auf den Wildtyp normiert; (n=3, 2 Wiederholungen)

im Vergleich zum Wildtyp (s. Abbildung 4-28). Im Stamm JR32, bei dem die Mutation von *lpg0721* keinen so starken Defekt in der hämolytischen Aktivität hervorrief, wie bei Stamm Phila-1, führte die Überexpression des selbigen zu einer deutlichen Erhöhung der hämolytischen Aktivität. Gleiches gilt für die Komple-

mentante von Stamm JR32, welche bezüglich der *lpg0721* Mutante mit Leervektor eine signifikante Steigerung der Aktivität aufwies.

Die Attenuierung von *L.pn.* Phila-1 *lpg721*::tn5 Kl.1 in der Koinfektion mit *A.c.* konnte nicht durch trans Komplementierung behoben werden. In Abbildung 4-29 sind die Ergebnisse der Koinfektion mit *A.c.* graphisch dargestellt. Obwohl beim Überexpressionsklon Phila-1 (*lpg0721*) eine im Gegensatz zum Wildtyp mit LV (pES62), Phila-1 (LV), eine deutlich höhere Vermehrungsrate zu beobachten war, führte die Transformation des Komplementationsvektor (pES63) in die Mutante zu keinem signifikanten Anstieg der intrazellulären Vermehrungsfähigkeit in *A.c.*. Diese bewegte sich auf dem Niveau der Mutante mit LV.

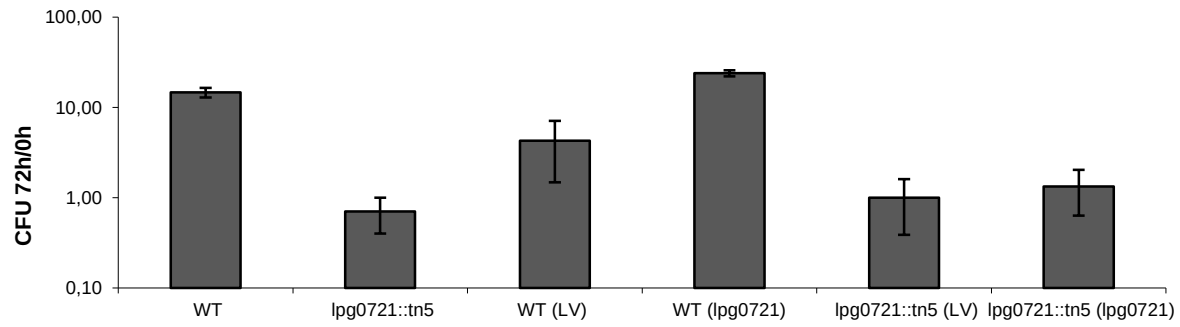


Abbildung 4-29: **Koinfektion mit Komplementations- und Überexpressionsklonen der *lpg0721* Mutante *L.pn.* Philadelphia *lpg721*::tn5 Kl.1 und dem Wildtyp (*L. pn.* Philadelphia) mit A. castellanii. ;** Leervektor(LV)=pES62; Komplementationsvektor (htpG)= pES63; (MOI = 0.1; n=3, mindestens 2 Wiederholungen)

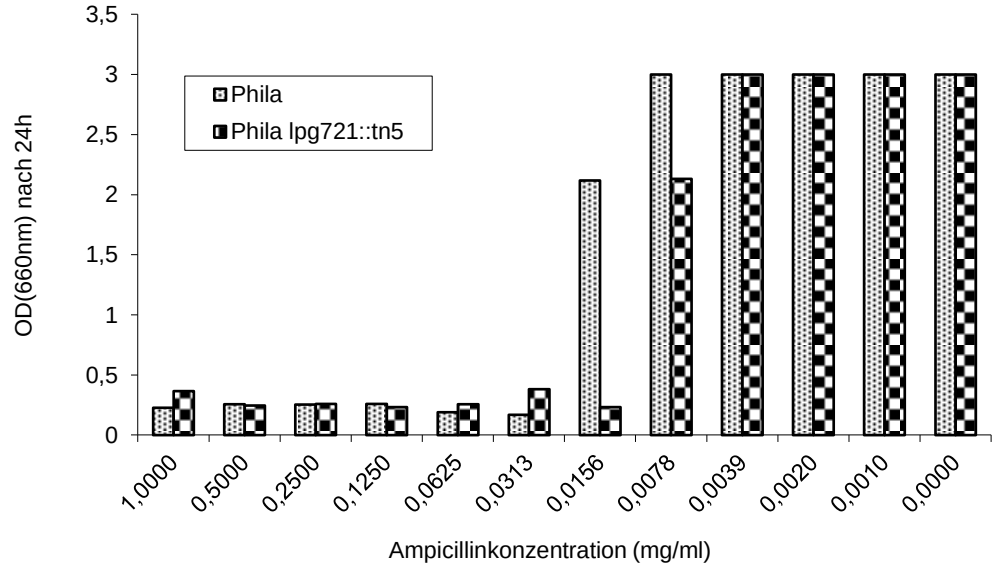
Die *lpg0721* Mutante, *L.pn*. Phila-1 *lpg0721*::tn5 Kl.1 sowie die Komplementationsklone wurden zusätzlich in einen zweiten Infektionsmodell getestet. Wie in der Koinfektion mit *A.c.* ist auch in der U937 Infektion eine Attenuierung von *L.pn.* Phil-1 *lpg0721*::tn5 Kl.1 zu beobachten, welche durch Trans-Komplementation nicht wieder aufgehoben werden konnte (Daten nicht gezeigt).

4.4.3.3 Vergleich der minimalen Hemmkonzentration von Ampicillin für *L.pn.* Wildtyp und *lpg0721* Mutante

Wie bereits beschrieben kodiert *lpg0721* ein Membranfusionprotein eines putativen RND-Efflux-Komplexes. Da diese Komplexe zu den Multi-Drug-Resistance Pumpen gehören lag es nahe die entsprechenden Mutanten in *L.pn.* Phila-1 und *L.pn.* JR32 auf ihre Resistenz gegenüber Antibiotika zu testen. RND Efflux Sys-

teme sind nur dann funktionstüchtig, wenn alle drei Bestanteile des Transportsystems vorhanden sind. Demnach müsste sich die Mutation in *lpg0721* (Membran-Fusions-Protein) auf die Antibiotikaresistenz auswirken. Um dieses zu testen wurden mehrere Experimente zur Bestimmung der **M**inimalen-**H**emm-**K**onzentration (MHK) durchgeführt. Als erstes wurde die MHK von Ampicillin der von *L.pn.* Phil-1 *lpg0721*::tn5 Kl.1 und *L.pn.* JR32 *lpg0721*::tn5 Kl.1 sowie der dazugehörigen Wildtypen im Dilutionsverfahren bestimmt (s. Abbildung 4-30). Dabei wird eine zweistufige Verdünnungsreihe des Antibiotikums in Kulturmedium mit jeweils der gleichen Menge an Inokulum beimpft und ü.N. bebrütet. Durch Messung der Trübung in den Reagenzgläsern kann das Wachstum in den Kulturlösungen in Abhängigkeit der Antibiotikakonzentration bestimmt werden. Die Antibiotikakonzentration, bei der als erstes kein Wachstum zu erkennen ist, wird als MHK bezeichnet. Mittels dieses Verfahrens konnte die MHK von Ampicillin wie folgt bestimmt werden. Für den Wildtyp *L.pn.* Phila-1 betrug die MHK 31,3µg/ml, für die *lpg0721* Mutante *L.pn*. Phila-1 *lpg0721*::tn5 Kl.1 lag sie bei 15,6µg/ml. Der Wildtyp *L.pn.* JR32 wies mit 62,5µg/ml eine höhere MHK gegenüber Ampicillin auf als Stamm Phila-1. Die *lpg0721* Mutante im Stamm JR32, *L.pn.* JR32 *lpg0721*::tn5 Kl.1, zeigte mit 15,6µg/ml die gleiche MHK wie die entsprechende Mutante in *L.pn.* Phila-1.

a)



b)

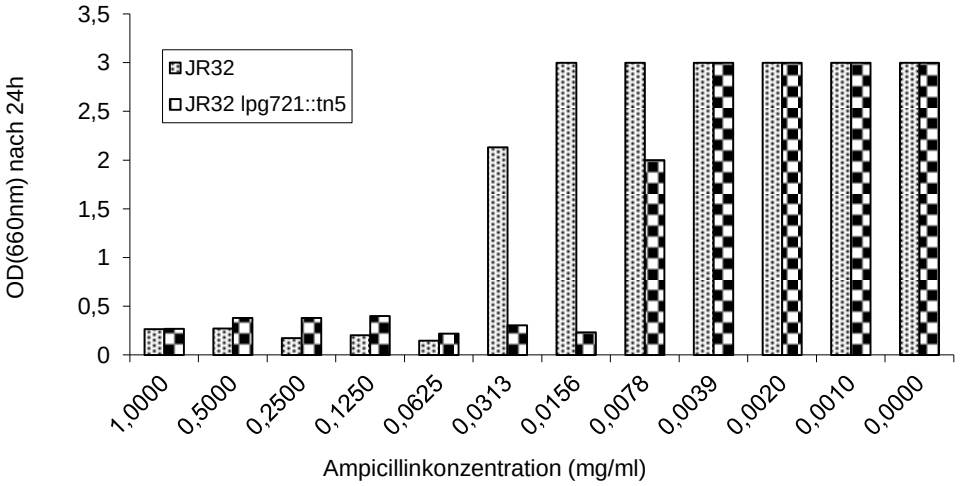


Abbildung 4-30 :**Bestimmung der MHK von Ampicillin.** *lpg0721* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Bestimmung erfolgte mittels Dilutionsverfahren. Phila-1=*L.pn.* Philadelphia-1; Phila-1 *lpg0721*::tn5 = *L.pn*. Philadelphia-1 *lpg0721*::tn5 Kl.1; JR32=*L.pn.* JR32; JR32 *lpg0721*::tn5 = *L.pn.* JR32 *lpg0721*::tn5 Kl.1

Um auszuschließen, dass die Unterschiede in den MHKs zwischen *lpg0721* Mutanten und Wildtypen auf unterschiedlichen Wachstumsraten basieren, wurde ein Test zur Bestimmung der MHK auf festen Nährböden durchgeführt. Dieser als Gradient-Diffusionsmethode (Epsilon-Test) bezeichneter Test, schließt eventuelle Wachstumsunterschiede der untersuchten Klone aus. Abbildung 4-31 zeigt die entsprechenden Nährmedienplatten mit dem darauf befindlichen Antibiotika-

Gradienten-Streifen und dem gekennzeichneten Organismus nach 72h Inkubation bei 37°C. Bei allen getesteten Organismen ist deutlich der durch Ampicillin verursachte Hemmhof erkennbar. Die MHK der einzelnen Stämme wurden am Teststreifen abgelesen. Diese ergaben sich beim *L.pn.* Phila-1 zu 0,25µg/ml beim Wildtyp und zu 0,12µg/ml bei der *lpg0721* Mutante *L.pn.* Phil-1 *lpg0721*::tn5 Kl.1. Der *L.pn.* JR32 Wildtyp wies in diesem Test eine MHK gegenüber Ampicillin von 0,5µg/ml auf. Die *lpg0721* Mutante von Stamm JR32, *L.pn*. JR32 *lpg0721*::tn5 Kl.1 zeigte sich mit einer MHK von 0,175µg/ml deutlich sensitiver gegenüber Ampicillin.

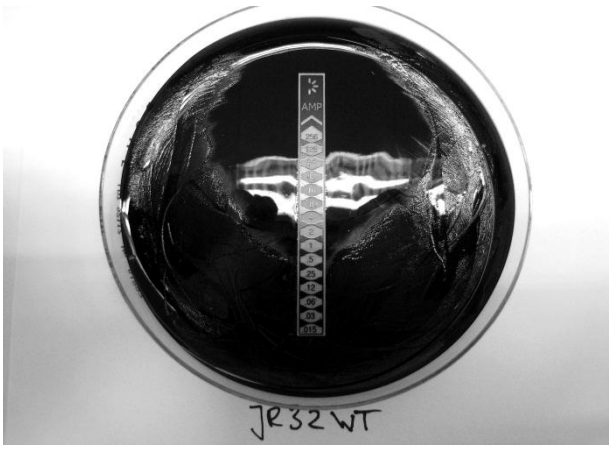
L.pn. Phila-1 WT

MHK: 0.25 µg/ml

L.pn. Phila-1 lpg0721::tn5 Kl.1

MHK: 0.12 µg/ml

*L.pn.*JR32 WT



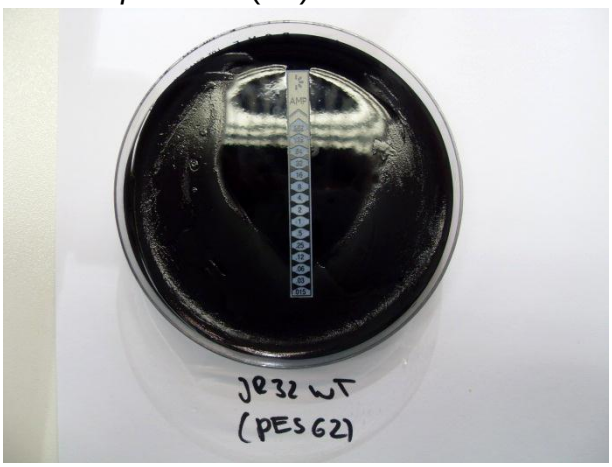
MHK: 0.5 µg/ml

L.pn. JR32 *lpg0721*::tn5 Kl1

MHK: 0.175 µg/ml

Abbildung 4-31: **Bestimmung der MHK von Ampicillin.** *lpg0721* Mutanten (*L.pn*. Phila-1 und JR32) im Vergleich zum Wildtyp. Bestimmung erfolgte mittels Gradient-Diffusionsmethode (Epsilon-Test).

*L.pn.*JR32 (LV) WT



MHK: 0.08 µg/ml

*L.pn.*JR32 *lpg0721*::tn5(LV)

MHK: 0.06 µg/ml

*L.pn.*JR32 WT (*lpg0721*)

MHK: 0.06 µg/ml

Lpn.JR32 *lpg0721*::tn5 KL1 (*lpg0721*)

MHK: 0.015 µg/ml

Abbildung 4-32:**Bestimmung der MHK von Ampicillin.** *lpg0721* Komplementations- und Überexpressionsklone *L.pn.* JR32 im Vergleich zum Wildtyp. Bestimmung erfolgte mittels Gradient-Diffusionsmethode (Epsilon-Test). . JR32=*L.pn.* JR32; JR32 *lpg721*::tn5 = *L.pn.* JR32 *lpg0721*::tn5 Kl.1; Leervektor(LV)=pES62; Komplementationsvektor (*lpg0721*)= pES63

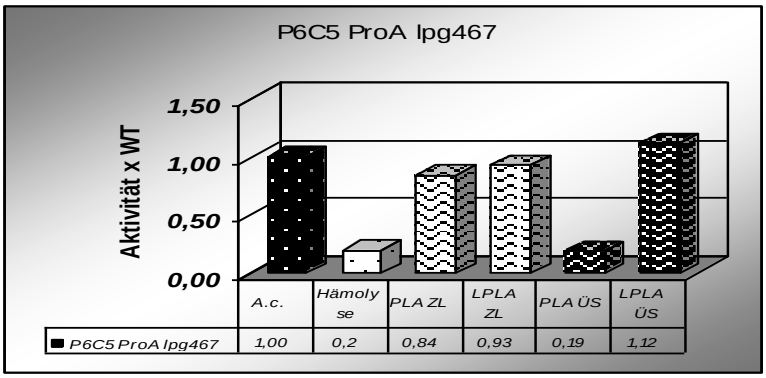
Obwohl die ermittelten MHK-Werte der beiden Methoden abweichen, ist eindeutig zu erkennen, dass die Mutation von *lpg0721* einen Einfluss auf die Resistenz gegen Ampicillin besitzt. Mittels der Gradient-Diffusionsmethode wurde daher untersucht, ob sich dieser Einfluss durch Transkomplementation mit einem Vektor, der das intakte *lpg0721* Gen trägt (pES63), reversibel ist. Bei diesem Experiment war zu beobachten, dass die alleinige Präsenz des Leer- bzw. Komplementationsvektor zu einer deutlichen Reduktion der MHK führte.

Das Einbringen einer intakten Kopie des Gens *lpg0721* mittels eines „low copy" Vektors (pES62) in die Mutante des Stammes JR32, führte nicht zu einer Erhöhung der Resistenz gegen Ampicillin. Im Gegenteil, durch die Transformation des Komplementationsvektors in den Wildtyp sowie in die Mutante und die damit einhergehende gesteigerte Transkription von *lpg0721*, reduzierte sich die MHK von Ampicillin im Vergleich zu Wildtyp und Mutante mit LV.

4.4.4 Mutante P6C5 - (*lpg0467*: proA)

Die Mutante P6C5 zeigte während des Screens auf den Festmedien eine signifikante Reduktion der hämolytischen, proteolytischen und lipolytischen Aktivität. Die nähere Untersuchung des lipolytischen Defekts der Mutante mittels des quantitativen Lipid-Hydrolyse Assays bestätigte die Ergebnisse von Flieger et.al, dass vor allem die sekretierte PLA-Aktivität reduziert ist (Flieger, Neumeister et al. 2002). Die Transposoninsertion hatte jedoch keinen Einfluss auf die intrazelluläre Vermehrung in *A.c.*. Als Ort der Transposoninsertion wurde das Gen *lpg0467* (nachfolgend als *proA* bezeichnet) bestimmt. Die Insertion erfolgte dabei zwischen Bp285 und 286. *lpg0467* kodiert für die Zinkmetalloprotease ProA (MspA). Das Gen ist 1263Bp lang und erstreckt sich auf dem Chromosom von *L.pn.* Phil–1 von Bp509030 bis Bp510661. Der durchschnittliche GC-Gehalt von *lpg0467* liegt bei 39,40%. *In silico* Analysen und empirische Daten zeigen, dass ProA in den extrazellulären Raum transportiert wird. In *L.pn.* Phil-1 existieren 3 Paraloge von ProA: *lpg0019*, *lpg1655* und *lpg2977*. Diese gehören ebenfalls zur Klasse der Metalloproteasen. Die in ProA enthaltenen Motive sind in Abbildung 4-33 e) dargestellt. Neben den katalytisch aktiven Domänen findet man im N-terminalen Bereich ein Propeptid.

a)



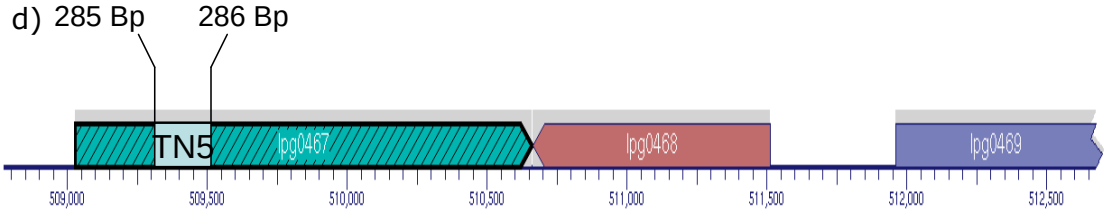
b)

Synonym:	lpg0467
Länge:	1632 bp
Position:	509030-510661 (+)
GC-Gehalt:	39,40 %
Protein:	Zincmetalloprotease (ProA) (543 AS)
Funktion:	Proteolyse
Lokalisation:	Extrazellulär
Operon:	kein

c) Paraloge in *L. pneumophila* Philadelphia-1 (http://www.genome.jp/kegg/kegg1.html)

Entry		len	SW-score	bits	identity	overlap
lpn:lpg0019	hemagglutinin/protease, zinc metalloproteas	560	1089	254	0.353	575
lpn:lpg1655	class 4 metalloprotease (EC:3.4.24.26)	557	810	190	0.323	567
lpn:lpg2977	zinc metalloprotease (virulence metalloprot	449	746	176	0.336	470
lpn:lpg1035	copper efflux ATPase	1024	103	29	0.203	276

d)



e) Motive in lpg0467 (http://www.genome.jp/kegg/kegg1.html)

Motif id	From	To	Definition	E value	Score
pf:FTP	59	110	Fungalysin/Thermolysin Propeptide Motif	4.5e-12	-
pf:PepSY	131	202	Peptidase propeptide and YPEB domain	6.6e-05	-
pf:Peptidase_M4	218	386	Thermolysin metallopeptidase, catalytic domain	1.7e-88	-
ps:ZINC_PROTEASE	374	383	Neutral zinc metallopeptidases, zinc-binding region signature.	-	-
pf:Peptidase_M4_C	388	535	Thermolysin metallopeptidase, alpha-helical domain	2.1e-91	-

Search GENES with the same motifs

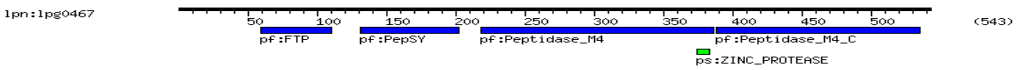


Abbildung 4-33: **Charakterisierung des Gens und der korrespondierenden Mutante.** Phänotyp der Mutante P6C5 (a). Eigenschaften des Gens: *lpg0467* und des kodierten Proteins (b). Paraloge des Gens in *L.pn.* Philadelphia-1 (c). Genauer Tn5-Insertionsort und genomische Umgebung (d) Motive in *lpg0467* (e).

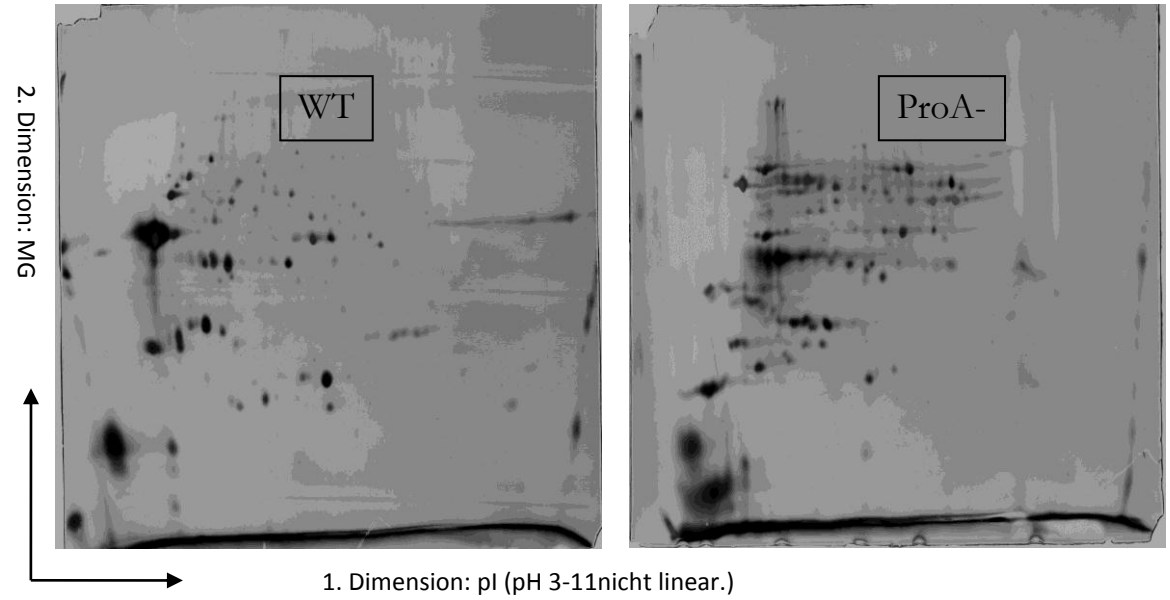
4.4.4.1 Vergleich Sekretome Wildtyp vs. *proA*-Mutante

Der Einfluss von ProA auf die Virulenz von *L.pn.* Phil-1 ist noch nicht genau definiert. Der Großteil der Veröffentlichungen zur Funktion von ProA fokussiert die Auswirkungen von ProA auf den Wirtsorganismus. Dabei wurde von Rossier et al. gezeigt, dass ProA in Abhängigkeit des Wirtsorganismus einen essentiellen Einfluss auf die intrazelluläre Vermehrung von *L. pneumophila* hat (Rossier, Dao et al. 2008). Eine wichtige Beobachtung wurde von Banerji et al. beschrieben. Sie konnten zeigen, dass ProA zur Aktivierung der Glyzerophospholipid:Azyltransferase (GCAT)-Aktivität einer sekretierten Phospholipase A notwendig ist (Banerji, Bewersdorff et al. 2005). Diese Aktivierungsfunktion von eigenen sekretierten Proteinen des Bakteriums eröffnet einen neuen Blickwinkel auf die spezifische Funktion von ProA. Um die Funktion der ProA weiter zu spezifizieren und den Aktivierungsmechanismus der GCAT-Aktivität von PlaC aufzuklären, wäre es von großem Vorteil die Substratspezifität dieser Metalloprotease zu kennen. Dabei sollten *Legionella* eigene genauso wie eukaryotische Substrate in Betracht gezogen werden. Ein Weg zur Identifizierung *Legionella* eigener Substrate stellt die Analyse des Kulturüberstands von *Legionella* mit der differentiellen 2-D-Gelelektrophorese dar. Dabei werden die Proteine der Kulturüberstände von Wildtyp und der entsprechenden *proA*-Mutante mittels 2-D-Gelelektrophorese aufgetrennt und miteinander verglichen. Proteine, die nur im Kulturüberstand der *proA*-Mutante als Volllängenproteine zu finden sind, stellen putative Substrate der ProA dar. Diese können über „Peptide Mass Fingerprinting" (PMF) identifiziert werden.

Abbildung 4-34 zeigt die 2-D-Gele der Sekretome von *L.pn.* Phil-1 Wildtyp und der entsprechenden *proA*-Mutante. Dazu wurden die Proteine der Überstände einer spätlogarithmischen Kultur (OD_{660nm}: 2,0) mit Isopropanol gefällt. Es wurden jeweils 75µg Protein für die 2D Gelelektrophorese verwendet. Die Auftrennung nach isoelektrischem Punkt (pI) in der 1.Dimension erfolgte mittels eines nichtlinearen pH-Gradienten (pH 3-11). In der 2.Dimension wurden die nach pI aufgetrennten Proteine auf einem 10%igen SDS-Gel nach ihrer Größe getrennt. Anhand der Einzelgele von Wildtyp und *proA*-Mutante ist ersichtlich, dass ProA einen entscheidenden Einfluss auf das Sekretom von *L.pn.* Phil-1 besitzt. Durch

das Übereinanderlegen der beiden Einzelgele (Warping) werden die Unterschiede noch deutlicher (

Abbildung 4-34 b). Blaue Spots repräsentieren den WT, gelbe Spots das Sekretom der *proA*-Mutante. Proteine die in beiden Überständen vorhanden sind, werden als dunkelblaue Spots dargestellt. ProA ist eindeutig als das abundanteste sekretierte Protein im Wildtyp zu erkennen. Erwartungsgemäß ist dieser Spot bei der *proA*-Mutante nicht vorhanden. Die Anzahl der Proteine im Sekretom der *proA*-Mutante ist deutlich höher als im Sekretom des WT. Dies trifft vor allem im Bereich größerer Proteine zu. Neben den zahlreichen Spots, die nur im Sekretom der *proA*-Mutante vorhanden sind und somit putative Substrate dieser Zinkmetalloprotease darstellen, sind auch Spots zu erkennen, die nur im Überstand des WT auftreten. Dies könnten unter anderem durch ProA modifizierte Proteine sein. Um die Proteine, die entweder nur im Überstand des WT oder der *proA*-Mutante detektierbar waren zu identifizieren, wurden zunächst 2 Spots (Spot: 1;2) die nur bei WT sichtbar sind, ein Spot (Spot:11) der in beiden Überständen vorhanden war und 12 Spots (Spot:3-10; 12-15) die nur bei der *proA*-Mutante zu sehen waren, ausgeschnitten und versucht diese mittels PMF zu identifizieren. Von diesen insgesamt 15 Proteinen konnten 8 identifiziert werden. Tabelle 4-10 zeigt die Ergebnisse des PMF der ausgewählten Spots.



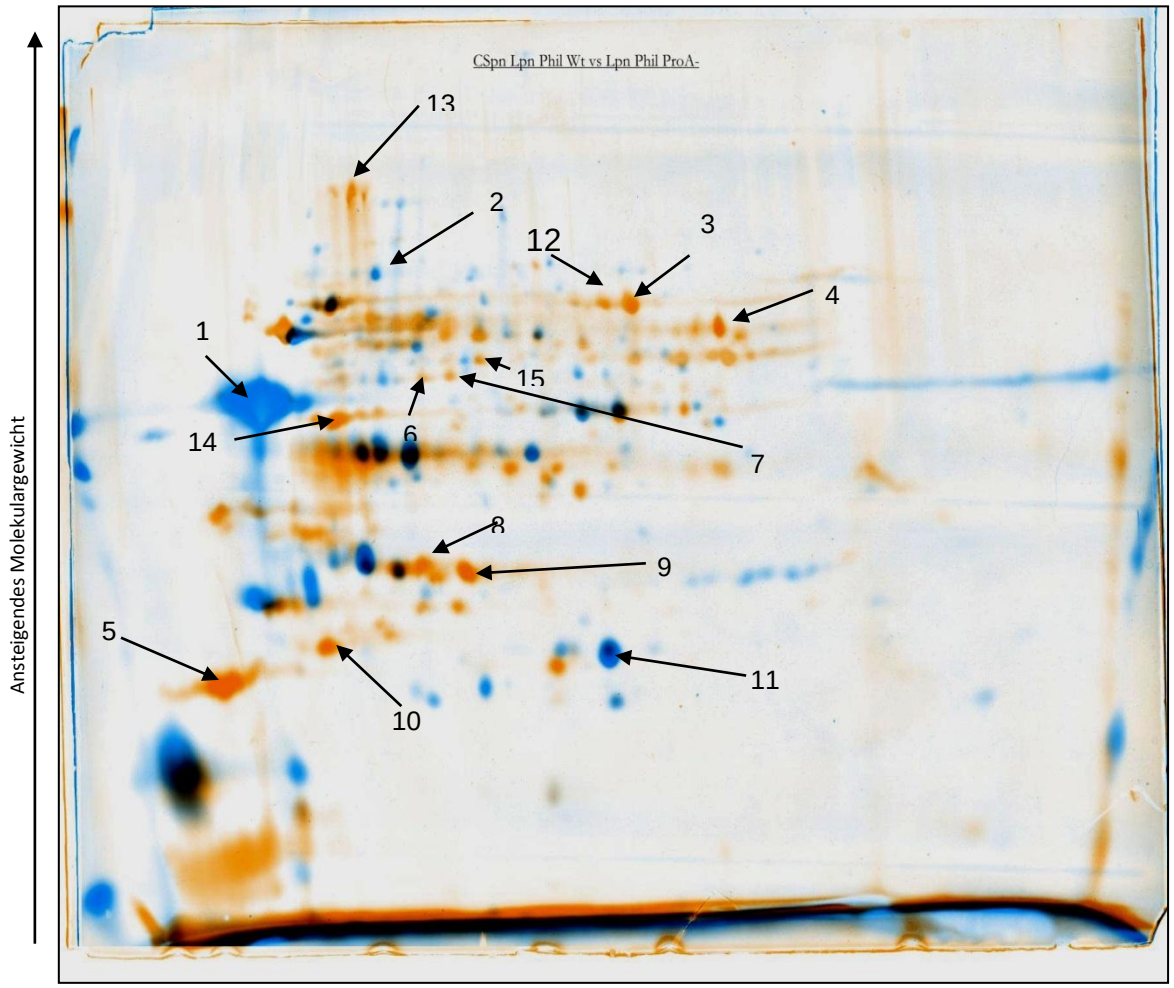


Abbildung 4-34: **Vergleich der Sekretome von *L.pn.* Philadelphia-1 Wildtyp und *proA*-Mutante mittels differenzieller 2-D-Gelelektrophorese.** Die oberen 2D Gele zeigen jeweils das nach pI und MW aufgetrennte Sekretom einer Kultur in der späten exponentiellen Wachstumsphase. Mit der Software Delta 2D (Decodon) wurden die beiden Einzelgele übereinandergelegt. Blaue Spots entsprechen Proteinen des Wildtyps, Gelbe Spots entsprechen Proteinen der proA-Mutante. Proteine die in beiden Sekretomen vorhanden sind dunkelblau bis schwarz. Die nummerierten Spots wurden ausgeschnitten und versucht mittels PMF die Proteine zu identifizieren. Die Ergebnisse der Identifikation finden sich in Tabelle 4.10.

Tabelle 4-10: **Ergebnis des PMF der gekennzeichneten Spots der differentiellen 2D-Gelelektrophorese**. Bei identifizierten Proteinen ist die lpg-Nr. des kodierenden Gens, das Molekulargewicht (MW), der isoelektrische Punkt (pI) sowie die Lokalisation (SignalP) mit angegeben. Spots die nicht identifiziert werden konnten sind mit n.i. indiziert.

Spot	Sekretom	Protein	lpg	MW	pI	Lokalisation
1	WT	Zinkmetalloprotease ProA	*lpg0467*	60670.09	5.33	sekretiert
2	WT	n.i.				
3	*ΔproA*	IgA-Proteinase	*lpg1667*	53371.34	5.98	sekretiert
4	*ΔproA*	Glucoamylase	*lpg0422*	51978.96	6.46	sekretiert
5	*ΔproA*	n.i.				
6	*ΔproA*	n.i.				
7	*ΔproA*	Type II Sekretionsystemprotein PilU	*lpg2323*	41657.9	5.4	Cytoplasma
8	*ΔproA*	n.i.				
9	*ΔproA*	hypothetisches protein	*lpg0957*	33614.13	5.52	sekretiert
10	*ΔproA*	periplasmatisches Protein eines Arginintransporters	*lpg0037*	28098.19	5.04	sekretiert
11	**WT**,*ΔproA*	Astacinprotease	*lpg2999*	30181.02	5.72	sekretiert
12	*ΔproA*	n.i.				
13	*ΔproA*	n.i.				
14	*ΔproA*	TPR repeat-enthaltenes Protein	*lpg2222*	41415.02	5.35	sekretiert
15	*ΔproA*	n.i.				

Das Protein von Spot 11, welches in den Überständen beider Kulturen zu detektieren war, konnte als Astacinprotease identifiziert werden. Wie in den Gelbildern und der Überlagerung dieser zu erkennen ist, wird diese sekretierte Protease im WT stärker exprimiert als in der *proA*-Mutante. Dies könnte bedeuten, dass ProA einen direkten oder indirekten regulatorischen Einfluss auf die Expression dieser Protease besitzt. Diese These muss jedoch durch weitere Untersuchungen verifiziert werden. Die weiteren identifizierten Proteine sind mit Ausnahme des TypII Sekretionsproteins PilU (Spot 7) alle samt potentiell sekretierte Proteine, die ein Signalpeptid besitzen. Die identifizierten Proteine der Spots 3, 4, 9, 10, 14 stellen putative Substrate von ProA dar. Um dies zu verifizieren, müssten weitere Versuche mit diesen Proteinen und ProA durchgeführt werden. Aufgrund der be-

grenzten Zeit der Arbeit, war es nicht möglich weitere Spots zu identifizieren und die Versuche zu wiederholen. Die bisher erzielten Ergebnisse zeigen jedoch, dass ProA einen wesentlichen Einfluss auf die im Kulturüberstand von *L.pn.* vorhandenen Proteine hat.

4.4.4.2 Protease Substrat Test (JPT)

Eine Möglichkeit vor allem die Substratspezifität von ProA gegenüber potentiellen eukaryotischen Substraten zu bestimmen, bietet der Protease Substrat Test (JPT). Dabei werden intern gequenchte (Dabsyl/ EDANS) synthetische Peptide mit gereinigter Protease inkubiert. Wird eines der Peptide durch die Protease gespalten, kann dies über ein Fluoreszenssignal gemessen werden. Der verwendete Protease-Substrat-Test umfasste 360 oktamere synthetische Peptide von bekannten eukaryotischen Substraten bzw. deren Schnittsequenzen charakterisierter Proteasen. Dies ergibt eine Anzahl von 2520 putativen Schnittstellen. Die synthetischen Peptide wurden 2h mit, aus Kulturüberstand von *L.pn.* 130b, gereinigter ProA unter Zinksupplementierung (6,6 µM) bei 37°C inkubiert. In Tabelle 4-11 sind die 52 Topsubstrate aus zwei unabhängigen Experimenten aufgelistet. Die Sequenz der Oktamere sowie das Protein aus welchem sie stammen, finden sich in den Spalten zwei und drei. Das Verhältnis des Fluoreszenssignals von post- zu pre-Inkubation ist in Spalte 4 zu sehen. Alle Peptide bei denen dieses Verhältnis >6 war wurden als Topsubstraten eingestuft. Zu den Topsubstraten gehört unter anderem Kollagen. Kollagen ist einer der Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix. Catenin beta 1, welches ebenfalls als Substrat für die ProA identifiziert wurde, ist wesentlicher Bestandteil der Tight Junctions zwischen den Zellen. Die Proteolyse dieses Bestandteils durch ProA, würde zur Destabilisierung der Zellverbindungen führen und somit den Legionellen einen Weg in tiefere Zellschichten ermöglichen. Neben den Substraten aus der extrazellulären Matrix findet sich unter den Topsubstraten auch eine Reihe von immunologisch assoziierten Proteinen. Zu diesen gehören Interleukin 18, Zytokin A7 und Proteine des Komplementsystems. Im Rahmen dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass eine *proA*-Mutante in der Koinfektion mit A549-Lungenepithelzellen eine deutlich höhere Interleukin 8 Ausschüttung induziert als der Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Dies deutet indirekt darauf hin, dass Interleukin 8 ebenfalls ein Substrat von ProA darstellt. Weiterhin gehören Proteasen wie Pepsin und die IgA-

spezifische Serinendopeptidase zu den gefundenen Substraten. Die identifizierten Substrate geben wichtige Anhaltspunkte auf die spezifische Funktion von ProA. Neben der Regulation der Immunantwort ist ProA vermutlich auch an der Destabilisierung der Zellverbände des betreffenden Gewebes beteiligt und ermöglicht so das weitere Disseminieren der Legionellen. Zu beachten ist jedoch, dass die Identifikation der Substrate anhand einer acht AS langen Sequenz des jeweiligen Proteins erfolgte. Um zu verifizieren, ob die Proteine auch im nativen Zustand von der ProA verdaut werden, müssten weitere Experimente durchgeführt werden.

Tabelle 4-11: **Top-Substrate aus dem Protease Substrat Test**. 360 fluoreszenzmarkierte Peptide (Oktamere) wurden mit gereinigter ProA (10mU, 6,6µM Zinkchlorid) von *L.pn.*130 inkubiert. Durch Spaltung der Peptide kann das gequenchte Fluoreszenssignal gemessen werden. Aufgelistet sind die 52 Topsubstrate die ein Ratio des Fluoreszenssignals nach zu vor Inkubation > 6 aufwiesen.

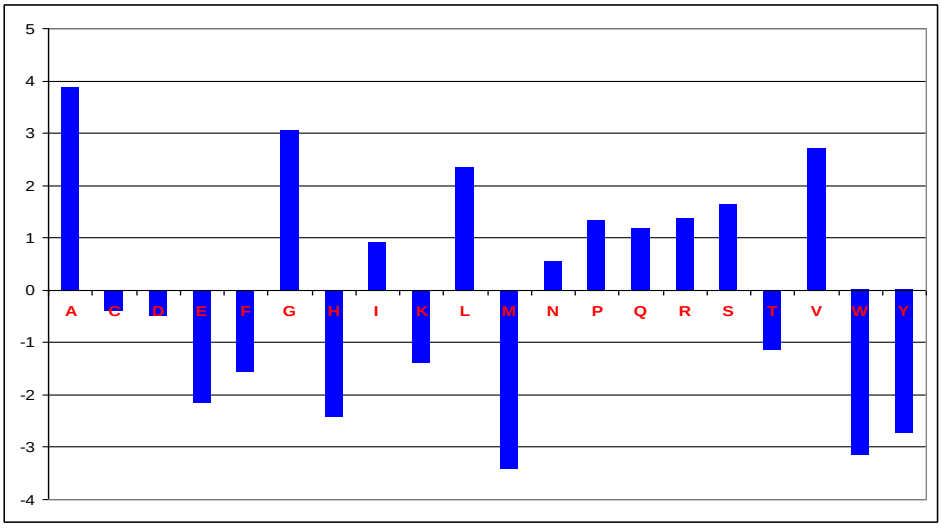
Peptid	Sequenz	Protein aus welchen Peptid stammt	Ratio
B22	APQRFGKK	FMRFamide-related peptides [Precursor]	11
F22	RAIDALRE	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	10.8
B4	SGPLSLQE	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	10.08
G3	ADIDGQYA	Catenin beta-1	10
B20	PQRFGRNT	FMRFamide-related peptides [Precursor]	9
O20	DTVDGKEI	Ras GTPase-activating protein 1	8.74
B14	MGKKSTGE	Gastrin-releasing peptide [Precursor]	8.6
M20	YYRADDAN	Collagen alpha-1(I) chain	8.38
I10	SLLDELES	Paxillin	8.33
D24	REEMGKGY	Carbonic anhydrase, chloroplast [Precursor]	8.27
G16	LLKDFLKK	Pepsin A [Precursor]	8.27
J21	LRNRAQSG	Coagulation factor VIII	8.23
J14	DLMDGLPP	Catenin beta-1	8.11
O2	LESDYFGK	Interleukin-18	8.07
B23	RVKRYRQS	ADM [Precursor]	8
D4	TVADGLKK	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase	7.86
B3	EFKRELTG	Corticotropin-lipotropin [Precursor]	7.81
N11	VKRRVQDV	Integrin alpha-9	7.73
A4	RGARARLG	Somatoliberin	7.69
F3	LAGGLMVG	Hexon-associated protein [Precursor]	7.69
C1	GPQGLLGA	Collagen alpha-2(I) chain [Precursor]	7.65
H3	RNKRAVQG	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 13B	7.6
M7	GLQRALEI	Complement C4-A	7.5
M16	RSRREADK	Beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase lunatic fringe	7.5
D8	GLARSNLD	Complement C3 [Precursor]	7.46
E13	EAGRNAQV	Cohesin subunit rad21	7.35

D5	ALADSLGK	Calpastatin	7
F16	DEIDHAEM	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4	7
O8	EISRKRRS	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase delta	7
N1	LDRRGIQR	Coagulation factor V	6.92
G4	TEIDGRSI	Nucleolin	6.87
K4	QSPRSFQK	Coagulation factor VIII	6.85
D17	QIDRIMEK	Synaptosomal-associated protein 25	6.81
E6	LLERGVTA	Coagulation factor VII [Precursor]	6.78
L22	YLQASEKF	Capsid protein P40	6.74
K10	AEPDYGAL	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma 1	6.69
C10	QPVGINTS	Small inducible cytokine A7 [Precursor] (MCP-3)	6.68
B2	KPVGKKRR	Corticotropin-lipotropin [Precursor]	6.64
I9	DGLPGLKG	Collagen alpha-3(IV) chain	6.62
K7	IEPRSFSQ	Coagulation factor VIII	6.59
O4	LSSDAPGV	cAMP response element-binding protein	6.59
E2	LTEDHLDL	Myocyte-specific enhancer factor 2D	6.56
D10	KPAPSPAA	IgA-specific serine endopeptidase [Precursor]	6.5
G18	DLKDHMRE	Splicing factor, arginine/serine-rich 1	6.46
G1	DNIDNLSP	Adenomatous polyposis coli protein	6.39
M8	GAQMGQPW	Lysosomal alpha-glucosidase	6.35
K17	LSPDLLTL	Erythroid transcription factor	6.33
D14	LLDRGATA	Coagulation factor VII [Precursor]	6.29
D19	PEDDGYFV	DNA topoisomerase 1	6.22
G11	YVKASELP	capsid assembly protein	6.07
O6	EPSRLQES	Double-strand-break repair protein rad21 homolog	6.05
K22	SEPDSPVF	Sterol regulatory element-binding protein 1	6

Zusätzlich zum Protease Substrat Test im 96well Format wurde ein Protease Profiling Microarray (JPT), der 1989 annotierte 8mere und 1536 zufällige generierte 15mere enthält, mit ProA (196mAnsonUnits 6,6µM Zinkchlorid) für 15h bei 37°C inkubiert. Die gespotteten Peptide sind mit Phosphotyrosin markiert, so dass die Auswertung hochspezifisch über Antiphosphotyrosinantikörper erfolgen kann. Bei 126 Peptiden betrug die Abnahme der Fluoreszenz mindestens 60% (Cleavage ≥ 60%). Mit diesen als Topsubstraten bezeichneten Peptiden wurden Analysen zur Spezifität der ProA durchgeführt. In Abbildung 4-35 a) ist die Verteilungsanalyse der in den Topsubstraten enthaltenen Aminosäuren graphisch dargestellt. Bei der Verteilungsanalyse wird das Vorkommen jeder Aminosäure in den Topsubstraten gezählt und mit dem entsprechenden Wert in der gesamten Peptidbibliothek verglichen. Wie zu erkennen ist, kommen kleine aliphatische Aminosäuren, wie Ala-

nin, Glycin, Leucin und Valin mehr als zweimal wahrscheinlicher in Substraten der ProA vor. Ebenfalls häufiger in den Topsubstraten befinden sich die Aminosäuren Serin, Arginin und Prolin.

a)



b)

motif	frequency
111	19
6x11	19
676	17
1x16	17
611	16
11x6	16
116	15
151	15
1x11	15
115	14
661	14
11x1	14
11xxx1	14
1x1x1	14

[1]=[A,P,G] 1=kleine AA
[2]=[C,M,N] 2 = Schwefel in Seitenkette
[3]=[D,E,Q] 3=sauer
[4]=[F,Y,W] 4=aromatisch
[5]=[R,K,H] 5=basisch
[6]=[I,V,L] 6=aliphatisch, hydrophob
[7]=[S,T] 7=polar, OH in Seitenkette
x=any aa

Abbildung 4-35: **Auswertung Protease-Substrat-Assay.** a)Verteilungsanalyse der in den Topsubstraten enthaltenen AS graphisch dargestellt. Bei der Verteilungsanalyse wird das Vorkommen jeder Aminosäure in den Topsubstraten gezählt und mit dem entsprechenden Wert in der gesamten Library verglichen. b) Patternanalyse der Topsubstrate. Bei der Pattern-Analyse werden die Aminosäuren "geclustert" und nach dem Vorkommen von entsprechenden Motiven geschaut.

Abbildung 4-35 b) zeigt das Ergebnis einer Pattern-Analyse der Topsubstrate. Bei der Pattern-Analyse werden die Aminosäuren "geclustert" und nach dem Vorkommen von entsprechenden Motiven geschaut. Das Motiv 111 kommt z.B. 19-mal unter den Top-Substraten vor. Das heißt, dass eine putative Konsensussequenz für die Schnittstelle von ProA drei kleine Aminosäuren (A,P,G) beinhaltet.

Es ist zu erkennen, dass neben aliphatischen und kleinen AS besonders häufig Arginin und Serin in den Sequenzen vorhanden sind.

4.4.5 Identifizierung putativer Schnittstellen von ProA im C-terminalen Bereich der sekretierten Phospholipase PlaC mittels eines Peptid-Micro-Arrays

Untersuchungen von Banerji et al. haben gezeigt, dass die von *L.pn.* sekretierte Phospholipase A PlaC neben PLA-, LPLA- und Lipaseaktivität auch eine Glycerophospholipid:Cholesterol–Acyltransferaseaktivität (GCAT) besitzt (Banerji, Bewersdorff et al. 2005). Weiterhin wurde gezeigt, dass die GCAT-Aktivität einer Aktivierung bedarf, die entweder direkt oder indirekt von der proteolytischen Aktivität der Zinkmetalloprotease ProA abhängt. Lang, Rastew, Hermes und Siegbrecht et al. konnten zeigen, dass ProA direkt die GCAT-Aktivität von PlaC aktiviert (Lang C. 2011). Die für die GCAT-Aktivität von PlaC essentiellen katalytischen Aminosäuren Serin, Aspartat und Histidin bilden eine katalytische Triade und befinden sich in konservierten Blocks. Dabei ist das nukleophile Serin im Block I im N-terminalen Bereich des Proteins lokalisiert. Im Gegensatz dazu befinden sich das katalytisch aktive Aspartat und das Histidin im Block V, im C-terminalen Bereich von PlaC. Der Austausch der katalytischen Aminosäuren führte zum vollständigen Verlust der GCAT-Aktivität von PlaC (Lang C. 2011). Um die Aktivierung von PlaC durch die Zinkmetalloprotease ProA weiter zu spezifizieren wäre es von großem Nutzen zu wissen, wie oft und an welchen Positionen PlaC durch ProA prozessiert wird. Massenspektrometrische Analysen eines kombinierten Trypsin/ProA-Verdaus von denaturierter PlaC lieferten fundierte Hinweise darauf, dass PlaC, ins besondere im C-terminalen Bereich, mehrmals durch ProA proteolytisch gespalten wird (Dissertation E. Rastew). Eine Möglichkeit diese Schnittstellen zu verifizieren bzw. neue zu identifizieren stellt die Verwendung von Peptide-Microarrays dar. Auf einen solchen Array sind markierte überlappende Peptide des putativen Substrats über einen Linker kovalent an die Glasoberfläche gebunden. Durch Inkubation des Arrays mit der entsprechenden Protease werden die Peptide, die eine Schnittstelle aufweisen proteolytisch gespalten. Die Spaltung der einzelnen Peptide wird mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper gemessen und kann somit quantifiziert werden. Dadurch, dass die Peptide überlappende Bereiche besitzen kann die genaue Schnittstelle der Protease bestimmt werden. Zur Identifizierung der genauen Schnittstelle bzw. Schnittstellen und

damit möglichen Aktivierungs-Sites von PlaC durch ProA wurde ein solches Peptide-Microarray-Experiment durchgeführt. Da wie die massenspektrometrischen Analysen zeigten, die Aktivierung mit hoher Wahrscheinlichkeit im C-terminalen Bereich von PlaC stattfindet, wurde zunächst der Bereich von Aminosäuren 300-433 als Bibliothek überlappenden oktamerer markierter Peptide synthetisiert und als Array gespottet. Die Überlappung der einzelnen Peptide betrug dabei 5 Aminosäuren. Der PlaC-Peptide-Microarray wurde mit rekombinant gereinigter ProA (196mAnson-Units) von *L.pn.m*130b unter Zinksupplementation (6µM) für 15h bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde ein identischer Chip unter gleichen Reaktionsbedingungen mit BSA (10mg/ml) inkubiert. Nach der Inkubation wurden beide Chips mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper ausgelesen. Um die verschiedenen Hintergrundsignale zu berücksichtigen wurde die Analyse der Spots einmal mit großen Spotdurchmessern und einmal mit kleinen Spotdurchmessern durchgeführt. Über das Verhältnis der Signalintensitäten der identischen Peptide, von dem mit BSA (Negativkontrolle) inkubierten Chip zu dem mit ProA inkubierten, lässt sich eine Cleavage-Rate für die einzelnen Peptide erstellen. Je höher dieses Verhältnis (>1) ist umso wahrscheinlicher ist eine proteolytische Degradation des Peptids durch ProA. Durch die Verwendung unterschiedlich großer Spotdurchmesser weichen die Cleavageraten der einzelnen Peptide bezüglich der Auswertemethode voneinander ab.

Abbildung 4-36 zeigt die Ergebnisse des PlaC-Peptid-Microarrays. In der Tabelle sind die Peptide mit einer positiven Cleavagerate, also durch die ProA proteolytisch gespalten wurden, aufgeführt. Anhand der Rangliste (hohe Cleavage-Raten) lässt sich die Wahrscheinlichkeit der Spaltung durch ProA ablesen. Wie schon erwähnt gibt es in Abhängigkeit der Auswertungsmethode Unterschiede in den Cleavage-Raten der einzelnen Peptide. Wie zu sehen ist, werden bei der Auswertung mit kleinem Spotdurchmesser weniger Peptide mit positiver Cleavage-Rate detektiert. Alle Peptide, die bei der Auswertung mit kleinem Spotdurchmesser identifiziert wurden, finden sich auch in der Liste der Peptide mit positiver Cleavage-Rate, bei Auswertung mit großem Spotdurchmesser. Unter den in der Tabelle aufgeführten Peptiden befinden sich, wie erwartet, viele überlappende Peptide. Durch grafische Auswertung dieser, ist die Bestimmung der putativen Schnittstelle von ProA möglich. Abbildung 4-36 B) zeigt diese grafische Auswertung mit den putativen Schnittstellen.

Die Peptide mit dem Index 21-23 zeigten mit beiden Auswertungsmethoden hohe Cleavage-Raten. Durch die Überlappung dieser konnte die genaue Schnittstelle zwischen Glutamin (Gln366) und Tyrosin (Tyr367) identifiziert werden. Die Peptide 5 und 6 wurden ebenfalls mit beiden Analysemethoden als Substrate von ProA identifiziert. Da kein zusätzliches überlappendes Peptid als Substrat identifiziert wurde, kann die Schnittstelle nur auf vier AS genau eingegrenzt werden. Am wahrscheinlichsten ist jedoch die Spaltung zwischen Phenylalanin (Phe317) und Valin (Val318), da wie erwähnt keine weiteren überlappenden Peptide als Substrat identifiziert wurden. Berücksichtigt man nur die Auswertung mit großem Spotdurchmesser, lassen sich zwei weitere Peptidpaare mit den entsprechenden putativen Schnittstellen der ProA bilden. Auch bei diesen ist die konkrete Angabe der Schnittstelle aufgrund fehlender weiterer überlappender Peptide nicht möglich. Wahrscheinlich ist beim Peptidpaar 26 und 27 jedoch die Spaltung zwischen Prolin (Pro380) und Glycin (Gly381) und beim Peptidpaar 11 und 12 zwischen Tyrosin (Tyr334) und Glycin (Gly335) erfolgt. In Abbildung 4-36 C) sind die identifizierten putativen Schnittstellen von ProA in der Proteinsequenz von PlaC abgebildet. Alle diese Schnittstellen befinden sich vor den katalytisch aktiven Asp398 und His401. Mittels des PlaC-Peptide-Microarrays konnte Gln366 /Tyr367 eindeutig als Schnittstelle von ProA im C-terminalen Bereich von PlaC definiert werden. Damit konnten die massenspektrometrischen Ergebnisse, diese Stelle betreffend, verifiziert werden.

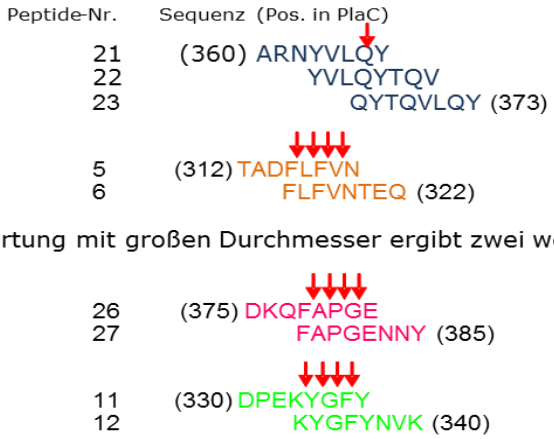
Weiterführende Experimente von Lang et al. bestätigten die Aktivierung von PlaC durch ProA im C-terminalen Bereich, zeigten aber auch, dass eine Prozessierung durch ProA an einer definierten Stelle nicht notwendig ist, um die GCAT von PlaC zu aktivieren. Stattdessen ist für die Aktivierung die Deletion eines Loops zwischen den Cyteinen, Cys343 und Cys388 durch ProA notwendig (Lang C. 2011).

A)

großer Spotdurchmesser			kleiner Spotdurchmesser		
Index	Peptid	Cleavage-Rate %	Index	Peptid	Cleavage-Rate (%)
21	ARNYVLQY	61.23	22	YVLQYTQV	65.98
22	YVLQYTQV	58.89	17	FPMFNAFI	52.38
27	FAPGENNY	58.35	5	TADFLFVN	28.04
12	KYGFYNVK	54.72	6	FLFVNTEQ	19.89
17	FPMFNAFI	46.6	23	QYTQVLQY	11.55
11	DPEKYGFY	46.46			
5	TADFLFVN	37.06			
26	DKQFAPGE	35.97			
6	FLFVNTEQ	8.73			
1	AKRIDAWK	5.6			
23	QYTQVLQY	3.69			

B)

Putative Schnittstellen (↓) mit beiden Auswertungsmethoden (gr. und kl. Durchmesser)



Auswertung mit großen Durchmesser ergibt zwei weitere putative Schnittstellen

C)

```
  1 miqnnricrw lfivllslpl vgftsipvks ivvfgdslsd ngntthllks lrqeedpafl
 61 vapfkifvin kmiefandyy vpqmvldagi savtdffdhd lapylanlvg kvkqvpvlpg
121 kpywknrfsn grvwieylae mlsiqksdee vylnkafggs wsatydyqlt vwnlirhplg
181 tiknlivgkl ippslglivq aylleheqls detlyfiysg sndyinvlff ednyntevms
241 tyidnvldgt ssavlklana garrfvimgi phvgdtpkfv kttdrdvlna avdlhnerla
301 kridawkery ptadflfvnt eqylkkafed pekygfynvk daCidvkfpm fnafihspfa
361 rnyvlqytqv lqyrdkqfap gennyhmCse pedylfwdei hpttrahnyl ayevCmalee
421 hgyevtCkmp esa
```

Abbildung 4-36: **Auswertung des PlaC-Peptide-Microarrays** mit Darstellung der ProA spezifischen Schnittstellen in der *L.pn.* 130b PlaC-Proteinsequenz. A) Die Tabelle zeigt eine Gegenüberstellung der Auswertung mittels großem und kleinem Spotdurchmesser. Die Peptide sind entsprechend ihrer Cleavage-Raten angeordnet. Dabei wurden nur Peptide mit positiven Werten berücksichtigt. B) Grafische Auswertung der Ergebnisse aus der Tabelle A) mit Darstellung der putativen Schnittstellen. C) Identifizierte putative Schnittstellen in der Proteinsequenz von PlaC.

5 Diskussion

5.1 Screening der Genbank von *L.pn.* Philadelphia-1 in *E.coli*

Um neue Gene mit hydrolytischen Eigenschaften des Lungenpathogens *L.pn.* Phil-1 zu identifizieren, wurde eine Genbibliothek von *L.pn.* Phil-1 in *E.coli* hergestellt. Diese umfasst insgesamt 4896 Klone, was einer Chromosomabdeckung von *L.pn.* Phil-1 von 99% entspricht. Die so erzeugte Genbank wurde anschließend auf Blut-, Casein- und Eigelbagar gescreent. Durch die heterologe Expression in *E. coli*, sollten so hämolytische, proteolytische sowie lipolytische Gene von *L.pn.* Phil-1 identifiziert werden. Um zu verifizieren, dass mit Hilfe dieses Screeningsystem entsprechende Gene von *L.pn.* Phil-1 identifiziert werden können, wurde zunächst nur ein Teil (960 Klone von 4896 Klonen) der Klone untersucht. Von den 960 gescreenten Klonen waren 601 hämolytisch aktiv. Nur bei einem der gescreenten Klone (P3H12) konnte eine proteolytische Aktivität festgestellt werden. Derselbe Klon zeigte auch hämolytische Aktivität auf Blut-Agar. Durch Analyse des Klons bezüglich des Chromosomabschnitts von *L.pn.* Phil, welcher in diesem Klon *in trans* exprimiert wurde, konnte ein 6,6kb großes Fragment identifiziert werden, welches auch das Gen für die sekretierte Zinkmetalloprotease ProA enthielt. Dieses Ergebnis zeigt, dass es prinzipiell möglich ist, proteolytische Faktoren von *L.pn.* Phila-1 mit Hilfe des benutzten Screeningverfahrens zu identifizieren. Die geringe Anzahl der proteolytisch aktiven *E.coli* Klone deutet jedoch darauf hin, dass die heterologe Expression von *L.pn.* Phil-1 Genen in *E.coli* nicht optimal ist. Es ist möglich, dass die heterolog exprimierten Proteine in Inclusionbodies eingeschlossen werden und somit nicht mehr aktiv sind. Proteine die durch andere *Legionella* spezifische Faktoren erst aktiviert werden müssen, können mit diesem System ebenfalls nicht identifiziert werden. Die Suche nach lipolytisch aktiven *E.coli* Klonen der Genbank blieb beim Screening der 960 Klone ohne Erfolg. Bei keinem der gescreenten Klone konnte ein opaleszentes Präzipitat um die Kolonie und somit lipolytische Aktivität festgestellt werden. Nur der als Positivkontrolle benutzte *E.coli* Klon, der das Gen für die Phosholipase (PlaB) *in trans* trägt, zeigte eine lipolytische Aktivität auf dem Eigelb-Agar. Da sich PlaB durch eine sehr starke Aktivität auszeichnet (Bender, Rydzewski et al. 2009), könnte es sein, dass die Aktivität anderer heterolog exprimierter lipolytisch aktiver Proteine nicht ausreichte, um mit diesem Screeningsystem detektiert zu wer-

den. Die oben aufgeführten Gründe für die geringe Anzahl an proteolytischen Klonen, kommen auch für das Fehlen lipolytischer Klone in Betracht. Dem gegenüber steht die große Anzahl hämolytischer Klone. Um zu klären, welche Gene von *Legionella* in den *E.coli* Klonen diese Hämolyse hervorgerufen haben, wurde begonnen mittels Sequenzierung der Plasmide der entsprechenden hämolytischen Klone, die Chromosomenabschnitte mit den darauf befindlichen putativen Genen zu bestimmen (s.Tabelle 4-2). Insgesamt wurden 51 hämolytische Klone untersucht. Beim Großteil der identifizierten Gene handelt es sich um Gene, die für membranassozierte Proteine kodieren. Diese könnten durch Integration und Porenbildung in der Erythrozytenmembran, ähnlich den bakteriellen RTX-Toxinen, zur Lyse dieser geführt haben (Welch 1991). Neben der Porenbildung als Ursache für die hämolytische Aktivität, wäre es auch möglich, dass membranassoziierte Proteine die Membranintegrität der Erythrozyten so stark beeinflussen, dass diese lysieren. Neben den membranassoziierten Proteinen sind auch eine Reihe von Proteinen mit putativer hydrolytischer Funktion wie z.B. Proteasen, Phosphatasen oder Dehydrogenasen in den *E.coli* Klonen gefunden worden. Diese könnten durch ihre enzymatische Aktivität Bestandteile der Erythrozytenmembran hydrolysiert haben und so den Hämolysehof um die Kolonie hervorgerufen haben. Eine genaue Zuordnung der hämolytischen Aktivität zu einem bestimmten Gen von *L.pn.* Phil-1 war aufgrund der erwähnten Tatsache, dass im Durchschnitt drei *Legionella*-Gene in einem *E.coli* Klon exprimiert wurden, ohne erheblichen Zeitaufwand nicht möglich. Aufgrund der hohen Anzahl der hämolytisch aktiven Klone und der Schwierigkeit proteolytisch und lipolytisch aktive Proteine von *L.pn.* Phil-1 über die heterologe Expression in *E.coli* zu identifizieren, wurden keine weiteren Klone der *E.coli* Klonbank gescreent. Es wurde beschlossen, das Screening mit einer Transposon(EzTn5) - mutagenisierten Genbank von *L.pn.* Phil-1 fortzuführen.

5.2 Screening einer EzTn5-mutagenisierten *L.pn.* Philadelphia-1 Genbank

Ein weiterer Ansatz zur Identifizierung von Genen, die für hydrolyseassoziierte Proteine kodieren, bestand im Screening einer EzTn5-mutagenisierten Genbank von *L.pn.* Phil-1. Einer der wesentlichen Vorteile einer solchen Insertionsmutationsbank besteht darin, dass neben hydrolytisch aktiven Proteinen auch regulatorisch wirkende Gene und deren Proteine identifiziert werden können. Darüber

hinaus können auch solche Proteine identifiziert werden, die für ihre Aktivität posttranslational durch *Legionella* eigene Faktoren aktiviert werden müssen, was für viele hydrolytische Proteine zum Schutz des Bakteriums wichtig ist. Ein Nachteil beim Screening einer Transposon mutagenisierten Genbank besteht darin, dass obligatorisch essentielle Gene nicht identifiziert werden können. Die Mutation dieser Gene ist ohne eine entsprechende Supplementation für den Organismus letal. Eine hohe Redundanz von Proteinen, wie sie bei den putativen lipolytischen Proteinen von *L.pn.* Phila-1 vorhanden ist (Banerji, Aurass et al. 2008; Lang and Flieger 2011) führt mitunter dazu, dass beim Screening einer solchen Genbank, Gene die für lipolytisch aktive Proteine kodieren nicht gefunden werden, da die fehlende Aktivität von anderen lipolytisch wirkenden Proteinen kompensiert wird. Die in dieser Arbeit verwendete Genbank umfasste 7300 Klone. Die Analyse der Insertionsstellen des Transposons zeigte, dass diese relativ gleichmäßig über das gesamte Genom verteilt sind (s.Abbildung 4-6). Um die Genbank in Hinblick auf hydrolyseassoziierte Gene auf den drei Screeningmedien (Blut-, Casein,- und Eigelbagar) zu testen, mussten die Klone zunächst vereinzelt werden. Anschließend wurden diese auf hämolytische, proteolytische und lipolytische Aktivität hin gescreent. Im Gegensatz zum Screening mit der Expressionsbank in *E.coli* wurden dabei vor allem Klone mit reduzierter Aktivität gesucht. Als Referenz wurde auf jeder der Screeningplatten *L.pn.* Phil-1 Wildtyp mitgeführt. In einem Screeningansatz wurden 648 Klone untersucht. Insgesamt konnte bei 46 Mutanten eine Reduktion in mindestens einer der gescreenten Aktivitäten festgestellt werden. 22 dieser Mutanten wiesen einen expliziten Defekt in der Hämolyse auf. Der Anteil der Mutanten, die nur einen lipolytischen oder proteolytischen Defekt aufwiesen fiel mit vier bzw. zwei Mutanten gering aus. Wie zu erwarten war, gab es Mutanten, die in mehr als einer Aktivität eine Reduktion aufwiesen. Bei 10 dieser Mutanten war ein Defekt in der Hämolyse mit einer Reduktion der lipolytischen Aktivität assoziiert. Dieses war zu erwarten, da viele lipolytisch aktive Proteine auch in der Lage sind Erythrozyten zu zerstören und so eine Hämolyse hervorzurufen (Rossignol, Merieau et al. 2008; Bender, Rydzewski et al. 2009; Chaves-Moreira, Chaim et al. 2009). Ursache der Hämolyse ist dabei häufig die Hydrolyse der Membranlipide und die daraus resultierende Degeneration der Zellmembran. Bei zwei Mutanten führte die Transposoninsertion neben der Reduktion der Hämolyse auch zur Reduktion der Proteolyse auf Caseinagar.

Auch hier lässt sich der hämolytische Effekt mit dem proteolytischen in Korrelation bringen. Durch die Proteolyse von Membranproteinen kann die Membranintegrität derart geschädigt sein, dass es zur Lyse des Erythrozyten kommt. Als Beispiele für Proteasen mit hämolytischer Aktivität sei hier auf die Elastase von *Pseudomonas aeruginosa* oder die HA/Protease (Vibriolysin) von *Vibrio cholerae* hingewiesen (Bergan 1981; Hase and Finkelstein 1990). Fünf der 46 Mutanten mit reduzierter Aktivität wiesen auf allen drei Screeningmedien einen kleineren Hof als der Wildtyp auf. In einer dieser Mutanten (P6C5) konnte das Transposon im Gen für die Zinkmetalloprotease ProA lokalisiert werden. Frühere Untersuchungen bestätigen, dass eine Mutation von *proA* zur Reduktion der Hämolyse, Lipolyse und Proteolyse führt (Flieger, Neumeister et al. 2002). Das Transposon wurde in den anderen vier Klonen in zwei Genen, die für hypothetische Proteine kodieren, in einem Gen was für ein Protein des Aminosäuremetabolismus kodiert und in einem Gen für die LPS-Synthese lokalisiert. Vermutlich erfüllen die hypothetischen Proteine und das Protein für den Aminosäuremetabolismus regulatorische Funktionen und führen so zu einer Reduktion aller drei Aktivitäten. Inwiefern eine Mutation in einem Gen für die LPS-Synthese Einfluss auf die hämolytische, proteolytische und lipolytische Aktivität hat, bedarf weiterer Untersuchungen. Neben Mutanten mit reduzierter Aktivität, konnten auch neun Mutanten mit erhöhter Aktivität auf dem Blutagar identifiziert werden. Unter diesen befinden sich vier (P4D1(*sdhB*-); P6C6(*sdhA*-); P17C2(*legL2-);* P4C5(*legLC8*-), die die Mutation in Genen, die für Substrate des TypIVB Sekretionssystems von *L.pn.* kodieren tragen. Bisher konnte keinem der bekannten TypIVB Sekretionssystems-Substrate ein hydrolytischer Effekt zugeordnet werden. Untersuchungen zeigten auch, dass vermutlich eine hohe funktionale Redundanz bei den Substraten vorhanden ist (Luo and Isberg 2004; Ensminger and Isberg 2009). Somit könnte man die erhöhte Aktivität der Mutanten damit erklären, dass sich durch die Mutation eines Substrates bzw. Effektors des TypIVB Sekretionssystems, das Expressionsmuster der anderen verändert. Die Lokalisation der Transposoninsertion war bei 53 der 55 Mutanten mit veränderter Aktivität erfolgreich. Dabei zeigte sich, dass das Transposon jeweils nur einmal in das Genom des entsprechenden Klons insertiert ist. Mit Hilfe der genauen Insertionsorte konnten weitere Aussagen über das Screeningsystem und die identifizierten Mutanten getroffen werden. So zeigte eine *in silico* Analyse zur subzellulären Lokalisation der identifizierten Pro-

teine, dass der Großteil (64%) putativ zytoplasmatisch lokalisiert ist. Die restlichen 36% sind entweder sekretiert oder membranassoziiert. Dieses Ergebnis entspricht nicht ganz der Erwartung, mit dem Screeningsystem vor allem sekretierte und membranassozierte Proteine zu identifizieren. Unter den zytoplasmatisch lokalisierten finden sich vor allem hypothetische und regulatorische Proteine. Vermutlich besitzt ein Großteil dieser hypothetischen Proteine ebenfalls regulatorische Funktionen. Die Verifizierung dieser These bedarf jedoch weiterer Untersuchungen. Unter den putativ zytoplasmatischen Proteinen finden sich auch Proteine, die durch Experimente bereits als Effektoren des TypIVB Sekretionssystems identifiziert wurden und somit sekretiert sind. Dies zeigt, dass *in silico* Analysen lediglich Anhaltspunkte darstellen können, die aber in jedem Fall einer experimentellen Verifizierung bedürfen, denn viele Sekretionssignale, z.B. für das TypIVB Sekretionssystem, sind noch nicht genau definiert. Neben vielen hypothetischen Proteinen wurden auch Proteine gefunden, denen anhand von Blast-Analysen und phylogenetischer Klassifizierung putative Funktionen zugewiesen werden konnten. Bereits bekannte Lipasen, die auch hämolytische Aktivität aufweisen oder bekannte Hämolysine von *L.pn.* Phil-1, wie z.B. Legiolysin (Wintermeyer, Rdest et al. 1991) wurden während des Screening nicht gefunden. Dies mag zum einen an der Zahl der vorerst gescreenten Klone liegen, die noch keine vollständige Abdeckung des gesamten Genoms darstellt. Zum anderen könnte es das Resultat von bereits erwähnter Kompensation von Aktivitäten sein. Die hohe Anzahl putativer lipolytischer Proteine im Genom von *L.pn.* Phil-1, die durch Blast-Analysen identifiziert wurden, lässt auf redundante Aktivitäten schließen. Mutationen in einzelnen Genen, die lipolytisch aktive Proteine kodieren, können dann nicht mehr identifiziert werden. Diesem Schwachpunkt steht jedoch der große Vorteil gegenüber, synergistische und regulatorische Effekte auf das Hydrolysom bzw. die dem zu Grunde liegenden Gene zu identifizieren. Solche indirekten Effekte können z.B. auftreten, wenn einzelne Gene einer Transkriptionseinheit durch EzTn5-Insertion mutiert sind. Durch die Mutation wird dann unter Umständen die Transkription und Expression hydrolytischer Gene beeinflusst. Durch diese polaren Effekte lassen sich ganze Operonstrukturen mit Bedeutung für das Hydrolysom von *L.pn.* Phil-1 identifizieren.

Im Vergleich zum Screening der Expressionsbank in *E.coli* lässt sich schlussfolgern, dass für das in dieser Arbeit eingesetzte Screeningverfahren eine Inserti-

onsmutationsbank des Organismus (in diesem Fall die EzTn5-Genbank von *L.pn.* Phil-1) klar zu bevorzugen ist. Das Screeningsystem als solches, stellt eine gute Methode dar, Gene mit Einfluss auf das Hydrolysom eines Bakteriums zu identifizieren. Einzig das Screeningmedium für die lipolytische Aktivität bedarf der Optimierung, da die Aktivität auf dem eingesetzten Eigelbagar nur schwer zu quantifizieren war und erst nach längerer Inkubation bei RT zu erkennen war.

5.3 Quantifizierung der hämolytischen und lipolytischen Aktivität

Um die Phänotypen der 55 Mutanten, die auf den Screeningmedien eine gegenüber dem Wildtyp veränderte Aktivität aufwiesen, zu bestätigen und zu quantifizieren, wurden diese in weiteren Assays untersucht. Alle 55 Mutanten wurden hinsichtlich ihrer hämolytischen Aktivität in einem quantitativen Hämolyseassay untersucht. Bei 33 der 55 untersuchten Mutanten konnte der hämolytische Phänotyp, welcher auf den *Legionella* Blut-Agar beobachtet wurde, bestätigt werden. Zwei der Mutanten [P7B1=Δ*lpg2971*::Tn5);P7B3=Δ*lpg0483*::Tn5)], die optisch auf dem Blutagar keine Reduktion der hämolytischen Aktivität aufwiesen, sondern im Falle von P7B1 eher eine stärkere Hämolyse und im Falle von P7B3 eine Reduktion der lipolytischen Aktivität in Bezug auf den Wildtyp zeigten, konnten mittels des quantitativen Assay auch als weniger hämolytisch im Vergleich zum Wildtyp identifiziert werden. Eine unterschiedliche Regulierung der Genexpression bei Wachstum im Flüssigmedium könnte diese Differenz hervorgerufen haben. Dem gegenüber stehen 17 Mutanten, bei denen der zunächst vermutete hämolytische Defekt im quantitativen Assay nicht bestätigt werden konnte. Dies könnte zum einen daran liegen, dass die optische Beurteilung des Hämolysehofes ein subjektives Verfahren mit einer hohen Fehlerquelle darstellt. Zum anderen könnten die Differenzen auch durch die bereits oben erwähnten unterschiedlichen Wachstumsbedingungen hervorgerufen worden sein. Da im quantitativen Hämolyseassay Bakterien einer definierten Wachstumsphase, in diesem Fall der spätlogarithmischen einsetzt werden, können Effekte wie Lyse der Bakterien und damit verbundene Freisetzung von hämolytisch aktiven Faktoren besser kontrolliert werden, als beim Wachstum auf Festmedien. Die Auswertung des quantitativen Hämolyseassays zeigt, dass das Screening nach Faktoren mit Einfluss auf die Hämolyse auf Blutagar als schnelle und einfache Methode, um gleichzeitig eine Vielzahl von Mutanten zu untersuchen, geeignet ist. Dennoch ist es zu empfehlen die Phänotypen im quantitativen Hämolyseassay zu bestätigen. Gleiches gilt für

die lipolytische Aktivität. Wie schon erwähnt, war die Auswertung des Screenings hinsichtlich der lipolytischen Aktivität der Klone auf dem Eigelbagar aufgrund des nur schwer zu erkennenden opaleszenten Ringes um die Kolonie und der langen Inkubationszeit schwieriger als mit dem Blut- und Caseinagar. Deshalb war es besonders wichtig die Mutanten, die optisch eine geringere Aktivität auf dem Eigelbagar im Gegensatz zum Wildtyp aufwiesen, genauer zu untersuchen. Mit dem in unserem Labor verwendeten Lipidhydrolyse-Assay, kann neben der Aussage der lipolytischen Aktivität, diese auch auf Substratspezifität und teilweise Lokalisation hin untersucht werden. Da Phosphatidylcholin (PC) ein Hauptbestandteil von Eigelb ist, lag es nahe dieses als Substrat einzusetzen. Um die Mutanten auf eventuelle Defekte in der lysophospholipolytischen Aktivität hin zu untersuchen, wurde LPC ebenfalls als Substrat mitgeführt. Durch den Einsatz von Zelllysat und Kulturüberstand konnte untersucht werden, ob sich die Mutation auf die zellassoziierte oder die sekretierte lipolytische Aktivität von *L.pn.* Phil-1 auswirkt. Mit Ausnahme der Mutanten (P11B3=Δ*lpg2911*::Tn5; P16D1= betroffenes Gen nicht identifiziert; P26A3=Δ*lpg1366*::Tn5) wurde der Defekt in der lipolytischen Aktivität der anderen 14 Mutanten bestätigt. Dass dies bei den drei erwähnten Mutanten nicht der Fall war, könnte die bereits bei der Hämolyse erwähnten Ursachen haben. Darüber hinaus ist es denkbar, dass der lipolytische Effekt auf andere Substrate zurückzuführen ist. Die Auswertung des Lipidhydrolyse-Assay zeigte, dass sich die Reduktion der lipolytischen Aktivität vor allem im Kulturüberstand wiederfindet. Keine der untersuchten Mutanten wies einen speziell zellassozierten lipolytischen Defekt auf. Bei vier der Mutanten (P7B3=Δ*lpg0483*::Tn5; P7D6=Δ*lpg1588*::Tn5; P8A1=Δ*lpg1831*::Tn5; P23D3=Δ*lpg0226*) konnte eine Reduktion der lipolytischen Aktivität sowohl im Zelllysat als auch im Kulturüberstand festgestellt werden. Wie erwartet war vor allem die phospholipolytische Aktivität der Mutanten reduziert. Erstaunlicherweise ging mit der Reduktion dieser häufig eine Erhöhung der lysophospholipolytischen Aktivität einher. Dieselbe Beobachtung wurde mit regulatorischen *L.pn.* Mutanten, in denen entweder *rpoS* oder *letA* ausgeknockt bzw. inhibiert wurde, von Broich et al. beschrieben (Broich, Rydzewski et al. 2006). Somit ist zu vermuten, dass in den Mutanten, mit reduzierter PLA-Aktivität und gleichzeitig erhöhter LPLA-Aktivität ein bisher unbekanntes Gen ausgeknockt wurde, welches einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Regulation der lipolytischen Aktivität von *L.pn.* aufweist. Dass die

Ergebnisse des Lipid-Hydrolyse-Assays, die Phänotypen der Mutanten auf dem Eigelbagar gut verifizieren zeigt, dass das Screeningsystem zum Auffinden von Genen von *L.pn.* Philadelpiha-1 mit Einfluss auf die hämolytische, lipolytische und proteolytische Aktivität geeignet ist.

5.4 Korrelation zwischen hydrolytischem Phänotyp der Mutanten und der Kolonisationsfähigkeit in *Acanthamobaea castellanii*

Hämolytische, lipolytische und proteolytische Faktoren sind als bakterielle Virulenzfaktoren vielfältig beschrieben (Finlay and Falkow 1997). Um ihre Virulenz vollständig zu entfalten, unterliegen diese Faktoren fast immer einer strikten Regulation. Daher sind neben den eigentlichen Effektoren, Faktoren die diese Virulenzfaktoren regulieren ebenfalls von wichtiger Bedeutung für die Pathogenität dieser Organismen. Dementsprechend bestand das Ziel dieser Arbeit nicht nur im Auffinden von Genen, die mit Hämolyse, Proteolyse und Lipolyse assoziiert sind, sondern darüber hinaus sollte untersucht werden, inwiefern die identifizierten Gene einen Einfluss auf die Virulenz von *L.pn.* besitzen. Für die Pathogenität von *L.pn*. und vielen anderen pathogenen Bakterien, stellt die Fähigkeit zur intrazellulären Vermehrung in einer Wirtszelle eine essentielle Eigenschaft dar (Garcia-del Portillo and Finlay 1995). Legionellen können sich in einer Vielzahl von Einzellern vermehren (Palusinska-Szysz and Cendrowska-Pinkosz 2009). Durch die Anpassung an das intrazelluläre Wachstum in Einzellern wie z.B. Amöben und durch horizontalen Gentransfer mit eukaryotischen Wirten besitzten Legionellen ein großes Repertoire an Proteinen, die eine intrazelluläre Vermehrung in humanen Zellen ermöglichen (Newton, Ang et al. 2011). So können sich Legionellen der Spezies *L. pneumophila* in humanen Makrophagen und Epithelzellen replizieren, was entscheidend zur Pathogenität der Legionellen beiträgt. Viele Gene, für die bekannt ist, dass sie für die Kolonisation in Amöben wichtig sind, sind auch für die intrazelluläre Replikation in Makrophagen von großer Bedeutung (Cianciotto and Fields 1992; Polesky, Ross et al. 2001) Daher bietet ein Amöben-Infektionsmodell ein System, um den putativen Einfluss von Genen auf die Virulenz von *L.pn.* zu untersuchen. In Zusammenhang mit den Ergebnissen des Screening lassen sich so auch Zusammenhänge zwischen hydrolytischen Phänotypen der Mutanten und der Virulenz dieser erkennen.

Alle 55 Mutanten, die in mindestens einer der gescreenten Aktivitäten einen Unterschied zum Wildtyp aufwiesen wurden auch auf ihre Kolonisationsfähigkeit im

Amöbenmodell getestet. Die hohe Zahl dieser Mutanten (48%) war dabei in Bezug auf den Wildtyp attenuiert. Die Mutanten wurden als attenuiert eingestuft, wenn die Anzahl der CFU nach 72h das Fünffache des Inokulums nicht überstieg. Alle Mutanten mit höheren Vermehrungsraten wurden als replizierend eingestuft. Alle diese Mutanten wiesen auch den von Aurass et.al beschriebenen Scatterphänotyp auf, welcher einen Hinweis auf die Attenuierung der Legionellen in Amöben gibt (Aurass, Pless et al. 2009). In gut 50% der Fälle trifft es also zu, dass das mutierte Gen, welches einen Einfluss auf das Hydrolysom von *L.pn.* Phil-1 hat auch einen putativen Einfluss auf die Virulenz dieses Pathogens besitzt. Besonders prägnant ist der Zusammenhang zwischen Hämolyse und Kolonisationsfähigkeit. 18 der 27 im Amöbenmodell attenuierten Mutanten wiesen auch einen hämolytischen Defekt auf. Fünf attenuierte Mutanten waren auch in Bezug auf die lipolytische Aktivität reduziert. Bei den Mutanten P21A4 und P23D2, welche eine reduzierte hämolytische Aktivität aufweisen und im Amöbenmodell attenuiert sind, wurde das Transposon im selben Gen, jedoch an verschiedenen Positionen innerhalb dieses lokalisiert. Es handelt sich dabei um das Gen *lpg0275*. Dieses Gen kodiert für das Protein SdbA, welches als Typ IVB Sekretionssystem-Substrat bekannt ist. Kürzlich wurde von Bartfeld et al. gezeigt, dass SdbA eine Rolle bei der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB spielt (Bartfeld, Engels et al. 2009). Dabei wurde auch gezeigt, dass eine *sdbA*-Mutante einen Replikationsdefekt in A549 Lungenepithelzellen aufweist. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse mit den *sdbA*-Mutanten bestätigen die Bedeutung von SdbA bei der Replikation in eukaryotischen Zellen, speziell in Amöben und verknüpfen diese mit der durch Mutation von *sdbA* verursachten Reduktion der hämolytischen Aktivität von *L.pn.* Phil-1. Neben SdbA konnte bisher nur wenigen Typ IVB Sekretionssystem – Effektoren eine Rolle bei der intrazellulären Vermehrung von *L.pneumophila* zugewiesen werden. Eine Schwierigkeit, bei der Funktionsanalyse der Effektoren besteht auch darin, dass Effektoren wirtsspezifische Funktionen aufweisen können. So wurde durch Laguna et al. gezeigt, dass eine Mutation von *sdhA* sich zwar attenuierend bei der Replikation in Mausmakrophagen auswirkt, aber im Kolonisationsmodell mit der Amöbe, *Dictyostelium discoideum,* keinen Defekt in der Replikationsfähigkeit aufwies (Laguna, Creasey et al. 2006). Im Zuge des Screenings wurde auch in dieser Arbeit eine *sdhA*-Mutante identifiziert (P6C6=Δ*lpg0376*), welche auf Legionella-Blutagar eine erhöhte Aktivität aufwies,

die aber im quantitativen Hämolyseassay nicht bestätigt werden konnte. In der Koinfektion mit *A. castellanii* zeigte die *sdhA*-Mutante jedoch eine im Vergleich zum Wildtyp verminderte Vermehrungsfähigkeit. Dieses Ergebnis unterstreicht die wirtsspezifische Funktion von *sdhA* und lässt vermuten, dass diese Wirtsspezifität auf eine Vielzahl der Effektoren des Typ IVB Sekretionssystem zutrifft.
Die Ergebnisse des Screenings und des Amöben-Infektionsmodell stützen die These, dass viele nicht obligat essentielle Gene, die einen Einfluss auf das Hydrolysom eines pathogenen Bakteriums haben, auch mit der Virulenz des entsprechenden Organismus assoziiert sein können.

5.5 Auswahl der Mutanten zur weiteren Charakterisierung

Mit Hilfe der verwendeten Screeningsysteme und dem Amöbeninfektionsmodell konnten eine Reihe von Genen mit Einfluss auf das Hydrolysom von *L.pn.* Phil-1 und die Kolonisationsfähigkeit in Amöben identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier der identifizierten Mutanten ausgewählt, um die durch die mutierten Gene hervorgerufenen Phänotypen zu bestätigen und weiter zu analysieren. Die Auswahl erfolgte anhand der Phänotypen auf den Screeningmedien, der quantitativen Analyse der hämolytischen und lipolytischen Aktivität, der Replikationsfähigkeit in Amöben und nicht zuletzt anhand der Identifikation des betroffenen Gens.

5.6 *lpg2166* und sein Einfluss auf die Virulenz von *L. pneumophila*

In der zur weiteren Charakterisierung ausgewählte Mutante P5A1 war das Gen *lpg2166* durch die Insertion des EzTn5-Tansposons mutiert. Es kodiert für ein hypothetisches Protein. Durch RT-PCR konnte ein Transkript dieses ORF festgestellt werden, so dass davon auszugehen ist, dass ein funktionsfähiges Protein translatiert wird. Die Suche nach homologen pro- und eukaryotischen Proteinen (BLAST) lieferte nur Treffer mit einer Homologie kleiner 30%. Daher sind auf diesem Weg keine Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins zu erhalten. Durch *in silico* Analyse konnten zwei putative Coiled coil Regionen in Lpg2166 identifiziert werden. Coiled coil Motive sind oft bei Proteinen zu finden, die in multimerer Form vorkommen oder an Protein-Protein Interaktionen beteiligt sind (Parry, Fraser et al. 2008). Aufgrund des GC-Gehalts von 35,48%, welcher vom GC-Gehalt des Chromosoms von *L.pn.* Phila-1 abweicht, könnte es sich beim Gen *lpg2166* um ein Gen handeln, welches durch horizontalen Gentransfer akquiriert

wurde. Bei Betrachtung der genomischen Umgebung von *lpg2166* (s. Abbildung 4-14) ist davon auszugehen, dass dieses Gen eine unabhängige Transkriptionseinheit darstellt. Dies untermauern auch *in silico* Analysen, in denen keine Operonstruktur mit *lpg2166* festgestellt werden konnte. Lpg2166 befindet sich jedoch in einem genomischen Bereich, der durch eine Anhäufung von Genen die für Effektoren des Typ IVB- Sekretionssystems kodieren, charakterisiert ist. Diese Region umfasst in *L.pn.* Phil-1 die Gene von *lpg2137* bis *lpg2176*. Zu den bisher validierten Effektoren dieser genomischen Region zählen LegK2 (*lpg2137*), AnkB (*lpg2144*), SdeC (*lpg2153*), SidE(*lpg2154*), SidJ (*lpg2155*), SdeB (*lpg2156*), SdeA (*lpg2157*) und LegS2 (*lpg2176*) (Burstein, Zusman et al. 2009). Kürzlich konnte durch Burstein et.al auch Lpg2166 als Substrat des Typ IVB-Sekretionssystems identifiziert und bestätigt werden (Burstein, Zusman et al. 2009). Homologe von Lpg2166, die zu mindestens 98% der Aminosäuren übereinstimmen sind in allen sequenzierten Stämmen von *L.pneumophila* sowie in *L. longbeachae* vorhanden. Einzig im Genom von *L. drancourtii* existiert kein Homolog zu Lpg2166. Die hohe Konservierung lässt auf eine wichtige Funktion dieses Gens schließen. Das Fehlen bekannter lipolytischer bzw. hämolytischer Motive in der Sequenz von Lpg2166 lässt zwei Rückschlüsse auf die Funktion des kodierten Proteins zu. Entweder handelt es sich bei Lpg2166 um einen Typ IVB-Effektor mit einem bislang unbekannten Hämolysin-Motiv oder das Protein erfüllt eine regulatorische Funktion. Die letztere These wird durch die beiden coiled-coil Motive in Lpg2166 untermauert. Vermutlich reguliert Lpg2166 einen oder mehrere sekretierte hämolytische Faktoren mittels Protein-Protein-Interaktion. Um den Phänotyp, der durch Mutation von *lpg2166* in *L.pn.* Phil-1 hervorgerufen wurde zu bestätigen, wurden neue Mutanten im isogenen Stamm als auch in den Stämmen JR32, Paris und 130b generiert. Die Mutation des jeweiligen Homologs in den Stämmen konnte durch RT-PCR bestätigt werden. Entgegen den Erwartungen verhielten sich die Mutanten in den verschiedenen phänotypischen Untersuchungen in einem Fall wesentlich anders als die Ursprungsmutante P5A1. Der hämolytische Defekt konnte mit Ausnahme der Mutante in JR32 bestätigt werden. In diesem Stamm führte die Mutation des *lpg2166* Homolog teilweise zu einer Erhöhung der hämolytischen Aktivität. Anders als häufig publiziert und angenommen, gibt es zwischen den Stämmen Phil-1 und JR32 auf genomischer Ebene beträchtliche Unterschiede. So ist eine von Huang et.al beschriebene 65Kb große Patho-

genitätsinsel im Stamm Phil-1 enthalten. Diese konnte im Stamm JR32 jedoch nicht nachgewiesen werden. (Huang, Yuan et al. 2006). Aufgrund der heterogenen Genomstruktur dieser Stämme ist es durchaus denkbar, dass die Mutation eines Gens auch unterschiedliche Phänotypen hervorruft. Dies könnte somit den unterschiedlichen Einfluss der *lpg2166* Mutation auf die hämolytische Aktivität dieser beiden Stämme erklären. Die Reduktion der hämolytischen Aktivität bei den anderen erzeugten Mutanten fiel im Stamm Paris am deutlichsten aus. Anhand der Resultate des quantitativen Hämolyseassays mit den neu generierten Mutanten lässt sich jedoch schlussfolgern, dass Lpg2166 und dessen Homologe in Paris und 130b die hämolytische Aktivität entscheidend beeinflussen. Die Quantität dieses Einflusses ist jedoch stammspezifisch. Im Gegensatz zur hämolytischen Aktivität konnte der Kolonisationsdefekt mit den neuen Phil-1 Mutanten nicht bestätigt werden. Die Mutation der *lpg2166* Homologe in den Stämmen JR32 und Paris hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die intrazelluläre Replikationsfähigkeit in A.c.. Einzig im Stamm 130b führte die Mutation des *lpg2166* Homologs zu einer deutlichen Reduktion der Replikationsrate in *A.c.*. Auch in der Koinfektion mit U937-Makrophagen konnte dieser Defekt beobachtet werden. Um auszuschließen, dass eventuelle „*Second-Site*-Mutationen" die Wachstumsdefekte der 130b Mutante und der Mutante P5A1 verursachten, wurde versucht durch intakte Versionen von *lpg2166 in trans* die entsprechenden Defekte zu komplementieren. Transkripte von *lpg2166* konnten in beiden Komplementanten mittels RT-PCR festgestellt werden. Allerdings war die Quantität dieser Transkripte, soweit man diese anhand der RT-PCR beurteilen kann, im Gegensatz zum jeweiligen Wildtyp deutlich erhöht. Der Komplementationsvektor mit dem intakten *lpg2166* wurde auch in die Wildtypen Phil-1 und 130b transformiert. Durch die dadurch entstandene Überexpression von *lpg2166*, wurde entgegen den Erwartungen die hämolytische Aktivität drastisch reduziert. Gleiches gilt für die Kolonisationsfähigkeit der Überexpressionsklone in *A.c.*. Beide waren in der Koinfektion attenuiert. Durch die intakte Kopie von *lpg2166 in trans* konnte die Attenuierung der Mutanten P5A1 und der 130b Mutante nicht aufgehoben werden. Diese Resultate weisen wiederum auf eine regulatorische Funktion von Lpg2166 hin. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei dem verwendeten Komplementationsvektor nicht um ein *single copy* Plasmid handelt, kommt es auch in den Mutanten zu einer Überexpression. Dieses spiegelt sich auch in der oben beschriebenen RT-

PCR wieder. Daher sind die Phänotypen in der Koinfektion mit *A.c.* von Komplementations- und Überexpressionsklon vergleichbar. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Lpg2166 mit hoher Wahrscheinlichkeit ein regulatorisch wirkender Typ IVB-Sekretions-System Effektor von *L.pn.* ist. Das Ausmaß und der Effekt der Regulation scheinen jedoch zwischen den getesteten Stämmen zu variieren. Allen gemein ist jedoch der Einfluss auf die hämolytische Aktivität. Es ist also davon auszugehen, dass Lpg2166 einen hämolytischen Faktor reguliert. In den Stämmen Phil-1 und 130b könnte dieser auch von Bedeutung für die Kolonisation von A.c. sein. Die anderen Stämme, bei denen kein Defekt während der Koinfektion auftrat könnten die Funktion dieses, durch Lpg2166 regulierten Faktors, durch andere Faktoren komplementiert haben. Dafür spricht auch die hohe funktionelle Redundanz unter den Typ IVB-Sekretions Effektoren (Ninio and Roy 2007). Um den Einfluss von Lpg2166 auf die Expression putativer hämolytischer Faktoren zu bestätigen, sollte versucht werden mit anderen Methoden eine Komplementation der Defekte zu erreichen. Die genomische Reintegration von *lpg2166* ins Genom könnte eine solche Methode darstellen, welche bei *L.pn.* aber nicht einfach zu realisieren ist.

5.7 Das Hitzeschockprotein HtpG und seine putative regulatorische Funktion auf Hydrolysom und Virulenz von *L.pneumophila*

Das durch Insertion der Transposons ausgeknockte Gen *lpg1369* in der Mutante P5A2 kodiert für das Hitzeschockprotein HtpG (High temperature protein G). HtpG ist das prokaryotische Paralog zum eukaryotischen Hitzeschockprotein Hsp90. Die Aminosäuresequenz dieser beiden Proteine ist zu ungefähr 40% homolog. Im Gegensatz zur eukaryotischen Variante ist über das bakterielle HtpG nur relativ wenig bekannt. Hsp90 hat in der eukaryotischen Zelle eine Vielzahl an Funktionen. Dabei stellt die Regulation der Stressantwort das zentrale Dogma dar (Csermely, Schnaider et al. 1998; Lewthwaite, Skinner et al. 1998; Tanaka and Nakamoto 1999; Thomas and Baneyx 2000; Lund 2001). Zu den Aufgaben von Hsp90 gehören die korrekte Faltung neu synthetisierter Proteine, die Rückfaltung denaturierter Proteine und das Verhindern von Missfaltungen. Darüber hinaus spielt Hsp90 eine wichtige Rolle in der Regulation von Proteinen der Signaltransduktion und dem Transport von Proteinen (Lund 2001). Wie Hsp90 bildet HtpG homologe Dimere (Csermely, Schnaider et al. 1998; Lund 2001; Shiau, Harris et al. 2006; Krukenberg, Forster et al. 2008). Jedes der Monomere besitzt

eine N-terminale ATPase-Domäne, welche die für die Funktion der Chaperone benötigte Energie liefert. Der C-terminale Teil von HtpG dient der Bindung von Substraten und der Dimerisierung des Proteins. Die Transposoninsertion in der Mutante P5A2 erfolgte in C-terminalen Bereich von *htpG*. Diese Mutation führte dazu, dass *htpG* nicht mehr transkribiert wird, was durch RT-PCR verifiziert wurde. Das Fehlen von HtpG hatte zur Folge, dass die Mutante P5A2 eine deutlich reduzierte hämolytische Aktivität aufwies. Die zellassoziierte und sekretierte PLA-Aktivität waren ebenfalls reduziert. In der Koinfektion mit *A.c.* war die Mutante P5A2 attenuiert, was darauf schließen lässt, dass HtpG eine wichtige Rolle bei der Kolonisation dieser Einzeller besitzt. Der Phänotyp von Mutante P5A2 konnte mit einer unabhängigen, neu generierten Mutante im Stamm Phil-1 reproduziert werden. Dass auch die intrazelluläre Replikation in humanen Makrophagen durch die Mutation von *htpG* signifikant reduziert war, deutet darauf hin, dass HtpG sowohl für die Kolonisation von *A.c*. als auch die Replikation in U937 Makrophagen essentiell ist. Ein ähnlicher Einfluss von HtpG auf die intrazelluläre Replikation wurde von Weiss et.al in *Francisella* beschrieben. Durch negatives Screening im Mausmodell konnte eine *htpG*-Mutante identifiziert werden, die sowohl im Mausmodell als auch in humanen Makrophagen stark attenuiert war (Weiss, Brotcke et al. 2007). Im Gegensatz dazu hat die Mutation von *htpG* im paradontalen Pathogen *Porphyromonas gingivalis* keinen Einfluss auf Adhärenz, Invasion und Wachstum in der Koinfektion mit humanen Zellen (Sweier, Combs et al. 2003). Dass die Rolle von HtpG für die intrazelluläre Replikation nicht nur spezies- sondern auch stammspezifisch sein kann, wird in der vorliegenden Arbeit anhand der generierten Mutante in *L.pn.* JR32 deutlich. Vergleichbar zum Stamm Phil-1 führte die Zerstörung des *htpG*-Homologs in JR32 zu einer signifikanten Reduktion der hämolytischen Aktivität. In der Koinfektion mit *A.c*. war jedoch nur eine leichte Attenuierung der Mutante festzustellen. Durch Transformation eines *low copy* Vektors, der eine intakte Kopie des *htpG*-Gens trägt, in die Mutanten von Phil-1 und JR32 konnte der hämolytische Defekt teilweise komplementiert werden. Im Stamm Phil-1 war die Hämolyse der Komplemente zwar signifikant höher als in der Mutante, konnte aber das Niveau des Wildtyps nicht erreichen. Die Komplementante im Stamm JR32 sowie die Überexpressionsklone von JR32 und Phil-1 wiesen im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp eine erhöhte Hämolyse auf. Die rekombinante Expression des HtpG von *L.pn.* Phil-1 in *E.coli* führte eben-

falls zur vermehrten Lyse von humanen Blutzellen. Da *E.coli* auch ein *htpG*-Gen besitzt (Spence and Georgopoulos 1989), kann jedoch nicht davon ausgegangen werden, dass das HtpG von *L.pn*. Phil-1 selbst hämolytisch aktiv ist. Dies ist auch anhand der Analyse der Proteinmotive, die in HtpG zu finden sind, eher unwahrscheinlich. Es deutet vielmehr darauf hin, dass HtpG an der Regulation eines hämolytischen Faktors in *L.pn.* Phil-1 und JR32 beteiligt ist. Die beobachtete Attenuierung der *L.pn.* Phil-1 Mutanten in *A.c*. und U937 Makrophagen konnte durch Transkomplementation nicht aufgehoben werden. Durch RT-PCR konnte ausgeschlossen werden, dass die erfolglose Komplementation das Ergebnis fehlender Transkription der intakten *htpG* Konstrukte *in trans* war. Auch einen toxischen Effekt als Folge der Überexpression von HtpG kann man aufgrund der Tatsache, dass der Wildtyp mit dem entsprechenden Komplementationsvektor keinen Wachstumsdefekt gegenüber dem Wildtyp mit Leevektor aufweist, ausschließen. Eine der möglichen Ursachen könnten sog. *Second site* Mutationen sein, die z.B. in für die Kolonisation essentiellen Genen stattgefunden haben. Zu solchen Genen zählen z.B. alle ORFs, die für das Typ IVB-Sekretionssystem von *L.pn.* kodieren. Dieses ist als essentieller Faktor für die intrazelluläre Vermehrung und somit die Virulenz von *L.pn.* beschrieben (Ensminger and Isberg 2009). Da jedoch zwei unabhängige Mutanten im Stamm Phil-1 die gleiche Attenuierung aufweisen, könnte es durchaus sein, dass durch die Mutation von *htpG* die Transkription von angrenzenden Genen, die eine wichtige Funktion in der intrazellulären Vermehrung übernehmen, beeinträchtigt wurden. Eine solche Operonstruktur, die *htpG* involviert, wurde zwar durch *in silico* Analysen nicht vorhergesagt, wäre aber dennoch denkbar. Eine RT-PCR, die die angrenzenden Gene mit einbezieht, könnte zeigen ob diese Vermutung zutrifft. Das generelle Problem bei der Komplemtation von intrazellulären Wachstumsdefekten von *L.pn.*, mittels extrachromosomaler Vektoren, erschwert die Verifizierung dafür, dass *htpG* ein wichtiger Faktor für die Kolonisation von *A.c*. und U937 Makrophagen ist. Versuche eine Reintegrante zu erzeugen, blieben erfolglos. Als mögliche Variante zu erfolgreicher Komplementation, könnte zukünftig das System von Liu et.al sehr hilfreich sein. Mit diesem kann die Mutation auch zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Infektion ausgeschaltet werden (Liu, Gao et al. 2008). Neben der Regulation von *Legionella*-eigenen Proteinen, die zur Attenuierung in den genannten Zellmodellen führen, könnte dieser Effekt durch den Einfluss von HtpG auf das Inflamasom

des Wirtes hervorgerufen worden sein. Ein solcher Einfluss ist bereits in *Shigella* (Bu, Zhu et al. 2008) und *Porphyromonas* (Shelburne, Coopamah et al. 2007) beschrieben. Ein weiterer Anhaltspunkt dafür, dass HtpG auf Wirtsseite agiert ist die Beobachtung von Yan et.al, dass *A.c.*, in denen *hsp90* mutiert ist, gegenüber Bakterien eine höhere Resistenz aufweisen (Yan, Cerny et al. 2004). Aufgrund der Homologie zwischen Hsp90 und HtpG könnte es sein, dass HtpG ebenfalls Funktionen des Hsp90 in der eukaryotischen Zelle übernimmt und dieses zu einer erhöhten Sensitivität von *A.c.* gegenüber *L.pn.* führt. Dazu müsste HtpG jedoch sekretiert oder zumindest membranständig sein, um mit Proteinen des Wirtes zu interagieren. Die *in silico* Analyse bezüglich der Lokalisation resultiert jedoch in einer putativen zytoplasmatischen Lokalisation von HtpG. Untersuchungen des Proteoms der äußeren Membranproteine von *L.pn,* die von Khemiri et.al durchgeführt wurden, konnten jedoch HtpG erstmals als eines von 4 Chaperonen, die in der äußeren Membran lokalisiert sind identifizieren (Khemiri, Galland et al. 2008). Die Verifizierung der Lokalisation mit anderen Methoden steht jedoch noch aus. Eine Möglichkeit wäre die membranassoziierte Lokalisation von HtpG mittels spezifischer Antikörper und immunofluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen zu verifizieren. Als Konsens aus den bisherigen Untersuchungen ergibt sich, dass HtpG essentiell für die hämolytische Aktivität von *L.pn.* Phil-1 und JR32 ist und der putative Einfluss auf die Kolonisation in *A.c.* und U937 Makrophagen weiter untersucht werden muss. Bestätigt sich dieser, so wäre HtpG ein neuer Virulenzfaktor der sowohl hydrolytische Eigenschaften als auch die Kolonisation von Eukaryoten beeinflusst.

5.8 *lpg0721/0720*: Gene eines putativen Multidrug-Efflux-Systems mit hämolytischer Eigenschaft und Bedeutung für die Kolonisation von Amöben und Makrophagen

Die Mutante P8C2 zeigte im Screening signifikant reduzierte Aktivitäten bei Wachstum auf Blut- und Eigelbagar. Verursacht wurde dieser Phänotyp durch die Insertion des Transposon in das Gen *lpg0721*. Dieses kodiert für ein Membranfusionsprotein eines putativen RND-Efflux-Komplexes. Zu diesem putativen Effluxsystem gehört höchstwahrscheinlich auch das Transkript des downstream von *lpg0721* lokalisierten Gens *lpg720*. Das putative Expressionsprodukt von *lpg0720* ist ein Multidrug-Resistenz-Protein. RND-Efflux Systeme sind aus drei

Bestandteilen aufgebaut: dem Multidrug-Resistenz Protein, dem Membranfusionsprotein und einem äußeren Membranprotein. Das Multidrug-Resistenzprotein stellt dabei den eigentlichen Transporter dar. Die dritte für die Funktion des Transportsystems essentielle Komponente, das äußere Membranprotein, konnte in unmittelbarer Umgebung des Operons *lpg0720/0721* nicht lokalisiert werden. Die Analyse der angrenzenden Genombereiche zeigte jedoch, dass der ORF *lpg0699* für ein Homolog des TolC Proteins von *E.coli* kodiert. TolC stellt das äußere Membranprotein des RND-Efflux-Systems AcrAB-TolC von *E.coli* dar (Fralick 1996). Untersuchungen von mehreren RND-Efflux-Systemen haben gezeigt, dass das äußere Membranprotein nicht immer in einem Operon bzw. der direkten Umgebung der anderen Bestandteile des Transporters lokalisiert sein muss. Darüber hinaus ist bekannt, dass Tunnelproteine wie z.B. OpmR von *Pseudomonas aeruginosa* als äußeres Membranprotein von mehreren RND-Efflux-Systemen fungieren können (Wong, Brinkman et al. 2001). Aufgrund dieser Erkenntnisse wäre es durchaus denkbar, dass *lpg0699* das äußere Membranprotein für das durch *lpg0720/0721* kodierte RND-Efflux-System darstellt. Die allgemeine Gleichung für den durch ein funktionelles RND-Efflux-System katalysierten Transport von Substraten lautet wie folgt:

$$\text{Substrate (in)} + n\text{H}^+ \text{ (out)} \rightarrow \text{Substrate (out)} + n\text{H}^+ \text{ (in)}$$

RND-Efflux-Systeme katalysieren dementsprechend den Substratefflux über einen Protonen-Antitransport. Wie die Bezeichnung schon vermuten lässt, besitzen Multidrug-Efflux-Systeme eine große Substratspezifität. Neben diversen Antibiotikaklassen (β-Lactamantibiotika, Makrolide, Fluorchinolone, Tetratcycline, Chloramphenicol) werden auch Desinfektionsmittel (z.B. Benzalkoniumchlorid) und Farbstoffe (z.B. Ethidiumbromid, Acriflavin) sowie Lösungsmittel, Tenside und Gallensäuren aus der Zelle gepumpt (Murakami, Nakashima et al. 2002; Yu, McDermott et al. 2003; Pos, Schiefner et al. 2004). Aufgrund des breiten Substratspektrums wird auch über die physiologische Rolle von Multi-Drug-Efflux-Systemen diskutiert. Diese könnte im Export von Metaboliten oder toxischen Substanzen liegen (Grkovic, Brown et al. 2002). Die erhöhte Sensitivität der *lpg0721* Mutanten gegenüber Ampicillin zeigt, dass dieses RND-Efflux-System zur Resistenz gegen Antibiotika beiträgt. Der Versuch die Sensitivität durch *in trans*

Komplementierung, mittels eines low copy Vektors wieder auf das Niveau des Wildtyps zu bringen, blieb erfolglos. Die plasmidbasierend Expression von *lpg0720* und *lpg721* in der *lpg0721* Mutante führte hingegen zu Reduktion der MHK und somit zu erhöhter Sensitivität gegenüber Ampicillin. Eine Ursache dieser Sensibilisierung könnte die Akkumulierung des Antibiotikums im Periplasma darstellen. Das Multidrug-Resistenzprotein sowie das Membranfusionsprotein des RND-Efflux-Systems, die den Transport durch die innere Membran bewerkstelligen, werden durch die *in trans* Komplementierung überexprimiert. Dies könnte einen erhöhten Efflux von Ampicillin ins Periplasma zur Folge haben. Das äußere Membranprotein, welches für die Translokation der Substrate aus dem Periplasma in den extrazellulären Raum verantwortlich ist, wird vermutlich nicht in entsprechend höherer Anzahl gebildet. Somit könnte es zur bereits erwähnten Akkumulation von Ampicillin im Periplasma kommen, welche die erhöhte Sensitivität bei Überexpression von *lpg0720* und *lpg0721* erklären würde. Für diese These sprechen auch Untersuchungen mit *Knockout*-Mutanten die zeigten, dass der Efflux von Substanzen nur stattfindet, wenn alle drei beteiligten Proteine ausgebildet werden. Ist dies nicht der Fall, reagiert der Stamm empfindlich auf Antibiotika, Farbstoffe etc. (Ma, Cook et al. 1995; Fralick 1996; Zgurskaya and Nikaido 2000). Neben der Bedeutung von *lpg0721* für den Efflux von antimikrobiell wirkenden Substanzen zeigten die Untersuchungen, dass dieses Gen einen starken Einfluss auf die hämolytische Aktivität von *L.pn.* Phil-1 besitzt. Die Mutanten waren in ihrer Fähigkeit humane Erythrozyten zu lysieren signifikant reduziert. Diese, durch Mutation von *lpg0721* hervorgerufene Reduktion, scheint jedoch stammspezifisch zu sein. Bei Mutation des Homologs von *lpg0721* im Stamm JR32 konnte keine deutliche Reduktion der Hämolyse beobachtet werden. Interessanterweise führte jedoch die Überexpression von *lpg0721 in trans* in beiden Stämmen zu einer signifikanten Erhöhung der hämolytischen Aktivität. Durch Expression von *lpg721 in trans* konnte die hämolytische Aktivität in der *L.pn.* Phil-1 *lpg0721*-Mutante zwar erhöht werden, erreichte jedoch nicht Wildtypniveau. Dies könnte auf eine eventuelle *second site* Mutation in Stamm Phil-1 hinweisen, die ebenfalls Einfluss auf die hämolytische Aktivität hat. Die Erhöhung der Hämolyse durch Überexpression von *lpg0721* in den Wildtypen sowie die starke Reduktion der Aktivität in der *L.pn.* Phil-1 Mutante könnte verschiedene Ursachen haben. Eher unwahrscheinlich ist, dass das durch *lpg0721* kodierte

Membranfusionsprotein selbst hämolytisch aktiv ist, da die heterologe Expression in *E.coli* nicht mit einer signifikanten Erhöhung der Hämolyse einherging. Wahrscheinlicher ist es, dass über das durch *lpg720/21* kodierte Effluxsystem ein hämolytischer Effektor ins Periplasma und von dort über das bislang nicht eindeutig identifizierte äußere Membranprotein in den extrazellulären Raum transloziert wird. Durch Vergleich der Sekretome *L.pn.* Phila-1 Wildtyp und einer isogenen *lpg0721* Mutante könnte dieser Faktor identifiziert werden. Neben der Existenz eines sekretierten hämolytischen Faktors wäre es auch denkbar, dass durch Mutation bzw. Überexpression von *lpg0721,* Gene die hämolytisch aktive Proteine kodieren, reguliert werden. Zu dieser These lassen sich in der Literatur jedoch keine Hinweise finden. Zuverlässige Aussagen über eine regulatorische Wirkung von *lpg0721* könnten durch vergleichende chipbasierte Expressionsanalysen von Mutante und Wildtyp erhalten werden.

Die Koinfektionen mit *A.c.* zeigten, dass *lpg0721* für die Kolonisierung von *L.pn.* Phil-1 in *A.c.* von Bedeutung ist. Die Mutation von *lpg0721* in diesem Stamm führte zur Attenuierung in *A.c*.. Selbiges gilt für die Koinfektion mit U937 Makrophagen. Ferhat et al. konnten zeigen, dass eine *tolC*- Mutante in *L.pn.* Lens, neben der erhöhten Sensitivität gegenüber antimikrobiellen Substanzen auch eine Attenuierung der Virulenz bezogen auf *A.c*. und U937 Makrophagen hervorruft (Ferhat, Atlan et al. 2009). Darüber hinaus fanden Stewart et al. kürzlich heraus, dass TolC bei der Translokation von Surfactant eine entscheidende Rolle spielt. Dabei konnten die *L.pn.* 130b Homologe von Lpg0720 (Lpw_07981) und Lpg0721(Lpw_07991) eindeutig als Partner von TolC identifiziert werden(Stewart, Burnside et al. 2011). Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung, dass TolC das äußere Membranprotein des RND-Efflux-Systems aus Lpg0720 und Lpg0721 darstellt. Ähnliche Auswirkung auf die Vermehrungsfähigkeit *in vivo* wurden in RND-Efflux-Mutanten anderer Pathogene beschrieben. So führte die Deletion von *acrB*, welches für das Transportprotein des AcrAB-RND-Efflux-Systems kodiert, zu einer Attenuierung von *Francisella tularensis* in Mäusen (Bina, Lavine et al. 2008). Die Invasivität von *P. aeruginosa* wurde durch Mutagenese von verschiedenen Multidrug-Efflux-Systemen ebenfalls erheblich reduziert (Hirakata, Srikumar et al. 2002). Auch in *Vibrio cholerae* und *Brucella suis* sind Attenuierungen als Folge von Mutationen in Multidrug-Efflux-Systemen beschrieben (Bina, Provenzano et al. 2008; Martin, Posadas et al. 2009). Aufgrund

der Ergebnisse der Koinfektion mit der *lpg0721*-Mutante in Stamm JR32 ist davon auszugehen, dass die Bedeutung von *lpg0721* für die Kolonisation von *A.c*. stammspezifisch ist. Die *lpg0721*-Mutante von JR32 wies keinen Defekt in der intrazellulären Vermehrung in *A.c.* auf. Vermutlich können in diesem Stamm die Defekte, die durch Mutation des *lpg0720/0721*-kodierten Efflux-System entstehen durch andere Systeme kompensiert werden. Eine Analyse der Genomsequenz von *L.pn.* Phila-1 zeigte, dass insgesamt 22 putative Multidrugefflux-Systeme vorhanden sind. Neun dieser gehören der RND-Efflux-Familie an. Es ist davon auszugehen, dass auch Stamm JR32 eine ähnlich hohe Anzahl putativer MDE-Systeme besitzt. Obwohl Stamm JR32 ein Derivat von *L.pn*. Phila-1 darstellt, gibt es auf genomischer Ebene gravierende Unterschiede. So konnten Brassinga et al. zeigen, dass eine genomische Insel von 65Kb Größe nur in *L.pn.* Phila-1 und nicht in JR32 vorkommt (Brassinga, Hiltz et al. 2003). Die Diskrepanzen auf genomischer Ebene zwischen diesen nahe verwandten Stämmen könnten demnach auch zu den unterschiedlichen Phänotypen der Mutanten führen. Die Antwort auf die Frage wie genau sich die Mutation von *lpg0721* auf die Kolonisierung von *A.c*. und U937 auswirkt steht noch aus. Denkbar wäre, dass das putative RND-Efflux-System spezifische antimikrobielle Substanzen der Wirte aus der Zelle schleust und diese Aufgabe aufgrund unterschiedlicher Substratspezifität nicht durch andere MDR-Systeme übernommen werden kann. Auch die Translokation eines Virulenzfaktors über das putative RND-Efflux-System ist nicht auszuschließen. Ein solcher Faktor könnte auch hämolytische Eigenschaften besitzen und so den Defekt in der Hämolyse der *lpg0721* Mutante erklären. Ein Einfluss des RND-Efflux-Systems auf die Adhäsion von *L.pn.* Phil-1 könnte ebenfalls zur Attenuierung beitragen. Schließlich handelt es sich bei den Komponenten, wie bei vielen anderen adhärenzassoziierten Proteinen, um membranständige Proteine. Dieses sind jedoch rein spekulative Aussagen. Die genaue Bedeutung des durch *lpg0720/21* kodierenden RND-Efflux-System für die Kolonisation von *A.c* und U937-Makrophagen kann nur durch weitere Experimente bestimmt werden. Im Vordergrund solcher Experimente sollte zunächst die Komplementation des durch *lpg0721* hervorgerufenen Kolonisationsdefekts stehen. Bei erfolgreicher Komplementation könnte eine eventuelle *second site* Mutation als Ursache für die beschriebenen Phänotypen ausgeschlossen werden. Die

in dieser Arbeit unternommenen Versuche den Kolonisationsdefekt mittels trans Komplementierung zu beheben blieben leider erfolglos.

5.9 Die sekretierte Zinkmetalloprotease ProA: Neue Ansätze zur Bedeutung dieses Proteins für die Virulenz von *L. pneumophila*

Proteasen stellen eine wichtige Klasse von Virulenzfaktoren dar. Nahezu alle bisher charakterisierten prokaryotischen und eukaryotischen pathogenen Parasiten exprimieren Proteasen, die mit der Virulenz des entsprechenden Pathogens in engem Zusammenhang stehen. Vor allem sekretierte Proteasen sind zahlreich als Virulenzfaktoren beschrieben. Die Rolle der einzelnen Proteasen in Bezug auf die Pathogenität kann dabei sehr divergent sein. Proteasen wie z.B. die Protease IV von *P. aeruginosa* oder die Cysteinprotease von *P. gingivalis* sind durch die direkte Zerstörung von Zellgewebe maßgeblich an der Invasion und Disseminierung dieser Pathogene beteiligt (Engel, Hill et al. 1998; Engel, Hill et al. 1998; Kuramitsu 1998). Andere Proteasen manipulieren gezielt das Immunsystem des Wirtes. Die proteolytische Degradation von Bestandteilen der angeborenen und adaptiven Immunantwort spielt dabei eine entscheidende Rolle. Die Elastase von *P.aeruginosa* trägt z.B. durch Depletion des alpha 1-Proteinase-Inhibitors und durch Inaktivierung des Komplementsystems zur Virulenz dieses Organismus bei (Schultz and Miller 1974; Morihara, Tsuzuki et al. 1979). Neben der direkten Rolle als Virulenzfaktoren, dienen sekretierte Proteasen während einer parasitären Infektion auch der Aufrechterhaltung des eigenen Stoffwechsels. So werden z.B. durch proteolytische Spaltung von Wirtsproteinen die für den Parasiten essentiellen Aminosäuren bereitgestellt. Die Aktivität extrazellulärer Proteasen ist jedoch nicht nur auf den Wirtsorganismus beschränkt. So sind extrazelluläre Proteasen beschrieben, die zur Prozessierung zelleigener Proteine notwendig sind. Erst durch die proteolytische Aktivierung dieser Proteine erlangen diese ihre biologische Aktivität. So wurde von Kuramitsu et al. gezeigt, dass die Fimbrienproduktion in einer Protease-defizienten Mutante von *P. gingivalis* defekt ist (Kuramitsu 1998). Als Ursache wurde mit hoher Wahrscheinlichkeit die fehlende proteolytische Prozessierung des Fimbrien-Precursors FimA identifiziert. PC-PLC, eine für die Virulenz von *L.monocytogenes* wichtige Phospholipase, wird ebenfalls durch eine sekretierte Protease (Mpl) aktiviert (Marquis, Goldfine et al. 1997; Marquis and Hager 2000; Yeung, Zagorski et al. 2005; O'Neil, Forster et al. 2009).

Als intrazelluläres pathogenes Bakterium exprimiert auch *L. pn.* eine Vielzahl von proteolytisch aktiven Proteinen. Unter ihnen auch einen Vielzahl sekretierter Proteasen. Die sekretierte proteolytische Aktivität, bei Wachstum auf Laborkulturmedien, ist jedoch hauptsächlich auf die Zinkmetalloprotease ProA zurückzuführen. Neben der proteolytischen Aktivität besitzt ProA einen signifikanten Einfluss auf die hämolytische Aktivität von *L.pn* Phil-1. Im Zuge des oben beschrieben Screenings konnte auch eine *proA*-Mutante (P6C5=*Δlpg0467*) identifiziert werden. Diese zeichnete sich durch eine starke Reduktion der Proteolyse und Hämolyse auf Casein- bzw. Blut-Agar aus. ProA wird als Proenzym über das Sec-System von *L.pn.* ins Periplasma und anschließend über das Typ II Sekretionssystem in den extrazellulären Raum transportiert. ProA aktiviert sich durch autokatalytische Abspaltung des Propeptids selbst. Trotz der starken proteolytischen Aktivität der ProA ist der Einfluss dieser Zinkmetalloprotease auf die Virulenz von *L. pn.* umstritten. Schädigung von Geweben, vor allem Lungengewebe, zytotoxische Effekte sowie die proteolytische Degradation immunologisch aktiver Moleküle wurden durch eine Vielzahl von Publikationen der Zinkmetalloprotease ProA zugeordnet (Baskerville, Conlan et al. 1986; Williams, Baskerville et al. 1987; Conlan, Williams et al. 1988; Keen and Hoffman 1989; Rechnitzer, Williams et al. 1992). Dennoch konnte in den meisten *in vitro* Infektionsmodellen mit isogenen *proA*-Mutanten keine Attenuierung der intrazellulären Replikationsfähigkeit nachgewiesen werden. Rossier et.al konnten jedoch zeigen, dass ProA für die Kolonisierung von *H. vermiformis* essentiell ist und somit ein wirtsspezifischen Virulenzfaktor darstellt (Rossier, Dao et al. 2008). Alle bisherigen Arbeiten, die sich mit dem Einfluss von ProA auf die Virulenz beschäftigten, fokussierten vor allem die Auswirkungen der proteolytischen Aktivität auf den jeweiligen Wirt. Wie bereits erwähnt, gibt es jedoch auch Proteasen die zelleigene Proteine aktivieren können. Banerji et al. konnten zeigen, dass ProA direkt oder indirekt die sekretierte Phospholipase PlaC vermutlich proteolytisch prozessiert (Banerji, Bewersdorff et al. 2005). Erst durch die putative Prozessierung entfaltet die Phospholipase eine zusätzliche Glycerophospholipid Cholesterol Acyltransferase (GCAT) Aktivität.

In der vorliegenden Arbeit sollte über die Analyse der Substratspezifität von ProA gegen eukaryotische und *Legionella* eigene Proteine, der Einfluss von ProA auf

die Virulenz von *L.pn.* weiter analysiert werden. Besonderer Fokus war dabei die Interaktion zwischen ProA und der ebenfalls sekretierten Phospholipase A PlaC.

Wie bereits erwähnt, trägt ProA zur Schädigung von Geweben, vor allem Lungengewebe, bei. Der genaue Mechanismus bzw. die Substrate, die dabei eine Rolle spielen sind weitestgehend unbekannt. Mit Hilfe des Protease-Substrat-Assays konnten jedoch potentielle eukaryotische Substrate von ProA, dessen Degradation zu dieser Schädigung führen könnte, identifiziert werden. Dazu gehört z.B. Catenin beta-1, welches einer der Hauptbestandteile der Tight Junctions (Takeichi, Inuzuka et al. 1990; Takeichi 1991; Montefort, Baker et al. 1993; Fukata and Kaibuchi 2001) darstellt. Durch die proteolytische Degradation von Catenin beta-1 könnten die Tight Junctions destabilisieret werden und dadurch die Disseminierung von *L.pn*. erleichtert werden. Neben Catenin beta 1 konnten weitere putative Substrate der ProA identifiziert werden (Tabelle 4-11). Zu diesen gehört auch Kollagen. Die proteolytische Spaltung von Kollagen, dem Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix durch die ProA, könnte ebenfalls die Invasivität und Disseminierung der Legionellen positiv beeinflussen. Salmonellen und Streptokokken, die wie *L.pn*. ebenfalls in der Lage sind eukaryote Zellen zu invadieren und sich im Zellgewebe zu verbreiten, besitzen ebenfalls Kollagen-degradierende Proteasen, die auch mit der Virulenz dieser Pathogene assoziiert werden (Ramu, Lobo et al. 2008; Soares, da Silva et al. 2008). Dass Legionellen eine Kollagen-abbauende Aktivität besitzen, wurde schon 1986 durch Baskerville et.al und Colan et.al beschrieben (Baskerville, Conlan et al. 1986; Conlan, Baskerville et al. 1986). Die Zuordnung dieser Aktivität zu einem bestimmten Enzym, speziell einer Protease blieb jedoch offen. Anhand der Daten des Protease-Substrat-Assays und der in der Literatur beschriebenen durch die ProA hervorgerufenen histologischen Veränderungen im Lungengewebe, kann die durch *L.pn*. induzierte Degradation von Kollagen mit hoher Wahrscheinlichkeit der Zinkmetalloprotease ProA zugeordnet werden. Weitere Untersuchungen mit gereinigter ProA sind zur Verifizierung dieser Annahme jedoch notwendig. Wie aus der Liste der Topsubstrate zu entnehmen ist (Tabelle 4-11) befinden sich unter den Topsubstraten eine Vielzahl immunologisch aktiver Moleküle. So konnten sowohl Bestandteile des Komplementsystems (Complement C3, Complement C4-A) als auch verschiedene Zytokine (IL18, MCP-3) und eine IgA-spezifische Serin-

Endopeptidase als potentielle Substrate ausgemacht werden. Dass ProA das Immunsystem des Wirtes beeinflusst, wurde in mehreren Publikationen gezeigt. So konnte neben Rechnitzer et al., die eine Inhibition von natürlichen Killerzellen durch ProA nachwiesen, die Gruppe um Mintz, Interleukin-2 und CD4 als Substrate von ProA identifizieren (Rechnitzer, Diamant et al. 1989; Mintz, Miller et al. 1993). Auch Moffat et al. beschreiben eine inhibitorische Wirkung der ProA auf die Chemotaxis von Neutrophilen (Moffat, Edelstein et al. 1994).
Die bisher diskutierten Ergebnisse bestätigen, dass ProA einen Einfluss auf die Wirtszellen besitzt. Die Funktion von ProA und der Einfluss auf Fitness und Virulenz von *L.pn*. lässt sich jedoch nicht nur auf diese Seite beschränken. Wie die vergleichende 2-D-Elektrophorese der Kulturüberstände von Wildtyp und isogener *proA*-Mutante zeigen (Abbildung 4-34), hat diese Zinkmetalloprotease auch einen entscheidenden Einfluss auf das Sekretom und somit auf *L.pn*. eigene Faktoren. Leider war es in Anbetracht der Zeit und den zur Verfügung stehenden Instrumenten nicht möglich diese Ergebnisse der 2-D-Analyse zu bestätigen und so weitere *Legionella*-eigene sekretierte Substrate der ProA zu identifizieren. Dieses sollte Bestandteil anschließender Untersuchungen dieser Arbeit sein. Dass von *L.pn*. sekretierte Proteine zu den Substraten von ProA zählen, wurde wie anfangs erwähnt durch Flieger et al. gezeigt (Flieger, Neumeister et al. 2002). Die 2-D-Analyse zeigt, dass die sekretierte Phospholipase A PlaC nicht das einzige Protein ist, welches durch ProA proteolytisch prozessiert werden könnte. Ob durch diese Prozessierung sekretierter Proteine, wie im Falle von PlaC eine Aktivierung einer bestimmten enzymatischen Funktion einhergeht, muss ebenfalls durch gezielte anschließende Experimente geklärt werden.
Um die Aktivierung der GCAT-Aktivität durch die ProA genau zu charakterisieren war es ein Ziel dieser Arbeit Schnittstellen der ProA in PlaC zu identifizieren. Da die Reinigung von PlaC sich als äußerst schwierig erwies (siehe Dissertation E.Rastew), mussten Methoden zur Identifizierung der Schnittstellen herangezogen werden, welche ohne gereinigtes Protein auskommen. Dazu gehört die in dieser Arbeit verwendete CHIP-Analyse mit überlappenden synthetischen Peptiden, die der Primärsequenz von PlaC entsprechen. Durch Inkubation des Chips mit gereinigter ProA konnten vier potentielle Schnittstellen im C-terminalen Bereich von PlaC ausfindig gemacht werden. Zwei dieser Schnittstellen befinden sich in der Primärsequenz von PlaC zwischen den Aminosäuren 314 und 337.

Würde eine Prozessierung von PlaC durch ProA an einer dieser Schnittstellen stattfinden, würde dies bedeuten, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit ein C-terminales Fragment komplett abgespalten wird. In diesem Bereich befinden sich jedoch die katalytischen Aminosäuren Aspartat 398 und Histidin 401. Untersuchungen von Lang et al. haben gezeigt, dass diese Aminosäuren für die GCAT-Aktivität essentiell sind (Lang C. 2011). Daher ist eine Aktivierung der Azyltransferase Aktivität von PlaC an einer dieser beiden putativen Schnittstellen eher unwahrscheinlich. Die beiden weiteren putativen Schnittstellen befinden sich zwischen den Aminosäuren 366 und 382. Durch die Verwendung überlappender Peptide konnte eine dieser Schnittstellen genau definiert werden. Es handelt sich dabei um die Schnittstelle zwischen Glutamin 366 und Tyrosin 367. Diese Schnittstelle wurde auch mittels einer massenspektrometrischen Analyse identifiziert (Lang C. 2011). Die genaue Position der putativen proteolytischen Spaltung innerhalb der zweiten Schnittstelle konnte nicht genau definiert werden. Sowohl N- als auch C-terminal von diesen beiden Schnittstellen befinden sich Cysteinreste. Daher muss die proteolytische Prozessierung an diesen Positionen nicht zwingend mit dem Verlust des C-terminalen Fragmentes einhergehen. Vielmehr könnte der C-Terminus inklusive der katalytischen Aminosäuren über Disulfidbrücken kovalent mit dem N-terminalen Fragment des Proteins, welches das katalytisch aktive Serin beherbergt, verbunden bleiben. Als Folge dieser Konformationsänderung könnte somit die Azyltransferase Aktivität von PlaC aktiviert werden. *In silico* Analysen mit PlaC zeigten, dass es zwischen den Cysteinen Cys343 und Cys388 sowie Cys415 und Cys 427 zur Ausbildung von Disulfidbrücken kommen kann. Eine Ausbildung von Disulfidbrücken konnte auch experimentell bestätigt werden. Die Übereinstimmung der Chip-basierten Analyse der putativen Schnittstellen und der massenspektrometrischen Untersuchungen lassen vermuten, dass ProA die Phospholipase PlaC spezifisch an bestimmten Domänen prozessiert. Da für die Chip-Analyse nur synthetische Peptide von PlaC, und für die massenspektrometrischen Experimente nur denaturierte PlaC verwendet werden konnte, ist es wichtig die erhaltenen Resultate mit nativ gereinigtem Protein zu bestätigen. Diese wurde kürzlich durch Lang et al. getan. Eine gezielte Mutagenese der identifizierten Schnittstellen, führte jedoch nicht zur Aktivierung der GCAT von PlaC. Erst nach Deletion eines Loops, der sich zwischen den Cysteinen Cys343 und Cys388 ausbildet, konnte die vollständige Aktivierung der GCAT von

PlaC beobachtet werden. Dies bedeutet, dass die Aktivierung von ProA nicht an einer genau definierten Stelle von PlaC stattfindet, sondern dass vielmehr die proteolytische Degradation des beschriebenen Loops durch ProA die Glycero:Phospholipidtransferase Aktivität aktiviert.

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit schlussfolgern, dass der Einfluss der sekretierten Zinkmetalloprotease ProA auf den Lebenszyklus von *L.pn.* viel komplexer ist, als bisher vermutet. Wie gezeigt entfaltet diese Protease ihre Aktivität nicht nur auf der Wirtsseite, sondern beeinflusst auch signifikant *L.pn.* eigene Faktoren. Diese Erkenntnis eröffnet eine ganz neue Sichtweise wie ProA die Virulenz und die Fitness von *L.pn.* beeinflusst, könnte und sollte die Grundlage für fortführende Experimente bilden.

ANHANG

Anhang 1: Auswertung der PlaC-Peptid-Microarrays mit großen Spotdurchmesser. MW: Mittelwert; VarK: Varianzkoeffizient ; ProA/BSA: Ratio MW ProA Inkubation / MW BSA-Inkubation; Cleavage-Rate: Abnahme des Signals des einzelnen Spots nach ProA-Inkubation in Prozent. Alle Peptide die durch ProA proteolytisch gespalten wurden sind grün unterlegt.

Index	Peptidsequenz	MW ProA	VarK ProA	MW BSA	VarK BSA	ProA/BSA	Cleavage-Rate %
1	AKRIDAWK	13242.3	0.38	14027.7	0.20	0.94	5.6
2	IDAWKERY	26939.7	0.75	16963.3	0.17	1.59	-58.81
3	WKERYPTA	45910.3	0.22	22154.3	0.47	2.07	-107.23
4	RYPTADFL	50562.3	0.10	28009.3	0.44	1.81	-80.52
5	TADFLFVN	23768.7	0.27	37761.3	0.23	0.63	37.06
6	FLFVNTEQ	1885.3	0.05	2065.7	0.08	0.91	8.73
7	VNTEQYLK	4315	0.29	1827.0	0.40	2.36	-136.18
8	EQYLKKAF	51719.7	0.12	38358.3	0.10	1.35	-34.83
9	LKKAFEDP	56088.3	0.10	41146.0	0.10	1.36	-36.32
10	AFEDPEKY	2354.7	0.04	2230.3	0.11	1.06	-5.58
11	DPEKYGFY	3499.3	0.35	6535.7	0.19	0.54	46.46
12	KYGFYNVK	3577.7	0.11	7900.7	0.34	0.45	54.72
13	FYNVKDAC	1383.3	0.33	1193.0	0.22	1.16	-15.95
14	VKDACIDV	31910.7	0.25	22873.3	0.28	1.40	-39.51
15	ACIDVKFP	48431.3	0.23	35886.3	0.22	1.35	-34.96
16	DVKFPMFN	45544.3	0.17	34958.0	0.10	1.30	-30.28
17	FPMFNAFI	11668	0.13	21849.7	0.28	0.53	46.6
18	FNAFIHSP	40899	0.25	32246.7	0.23	1.27	-26.83
19	FIHSPFAR	45292.3	0.30	34122.7	0.12	1.33	-32.73
20	SPFARNYV	44226	0.16	35892.7	0.18	1.23	-23.22
21	ARNYVLQY	845.3	0.14	2180.3	0.21	0.39	61.23
22	YVLQYTQV	8953.7	0.18	21779.0	0.37	0.41	58.89
23	QYTQVLQY	16332	0.72	16957.7	0.64	0.96	3.69
24	QVLQYRDK	53350.7	0.19	37362.7	0.15	1.43	-42.79
25	QYRDKQFA	48631.3	0.30	35995.7	0.12	1.35	-35.1
26	DKQFAPGE	3858.3	0.23	6025.3	0.41	0.64	35.97
27	FAPGENNY	1570.7	0.08	3771.0	0.47	0.42	58.35
28	GENNYHMC	4145	0.46	2956.3	0.29	1.40	-40.21
29	NYHMCSEP	15477.7	0.25	10679.0	0.28	1.45	-44.94
30	MCSEPEDY	2691.3	0.27	2277.0	0.04	1.18	-18.19
31	EPEDYLFW	39000.3	0.29	22877.3	0.48	1.70	-70.48
32	DYLFWDEI	36018	0.35	26517.3	0.41	1.36	-35.83
33	FWDEIHPT	42547	0.06	33693.3	0.11	1.26	-26.28
34	EIHPTTRA	44948.3	0.16	34519.3	0.10	1.30	-30.21
35	PTTRAHNY	14368.7	1.04	8278.0	0.27	1.74	-73.58
36	RAHNYLAY	49427	0.15	33002.0	0.07	1.50	-49.77
37	NYLAYEVC	49291.7	0.28	35699.5	0.07	1.38	-38.07
38	AYEVCMAL	44310.7	0.24	29063.0	0.31	1.52	-52.46
39	VCMALEEH	45951.7	0.13	27364.0	0.41	1.68	-67.93
40	ALEEHGYE	41489	0.07	24487.3	0.50	1.69	-69.43
41	EHGYEVTC	4041.7	0.20	2785.0	0.34	1.45	-45.12
42	YEVTCKMP	46801.7	0.12	33192.0	0.07	1.41	-41
43	TCKMPESA	9643	0.28	7885.0	0.22	1.22	-22.3

Anhang 2: Auswertung der PlaC-Peptid-Microarrays mit kleinem Spotdurchmesser. MW: Mittelwert; VarK: Varianzkoeffizient ; ProA/BSA: Ratio MW ProA Inkubation / MW BSA-Inkubation; Cleavage-Rate: Abnahme des Signals des einzelnen Spots nach ProA-Inkubation in Prozent. Alle Peptide die durch ProA proteolytisch gespalten wurden sind grün unterlegt.

Index	Peptid	MW ProA	VarK ProA	MW BSA	VarK BSA	ProA/BSA	Cleavage_rate (%)
1	AKRIDAWK	56992	0.18	41736.67	0.18	1.37	-36.55
2	IDAWKERY	51199	0.29	40525.00	0.32	1.26	-26.34
3	WKERYPTA	55214.7	0.19	40464.67	1.00	1.36	-36.45
4	RYPTADFL	51490.7	0.10	40447.67	0.48	1.27	-27.3
5	TADFLFVN	23768.7	0.27	33032.50	0.01	0.72	28.04
6	FLFVNTEQ	1512.3	0.47	1887.67	0.08	0.80	19.89
7	VNTEQYLK	48445	0.16	42787.33	0.54	1.13	-13.22
8	EQYLKKAF	51719.7	0.12	38829.33	0.19	1.33	-33.2
9	LKKAFEDP	56088.3	0.10	41390.33	0.15	1.36	-35.51
10	AFEDPEKY	56538.3	0.10	44444.67	0.03	1.27	-27.21
11	DPEKYGFY	57694.7	0.15	43119.33	0.32	1.34	-33.8
12	KYGFYNVK	57689.7	0.16	41098.67	0.79	1.40	-40.37
13	FYNVKDAC	52855.7	0.26	40832.33	0.17	1.29	-29.45
14	VKDACIDV	31910.7	0.25	22873.33	0.20	1.40	-39.51
15	ACIDVKFP	48431.3	0.23	35955.67	0.17	1.35	-34.7
16	DVKFPMFN	45544.3	0.17	35116.00	0.11	1.30	-29.7
17	FPMFNAFI	11668	0.13	24502.00	0.34	0.48	52.38
18	FNAFIHSP	40899	0.25	32203.00	0.01	1.27	-27
19	FIHSPFAR	44711	0.31	34666.33	0.12	1.29	-28.98
20	SPFARNYV	43660.7	0.17	35892.67	0.03	1.22	-21.64
21	ARNYVLQY	47845	0.08	36202.33	0.53	1.32	-32.16
22	YVLQYTQV	8953.7	0.18	26322.50	0.17	0.34	65.98
23	QYTQVLQY	31758.3	0.15	35904.50	0.04	0.88	11.55
24	QVLQYRDK	53350.7	0.19	37362.67	0.30	1.43	-42.79
25	QYRDKQFA	48631.3	0.30	36546.33	0.22	1.33	-33.07
26	DKQFAPGE	52942.7	0.17	41598.00	0.59	1.27	-27.27
27	FAPGENNY	49416.3	0.14	37176.00	0.79	1.33	-32.93
28	GENNYHMC	38617	0.06	36829.00	0.24	1.05	-4.85
29	NYHMCSEP	36001.3	0.06	34984.00	0.12	1.03	-2.91
30	MCSEPEDY	43680.7	0.12	37660.33	0.02	1.16	-15.99
31	EPEDYLFW	42955	0.22	33469.67	0.49	1.28	-28.34
32	DYLFWDEI	42177.7	0.21	32836.67	0.25	1.28	-28.45
33	FWDEIHPT	42547	0.06	34267.00	0.16	1.24	-24.16
34	EIHPTTRA	45021	0.16	35811.33	0.18	1.26	-25.72
35	PTTRAHNY	45918	0.23	34782.00	0.63	1.32	-32.02
36	RAHNYLAY	49427	0.15	33829.33	0.29	1.46	-46.11
37	NYLAYEVC	49291.7	0.28	24754.00	0.19	1.99	-99.13
38	AYEVCMAL	44310.7	0.24	29046.67	0.17	1.53	-52.55
39	VCMALEEH	45951.7	0.13	27221.67	0.15	1.69	-68.81
40	ALEEHGYE	41488.7	0.07	25177.00	0.12	1.65	-64.79
41	EHGYEVTC	41799.3	0.04	23472.00	0.21	1.78	-78.08
42	YEVTCKMP	46801.7	0.12	23447.33	0.23	2.00	-99.6
43	TCKMPESA	43782	0.09	25348.67	0.16	1.73	-72.72

PUBLIKATIONSLISTE

Publikationen:

- R Norton, H V Smith, N Wood, **E Siegbrecht**, A Ross, N Ketheesan (2004) "Invasive group A streptococcal disease in North Queensland (1996 - 2001)" Indian J Med Res. 2004 May;119 Suppl:148-51

- P Lasch, W Beyer, H Nattermann, M Staemmler, **E Siegbrecht**, D Naumann (2009) "Rapid Identification of *Bacillus anthracis* using MALDI-ToF Mass Spectrometry and Artificial Neural Networks" Appl Environ Microbiol. 2009 Nov;75(22):7229-42

- C Lang, E Rastew, B Herms, **E Siegbrecht**, R Ahrens, S Banerji, A Flieger (2011) "Loop deletion by the zinc metalloprotease ProA activates *Legionella pneumophila* glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase PlaC." Journal of Bacteriology (submitted)

Präsentationen:

- CNRS, Marseille, Frankreich, 11/2006
  Vortrag:"Identification and virulence properties of novel *Legionella* proteins contributing to lipolysis and proteolysis"

- VAAM, Osnabrück, 04/2007
  Poster: "Identification and virulence properties of novel *Legionella* proteins contributing to lipolysis and proteolysis"

- DGHM, Dresden, 09/2008
  Poster: "Novel potential *Legionella* virulence factors with hydrolytic activity"

REFERENZEN

(2009). "Infektionepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2009. Robert Koch-Institut."

Adeleke, A. A., B. S. Fields, et al. (2001). "Legionella drozanskii sp. nov., Legionella rowbothamii sp. nov. and Legionella fallonii sp. nov.: three unusual new Legionella species." Int J Syst Evol Microbiol **51**(Pt 3): 1151-60.

Alli, O. A., L. Y. Gao, et al. (2000). "Temporal pore formation-mediated egress from macrophages and alveolar epithelial cells by Legionella pneumophila." Infect Immun **68**(11): 6431-40.

Arpigny, J. L. and K. E. Jaeger (1999). "Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties." Biochem J **343 Pt 1**: 177-83.

Aurass, P., B. Pless, et al. (2009). "bdhA-patD operon as a virulence determinant, revealed by a novel large-scale approach for identification of Legionella pneumophila mutants defective for amoeba infection." Appl Environ Microbiol **75**(13): 4506-15.

Azghani, A. O. (1996). "Pseudomonas aeruginosa and epithelial permeability: role of virulence factors elastase and exotoxin A." Am J Respir Cell Mol Biol **15**(1): 132-40.

Banerji, S., P. Aurass, et al. (2008). "The manifold phospholipases A of Legionella pneumophila - identification, export, regulation, and their link to bacterial virulence." Int J Med Microbiol **298**(3-4): 169-81.

Banerji, S., M. Bewersdorff, et al. (2005). "Characterization of the major secreted zinc metalloprotease- dependent glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase, PlaC, of Legionella pneumophila." Infect Immun **73**(5): 2899-909.

Banga, S., P. Gao, et al. (2007). "Legionella pneumophila inhibits macrophage apoptosis by targeting pro-death members of the Bcl2 protein family." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(12): 5121-6.

Bartfeld, S., C. Engels, et al. (2009). "Temporal resolution of two-tracked NF-kappaB activation by Legionella pneumophila." Cell Microbiol **11**(11): 1638-51.

Baskerville, A., J. W. Conlan, et al. (1986). "Pulmonary damage caused by a protease from Legionella pneumophila." Br J Exp Pathol **67**(4): 527-36.

Bellinger-Kawahara, C. and M. A. Horwitz (1990). "Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of Legionella pneumophila and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes." J Exp Med **172**(4): 1201-10.

Bender, J., K. Rydzewski, et al. (2009). "Phospholipase PlaB of Legionella pneumophila represents a novel lipase family: protein residues essential for lipolytic activity, substrate specificity, and hemolysis." J Biol Chem.

Bender, J., K. Rydzewski, et al. (2009). "Phospholipase PlaB of Legionella pneumophila represents a novel lipase family: protein residues essential for lipolytic activity, substrate specificity, and hemolysis." J Biol Chem **284**(40): 27185-94.

Benkel, D. H., E. M. McClure, et al. (2000). "Outbreak of Legionnaires' disease associated with a display whirlpool spa." Int J Epidemiol **29**(6): 1092-8.

Benson, R. F. and B. S. Fields (1998). "Classification of the genus Legionella." Semin Respir Infect **13**(2): 90-9.

Bergan, T. (1981). "Pathogenetic factors of Pseudomonas aeruginosa." Scand J Infect Dis Suppl **29**: 7-12.

Berger, K. H., J. J. Merriam, et al. (1994). "Altered intracellular targeting properties associated with mutations in the Legionella pneumophila dotA gene." Mol Microbiol **14**(4): 809-22.

Bina, X. R., C. L. Lavine, et al. (2008). "The AcrAB RND efflux system from the live vaccine strain of Francisella tularensis is a multiple drug efflux system that is required for virulence in mice." FEMS Microbiol Lett **279**(2): 226-33.

Bina, X. R., D. Provenzano, et al. (2008). "Vibrio cholerae RND family efflux systems are required for antimicrobial resistance, optimal virulence factor production, and colonization of the infant mouse small intestine." Infect Immun **76**(8): 3595-605.

Black, W. J., F. D. Quinn, et al. (1990). "Legionella pneumophila zinc metalloprotease is structurally and functionally homologous to Pseudomonas aeruginosa elastase." J Bacteriol **172**(5): 2608-13.

Blackwood, L. L., R. M. Stone, et al. (1983). "Evaluation of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A and elastase as virulence factors in acute lung infection." Infect Immun **39**(1): 198-201.

Blander, S. J., L. Szeto, et al. (1990). "An immunoprotective molecule, the major secretory protein of Legionella pneumophila, is not a virulence factor in a guinea pig model of Legionnaires' disease." J Clin Invest **86**(3): 817-24.

Boddicker, J. D. and B. D. Jones (2004). "Lon protease activity causes down-regulation of Salmonella pathogenicity island 1 invasion gene expression after infection of epithelial cells." Infect Immun **72**(4): 2002-13.

Borges-Walmsley, M. I. and A. R. Walmsley (2001). "The structure and function of drug pumps." Trends Microbiol **9**(2): 71-9.

Brassinga, A. K., M. F. Hiltz, et al. (2003). "A 65-kilobase pathogenicity island is unique to Philadelphia-1 strains of Legionella pneumophila." J Bacteriol **185**(15): 4630-7.

Brieland, J., M. McClain, et al. (1996). "Coinoculation with Hartmannella vermiformis enhances replicative Legionella pneumophila lung infection in a murine model of Legionnaires' disease." Infect Immun **64**(7): 2449-56.

Broich, M., K. Rydzewski, et al. (2006). "The global regulatory proteins LetA and RpoS control phospholipase A, lysophospholipase A, acyltransferase, and other hydrolytic activities of Legionella pneumophila JR32." J Bacteriol **188**(4): 1218-26.

Broome, C. V. and D. W. Fraser (1979). "Epidemiologic aspects of legionellosis." Epidemiol Rev **1**: 1-16.

Bruggemann, H., C. Cazalet, et al. (2006). "Adaptation of Legionella pneumophila to the host environment: role of protein secretion, effectors and eukaryotic-like proteins." Curr Opin Microbiol **9**(1): 86-94.

Bu, X., L. Zhu, et al. (2008). "[HtpG protein of Shigella flexneri 2a strain 2457T evokes inflammatory response in mice]." Wei Sheng Wu Xue Bao **48**(7): 905-10.

Burstein, D., T. Zusman, et al. (2009). "Genome-scale identification of Legionella pneumophila effectors using a machine learning approach." PLoS Pathog **5**(7): e1000508.

Butler, S. M., R. A. Festa, et al. (2006). "Self-compartmentalized bacterial proteases and pathogenesis." Mol Microbiol **60**(3): 553-62.

Byrne, B. and M. S. Swanson (1998). "Expression of Legionella pneumophila virulence traits in response to growth conditions." Infect Immun **66**(7): 3029-34.

Chaves-Moreira, D., O. M. Chaim, et al. (2009). "Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom." J Cell Biochem **107**(4): 655-66.

Chen, C. C. and P. P. Cleary (1990). "Complete nucleotide sequence of the streptococcal C5a peptidase gene of Streptococcus pyogenes." J Biol Chem **265**(6): 3161-7.

Chen, J., K. S. de Felipe, et al. (2004). "Legionella effectors that promote nonlytic release from protozoa." Science **303**(5662): 1358-61.

Cianciotto, N. P., B. I. Eisenstein, et al. (1990). "A mutation in the mip gene results in an attenuation of Legionella pneumophila virulence." J Infect Dis **162**(1): 121-6.

Cianciotto, N. P. and B. S. Fields (1992). "Legionella pneumophila mip gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(11): 5188-91.

Cirillo, J. D., S. L. Cirillo, et al. (1999). "Intracellular growth in Acanthamoeba castellanii affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of Legionella pneumophila." Infect Immun **67**(9): 4427-34.

Cirillo, S. L., L. E. Bermudez, et al. (2001). "Legionella pneumophila entry gene rtxA is involved in virulence." Infect Immun **69**(1): 508-17.
Cirillo, S. L., J. Lum, et al. (2000). "Identification of novel loci involved in entry by Legionella pneumophila." Microbiology **146 (Pt 6)**: 1345-59.
Cirillo, S. L., L. Yan, et al. (2002). "Role of the Legionella pneumophila rtxA gene in amoebae." Microbiology **148**(Pt 6): 1667-77.
Clarke, L. and J. Carbon (1976). "A colony bank containing synthetic Col El hybrid plasmids representative of the entire E. coli genome." Cell **9**(1): 91-9.
Coers, J., J. C. Kagan, et al. (2000). "Identification of Icm protein complexes that play distinct roles in the biogenesis of an organelle permissive for Legionella pneumophila intracellular growth." Mol Microbiol **38**(4): 719-36.
Conlan, J. W., A. Baskerville, et al. (1986). "Separation of Legionella pneumophila proteases and purification of a protease which produces lesions like those of Legionnaires' disease in guinea pig lung." J Gen Microbiol **132**(6): 1565-74.
Conlan, J. W., A. Williams, et al. (1988). "In vivo production of a tissue-destructive protease by Legionella pneumophila in the lungs of experimentally infected guinea-pigs." J Gen Microbiol **134**(1): 143-9.
Conlan, J. W., A. Williams, et al. (1988). "Inactivation of human alpha-1-antitrypsin by a tissue-destructive protease of Legionella pneumophila." J Gen Microbiol **134**(2): 481-7.
Conover, G. M., I. Derre, et al. (2003). "The Legionella pneumophila LidA protein: a translocated substrate of the Dot/Icm system associated with maintenance of bacterial integrity." Mol Microbiol **48**(2): 305-21.
Csermely, P., T. Schnaider, et al. (1998). "The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review." Pharmacol Ther **79**(2): 129-68.
Diederen, B. M. (2008). "Legionella spp. and Legionnaires' disease." J Infect **56**(1): 1-12.
Dreyfus, L. A. (1987). "Virulence associated ingestion of Legionella pneumophila by HeLa cells." Microb Pathog **3**(1): 45-52.
Dreyfus, L. A. and B. H. Iglewski (1986). "Purification and characterization of an extracellular protease of Legionella pneumophila." Infect Immun **51**(3): 736-43.
Edelstein, P. H. (1981). "Improved semiselective medium for isolation of Legionella pneumophila from contaminated clinical and environmental specimens." J Clin Microbiol **14**(3): 298-303.
Edelstein, P. H. (2007). "Urine antigen tests positive for Pontiac fever: implications for diagnosis and pathogenesis." Clin Infect Dis **44**(2): 229-31.
Elsheikh, L. E., T. Kronevi, et al. (1987). "Assessment of elastase as a Pseudomonas aeruginosa virulence factor in experimental lung infection in mink." Vet Microbiol **13**(3): 281-9.
Engel, L. S., J. M. Hill, et al. (1998). "Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from Pseudomonas aeruginosa." J Biol Chem **273**(27): 16792-7.
Engel, L. S., J. M. Hill, et al. (1998). "Pseudomonas aeruginosa protease IV produces corneal damage and contributes to bacterial virulence." Invest Ophthalmol Vis Sci **39**(3): 662-5.
Ensminger, A. W. and R. R. Isberg (2009). "Legionella pneumophila Dot/Icm translocated substrates: a sum of parts." Curr Opin Microbiol **12**(1): 67-73.
Feeley, J. C., R. J. Gibson, et al. (1979). "Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for Legionella pneumophila." J Clin Microbiol **10**(4): 437-41.
Ferhat, M., D. Atlan, et al. (2009). "The TolC protein of Legionella pneumophila plays a major role in multi-drug resistance and the early steps of host invasion." PLoS One **4**(11): e7732.
Fick, R. B., Jr., R. S. Baltimore, et al. (1985). "IgG proteolytic activity of Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis." J Infect Dis **151**(4): 589-98.
Fields, B. S. (1996). "The molecular ecology of legionellae." Trends Microbiol **4**(7): 286-90.
Fields, B. S., R. F. Benson, et al. (2002). "Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation." Clin Microbiol Rev **15**(3): 506-26.

Finlay, B. B. and S. Falkow (1997). "Common themes in microbial pathogenicity revisited." Microbiol Mol Biol Rev **61**(2): 136-69.

Flieger, A., B. Neumeister, et al. (2002). "Characterization of the gene encoding the major secreted lysophospholipase A of Legionella pneumophila and its role in detoxification of lysophosphatidylcholine." Infect Immun **70**(11): 6094-106.

Flieger, A., K. Rydzewski, et al. (2004). "Cloning and characterization of the gene encoding the major cell-associated phospholipase A of Legionella pneumophila, plaB, exhibiting hemolytic activity." Infect Immun **72**(5): 2648-58.

Flieger, A., S. banerji, M. Broich, K. Rydzewski, and W. S. Shadrach (2003). "Pathogenese der Legionelleninfektion." Bundesgesundheitsblatt **46**: 694-699.

Fliermans, C. B., W. B. Cherry, et al. (1981). "Ecological distribution of Legionella pneumophila." Appl Environ Microbiol **41**(1): 9-16.

Fralick, J. A. (1996). "Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of Escherichia coli." J Bacteriol **178**(19): 5803-5.

Franco, I. S., H. A. Shuman, et al. (2009). "The perplexing functions and surprising origins of Legionella pneumophila type IV secretion effectors." Cell Microbiol **11**(10): 1435-43.

Frees, D., A. Chastanet, et al. (2004). "Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in Staphylococcus aureus." Mol Microbiol **54**(5): 1445-62.

Frees, D., S. N. Qazi, et al. (2003). "Alternative roles of ClpX and ClpP in Staphylococcus aureus stress tolerance and virulence." Mol Microbiol **48**(6): 1565-78.

Frees, D., K. Savijoki, et al. (2007). "Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria." Mol Microbiol **63**(5): 1285-95.

Fukata, M. and K. Kaibuchi (2001). "Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(12): 887-97.

Gaillot, O., E. Pellegrini, et al. (2000). "The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of Listeria monocytogenes." Mol Microbiol **35**(6): 1286-94.

Galloway, D. R. (1991). "Pseudomonas aeruginosa elastase and elastolysis revisited: recent developments." Mol Microbiol **5**(10): 2315-21.

Gao, L. Y., M. Susa, et al. (1999). "Heterogeneity in intracellular replication and cytopathogenicity of Legionella pneumophila and Legionella micdadei in mammalian and protozoan cells." Microb Pathog **27**(5): 273-87.

Garcia-del Portillo, F. and B. B. Finlay (1995). "The varied lifestyles of intracellular pathogens within eukaryotic vacuolar compartments." Trends Microbiol **3**(10): 373-80.

Garduno, R. A., E. Garduno, et al. (2002). "Intracellular growth of Legionella pneumophila gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms." Infect Immun **70**(11): 6273-83.

Ge, J. and F. Shao (2011). "Manipulation of host vesicular trafficking and innate immune defense by Legionella Dot/Icm effectors." Cell Microbiol.

Glick, T. H., M. B. Gregg, et al. (1978). "Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects." Am J Epidemiol **107**(2): 149-60.

Grkovic, S., M. H. Brown, et al. (2002). "Regulation of bacterial drug export systems." Microbiol Mol Biol Rev **66**(4): 671-701, table of contents.

Hagele, S., R. Kohler, et al. (2000). "Dictyostelium discoideum: a new host model system for intracellular pathogens of the genus Legionella." Cell Microbiol **2**(2): 165-71.

Hales, L. M. and H. A. Shuman (1999). "Legionella pneumophila contains a type II general secretion pathway required for growth in amoebae as well as for secretion of the Msp protease." Infect Immun **67**(7): 3662-6.

Hammer, B. K. and M. S. Swanson (1999). "Co-ordination of legionella pneumophila virulence with entry into stationary phase by ppGpp." Mol Microbiol **33**(4): 721-31.

Hase, C. C. and R. A. Finkelstein (1990). "Comparison of the Vibrio cholerae hemagglutinin/protease and the Pseudomonas aeruginosa elastase." Infect Immun **58**(12): 4011-5.

Heath, C. H., D. I. Grove, et al. (1996). "Delay in appropriate therapy of Legionella pneumonia associated with increased mortality." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **15**(4): 286-90.
Hebert, G. A., C. W. Moss, et al. (1980). "The rickettsia-like organisms TATLOCK (1943) and HEBA (1959): bacteria phenotypically similar to but genetically distinct from Legionella pneumophila and the WIGA bacterium." Ann Intern Med **92**(1): 45-52.
Heck, L. W., P. G. Alarcon, et al. (1990). "Degradation of IgA proteins by Pseudomonas aeruginosa elastase." J Immunol **144**(6): 2253-7.
Heck, L. W., K. Morihara, et al. (1986). "Specific cleavage of human type III and IV collagens by Pseudomonas aeruginosa elastase." Infect Immun **51**(1): 115-8.
Helbig, J. H., S. Bernander, et al. (2002). "Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of Legionella pneumophila serogroups and monoclonal subgroups." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **21**(10): 710-6.
Higgins, M. K., E. Bokma, et al. (2004). "Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(27): 9994-9.
Hilbi, H., G. Segal, et al. (2001). "Icm/dot-dependent upregulation of phagocytosis by Legionella pneumophila." Mol Microbiol **42**(3): 603-17.
Hirakata, Y., R. Srikumar, et al. (2002). "Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of Pseudomonas aeruginosa." J Exp Med **196**(1): 109-18.
Hoffman, P. S., L. Pine, et al. (1983). "Production of superoxide and hydrogen peroxide in medium used to culture Legionella pneumophila: catalytic decomposition by charcoal." Appl Environ Microbiol **45**(3): 784-91.
Holder, I. A. and C. G. Haidaris (1979). "Experimental studies of the pathogenesis of infections due to Pseudomonas aeruginosa: extracellular protease and elastase as in vivo virulence factors." Can J Microbiol **25**(5): 593-9.
Holder, I. A. and A. N. Neely (1989). "Pseudomonas elastase acts as a virulence factor in burned hosts by Hageman factor-dependent activation of the host kinin cascade." Infect Immun **57**(11): 3345-8.
Hong, Y. Q. and B. Ghebrehiwet (1992). "Effect of Pseudomonas aeruginosa elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3." Clin Immunol Immunopathol **62**(2): 133-8.
Horwitz, M. A. (1983). "Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (Legionella pneumophila) in human monocytes." J Exp Med **158**(4): 1319-31.
Horwitz, M. A. (1983). "The Legionnaires' disease bacterium (Legionella pneumophila) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes." J Exp Med **158**(6): 2108-26.
Horwitz, M. A. (1984). "Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (Legionella pneumophila) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil." Cell **36**(1): 27-33.
Huang, B., Z. Yuan, et al. (2006). "Distribution of 19 major virulence genes in Legionella pneumophila serogroup 1 isolates from patients and water in Queensland, Australia." J Med Microbiol **55**(Pt 8): 993-7.
Hubber, A. and C. R. Roy (2010). "Modulation of host cell function by Legionella pneumophila type IV effectors." Annu Rev Cell Dev Biol **26**: 261-83.
Huston, W. M., C. Theodoropoulos, et al. (2008). "Chlamydia trachomatis responds to heat shock, penicillin induced persistence, and IFN-gamma persistence by altering levels of the extracytoplasmic stress response protease HtrA." BMC Microbiol **8**: 190.
Jacquot, J., J. M. Tournier, et al. (1985). "In vitro evidence that human airway lysozyme is cleaved and inactivated by Pseudomonas aeruginosa elastase and not by human leukocyte elastase." Infect Immun **47**(2): 555-60.
Jaeger, K. E., S. Ransac, et al. (1993). "Topological characterization and modeling of the 3D structure of lipase from Pseudomonas aeruginosa." FEBS Lett **332**(1-2): 143-9.
Jermy, A. (2011). "Bacterial pathogenesis: legionella effector under friendly fire." Nat Rev Microbiol **9**(2): 80.

Jongeneel, C. V., J. Bouvier, et al. (1989). "A unique signature identifies a family of zinc-dependent metallopeptidases." FEBS Lett **242**(2): 211-4.
Katz, S. M. and J. M. Hammel (1987). "The effect of drying, heat, and pH on the survival of Legionella pneumophila." Ann Clin Lab Sci **17**(3): 150-6.
Katz, S. M. and S. Hashemi (1982). "Electron microscopic examination of the inflammatory response to Legionella pneumophila in guinea pigs." Lab Invest **46**(1): 24-32.
Keen, M. G. and P. S. Hoffman (1989). "Characterization of a Legionella pneumophila extracellular protease exhibiting hemolytic and cytotoxic activities." Infect Immun **57**(3): 732-8.
Khemiri, A., A. Galland, et al. (2008). "Outer-membrane proteomic maps and surface-exposed proteins of Legionella pneumophila using cellular fractionation and fluorescent labelling." Anal Bioanal Chem **390**(7): 1861-71.
Kirby, J. E., J. P. Vogel, et al. (1998). "Evidence for pore-forming ability by Legionella pneumophila." Mol Microbiol **27**(2): 323-36.
Krukenberg, K. A., F. Forster, et al. (2008). "Multiple conformations of E. coli Hsp90 in solution: insights into the conformational dynamics of Hsp90." Structure **16**(5): 755-65.
Kubori, T., A. Hyakutake, et al. (2008). "Legionella translocates an E3 ubiquitin ligase that has multiple U-boxes with distinct functions." Mol Microbiol **67**(6): 1307-19.
Kukkonen, M. and T. K. Korhonen (2004). "The omptin family of enterobacterial surface proteases/adhesins: from housekeeping in Escherichia coli to systemic spread of Yersinia pestis." Int J Med Microbiol **294**(1): 7-14.
Kukkonen, M., M. Suomalainen, et al. (2004). "Lack of O-antigen is essential for plasminogen activation by Yersinia pestis and Salmonella enterica." Mol Microbiol **51**(1): 215-25.
Kumar, A. and H. P. Schweizer (2005). "Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake." Adv Drug Deliv Rev **57**(10): 1486-513.
Kuramitsu, H. K. (1998). "Proteases of Porphyromonas gingivalis: what don't they do?" Oral Microbiol Immunol **13**(5): 263-70.
La Scola, B., R. J. Birtles, et al. (2004). "Legionella drancourtii sp. nov., a strictly intracellular amoebal pathogen." Int J Syst Evol Microbiol **54**(Pt 3): 699-703.
Laguna, R. K., E. A. Creasey, et al. (2006). "A Legionella pneumophila-translocated substrate that is required for growth within macrophages and protection from host cell death." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(49): 18745-50.
Lahteenmaki, K., P. Kyllonen, et al. (2005). "Antiprotease inactivation by Salmonella enterica released from infected macrophages." Cell Microbiol **7**(4): 529-38.
Lang, C. and A. Flieger (2011). "Characterisation of Legionella pneumophila phospholipases and their impact on host cells." Eur J Cell Biol **90**(11): 903-12.
Lang C., R. E., Hermes B.,Siegbrecht E., Ahrens R., Banerji S., Flieger A. (2011). "Loop deletion by the zinc metalloprotease ProA activates Legionella pneumophila glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase PlaC." Journal of Bacteriology.
Levin, A. S. (2009). "Nosocomial legionellosis: prevention and management." Expert Rev Anti Infect Ther **7**(1): 57-68.
Lewis, C., H. Skovierova, et al. (2009). "Salmonella enterica Serovar Typhimurium HtrA: regulation of expression and role of the chaperone and protease activities during infection." Microbiology **155**(Pt 3): 873-81.
Lewthwaite, J., A. Skinner, et al. (1998). "Are molecular chaperones microbial virulence factors?" Trends Microbiol **6**(11): 426-8.
Li, X. H., Y. L. Zeng, et al. "The ClpP protease homologue is required for the transmission traits and cell division of the pathogen Legionella pneumophila." BMC Microbiol **10**: 54.
Liles, M. R., P. H. Edelstein, et al. (1999). "The prepilin peptidase is required for protein secretion by and the virulence of the intracellular pathogen Legionella pneumophila." Mol Microbiol **31**(3): 959-70.

Lipinska, B., S. Sharma, et al. (1988). "Sequence analysis and regulation of the htrA gene of Escherichia coli: a sigma 32-independent mechanism of heat-inducible transcription." Nucleic Acids Res **16**(21): 10053-67.

Liu, Y., P. Gao, et al. (2008). "An in vivo gene deletion system for determining temporal requirement of bacterial virulence factors." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(27): 9385-90.

Lomovskaya, O., H. I. Zgurskaya, et al. (2002). "It takes three to tango." Nat Biotechnol **20**(12): 1210-2.

Lowe, D. C., T. C. Savidge, et al. (1999). "Characterization of candidate live oral Salmonella typhi vaccine strains harboring defined mutations in aroA, aroC, and htrA." Infect Immun **67**(2): 700-7.

Ludwig, A. (1996). "Cytolytic toxins from gram-negative bacteria." Microbiologia **12**(2): 281-96.

Ludwig, A., F. Garcia, et al. (1996). "Analysis of the in vivo activation of hemolysin (HlyA) from Escherichia coli." J Bacteriol **178**(18): 5422-30.

Ludwig, A. and W. Goebel (2000). "Dangerous signals from E. coli toxin." Nat Med **6**(7): 741-2.

Lund, P. A. (2001). "Microbial molecular chaperones." Adv Microb Physiol **44**: 93-140.

Luo, Z. Q. and R. R. Isberg (2004). "Multiple substrates of the Legionella pneumophila Dot/Icm system identified by interbacterial protein transfer." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(3): 841-6.

Ma, D., D. N. Cook, et al. (1993). "Molecular cloning and characterization of acrA and acrE genes of Escherichia coli." J Bacteriol **175**(19): 6299-313.

Ma, D., D. N. Cook, et al. (1995). "Genes acrA and acrB encode a stress-induced efflux system of Escherichia coli." Mol Microbiol **16**(1): 45-55.

Macfarlane, J. T., A. C. Miller, et al. (1984). "Comparative radiographic features of community acquired Legionnaires' disease, pneumococcal pneumonia, mycoplasma pneumonia, and psittacosis." Thorax **39**(1): 28-33.

Machner, M. P. and R. R. Isberg (2006). "Targeting of host Rab GTPase function by the intravacuolar pathogen Legionella pneumophila." Dev Cell **11**(1): 47-56.

Mahoney, F. J., C. W. Hoge, et al. (1992). "Communitywide outbreak of Legionnaires' disease associated with a grocery store mist machine." J Infect Dis **165**(4): 736-9.

Mao, W., M. S. Warren, et al. (2002). "On the mechanism of substrate specificity by resistance nodulation division (RND)-type multidrug resistance pumps: the large periplasmic loops of MexD from Pseudomonas aeruginosa are involved in substrate recognition." Mol Microbiol **46**(3): 889-901.

Marquis, H., H. Goldfine, et al. (1997). "Proteolytic pathways of activation and degradation of a bacterial phospholipase C during intracellular infection by Listeria monocytogenes." J Cell Biol **137**(6): 1381-92.

Marquis, H. and E. J. Hager (2000). "pH-regulated activation and release of a bacteria-associated phospholipase C during intracellular infection by Listeria monocytogenes." Mol Microbiol **35**(2): 289-98.

Marr, A. K., J. Overhage, et al. (2007). "The Lon protease of Pseudomonas aeruginosa is induced by aminoglycosides and is involved in biofilm formation and motility." Microbiology **153**(Pt 2): 474-82.

Marston, B. J., H. B. Lipman, et al. (1994). "Surveillance for Legionnaires' disease. Risk factors for morbidity and mortality." Arch Intern Med **154**(21): 2417-22.

Martin, F. A., D. M. Posadas, et al. (2009). "Interplay between two RND systems mediating antimicrobial resistance in Brucella suis." J Bacteriol **191**(8): 2530-40.

Maruta, K., H. Miyamoto, et al. (1998). "Entry and intracellular growth of Legionella dumoffii in alveolar epithelial cells." Am J Respir Crit Care Med **157**(6 Pt 1): 1967-74.

Matthews, B. W., J. N. Jansonius, et al. (1972). "Three-dimensional structure of thermolysin." Nat New Biol **238**(80): 37-41.

McCoy-Simandle, K., C. R. Stewart, et al. (2011). "Legionella pneumophila type II secretion dampens the cytokine response of infected macrophages and epithelia." Infect Immun **79**(5): 1984-97.

McDade, J. E., C. C. Shepard, et al. (1977). "Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease." N Engl J Med **297**(22): 1197-203.
Mintz, C. S., R. D. Miller, et al. (1993). "Legionella pneumophila protease inactivates interleukin-2 and cleaves CD4 on human T cells." Infect Immun **61**(8): 3416-21.
Moffat, J. F., W. J. Black, et al. (1994). "Further molecular characterization of the cloned Legionella pneumophila zinc metalloprotease." Infect Immun **62**(2): 751-3.
Moffat, J. F., P. H. Edelstein, et al. (1994). "Effects of an isogenic Zn-metalloprotease-deficient mutant of Legionella pneumophila in a guinea-pig pneumonia model." Mol Microbiol **12**(5): 693-705.
Mohamedmohaideen, N. N., S. K. Palaninathan, et al. (2008). "Structure and function of the virulence-associated high-temperature requirement A of Mycobacterium tuberculosis." Biochemistry **47**(23): 6092-102.
Mohr, C. D., L. Rust, et al. (1990). "Expression patterns of genes encoding elastase and controlling mucoidy: co-ordinate regulation of two virulence factors in Pseudomonas aeruginosa isolates from cystic fibrosis." Mol Microbiol **4**(12): 2103-10.
Molmeret, M. and Y. Abu Kwaik (2002). "How does Legionella pneumophila exit the host cell?" Trends Microbiol **10**(6): 258-60.
Molmeret, M., O. A. Alli, et al. (2002). "icmT is essential for pore formation-mediated egress of Legionella pneumophila from mammalian and protozoan cells." Infect Immun **70**(1): 69-78.
Molmeret, M., O. A. T. Alli, et al. (2002). "icmT Is Essential for Pore Formation-Mediated Egress of Legionella pneumophila from Mammalian and Protozoan Cells." Infect. Immun. **70**(1): 69-78.
Montecucco, C. and G. Schiavo (1993). "Tetanus and botulism neurotoxins: a new group of zinc proteases." Trends Biochem Sci **18**(9): 324-7.
Montefort, S., J. Baker, et al. (1993). "The distribution of adhesive mechanisms in the normal bronchial epithelium." Eur Respir J **6**(9): 1257-63.
Morihara, K., H. Tsuzuki, et al. (1979). "Protease and elastase of Pseudomonas aeruginosa: inactivation of human plasma alpha 1-proteinase inhibitor." Infect Immun **24**(1): 188-93.
Mouchtouri, V. A., G. Goutziana, et al. "Legionella species colonization in cooling towers: risk factors and assessment of control measures." Am J Infect Control **38**(1): 50-5.
Muder, R. R. and V. L. Yu (2002). "Infection due to Legionella species other than L. pneumophila." Clin Infect Dis **35**(8): 990-8.
Muder, R. R., V. L. Yu, et al. (1983). "Simultaneous infection with Legionella pneumophila and Pittsburgh pneumonia agent. Clinical features and epidemiologic implications." Am J Med **74**(4): 609-14.
Murakami, S., R. Nakashima, et al. (2002). "Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB." Nature **419**(6907): 587-93.
Murata, T., A. Delprato, et al. (2006). "The Legionella pneumophila effector protein DrrA is a Rab1 guanine nucleotide-exchange factor." Nat Cell Biol **8**(9): 971-7.
Murga, R., T. S. Forster, et al. (2001). "Role of biofilms in the survival of Legionella pneumophila in a model potable-water system." Microbiology **147**(Pt 11): 3121-6.
Nagai, H., J. C. Kagan, et al. (2002). "A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on Legionella phagosomes." Science **295**(5555): 679-82.
Newton, H. J., D. K. Ang, et al. (2011). "Molecular pathogenesis of infections caused by Legionella pneumophila." Clin Microbiol Rev **23**(2): 274-98.
Newton, H. J., F. M. Sansom, et al. (2008). "Significant role for ladC in initiation of Legionella pneumophila infection." Infect Immun **76**(7): 3075-85.
Nikaido, H. (1996). "Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria." J Bacteriol **178**(20): 5853-9.
Ninio, S. and C. R. Roy (2007). "Effector proteins translocated by Legionella pneumophila: strength in numbers." Trends Microbiol **15**(8): 372-80.
O'Neil, H. S., B. M. Forster, et al. (2009). "The propeptide of the metalloprotease of Listeria monocytogenes controls compartmentalization of the zymogen during intracellular infection." J Bacteriol **191**(11): 3594-603.

Owen, B. A., W. P. Sullivan, et al. (2002). "Regulation of heat shock protein 90 ATPase activity by sequences in the carboxyl terminus." J Biol Chem **277**(9): 7086-91.

Palusinska-Szysz, M. and M. Cendrowska-Pinkosz (2009). "Pathogenicity of the family Legionellaceae." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **57**(4): 279-90.

Parmely, M., A. Gale, et al. (1990). "Proteolytic inactivation of cytokines by Pseudomonas aeruginosa." Infect Immun **58**(9): 3009-14.

Parry, D. A., R. D. Fraser, et al. (2008). "Fifty years of coiled-coils and alpha-helical bundles: a close relationship between sequence and structure." J Struct Biol **163**(3): 258-69.

Pasculle, A. W., J. C. Feeley, et al. (1980). "Pittsburgh pneumonia agent: direct isolation from human lung tissue." J Infect Dis **141**(6): 727-32.

Pavlovskis, O. R. and B. Wretlind (1979). "Assessment of protease (elastase) as a Pseudomonas aeruginosa virulence factor in experimental mouse burn infection." Infect Immun **24**(1): 181-7.

Pedersen, L. L., M. Radulic, et al. (2001). "HtrA homologue of Legionella pneumophila: an indispensable element for intracellular infection of mammalian but not protozoan cells." Infect Immun **69**(4): 2569-79.

Phillips, R. W. and R. M. Roop, 2nd (2001). "Brucella abortus HtrA functions as an authentic stress response protease but is not required for wild-type virulence in BALB/c mice." Infect Immun **69**(9): 5911-3.

Plaut, A. G. (1983). "The IgA1 proteases of pathogenic bacteria." Annu Rev Microbiol **37**: 603-22.

Plouffe, J. F., T. M. File, Jr., et al. (1995). "Reevaluation of the definition of Legionnaires' disease: use of the urinary antigen assay. Community Based Pneumonia Incidence Study Group." Clin Infect Dis **20**(5): 1286-91.

Polesky, A. H., J. T. Ross, et al. (2001). "Identification of Legionella pneumophila genes important for infection of amoebas by signature-tagged mutagenesis." Infect Immun **69**(2): 977-87.

Poole, K., D. E. Heinrichs, et al. (1993). "Cloning and sequence analysis of an EnvCD homologue in Pseudomonas aeruginosa: regulation by iron and possible involvement in the secretion of the siderophore pyoverdine." Mol Microbiol **10**(3): 529-44.

Pos, K. M., A. Schiefner, et al. (2004). "Crystallographic analysis of AcrB." FEBS Lett **564**(3): 333-9.

Quinn, F. D. and L. S. Tompkins (1989). "Analysis of a cloned sequence of Legionella pneumophila encoding a 38 kD metalloprotease possessing haemolytic and cytotoxic activities." Mol Microbiol **3**(6): 797-805.

Ragaz, C., H. Pietsch, et al. (2008). "The Legionella pneumophila phosphatidylinositol-4 phosphate-binding type IV substrate SidC recruits endoplasmic reticulum vesicles to a replication-permissive vacuole." Cell Microbiol **10**(12): 2416-33.

Ramu, P., L. A. Lobo, et al. (2008). "Activation of pro-matrix metalloproteinase-9 and degradation of gelatin by the surface protease PgtE of Salmonella enterica serovar Typhimurium." Int J Med Microbiol **298**(3-4): 263-78.

Ramu, P., R. Tanskanen, et al. (2007). "The surface protease PgtE of Salmonella enterica affects complement activity by proteolytically cleaving C3b, C4b and C5." FEBS Lett **581**(9): 1716-20.

Rawlings, N. D., A. J. Barrett, et al. "MEROPS: the peptidase database." Nucleic Acids Res **38**(Database issue): D227-33.

Rechnitzer, C. and J. Blom (1989). "Engulfment of the Philadelphia strain of Legionella pneumophila within pseudopod coils in human phagocytes. Comparison with other Legionella strains and species." Apmis **97**(2): 105-14.

Rechnitzer, C., M. Diamant, et al. (1989). "Inhibition of human natural killer cell activity by Legionella pneumophila protease." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **8**(11): 989-92.

Rechnitzer, C., A. Williams, et al. (1992). "Demonstration of the intracellular production of tissue-destructive protease by Legionella pneumophila multiplying within guinea-pig and human alveolar macrophages." J Gen Microbiol **138 Pt 8**: 1671-7.

Robertson, G. T., M. E. Kovach, et al. (2000). "The Brucella abortus Lon functions as a generalized stress response protease and is required for wild-type virulence in BALB/c mice." Mol Microbiol **35**(3): 577-88.

Robinson, C. G. and C. R. Roy (2006). "Attachment and fusion of endoplasmic reticulum with vacuoles containing Legionella pneumophila." Cell Microbiol **8**(5): 793-805.

Rogers, J. and C. W. Keevil (1992). "Immunogold and fluorescein immunolabelling of Legionella pneumophila within an aquatic biofilm visualized by using episcopic differential interference contrast microscopy." Appl Environ Microbiol **58**(7): 2326-30.

Roop, R. M., 2nd, R. W. Phillips, et al. (2001). "Re-examination of the role of the Brucella melitensis HtrA stress response protease in virulence in pregnant goats." Vet Microbiol **82**(1): 91-5.

Rossier, O., J. Dao, et al. (2008). "The type II secretion system of Legionella pneumophila elaborates two aminopeptidases, as well as a metalloprotease that contributes to differential infection among protozoan hosts." Appl Environ Microbiol **74**(3): 753-61.

Rossier, O., J. Dao, et al. (2009). "A type II secreted RNase of Legionella pneumophila facilitates optimal intracellular infection of Hartmannella vermiformis." Microbiology **155**(Pt 3): 882-90.

Rossignol, G., A. Merieau, et al. (2008). "Involvement of a phospholipase C in the hemolytic activity of a clinical strain of Pseudomonas fluorescens." BMC Microbiol **8**: 189.

Rowbotham, T. J. (1986). "Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man." Isr J Med Sci **22**(9): 678-89.

Rowe, G. E. and R. A. Welch (1994). "Assays of hemolytic toxins." Methods Enzymol **235**: 657-67.

Roy, C. R., K. H. Berger, et al. (1998). "Legionella pneumophila DotA protein is required for early phagosome trafficking decisions that occur within minutes of bacterial uptake." Mol Microbiol **28**(3): 663-74.

Sahney, N. N., J. T. Summersgill, et al. (2001). "Inhibition of oxidative burst and chemotaxis in human phagocytes by Legionella pneumophila zinc metalloprotease." J Med Microbiol **50**(6): 517-25.

Saier, M. H., Jr., I. T. Paulsen, et al. (1998). "Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria." Faseb J **12**(3): 265-74.

Saier, M. H., Jr., R. Tam, et al. (1994). "Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport." Mol Microbiol **11**(5): 841-7.

Sauer, J. D., M. A. Bachman, et al. (2005). "The phagosomal transporter A couples threonine acquisition to differentiation and replication of Legionella pneumophila in macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(28): 9924-9.

Schnupf, P. and D. A. Portnoy (2007). "Listeriolysin O: a phagosome-specific lysin." Microbes Infect **9**(10): 1176-87.

Schultz, D. R. and K. D. Miller (1974). "Elastase of Pseudomonas aeruginosa: inactivation of complement components and complement-derived chemotactic and phagocytic factors." Infect Immun **10**(1): 128-35.

Schunder, E., P. Adam, et al. (2010). "Phospholipase PlaB is a new virulence factor of Legionella pneumophila." Int J Med Microbiol **300**(5): 313-23.

Segal, G., M. Purcell, et al. (1998). "Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the Legionella pneumophila genome." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(4): 1669-74.

Shadrach, W. S., K. Rydzewski, et al. (2005). "Balamuthia mandrillaris, free-living ameba and opportunistic agent of encephalitis, is a potential host for Legionella pneumophila bacteria." Appl Environ Microbiol **71**(5): 2244-9.

Shelburne, C. E., M. D. Coopamah, et al. (2007). "HtpG, the Porphyromonas gingivalis HSP-90 homologue, induces the chemokine CXCL8 in human monocytic and microvascular vein endothelial cells." Cell Microbiol **9**(6): 1611-9.

Shiau, A. K., S. F. Harris, et al. (2006). "Structural Analysis of E. coli hsp90 reveals dramatic nucleotide-dependent conformational rearrangements." Cell **127**(2): 329-40.

Shohdy, N., J. A. Efe, et al. (2005). "Pathogen effector protein screening in yeast identifies Legionella factors that interfere with membrane trafficking." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(13): 4866-71.
Smith-Somerville, H. E., V. B. Huryn, et al. (1991). "Survival of Legionella pneumophila in the cold-water ciliate Tetrahymena vorax." Appl Environ Microbiol **57**(9): 2742-9.
Soares, G. C., B. A. da Silva, et al. (2008). "Metallopeptidases produced by group B Streptococcus: influence of proteolytic inhibitors on growth and on interaction with human cell lineages." Int J Mol Med **22**(1): 119-25.
Sodeinde, O. A., Y. V. Subrahmanyam, et al. (1992). "A surface protease and the invasive character of plague." Science **258**(5084): 1004-7.
Spence, J. and C. Georgopoulos (1989). "Purification and properties of the Escherichia coli heat shock protein, HtpG." J Biol Chem **264**(8): 4398-403.
Steinert, M., G. Ockert, et al. (1998). "Regrowth of Legionella pneumophila in a heat-disinfected plumbing system." Zentralbl Bakteriol **288**(3): 331-42.
Stewart, C. R., D. M. Burnside, et al. (2011). "The Surfactant of Legionella pneumophila Is Secreted in a TolC-Dependent Manner and Is Antagonistic toward Other Legionella Species." J Bacteriol **193**(21): 5971-84.
Stone, B. J. and Y. Abu Kwaik (1998). "Expression of multiple pili by Legionella pneumophila: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells." Infect Immun **66**(4): 1768-75.
Stout, J. E. and V. L. Yu (1997). "Legionellosis." N Engl J Med **337**(10): 682-7.
Strauch, K. L. and J. Beckwith (1988). "An Escherichia coli mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(5): 1576-80.
Sturgill-Koszycki, S. and M. S. Swanson (2000). "Legionella pneumophila replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles." J Exp Med **192**(9): 1261-72.
Sulavik, M. C., C. Houseweart, et al. (2001). "Antibiotic susceptibility profiles of Escherichia coli strains lacking multidrug efflux pump genes." Antimicrob Agents Chemother **45**(4): 1126-36.
Swanson, M. S. and B. K. Hammer (2000). "Legionella pneumophila pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages." Annu Rev Microbiol **54**: 567-613.
Sweier, D. G., A. Combs, et al. (2003). "Construction and characterization of a Porphyromonas gingivalis htpG disruption mutant." FEMS Microbiol Lett **225**(1): 101-6.
Szeto, L. and H. A. Shuman (1990). "The Legionella pneumophila major secretory protein, a protease, is not required for intracellular growth or cell killing." Infect Immun **58**(8): 2585-92.
Takaya, A., Y. Kubota, et al. (2005). "Degradation of the HilC and HilD regulator proteins by ATP-dependent Lon protease leads to downregulation of Salmonella pathogenicity island 1 gene expression." Mol Microbiol **55**(3): 839-52.
Takeichi, M. (1991). "Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator." Science **251**(5000): 1451-5.
Takeichi, M., H. Inuzuka, et al. (1990). "Cadherin-mediated cell-cell adhesion and neurogenesis." Neurosci Res Suppl **13**: S92-6.
Tamura, Y., S. Suzuki, et al. (1992). "Effect of proteolytic enzyme on experimental infection of mice with Pseudomonas aeruginosa." J Vet Med Sci **54**(3): 597-9.
Tamura, Y., S. Suzuki, et al. (1992). "Role of elastase as a virulence factor in experimental Pseudomonas aeruginosa infection in mice." Microb Pathog **12**(3): 237-44.
Tanaka, N. and H. Nakamoto (1999). "HtpG is essential for the thermal stress management in cyanobacteria." FEBS Lett **458**(2): 117-23.
Tesh, M. J. and R. D. Miller (1981). "Amino acid requirements for Legionella pneumophila growth." J Clin Microbiol **13**(5): 865-9.
Tesh, M. J., S. A. Morse, et al. (1983). "Intermediary metabolism in Legionella pneumophila: utilization of amino acids and other compounds as energy sources." J Bacteriol **154**(3): 1104-9.
Thibodeaux, B. A., A. R. Caballero, et al. (2007). "Corneal virulence of Pseudomonas aeruginosa elastase B and alkaline protease produced by Pseudomonas putida." Curr Eye Res **32**(4): 373-86.

Thomas, J. G. and F. Baneyx (2000). "ClpB and HtpG facilitate de novo protein folding in stressed Escherichia coli cells." Mol Microbiol **36**(6): 1360-70.

Tilney, L. G., O. S. Harb, et al. (2001). "How the parasitic bacterium Legionella pneumophila modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane." J Cell Sci **114**(Pt 24): 4637-50.

Titani, K., M. A. Hermodson, et al. (1972). "Amino-acid sequence of thermolysin." Nat New Biol **238**(80): 35-7.

Tomarelli, R. M., J. Charney, et al. (1949). "The use of azoalbumin as a substrate in the colorimetric determination or peptic and tryptic activity." J Lab Clin Med **34**(3): 428-33.

Unlu, M., M. E. Morgan, et al. (1997). "Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts." Electrophoresis **18**(11): 2071-7.

Van Bambeke, F., Y. Glupczynski, et al. (2003). "Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy." J Antimicrob Chemother **51**(5): 1055-65.

Van Bambeke, F., J. M. Michot, et al. (2003). "Antibiotic efflux pumps in eukaryotic cells: occurrence and impact on antibiotic cellular pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicodynamics." J Antimicrob Chemother **51**(5): 1067-77.

VanRheenen, S. M., Z. Q. Luo, et al. (2006). "Members of a Legionella pneumophila family of proteins with ExoU (phospholipase A) active sites are translocated to target cells." Infect Immun **74**(6): 3597-606.

Venkataraman, C., B. J. Haack, et al. (1997). "Identification of a Gal/GalNAc lectin in the protozoan Hartmannella vermiformis as a potential receptor for attachment and invasion by the Legionnaires' disease bacterium." J Exp Med **186**(4): 537-47.

Vogel, J. P., H. L. Andrews, et al. (1998). "Conjugative transfer by the virulence system of Legionella pneumophila." Science **279**(5352): 873-6.

von Baum, H., S. Ewig, et al. (2008). "Community-acquired Legionella pneumonia: new insights from the German competence network for community acquired pneumonia." Clin Infect Dis **46**(9): 1356-64.

Vranckx, L., E. De Buck, et al. (2007). "Legionella pneumophila exhibits plasminogen activator activity." Microbiology **153**(Pt 11): 3757-65.

Wandersman, C. and P. Delepelaire (1990). "TolC, an Escherichia coli outer membrane protein required for hemolysin secretion." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(12): 4776-80.

Weiss, D. S., A. Brotcke, et al. (2007). "In vivo negative selection screen identifies genes required for Francisella virulence." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(14): 6037-42.

Welch, R. A. (1991). "Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria." Mol Microbiol **5**(3): 521-8.

Williams, A., A. Baskerville, et al. (1987). "Immunocytochemical demonstration of the association between Legionella pneumophila, its tissue-destructive protease, and pulmonary lesions in experimental legionnaires' disease." J Pathol **153**(3): 257-64.

Wintermeyer, E., U. Rdest, et al. (1991). "Characterization of legiolysin (lly), responsible for haemolytic activity, colour production and fluorescence of Legionella pneumophila." Mol Microbiol **5**(5): 1135-43.

Wong, K. K., F. S. Brinkman, et al. (2001). "Evaluation of a structural model of Pseudomonas aeruginosa outer membrane protein OprM, an efflux component involved in intrinsic antibiotic resistance." J Bacteriol **183**(1): 367-74.

Woo, A. H., A. Goetz, et al. (1992). "Transmission of Legionella by respiratory equipment and aerosol generating devices." Chest **102**(5): 1586-90.

Woods, D. E., S. J. Cryz, et al. (1982). "Contribution of toxin A and elastase to virulence of Pseudomonas aeruginosa in chronic lung infections of rats." Infect Immun **36**(3): 1223-8.

Yan, L., R. L. Cerny, et al. (2004). "Evidence that hsp90 is involved in the altered interactions of Acanthamoeba castellanii variants with bacteria." Eukaryot Cell **3**(3): 567-78.

Yeung, P. S., N. Zagorski, et al. (2005). "The metalloprotease of Listeria monocytogenes controls cell wall translocation of the broad-range phospholipase C." J Bacteriol **187**(8): 2601-8.

Yu, E. W., G. McDermott, et al. (2003). "Structural basis of multiple drug-binding capacity of the AcrB multidrug efflux pump." Science **300**(5621): 976-80.

Yu, V. L., J. F. Plouffe, et al. (2002). "Distribution of Legionella species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey." J Infect Dis **186**(1): 127-8.

Zgurskaya, H. I. and H. Nikaido (2000). "Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes." Mol Microbiol **37**(2): 219-25.

ZUSAMMENFASSUNG

Legionella pneumophila ist ein opportunistisch humanpathogenes Bakterium und Verursacher einer schweren Lungenentzündung, der Legionärskrankheit. Das Bakterium vermehrt sich intrazellulär in Protozoen, wie z. B. *Acanthamoeba castellanii*, sowie in alveolaren Makrophagen. Neben bereits bekannten und gut charakterisierten Virulenzfaktoren, wie z.B. dem Typ IVB Sekretionssystem Dot/Icm, sind im Genom von *L. pneumophila* eine Vielzahl potentieller Virulenzfaktoren kodiert. Zu diesen zählen auch Gene, die für putative hydrolytische Proteine kodieren, wie z.B. Proteasen, Lipasen und Hämolysine. Um den Einfluss solcher Proteine auf die Pathogenität von *L. pneumophila* zu untersuchen, sollten in dieser Arbeit mit Hilfe eines entwickelten Screeningsystems Gene die für proteo-, lipo-, sowie hämolytische Proteine kodieren bzw. Faktoren, die diese Aktivitäten beeinflussen, identifiziert werden. Zusätzlich sollte deren Einfluss auf die intrazelluläre Vermehrung des Pathogens geprüft werden, welche einen Hinweis auf eine Virulenzeigenschaft des entsprechenden Faktors darstellt. Drei der im Screening identifizierten Gene, bzw. deren Mutanten wurden in dieser Arbeit näher charakterisiert. Dazu zählt das Gen *lpg2166*, dessen Genprodukt kürzlich als Typ IVB - Effektor identifiziert wurde. Die Ergebnisse in dieser Arbeit weisen darauf hin, dass Lpg2166 als Regulator eines hämolytischen Faktors agiert und darüber hinaus die intrazelluläre Vermehrungsfähigkeit von *L. pneumophila* stammspezifisch beeinflusst. Als ebenfalls für die hämolytische Aktivität essentieller regulatorischer Faktor stellte sich HtpG, ein Hitzeschockprotein, welches vermutlich als Chaperon fungiert, heraus. Darüber hinaus beeinflusst HtpG die intrazelluläre Vermehrung in *A. castellanii* und humanen Makrophagen. Als weiterer die Hämolyse fördernder Faktor mit stammspezifischem Einfluss auf die intrazelluläre Replikationsfähigkeit konnte *lpg0721* identifiziert werden, dessen Expressionsprodukt das Membranfusionprotein eines RND-Effluxsystems darstellt. Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Zinkmetalloprotease ProA. Durch Analysen der Substratspezifität konnte gezeigt werden, dass ProA sowohl Wirts- als auch *Legionella*-eigene Proteine proteolytisch prozessiert. Eines dieser *Legionella* Proteine ist die sekretierte Phospholipase PlaC, welche nach Prozessierung durch ProA eine Glyzerophospholipid-Cholesterol Azyltransferase-Aktivität aufweist. Durch Peptidchip-basierte Analysen konnten die putativen Schnittstellen von ProA in PlaC weiter spezifiziert werden, was zur Aufklärung des Mechanismus, der zur Aktivierung der GCAT führt, beiträgt.

ABSTRACT

Legionella pneumophila, the causative agent of the pneumonia Legionnaire's disease, is an opportunistic human pathogen. The bacterium replicates intracellularly in protozoa, such as *Acanthamoeba castellanii*, and alveolar macrophages. Besides already known and well-characterized virulence factors, such as the type IVB secretion system Dot/Icm, there are still a variety of uncharacterized putative virulence factors encoded in the genome of a *L. pneumophila*. These include genes that code for potential hydrolytic proteins, e.g. proteases, lipases, and hemolysins. To investigate the effect of such proteins on the pathogenicity of *L. pneumophila,* a screening system for identification of proteolytic, lipolytic and hemolytic factors or factors that influence these activities, was developed. In order to determine the impact on pathogenicity of identified factors, the ability to replicate inside *A. castellanii* was determined as well. Three by the used screening method identified factors were selected for further characterization. These include the gene *lpg2166*, whose gene product was recently identified as a Type IVB effector. The results of this work indicate that Lpg2166 acts as regulator of a hemolytic activity and also exerts a strain-specific effect on the intracellular viability. HtpG, a heat shock protein, probably acting as chaperone, turned out as another regulatory factor with essential impact on hemolytic activity. In addition HtpG influenced the intracellular multiplication in *A. castellanii* and human macrophages. As a further factor with hemolysis-promoting properties and a strain-specific effect on intracellular replication ability, *lpg0721* could be identified. The expression product of *lpg0721* represents the membrane fusion protein of an RND efflux system.

The second part of this work deals with the zinc metalloprotease ProA. Analysis of substrate specificity showed that both host-specific as well as *Legionella*- specific proteins are proteolytically processed by ProA. One of these *Legionella* proteins is the secreted phospholipase PlaC, which exhibits additional glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase activity (GCAT) after processing by ProA. Using peptide chip based analysis, the putative site of proteolytic processing of PlaC by ProA could be further specified. The knowledge of these sites is essential for understanding the mechanism that results in the activation of GCAT.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation in allen Teilen von mir selbständig angefertigt wurde und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben worden sind.

Weiter erkläre ich, dass ich nicht schon anderweitig einmal die Promotionsabsicht angemeldet oder ein Promotionseröffnungsverfahren beantragt habe.

Veröffentlichungen von irgendwelchen Teilen der vorliegenden Dissertation sind von mir wie folgt vorgenommen worden.

Berlin, 12.01.2012

Enrico Siegbrecht