

Aus dem Institut für molekulare Infektionsbiologie

der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. Dr. h.c. mult. J. Hacker

Ein neues Konjugationssystem in
***Legionella pneumophila* Corby**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Erik Weinmann

aus Würzburg

Würzburg, Februar 2008

Referentenblatt:

Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. J. Hacker

Koreferent: Prof. Dr. U. Vogel

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung : 27.10.08

Der Promovend ist Arzt

1. Einleitung.....	1
1.1. Die Geschichte der „Legionärskrankheit“.....	1
1.2. Die Familie der <i>Legionellaceae</i> und ihr Lebensraum.....	1
1.3. Klinik der Legionelleninfektion	2
1.4. Krankheitsentstehung.....	3
1.5. Virulenzfaktoren.....	5
1.6. Sekretionsysteme	6
1.7. Zielsetzung der Arbeit.....	8
2. Material und Methoden.....	10
2.1. Material.....	10
2.1.1. Geräte.....	10
2.1.2. Bakterienstämme	11
2.1.3. Vektoren	12
2.1.4. Chemikalien	12
2.1.5. Medien und Nährböden	12
2.1.6. Antibiotika für Medien und Nährböden.....	12
2.1.7. Agaroseelektrophorese.....	13
2.1.8. Kälte-Phenol Extraktion	13
2.1.9. Lösungen für die Isolierung von Plasmid-DNA	13
2.1.10. Lösung für die Isolierung von Gesamt-DNA.....	13
2.1.11. Lösungen für den Southern Blot	14
2.1.12. Lösungen für die Polymerase-Kettenreaktion.....	14
2.1.13. Konjugation.....	16
2.1.14. Elektronenmikroskopie.....	16
2.2. Methoden.....	16
2.2.1. Isolierung von Gesamt-DNA (Sambrook, 1989).....	16
2.2.2. Isolierung von Plasmid DNA (Sambrook et. al., 1989).....	17
2.2.3. Phenol/Chloroform-Extraktion.....	17
2.2.4. DNA Fällung	17
2.2.5. DNA Konzentrationsbestimmung (Sambrook et. al. 1989).....	18
2.2.6. DNA Spaltung mit Restriktionsenzymen	18
2.2.7. Dephosphorylierung linearisierter Plasmid DNA.....	18
2.2.8. Ligation mit T4 Ligase.....	19
2.2.9. Herstellung kompetenter E.coli Zellen für die Elektroporation (Calvin & Hannawalt 1988).....	19
2.2.10. Transformation durch Elektroporation (Calvin & Hannawalt 1988)	19
2.2.11. Horizontale Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook et.al., 1982).....	20
2.2.12. Elution von DNA aus einem Agarosegel (Thuring & Sanders, 1975).....	20
2.2.13. Southern-Blot (Southern, 1975)	21
2.2.14. PCR (Saiki et. al., 1988)	22
2.2.15. Sequenzierung (Sanger et. al., 1977).....	23
2.2.16. Konjugation zwischen E. coli	23
2.2.17. Elektronenmikroskopie.....	24
3. Ergebnisse	25
3.1. Klonierung Trb1/Trb2.....	25
3.1.1. Konstruktion der Plasmide.....	26
3.1.2. Trb-Genominseln	30
3.3. Verbreitung der trb/tra Region in der Gattung Legionella	54
3.4. Hinweise auf Funktionalität der trb/tra Region	70
3.4.1. Elektronenmikroskopie.....	70
3.4.2. Konjugation	71
4. Diskussion	72
4.1. Regulation durch csrA?	72
4.2. Gene der „mating pair formation“.....	74
4.2.1. Pilusgenese durch TrbC und TraF.....	75
4.2.2. Der „entry exclusion factor“ TrbK	75
4.3. Der „coupling factor“ TraG.....	76
4.4. Gene des “DNA transfer and replication“ Systems	77
4.4.1. Die Relaxase Tral	77
4.4.2. Das Relaxosom.....	77
4.5. Virulenzfaktor mutT?.....	78
4.6. Verbreitung der trb/tra Region	79
4.7. Mögliche Funktionalität des trb/tra Systems	79
5. Zusammenfassung.....	81
6. Literatur	82

1. Einleitung

1.1. Die Geschichte der „Legionärskrankheit“

Im Jahr 1976 führte eine lokale Epidemie in einem Hotel in Philadelphia, USA zu einer Erkrankung der Lunge, die in kurzer Zeit zum Tod von 34 Menschen führte.

Nach einigen Monaten intensiver Suche wurde im Lungengewebe der Opfer ein bislang nicht beschriebenes gram-negatives Bakterium gefunden und als Ursache der Todesfälle erkannt. Es erhielt den Namen *Legionella* weil von der Epidemie vor allem amerikanische Kriegsveteranen des ersten Weltkriegs, im Amerikanischen „legionnaires“, betroffen waren. Rätselhaft erschien an der scheinbar neuen Krankheit die streng lokale Ausbreitung, die Erklärung ergab sich nach epidemiologischer Untersuchung des Vorfalles darin, dass die Erregeraufnahme nicht von Mensch zu Mensch erfolgte, sondern durch Inhalation eines Bakterienaerosols aus der Klimaanlage des Hotels (Fraser et. al., 1977; McDade et. al., 1977).

1.2. Die Familie der *Legionellaceae* und ihr Lebensraum

Legionellen sind aerobe, Gram-negative Stäbchen aus der γ -Untergruppe der Proteobakterien. Bislang sind 48 Spezies und 70 Serogruppen bekannt (Fields et. al., 2002). Legionellen können in Biofilmen überleben, replizieren sich aber nur in verschiedenen Protozoen, die ihnen als Wirt dienen (Murga et. al., 2001; Surman et. al., 2001; Fields, 1996). In natürlichen Habitaten erreichen Legionellenpopulationen nicht die Dichte wie in von Menschen gebauten Warmwasseranlagen, wenn dort eine optimale Wachstumstemperatur von gleichmäßig 30 bis 40°C geboten ist. Deshalb erfolgt eine Ansteckung mit dem Erreger weitaus häufiger aus künstlichen Reservoirs, wie Klimaanlage oder Luftbefeuchtern, die aus angewärmten Wasser ein Aerosol produzieren (Ohno et. al., 2003). Durch ihr Leben in den Amöben sind Legionellen gegen Umwelteinflüsse wie pH- und Temperaturschwankungen oder Wasserdesinfektionsmaßnahmen, wie Zusatz von freiem Chlor weitgehend geschützt (Fliermans, 1995). Die „*American Society of Heating, Refrigeration, and Air-Conditioning Engineers (ASHRAE)*“ gibt deshalb Richtlinien zur adäquaten Behandlung von Wasseranlagen gegen eine

Besiedlung mit Legionellen heraus und deren Umsetzung könnte vor allem nosokomiale Infektionen vermeiden helfen (Fields et. al., 2002).

1.3. Klinik der Legionelleninfektion

Die Erkrankung beginnt nach zwei bis zehn Tagen Inkubationszeit mit leichtem Fieber, unspezifischen Muskel- und Kopfschmerzen und trockenem Husten. Im unbehandelten Verlauf kulminiert die Symptomatik in hohem Fieber, respiratorischer Insuffizienz bis hin zu Multiorganversagen. In Abhängigkeit des Immunstatus hat die manifeste Legionellose bis zu 25% Letalität (Stout & Yu, 1997).

Die klinische Diagnose gestaltet sich aufgrund des variantenreichen Verlaufs der Erkrankung schwierig, eine klinische Abgrenzung gegen andere Lungenentzündungen ist nicht möglich (Edelstein, 1993). Verschleiernde weitere Symptome, die zunächst vor der Lungensymptomatik augenscheinlich werden können und die Diagnose dadurch erschweren sind wässrige Diarrhoen, neurologische Ausfälle, Leber und/oder Nierenversagen sowie Bradykardie. Im Rahmen einer Bakteriämie kann insbesondere das Herz in Form einer Myo-Peri- oder Endokarditis betroffen werden (Stout & Yu, 1997; Rechnitzer, 1994).

Neben diesem schweren Verlauf existiert auch eine Variante der Legionellose, das Pontiac-Fieber, das sich lediglich als selbstlimitierende leicht fieberhafte Erkrankung präsentiert (Glick et. al., 1978). *L. pneumophila*, ist in ca. 79% der Fälle von Legionärskrankheit das ursächliche Agens und von diesen gehören wiederum 95% der Serogruppe 1 an (Fields et. al., 2002).

Zur Diagnose einer Legionelleninfektion erbringt nur die Kultur der Erreger aus Absonderungen der Atemwege eine Spezifität von 100%. Die Sensivität ist Abhängig von dem verwendeten Material, wobei Sputum schlechter zu Diagnosesicherung geeignet ist, hierbei ist eine Bronchoalveoläre Lavage Mittel der Wahl zur Probengewinnung (Edelstein, 1987; Maiwald et. al., 1998; Fields, 2002). Der Nachteil der Kultur ist die lange Zeit, die für eine definitive Diagnose benötigt wird, deshalb sind schnelle Screeningtests mit immunologischen Methoden entwickelt worden. Etabliert sind Legionellen-Antigentests aus dem Urin mittels ELISA oder Latexagglutination, die eine Sensitivität von 70% und eine Spezifität von fast 100% bietet, allerdings werden bei diesen Tests nur *L.p.* Serogruppe 1 erfasst und es wird

geschätzt, dass dadurch 40% der Legionelleninfektionen nicht erkannt werden (Fields et. al., 2002).

Serologisch können indirekte Immunfluoreszenztests, Enzymimmunoassays und Mikroagglutination zur Erkennung von Legionellenantikörpern verwendet werden. Die Sensivität und Spezifität der unterschiedlichen Methoden ist ausgiebig evaluiert worden und beläuft sich im Durchschnitt auf 80% Sensivität und 99% Spezifität, (Fields et. al., 2002). Allerdings sind verschiedene Faktoren bei der Beurteilung dieser Tests zu beachten. Zum einen erfassen die meisten Tests nur *L.p.* Serogruppe 1. Zum anderen gehören die nachweisbaren Antikörper der Klasse IgG an, so dass nur die späte Immunantwort erkannt wird. Die Kreuzreaktivität mit anderen Spezies ist oft sehr hoch und es resultiert eine falsch positive Diagnose Legionellose. Zudem ist eine repetitive Blutabnahme im Abstand von drei Wochen zur zuverlässigen Beurteilung des Antikörpertiterverlaufs notwendig und deshalb in der Praxis schlecht geeignet (Fields et. al., 2002).

Als wirksame Behandlung stehen Makrolidantibiotika, etwa Azithromycin oder Quinolone wie etwa Ciprofloxacin, Levofloxacin oder Moxifloxacin zur Verfügung (Baltch et. al., 2005; [www. legionella.org](http://www.legionella.org)). Die Patienten leiden allerdings sehr häufig unter einer langen Rekonstitutionsphase von zwei bis drei Monaten nach überstandener Erkrankung (Stout & Yu, 1996; Neumeister, 1996).

1.4. Krankheitsentstehung

In ihrem natürlichen Lebensraum vermehren sich Legionellen in Protozoen. Bislang sind 13 Amöbenarten und 2 Arten von Ziliaten als Wirte für Legionellen beschrieben (Fields, 1996).

Die Legionellen heften sich an Galactose/N-acetylgalactosamine (Gal/GalNac) Lektin auf der Amöbenoberfläche (Venkataraman et. al., 1997). Die Aufnahme in die Wirtszelle erfolgt sowohl durch konventionelle Phagozytose, als auch durch den speziellen „coiling“ Phagozytosemechanismus, dabei wird das Bakterium von der Zellmembran der phagozytierenden Zelle zunächst mehrmals umwickelt und dann aufgenommen. Allerdings scheinen diese unterschiedlichen Aufnahmewege keinen Einfluss auf die Replikation in der Zelle zu nehmen (Abu Kwaik et. al., 1998; Molmeret et. al., 2005).

In menschlichen Makrophagen erfolgt die Erregeraufnahme dadurch, dass die Legionellen zunächst durch das unspezifische Komplementsystem für die Phagozytose markiert werden. Die Faktoren C3b und C3i binden an das „*major outer membrane protein*“ (MOMP) der Legionellen und über Wechselwirkung mit den Komplementfaktorrezeptoren CR1 und CR3 der Makrophagen werden die Bakterien aufgenommen (Shuman & Horwitz, 1996; Bellinger-Kawahara & Horwitz, 1990).

Komplementunabhängig kann die Aufnahme der Legionellen in Makrophagen antikörpervermittelt über den Fc-Rezeptor erfolgen, hier ist das OMP-Protein (*outer membrane porin*) von *Legionella pneumophila* als die von den Antikörpern erkannte Struktur beteiligt (Husmann & Johnson, 1992).

Jedoch nehmen die opsinabhängigen und unabhängigen Wege keinen Einfluss auf den weiteren intrazellulären Lebenszyklus der Bakterien (Molmeret et. al., 2005)

Nach der Aufnahme in das intrazelluläre Milieu assoziiert das Legionellen enthaltende Phagosom mit Mitochondrien, dem rauen endoplasmatischen Reticulum und Vesikeln (Molmeret et. al., 2005). In den ersten Stunden bilden sich keine lysosomalen Marker wie MHC I oder II, alkalische Phosphatasen oder andere Membranproteine aus und innerhalb von 6 Stunden nach Phagozytose ist das Legionellenphagosom getrennt vom endosomal-lysosomalen Weg (Swanson & Fernandez-Moreira, 2002).

Innerhalb dieses modifizierten Phagosoms findet die Replikation der Erreger statt.

Verringert sich schließlich das Nährstoffangebot durch die Zunahme der Bakteriendichte wird der „*second messenger*“ ppGpp vermehrt produziert (Hammer & Swanson, 1999) und durch die Sigmafaktoren RpoS und FliA wird die Transkription von Genen des Transmissionsregulons initiiert und der Übergang von der replikativen in die Transmissionsphase ausgelöst (Bachman & Swanson, 2001; Bachman & Swanson, 2004; Fettes et. al., 2001; Heuner et. al., 1999; Zusman et. al., 2002).

Zeitgleich dazu wird durch das Zusammenwirken des aus zwei Komponenten bestehenden Regulationsfaktors LetA/LetS und des *letE* Genlocus die Repression verschiedener Gene die durch den Faktor CsrA inhibiert sind aufgehoben und die Bakterien werden in Folge davon zytotoxisch, beweglich und infektiös (Hammer & Swanson, 1999; Hammer et. al., 2002; Lynch et. al., 2003; Molofsky & Swanson, 2003). Am Ende des Vermehrungszyklus der Legionellen in Säugerzellen steht die Zerstörung der Wirtszelle. Diese kann auf zwei unterschiedliche Arten geschehen, zum einen früh nach der Infektion durch Apoptose nach Aktivierung des

mitochondrialen Signalwegs (Neumeister et. al., 2002; Gao & Abu Kwaik, 1999), zum anderen durch nekrotischen Zelltod, ausgelöst durch ein porenbildendes Toxin das von *L. pneumophila* in der postexponentiellen Wachstumsphase gebildet wird (Gao & Abu Kwaik, 2000; Alli et. al., 2000).

1.5. Virulenzfaktoren

Dadurch, dass es sich bei Legionellen um intrazellulär lebende Organismen handelt, ist ihre Pathogenität durch die Fähigkeit bestimmt in Wirtszellen einzudringen, sich in ihnen zu vermehren und schließlich zu zerstören (Rechnitzer, 1994).

Dazu besitzen sie eine umfangreiche Ausstattung an Virulenzfaktoren, wie spezifische Oberflächenstrukturen. *L. pneumophila* ist überzogen mit einem speziellen Lipopolysaccharid (LPS), welches in der Transmissionsphase deacetyliert und verlängert wird und damit wahrscheinlich an der Verhinderung der Phagosom-Lysosom Fusion beteiligt ist (Fernandez-Moreira et. al., 2006). Daneben sind Proteine der RTX-Familie (*repeats in structural toxin genes*) essentiell für die Adhärenz an die Wirtszelle. So konnte für Legionellenmutanten deren *rtxA* Gen ausgeschaltet ist gezeigt werden, dass sie eine verminderte Adhärenz, Zytotoxizität, Porenbildung, intrazelluläre Vermehrung in Makrophagen und geringere Virulenz in Mäusen aufweisen (Cirillo et. al., 2001). Erreichen Legionellen die stationäre Phase bildet sich eine Flagelle auf der Oberfläche aus, die in Abhängigkeit von dem alternativen σ^{28} Faktor exprimiert wird (Heuner et. al., 2002). Die Flagelle ist auch als Virulenzfaktor zu werten, denn Mutanten des Flagellin bildenden *flaA* Gens werden seltener in HL-60 Zellen und *Acanthamoeba castellanii* aufgenommen. Allerdings ist sie nicht direkt notwendig für die Adhäsion und intrazelluläre Replikation (Dietrich et. al., 2001). Desweiteren besitzen Legionellen spezielle Pili, die elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden können und in zwei Kategorien eingeteilt sind. Zum einen stellen sich kurze 0,1 bis 0,6 μ m große Pili dar zum anderen längere mit 0,8 bis 1,5 μ m (Rodgers et. al., 1980 ; Stone & Abu Kwaik, 1998).

Die langen Pili sind nach Ausschaltung des *pilE* Gens nicht mehr nachweisbar und die Adhärenz von *L. pneumophila* an U937 makrophagenähnlichen Zellen, *A. polyphaga* und menschlichen Alveolarepithelzellen ist herabgesetzt. Die intrazelluläre Replikation ist nicht beeinträchtigt (Stone & Abu Kwaik, 1998). Ebenso ist der *pilE*

Genlocus und damit die Expression der langen Typ IV Pili an der natürlichen Kompetenz zur Aufnahme von DNA beteiligt und diese Pili werden deshalb CAP (for competence- and adherence-associated pili) genannt (Stone & Abu Kwaik, 1999).

Als weiteres Oberflächenprotein ist das Mip-Protein („*macrophage infectivity potentiator*“) zu erwähnen. Dieses ist ein FK506 Bindungsprotein, das für eine optimale Infektion notwendig ist. Es fördert die Hydrolaseaktivität von p-NPPC (p-nitrophenol phosphorylcholin), das durch das Typ II Sekretionssystem *lsp* („*legionella secretion pathway*“) exportiert wird (DebRoy et. al., 2006a).

Noch ein wichtiger Virulenzfaktor ist Hsp60, ein Chaperon, das auf der Oberfläche von Legionella lokalisiert werden konnte (Garduno et. al., 1998a). Wenn Hsp60 durch spezifische Antikörper inhibiert wird, ist die Fähigkeit des Erregers HeLa-Zellen zu infizieren erheblich herabgesetzt (Garduno et. al., 1998b). Die Interaktion von Hsp60 mit humanen Phagozytosezellen findet über Rezeptoren statt, die Proteinkinase C vermittelt zu einer erhöhten IL-1 β -Synthese führen und damit die T-Zellaktivierung und Antigenpräsentation beeinflussen (Retzlaff et. al., 1996).

Weiterhin existieren noch viele weitere Virulenzfaktoren, die Auswahl hier dient nicht der erschöpfenden Abhandlung aller bekannten Faktoren, sondern der Illustration der mannigfaltigen Möglichkeiten die Legionellen anbieten um zu überleben.

1.6. Sekretionsysteme

Legionellen besitzen Typ I, II, IV und V Sekretionssysteme um verschiedene Substrate durch die Bakterienhülle zu transportieren. Daneben existiert ein Typ III ähnliches System, die Flagelle zur Fortbewegung. Von diesen werden im Folgenden auf die Typ II und Typ IV Sekretionssysteme näher beschrieben. Legionellen sind mit einem Typ II Sekretionssystem ausgestattet, genannt *lsp* (*legionella secretion pathway*), das verschiedene Enzyme aus der Zelle schleusen kann. Darunter Proteasen, saure Phosphatasen, Phospholipase A, Lysophospholipase A, eine Zink-Metalloprotease, die p-NPPC Hydrolase und eine Lipase. Dieses Typ II Sekretionssystem wird durch die Gene *lspFGHIJK*, deren Produkte Pseudopiline ergeben, durch *lspD*, das ein Sekretin der Außenmembran kodiert und *lspE* das ein Gen für eine ATPase darstellt, zusammengesetzt.

PilD, eine auch an der Typ IV Pilusgenese beteiligte Peptidase ist neben den *lsp* Genen essentiell für die Typ II Sekretion (Ciancotto, 2001; Rossier & Ciancotto,

2001). Untersuchungen des Wachstumsverhaltens von Legionellenmutanten, bei denen *Isp* Gene inaktiviert sind zeigen signifikant geringere Wachstumsraten bei niedrigen Temperaturen im Vergleich zum Wildtyp. Deshalb ist anzunehmen, dass ein bislang unbekannter Faktor der durch *Isp* exportiert wird für die Temperaturadaption von Legionellen notwendig ist. (Söderberg et. al., 2004).

Ein weiterer kürzlich entdeckter Virulenzfaktor ist eine Chitinase, dessen Sekretion durch das Typ II System für eine Infektion von Mäusen nach intratrachealer Legionelleninoculation essentiell ist. Bei weiteren *in vivo* Versuchen mit Mäusen konnte in der gleichen Arbeit gezeigt werden, dass eine Phosphatase, Protease und mehrere Lipasen, die Typ II abhängig transportiert werden, jedoch nicht für die Etablierung einer Infektion notwendig sind (DebRoy et. al., 2006b).

Weiterhin besitzen Legionellen zwei Typ IV Sekretionssysteme, das *icm/dot* (*intracellular multiplication, defect in organelle trafficking*) und das *lvh* System (*Legionella vir homologue*). Typ IV Sekretionssysteme stammen von bakteriellen Konjugationssystemen ab und können Proteine und DNA-Protein Komplexe zwischen prokaryotischen Zellen und von prokaryotischen zu eukaryotischen Zellen übertragen und sind essentiell für die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella* (Christie, 2001). Vielfältige Funktionen konnten bislang gezeigt werden. So bilden sich in Abhängigkeit von dem *icm/dot* System Poren in der Bakterienoberfläche, durch die Substrate ausgeschleust werden (Nagai & Roy, 2001; Coers et. al., 2000). Die Pore wird wahrscheinlich durch Proteine gebildet die von den Genen *icmQ* und *icmR*, oder *icmR* analogen Genen kodiert werden (Dumenil & Isberg, 2001; Dumenil et. al., 2004; Feldman et. al., 2005). Notwendig ist das *icm/dot* System unter anderem zur Modifizierung des Phagosoms, damit sich die Legionellen intrazellulär vermehren können und nicht der Endozytose zugeführt werden (Swanson & Isberg, 1995; Segal et. al., 1998). In diesem Zusammenhang konnte unter den exportierten Proteinen eines, RalF, identifiziert werden, das in den Vesikeltransport eingreift, indem es ADP-Ribosylierungsfaktoren in die Legionellenvakuole rekrutiert (Nagai et. al., 2002) und ein weiteres Protein SidJ, das Proteine des endoplasmatischen Retikulum in das Phagosom leitet (Liu & Luo, 2006). Außerdem sind Faktoren, die durch *icm/dot* in die Wirtszelle exportiert werden für die Auslösung des apoptotischen Zelltods der Wirtszelle ausschlaggebend (Zink et. al., 2002). Kürzlich wurde berichtet, dass auch der antiapoptotische Faktor NF- κ B in Anwesenheit des *icm/dot* Systems hochreguliert wird (Losick & Isberg, 2006) und ein Faktor SdhA

exportiert wird, dessen Fehlen mit einer erhöhten Rate an apoptotisch zugrundegegangenen Zellen einhergeht (Laguna et. al., 2006). Somit zeigt sich, dass das *icm/dot* System und dessen exportierte Proteine auch ein fein abgestimmtes System zur Regulierung des Wirtszelltodes im Lebenszyklus von Legionellen darstellen (Laguna et. al., 2006).

Des Weiteren werden bei der Vermehrung in Protozoen zwei Polypeptide LepA und LepB gebildet und exportiert, die möglicherweise an dem Nicht-lytischen Evasionsweg aus Amöben beteiligt sind (Chen et. al., 2004). Eine weitere Funktion von *icm/dot* ist die Übertragung von Plasmid-DNA zwischen Legionellen (Vogel et. al., 1998). Das zweite TypIV Sekretionssystem, *lvh*, ist ebenso in der Lage ein Plasmid zu übertragen, jedoch ist es nicht notwendig für die intrazelluläre Replikation in HL-60 Makrophagenzellen und in *A castellanii*. (Segal et. al., 1999b).

Allerdings zeigen neue Ergebnisse, dass das *lvh* System unter natürlichen Umweltbedingungen die Funktionen des *icm/dot* Systems bei der intrazellulären Replikation und der Fusion des Phagosoms zu einem Lysosom in Amöben zum Teil ersetzen kann (Bandyopadhyay et. al., 2006).

1.7. Zielsetzung der Arbeit

Wie beschrieben können Legionellen mit Typ IV Sekretionssystemen Plasmid DNA übertragen. In Untersuchungen mit *Legionella pneumophila* Mutanten, deren *icm/dot* System und *lvh* System ausgeschaltet ist, zeigte sich, dass diese immer noch in der Lage sind DNA zu transferieren (Miyamoto, 2003). Deshalb müssen noch andere Mechanismen des Genaustauschs in Legionellen existieren.

In *Legionella pneumophila* Corby konnte ein Gen *trbE* aus einer Genbank identifiziert werden, das signifikante Ähnlichkeit zu Genen verschiedener Typ IV Sekretionssystemen aufweist. Vor allem die große Ähnlichkeit zu dem in dem IncPβ Plasmid R751 enthaltenem *trbE* warf die Frage auf, ob ein dem IncP kodiertes Konjugationssystem vergleichbares System auch in *L.p.* Corby vorhanden sein könnte. Ausgehend von diesem Genomabschnitt sollte die flankierende Region dieses Gens auf dem Chromosom identifiziert, kloniert und sequenziert werden. Anschließend sollte durch die Analyse des Genomabschnittes überprüft werden, ob alle erforderlichen Gene eines Konjugations/Sekretionssystems dort vorhanden sind. Die Untersuchung beinhaltet die Suche nach Sequenzmotiven DNA-Transferierender

Proteine in den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der offenen Leserahmen der klonierten Region. Für die Gene der TypIV bzw. Konjugationssysteme, denen noch keine Funktion zugeordnet werden konnte, sollte zumindest eine hohe Sequenzhomologie zu entsprechenden essentiellen Genen eines Transfersystems bestehen. Des Weiteren interessiert die Frage, inwieweit ein solches System Verbreitung innerhalb der Legionellastämme findet und ob sich eine mögliche Koexistenz oder Inkompatibilität zu den bekannten TypIV Systemen findet. Verschiedene *Legionella*-Stämme wurden deshalb durch Gensonden dahingehend untersucht, welche Systeme jeweils enthalten sind. Abschließend sollte mittels eines elektronenmikroskopischen Vergleichs von Wildtyp *L.p. Corby* und Mutanten geprüft werden ob ein Unterschied in den Oberflächenstrukturen zu finden wäre. Bei den Mutantenstämme wurde das IncP ähnliche Konjugationssystem durch gezielte Genausschaltung inaktiviert. Ein intaktes Konjugationssystem dieser Art müsste im Elektronenmikroskop sichtbare Pili ausbilden.

Schließlich sollte für Elemente dieses Genomabschnittes untersucht werden, ob diese in der Lage sind DNA zu mobilisieren und damit die Funktionalität des Systems zu beweisen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Analysenwaage	Chyo JL-180
Autoklav	Fedegari Autoklavi
Brutschrank (30 °C und 37 °C)	Heraeus Typ 5060 EC -CO2 Platteninkubator
DNA-Sequenzierer	LI-COR-DNA; MWG-Biotech Ebersberg
Eismaschine	Scotsman AF-20
Elektrophoresekammern	für Pharmacia, BioRad
Agarose-Gele	
Elektronenmikroskop	Zeiss EM 10
Entwicklermaschine	Agfa Curix 60
Geldokumentationsapparatur	BioRad Gel Doc 2000 mit PC
Gefrierschrank –20 °C	Privileg Senator
Gefrierschrank –80 °C	Revco
Grobwaage	Kern 470 bzw. 572
Heizblock	Liebsch, Bielefeld
Hybridisierungsöfen	Hybaid Ltd. Mini-10
Kühlschrank	Privileg Super Öko
Kühlzentrifuge (für 50 ml Falcon)	Heraeus Multifuge 1 L-R
Magnetrührer	Gerhardt, Bonn, Typ RMO
Mikrowelle	AEG Mikromat
Netzgeräte	Consort E455, BioRad PowerPac 3000, Amersham-Pharmacia EPS 200
Pipetten	Gilson, Eppendorf
pH-Meter	WTW MultiLine P4
Röntgenfilm	Hyperfilm-MP Amersham, Braunschweig
Schüttler, klein	IKA KS125 basic
Schüttelinkubator	B. Braun Certomat BS-1
Sicherheitswerkbank	Nunc Microflow Biological Safety Cabinet
Spectrophotometer	Amersham Ultrospec 3100 pro
Thermocycler	Biometra T3 Thermocycler
Tischzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415C
UZ bzw. UZ-Rotor	Beckman SW40 oder SW41, Ti45
Vortexer	Boskamp Mixomat
Zentrifuge	Beckman J2-HC mit JA-10-, JA-14-Rotor

2.1.2. Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> K-12 (DH5α)	end A1, hsdrl 7, sup E44, thi-1 rec A1, gyr A96, rel A1, (lacZ YA) Hanahan, 1983
<i>Escherichia coli</i> K-12 (SM10λpir)	thi1, thr1, leuB6, supE44, tonA21, lacY1, recA::RP4-2-Tc::Mu Km ^r Simon et. al., 1983
<i>Escherichia coli</i> XL1-blue	recA, endA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk-,mk+), supE44, relA1, lambda-, lac-, [F', proAB, lacIqZdeltaM15, Tn10(tet)] Bullock et. al., 1987
<i>L. pneumophila</i> Corby	Jepras et. al., 1985
<i>L.pneumophila</i> Philadelphia1	[ATCC 33152]
<i>L.pneumophila</i> Philadelphia 1 XXXV	Bender et. al. 1991
<i>L.pneumophila</i> Philadelphia JR 32	Marra & Shuman, 1989
<i>L.pneumophila</i> AA100	Edelstein et. al., 1986
<i>L. pneumophila</i> S7	P. Lück, Dresden
<i>L. pneumophila</i> S10	P. Lück, Dresden
<i>L. pneumophila</i> S12	P. Lück, Dresden
<i>L. pneumophila</i> S13	P. Lück, Dresden
<i>L. pneumophila</i> Msp 19	Bender et. al., 1991
<i>L. pneumophila</i> U22	Bender et. al., 1991
<i>L. pneumophila</i> U21	Bender et. al., 1991
<i>L. pneumophila</i> 685	Bender et. al., 1991
<i>L. pneumophila</i> 640	Bender et. al., 1991
<i>L. pneumophila</i> 664	Bender et. al., 1991
<i>L. pneumophila</i> Bloomington	[ATCC 33155]
<i>L. pneumophila</i> Los Angeles	[ATCC 33156]
<i>L. pneumophila</i> Chicago-2	[ATCC 33215]
<i>L. longbeachae</i>	[ATCC 33462]
<i>L. micdadei</i>	[ATCC 33218]
<i>L. bozemanii</i>	[ATCC 33217]
<i>L. dumoffii</i>	[ATCC 33279]
<i>L. feelei</i> (S1)	[ATCC 35072]
<i>L.gormanii</i>	[ATCC 33297]
<i>L. hackeliae</i> (S1)	[ATCC 33250]
<i>L. hackeliae</i> (S2)	[ATCC 33484]
<i>L. isrealiensis</i>	[ATCC 43119]
<i>L. jordanis</i>	[ATCC 33623]
<i>L. longbeachae</i> (S1)	[ATCC 33462]
<i>L. longbeachae</i> (S2)	[ATCC 33484]
<i>L. micdadei</i>	[ATCC 33218]
<i>L. oakridgensis</i>	[ATCC 33761]
<i>L. anisa</i>	Fields et. al., 1990
<i>L. erythra</i>	Saunders et. al., 1992
<i>Sacrobium (Legionella) lyticum</i>	[Polish Culture of Microorganisms; PCM 2298]

2.1.3. Vektoren

pGEM-T (Promega) Amp^r; lacZ Gen; T7, SP 6 Promotor

pMMB207 Cm^r taclac Promotor ;mobRP4 Morales et. al. 1991

2.1.4. Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Amersham, Boehringer GmbH, Mannheim; Carl Roth GmbH, Karlsruhe; Fermentas GmbH, St. Leon-Rot; Invitrogen GmbH, Karlsruhe; MBI Fermentas, Vilnius, Litauen; Merck, Darmstadt; Oxoid GmbH, Wesel; Promega Corporation, Madison, USA; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen; VWR International, Nürnberg.

2.1.5. Medien und Nährböden

LB-Medium	10 g Bacto Typton 5 g Yeast Extract 5 g NaCl ad 1 l H ₂ O
LB-Agarplatten	1 l LB-Medium 10 g Agar
LB-X-Gal Platten	1 l LB-Medium 10 g Agar autoklavieren, auf 45°C abkühlen 500 µl IPTG (100 mM) 3 ml 2% X-Gal (in Dimethylformamid)
Legionellen-Agarplatten	5 g ACES 10 g Hefeextrakt in 1 l H ₂ O _{Dest.} lösen und pH-Wert mit 10 N KOH auf 6,9 einstellen. 2 g Aktivkohle 15 g Agar autoklavieren, auf ca. 40°C abkühlen lassen. 0,4 g Cystein in 10 ml H ₂ O _{Dest.} 0,25 g Eisen(III)NO ₃ in 10 ml H ₂ O _{Dest.}

2.1.6. Antibiotika für Medien und Nährböden

Ampicillin (Amp)	100 mg/l H ₂ O _{Dest.}
Tetracyclin (Tc)	50 mg/l Ethanol
Chloramphenicol (Cm)	20 mg/l Ethanol

2.1.7. Agaroseelektrophorese

TAE	40mM Tris-Acetat pH 8.0; 1 mM EDTA
Agarose	1% in 1fach TAE
Stopp-Puffer	25 mg Bromphenolblau
	25 mg Xylencyanol
	2,5 g Ficoll Typ 400
	ad 10 ml H ₂ O _{Dest.}
Ethidiumbromidlösung	0,5 µg/ml

2.1.8. Kälte-Phenol Extraktion

Phenol
Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)
4M Na-Acetat
Ethanol (absolut)

2.1.9. Lösungen für die Isolierung von Plasmid-DNA

Lösung 1	50 ml Glukose
	10 mM EDTA, pH 8.0
	25 mM Tris HCl, pH 8.0
	3 mg/ml Lysozym (frisch)
Lösung 2	0.2 N NaOH
	1% SDS
Lösung 3	3 M Na-Acetat, pH 4.8
Ethanol (absolut)	
Phenol	
Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)	

2.1.10. Lösung für die Isolierung von Gesamt-DNA

0,15 M NaCl/0,1 M EDTA,	pH 8.0
25% Saccharose/10 mM Tris-HCl,	pH 8.0
250 mM EDTA,	pH 8.0
Lysozymlösung 20 mg/ml	
10% SDS	
TES-Puffer:	30 mM Tris-HCl, pH 7.5
	5 mM EDTA, pH 7.5
	5mM NaCl
Proteinkinase K (10 mg/ml)	
5 M NaClO ₄	

2.1.11. Lösungen für den Southern Blot

Depurinierungslösung	0,25 N HCl
Denaturierungslösung	1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH
Neutralisierungslösung	0,5 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl, pH 5.1
Blot Lösung	20x SSC
20x SSC	600 ml 5 M NaCl 200 ml 1,5 M Na ₂ Citrat, pH 7.0 200 ml H ₂ O _{Dest.}
Transfer-Puffer	5x SSC 10 mM NaOH pH 11.5
Vorhybridisierungs-Lösung	50 ml Formamid 25 ml 20x SSC 1 ml 10% SDS 0,4 ml 50 mM EDTA 5 ml 100x Denhardts-Lösung 5 ml 1M Tris-Cl, pH 7.5 13,6 ml H ₂ O 750 µl Herings DNA (50µg/ml)
Wasch Puffer I	1x SSC, 0,1% SDS
Wasch Puffer II	0,5x SSC, 0,1% SDS

2.1.12. Lösungen für die Polymerase-Kettenreaktion

10x Taq Polymerasepuffer	750 mM Tris-HCl, pH 9.0 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ /0,1% Tween 20
Oligonukleotide	1 µg/ml
DNTPs	20 mM
Taq-Polymerase (Invitrogen GmbH)	5 U/ µl
Taq-Polymerase Verdünnungspuffer	50% Glycerin 10 mM NaPO ₄ , pH 7 100 mM NaCl 0,1 M EDTA, 2 mM DTT
MgCl ₂	25 mM-Stammlösung

Tab. 1: In dieser Arbeit verwendete Primer (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen).

Name	Sequenz 5'-3'	Tm (°C)
trbra-U	TGCCGCAGTTGATTGGAGCTCGTCGTGACA	70
trbA-U	GATTGGCATTGTGTCGTGACAT	55
trbCsrA-R	TTGACTGTCACCAATAGATCTTTATCTTTATCTACA	61
TtrbA-R	CCATCGGCGTTACACATG	56
trbAU2	CAGGCGTTCATCGTCAAGAAGTG	62,4
B1U	CGTTGTATCCGGACCAACCTT	59,8
B1R	GCGCATCCTGAGTGTGGTTTT	59,8
trbB-R	GTTTCGATTTTCAGAAGGCGCT	57,3
trbC-U*	CATCAGTTATGAGCCTTCGCA	57,9
trbE-R1*	AAGGCACGGTCTTCATCCATT	57,9
trbE-R	GAGCCACTTTGATGCATGCTG	59,8
trbF-R	TAGCACTGAGATACCATCCATCAC	61
r25r3	CGTACTGTCCATGGATCCTTT	57,9
r25U1	TTGGATAAGCCATGTTTATTT	50
r25r1	TTGATGCCATTGACAGG	54
r25u3	GCAAAGTGGCAGTTCATTCAA	55,9
r8U1*	ACCATTACGAGGTGCTAAAGA	55,9
RT-2bF	GATGCTTTTGGCATCAGCCTG	60
trbl-F	TAAGGAGTGAGACTGATGAATC	56,5
RT-2aF	CTGTGTTTGTGGTGTGATAGC	58
r8U2*	CAGAGCAAGTGTAAGGGC	56
RT-2R	GCTCTGAGTTCATATCGGGTG	60
r8R2*	CACTACAATGATGTTGAAACG	54
trbl-R	CATTGCACTCCTCCTGTATCAAT	58,9
R8R1*	CGAACACCATGATGGATAAAC	55,9
R8U4	GCGAAAAGCAGACATTCAAGAG	58,4
traU1*	ATAGTAACCGCGCAAGTG	53,7
RT-4bF	TGCTGATGCCATTCATCAGCG	60
traG-F	TGGAGACGGTCAATGAGCTTGA	60,3
RT-4aF	CATCAGTATGCAGGTTGGCAC	60
RT-4R	CATCTAATGGATTCCATCGGG	58
tra69U2*	TGATGCATCATGCAAGCC	53,7
traG-R	TAGTCTGATTTCTCATCTTCACG	59,3
traR1*	CCTCCTTAGCGTCATCTT	53,7
tra69R2*	TTCCAGTATTGAACAGTCGTG	56,5
traH	CATCCTTCAAGGCTTGATCGA	57,9
P6R1*	AAGGCAGGATTTTACGTGG	54,5
P6R2*	TGACTTGGCAAATCACAGTATG	56,5
trbra-R	TTTTGCAATAAGCGCAGATCTTTCATCGT	64
P6U2*	GGCGGTGATGTAAAGCTCAA	57,9
RT-5F	CCGGCTTGAATTGAGCAATCC	60
P6U1*	TTCCAATTATCGGATTGCTCA	54
RT-5aR	TTGGATTCAGCTAACAGATATGGT	58
oriTU-Sac	AATCCGCGGACTTCCTAATTATCCCT	63,4
tral-R	AAGCTGTTTTGACTTTTGGCTGGC	61
RT-5bR	CCAACGCTGACAGCATTAGAC	60
tral-U2*	CTCAAACATCTGCGTGAAGCT	57,9
RT-6F	GTTGTTCCATATCATCGGCAAGAT	59
tral-U*	ACCTGGGCTATTCATGAAGTA	55,9
RT-6R	AAACACGGTCGCCATCTTCGT	60
traJ-R	ACAAGTGGTTTGCAATCCTTTAG	57,1
oriT-U*	TTTCATTTCGGCTACAAGGCAT	55,9
oriTR1-Xba	GAATTTTCTAGAATATAAAAATGAGTA	52,8
oriTR2-Xba	TTTTGGTCTAGATGGATGCATGAGTTA	60,4
traM1R*	GCTAGCCAATGCAGCAT	53,7
traM-R	CGAAACAATGTGGCTGAAGATACC	61
pUC U	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	58
pUC R	AGCGGATAACAATTTACACAGGA	58

gekennzeichnete Primer sind infrarotfarbstoffmarkiert und für die Sequenzierungen eingesetzt.

2.1.13. Konjugation

LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikazusatz
Nitrozellulosemembran

2.1.14. Elektronenmikroskopie

Pioloform beschichtetes Kupfernetz (Merck)
Phosphotungstic Säure pH 6.5 (Sigma)

2.2. Methoden

2.2.1. Isolierung von Gesamt-DNA (Sambrook, 1989)

Die Bakterien einer *Legionella*-Agarplatte, die für zwei Tage bei 37°C und 5% Kohlendioxid gewachsen sind, werden in 2 ml H₂O aufgenommen und in Reaktionsgefäßen für zwei Minuten bei 6000 rpm abzentrifugiert. Das Sediment wird mit 0,15 M NaCl/0,1 M EDTA (pH 8.0) gewaschen und in 100 µl 25% Saccharose/40 mM Tris-HCl (pH 7.5) wieder gelöst. Danach werden 60 µl 250 mM EDTA (pH 8.0) und 40 µl Lysozymbilösung (20 mg/ml) zugegeben und der Ansatz für 30 Minuten bei 37°C unter leichtem schütteln inkubiert. Anschließend werden 40 µl 250 mM EDTA (pH 8.0) und 48 µl 10% SDS zugesetzt und für 15 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Nun werden 612 µl TES Puffer add 1ml und 6µl Proteinase K (10 mg/ml) dazugegeben. Das Gemisch wird in ein 10 ml Kapsenbergrohrchen überführt und bei 37°C bis zum Aufklaren geschüttelt (ca. 1 Stunde). Daraufhin werden 250 µl NaClO₄ und 650 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) hinzugefügt. Nun wird bei Raumtemperatur der Ansatz wiederum geschüttelt bis sich ein homogenes Gemisch bildet (ca. 2 Stunden). Anschließend wird der Ansatz in einem neuen Reaktionsgefäß für 10 min bei 10000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird mit 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt und wiederum abzentrifugiert. Der dadurch gewonnene Überstand wird mit zweifachem Volumen Ethanol (absolut) versetzt und anschließend wird der Ansatz für 2 Minuten inkubiert und mit 15000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Das DNA Sediment wird leicht angetrocknet und in 100 µl Wasser (bidest) aufgenommen.

2.2.2. Isolierung von Plasmid DNA (Sambrook et. al., 1989)

3 ml einer Übernachtskultur werden abzentrifugiert und das Sediment wird mit 100 µl Lösung 1 wieder gelöst. Nach 5 Minuten Inkubation wird Lösung 2 dazugegeben und der Ansatz wird 5 Minuten auf Eis gelegt. Im Anschluss daran wird 150 µl Lösung 3 zugegeben, stark geschüttelt und 10 min auf Eis ruhen lassen. Nach abzentrifugieren mit 10000 rpm für 10 Minuten wird mit dem Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Die DNA wird mit absolutem Ethanol gefällt und nach erneutem zentrifugieren mit 10000 rpm für 10 Minuten in 50µl Wasser aufgenommen und bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.3. Phenol/Chloroform-Extraktion

Mit dieser Methode lassen sich Proteine aus einer DNA-Lösung entfernen. Dazu wird der zu reinigenden Lösung ein halbes Volumen Phenol und ein halbes Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugesetzt und kräftig geschüttelt. Das erhaltene Gemisch wird 5 Minuten bei 15000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wird mit einer Pipette vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt, ohne die Interphase mit zu übernehmen. Danach wird der Vorgang so lange wiederholt bis die obere Phase keine Trübung mehr aufweist und die Interphase deutlich abnimmt. Dann wird die obere Phase noch zweimal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gewaschen und es kann eine DNA Fällung durchgeführt werden.

2.2.4. DNA Fällung

Zum Ausfällen der DNA werden der Lösung 1/10 Volumen Na-Acetat-Lösung und das dreifache Volumen absolutes Ethanol (-20 °C) zugegeben und abhängig von der Menge wird die Lösung für 20 Minuten bis 1 Stunde bei -20 °C inkubiert. Im Anschluss wird die Lösung bei 15000 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert. Das Sediment wird an Raumluft einige Minuten getrocknet und anschließend in Wasser (bidest) wieder gelöst. Die Wassermenge richtet sich nach der Größe des Pellets.

2.2.5. DNA Konzentrationsbestimmung (Sambrook et. al. 1989)

Zur Konzentrationsbestimmung einer DNA Lösung wird ein Photometer verwendet. Die Bestimmung erfolgt in einer Quarzküvette mit 1 cm Schichtdicke bei 260 nm Wellenlänge.

OD = optische Dichte

Doppelstrang DNA: 1 OD entspricht 50 µg DNA/ml

Einzelstrang DNA: 1 OD entspricht 40 µg DNA/ml

Oligonukleotide: 1 OD entspricht 20 µg/ml

Berechnung: $Y \text{ OD} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times Z \text{ µg DNA/ml} = X \text{ µg DNA/ml}$

2.2.6. DNA Spaltung mit Restriktionsenzymen

Zur analytischen Spaltung werden 1 µg Plasmid DNA bzw. 5 µg Gesamt DNA benutzt. Der Spaltansatz besteht aus: X µl DNA-Lösung, 1/10 Volumen Spaltpuffer (10x), 1/10 RNase-Lösung (10mg/ml), 1-5 U Restriktionsenzym (Plasmid- bzw. Gesamt-DNA), ad 20µl H₂O bidest. Plasmid-DNA benötigt 2-3 Stunden Spaltungszeit, Gesamt-DNA 3-4 Stunden. Die Temperatur ist abhängig von den verwendeten Enzymen. Soll eine präparative Spaltung erfolgen ist der Ansatz entsprechend zu vergrößern.

2.2.7. Dephosphorylierung linearisierter Plasmid DNA

Wenn die Religierung eines Vektors verhindert werden soll, müssen die 5`-Phosphatenden entfernt werden. Dies geschieht mit Hilfen von „calf intestinal alkaline phosphatase“ (CIP). Die Konzentration an CIP soll 0,01 U/pmol 5`Enden betragen.

Für einen 50 µl Ansatz ist folgende Angabe zu verwenden:

X µl CIP; 5 µl CIP-Puffer; Z µl linearisiertes Plasmid; ad 50 µl H₂O bidest.

Das CIP ist auf zwei Hälften aufzuteilen. Zu Beginn ist die erste Hälfte zuzugeben und nach 30 Minuten bei 37°C die zweite. Anschließend wird das Volumen mit Wasser auf 100µl aufgefüllt. Danach schließt sich eine Phenol /Chloroform-Extraktion und eine DNA-Fällung an. Das erhaltene Pellet wird mit geeigneter Menge Wasser gelöst.

2.2.8. Ligation mit T4 Ligase

Die Ligation von Vektor und Insert erfolgt in einem 20µl Ansatz. Das Verhältnis von Vektor und Insert soll 1:3 betragen, ist jedoch variierbar. Der Ansatz setzt sich wie folgt zusammen: 4 µl Ligase-Puffer (10x), 1µl T4 Ligase (1U/µl), X µl DNA Fragmente (z.B. 1 µg Vektor DNA und 3µg Insert DNA), ad 20µl H₂O bidest. Die Inkubationszeit beträgt für „sticky ends“ ca. 12-14 Stunden, bei einer Temperatur von 14°C. Danach kann der Ansatz zur Transformation eingesetzt werden.

2.2.9. Herstellung kompetenter *E.coli* Zellen für die Elektroporation (Calvin & Hannawalt 1988)

Die Bakterien werden in 500 ml LB-Medium angesetzt und bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,5 wachsen gelassen. Danach wird die Bakterienkultur bei 3000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, das Sediment wird zunächst gleichem Volumen an 10% Glycerin gewaschen. Es schließt sich eine erneute Zentrifugation mit 3000 rpm für 5 Minuten an. Wiederum wird das Sediment mit 10% Glycerin gewaschen, jedoch mit halben Volumen. Nach erneuter Zentrifugation wird das Zellpellet mit 1,5 ml 10% Glycerin wieder in Suspension gebracht und auf 150 µl Portionen verteilt. Die Aliquots können dann bei -70°C aufbewahrt werden.

2.2.10. Transformation durch Elektroporation (Calvin & Hannawalt 1988)

Den 150 µl Aliquots kompetenter *E.coli* Bakterienzellen werden 200 ng DNA zugegeben. Das Gemisch und die Plattenkondensatorküvette werden für 5 Minuten auf Eis gestellt. Danach wird die Küvette mit dem Zell/DNA Gemisch befüllt und in den Elektroporator geschoben. Nun wird der elektrische Impuls (2,3 kV, 400 Ω und 25 µF für *E.coli*) gegeben. Das Gemisch aus der Küvette wird mit 1 ml LB-Medium aufgefüllt und in ein Reaktionsgefäß pipetiert. Es folgt eine Inkubationszeit von 2 Stunden bei 37°C. Abschließend werden maximal 200 µl Bakteriensuspension auf jeweils einer antibiotikahaltigen Agarplatte ausgebracht.

2.2.11. Horizontale Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook et.al., 1982)

Zur Auftrennung von DNA Fragmenten wird ein 1% Agarosegel verwendet.

Es werden zur Herstellung des Gels 1g Agarose mit 100 ml 1x TAE bis zur vollständigen Lösung aufgekocht und anschließend unter fließendem Wasser leicht abgekühlt. Der Gelschlitten wird mit Klebeband abgedichtet und ein Plastikamm wird 1 cm vom oberen Rand entfernt senkrecht angebracht, damit sich Taschen zum Einbringen der DNA ausbilden. Das flüssige Gel wird nun eingegossen und der Schlitten wird waagrecht gelagert bis das Gel erstarrt. Der Kamm wird entfernt und das Gel wird in die mit 1x TAE-Puffer befüllte Kammer gelegt. Die DNA Proben werden mit Elektrophorese-Puffer versetzt und in die Taschen eingebracht. Nun wird eine Spannungsquelle an die Gelkammer so angeschlossen, dass die DNA zur Anode wandern kann. Die Auftrennung erfolgt bei 40 V in ca. 16 Stunden und bei 100 V innerhalb von ca. 3 Stunden. Nach der Elektrophorese wird das Gel für 20 Minuten mit Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml) gefärbt, UV Licht (302nm) macht die DNA Banden sichtbar und diese können fotografiert und ausgeschnitten werden.

2.2.12. Elution von DNA aus einem Agarosegel (Thuring & Sanders, 1975)

Die aus einem Agarosegel ausgeschnittene DNA Bande wird zerkleinert und in ein Reaktionsgefäß gegeben. Das Gel wird mit einem Glasstab zerdrückt bis keine festen Bestandteile mehr enthalten sind. Danach werden 300 µl Phenol dazugegeben und durch schütteln vermischt. Das Gemisch wird bei -20°C für mindestens 20 Minuten gekühlt, danach kräftig geschüttelt und bei 13000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Gefäß pipetiert und mit halben Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt und nach kräftigem Schütteln wiederum mit 13000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und in ein neues Gefäß gefüllt. Danach kann die DNA gefällt werden und die DNA in Wasser bei -20°C aufbewahrt werden.

2.2.13. Southern-Blot (Southern, 1975)

Das Prinzip des Southern Blots dient zum Nachweis von spezifischer DNA Banden in einem Gemisch aus verschiedenen DNA Fragmenten.

Dazu schließt sich an die Elektrophorese, nachdem die Banden unter UV photographiert worden sind ein Depurinierungsschritt mit 0,25 M HCl für 8 Minuten an. Danach wird ebenso lange eine Denaturierung mit 0,5 N NaOH/1,5 M NaCl durchgeführt. Der letzte Schritt besteht in der Zugabe einer Neutralisierungslösung 1,5 M NaCl/0,5 Tris-HCl, pH 5.1. Nun wird das DNA Bandenmuster durch Kapillarkräfte auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Aufbau beginnt mit einem 5 cm hohen Papierstapel, auf diesen werden drei Lagen Filterpapier in Gelgröße gelegt. Auf das Filterpapier folgt die Nitrozellulosemembran, die auf Gelgröße zurechtgeschnitten wird. Das Gel wird auf die Membran gelegt und als Abschluss werden unter das Gel zwei Lagen dickes Filterpapier gegeben, das mit seinen Enden in zwei Schalen mit 20 x SSC getaucht wird. Das Ganze wird mit einem 500 g Gewicht beschwert. Das Blotten kann über Nacht erfolgen. Anschließend wird die Nitrozellulosemembran mit 2x SSC für 10 Minuten gewaschen getrocknet und die DNA durch Crosslinking fixiert.

Nichtradioaktive Markierung der DNA Sonden (ECL-Kit, Amersham)

0,3-1 µg DNA in 10µl Wasser lösen, 5 min kochen und anschließend auf Eis abkühlen. Kurz abzentrifugieren und 10 µl Markierungsreagenz zugeben, leicht schütteln. 10 µl Glutaraldehyd beimischen, vortexen und abzentrifugieren. Anschließend bei 37°C für 10 min inkubieren und dann sofort für die Hybridisierung einsetzen.

Vorhybridisierung

Die Membran wird zur Vorbereitung auf die Hybridisierung für 2-3 Stunden in ca. 40°C warmer Vorhybridisierungslösung geschwenkt. Nach abziehen der Lösung ist die Membran vorbereitet.

Hybridisierung

Zunächst muss die Membran über Nacht mit der markierten Sonde inkubiert werden. Dazu wird sie gerollt in ein Röhrchen gebracht und es wird warme Vorhybridisierungslösung zugegeben, anschließend wird der Ansatz mit der markierten Sonde zupipetiert.

Das Röhrchen wird bei 43°C unter leichten rollierenden Bewegungen über Nacht inkubiert. Danach wird die Hybridisierungslösung entfernt und die Membran für 2x 10min in Waschlösung 1 bei 50°C geschwenkt. Diese wird entfernt und die Membran wird für 2x 5 min bei Raumtemperatur in Waschlösung 2 unter leichter Bewegung inkubiert. Die Waschlösung wird vollständig entfernt und es werden 5 ml Detektionslösung 1 und 5 ml Detektionslösung 2 in ein Schälchen mit der Membran gegeben und für exakt 1 Minute inkubiert. Die Signale auf der Membran sind nun fähig einen Film zu schwärzen. Dazu wird die Membran in durchsichtige Folie gewickelt und in der Dunkelkammer ein Hyperfilm-ECL aufgelegt. Je nach Stärke des Signals, aber frühestens nach 10 Minuten kann der Film entwickelt werden. Ist das Signal zu schwach kann gegebenenfalls noch ein Film aufgelegt werden.

2.2.14. PCR (Saiki et. al., 1988)

Die PCR dient dazu spezifische DNA Stücke zu vervielfältigen. Definiert werden diese Stücke durch die Auswahl von zwei Oligonukleotiden (Primern) die an flankierende Bereiche des zu amplifizierenden Stücks komplementär binden können. Ausgehend von dem durch die Primer und der einsträngigen DNA gebildeten Doppelstrang kann eine DNA-Polymerase einen neuen Doppelstrang synthetisieren. Wird dieser Zyklus aus Strangtrennung, Anlagerung der Primer und Synthese eines neuen DNA Doppelstrangs mehrmals durchlaufen, steigt die Anzahl des amplifizierten DNA Stücks exponentiell an.

Für den Reaktionsansatz werden 10µl Taq Polymerasepuffer und 4µl Desoxynukleotidgemisch (20 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP; pH 7.5) in einem entsprechenden Reaktionsgefäß pipetiert. Dazu wird 0,5 µg (ca. 1µl) DNA gegeben, die den amplifizierenden Bereich enthält. Von jedem Primern wird jeweils 1 µg/µl (1µl) dazupipetiert und schließlich werden 5 U/µl (1µl) der Taq Polymerase hinzugefügt. Nach gutem Mischen kann die Reaktion gestartet werden:

1. Denaturierung: 5 Minuten 95°C; Bei weiteren Durchläufen des Zyklus 1 Minute/95°C
2. Annealing: 1 Minute Anlagerung der Primer bei entsprechender Temperatur $(69,3 + 0,4(\%GC\text{-Gehalt}) - 650 / \text{Länge des Primers})$
3. Elongation: 1 Minute/ kb amplifizierte DNA ca. 30 Zyklen; danach 5 Minuten 72°C

Das Produkt kann anschließend in 1% Agarosegel durch Elektrophorese aufgetrennt werden und die Größe des Fragments kann dadurch bestimmt werden. Für weitere Versuche kann das Fragment aus dem Gel eluiert werden.

2.2.15. Sequenzierung (Sanger et. al., 1977)

DNA Einzelstränge können mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger sequenziert werden. Dazu wird eine modifizierte Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt, wobei der Umstand genutzt wird, dass eine DNA Polymerase nach Einbau eines Didesoxynukleotids die Synthese abbricht.

Es werden vier Ansätze der zu sequenzierenden DNA in einer PCR amplifiziert, die jeweils eine Art Didesoxynukleotide enthalten. So entstehen Fragmente unterschiedlicher Länge, die z. B. durch ein automatisches Gelelektrophoresegerät analysiert werden können.

Für die Analyse wurde ein automatischer DNA Sequenzierer verwendet (LI-COR-DNA 4000), der infrarotfarbstoffmarkierte DNA erkennt. Für die Markierung wurden Primer mit Infrarotfarbstoff bei der Kettenabbruch-Methode nach Sanger benutzt.

2.2.16. Konjugation zwischen *E. coli*

Eine 2 ml Übernachtskultur des Donorstamms (*E.coli* Sm10 λ pir) und des Akzeptorstammes (*E.coli* XL1-blue, Stratagene) werden 1:20 verdünnt und ohne Selektionsdruck bis zu einer OD550 von 0.7 inkubiert. Von diesen Vorkulturen wird eine Verdünnungsreihe hergestellt und auf LB-Agar mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert, um die Ausgangskonzentration an Zellen zu ermitteln. Für die Konjugation werden jeweils 0.5ml der Donor- und Akzeptorsuspension auf einem sterilen Stück Nitrozellulosefilter gemischt und für 5h bei 37°C ohne Selektionsdruck inkubiert. Danach werden die Filter mit 4ml LB-Medium abgeschwemmt. Von 1ml dieser Suspension wird eine Verdünnungsreihe hergestellt und auf LB-Agarplatten ausplattiert, die sowohl Tetrazyklin als auch Ampicilin bzw. Chloramphenicol enthalten. *E. coli* Sm10 λ pir kann nicht auf LB-Tc Platten wachsen. Die Donorplasmide sind pGEM (Amp^R; Negativkontrolle), pMMB207 (Cm^R; Positivkontrolle) und pGEM mit traHIJK-oriT aus Trb1 (Amp^R)

Durch diese Selektion ist gewährleistet, dass nur Transkonjuganten überleben, die ein Plasmid erhalten haben und somit zwei Resistenzen aufweisen.

2.2.17. Elektronenmikroskopie

Nach vier Tagen Wachstum auf BCYE-Agar bei 30°C und 5% CO₂ werden die Bakterien in H₂O_{Dest.} aufgenommen und ein Tropfen der Suspension wird auf ein Pioloform beschichtetes Kupfernetz (Merck) appliziert. Nachdem die sich die Bakterien abgesetzt haben werden die Proben mit Phosphotungsticsäure (Sigma) pH 6.5 gefärbt und können anschließend im Elektronenmikroskop analysiert werden (Zeiss EM 10; 60 kV).

3. Ergebnisse

3.1. Klonierung Trb1/Trb2

Aus einer Genbank von *Legionella pneumophila* Corby konnte durch Sequenzvergleiche ein Klon (pKHr 25) identifiziert werden, dessen Insert Homologie zu dem Protein TrbE des *Enterobacter aerogenes* IncP β Plasmids R751 aufweist. Ebenso zeigt sich eine Ähnlichkeit mit den Proteinen VirB4 von *Agrobacterium tumefaciens* und LvhB4 von *Legionella pneumophila*, die jeweils ein Gen eines Typ IV Sekretionssystems darstellen (Alt-Mörbe et. al., 1996; Segal et. al., 1999a).

Die von diesem Insert ausgehende weitere Sequenzierung durch „*chromosomal walking*“ ergab die im Folgenden als *trb/tra* Region bezeichnete DNA-Sequenz (Abb.1). Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier Plasmide konstruiert, pKH 537 pKH 538, pKH 539 und pKH 540 (Abb. 2), die Sequenzen der restlichen bereits vorhandenen Plasmide wurde sequenziert und ausgewertet. Hierbei zeigte sich, dass alle Gene eines IncP R751/RP4 ähnlichen DNA-Konjugationssystems vorhanden waren. Nach Abschluß der Sequenzierung dieser Gene wurde das gesamte Genom von *L.p.* Corby vollständig sequenziert und verfügbar (Glöckner et. al., 2007). Bei der Einordnung in das *L.p.* Corby Genom zeigte sich, dass der als *trb/tra* Region bezeichnete Abschnitt auf zwei Genominseln vorliegt, die als Trb1 und Trb2 bezeichnet werden, die Gene aus Trb1 sind mit dem Zusatz 1 versehen, Trb2 Gene mit einer 2.

Zunächst wird auf die Klonierung der in dieser Arbeit hergestellten Plasmide kurz eingegangen. Im Nachfolgenden werden die Leserahmen im Einzelnen beschrieben, gegliedert nach funktionell zusammengehörenden Bereichen. Für jedes Gen wird nacheinander versucht eine Funktion zuzuordnen, anhand von gleichen Sequenzmotiven zu bislang bekannten Proteinen, bzw. durch hohe Übereinstimmung der Aminosäuresequenz. Dabei werden auch die Ergebnisse der Datenbankabfrage nach vergleichbaren Proteinen der vollständig sequenzierten Legionellastämme *L.p.* Philadelphia1, *L.p.* Paris, *L.p.* Lens aufgezeigt.

3.1.1. Konstruktion der Plasmide

Durch Auswahl eines Primers, der in bereits bekannter Sequenz bindet und eines Zufallsprimers wurden Abschnitte der DNA Sequenz der *trb/tra* Region als PCR Fragmente generiert. Die verwendeten Primer wurden aus bekannten Genen abgeleitet, die aufgrund des ähnlichen Aufbaus der Trb1 und Trb2 Genominseln zu *Enterobacter aerogenes* IncP β Plasmids R751 oder *L.p.* AA100 *tra1* folgen könnten. Die Annealingtemperatur wurde ebenfalls niedrig gewählt um eine Bindung im Genom zu erleichtern. Die PCR Fragmente wurden in ein Vektorplasmid pGEM-T eingefügt und durch Elektroporation in *E.coli* Zellen gebracht (Tab.2; Abb. 1; Abb. 2). Der Vektor pGEM-T enthält ein Ampicillinresistenzgen und ein lacZ Operon, wodurch die Selektion von Bakterienkolonien die das Plasmid aufgenommen haben ermöglicht wurde.

Anschließend wurde die in den Bakterien multiplizierte Plasmid DNA wieder isoliert und konnte zur Sequenzierung verwendet werden. Die Sequenzierung wurde mit Infrarotfluoreszenzfarbstoff markierten Primern durchgeführt. Die nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger erhaltenen Fragmente wurden mit einem LICOR-Gerät analysiert und die DNA Sequenz dadurch erhältlich.

Enthielten entsprechende Plasmide ein Insert mit einem zu der bekannten Sequenz überlappenden Bereich, wurde der neu erhaltene Abschnitt angefügt und als Ausgangspunkt für den nächsten Schritt des „chromosomal walkings“ mit neuem Zufallsprimer oder abgeleitetem Primer verwendet.

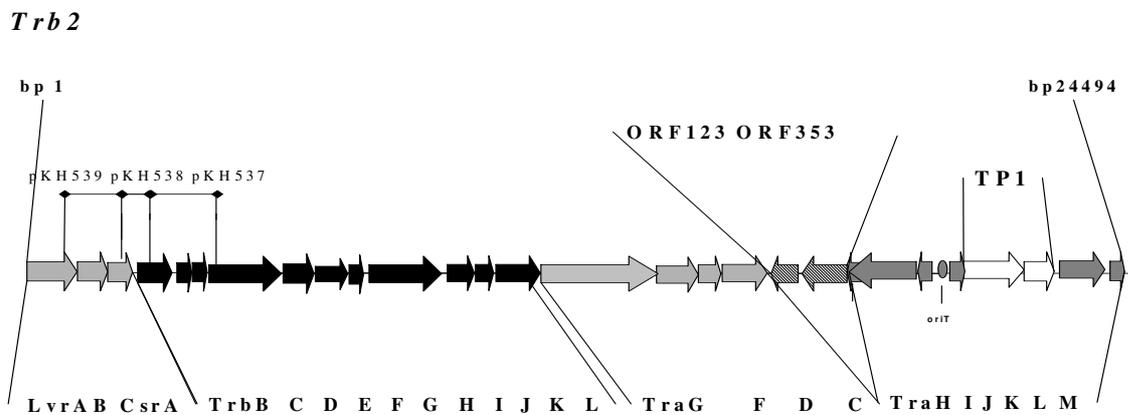
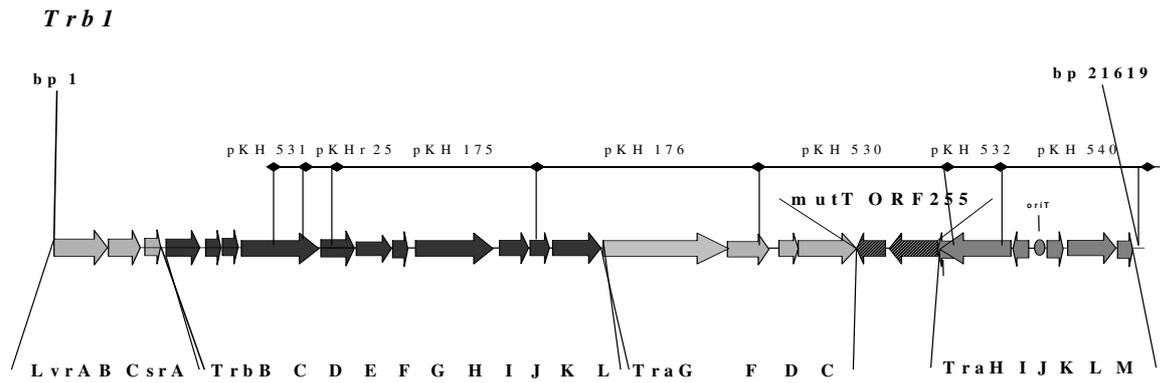
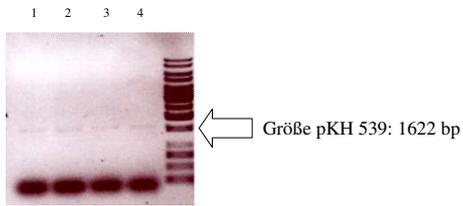


Abb.1: Übersicht über die *trb/tra* Regionen der Genominseln *Trb1* und *Trb2* von *L.p. Corby* und Zuordnung der einzelnen Plasmide aus Abbildung 2. Die Richtung der Pfeile gibt die Leserichtung der Gene an.

Tab.2 Zuordnung der die *trb/tra* Region enthaltenden Plasmide zu den Genominseln *Trb1* und *Trb2*.

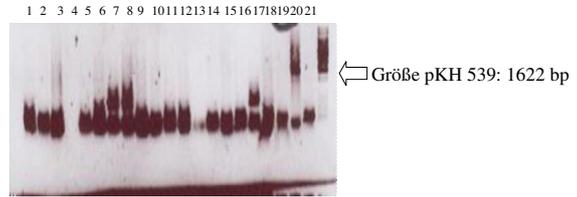
PLASMID	ANFANG	ENDE	GRÖßE (BP)
Trb1			
pKH 539 (A1K20)	546	2167	1622
pKH 538 (B1K50)	1749	2349	601
pKH 537 (E2K24)	2267	4952	2686
Trb2			
pKH 531 (F5K42)	4893	5627	735
pKHr25	5562	6444	883
pKH 175 (r8K2)	6437	10331	3895
pKH 176A	10187	12690	2504
pKH 176B	12690	14671	1982
pKH 530	14571	17744	3174
pKH 532 (P6K10,12)	17650	19773	2124
pKH 540 (J5K36)	19724	21619	2413
		22136	

A.) pKH 539



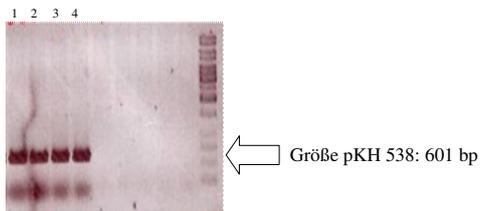
Denaturierung: 94°C, 45s
 Annealing: 48°C, 45s
 Elongation: 72°C, 8min

B.) pKH 539



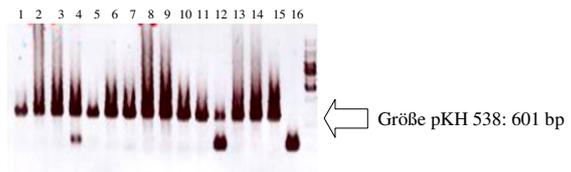
Denaturierung: 94°C, 45s
 Annealing: 48°C, 45s
 Elongation: 72°C, 3min

C.) pKH 538



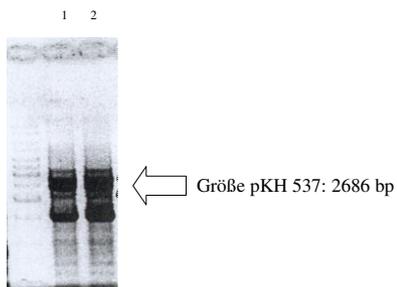
Denaturierung: 94°C, 45s
 Annealing: 45°C, 45s
 Elongation: 72°C, 5min

D.) pKH 538



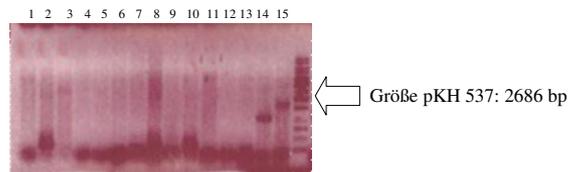
Denaturierung: 94°C, 45s
 Annealing: 54°C, 45s
 Elongation: 72°C, 2min

E.) pKH 537



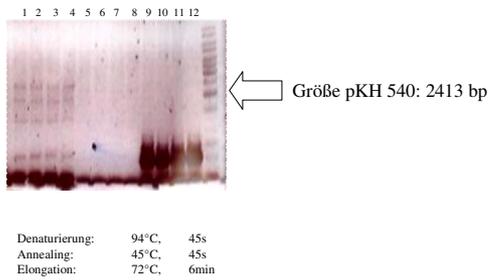
Denaturierung: 94°C, 45s
 Annealing: 50°C, 45s
 Elongation: 72°C, 8min

F.) pKH 537

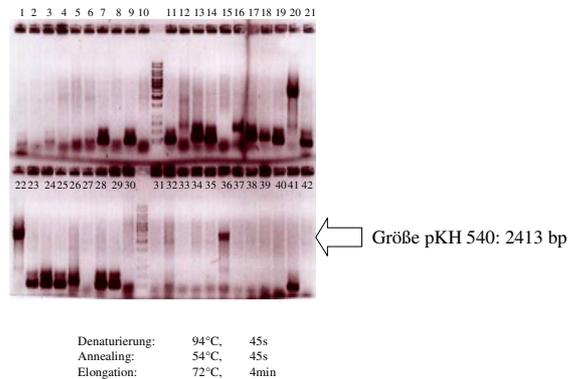


Denaturierung: 94°C, 45s
 Annealing: 54°C, 45s
 Elongation: 72°C, 3min

G.) pKH 540



H.) pKH 540



I.)

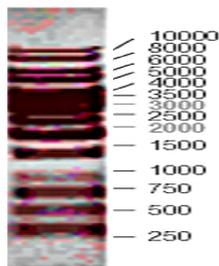


Abb.2: Herstellung der Plasmide pKH 537 (E. und F.), pKH 538 (C. und D.), pKH 539 (A. und B.) und pKH540 (G. und H.).

A.: pKH 539: Die Spalten 1 bis 4 enthalten ein PCR-Produkt A1 aus dem Genom von *L.p. Corby*. Verwendet wurde das Primerpaar trbB1R, der aus dem Gen trbB des Plasmids R751 von *Enterobacter aerogenes* abgeleitet wurde und einem Zufallsprimer PUC U.

B.: PCR der *E.coli* Klone, in die das A1 Fragment eingebracht worden ist. Als Primer wurden PUC U und PUC R verwendet die bei dem Vektor pUC 18 die Insertionsstelle flankieren. Die Insert DNA aus Klon 20 wurde sequenziert und anschließend analysiert.

C.: pKH 538 Die Spalten 1 bis 4 enthalten das PCR Produkt B1 aus dem Genom von *L.p. Corby*. Die Primer sind trbB, abgeleitet aus trbB des Plasmids R751 von *Enterobacter aerogenes* und trbAU1, abgeleitet aus trbA des Plasmids R751 von *Enterobacter aerogenes*.

D.: PCR der *E.coli* Klone, in die das B1 Fragment eingebracht worden ist. Als Primer wurden PUC U und PUC R verwendet die bei dem Vektor pUC 18 die Insertionsstelle flankieren. Die Insert DNA aus Klon 3 wurde sequenziert und anschließend analysiert.

E.: pKH 537: Die Spalten 1 und 2 enthalten das PCR Produkt E2 aus dem *L.p. Corby* Genom. Die verwendeten Primer trbA2 und trbE sind aus den gleichnamigen Genen trbA und trbE des *Enterobacter aerogenes* Plasmids R751 abgeleitet.

F.: PCR der *E.coli* Klone, in die das E2 Fragment eingebracht worden ist. Als Primer wurden PUC U und PUC R verwendet die bei dem Vektor pUC 18 die Insertionsstelle flankieren. Die Insert DNA aus Klon 3 wurde sequenziert und anschließend analysiert.

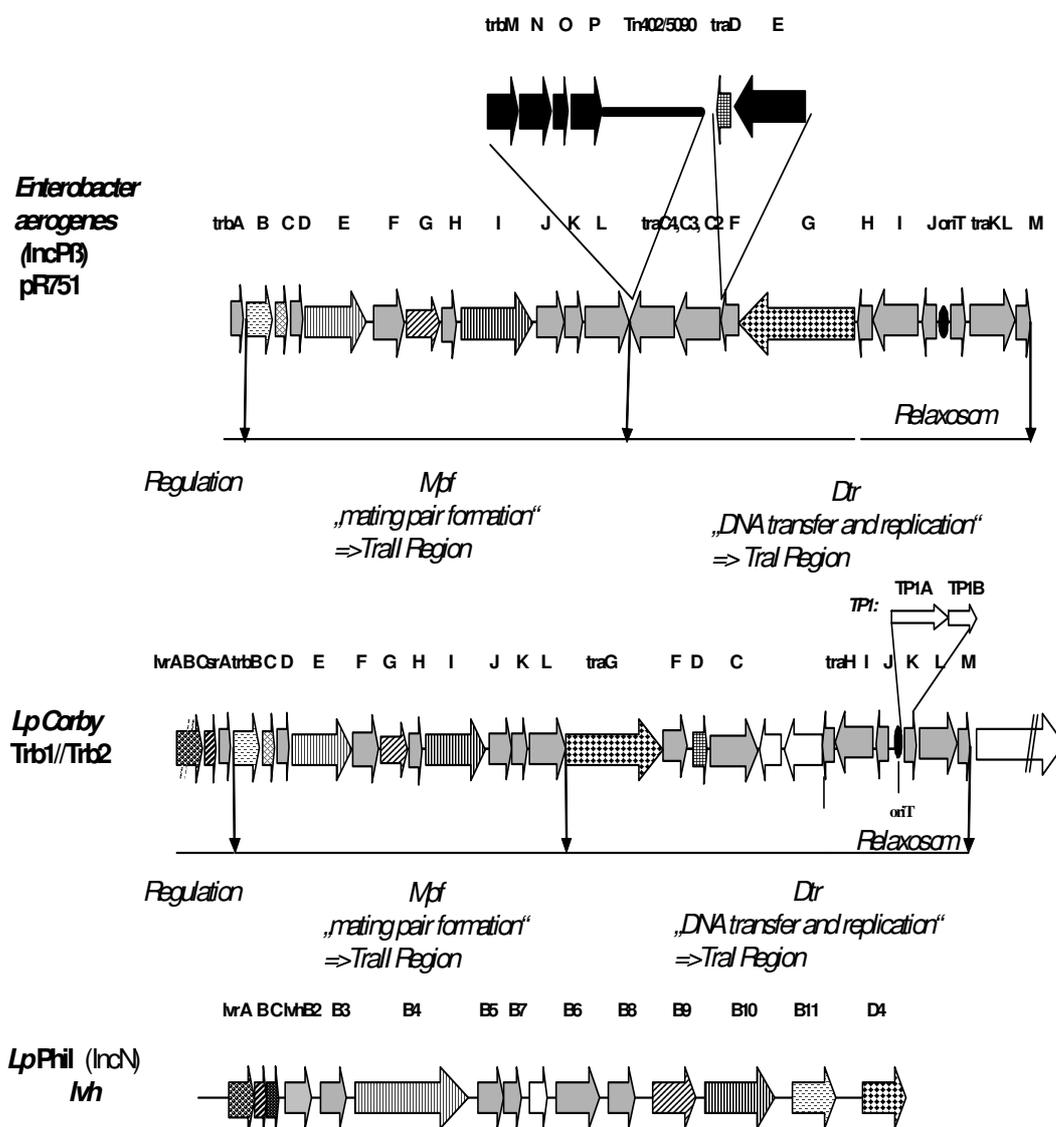
G.: pKH 540: Die Spalten 1 bis 4 enthalten das PCR Produkt J5 aus dem *L.p. Corby* Genom. Die verwendeten Primer traJ und traM sind aus den gleichnamigen Genen traJ und traM von *L.p. AA100* abgeleitet

H.: PCR der *E.coli* Klone, in die das J5 Fragment eingebracht worden ist. Als Primer wurden PUC U und PUC R verwendet die bei dem Vektor pUC 18 die Insertionsstelle flankieren. Die Insert DNA aus Klon 36 wurde sequenziert und anschließend analysiert.

I: Größenmarker, bezeichnet sind die Basenpaargrößen der standardisierten Fragmente.

3.1.2. Trb-Genominseln

Aus Abb. 3 ist ersichtlich, dass die Organisation der Trb1/Trb2 Regionen sehr ähnlich zu dem IncP β Plasmide R751 ist. Drei Bereiche lassen sich demnach unterscheiden, zunächst Gene die möglicherweise einen Regulationsmechanismus kodieren: LvrAB und lvrC, bzw. trbA. Gefolgt von zwei Regionen, die den membranüberspannenden Proteinkomplex und Pilus bilden(trbB-L) entsprechend der Trall Region von R751/TP4. Dann folgen Gene die Proteine für den DNA Transfer k (TraG, TraF, TraC, TraH-M) und das Relaxosom ausbilden, entsprechend der Tral Region von R751/TP4.



Tab.3: Die *trb/tra* Region in Trb1 und Trb2 von L.p. Corby im Vergleich zu dem Typ IV Sekretionssystem des *E. aerogenes* IncP β Plasmids R751 und dem Sekretionssystem lvh von *L.p.* Philadelphia 1, homologe Gene sind gleich schraffiert.

Auffallend ist, dass in Trb1/Trb2 keine Tn-Elemente die Genorganisation unterbrechen, wie dies bei R751 zwischen Tral und Trall der Fall ist. Allerdings wird in Trb2 TraK durch ein IS Element unterbrochen.

Im folgenden Teil werden die offenen Leserahmen so beschrieben, wie sie sich auf den konstruierten Plasmiden finden. Die Zuordnung zu den einzelnen Plasmiden lässt sich aus Abbildung 1 und Tabelle 2 entnehmen.

Die zusammengefassten Ergebnisse der Analyse finden sich in Tabelle 4 und Tabelle 5. Tabelle 6 zeigt den Vergleich der *trb/tra* Gene zwischen der Trb1 und Trb2 Genominsel. Die Leserahmen trbBCD wurden aus der Genominsel Trb2 mit PCR amplifiziert, trbEFGHIJKL sind aus Trb1 kloniert und sequenziert worden (Abb.1).

Die ersten fünf vollständigen Leserahmen, benannt als lvrB2, csrA2, trbB2, trbC2 und trbD2 befinden sich in der Genominsel Trb2 (Abb.1; Tab. 2). Die Plasmide, die diese enthalten sind pKH 539, pKH 538 und pKH 537. (Abb.1; Abb.2; Tab.2).

Insgesamt finden sich alle Gene eines TypIV bzw. Konjugationssystems, vergleichbar den IncP kodierten Transportsystemen von R751 bzw. RP4.

Tab:4: Die *trb/tra* Region in Trb1

GEN	ANFANG	ENDE	GRÖÖE (NT)	MOLEKULAR GEWICHT (DA)	FUNKTION
lvrA1	1	882	881	33920.98	Entspricht lpp0166
lvrB1	743	1207	465	17430.07	Entspricht Lpp0167
csrA1	1228	1494	267	10112.58	Regulation?
trbB1	1505	2470	966	35583.61	Mpf; ATPase
trbC1	2482	2859	378	13229.80	Mpf; Präpilin
trbD1	2856	3155	300	11472.76	Mpf
trbE1	3152	5677	2526	94391.66	Mpf
trbF1	5614	6417	744	30464.00	Mpf
trbG1	6414	7289	876	33013.36	Mpf
trbH1	7305	7703	399	15024.39	Mpf
trbI1	7709	8959	1251	45855.79	Mpf
trbJ1	8975	9715	741	27906.54	Mpf
trbK1	9742	9954	213	7724.95	Eex Faktor
trbL1	9959	11356	1398	47957.8	Mpf
traG1	11353	13242	1890	71336.79	Mpf-Dtr Verbindung
traF1	13239	13784	546	20424.26	Reifung des Pilinproteins TrbC
TraD	13785	13855	165	7523.22	
traC1	13902	16124	2187	82866.28	DNA Primase
mutT	16126	16584	459	17743.51	MutT
ORF255	16595	17362	768	29551.79	
traH1	17512	17808	297	12751.90	Relaxosom stabilisierung
traI1	17453	19354	1866	73559.33	DNA Relaxase
traJ1	19351	19704	354	13328.81	Relaxosom bestandteil oriT Bindung
traK1	20119	20445	327	12488.41	oriT Bindung
traL1	20445	21170	726	27219.52	
traM1	21170	21619	450	16801.70	

Tab:5: Die *trb/tra* Region in Trb2

GEN	ANFANG	ENDE	GRÖßE (NT)	MOLEKULAR GEWICHT (DA)	FUNKTION
<i>lvrA2</i>	1	885	885	33995.87	Entspricht lpp0166
<i>lvrB2</i>	746	1213	468	17941.74	Entspricht lpp0167
<i>csrA2</i>	1232	1498	267	10190.86	Regulation?
<i>trbB2</i>	1511	2476	966	35269.24	Mpf; ATPase
<i>trbC2</i>	2489	2866	378	13291.95	Mpf; Präpilin
<i>trbD2</i>	2863	3162	300	11410.72	Mpf
<i>trbE2</i>	3159	5696	2538	94997.56	Mpf
<i>trbF2</i>	5693	6436	744	28320.46	Mpf
<i>trbG2</i>	6433	7308	876	33098.68	Mpf
<i>trbH2</i>	7311	7721	411	15393.05	Mpf
<i>trbI2</i>	7703	8968	1266	46120.87	Mpf
<i>trbJ2</i>	8982	9722	741	27923.66	Mpf
<i>trbK2</i>	9722	9964	213	8855.42	Eex Faktor
<i>trbL2</i>	9912	11384	1473	48547.15	Mpf
<i>traG2</i>	11387	13270	1884	70872.35	Mpf-Dtr Verbindung
<i>traF2</i>	13267	13812	546	20571.58	Reifung des Pilinproteins TrbC
<i>traD2</i>	13813	13978	165	7511.13	
<i>traC2</i>	13948	16152	2187	82676.67	DNA Primase
ORF123	16234	16605	372	14080.65	Mögl. ATPase α -Untereinheit
ORF352	16583	17641	1059	41310.14	Mögl. Prophagenprotein
<i>traH2</i>	17788	18084	297	11214.03	Relaxom stabilisierung
<i>traI2</i>	17756	19630	1875	71432.25	DNA Relaxase
<i>traJ2</i>	19627	19980	354	13550.28	Relaxom bestandteil oriT Bindung
<i>traK2</i>	20397	20609	354	8112.52	oriT Bindung
TP1:					
TP1A	20762	22273	1512	58164.21	Mögl. Integrase und Sensorprotein
TP1B	22283	23029	747	28422.27	DnaA/C ATPase
<i>traL2</i>	23314	24039	726	27338.79	
<i>traM2</i>	24039	24494	456	16999.91	

Tab.6: Vergleich der *trb/tra* Region der Genominseln Trb1 und Trb2

	LEGIONELLA PNEUMOPHILA CORBY		IDENTISCHE NUKLEOTIDE (%)	LEGIONELLA PNEUMOPHILA CORBY		IDENTISCHE AMINOSÄUREN (%)
	NUKLEOTIDE			AMINOSÄUREN		
	<i>Trb1</i>	<i>Trb2</i>		<i>Trb1</i>	<i>Trb2</i>	
<i>lvrA</i>	881	885	84,4	293	294	80,3
<i>lvrB</i>	360	468	80,8	119	155	76,1
<i>csrA</i>	267	267	77,5	88	88	77,3
<i>trbB</i>	966	966	80,7	321	321	84,1
<i>trbC</i>	378	378	77,2	125	125	84,0
<i>trbD</i>	300	300	81,7	99	99	89,9
<i>trbE</i>	2526	2538	80,4	841	845	86,6
<i>trbF</i>	744	744	72,3	247	247	77,9
<i>trbG</i>	876	876	76,9	291	291	80,4
<i>trbH</i>	399	411	68,4	132	136	61,8
<i>trbI</i>	1251	1242	72,1	416	413	73,6
<i>trbJ</i>	741	741	78,7	246	246	82,1
<i>trbK</i>	213	213	67,9	70	70	65
<i>trbL</i>	1398	1473	72,3	465	471	80,7
<i>traG</i>	1890	1884	83,3	629	627	90,6
<i>traF</i>	546	546	78,8	181	181	69,6
<i>traD</i>	165	165	77,8	54	54	82,4
<i>traC</i>	2187	2187	80,3	728	728	83,1
<i>traH</i>	297	297	78,5	98	98	85,7
<i>traI</i>	1866	1875	81,2	614	624	78,8
<i>traJ</i>	354	354	87,3	117	117	87,2
<i>traK</i>	327	327	56,3	108	108	47,2
<i>traL</i>	726	726	89,4	241	241	94,6
<i>traM</i>	450	456	77	149	151	73,3

Aus den Tabellen ist ersichtlich, dass allen klonierten Genen eine Funktion oder zumindest ein entsprechendes Protein zugeordnet werden konnte. Der folgende Teil handelt die Leserahmen der *trb/tra* Region aus den Genominseln Trb1/Trb2 nacheinander ab, dabei wird zunächst versucht eine Funktion anhand von Aminosäuresequenzmotiven, bzw. Sequenzhomologien zuzuordnen.

3.1.2.1 *lvrA-lvrB-lvrC* Gencluster

Den Genen die ein TypIV Sekretionssystem kodieren, sind einige Leserahmen vorangestellt, die einen möglichen Regulationsmechanismus beinhalten, analog den *lvr*-Genen in *L.p. Philadelphia*1. Der erste dieser ORFs von Trb2, der in pKH 539 mit vollständiger Sequenz zu finden ist, hat eine Gesamtlänge von 155 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 17,9 kDa. Von Aminosäure 1 bis 40 findet sich eine Signalpeptidsequenz. Sequenzvergleiche ergeben 64% homologe Aminosäuren zu dem Protein LvrB von *L.p. Philadelphia* 1 und zu einem „*legionella vir region protein*“ von *L.p. Lens* (65% homologe Aminosäuren) und *L.p. Paris* (70% homologe Aminosäuren). LvrB gehört zu dem *prpA-lvrA-lvrB-lvrC* Gencluster, der an der Genregulation beteiligt sein könnte. (Segal et. al., 1999a; Samrakandi et.al., 2002).

Der darauf folgende Leserahmen, mit 88 Aminosäuren Länge und einem Gewicht von 10,1 kDa zeigt signifikante Ähnlichkeit zu CsrA (*carbon storage regulator*). CsrA ist ein Regulatorprotein, das RNA bindet und in *E. coli* durch erleichterten mRNA Abbau den Kohlenstoffstoffwechsel reguliert. (Liu et. al., 1997). Verschiedene *Legionellastämme* weisen vergleichbare Proteine auf (Abb. 3). Bei Legionellen ist *lvrC* an der Regulation des Übergangs von der replikativen in die Transmissionsphase beteiligt (Hammer et. al., 2002; Molofsky & Swanson, 2003).

Tabelle 7 zeigt den Vergleich der möglichen Regulationsgene *lvrAB* und *csrA* aus Trb1/Trb2 mit den vollständig sequenzierten *Legionellastämmen* *L.p. Philadelphia* 1, *L.p. Lens* und *L.p. Paris*. Diese besitzen demnach Proteine die LvrA und LvrB mit vergleichbarer Homologie entsprechen. Für das CsrA ähnliche Protein findet sich bei *L.p. Philadelphia* 1 und *L.p. Lens* das entsprechende Protein, dagegen ist in *L.p. Paris* ein Protein, plpp 0016 enthalten (80% homologe Aminosäuren).

Tab.7: Übersicht über die homologen Proteine der möglichen Regulationsproteine LvrAB und csrA. Bei dem Vergleich wurde die Datenbank von www.pedant.gsf.de verwendet und damit die bestmögliche Überlappung der Aminosäuresequenz gesucht. Davon angegeben ist die Zahl der identischen bzw. homologen Aminosäuren und die Gesamtanzahl der verglichenen Aminosäuren.

LEGIONELLA PNEUMOPHILA CORBY/ PHILADELPHIA 1		IDENTISCHE AMINOSÄUREN		HOMOLOGE AMINOSÄUREN	
L.P.					
Trb1/ <i>L.p. Phil1</i>	Trb2/ <i>L.p. Phil1</i>	Trb1/ <i>L.p. Phil1</i>	Trb2/ <i>L.p. Phil1</i>	Trb1/ <i>L.p. Phil1</i>	Trb2/ <i>L.p. Phil1</i>
LvrA	LvrA	187/294 (63%)	185/295 (62%)	218/294 (74%)	218/295 (73%)
LvrB	LvrB	61/144 (42%)	69/155 (44%)	94/144 (65%)	100/155 (64%)
CsrA	CsrA	25/59 (42%)	27/59 (45%)	45/59 (76%)	43/59 (72%)
LEGIONELLA PNEUMOPHILA CORBY/ L.P. PARIS		IDENTISCHE AMINOSÄUREN		HOMOLOGE AMINOSÄUREN	
Trb1/ <i>L.p. Paris</i>	Trb2/ <i>L.p. Paris</i>	Trb1/ <i>L.p. Paris</i>	Trb2/ <i>L.p. Paris</i>	Trb1/ <i>L.p. Paris</i>	Trb2/ <i>L.p. Paris</i>
Legionella vir region protein	Legionella vir region protein	187/294 (63%)	189/294 (73%)	215/294 (73%)	224/294 (76%)
Legionella vir region protein	Legionella vir region protein	57/118 (48%)	63/126 (50%)	83/118 (70%)	89/126 (70%)
plpp0016	plpp0016	39/80 (48%)	39/80 (48%)	64/80 (80%)	64/80 (80%)
LEGIONELLA PNEUMOPHILA CORBY/ L.P. LENS		IDENTISCHE AMINOSÄUREN		HOMOLOGE AMINOSÄUREN	
Trb1/ <i>L.p. Lens</i>	Trb2/ <i>L.p. Lens</i>	Trb1/ <i>L.p. Lens</i>	Trb2/ <i>L.p. Lens</i>	Trb1/ <i>L.p. Lens</i>	Trb2/ <i>L.p. Lens</i>
Legionella vir region protein	Legionella vir region protein	190/294 (64%)	195/295 (66%)	217/294 (73%)	223/295 (75%)
Legionella vir region protein	Legionella vir region protein	63/153 (41%)	73/157 (46%)	96/153 (62%)	103/157 (65%)
Global regulator CsrA	Global regulator CsrA	25/59 (42%)	27/59 (45%)	45/59 (76%)	43/59 (72%)

3.1.2.2 Mating pair formation Komplex

Die folgenden 11 ORFs weisen gleiche Orientierung auf und zeigen in ihrer abgeleiteten Aminosäuresequenz große Ähnlichkeiten zu Proteinen des „*mating pair formation*“ (*Mpf*) Komplexes des *Enterobacter aerogenes* Plasmids R751, mit einem Anteil identischer Aminosäuren von 45% bis 65% (Tab. 8 am Ende dieses Abschnitts und Abb. 3). Damit entsprechen sie auch der Trall Region von RP4 (Thorsted et. al., 1998), einem gut untersuchten IncP kodierten Konjugationssystem und wurden deshalb trbBCDEFGHIJKL benannt. Diese Proteine gehören zu den notwendigen Bestandteilen eines Konjugationssystems (Haase et. al., 1995). Die mögliche Funktion der einzelnen Proteine kann damit aus dem Vergleich zu R751 und RP4 Proteinen erschlossen werden, bzw. durch den Analogschluß auf Proteine des *Agrobacterium tumefaciens* Ti Plasmids.

3.1.2.2.1 Struktur und Motive der Mpf Gene in *L.p. Corby*

Der erste ORF ist analog zu TrbB aus der Gruppe der *Mpf* Gene von R751 und RP4, (321 Aminosäuren; Molekulargewicht 35,3 kDa.) und gehört damit zu der VirB11 Proteinfamilie (Thorsted et.al., 1998). Sequenzanalysen ergaben, dass diese Proteine vier konservierte Aminosäuresequenzmotive enthalten müssen, um den konjugativen Gentransfer leisten zu können.(Abb.4) (Rivas et. al., 1997).

Walker A Box				Walker B Box			
R751	TrbB	156	GGTGS GK TTL 165	R751	TrbB	217	LRMRPDRILVGE VR 230
RP4	TrbB	155	GGTGS GK TTL 164	RP4	TrbB	216	LRMRPDRILVGE VR 229
Trb1	TrbB1	156	GGTGS GK TTL 165	Trb1	TrbB1	217	LRMRPDRILVGE VR 230
Trb2	TrbB2	156	GGTGS GK TTL 165	Trb2	TrbB2	217	LRMRPDRILVGE VR 230
L.p.	LvhB11	185	GGTSS GK TTF 194	L.p.	LvhB11	250	LRLRPDRII M GE IR 263

Asp Box				His Box			
R751	TrbB	180	ER V FII EDTGE I 191	R751	TrbB	244	TGHEGGAATL HA 255
RP4	TrbB	179	ER V VII EDTGE I 190	RP4	TrbB	243	TGHEGGAATL HA 254
Trb1	TrbB1	180	ER I FII EDTGE I 191	Trb1	TrbB1	244	TGHEGGAATL HA 255
Trb2	TrbB2	181	ER I FII EDTGE I 192	Trb2	TrbB2	244	TGHEGGAATL HA 255
L.p.	LvhB11	206	ER L IT LE D TYEM 217	L.p.	LvhB11	276	TGHS GALATI HA 287

Abb.4: Konservierte Aminosäuresequenzmotive der PulE, VirB11, TrbB ähnlichen Proteine und Vergleich zu TrbB1 und TrbB2 aus *L.p. Corby*. Die in 25 untersuchten Proteinen identischen Aminosäuren sind hervorgehoben. (Rivas et. al. 1997). Die Positionen der Aminosäuren sind am Rand vermerkt. TrbB (RP4), M93696; TrbB (R751), U67194; LvhB11 (*L.p.*Philadelphia1), CAB 60061

In RP4 ist TrbB eine essentielle Komponente des konjugativen DNA Transfersystems (Haase et. al., 1995). *In vitro* zeigt das Protein eine NTPase Aktivität, die dadurch bereitgestellte Energie könnte für die Zusammensetzung des Transmembrankanals notwendig sein (Krause et. al., 2000). Alle erforderlichen Sequenzmotive sind auch in TrbB1 und TrbB2 von *L.p. Corby* enthalten (Abb.4).

Der nächste Leserahmen *trbC* enthält 125 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 13,2 kDa. Das Protein TrbC von RP4, stellt eine Untereinheit des Konjugationspilus dar (Kalkum et. al., 2002). Nach drei Prozessierungsschritten entwickelt das Molekül die reife Ringstruktur und bildet den nach extrazellulär reichenden Pilus (Abb.7; Abb.8) (Kalkum et. al., 2002). Zunächst wird TrbC durch eine noch unbekannte Protease am C-Terminus prozessiert, durch LepB wird das Signalpeptid abgespalten und schließlich kommt es nach Spaltung von vier weiteren Aminosäuren am C-Terminus durch TraF zu einer Zyklisierung durch Verbindung von Glycin 114 und Serin 37 (s. Abb. 5) (Kalkum et. al., 2002). Die mit Elektronenmikroskopie sichtbaren Pili sind sehr rigide und unflexibel mit einem Durchmesser von 10nm (Eisenbrandt et.al.,1999). Bei dem direkten Sequenzvergleich zwischen TrbC1 ,TrbC2 und TrbC des *E. aerogenes* Plasmids R751 als RP4 analoges Protein finden sich Sequenzmotive in *L.p. Corby* TrbC1/C2, die auf eine vergleichbare Funktion als Strukturgebender Bestandteil des Pilus schließen lassen (Abb. 6, Abb. 7).

Für den anschließenden ORF findet sich eine Pfam Domäne TrbD von Aminosäure 8 bis 99. TrbD ist ein essentielles Transfer/Virulenzprotein für den Aufbau des Mpf Komplexes in R751/RP4 (Lessl et. al. 1992b). Es sind keine konservierten Domänen dieser Proteine bekannt, ebenso ist die Funktion ungeklärt.

TrbD (R751) entspricht jedoch VirB3 (Thorsted et. al., 1998), das in Abwesenheit von VirB4 nur in der inneren Membran gefunden werden kann, ist VirB4 vorhanden befindet sich VirB3 sowohl in der inneren als auch der äußeren Membran (Jones et. al., 1994).

Es folgt ein Leserahmen trbE mit 845 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 94,9 kDa. Die größte Homologie weist der Leserahmen zu den VirB4 analogen Proteinen TrbE (R751) und TrbE (RP4) auf. Es konnte gezeigt werden, dass zwei Aminosäuresequenzmotive für den DNA Transfer, die Pilusproduktion und Phagensensitivität im RP4 System notwendig sind (Rabel et. al., 2003). Diese Motive finden sich in TrbE1 und TrbE2 in vergleichbarer Form (Abb.7; Abb.8).

TrbE Motiv A					TrbE Motiv B				
R751	TrbE	495	<u>G</u> PTG <u>A</u> GK	502	R751	TrbE	694	<u>D</u> E <u>A</u> W	697
RP4	TrbE	495	<u>G</u> PTG <u>A</u> GK	502	RP4	TrbE	694	<u>D</u> E <u>A</u> W	697
Trb1	TrbE	497	<u>G</u> PTRS <u>G</u> K	504	Trb1	TrbE	684	<u>D</u> E <u>A</u> W	687
Trb2	TrbE	495	<u>G</u> PTRS <u>G</u> K	502	Trb2	TrbE	688	<u>D</u> E <u>A</u> W	691
L.p.LvhB4		471	<u>G</u> GNN <u>A</u> GK	478	L.p.LvhB4		675	<u>A</u> E <u>A</u> W	678

Abb.7 : Vergleich der für die Funktion von TrbE essentiellen Sequenzmotive A und B. Motiv A "WalkerA Box" (GxxxxGK[S/T]), Motiv B "Walker B Box" (h4[D/E/A] E [A/F] [W/H/R]). Die für die Funktion essentiellen Aminosäuren sind unterstrichen. Die Positionen der Aminosäuren sind am Rand gekennzeichnet (Rabel et. al., 2003). RP4, TrbE (AAA26431); R751, TrbE (NP_044243); *Legionella pneumophila* LvhB4 (L.p.) (CAB60053)

TrbE Motiv D					TrbE Motif C				
R751	TrbE	717	<u>R</u> KANCLVLM <u>A</u> <u>T</u> <u>Q</u>	728	R751	TrbE	642	<u>D</u> A <u>E</u> E <u>D</u>	646
RP4	TrbE	717	<u>R</u> KANCLVLM <u>A</u> <u>T</u> <u>Q</u>	728	RP4	TrbE	642	<u>D</u> A <u>E</u> E <u>D</u>	646
Trb1	TrbE	706	AKKNCAVFM <u>A</u> <u>T</u> <u>Q</u>	717	Trb1	TrbE	632	<u>D</u> A <u>E</u> CD	636
Trb2	TrbE	710	AKKNCVVFM <u>A</u> <u>T</u> <u>Q</u>	721	Trb2	TrbE	631	<u>D</u> A <u>E</u> SD	635
L.p.LvhB4		697	<u>R</u> KKN <u>G</u> HFI <u>F</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>Q</u>	708	L.p.LvhB4		621	<u>D</u> NP <u>N</u> D	625

Abb.8: Weitere Sequenzmotive, deren Veränderung eine Reduktion der DNA Transferfrequenz und Phagensensitivität bedingt. Essentielle Aminosäuren sind unterstrichen. Motiv C: (Dxxx[D/N]); Motiv D: D R[K/M]x8 [T/S]Q. Die Positionen der Aminosäuren sind am Rand gekennzeichnet (Rabel et. al., 2003) RP4, TrbE (AAA26431); R751, TrbE (NP_044243); *Legionella pneumophila* LvhB4 (L.p.) (CAB60053).

Für VirB4 (pTi) als Analogon zu TrbE (RP4/R751) (Thorsted et. al. 1998) wurde eine Dimerisierung bzw. Homo-Oligomerisierung nachgewiesen, die für den Zusammenbau der Transmembranpore unbedingt erforderlich ist. Die ATPase Aktivität von VirB4 spielt dabei keine Rolle, weshalb vermutet wird, dass VirB4 ATP-induzierte Konformationsänderungen bewirkt und damit den Exportprozess aktiviert (Dang et.al., 1999). TrbE1 und TrbE2 weisen eine Mutation R717A auf, für die gezeigt wurde, dass dies zu einer Reduktion der Transferfrequenz auf $3,9 \times 10^{-7}$ führt. Die Pilusproduktion bleibt unbeeinflusst, die Sensitivität gegen den Phagen PRD1 ist aufgehoben (Rabel et. al., 2003).

Bei dem anschließenden ORF finden sich Sequenzhomologien zu TrbF, ein weiteres essentielles Protein des Pilusapparates, das für den Transfer während der Konjugation notwendig ist (Schmidt-Eisenlohr 2001), ungeklärt ist die Funktion. Es gehört zu der VirB8 Proteinfamilie und ist damit wahrscheinlich Teil des Transmembrankomplex (Thorsted et. al. 1998). Für das VirB8 des Ti Plasmids gilt, dass es mit sich selbst und VirB9 und VirB10 interagiert (Das, Xie, 2000).

Darauf folgt ein Leserahmen *trbG* dessen abgeleitete Aminosäuresequenz eine hohe Ähnlichkeit zu dem Protein TrbG von R751 auf. Zudem ist ein Signalpeptid von Aminosäure 1 bis 19 enthalten. TrbG von RP4 konnte als periplasmatisches Protein eingeordnet werden (Grahn 2000) und gehört zu den essentiellen *Mpf* Proteinen. (Haase 1995). Weiterhin lässt sich TrbG als VirB9 (pTi) Analogon einordnen (Thorsted et. al., 1998), als Funktion des VirB9 konnte eine Interaktion, sowohl mit VirB7 der äußeren Membran (Baron et. al., 1997), als auch mit Vir B8 und Vir B10 der inneren Membran gezeigt werden (Das und Xie, 2000), die genaue Funktion ist unbekannt.

Anschließend ergibt sich ein offener Leserahmen, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz Analogie zu dem Protein TrbH von R751 aufweist. Die Funktion ist nicht bekannt, jedoch gehört es unbedingt zu den *Mpf* Proteinen (Haase 1995) und könnte mit der äußeren Membran assoziiert sein (Grahn 2000). Es schließt ein ORF mit Homologien zu TrbI von R751 an. Eine Pfam Domäne TrbI kann ebenso gefunden werden, das Protein ist essentiell für das Konjugationssystem (Alt-Mörbe et. al. 1996). Das homologe Protein zu R751 TrbI ist VirB10 des Ti Plasmids (Thorsted et. al., 1998). Dieses bildet mit VirB8 und VirB9 oder mit sich selbst Komplexe und ist wahrscheinlich Teil des Translokationsapparates (Ward et. al., 1990; Beaupré et. al., 1997; Das, Xie, 2000). Der nächste ORF *trbJ* weist mit seiner

abgeleiteten Aminosäuresequenz die höchste Homologie zu TrbJ (R751) auf, es ist ebenfalls notwendiger Bestandteil eines Konjugationssystems (Alt-Mörbe et. al. 1996). Die Funktion ist nicht bekannt. Daran anschließend befindet sich der Leserahmen trbK. TrbK nimmt eine Sonderrolle innerhalb der dem *Mpf*-System zugeordneten Gene ein, denn das Protein ist kein notwendiger Bestandteil des DNA Übertragungsmechanismus, sondern verhindert die weitere Aufnahme von Plasmiden in die Zelle (Haase et. al., 1996). Der letzte Leserahmen, trbL weist zu TrbL (R751) hohe Homologie auf, damit gehört es zu den VirB6 ähnlichen Proteinen (Thorsted et. al., 1998). Bei TrbL(RP4) handelt es sich um ein in der Cytoplasmamembran lokalisiertes Protein, ebenso gilt dies für VirB6 (Hapfelmeier et. al., 2000). Eine Deletion des VirB6 führt zur Avirulenz des *Agrobacterium*, möglicherweise dadurch, dass VirB5 und VirB3 in geringerer Menge vorliegen, das Ergebnis ist, dass der T-Pilus nicht mehr gebildet wird. Eine Interaktion zwischen VirB5 und VirB6 scheint deshalb eine Schlüsselrolle in der Assemblierung des T-Pilus zu sein (Hapfelmeier et. al., 2000)

Homologe Gene zu den Mpf Genen von *L.p. Corby*

Im folgenden Abschnitt sind die Proteine aufgeführt, die eine Ähnlichkeit zu den Mpf Regionen aus den Trb1 und Trb2 Genominseln aus *L.p. Corby* aufweisen.

Wie bereits erwähnt finden sich für alle Leserahmen trbB-L entsprechende Gene bei *Enterobacter aerogenes* Plasmid R751. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tab.6: Zusammenfassung des Vergleichs der *trb/tra* Gene von *L.p. Corby* und der *Mpf*-Gene des Konjugationssystems von *E. aerogenes* pR751.

	LEGIONELLA PNEUMOPHILA CORBY		ENTEROBACTER AEROGENES INCPB PLASMID R751	LEGIONELLA PNEUMOPHILA CORBY VS. R751	LEGIONELLA PNEUMOPHILA CORBY VS. R751
	AMINOSÄUREN		AMINOSÄUREN	IDENTISCHE AMINOSÄUREN (%)	IDENTISCHE AMINOSÄUREN (%)
	<i>Trb1</i>	<i>Trb2</i>	<i>R751</i>	<i>Trb1/R751</i>	<i>Trb2/R751</i>
trbB	321	321	320	70,6	69,6
trbC	125	125	154	47,2	48,6
trbD	99	99	103	64,6	63,9
trbE	841	845	852	67,4	68,1
trbF	247	247	260	42,7	42,9
trbG	291	291	306	55,7	54,8
trbH	132	136	162	36,8	37,1
trbI	416	413	473	51,6	51,9
trbJ	246	246	254	46,5	46,2
trbK	70	70	75	28,6	27,3
trbL	465	471	572	45,9	45,8

Dabei ergibt sich nur ein geringer Unterschied zwischen dem Vergleich der Tra1 Genominsel mit R751 und Tra2 mit R751. Die hochkonservierten Gene TrbB und TrbE weisen nahezu 70% Übereinstimmung auf. Das nicht essentielle TrbK scheint wenig konserviert. Die Anzahl der Nukleotide ist, außer bei trbB, in R751 stets größer als in Trb1/Trb2.

Die Suche nach vergleichbaren Proteinen bei den vollständig sequenzierten Legionella-Stämmen *L.p.* Philadelphia1, *L.p.* Paris und *L.p.* Lens ergibt das in Tabelle 7 und 8 zusammengefasste Ergebnis

Tab.7: Zusammenfassung der Ergebnisse des Vergleichs der *trb/tra* Regionen von *L.p.* Corby mit dem Genom von *L.p.* Philadelphia1, *L.p.* Paris und *L.p.* Lens. Bei dem Vergleich wurde die Datenbank von www.pedant.gsf.de verwendet und damit die bestmögliche Überlappung der Aminosäuresequenz gesucht. Angegeben ist die Zahl der identischen bzw. homologen Aminosäuren und die Gesamtanzahl der verglichenen Aminosäuren.

LEGIONELLA PNEUMOPHILA PHILADELPHIA 1/ L.P. CORBY		IDENTISCHE AMINOSÄUREN (%)		HOMOLOGE AMINOSÄUREN (%)	
Trb1/ <i>L.p.</i> Phil1	Trb2/ <i>L.p.</i> Phil1	Trb1/ <i>L.p.</i> Phil1	Trb2/ <i>L.p.</i> Phil1	Trb1/ Phil1	<i>L.p.</i> Trb2/ <i>L.p.</i> Phil1
LvhB11	LvhB11	98/311 (30%)	94/311 (30%)	152/311 (48%)	152/311 (48%)
LvhB4	LvhB4	123/465 (26%)	201/825 (24%)	196/465 (42%)	327/825 (39%)
LvhB9	LvhB9	36/150 (24%)	43/150 (28%)	60/150 (40%)	65/150 (43%)
LvhB10	LvhB10	50/193 (25%)	58/221 (26%)	96/193 (49%)	107/221 (48%)
ABC transporter	Regulatory protein tetR	19/73 (26%)	25/89 (28%)	35/73 (47%)	42/89 (47%)
Legionella pneumophila Paris		Identische Aminosäuren		Homologe Aminosäuren	
Trb1/ <i>L.p.</i> Paris	Trb2/ <i>L.p.</i> Paris	Trb1/ <i>L.p.</i> Paris	Trb2/ <i>L.p.</i> Paris	Trb1/ <i>L.p.</i> Paris	Trb2/ <i>L.p.</i> Paris
Legionella vir homologue protein	Legionella vir homologue protein	91/311 (29%)	92/315 (29%)	145/311 (46%)	149/315 (47%)
Legionella vir homologue protein	Legionella vir homologue protein	123/468 (26%)	136/543 (25%)	198/468 (42%)	225/543 (41%)
	lpp2390		36/150 (24%)		66/150 (43%)
Legionella vir homologue protein	Legionella vir homologue protein	33/144 (22%)	41/150 (27%)	60/144 (41%)	65/150 (43%)
	lpp 2488		20/57 (35%)		25/57 (43%)
Legionella vir homologue protein	Legionella vir homologue protein	47/193 (24%)	56/221 (25%)	94/193 (48%)	106/221 (47%)
Legionella vir homologue protein	lpp1136	42/191 (21%)	25/89 (28%)	73/191 (38%)	42/89 (47%)

LEGIONELLA PNEUMOPHILA LENS		IDENTISCHE AMINOSÄUREN		HOMOLOGE AMINOSÄUREN	
<i>Trb1/ L.p. Lens</i>	<i>Trb2/ L.p. Lens</i>	<i>Trb1/ L.p. Lens</i>	<i>Trb2/ L.p. Lens</i>	<i>Trb1/ L.p. Lens</i>	<i>Trb2/ L.p. Lens</i>
Legionella vir homologue protein	Legionella vir homologue protein	94/311 (30%)	93/315 (29%)	150/311 (48%)	151/315 (47%)
Legionella vir homologue protein	Legionella vir homologue protein	121/465 (26%)	121/464 (26%)	196/465 (42%)	192/464 (41%)
Legionella vir homologue protein	Legionella vir homologue protein	32/144 (22%)	39/150 (26%)	61/144 (42%)	66/150 (44%)
	lpl 2346		20/57 (35%)		25/57 (43%)
Legionella vir homologue protein	Legionella vir homologue protein	62/253 (24%)	58/221 (26%)	118/253 (46%)	106/221 (47%)
lpl 1573	lpl 1141	38/155 (24%)	25/89 (28%)	64/155 (41%)	42/89 (47%)
	NAD(P) subunit beta		54/217 (24%)		90/217 (41%)

Hierbei finden sich in *L.p. Philadelphia1* für TrbB, TrbE, TrbG und TrbI entsprechende Proteine des Lvh Systems. Für TrbJ1/2 finden sich außer für TrbJ1 zu *L.p. Paris* keine entsprechenden Gene eines TypIV Sekretionssystems. In *L.p. Paris* finden sich zusätzlich zu den homologen Proteinen die *L.p. Philadelphia1* aufweist noch zusätzlich homologe Proteine zu TrbF2 und TrbH2, deren Funktion nicht geklärt ist. Für *L.p. Lens* lassen sich ebenfalls die gleichen Proteine wie bei *L.p. Philadelphia1* ausmachen, darüber hinaus auch Proteine unbekannter Funktion zu TrbH2 und TrbL.

3.1.2.3 „coupling factor“ TraG

Im Anschluß an die *Mpf*-Gene befinden sich Leserahmen, die der Tral Region von RP4 entsprechen. Zunächst folgt auf die TralI (RP4) ähnliche Region ein Leserahmen der in seiner abgeleiteten Aminosäuresequenz dem „coupling factor“ entspricht, der mit den „mating pair formation“ Genen den minimalen Satz an Genen darstellt, die für eine Konjugation notwendig sind (Haase et. al., 1995). Die Funktion des „coupling factors“ TraG könnte darin bestehen, dass eine Hexamerstruktur durch TraG Proteine ausgebildet wird und damit eine Pore in der inneren Membran entsteht an die das Relaxosom bindet (Schröder et. al., 2002). Die Länge des Leserahmens beträgt 629 Aminosäuren, das Gewicht 71,3 kDa. Bei der Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz ergeben sich Sequenzmotive, die in TraG ähnlichen Proteinen konserviert sind und deren Änderung eine Reduktion der Übertragungsrates von DNA während der Konjugation zur Folge haben (Abb.11) (Balzer et. al. 1994).

TraG Motiv A					
R751	TraG	183	<u>A</u> PTRS <u>GKG</u> VGLVVPTLLSWGASSVITDLKGE	213	
RP4	TraG	181	<u>A</u> PTRS <u>GKG</u> VGLVVPTLLSWAHSVITDLKGE	211	
Trb1	TraG	169	<u>A</u> PTRS <u>GKG</u> VGLVIPTLLSWKQSCVITDLKGE	199	
Trb2	TraG	166	<u>A</u> PTRS <u>GKG</u> VGLVIPTLLSWKQSCVITDLKGE	196	
L.p.	LvhD4	262	<u>A</u> PTGS <u>GKT</u> RSIGIPNLFNYPYSVVCNDVKLT	292	

TraG Motiv B					
R751	TraG	446	LLMML <u>DE</u> FFPSLGKLEIM	462	
RP4	TraG	444	LLMML <u>DE</u> FFPSLGKLEIL	460	
Trb1	TraG1	444	LLCMI <u>DE</u> FFPSLGKLDIL	460	
Trb2	TraG2	439	LLCMI <u>DE</u> FFPSLGKLDIL	455	
L.p.	LvhD4	510	LLCLI <u>DE</u> FSLSLGRIERL	526	

Abb.9: Motiv A und Motiv B in TraG ähnlichen Proteinen. Die funktionellen Aminosäuren in TraG ähnlichen Proteine sind hervorgehoben und unterstrichen. Die Positionen der Aminosäuren sind am Rand gekennzeichnet (Balzer et. al. 1994). TraG (RP4), S22999; TraG (R751), S22992; LvhD4 (*L. pneumophila* [L.p.]), CAB60062;

Das Motiv A ist ein Walker A Motiv (G/AxxxxGKS/T), das eine phosphatbindende „P-loop“ Region ausbildet. Diese ist in Plasmid R388 im Protein TrwB und in Plasmid F im Protein TraD enthalten. In den Proteinen TraG von Plasmid RP4 und dem Protein HP0524 der *cag* Pathogenitätsinsel von *Helicobacter pylori* zeigen sich eine abweichende Konsensussequenz AptrsGKG (die Änderung von dem Konsensusmotiv ist unterstrichen) (Schröder et. al., 2002). Diese abweichende Sequenz passt in die „P-loop“ Konsensussequenz von Adenylatzyklasen (Saraste et. al., 1990), die Aminosäuresequenz von TraG1 und TraG2 von L.p. Corby weisen dieses Motiv in gleicher Weise auf und enthalten deshalb wahrscheinlich ein funktionelles „P-loop“ Motiv (Abb. 9). Das zweite konservierte Motiv, als Motiv B bezeichnet ist in allen untersuchten Sequenzen übereinstimmend in den essentiellen Aminosäuren.

Zusätzlich zu diesen Motiven existieren noch drei weitere Motive (Abb. 10) deren Mutation ebenfalls die DNA-Transferaktivität in RP4 reduziert, bzw. vollständig inhibiert (Schröder et.al., 2002). Diese Motive sind in TraG1 und TraG2 enthalten, außer Prolin in Motiv V.

Motiv III				Motiv IV					
R751	TraG	470	YGIKCYLICQDINQL	484	R751	TraG	514	ETAEHL SRLTGQTT	527
RP4	TraG	469	YGIKCYLICQDINQL	483	RP4	TraG	513	ETAEHL SKLTGTTT	526
Trb1	TraG1	465	YGLKFYLICQDINQL	479	Trb2	TraG2	510	ETAEHL SKLTGQTT	523
Trb2	TraG2	463	YGLKFYLICQDINQL	477	Trb2	TraG2	508	ETAEHL SKLTGQTT	521
L.p.	LvhD4	536	YRVRCVLI MQYIAQT	450	L.p.	LvHD4	577	FAEYVSKLLGTRT	590

Motiv V				
R751	TraG	559	LLTPDE CLRMPGPK..KNAQGEIEEAGDMVI YV	589
RP4	TraG	558	LLTPDE CLRMPGPK..KSADGSIEEAGDMV VYV	588
Trb1	TraG	545	LLTVDE CQRMPGPK..KDENGLIKEAGDMV VYV	575
Trb1	TraG	551	LLTIDE CQRMPGPK..KDANGLITEAGDMV VYV	581
L.p.	LvhD4	615	LLRPDE VMRLPEDQTLIMRTGHAPVKAEQ MVWY	648

Abb.10: Konservierte Sequenzmotive die in RP4 TraG essentiell für die DNA Übertragung sind, funktionelle Aminosäuren sind hervorgehoben. Die Positionen der Aminosäuren sind am Rand gekennzeichnet (Schröder et. al., 2002) TraG (RP4), S22999; TraG (R751), S22992; LvhD4 (*L. pneumophila* [L.p.]), CAB60062;

Neben diesen Konsensussequenzen werden zwei Transmembranabschnitte für die Funktionalität von TraG in RP4 gefordert (Schröder et.al., 2002). Auch diese finden sich in TraG1 und TraG2 von *L.p. Corby* (Abb.11).

	10	20	30	40	50	60
TraG1	LNKPNKAIGPQVRQKHNEKTNKQ L	VILVALSLFISMQV	GTQFVAYK	LHFSDELG	FSLNHV	

TraG2	MSKPNKSIGPQVRKKRVEKTNKQ I	VFLVVLALFVSMQIG	TQFVAYK	LHYHQSLG	FSVAHI	
	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
TraG1	YFPWQSLWWSLKYHHYYPDYFN AA	FGLMAMSGSLFLML	LIVFVAKHLK	KENISEYLHGSAR		

TraG2	YLPWQLLWNNLQYHSIYPDYFN AA	FGLVAMSGSLFLMI	ILFVSKQLTQ	ENVSEYLHGSAR		
	70	80	90	100	110	120

Abb.11 : Sequenz der Transmembrandomänen in TraG1 und TraG2 von *L.p. Corby*. Ein Punkt gibt vergleichbare Aminosäuren an, zwei Punkte bezeichnen identische Aminosäuren. Die Transmembranabschnitte sind hervorgehoben. Sie wurden mit SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) berechnet.

3.1.2.4 Protease TraF

Bei dem nächsten Leserahmen handelt es sich um ein mögliches Protein TraF mit einer Länge von 181 Aminosäuren und einem Gewicht von 20,4 kDa.

Das TraF der IncP Plasmide gehört zu einer Klasse von Serinproteasen

(Paetzel, Dalbey 1997), welche die Bildung der Ringstruktur von TrbC katalysieren (Kalkum et.al. 2002). Sie enthalten drei charakteristische Aminosäuresequenzmotive (Abb.12)

Motiv I				Motiv II			
r751 TraF	38	<u>S</u> IPVGLYWTS	47	R751 TraF	88	MM <u>KK</u> VLAAKDDAVA	101
RP4 TraF	37	<u>S</u> IPVGLYWKS	46	RP4 TraF	87	MM <u>KK</u> VLAAKGDEVA	100
Trb1 TraF1	34	<u>S</u> IPFGLYRIT	43	Trb1 TraF1	84	LM <u>KK</u> VVATNGDQIS	97
Trb2 TraF2	34	<u>S</u> IPVGLYRIT	43	Trb2 TraF2	84	LM <u>KK</u> VVATSGDKVS	97
E. coli Lep	90	<u>S</u> MMPTLLIGD	99	E. coli Lep	143	YI <u>KK</u> AVGLPGDKVT	156
B. subtilis SipS	43	<u>S</u> MYPTLHNRE	52	B. subtilis SipS	81	YV <u>KK</u> IIGLPGDTVE	94

Motiv III			
R751 TraF	145	LMSDVSA <u>SF</u> <u>DGRY</u>	158
RP4 TraF	144	LMSDVSD <u>T</u> <u>SF</u> <u>DGRY</u>	157
Trb1 TraF1	143	TMTSQSEC <u>SF</u> <u>DSRY</u>	156
Trb2 TraF2	143	TMTNQSEW <u>SF</u> <u>DARY</u>	156
E. coli Lep	270	MMGDNRD <u>NSA</u> <u>DSRY</u>	283
B. subtilis SipS	144	VMGDNRR <u>NSM</u> <u>DSRN</u>	157

Abb.12: Vergleich der Sequenzmotive von TraF1 und TraF2 mit den Proteasen von RP4, *E. coli* und *B. subtilis*. Die für die Funktion essentiellen Aminosäuren sind hervorgehoben und unterstrichen. Die Positionen der Aminosäuren sind am Rand gekennzeichnet (Eisenbrandt et. al., 2000). RP4 TraF [L27758], R751 TraF [M94367] *Escherichia coli* Lep[K00426], *Bacillus subtilis* SipS [Z11847].

Die funktionell aktiven Aminosäuren sind Serin und Lysin, die nach einem Serin-Lysin Dyad Mechanismus die Präpillin Zyklisierung von TrbC katalysieren. Alle geforderten Motive finden sich in TraF1 und TraF2, außer einem Austausch von Arginin gegen Lysin in Motiv II. Von Aminosäure 7 bis 29 findet sich ein Transmembranabschnitt. Die untersuchten *Legionella*-stämmen weisen keine signifikant ähnlichen Proteine auf.

Auf den TraF1/2 Leserahmen folgt ein Leserahmen der TraD von R751 entspricht. Die Funktion ist unbekannt, die untersuchten *Legionella*-stämmen enthalten kein Protein mit signifikanter Homologie.

3.1.2.5 Topoisomerase TraC

Der anschließende ORF, TraC enthält zwei konservierte Aminosäuremotive, die als Topoisomerase-Primase Motiv bezeichnet werden (Abb.13) (Aravind et. al. 1998).

Trb1 TraC1

594 PVIVIAEGYATAATIKEACGLPAVVSAFDSGNLKSVAKVLHEKYPYTPVMIASDDDKHLELTQGINPGKE
KALEAAGAVNGFIV 677

Trb2 TraC2

588 PVIVIAEGYATAATIKEACEELPAVVSAFDSGNLKSVAKALHEKYPHTPIVMAADDDRHLEQSKGINPGKD
KAGEAANAVNGFIV 671

Abb.13: Vergleich der möglichen Topoisomerase-Primase TraC von Trb1 und Trb2.

Die für die Funktion essentiellen Aminosäuren sind hervorgehoben und unterstrichen. Das DxD Motiv ist wahrscheinlich an der Bindung von Mg²⁺ beteiligt. Mutation des konservierten Glutamat beendet komplett die DnaG-Primase Aktivität (Aravind et. al. 1998). Das die Primase definierende EGYATA Motiv ist kursiv dargestellt (Strack et. al., 1992). Abweichende Aminosäuren zwischen TraC1 und TraC2 sind fett gedruckt. Die Positionen der Aminosäuren sind am Rand gekennzeichnet.

Diese Primase wird beim konjugativen Transfer von Collb-P9 und RP4/R751 mit in den Rezipienten transferiert und kann dann Wirtszellunabhängig die diskontinuierliche DNA Synthese ausführen (Rees, Wilkins 1990).

Das Primasemotiv EGYATA ist unbedingt erforderlich und definiert die Primase als solche (Strack et. al., 1992). Alle Motive sind in TraC1 und TraC2 (*L.p.* Corby) vorhanden (Abb.13). Die Länge des Leserahmens beträgt 740 Aminosäuren, das Gewicht 82,8 kDa. Bei der weiteren Analyse zeigt sich eine coiled coil Struktur von Aminosäure 484 bis 513.

Die folgenden Leserahmen sind als ORF152 und ORF255 bezeichnet und nur in Trb1 enthalten. In Trb2 sind diese durch Gene, die als ORF123 und ORF352 benannt wurden, ersetzt.

Der Leserahmen ORF 152 (Trb1) schließt sich in entgegengesetzter Transkriptionsrichtung an, enthält 152 Aminosäuren. Hier findet keine Homologie zu *Enterobacter aerogenes* R751. Bei dem Abgleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz zu *L.p.* Lens und *L.p.* Paris ergibt sich eine Ähnlichkeit zu einem Mutator Protein MutT. Als Teil des GO Systems bei *E.coli* verhindert MutT den mutagenen Effekt von 8-oxo-GTP, das bei der DNA Replikation entsteht (Maki & Sekiguchi 1992). Ebenso findet sich ein Pfam Domäne NUDIX von Aminosäure 17 bis 134. Der Leserahmen ORF123 (Trb2) enthält 123 Aminosäuren mit einem

Gewicht von 14,1 kDa. *L.p.* Philadelphia 1, *L.p.* Paris und *L.p.* Lens enthalten kein Protein mit signifikanter Homologie. Die Suche nach vergleichbaren Proteinen ergibt das Ergebnis DUF 437, ein Protein unbekannter Funktion, bzw. die α -Untereinheit einer ATPase.

Anschließend befindet sich ein 255 Aminosäuren langer Leserahmen ORF255 (Trb1). Zu *Enterobacter aerogenes* R751 lässt sich keine Homologie aufzeigen. Bei *L.p.* Philadelphia 1 findet sich Homologie zu TraD (44% homologe Aminosäuren), bei *L.p.* Paris zu einem Protein lpp 1055 (43% homologe Aminosäuren) und bei *L.p.* Lens zu dem Protein lpl 1016 (44% homologe Aminosäuren). Die Funktion des Proteins ist ungeklärt. Der als ORF352 in Trb2 benannte Leserahmen, der ORF255 (Trb1) ersetzt, besitzt 352 Aminosäuren Länge. Bei *L.p.* Philadelphia 1 finden sich 45% homologe Aminosäuren zu DotA, bei *L.p.* Paris 43% homologe Aminosäuren zu DotA und bei *L.p.* Lens ebenfalls 45% homologe Aminosäuren zu DotA. DotA ist ein membranüberspannendes Protein, das möglicherweise als Kanal zwischen Zytoplasma und Periplasma funktioniert und notwendig ist für die Replikation in Makrophagen (Roy & Isberg, 1996).

Homologe Gene zu den Dtr Genen von *L.p.* Corby

Die größte Homologie weisen die Leserahmen traG, traF, traC und traD zu den entsprechenden Proteinen von *Enterobacter aerogenes* Plasmid R751 auf (Tab.8)

Tab.8: Zusammenfassung des Vergleichs der *trb/tra* Gene von *L.p.* Corby und der *Mpf*-Gene des Konjugationssystems von *E. aerogenes* pR751.

	LEGIONELLA PNEUMOPHILA CORBY		ENTEROBACTER AEROGENES INCPB PLASMID R751	LEGIONELLA PNEUMOPHILA CORBY VS. R751	LEGIONELLA PNEUMOPHILA CORBY VS. R751
	NUKLEOTIDE		NUKLEOTIDE	IDENTISCHE NUKLEOTIDE (%)	IDENTISCHE NUKLEOTIDE (%)
	Trb1	Trb2		Trb1/R751	Trb2/R751
traG	629	627	637	67,1	68,2
traF	181	181	178	41,9	41,6
traC	728	728	687	54,0	54,3
traD	165	165	128	42,6	42,4

Bei dem Vergleich Trb1 zu R751 bzw. Trb2 zu R751 ist weder ein großer Unterschied in der Anzahl der Nukleotide noch im Anteil identischer Nukleotide zu finden.

Die TraG entsprechenden Leserahmen traG1 und traG2 sind mit über 65% identischen Nukleotiden sehr ähnlich dem R751/RP4 „*coupling protein*“. Hingegen zeigt die Protease TraF geringeren Anteil identischer Aminosäuren, mit ca. 42%.

Die Primase TraC (R751) ist mit über 50% identischen Aminosäuren ähnlich den Leserahmen traC1 und traC2. TraD ist mit 42% identischen Aminosäuren das Protein mit der höchsten Homologie zu traD1 und traD2.

Der Vergleich dieser Leserahmen mit den vollständig sequenzierten Legionellastämmen erbringt das in Tabelle 9 zusammengefasste Ergebnis.

Tab.9: Zusammenfassung der Ergebnisse des Vergleichs der *trb/tra* Regionen von *L.p.* Corby mit dem Genom von *L.p.* Philadelphia1, *L.p.* Paris und *L.p.* Lens. Bei dem Vergleich wurde die Datenbank von www.pedant.gsf.de verwendet und damit die bestmögliche Überlappung der Aminosäuresequenz gesucht. Davon angegeben ist die Zahl der identischen bzw. homologen Aminosäuren und die Gesamtanzahl der verglichenen Aminosäuren.

LEGIONELLA PNEUMOPHILA PHILADELPHIA 1		IDENTISCHE AMINOSÄUREN		HOMOLOGE AMINOSÄUREN	
Trb1/ <i>L.p.</i> Phil1	Trb2/ <i>L.p.</i> Phil1	Trb1/ <i>L.p.</i> Phil1	Trb2/ <i>L.p.</i> Phil1	Trb1/ <i>L.p.</i> Phil1	Trb2/ <i>L.p.</i> Phil1
LvhD4	LvhD4	140/524 (26%)	137/524 (26%)	243/524 (46%)	234/524 (44%)
TraI	TraI	36/133 (27%)	38/138 (27%)	62/133 (46%)	65/138 (47%)
TraD	DotA	20/87 (22%)	20/64 (31%)	39/87 (44%)	28/64 (45%)
LEGIONELLA PNEUMOPHILA PARIS		IDENTISCHE AMINOSÄUREN		HOMOLOGE AMINOSÄUREN	
Trb1/ <i>L.p.</i> Paris	Trb2/ <i>L.p.</i> Paris	Trb1/ <i>L.p.</i> Paris	Trb2/ <i>L.p.</i> Paris	Trb1/ <i>L.p.</i> Paris	Trb2/ <i>L.p.</i> Paris
Legionella vir homologue protein	Legionella vir homologue protein	143/524 (27%)	141/524 (26%)	241/524 (45%)	235/524 (44%)
Mutator protein MutT		20/52 (38%)		34/52% (65%)	
lpp1055	DotA	22/96 (22%)	23/85 (27%)	42/96 (43%)	37/85 (43%)
LEGIONELLA PNEUMOPHILA LENS		IDENTISCHE AMINOSÄUREN		HOMOLOGE AMINOSÄUREN	
Trb1/ <i>L.p.</i> Lens	Trb2/ <i>L.p.</i> Lens	Trb1/ <i>L.p.</i> Lens	Trb2/ <i>L.p.</i> Lens	Trb1/ <i>L.p.</i> Lens	Trb2/ <i>L.p.</i> Lens
Legionella vir homologue protein	Legionella vir homologue protein	139/525 (26%)	135/525 (25%)	242/525 (46%)	233/525 (44%)
plpl0037	plpl0037	80/284 (28%)	86/285 (30%)	117/284 (41%)	128/285 (44%)
Mutator protein MutT		21/52 (40%)		35/52 (67%)	
Lpl1016	DotA	22/96 (22%)	20/64 (31%)	43/96 (44%)	29/64 (45%)

Detailliert betrachtet beginnt diese Region mit einem Leserahmen traH, die genaue Funktion von TraH ist nicht geklärt, diskutiert wird, dass es den Relaxosomkomplex stabilisiert (Lanka & Wilkins 1995). Die Länge beträgt 98 Aminosäuren, das Gewicht 12,7 kDa.

Die Sequenz überlappt mit dem Leserahmen tral, welcher der Relaxase Tral von R751/RP4 entspricht. Es konnte gezeigt werden, dass für die katalytische Aktivität der Relaxase Tral in RP4 von der korrekten Aminosäuresequenz in drei Sequenzmotiven abhängt (Pansegrau et. al., 1994b). Die abgeleiteten Leserahmen von *tral1* und *tral2* zeigen die gleichen Motive, an der entsprechenden Stelle des möglichen Proteins (Abb.15).

Motiv I				Motiv II			
R751	TraI	16	FAGLAN <u>Y</u> ITDA 26	R751	TraI	68	TYHLIVSFRAGE 79
RP4	TraI	16	FAELVK <u>Y</u> ITDE 26	RP4	TraI	68	TYHLLVSFRAGE 79
Trb1	TraI1	16	FSALVK <u>Y</u> ITDE 26	Trb1	TraI1	68	TYHMLISFAPGE 79
Trb2	TraI2	16	FSGLVK <u>Y</u> ITDH 26	Trb2	TraI2	68	TYHLLISFAPGE 79
L.p. AA100	TraI	16	FSGLVQ <u>Y</u> LCNQ 26	L.p. AA100	TraI	68	TYHMLISFAPGE 79

Motiv III			
R751	TraI	103	QRISAVHH <u>D</u> TDNL <u>H</u> <u>H</u> IAINKI 124
RP4	TraI	103	QRVSAVHH <u>D</u> TDNL <u>H</u> <u>H</u> IAINKI 124
Trb1	TraI1	103	QRISAIHH <u>D</u> TDNL <u>H</u> <u>H</u> VAINKI 124
Trb2	TraI2	103	QRISVIHH <u>D</u> TDNL <u>H</u> <u>H</u> VAINKI 124
L.p. AA100	TraI	103	QRISVVHH <u>D</u> TDNL <u>H</u> <u>H</u> VAINKI 124

Abb.15: Vergleich der Aminosäuresequenzmotive der Tral Relaxasen Tral RP4, Tral R751, Tral1 Genominsel Trb1 *L.p. Corby*, Tral2 Genominsel Trb2 *L.p. Corby* und Tral aus der *tra1* Region von *L.p. AA100*. Die für die Funktion essentiellen Aminosäuren sind hervorgehoben. Die Positionen der Aminosäuren sind am Rand gekennzeichnet (Pansegrau et. al. 1994b). RP4 Tral (S23001); R751 Tral (S22994); *L.p. AA100 tra1* Region (AY053454).

Der abgeleitete Leserahmen von Tral enthält 614 Aminosäuren und hat ein errechnetes Gewicht von 73,5 kDa ergibt. Die Aminosäurenabfolge gleicht mit 64% identischen Aminosäuren dem Protein Tral von *L.p. AA100*, und mit 41,5% identischen Aminosäuren dem Protein Tral von R751.

Es folgt traJ, ein Leserahmen der dem Protein TraJ von R751/RP4 gleicht. TraJ initiiert die Relaxosombildung durch Bindung an *oriT* (Pansegrau et. al., 1990).

Der Leserahmen weist mit 73,5% identischen Aminosäuren eine Ähnlichkeit zu *L.p. AA100* auf und 41,9% identische Aminosäuren zu TraJ von R751. Die Größe beläuft sich auf 117 Aminosäuren, das Gewicht beträgt 13,3 kDa.

Darauf folgend, mit entgegengesetzter Orientierung zu TraHIJ, befindet sich der Leserahmen traK der dem TraK des IncP α / β DNA-Transfersystems entspricht. Es wird vermutet, dass TraK eine Funktion zur Entwindung der die *nic-site* flankierende Region ausübt, indem es positive supercoils einfügt (Lanka & Wilkins 1995).

Die vergleichende Analyse ergibt 52,6% identische Aminosäuren zu TraK von *L.p.* AA100, und 33,3% identische Aminosäuren zu TraK von R751, mit 108 Aminosäuren und einem Gewicht von 12,4 kDa. Zudem findet sich eine Homologie von 39% identischen Aminosäuren zu einem Protein TraK von *L.p.* Philadelphia 1 und bei *L.p.* Lens zu einem Protein Ipl0071 mit 58% homologe Aminosäuren, bzw. bei *L.p.* Paris zu einem Protein Ipp0067 mit 57% homologe Aminosäuren. In dem Leserahmen traK2 befindet sich eine Insertion, mit zwei möglichen Leserahmen (Abb.16).

```

ATGAAAAAACCACCTTTCCGAACGAGTCATTCAAATCAGTCAGAAAAAAGAACGG
GCGAGTTAATGCTAAGATTCAATTTATCGCACTGAAAGAAGACATTCGAGAAGCC
CTTGATAAGGGATGTTTCGATGAAAGCTGTTTGGG●●●●●TP1●●TTTGGGAACTT
TATCTGATGAAGGTCAAATTTCAATTCGGCTATAAAGCGTTTAGGCATTACGTACTT
AAGTTAATTAAGTCAGAGCAGGAAGATAACCAGGGATGATAAACAGAGCAAAGTA
AAAACACCAATAAAATCAAAGGTTTTACTTTTAATCCAATACCCAACCCGGAGGAA
CTCTTGTA

```

Abb.16: Insertionselement TP1 in traK2. Eine kurze Wiederholungssequenz flankiert den Ort der Insertion. Die Wiederholungssequenz (ATTCCGG-N7-TGATCA) ist durch● gekennzeichnet. In TP1 befinden sich zwei Leserahmen TP1A und TP1B.

TraK2 ist inaktiviert durch die Insertion eines IS Elements TP1 (Abb. 16). Der als TP1A bezeichnete Leserahmen enthält 503 Aminosäuren und hat ein Gewicht von 58,1 kDa. Bei der Suche nach Proteinfamilien die der abgeleiteten Aminosäuresequenz entsprechen, ergibt sich eine signifikante Ähnlichkeit zu einer putativen Integrase und Sensorprotein der luxR Familie. Zu dieser Proteinfamilie gehört ebenfalls das Protein TraR des Ti Plasmids von *Agrobacterium tumefaciens* (Fuqua & Winans, 1996; Piper & Farrand, 2000). TraR aktiviert die Transkription von Operons in Abhängigkeit vom Anstieg von N-(3-oxo-octanoyl)-L-Homoserin-Lacton. (Piper et. al., 1993; Fuqua & Winans, 1994; Hwang et. al., 1994). Nach der Aktivierung bindet TraR in dimerisierter Form an die Promotorregionen der für die Konjugation notwendigen tra Gene und initiiert die Expression dieser Gene (Fuqua & Winans, 1996; Zhu & Winans, 1999; Qin et. al., 2000). Es finden sich keine vergleichbaren Proteine in den untersuchten *Legionellastämmen* *L.p.* Philadelphia 1, *L.p.* Paris und *L.p.* Lens.

Im Anschluss findet sich ein Leserahmen TP1B, mit einer Länge von 248 Aminosäuren und einem Gewicht von 28,4 kDa. Von Aminosäure 41 bis 76 erstreckt sich eine coiled coil Region, von Aminosäure 97 bis 230 ergibt sich eine signifikante Ähnlichkeit zu Proteinen der AAA-ATPase Familie. Diese Familie gehört zu den ringförmigen P-Loop NTPasen, die energieabhängig Makromoleküle entfalten (Neuwald et.al. 1999). Der Vergleich zu *L.p.* Philadelphia 1 ergibt ein als NAD (P) transhydrogenase bezeichnetes Protein (49% homologe Aminosäuren). Bei *L.p.* Paris findet sich ein als lpp2885 bezeichnetes Protein (52% homologe Aminosäuren).

An den unterbrochenen Leserahmen traK2 schließt sich mit gleicher Orientierung traL an. Die vergleichende Analyse erbringt 72,6% identische Aminosäuren zu TraL von *L.p.* AA100 und 66,4% identischen Aminosäuren zu TraL (R751), bei einer Länge von 241 Aminosäuren und einem Gewicht von 27,2 kDa.

Das letzte Protein, das sich in diese Region einordnen lässt wurde mit TraM1 bezeichnet, aufgrund von 61,1% identischer Aminosäuren mit TraM von *L.p.* AA100 und 40,8% identischen Aminosäuren zu TraM von R751. Die Funktion ist ungeklärt. Die Länge beträgt 149 Aminosäuren, das Gewicht 16,8 kDa.

Bei *L.p.* Paris und *L.p.* Lens kann ein Protein SidC gefunden werden, das jeweils 26% identische Aminosäuren aufweist. Das Genom von *L.p.* Philadelphia 1 enthält ein Protein SidG, das 19% identische Aminosäuren zeigt. Diese Sid-Proteine sind mögliche Effektoren die über das *dot/icm* System in den Rezipienten übertragen werden.

Homologe Gene der Relaxosomregion

Die folgende Tabelle 10 zeigt das Zusammengefasste Ergebnis der vergleichenden Analyse von *L.p.* Corby mit der *tra1* Region von *L.p.* AA100, den entsprechenden Genen von *Enterobacter aerogenes* R751 (Tab.11) und den Legionellastämmen *L.p.* Philadelphia 1, *L.p.* Paris und *L.p.* Lens (Tab.12).

Tab. 10: Vergleich der *trb/tra* Genen von *L.p.* Corby mit der *tra1* Region von *L.p.* AA100.

	LEGIONELLA PNEUMOPHILA CORBY		LEGIONELLA PNEUMOPHILA AA100	IDENTISCHE AMINOSÄUREN (%)	
	AMINOSÄUREN		AMINOSÄUREN		
	<i>Trb1</i>	<i>Trb2</i>		<i>Trb1/ tra1 AA100</i>	<i>Trb2/ tra1 AA100</i>
TraH	98	98	97	73,5	77,6
TraI	621	624	623	64,3	66
TraJ	117	117	117	73,5	71,8
TraK	108	108	114	52,6	52,8
TraL	241	241	241	72,6	73
TraM	149	151	145	61,1	62,3

Tab.11: Vergleich der *trb/tra* Gene von *L.p.* Corby und der Gene des RP4 ähnlichen Konjugationssystems von *E. aerogenes* pR751.

	LEGIONELLA PNEUMOPHILA CORBY		ENTEROBACTER AEROGENES INCPB PLASMID R751	LEGIONELLA PNEUMOPHILA CORBY VS. R751	LEGIONELLA PNEUMOPHILA CORBY VS. R751
	AMINOSÄUREN		AMINOSÄUREN	IDENTISCHE AMINOSÄUREN (%)	IDENTISCHE AMINOSÄUREN (%)
	<i>Trb1</i>	<i>Trb2</i>		<i>Trb1/R751</i>	<i>Trb2/R751</i>
TraH	98	98	130	44,9	39,4
TraI	621	624	747	41,5	33,9
TraJ	117	117	124	41,9	42,7
TraK	108	108	132	33,3	30,9
TraL	241	241	241	66,4	66
TraM	149	151	145	40,8	62,3

Tab.12: Zusammenfassung der Ergebnisse des Vergleichs der *trb/tra* Regionen von *L.p.* Corby mit dem Genom von *L.p.* Philadelphia1, *L.p.* Paris und *L.p.* Lens.. Bei dem Vergleich wurde die Datenbank von www.pedant.gsf.de verwendet und damit die bestmögliche Überlappung der Aminosäuresequenz gesucht. Davon angegeben ist die Zahl der identischen bzw. homologen Aminosäuren und die Gesamtanzahl der verglichenen Aminosäuren.

LEGIONELLA PNEUMOPHILA PHILADELPHIA 1/ L.P. CORBY		IDENTISCHE AMINOSÄUREN		HOMOLOGE AMINOSÄUREN	
<i>Trb1/ L.p. Phil1</i>	<i>Trb2/ L.p. Phil1</i>	<i>Trb1/ L.p. Phil1</i>	<i>Trb2/ L.p. Phil1</i>	<i>Trb1/ L.p. Phil1</i>	<i>Trb2/ L.p. Phil1</i>
TraK	TraK	48/121 (39%)	19/49 (38%)	71/121 (58%)	33/49 (67%)
	NAD(P) transhydrogenase		30/107 (28%)		53/107 (49%)
SidG		18/91 (19%)		43/91 (47%)	
LEGIONELLA PNEUMOPHILA PARIS		IDENTISCHE AMINOSÄUREN		HOMOLOGE AMINOSÄUREN	
<i>Trb1/ L.p.Paris</i>	<i>Trb2/ L.p.Paris</i>	<i>Trb1/ L.p.Paris</i>	<i>Trb2/ L.p.Paris</i>	<i>Trb1/ L.p.Paris</i>	<i>Trb2/ L.p.Paris</i>
lpp0067	lpp0067	49/121 (40%)	22/60 (36%)	69/121 (57%)	38/60 (63%)
	lpp2884	56/260 (21%)			106/260 (40%)
	lpp2885		56/184 (30%)		97/184 (52%)
SidC		26/100 (26%)		44/100 (44%)	

LEGIONELLA PNEUMOPHILA LENS		IDENTISCHE AMINOSÄUREN		HOMOLOGE AMINOSÄUREN	
<i>Trb1/ L.p. Lens</i>	<i>Trb2/ L.p. Lens</i>	<i>Trb1/ L.p. Lens</i>	<i>Trb2/ L.p. Lens</i>	<i>Trb1/ L.p. Lens</i>	<i>Trb2/ L.p. Lens</i>
lpl0071	lpl0071	42/122 (34%)	20/50 (40%)	67/122 (54%)	34/50 (68%)
SidC		26/100 (26%)		44/100 (44%)	

Die Zusammenschau des Vergleichs zeigt, dass die Relaxosomregion von *L.p. Corby* *Trb1/2* weitgehend der *tra1* Region von *L.p. AA100* entspricht, denn es finden sich hohe Homologien im direkten Vergleich der Aminosäuresequenzen.

An zweiter Stelle bei der Suche nach vergleichbaren Proteinen stehen die das Relaxosom kodierende Proteine des IncP Plasmids R751 von *Enterobacter aerogenes*.

Der Vergleich zu den *Legionella*-stämmen kann zusammengefasst werden, dass in den untersuchten *Legionella*-stämmen jeweils ein TraK ähnliches Protein gefunden werden kann. Für die in TraK2 integrierten Leserahmen TP1A und TP1B finden sich in *L.p. Paris* Proteine die Transposasen entsprechen können (lpp2884 und lpp2885). Für die abgeleitete Aminosäuresequenz von TraM1 ergibt sich jeweils schwache Übereinstimmung mit Proteinen, die über das *icm/dot* TypIV System transportiert werden.

Nachdem theoretisch alle Elemente eines Konjugationssystems vorhanden sind, wird in Abschnitt 3.4.2 die Prüfung der Funktionalität des Systems dargelegt werden.

3.3. Verbreitung der trb/tra Region in der Gattung *Legionella*

Nach Sequenzierung der Region, die Elemente eines Konjugations- bzw. Typ IV Sekretionssystems aufweist, sollte untersucht werden, ob auch andere *Legionellastämme* (Tab.13) teilweise oder vollständig diese Region enthalten. Hierzu wurden Sonden durch PCR von den klonierten Plasmiden generiert, die *trbB2*, *trbI1*, *traG1* und *traJ1* mit der *ori-T* Region enthalten (Tab.14).

Zum Vergleich, ob gleichzeitig andere Sekretionssysteme vorhanden sind, wurden Sonden erstellt, die das Gene *TraD* aus dem *PI-1* assoziierten Systems und das Gen *LvhB10* des *Lvh* Systems von *L.p. Philadelphia 1* enthalten. Das *icm/dot* Systems von *L.p. Philadelphia1* wurde mit der Sonde *icmR* geprüft (Zusammenfassung der Ergebnisse s. Tab.15).

Gensonden der generierten Plamide aus L.p. Corby

Sonde 1: ORF trbB2
Sonde 2: ORF trbI1
Sonde 3: ORF traG1
Sonde 4: ORF traJK-ori-T-traLM1

Gensonden aus L.p. AA100

Sonde 5: lvhB10

Gensonden aus L.p. Philadelphia 1

Sonde 6: traD
Sonde 7: icmR

Tab.13: Verwendete Legionella Stämme

Blot1

1 <i>L.p.</i> Corby	
2 <i>L.p.</i> Phil1	[ATCC 33152]
3 <i>L.p.</i> Phil 1 XXXV	Bender et. al. 1991
4 <i>L.p.</i> S7	P. Lück, Dresden
5 <i>L.p.</i> S10	P. Lück, Dresden
6 <i>L.p.</i> S12	P. Lück, Dresden
7 <i>L.p.</i> S13	P. Lück, Dresden
8 <i>L.p.</i> Msp 19	Bender et. al. 1991
9 <i>L.p.</i> U22	Bender et. al. 1991
10 <i>L.p.</i> U21	Bender et. al. 1991
11 <i>L.p.</i> 685	Bender et. al. 1991
12 <i>L.p.</i> 640	Bender et. al. 1991
13 <i>L.p.</i> 664	Bender et. al. 1991
14 <i>L.p.</i> Bloomington	[ATCC 33155]
15 <i>L.p.</i> Los Angeles	[ATCC 33156]
16 <i>L.p.</i> Chicago-2	[ATCC 33215]
17 <i>L. longbeachae</i>	[ATCC33462]
18 <i>L. micdadei</i>	[ATCC33218]

Blot2

1 <i>L.p.</i> Corby	Jepras et. al. 1985
2 <i>L. bozemanii</i>	[ATCC 33217]
3 <i>L. dumoffii</i>	[ATCC 33279]
4 <i>L. feelei</i> (S1)	[ATCC 35072]
5 <i>L. gormanii</i>	[ATCC 33297]
6 <i>L. hackeliae</i> (S1)	[ATCC 33250]
7 <i>L. hackeliae</i> (S2)	[ATCC 33484]
8 <i>L. isrealiensis</i>	[ATCC 43119]
9 <i>L. jordanis</i>	[ATCC 33623]
10 <i>L. longbeachae</i> (S1)	[ATCC3462]
11 <i>L. longbeachae</i> (S2)	[ATCC 3484]
12 <i>L. micdadei</i>	[ATCC 33218]
13 <i>L. oakridgensis</i>	[ATCC 33761]
14 <i>L. anisa</i>	Fields et. al., 1990
15 <i>L. erythra</i>	Saunders et. al., 1992
16 <i>Sacrobium</i> (<i>Legionella</i>) <i>lyticum</i>	[Polish Culture of Microorganisms; PCM 2298]
17 <i>L.p.</i> Phil1	[ATCC 33152]

Blot 3

1 <i>L.p.</i> Corby	Jepras et. al. 1985
2 <i>L.p.</i> Phil1	[ATCC 33152]
3 <i>L.p.</i> Philadelphia JR 32	Marra & Shuman, 1989
4 <i>L.p.</i> AA100	Edelstein et. al., 1986
5 <i>L.p.</i> S13	P. Lück, Dresden
6 <i>L.p.</i> 640	Bender et. al. 1991
7 <i>L. dumoffii</i>	[ATCC 33279]
8 <i>L. micdadei</i>	[ATCC 33218]

Tab.14: Verwendete Primer zur generierung der Sonden.

	Sequenz (5'---3')	Tm(°C)NT(bp)	
Sonde1			
trbB2			
B1-U	CGTTGTATCCGGACCAACCTT	59	342
B1-R	GCGCATCCTGAGTGTGGTTTT	59	
Sonde2			
trbI1			
TrbI-F	TAAGGAGTGAGACTGATGAATC	57	1247
TrbI-R	CATTGCACTCCTCCTGTATCAAT	59	
Sonde3			
traG1			
TraG-F	TGGAGACGGTCAATGAGCTTGA	60	1890
TraG-R	TAGTCTGATTTCTCATCTTCACG	59	
Sonde4			
traJ1			
traJ-R	ACAAGTGGTTTGCAATCCTTTAG	57	1767
traM1R	GCTAGCCAATGCAGCATT	53	
Sonde5			
traD			
TraD-F	GCTTATCATCACTTGCCCTTTA	57	633
TraD-R	GCAGAGATACACCACCAATCCGA	62	
Sonde6			
lvhB10			
LvhB10-F	GCAATCGGACTCAGGTTGCTA	60	710
LvhB10-R	CTGCCAAAGCGCTCGAAGAAA	60	
Sonde7			
icmR			
IcmR-F	ATACTGATGACAGTGCACGAA	60	350
IcmR-R	GATGATAATTTGAAACCACCACG TTC	55	

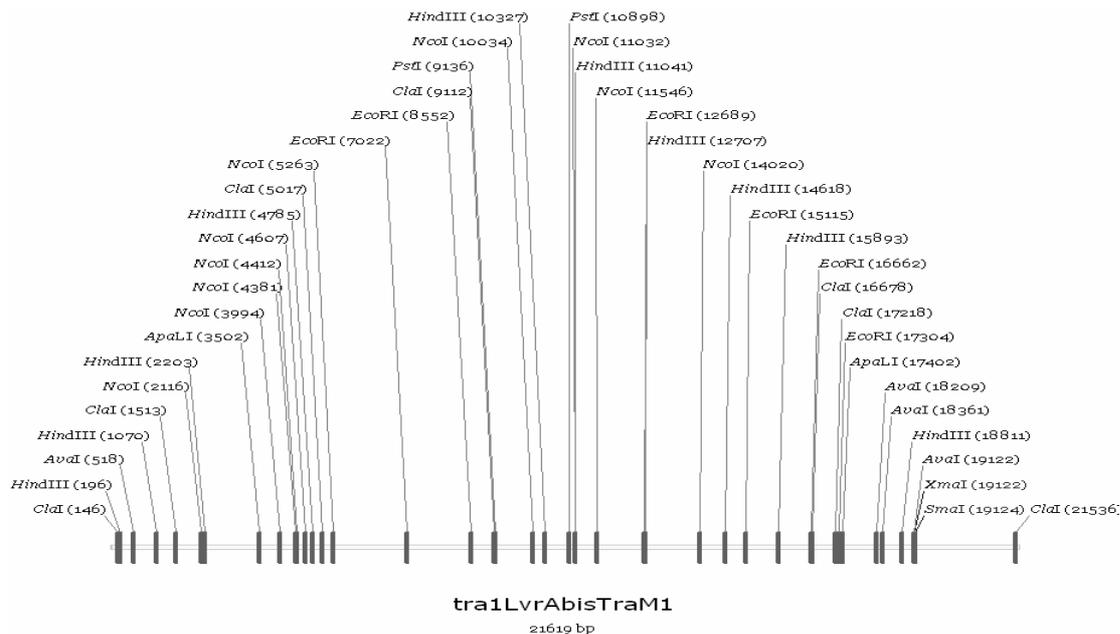


Abb.17: Restriktionsschnittstellen der *trb/tra* Region in Trb1

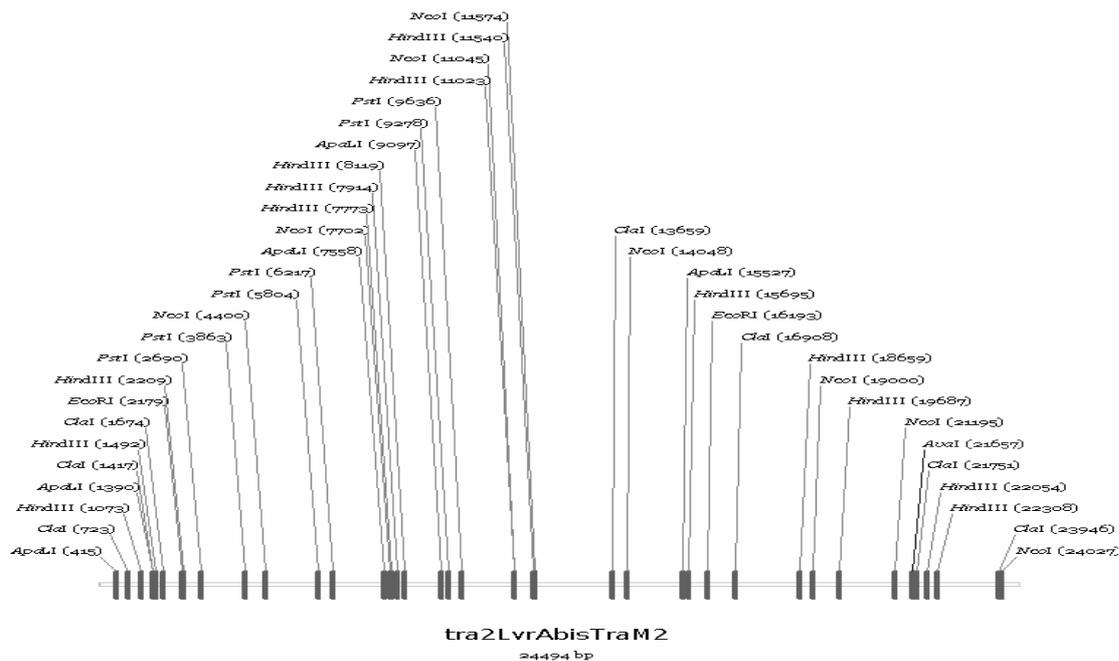


Abb. 18: Restriktionsschnittstellen der *trb/tra* Region in Trb2

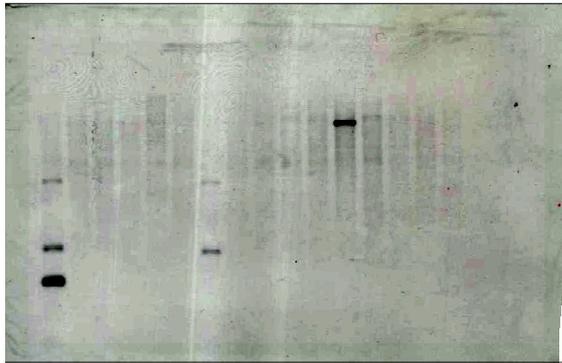
Aus den Abbildungen 17 und 18 ergeben sich für die Analyse der Hybridisierungen folgende Fragmentgrößen (DNA mit HindIII und SacII restringiert.)

	Trb1 Genominsel	Trb2 Genominsel
Sonde 1 trbB2:	2582 bp und 1133bp	5564 bp
Sonde 2 trbI1:	5542 bp	2904 bp
Sonde 3 traG1 :	1666 bp und 1911 bp	4155 bp

Sonde 1 trbB2 *L.p. Corby*

A.) Blot1

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

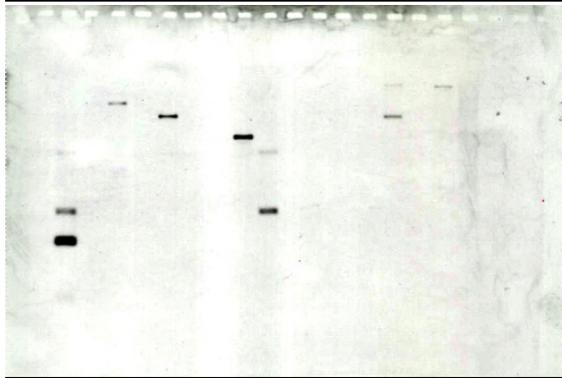


Blot1

- 1 *L.p. Corby*
- 2 *L.p. Phil1*
- 3 *L.p. Phil 1 XXXV*
- 4 *L.p. S7*
- 5 *L.p. S10*
- 6 *L.p. S12*
- 7 *L.p. S13*
- 8 *L.p. Msp 19*
- 9 *L.p. U22*
- 10 *L.p. U21*
- 11 *L.p. 685*
- 12 *L.p. 640*
- 13 *L.p. 664*
- 14 *L.p. Bloomington*
- 15 *L.p. Los Angeles*
- 16 *L.p. Chicago-2*
- 17 *L. longbeachae*
- 18 *L. micdadei*

B.) Blot2

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

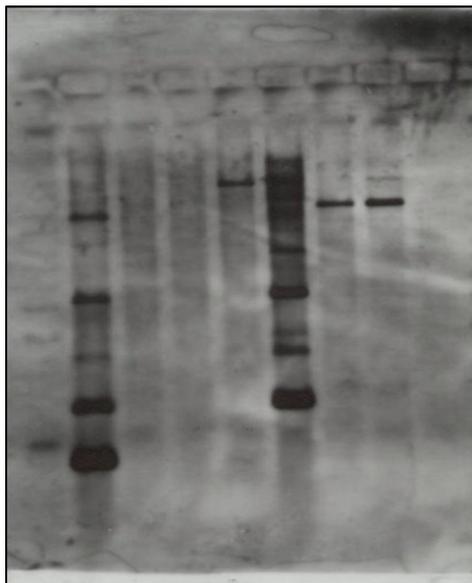


Blot2

- 1 *L.p. Corby*
- 2 *L. bozemanii*
- 3 *L. dumoffii*
- 4 *L. feelei (S1)*
- 5 *L. gormanii*
- 6 *L. hackeliae (S1)*
- 7 *L. hackeliae (S2)*
- 8 *L. isrealiensis*
- 9 *L. jordanis*
- 10 *L. longbeachae (S1)*
- 11 *L. longbeachae (S2)*
- 12 *L. micdadei*
- 13 *L. oakridgensis*
- 14 *L. anisa*
- 15 *L. erythra*
- 16 *Sacrobium (Legionella) lyticum*
- 17 *L.p. Phil1*

C.) Blot 3

1 2 3 4 5 6 7 8



Blot 3

- 1 *L.p. Corby*
- 2 *L.p. Phil1*
- 3 *L.p. Philadelphia JR 32*
- 4 *L.p. AA100*
- 5 *L.p. S13*
- 6 *L.p. 640*
- 7 *L. dumoffii*
- 8 *L. micdadei*

Abb.19: Hybridisierung mit Gensonde trbB2. Für die Genominsel Trb1 wird aufgrund der Restriktionsschnittstellen (Abb.19) eine Hybridisierung eines 2582 bp und 1133 bp großen Fragments erwartet. Trb2 wird durch Fragmente der Größe 5364 bp und 717bp angezeigt.(Abb.20)

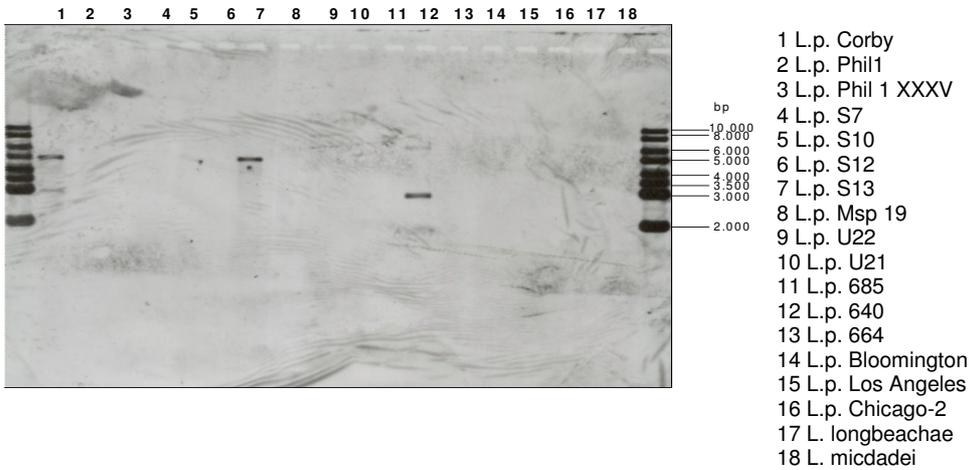
Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse der Hybridisierung mit der trbB2 Sonde aus Trb2. Von den getesteten *L. pneumophila* Stämmen weist *L.p.* S13 in Blot1/Spur 7 ein positives Signal für beide Genominseln Trb1/Trb2 auf, jedoch fehlen das 1133 bp große Fragment für Trb1 und das 717 bp große Fragment, das Trb2 anzeigt.

L.p.640 in Blot1/Spur 12 hybridisiert als weiterer *L. pneumophila* Stamm mit dem trbB2 Fragment.

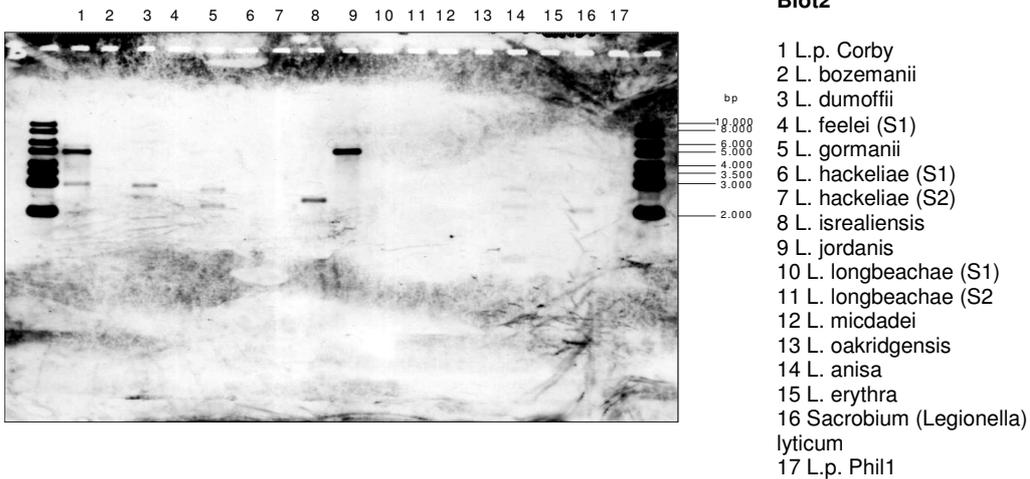
L. jordanis in Blot2/Spur 9 hybridisiert mit einem zu *L.p.*Corby vergleichbaren Bandenmuster, allerdings ohne das 1133 bp (Trb1) und das 717bp (Trb2) große Fragment, vergleichbar mit *L.p.* S13, damit enthält dieser Stamm auch Elemente aus Trb1 und Trb2. Die Non-*pneumophila* Stämme von Blot2 *L. dumoffii* (Blot2/Spur 3), *L.anisa* (Blot2/Spur 14) *L.gormanii* (Blot2/Spur 5), *L.israeliensis* (Blot2/Spur 8,) und *L.lyticum* (Blot2/Spur 16) zeigen ebenfalls ein positives Signal, mit unterschiedlich großen Fragmenten. Zusätzlich hybridisiert *L.p.* AA100 (Blot3/Spur 4) mit einem Fragment möglicherweise aus Trb2.

Sonde2 trb1 *L.p.* Corby

A.) Blot1



B.) Blot2



C.) Blot3

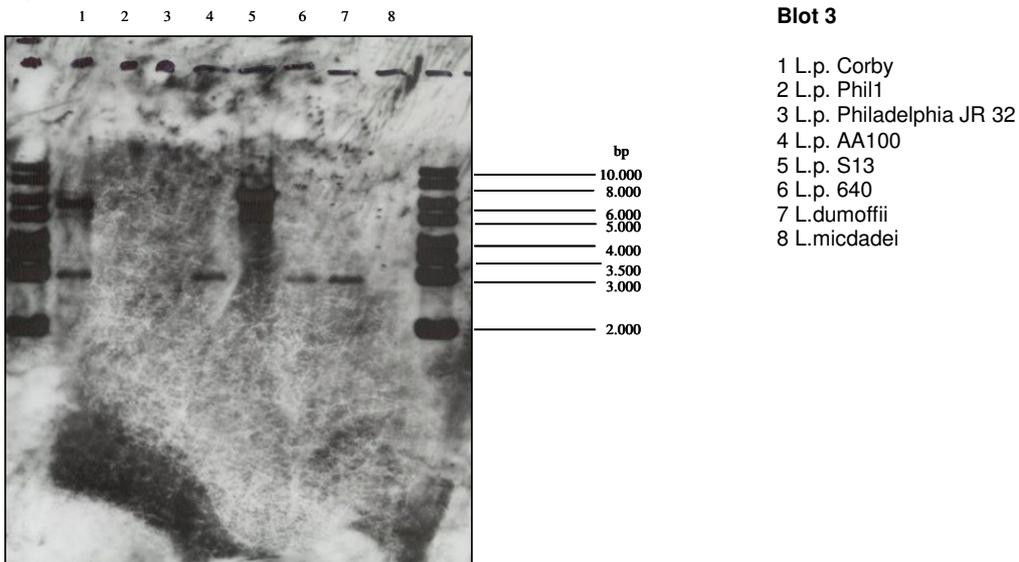
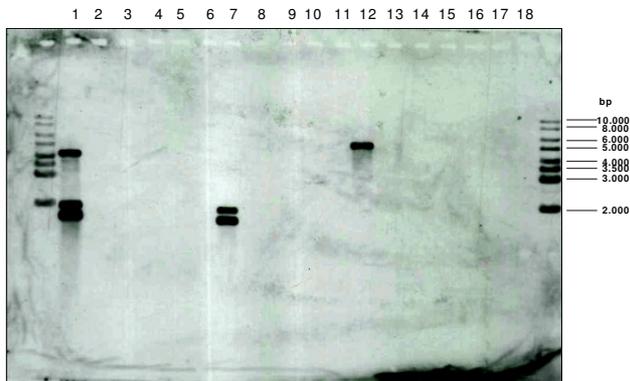


Abb. 20: Hybridisierung mit Gensonde trb1. Trb1 wird durch ein 5542 bp großes Fragment angezeigt und Trb2 durch ein 2904 bp Fragment.

Abbildung 20 stellt das Ergebnis der Hybridisierungen mit der Gensonde *trb1* dar. Für die getesteten *L.pneumophila* Stämme auf Blot1 gilt, dass *L.p. S13* (Blot1/Spur 7) nur mit der Bande die *Trb1* entspricht hybridisiert. *L.p. 640* (Blot1/Spur 12) hybridisiert mit der *Trb2* typischen Bande. Von Blot2, den non-pneumophila Stämmen, weist *L.jordanis* (Blot2/Spur 9) die 5542bp Bande für *Trb1* auf, jedoch nicht die 2904bp Bande von *Trb2*. *L. dumoffii* (Blot2/Spur 3), *L. gormanii* (Blot2/Spur 5), und *L. anisa* (Blot2/Spur 14) zeigen ein ähnliches Bandenmuster, mit einer Bande die *Trb2* entspricht. *L. israeliensis* (Blot2/Spur 8) und *L. lyticum* (Blot2/Spur 16) weisen ebenfalls ein positives Signal auf, jedoch nicht mit *L.p. Corby* vergleichbaren Fragmenten. Von Blot3 hybridisiert *L.p. AA 100* (Blot3/Spur 4) mit dem 2904bp Fragment aus *Trb2*.

Sonde 3 traG1 *L.p. Corby*

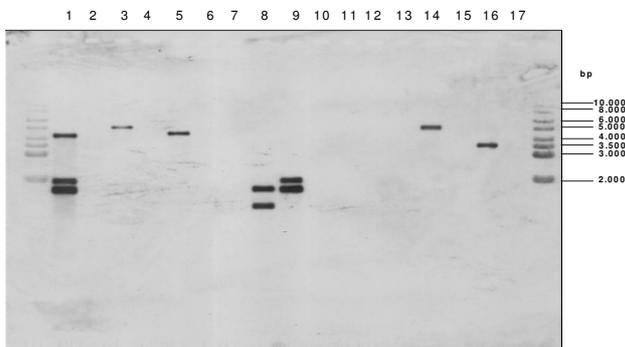
A.) Blot1



Blot1

- 1 *L.p. Corby*
- 2 *L.p. Phil1*
- 3 *L.p. Phil 1 XXXV*
- 4 *L.p. S7*
- 5 *L.p. S10*
- 6 *L.p. S12*
- 7 *L.p. S13*
- 8 *L.p. Msp 19*
- 9 *L.p. U22*
- 10 *L.p. U21*
- 11 *L.p. 685*
- 12 *L.p. 640*
- 13 *L.p. 664*
- 14 *L.p. Bloomington*
- 15 *L.p. Los Angeles*
- 16 *L.p. Chicago-2*
- 17 *L. longbeachae*
- 18 *L. micdadei*

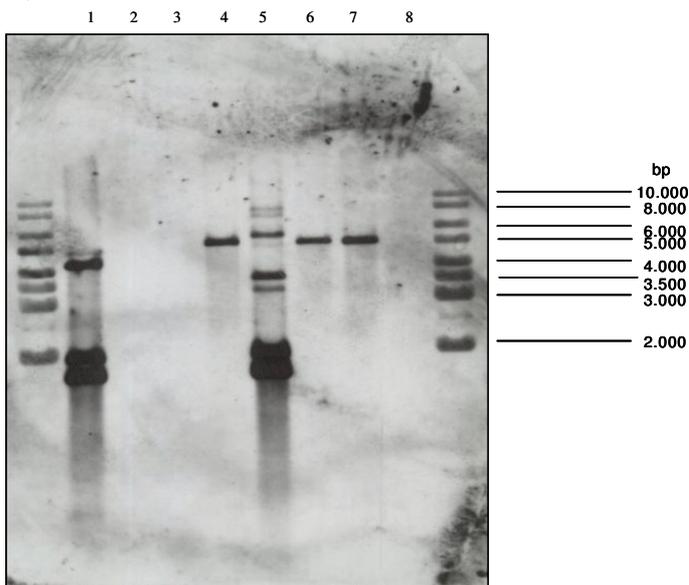
B.) Blot2



Blot2

- 1 *L.p. Corby*
- 2 *L. bozemanii*
- 3 *L. dumoffii*
- 4 *L. feelei (S1)*
- 5 *L. gormanii*
- 6 *L. hackeliae (S1)*
- 7 *L. hackeliae (S2)*
- 8 *L. israeliensis*
- 9 *L. jordanis*
- 10 *L. longbeachae (S1)*
- 11 *L. longbeachae (S2)*
- 12 *L. micdadei*
- 13 *L. oakridgensis*
- 14 *L. anisa*
- 15 *L. erythra*
- 16 *Sacrobium (Legionella) lyticum*
- 17 *L.p. Phil1*

C.) Blot3



Blot 3

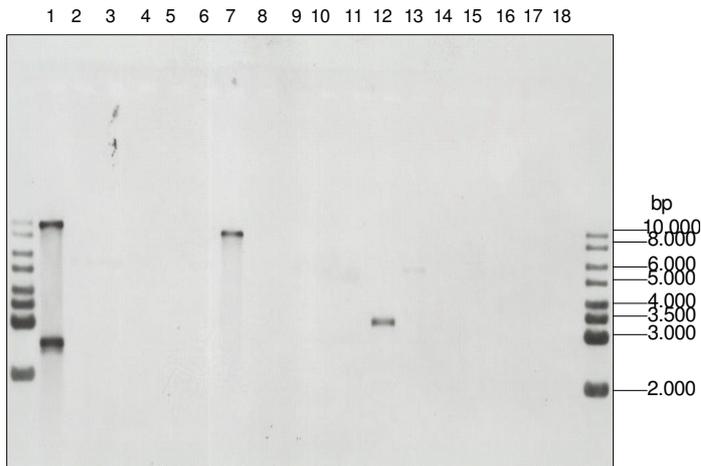
- 1 *L.p. Corby*
- 2 *L.p. Phil1*
- 3 *L.p. Philadelphia JR 32*
- 4 *L.p. AA100*
- 5 *L.p. S13*
- 6 *L.p. 640*
- 7 *L.dumoffii*
- 8 *L.micdadei*

Abb.21: Hybridisierung mit Sonde traG1. Die zu erwartenden Fragmente sind für Trb1 1666bp und 1911bp groß. Für Trb2 ergibt sich ein Fragment der Größe 4155bp (Abb.19;Abb.20).

Abbildung 21 stellt das Ergebnis der Reaktion mit Sonde traG1 dar. *L.p.* S13 (Blot1/Spur 7) zeigt beide Trb1 Banden, in Blot3 allerdings auch die Bande bei 4155 für Trb2. Bei *L.p.* 640 (Blot1/Spur 12) erscheint nur die Bande der Trb2 Region. Die Hybridisierung mit Blot2 ergibt bei *L. jordanis* das Bandenmuster für Trb1, die *Non-pneumophila* Stämme *L. dumoffii* (Blot2/Spur 3), *L.gormanii* (Blot2/Spur 5), *L.anisa* (Blot2/Spur 14) hybridisieren mit Trb2. *L.israeliensis* (Blot2/Spur 8), und *L.lyticum* (Blot2/Spur 16) zeigen ebenfalls eine Hybridisierungsreaktion, allerdings nicht mit vergleichbarem Bandenmuster. Zusätzlich zeigt *L.p.* AA100 (Blot3/Spur4) eine Hybridisierung mit dem 4155bp Fragment aus Trb2.

Sonde 4 ori-T Region *L.p. Corby*

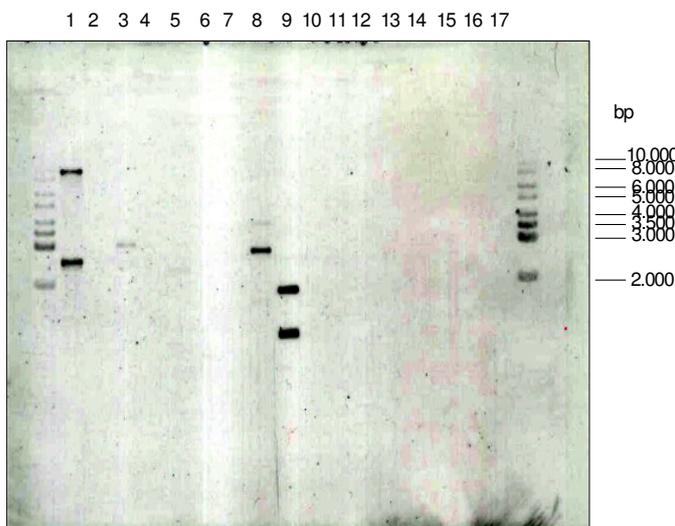
A.) Blot1



Blot1

- 1 *L.p. Corby*
- 2 *L.p. Phil1*
- 3 *L.p. Phil 1 XXXV*
- 4 *L.p. S7*
- 5 *L.p. S10*
- 6 *L.p. S12*
- 7 *L.p. S13*
- 8 *L.p. Msp 19*
- 9 *L.p. U22*
- 10 *L.p. U21*
- 11 *L.p. 685*
- 12 *L.p. 640*
- 13 *L.p. 664*
- 14 *L.p. Bloomington*
- 15 *L.p. Los Angeles*
- 16 *L.p. Chicago-2*
- 17 *L. longbeachae*
- 18 *L. micdadei*

B.) Blot2



Blot2

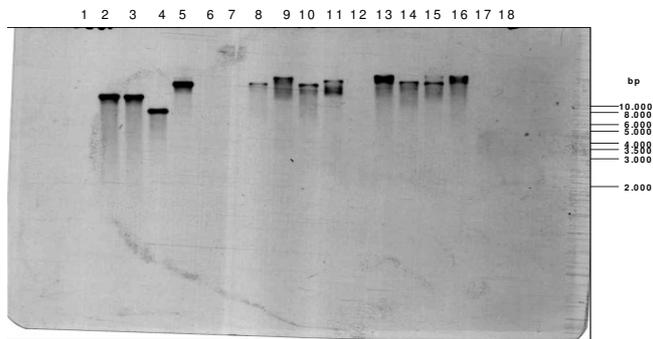
- 1 *L.p. Corby*
- 2 *L. bozemanii*
- 3 *L. dumoffii*
- 4 *L. feelei (S1)*
- 5 *L. gormanii*
- 6 *L. hackeliae (S1)*
- 7 *L. hackeliae (S2)*
- 8 *L. israeliensis*
- 9 *L. jordanis*
- 10 *L. longbeachae (S1)*
- 11 *L. longbeachae (S2)*
- 12 *L. micdadei*
- 13 *L. oakridgensis*
- 14 *L. anisa*
- 15 *L. erythra*
- 16 *Sacrobium (Legionella) lyticum*
- 17 *L.p. Phil1*

Abb. 22: Die Gensonde enthält die Gene traJKLM und den „*origin of transfer*“. Das Bandenmuster bei *L.p. Corby* zeigt zwei Banden bei ca. 9000bp für Trb1 und bei ca. 2500bp für Trb2.

Aus Abbildung 22 ist ersichtlich, dass bei *L.p. S13* (Blot1/Spur 7) nur die Bande bei 9000bp für Trb1 erscheint, bei *L.p. 640* hybridisiert ein Fragment bei 3300bp, möglicherweise entsprechend Trb2. Die Bandenmuster der Non-*pneumophila* Stämme zeigen unspezifisch eine Reaktion für *L. israeliensis* und *L. jordanis*.

Sonde5 IvhB10 *L.p.* AA100

A.) Blot1



Blot1

- 1 *L.p.* Corby
- 2 *L.p.* Phil1
- 3 *L.p.* Phil 1 XXXV
- 4 *L.p.* S7
- 5 *L.p.* S10
- 6 *L.p.* S12
- 7 *L.p.* S13
- 8 *L.p.* Msp 19
- 9 *L.p.* U22
- 10 *L.p.* U21
- 11 *L.p.* 685
- 12 *L.p.* 640
- 13 *L.p.* 664
- 14 *L.p.* Bloomington
- 15 *L.p.* Los Angeles
- 16 *L.p.* Chicago-2
- 17 *L.* longbeachae
- 18 *L.* micdadei

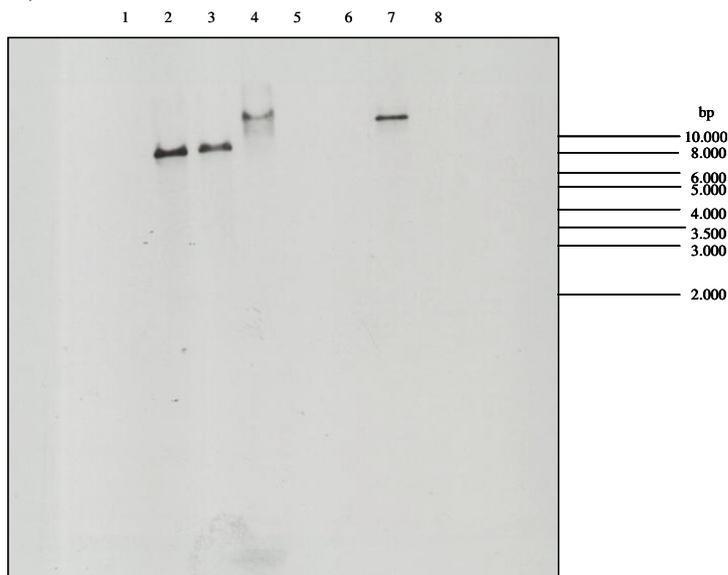
B.) Blot2



Blot2

- 1 *L.p.* Corby
- 2 *L.* bozemanii
- 3 *L.* dumoffii
- 4 *L.* feelei (S1)
- 5 *L.* gormanii
- 6 *L.* hackeliae (S1)
- 7 *L.* hackeliae (S2)
- 8 *L.* isrealiensis
- 9 *L.* jordanis
- 10 *L.* longbeachae (S1)
- 11 *L.* longbeachae (S2)
- 12 *L.* micdadei
- 13 *L.* oakridgensis
- 14 *L.* anisa
- 15 *L.* erythra
- 16 *Sacrobium* (*Legionella*)
lyticum
- 17 *L.p.* Phil1

C.) Blot3



Blot 3

- 1 *L.p.* Corby
- 2 *L.p.* Phil1
- 3 *L.p.* Philadelphia JR 32
- 4 *L.p.* AA100
- 5 *L.p.* S13
- 6 *L.p.* 640
- 7 *L.* dumoffii
- 8 *L.* micdadei

Abb.23: Hybridisierungen mit Gensonde IvhB10.

Das Ergebnis der Hybridisierungsreaktionen mit der Gensonde lvhB10 die aus dem *legionella vir homologue* Typ IV Transportsystem abgeleitet ist, ist in Abbildung 23 dargestellt. Es ergeben sich keine Signale für *L.p.* Corby (Blot1/Spalte 1), *L.p.* S13 (Blot 1/Spalte 7), *L.p.* 640 (Blot1/Spalte 12), *L. longbeachae* (Blot1/Spalte 17) und *L. micdadei* (Blot1/Spalte 18).

Die restlichen geprüften *L.pneumophila* Stämme hybridisieren.

Von den getesteten Non-*pneumophila* Stämmen zeigen *L. dumoffii*

(Blot2/Spalte 3) und *L. oakridgeiensis* (Blot2/Spalte 13) eine positive Reaktion mit der Sonde. Zusätzlich hybridisiert *L.p.* JR32 mit der Sonde (Blot3/Spur3).

Sonde6 traD *L.p. Philadelphia*1

A.) Blot1



Blot1

- 1 *L.p. Corby*
- 2 *L.p. Phil1*
- 3 *L.p. Phil 1 XXXV*
- 4 *L.p. S7*
- 5 *L.p. S10*
- 6 *L.p. S12*
- 7 *L.p. S13*
- 8 *L.p. Msp 19*
- 9 *L.p. U22*
- 10 *L.p. U21*
- 11 *L.p. 685*
- 12 *L.p. 640*
- 13 *L.p. 664*
- 14 *L.p. Bloomington*
- 15 *L.p. Los Angeles*
- 16 *L.p. Chicago-2*
- 17 *L. longbeachae*
- 18 *L. micdadei*

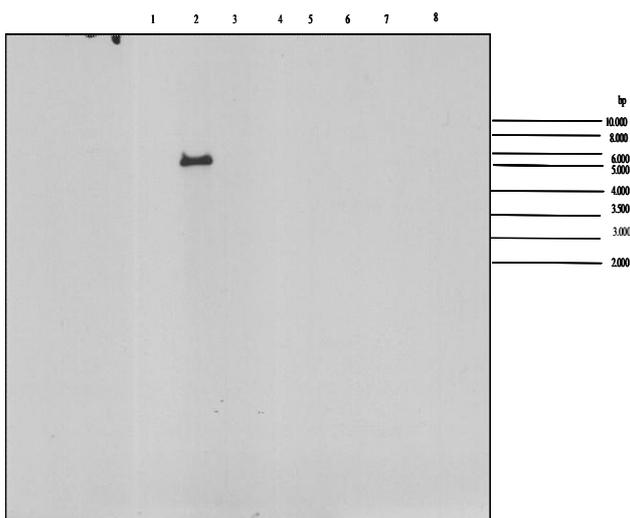
B.) Blot2



Blot2

- 1 *L.p. Corby*
- 2 *L. bozemanii*
- 3 *L. dumoffii*
- 4 *L. feelei (S1)*
- 5 *L. gormanii*
- 6 *L. hackeliae (S1)*
- 7 *L. hackeliae (S2)*
- 8 *L. isrealiensis*
- 9 *L. jordani*
- 10 *L. longbeachae (S1)*
- 11 *L. longbeachae (S2)*
- 12 *L. micdadei*
- 13 *L. oakridgensis*
- 14 *L. anisa*
- 15 *L. erythra*
- 16 *Sacrobium (Legionella) lyticum*
- 17 *L.p. Phil1*

C.) Blot 3



Blot 3

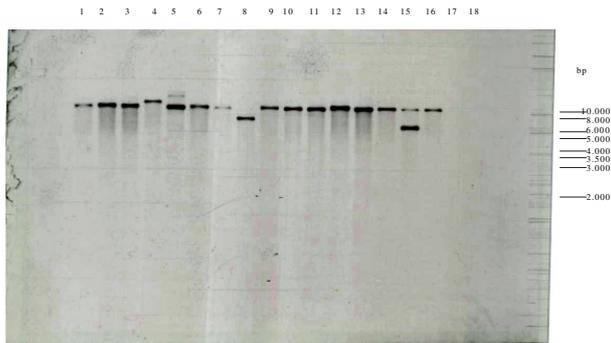
- 1 *L.p. Corby*
- 2 *L.p. Phil1*
- 3 *L.p. Philadelphia JR 32*
- 4 *L.p. AA100*
- 5 *L.p. S13*
- 6 *L.p. 640*
- 7 *L.dumoffii*
- 8 *L.micdadei*

Abb. 24: Gensonde traD aus *L.p. Philadelphia* 1.

Zum Nachweis des *lvh* Systems wurden die *Legionella*-stämmen mit der Sonde traD geprüft (Abb. 24). Es hybridisieren *L.p.* Philadelphia1 (Blot1/Spur 2 und 3) und *L.p.* S12 (Blot1/Spur 5). Bei den Non-pneumophila Stämmen zeigen *L. anisa* und *L. erythra* positive Signale (Blot2/Spuren 14 und 15).

Sonde 7 *icmR L.p. Philadelphia1*

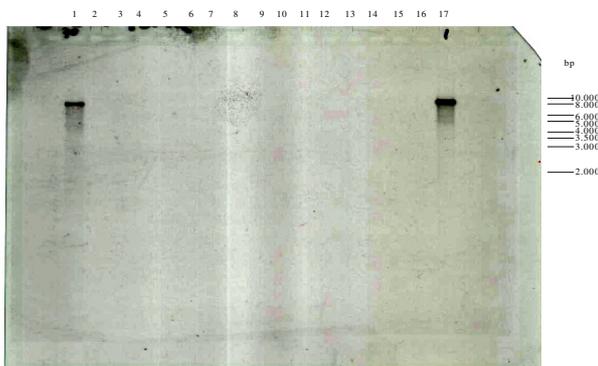
A.) Blot1



Blot1

- 1 *L.p.* Corby
- 2 *L.p.* Phil1
- 3 *L.p.* Phil 1 XXXV
- 4 *L.p.* S7
- 5 *L.p.* S10
- 6 *L.p.* S12
- 7 *L.p.* S13
- 8 *L.p.* Msp 19
- 9 *L.p.* U22
- 10 *L.p.* U21
- 11 *L.p.* 685
- 12 *L.p.* 640
- 13 *L.p.* 664
- 14 *L.p.* Bloomington
- 15 *L.p.* Los Angeles
- 16 *L.p.* Chicago-2
- 17 *L.* longbeachae
- 18 *L.* micdadei

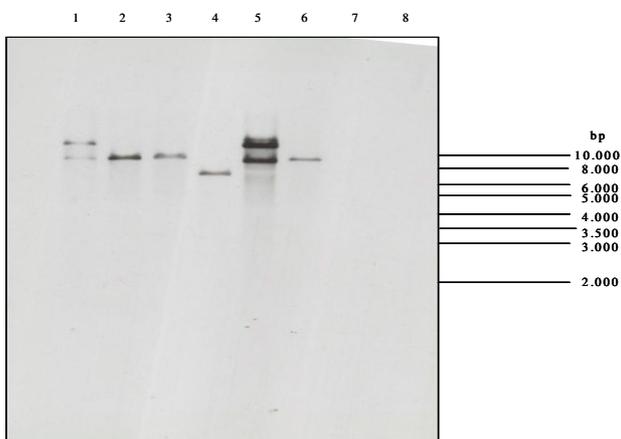
B.) Blot2



Blot2

- 1 *L.p.* Corby
- 2 *L.* bozemanii
- 3 *L.* dumoffii
- 4 *L.* feelei (S1)
- 5 *L.* gormanii
- 6 *L.* hackeliae (S1)
- 7 *L.* hackeliae (S2)
- 8 *L.* isrealiensis
- 9 *L.* jordanis
- 10 *L.* longbeachae (S1)
- 11 *L.* longbeachae (S2)
- 12 *L.* micdadei
- 13 *L.* oakridgensis
- 14 *L.* anisa
- 15 *L.* erythra
- 16 *Sacrobium* (*Legionella*)
lyticum
- 17 *L.p.* Phil1

C.) Blot3



Blot 3

- 1 *L.p.* Corby
- 2 *L.p.* Phil1
- 3 *L.p.* Philadelphia JR 32
- 4 *L.p.* AA100
- 5 *L.p.* S13
- 6 *L.p.* 640
- 7 *L.* dumoffii
- 8 *L.* micdadei

Abb. 25: Sonde *icmR aus L.p. Philadelphia1*.

Das Vorhandensein des *icm/dot* Systems wurde durch die Gensonde *icmR* geprüft (Abb. 25). Es hybridisieren alle geprüften *L.pneumophila* Stämme. Die untersuchten Non-*pneumophila* Stämme zeigen kein Signal.

Tab.15: Ergebnis der Hybridisierungsreaktionen. Eine positive Reaktion ist mit (+) bezeichnet, kein signal ist mit (-) dargestellt. Wenn sich Trb1/Trb2 nicht zuordnen ließ erscheint kein Teilstrich.

	Sonde1	Sonde2	Sonde3	Sonde4	Sonde5	Sonde6	Sonde7
	<i>trbB2</i>	<i>trbI1</i>	<i>traG1</i>	<i>traHIJK oriT Tra1</i>	<i>lvhB10</i>	<i>traD</i>	<i>icmR</i>
	Trb1/Trb2	Trb1/Trb2	Trb1/Trb2	Trb1/Trb2			
Stamm							
<i>L.p. Corby</i>	+/+	+/+	+/+	+/+	-	-	+
<i>L.p. Phil I</i>	-	-	-	(+)	+	+	+
<i>L.p. Phil I XXXV</i>	-	-	-	(+)	+	+	+
<i>L.p. S7</i>	-	-	-	-	+	-	+
<i>L.p. S10</i>	-	-	-	-	+	-	+
<i>L.p. S12</i>	-	-	-	(+)	-	+	+
<i>L.p. S13</i>	+/+	+/-	+/+	+/+	-	-	+
<i>L.p. Msp 19</i>	-	-	-	-	(+)	-	+
<i>L.p. U22</i>	-	-	-	-	(+)	-	+
<i>L.p. U21</i>	-	-	-	-	(+)	-	+
<i>L.p. 685</i>	-	-	-	-	(+)	-	+
<i>L.p. 640</i>	-/+	-/+	-/+	-/+	-	-	+
<i>L.p. 664</i>	-	-	-	-	(+)	-	+
<i>L.p. Los Angeles</i>	-	-	-	(+)	(+)	-	+
<i>L.p. Chicago 2</i>	-	-	-	(+)	(+)	-	+
<i>L.p. JR 32</i>	-	-	-	nd	+	-	+
<i>L.p. AA100</i>	-/+	-/+	-/+	nd	+	-	+
<i>L. bloomington</i>	-	-	-	(+)	(+)	-	-
<i>L. bozemanii</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. dumoffii</i>	-/+	-/+	-/+	-/+	+	-	-
<i>L. feelei</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. gormanii</i>	+	-/+	-/+	-/+	-	-	-
<i>L. hackeliae [S1]</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. hackeliae [S2]</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. israeliensis</i>	+	-/+	-/+	-/+	-	-	-
<i>L. jordanis</i>	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-
<i>L. longbeachae [S1]</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. longbeachae [S2]</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. micdadei</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. oakridgensis</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>L. anisa</i>	+	-/+	-/+	(+)	-	+	-
<i>L. erythra</i>	-	-	-	-	-	+	-
<i>L. lyticum</i>	+	+	+	+	-	-	-

Die Ergebnisse der Hybridisierungen sind in Tab. 15 zusammenfasst.

Es findet sich bei *L.p. S13*, *L.p. 640* und *L.p. AA100* als Vertreter der *Legionella pneumophila* Stämme jeweils ein positives Signal für die Sonden der *trb/tra* Region, die restlichen 15 untersuchten *L. pneumophila* Stämme sind negativ.

Bei den Non-*pneumophila* Stämmen sind *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. israeliensis*, *L. jordanis*, *L. anisa* und *L. lyticum* positiv und 9 Non-*pneumophila* Stämme negativ.

Im Vergleich zu dem *lvh* System zeigt sich, dass bis auf *L. dumoffii* und *L.p.* AA100 die untersuchten *Legionella*-stämmen jeweils entweder für Sonden der *trb/tra* Region oder des *lvh* Systems hybridisieren.

Die Analyse der Bandenmuster ergibt, dass *L.p.* Corby, *L.p.* S13 und *L. jordanis* die *trb/tra* Region aus beiden Genominseln Trb1 und Trb2 enthalten. *L.p.* 640, *L.p.* AA100, *L. gormanii*, *L. dumoffii* und *L. anisa* besitzen das *trb/tra* System aus Trb2. Die restlichen Bandenmuster der positiven Stämme lassen keine Aussage zu.

3.4. Hinweise auf Funktionalität der *trb/tra* Region

3.4.1. Elektronenmikroskopie

Das mögliche Vorhandensein des Proteins TrbC, das den eigentlichen Pilus darstellt der aus der Bakterienmembran herausragt und des zur Prozessierung notwendigen Proteins TraF, (Kalkum et. al., 2002) legt den Schluss nahe, dass ein mit Mikroskopie nachweisbarer Pilus darstellbar ist (Abb 26). Zum Vergleich wurden Zellen untersucht, bei denen entweder *traG* oder *trbI* durch Einbringung einer Kanamycin Kassetten ausgeschaltet ist.

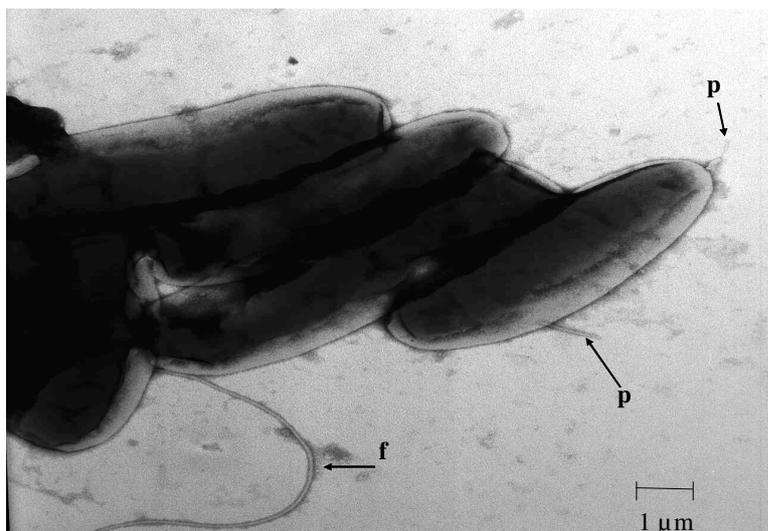


Abb. 26: *L.p.* Corby Zellen. Markiert sind mögliche Pili (P) und eine Flagelle (F).

3.4.2. Konjugation

Um die Funktionalität der ori-T Region, also dem Bereich der *trb/tra* Region der für den Start des DNA Transfers verantwortlich sein kann, zu überprüfen, wurden die ORFs *trbHIJK ori-T* aus *Trb1* in ein Vektorplasmid pGEM kloniert und untersucht ob die Gene ausreichen ein Plasmid zu mobilisieren. Hierzu wurde der *E.coli* Stamm Sm10 λ pir als Donorstamm verwendet, der alle Transferegene zur Übertragung von *mobRP4* Plasmiden enthält. Als Positivkontrolle wurde das Plasmid pMMB207 benutzt, das selbsttransferierbar ist. Als Negativkontrolle wurde das Plasmid pGEM ohne Insert verwendet, damit enthält dieser Vektor keine Gene zur Mobilisierung. Der *E.coli* Stamm XL1-blue wurde als Akzeptor benutzt. XL1-blue ist Resistent gegen Tetrazyklin, die Plasmide pGEM und pGEM-ori-T enthalten eine Ampicillinresistenz und das Plasmid pMMB207 eine Chloramphenicolresistenz. Sm10 λ pir ist nicht gegen Tetrazyklin resistent. Somit ist es möglich eine erfolgte Konjugation durch die neu erlangte Doppeltresistenz zu überprüfen (Tc und Amp für XC1 mit pGEM Plasmid; Tc und Cm für XC1 mit pMMB207). Die Resultierende Transferfrequenz ist in Abbildung 29 dargestellt.

Transferfrequenz

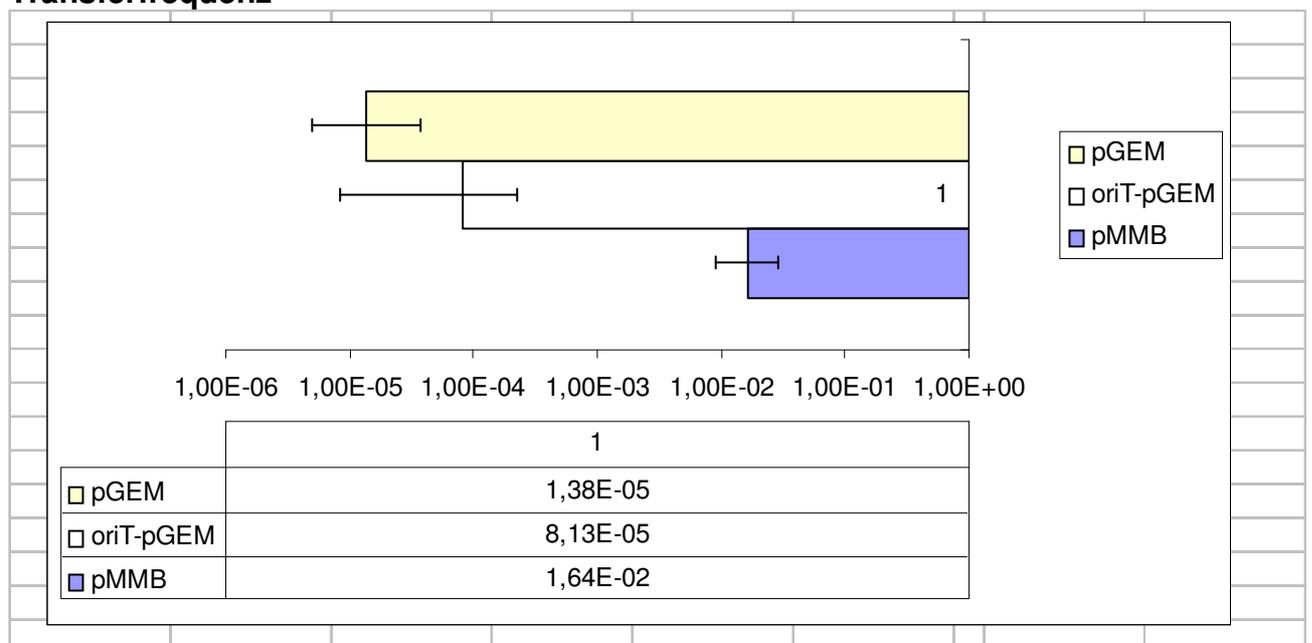


Abb.27: Negativ logarithmische Auftragung der Transferfrequenz(Transkonjugaten/Donor).Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

pMMB: Akzeptor mit Plasmid pMMB207

oriT-pGem: Akzeptor mit oriT Region Plasmid

pGEM: Akzeptor mit nicht mobilisierbarem Plasmid pGEM.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung eines bislang nicht in *Legionella pneumophila* beschriebenen Konjugationssystems und möglichen Typ IV Sekretionssystemen. Der kassettenartige Aufbau der Gene ähnelt den Typ IV Sekretionssystemen von *Agrobacterium tumefaciens vir*, *Bordetella pertussis ptl*, *Helicobacter pylori cag* und *Legionella pneumophila dot/icm* bzw. *Ivh* (Winans et. al., 1996). Typ IV Sekretionssysteme sind definiert durch die Fähigkeit bestimmte Moleküle zu sekretieren. Diese Sekretionssysteme leiten sich evolutorisch aus Systemen zur Konjugation ab, wie sich aus der übereinstimmenden Genorganisation und Sequenzähnlichkeiten erschließt (Lessl et. al., 1994, Kado, 1994; Christie, 2001). Die Analyse der Genominseln Trb1 und Trb2 von *L.p.* Corby zeigt Gene, die Homologie zu Genen des „*mating pair formation*“ Komplexes des IncP β Plasmids R751 aufweisen und Gene die den „*DNA transfer and replication*“ Genen des IncP β Plasmids R751, wie auch den *tra1* Gene von *L.p.* AA100 entsprechen.

Bei diesen Genen, analog zu pR751 *trbBCDEFGHIJKL* und *traFGHIJKLM* genannt, handelt es sich um die minimal geforderten Gene eines Konjugations bzw. TypIV Sekretionssystems (Li et. al., 1999; Christie, 2001).

Hervorzuheben ist das Fehlen der nicht essentiellen Gene wie *trbMNOP* und *traE* im Unterschied zu R751, was eine Optimierung der Genomorganisation bedeuten könnte. Ebenso befindet sich kein Tn-Element zwischen den *trb* und *tra* Regionen, wie dies bei dem *Enterobacter aerogenes* Plasmid R751 der Fall ist, jedoch findet sich ein solches in *traK2* der Genominsel Trb2.

Bei der Suche nach vergleichbaren Genen in den Genomen von *L.p.* Philadelphia 1, *L.p.* Paris und *L.p.* Lens erbringt für einige Gene eine Homologie zu *Ivh*, bzw. *vir-homologen* Proteinen, aber nicht für alle geprüften Leserahmen.

4.1. Regulation durch csrA?

Es scheint ein möglicher Genexpressionsregulierender Bereich mit dem *trb/tra* System assoziiert zu sein. Stromabwärts der „*mating pair formation*“ Gene befindet sich ein Leserahmen, der ein CsrA homologes Protein kodiert.

Außer für das *icm/dot* System konnte ein *IvrABC* Gencluster in allen Typ IV Sekretionssystemen von *L.pneumophila* gefunden werden (Brassinga et. al., 2003)(Abb.28).

	1		50
1. LgrA	MLILTRRIGE	TLIIGDD-VN	ITVLGVKGNQ
2. LvrC-PI1	..S....V..	SIV..E.-IFCC....
3. LvrC-Trb1	..V....V..	SVV.SE.-IY	C.IV.YQND
4. LvrC-Trb2	..V....V..	SVV.H...-Y	C.IV.YRDGE
5. LvrC-lvh†	..V...KA.Q	QIL..KGLIQ	MK..K.DDDI
6. LvrC-lvhf	..V...KA.Q	QIL..KGLIQ	MK..K.DDDI
7. LvrC-PI2†D.K...	EIY.NKGKIKYE.NGL
			VRLGINAPKD
			VSVHREEIY-
			..I.F...NS
			.AI..Y...-
			...AFD..KS
			IPI..D..Q-
			...AFD..RS
			IP...D..Q-
			ISI..K..QH
			IDID.....L
			ISI..K..QH
			IDID.....L
			IGI.VR..SE
			IDID.K.VFI
	51		90
1. LgrA	LRIQQE--KE	SDDSEQAV	~~~~~ 64
2. LvrC-PI1	Q...S.--H	DGLADPTKKF	CPSMQQSILN
3. LvrC-Trb1	R..YRDQI.D	NKFVVK.ANN	ESIVDRLINK
4. LvrC-Trb2	R..HRARI.D	NWFIDK.ANK	ESIVDRLINK
5. LvrC-lvh†	KKL...--GQ	AES.M.K.AP	~~~~~ 67
6. LvrC-lvhf	KKL...--EQ	AES.M.K.AP	~~~~~ 67

Abb.28: Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener *csrA* homologer Proteine aus *L.p.* Philadelphia-1 (1. LgrA), *L.p.* Philadelphia-1 Pathogenitätsinsel-1 (2. LvrC-PI1), *L.p.* Corby *trb/tra* Cluster (3. LvrC-*trb/tra*), *prpA-lvrABC* Cluster von *L.p.* Philadelphia AA100 (4. LvrC-lvh†), *L.p.* JR32 (5. LvrC-lvhf) und *L.p.* Philadelphia-1 putative Pathogenitätsinsel-2 (6. LvrC-PI2†). Punkte bezeichnen identische Aminosäuren. (Brassinga et. al., 2003)

Für *L. pneumophila* konnte gezeigt werden, dass nachdem ein CsrA Analogon durch LetA/LetS und *letE* inhibiert wird, Gene des Transmissionsphänotyps exprimiert werden (Hammer et. al., 2002; Lynch et. al., 2003; Molofsky & Swanson, 2003). Das CsrA homologe Element in dem putativen LvrABC von *L.p.* Corby könnte eine wichtige Rolle in der Expression des Sekretionssystems spielen. Deshalb könnten weitere Versuche zeigen ob das *trb/tra* System vielleicht Phasenabhängig ausgebildet wird. Beispielsweise könnte in *L.p.* Corby auch das TraR ähnliche Protein zusammen mit dem CsrA analogen Protein die Expression des Sekretionssystems regulieren, der Regelkreis und die Faktoren die dies beeinflussen bleiben zu definieren. CsrA reguliert in *E.coli* den Kohlenstoffstoffwechsel (Liu et. al. 1997), CsrA bindet an das CsrB RNA Molekül und bildet das Csr Regulationssystem, das einen negativen Effekt auf die Glykogen Synthese, Glukoneogenese und den Glykogen Abbau hat. Bei anderen Bakterien, wie *Erwinia caratovara* zeigt RmsA einen regulierenden Effekt auf die Produktion von Virulenzfaktoren, wie extrazelluläre Enzyme (Cui et. al. 1995).

4.2. Gene der „mating pair formation“

Das *Mpf* System („mating pair formation“) stellt die Proteine, die für die Pilusgenese benötigt werden und Membran assoziierte Proteine, die den engen Kontakt zwischen Donor und Rezipientenzelle regulieren (Samuels et. al. 2000).

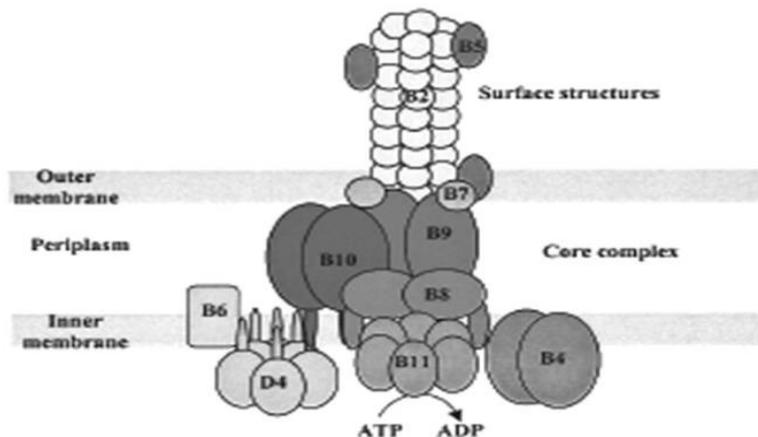


Abb.29: Dargestellt ist das Typ IV Sekretionssystem aus *Agrobacterium tumefaciens*. Die Abbildung zeigt die Organisation der *Mpf* Proteine in den Bakterienmembranen (Abbildung aus Yeo & Waksman, 2004)

Vergleichbare Gene des *Mpf* („mating pair formation complex“) finden sich auch in den *virB* Komponenten von *Agrobacterium tumefaciens*. Diese exportieren das ssDNA bindende Protein VirE2 (Binns et. al., 1995; Christie et. al., 1988; Gietl et. al., 1987) (s. Abb.29). Die *Mpf* Gene sind bei dem IncP α Plasmid RP4 und dem IncP β Plasmid R751 als *trb*-Gene bezeichnet. Sie sind zwischen IncP α Plasmiden und IncP β Plasmiden mit geringer Reduktion der Transferfrequenz vollständig austauschbar (Lessl et. al., 1992b). Elektrophysiologische Arbeiten zeigen, dass in Anwesenheit von *Mpf* Proteinen die Permeabilität der Wirtszellmembran erhöht wird (Daugelavius et.al., 1997). Die in den Genominseln Trb1 und Trb2 enthaltenen *trb* Gene weisen in ihrer abgeleiteten Aminosäuresequenz dieselben Sequenzmotive auf, was darauf hinweist, dass es sich um ein putatives *Mpf* System handeln kann, das unter Energieverbrauch Substrate exportiert.

Aminosäuresequenzvergleiche der Genominseln Trb1 und Trb2 mit den *trb* Genen des IncP β Plasmids R751 zeigen eine hohe Sequenzübereinstimmung. Untersuchungen der Genprodukte von *trbB*, *trbE* und *traG* des IncP α Plasmids RP4 ergeben, dass diese und analoge Proteine aus anderen Konjugations und Typ IV Sekretionsystemen konservierte NTP bindende Aminosäuresequenzmotive enthalten, die für den Transfer von Plasmiden essentiell sind (Krause 2000, Rabel et. al., 2003, Schröder et. al., 2002).

4.2.1. Pilusgenese durch TrbC und TraF

Die Reaktionsschritte die zur Ausbildung des nach extrazellulär reichenden Pilus führen sind ausführlich für das IncP α Plasmid RP4 beschrieben (Kalkum et. al., 2002). Der Reifungsprozess des TrbC Moleküls des IncP α Plasmid RP4 beginnt mit der Abspaltung eines 27 Aminosäuren langen Polypeptids am Carboxylende durch eine bisher nicht identifizierte Protease. In einem zweiten Schritt wird ein 36 Aminosäuren langes Signalpeptid durch die Wirtszell Signalpeptidase LepB aus *E. coli* abgespalten. In *L.pneumophila* wurde ein LepB ähnliche Signlapepetidase identifiziert (Lammertyn et. al., 2004) die analog diesen Schritt katalysieren könnte.

Der dritte und letzte Schritt beinhaltet eine Abspaltung von weiteren 4 Aminosäuren am Carboxylende und die Ausbildung einer neuen Peptidbindung zwischen dem Amino- und Carboxylende des TrbC Moleküls. Dieser Schritt der letztendlich zu einer Ringbildung führt wird durch TraF, einer Signalpeptidase katalysiert (Kalkum et. al., 2002; Haase & Lanka, 1997). Die Aminosäuren, die in vergleichbaren Signalpeptidasen von *E. coli* und *B. subtilis* für die katalytische Wirksamkeit gefordert werden (Black ,1993; van Dijl et. al.,1995) und für die gezeigt werden konnte, dass sie für das RP4 System ebenso essentiell sind (Haase & Lanka, 1997), finden sich auch in Trb1 und Trb2 in entsprechenden Aminosäuresequenzmotiven von TraF1 und TraF2. Die Reifung und Zyklisierung der TrbC ähnlichen Proteine findet aufgrund der Ähnlichkeit des Erkennungsmotivs für TraF (AEIA) wahrscheinlich auch in anderen Transportsystemen statt. So findet sich dieses Motiv auch in PtIA, dem Pilingen des *B. pertussis* toxin operons und den virB2 analogen Genen von *Brucella suis* und *Brucella abortus*, was darauf schließen lässt, dass eine vergleichbare Reaktionskaskade abläuft (Kalkum et. al., 2002). Auch in TrbC1 und TrbC2 finden sich entsprechende Sequenzmotive und diese Reaktionen könnten deshalb analog stattfinden und einen Pilus ausbilden.

4.2.2. Der „entry exclusion factor“ TrbK

TrbK stellt eine Ausnahme innerhalb der *Mpf* Komplex Gene dar, denn es ist nicht direkt notwendig für die Konjugation. Dieses Protein zeichnet sich dadurch aus, dass es eine weitere Aufnahme von Plasmiden in die Rezipientenzelle verhindert wird, wenn bereits ein Plasmid enthalten ist. TrbK von RP4 befindet sich an der inneren Zellmembran und verhindert möglicherweise die Bildung eines DNA durchlässigen Kanals in der Hülle der aufnehmenden Zelle (Haase et. al., 1996). Bei IncP α

Plasmiden ist dieser Schutzmechanismus besser geeignet eine Aufnahme von RP2 bzw. RP4 Plasmiden zu verhindern als gegen das IncP β Plasmid R751, was eine Spezialisierung dieser Komponente bedeuten könnte (Haase et. al., 1996).

Die zwei in *L.p. Corby* gefundenen Gene *trbK1* und *trbK2* unterscheiden sich untereinander mehr als die restlichen *trb* Genen im Vergleich möglicherweise weist dies darauf hin, dass *TrbK1* nicht vor *TrbK2* Aufnahme schützt.

4.3. Der „coupling factor“ TraG

Ein TraG ähnliches Protein ist die einzige Komponente des RP4 Systems, das neben den *Mpf* Proteinen notwendig ist, um das nicht selbst transferierbares IncQ Plasmid RSF1010 zu mobilisieren. (Bejersbergen et. al., 1992; Cabezón et. al., 1994; Lessl et. al., 1993) Ebenso sind TraG Proteine essentielle Bestandteile von Typ IV Sekretionssystemen (Christie, 2001). Aufgrund verschiedener genetischer Experimente (Cabezón et. al., 1997; Lessl et. al., 1993; Hamilton et. al., 2000) und biochemischer Daten (Diqué-Kochem et. al., 1997; Szpirer et. al., 2000; Pansegrau et. al., 1996) lässt sich darauf schließen, dass die Funktion TraG ähnlicher Proteine die Verbindung des *Mpf* Systems mit dem DNA Prozessierungssystem *Dtr* („DNA transfer and replication“) ist. TraG ähnliche Proteine enthalten zwei Aminosäuresequenzmotive, ein Typ A und Typ B Nukleotidbindungsmotiv, das in NTP Hydrolasen und ABC Transportern zu finden ist (Lessl et. al., 1992 a.; Llosa et. al., 1994; Schneider et. al., 1998). Diese Motive sind essentiell für die Transferaktivität des RP4 Systems (Balzer et. al., 1994), für Motiv A konnte zudem eine aktive Nukleotidbindung nachgewiesen werden (Moncalián et. al., 1999). Die in *L.p. Corby* enthaltenen Gene *TraG1* und *TraG2* zeigen diese Motive in vergleichbarer Form.

4.4. Gene des “DNA transfer and replication“ Systems

4.4.1. Die Relaxase Tral

Für die Relaxase Tral des Plasmids RP4 können drei Aminosäuresequenzmotive identifiziert werden, die für die Aktivität erforderlich sind (Pansegrau et. al., 1994 b).

Diese Motive I bis III sind in den N-terminalen Regionen von analogen Proteinen verschiedener DNA Transfersystemen konserviert, wie in dem Protein VirD2 der Ti/Ri Plasmide, NikB des Plasmids R64, Rlx des *S. aureus* Plasmids pS194 oder die Proteine pC221, pC223 und MobA von dem *Thiobacillus ferrooxidans* Plasmid pTF-FC2 (Ilyina et. al., 1992; Pansegrau et. al., 1991; Pansegrau et. al., 1994 b)

Die Funktion der Aminosäuren dieser Motiven ist die DNA Einzelstränge von einander zu trennen und wieder zusammenzuführen, was für den Beginn und das Ende der DNA Übertragung während der Konjugation entscheidend ist. (Pansegrau et. al., 1994 b). Für jedes einzelne Motiv kann eine spezifische Funktion zugeordnet werden. So enthält Motiv I an Stelle 22 der Aminosäuresequenz Tyrosin, das während der Strangtrennung mit dem 5' Phosphat des Kohlenstoffs an der „*nick site*“ des oriT reagiert und einen Phosphodiester mit seiner aromatischen Hydroxylgruppe ausbildet (Pansegrau et. al., 1993). Motiv II ist möglicherweise an der Erkennung und Bindung der „*nick region*“ des oriT beteiligt. Schließlich ist Motiv III wahrscheinlich an der Erleichterung der Strangtrennungsreaktion durch Protonenentzug an der Hydroxylgruppe des Tyrosins 22 durch das Histidin an Stelle 116 beteiligt (Balzer, 1994). Die in *L.p. Corby* gefundenen Tral analogen Gene *tral1* und *tral2* enthalten die Motive I bis III in der postulierten konservierten Form und erfüllen deshalb wahrscheinlich den gleichen Zweck.

4.4.2. Das Relaxosom

Für die Herstellung der zu übertragenden Einzelstrang DNA bildet sich als erster Schritt ein sogenanntes „*Relaxosom*“. Dieses Nukleoproteinmolekül entsteht in einer bestimmten Reaktionsfolge, zunächst bindet das TraJ Protein an die 19 bp lange invertiert wiederholte Nukleotidsequenz des oriT. Diese Bindung erfolgt asymmetrisch durch die Erkennung einer 10bp langen Palindromsequenz (srj) in der rechten Hälfte der unvollständig wiederholten Sequenz (Ziegelin et. al., 1989).

Daraufhin erfolgt die Bindung der Relaxase Tral an den TraJs_{rj} Komplex. Dies geschieht möglicherweise durch Protein-Protein Wechselwirkung von TraJ und Tral und der Erkennung einer 6 bp langen Sequenz der *nic* Region (Pansegrau & Lanka

1996). Die *nic* region wurde dadurch entdeckt, dass sie für die Trennung der DNA Stränge notwendig ist und bei unterschiedlichen Konjugationssystemen analog vorhanden ist (Pansegrau & Lanka 1991; Waters et. al., 1991). Für den Komplex aus TraJ, Tral und oriT DNA konnte gezeigt werden, dass spezifisch an der *nic* Region die Strangtrennung stattfindet (Pansegrau et. al., 1990). Das 59 bp lange Ende des T-Strangs wird kovalent an Tral geknüpft (Pansegrau et. al., 1990; Waters et. al., 1991). Die Proteine TraH und TraK sind ebenfalls an der Bildung des „Relaxosoms“ beteiligt. Das saure Protein TraH stabilisiert durch Protein-Protein Wechselwirkung den TraJ-Tral Komplex, ohne eine Bindung mit der DNA einzugehen (Pansegrau & Lanka, 1996). TraK ist ein basisches Protein, das mit oriT dadurch reagiert, dass es eine 180 bp lange Region, *srk* genannt, bindet (Ziegelin et. al., 1992). Wenn vermehrt TraK Moleküle vorhanden sind, erhöht sich der Anteil an Plasmiden mit getrennten DNA Strängen an der *nic* Region (Fürste et. al., 1989; Waters et. al., 1991). Allerdings inhibieren mehr als 30 Moleküle TraK pro DNA die Relaxierung der Stränge (Ziegelin et. al., 1991). *TraK2* ist durch eine Insertion inaktiviert, was vielleicht diesen inhibierenden Effekt ausgleicht und in *L.p.* Corby dafür sorgt, dass beide Elemente mobil bleiben.

4.5. Virulenzfaktor mutT?

In Trb1 befindet sich zwischen der möglichen Topoisomerase TraC1 und den Leserahmen für die Mobilisierungsgene ein Leserahmen der für ein MutT ähnliches Protein kodiert. Als Teil des GO Systems bei *E.coli* verhindert MutT den mutagenen Effekt von 8-oxo-GTP, das bei der DNA Replikation entsteht (Maki & Sekiguchi 1992). Die Inaktivierung des *mutT* Gens führt zu einem Anstieg A-T/G-C Transversion (Yanofsky et. al., 1966). MutT ist nicht assoziiert mit anderen Proteinen, einschließlich des Replikationskomplexes (Bhatnagar et. al., 1991), es ist nicht an der Reparatur oder Rekombination nach der Replikation beteiligt (Cox, 1976).

In *L. pneumophila* ist ein MutT ähnliches Protein nachgewiesen, NudA, dessen Ausschaltung *in vitro* und *in vivo* zu einer signifikanten Reduzierung der Virulenz führt. So wächst die *nudA* Mutante in kleineren Kolonien, besitzt eine bessere Salz resistenz und zeigt bei 25°C eine geringere Wachstumsgeschwindigkeit.

In Infektionsversuchen mit Makrophagen zeigt die Mutante im Vergleich zum Wildtyp eine geringere Aufnahme rate, ebenso bei Infektionsversuchen mit Meerschweinchen (Edelstein et. al., 2005). Die Rolle des neu gefundenen möglichen MutT Analogon

bleibt zu definieren, wahrscheinlich erfüllt es eine ähnliche Funktion indem es DNA stabilisiert und *L.p. Corby* eine erhöhte Umweltresistenz verleiht.

4.6. Verbreitung der *trb/tra* Region

Die Analyse der Verbreitung von vier Typ IV Sekretionssystemen in *Legionellaceae* zeigt, dass keiner der untersuchten Stämme alle Systeme gleichzeitig enthält. Außer bei *L.p. Corby* und *L.p. S13* sind bei den *trb/tra* positiven Stämmen nicht zwei Systeme der Genominseln Trb1 und Trb2 vorhanden. Somit bleibt zu prüfen, ob diese Typ IV Sekretionssysteme einer Inkompatibilität unterliegen und wie sich dieser Unterschied in der genetischen Ausstattung erklären lässt. Es weist *L. jordanis* und die Trb1 Genominsel auf, hingegen *L.p. 640*, *L.p. AA100*, *L. gormanii*, *L. dumoffii* und *L. anisa*, wahrscheinlich das Sekretionssystem aus Trb2. Außerdem besitzen von den untersuchten Legionellastämmen mehr *L. non-pneumophila* Stämme das *trb/tra* System, als *L. pneumophila* Stämme. Welche phylogenetische Bedeutung dies hat kann noch weiterführend untersucht werden.

Die Untersuchung ob weitere *Legionella*-stämme das Typ IV Sekretionssystem der Pathogenitätsinsel von *L.p. Philadelphia 1* enthalten führt zu dem Ergebnis, dass *L. erythra* und *L. anisa* ebenfalls einen *traD* homologen Bereich aufweisen, bislang wurde dieses Sekretionssystem als exklusiv für *L.p. Philadelphia 1* angesehen (Brassinga et. al., 2003).

4.7. Mögliche Funktionalität des *trb/tra* Systems

Alle essentiellen Gene eines Konjugationssystems sind in den Genominseln Trb1/2 von *Legionella pneumophila* Corby vorhanden. Hinweise auf Funktionalität des *trb/tra* Systems ergeben sich aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen, bei denen an Wildtyp Zellen im Gegensatz zu Zellen bei denen das „*coupling protein*“ traG oder trbI ausgeschaltet sind, mögliche Konjugationspili identifizierbar sind. Zum anderen wird ein Plasmid, das keine Gene zur Mobilisierung besitzt, durch Einbringung der Region traHIJK mit oriT aus Trb1 zwischen *E.coli* Zellen übertragen. Weitergehende Untersuchungen bestätigen dieses Ergebnis, in Konjugationsversuchen zeigt sich, dass das nicht mobilisierbare Plasmid pBC KS nach Insertion der traHIJK-oriT Region aus Trb1 von *L.p. Corby* in den Rezipientenstamm *L.p. JR32* übertragen wird (Glöckner et. al., 2007). Die bislang in *Legionella pneumophila* bekannten Transportsysteme *Ivh* und *dot/icm* sind auch an DNA Konjugation beteiligt und einige

Komponenten sind zwischen den Systemen austauschbar (Segal et. al., 1999a). Es wurde vorgeschlagen, dass diese beiden Systeme jeweils bei unterschiedlichen Temperaturen optimal funktionieren (Ridenour et. al., 2003). Auch das *trb/tra* System von *L.p.* Corby könnte bei bestimmten Umweltbedingungen seine Funktion entfalten und durch die Möglichkeit DNA zu transferieren oder sogar Proteine zu exportieren einen Adaptionsmechanismus darstellen. Im Anschluss an diese Arbeit, nachdem das Genom von *L.p.* Corby vollständig sequenziert vorliegt, ergaben sich weitere Ergebnisse. Die Genominsel Trb1 ist demnach in ein tRNA_{Pro} kodierendes Gen *lpc2778* integriert, Trb2 befindet sich in dem tmRNA Gen *lpc0163*, ersetzt somit die Position des *lvh* Systems von *L.p.* Paris. Beide Genominseln können aus dem Chromosom springen und eine ringförmige Struktur bilden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die gesamte Trb1 Region von *L.p.* Corby nach *L.p.* JR32 durch Konjugation übertragen wird und sich an der gleichen Stelle integriert (Glöckner et. al., 2007).

Ein Mechanismus, bei dem ein 30 kb großes instabiles Element aus dem Chromosom springt und sich als „*high-copy*“ Plasmid repliziert ist in *L.p.* Olda beschrieben. Wenn dieses Element in das Chromosom integriert ist resultiert ein virulenter Phänotyp. Bei Vorliegen des Elements als Plasmid resultiert daraus ein Phänotyp mit einem modifizierten Lipopolysaccharid-O-Antigen Epitop, was verminderte Virulenz zur Folge hat (Lüneberg et. al., 2001).

Ob eine Änderung der Virulenz von *L.p.* Corby stattfindet wenn, Trb1 und/oder Trb2 das Chromosom verlassen bleibt noch zu zeigen.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde in *Legionella pneumophila* Corby ein bislang nicht in *L. pneumophila* beschriebener Bereich im Genom kloniert und sequenziert, der für ein putatives Konjugations- Typ IV Sekretionssystem kodiert.

Alle für ein Typ IV Sekretionssystem notwendigen Gene sind vorhanden. Zum einen kodieren diese ein „*mating pair formation*“ System, also Proteine für die Pilusgenese und energieabhängigen Transport von Substraten aus der Bakterienzelle. Zum anderen finden sich Gene, deren Proteine ein „*Relaxosom*“ bilden und damit DNA duplizieren und für die Ausschleusung aus der Zelle bereitstellen können. Bei vergleichenden elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Mutanten, deren *trb/tra* Gene ausgeschaltet sind und Wildtyp *L.p. Corby* finden sich zwar wenige, aber mögliche Typ IV Pili auf der Oberfläche. Konjugationsexperimente zeigen, dass es sich bei den „*DNA transfer and replication*“ Genen *trb/tra* System um einen funktionierenden Mechanismus zur Mobilisierung von DNA handelt.

Für alle untersuchten Gene finden sich die entsprechenden Sequenzmotive von Typ IV Sekretionssystemelementen, insbesondere zeigt der direkte Vergleich mit dem Sekretionssystem des IncP β Plasmid R751 von *Enterobacter aerogenes* eine große Ähnlichkeit. Der Vergleich mit der verfügbaren Genomsequenz von *L.p. Philadelphia1*, *L.p. Paris* und *L.p. Lens* erbringt nicht für alle Gene ein homologes Element, aber für einige scheinen Gene aus dem *lvh*-System entsprechend zu sein, allerdings mit geringerem Anteil identischer Aminosäuren als zu den Proteinen von pR751. Bei Untersuchungen zur Verbreitung dieses Systems und Vergleich zu den bekannten Typ IV Transportsystemen zeigt sich, dass das *trb/tra* System bei 3/18 *L. pneumophila* und bei 6/15 non- *pneumophila* Stämmen gefunden werden kann. Bei keinem der untersuchten Stämme, außer bei *L. dumoffii* und *L.p. AA100* ist das *trb/tra* System zusammen mit dem *lvh*-System vorhanden und bei keinem untersuchten Stamm außer *L.p. Corby* und *L.p. S13* lassen sich Trb1 und Trb2 Elemente zusammen nachweisen. Nach Abschluß dieser Arbeit zeigte sich, dass das *trb/tra* System in zwei Genominseln in *L.p. Corby* enthalten ist und dass beide aus dem Chromosom springen und eine ringförmige Struktur ausbilden können. Ebenso konnte eine Übertragung dieser genetischen Elemente zwischen *L. pneumophila* bewiesen werden. Welche Auswirkung dies auf die Virulenz des Erregers hat bleibt noch zu zeigen.

6. Literatur

- Abu Kwaik Y., Gao LY, Stone BJ, Venkataraman C, Harb OS. (1998)
Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis.
Appl. Environ. Microbiol. **64** (9): 3127-33
- Alli OAT., Gao LY., Pedersen LL., Zink S., Radulic M., Doric M., Abu Kwaik Y. (2000)
Temporal pore formation-mediated egress from macrophages and alveolar epithelial cells by *Legionella pneumophila*.
Infect. Immun. **68**: 6431-40
- Alt-Mörbe J, Stryker JL, Fuqua C, Li PL, Farrand SK, Winans SC. (1996)
The conjugal transfer system of *Agrobacterium tumefaciens* octopine-type Ti plasmids is closely related to the transfer system of an IncP plasmid and distantly related to Ti plasmid vir genes.
J. Bacteriol. **178**: 4248-4257
- Aravind L, Leipe DD, Koonin EV. (1998)
Toprim--a conserved catalytic domain in type IA and II topoisomerases, DnaG-type primases, OLD family nucleases and RecR proteins.
Nucleic Acids Res. **26**: 4205-13
- Atlas, RM. (1999)
Legionella: from environmental habitats to disease pathology, detection and control.
Environ. Microbiol. **1**: 283-293
- Bachman MA, Swanson MS. (2001).
RpoS cooperates with other factors to induce *Legionella pneumophila* virulence in the stationary phase.
Mol. Microbiol. **40**:1201–1214
- Bachman MA, Swanson MS. (2004)
Genetic evidence that *Legionella pneumophila* RpoS modulates expression of the transmission phenotype in both the exponential and the stationary phase.
Infect. Immun. **72**: 2468–2476
- Baltch AL, Bopp LH, Smith RP, Michelsen PB, Ritz WJ. (2005)
Antibacterial activities of gemifloxacin, levofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin and erythromycin against intracellular *Legionella pneumophila* and *Legionella micdadei* in human monocytes
J. Antimicrob. Chemotherapy **56**: 104–109
- Balzer D, Pansegrau W, Lanka E. (1994)
Essential motifs of relaxase (Tral) and TraG proteins involved in conjugative transfer of plasmid RP4.
J. Bacteriol. **176**:4285–4295

- Baron C, Thorstenson YR, Zambryski PC. 1997:
The lipoprotein VirB7 interacts with VirB9 in the membranes of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **179**: 1211-1218.
- Beaupré CE, Bohne J, Dale EM, Binns AN. (1997)
Interactions between VirB9 and VirB10 membrane proteins involved in movement of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plant cells.
J. Bacteriol. **179**: 78-89.
- Beijersbergen A, Den Dulk-Ras A, Schilperoort RA, Hooykaas PJJ. (1992)
Conjugative transfer by the virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*.
Science **256**: 1324–1327
- Bender L, Ott M, Debes A, Rdest U, Heesemann J, Hacker J. (1991)
Distribution, expression, and long-range mapping of legiolysin gene (*lly*)-
specific DNA Sequences in *legionellae*.
Infect. Immun. **59**: 3333-3336
- Bhatnagar SK, Bullions LC, Bessman MJ. (1991)
Characterization of the mutT nucleotide triphosphatase of *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem. **266**:9050-9054
- Binns AN, Beaupre CE, Dale EM. (1995)
Inhibition of VirB-mediated transfer of diverse substrates from *Agrobacterium tumefaciens* by IncQ plasmid RSF 1010.
J. Bacteriol. **177**: 4890-4899
- Brassinga AKC, Hiltz MF, Sisson GR, Morash MG, Hill N, Garduno E, Edelstein PH, Garduno RA, Hoffman PS (2003)
A 65-Kilobase Pathogenicity Island Is Unique to Philadelphia-1 Strains of *Legionella pneumophila*
J. Bacteriol. **185**: 4630 - 4637
- Black MT. (1993)
Evidence that the catalytic activity of prokaryote leader peptidase depends upon the operation of a serine-lysine catalytic dyad.
J. Bacteriol. **175**: 4957–4961
- Bandyopadhyay P, Liu S, Gabbai CB, Venitelli Z, Steinman HM. (2006)
Environmental Mimics and the Lvh Type IVA Secretion System Contribute to Virulence-related Phenotypes of *Legionella pneumophila*
Infect. Immun 10.1128/IAI.00956-06
- Bellinger-Kawahara C, Horwitz MA. (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**: 1201

- Bullock O, Fernandez JM, Short JM. (1987)
 XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA E.coli* strain with beta-galactosidase selection.
Biotechniques. **5**: 376-378
- Byrd DR, Matson SW. (1997)
 Nicking by transesterification: the reaction catalysed by a relaxase.
Mol. Microbiol. **25**: 1011-1022
- Cabezón E, Lanka E, de la Cruz F. (1994)
 Requirements for mobilization of plasmids RSF1010 and ColE1 by the IncW plasmid R388: *trwB* and RP4 *traG* are interchangeable.
J. Bacteriol. **176**:4455–4458
- Cabezón E, Sastre JI, de la Cruz F. (1997)
 Genetic evidence of a coupling role for the TraG protein family in bacterial conjugation.
Mol. Gen. Genet. **254**:400–406
- Calvin NM, Hanawalt PC (1988)
 High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation.
J. Bacteriol. **170**: 2796 - 2801
- Chen J, de Felipe KS, Clarke M, Lu H, Anderson OR, Segal G, Shuman HA. (2004)
Legionella Effectors That Promote Nonlytic Release from Protozoa
Science **303**: 1358 - 1361
- Christie PJ, Ward JE, Winans SC, Nester EW. (1988)
 The *Agrobacterium tumefaciens* *virE2* gene product is a single stranded DNA binding protein that associates with T-DNA.
J. Bacteriol. **170**: 2659-2667
- Christie PJ. (2001)
 Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines.
Mol. Microbiol. **40**:294–305
- Ciancotto NP. (2001)
 Pathogenicity of *Legionella pneumophila*.
Int. J. Med. Microbiol. **291**: 331-43
- Cirillo SLG, Bermudez LE, El-Etr SH, Duhamel GE, Cirillo YD. (2001)
Legionella pneumophila entry gene *rtxA* is involved in virulence.
Infect. Immun. **69**: 508-17
- Coers, J., Kagan JC, Matthews M, Nagai H, Zuckman DM, Roy CR. (2000)
 Identification of Icm protein complexes that play distinct roles in the biogenesis of an organelle permissive for *Legionella pneumophila* intracellular growth.
Mol. Microbiol. **38**:719–736

- Cox EC. (1976).
Bacterial mutator genes and the control of spontaneous mutation.
Annu. Rev. Genet. **10**:135-156
- Cui Y, Chatterjee A, Liu Y, Dumenyo CK, Chatterjee AK. (1995)
Identification of a global repressor gene, *rsmA*, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* that controls extracellular enzymes, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone, and pathogenicity in soft-rotting *Erwinia* spp.
J. Bacteriol. **177**:5108-5115
- Das A, Xie Y.-H. (2000):
The *Agrobacterium* T-DNA transport pore proteins VirB8, VirB9, and VirB10 interact with one another.
J. Bacteriol. **182**: 758-763
- Dang T. A., Zhou X.-R. , B. Graf B. , Christie PJ. (1999):
Dimerization of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB4 ATPase and the effect of ATP-binding cassette mutations on the assembly and function of the T-DNA transporter.
Mol. Microbiol. **32**: 1239-1253.
- Daugelavius R. (1997)
The IncP plasmid encoded cell envelope-associated DNA transfer complex increases cell permeability.
J. Bacteriol. **179**: 5195-5202
- DebRoy S, Aragon V, Kurtz S, Cianciotto NP. (2006)a
Legionella pneumophila Mip, a surface-exposed peptidylproline *cis-trans*-isomerase, promotes the presence of phospholipase C-like activity in culture supernatants.
Infect. Immun. **74**: 5152-5160
- DebRoy S, Dao J, Söderberg M, Rossier O, Cianciotto NP. (2006)b
Legionella pneumophila type II secretome reveals unique exoproteins and a chitinase that promotes bacterial persistence in the lung
PNAS, 10.1073/pnas.0608279103
- Disqué-Kochem C, Dreiseikelmann B. (1997)
The cytoplasmic DNA-binding protein TraM binds to the inner membrane protein TraD in vitro.
J. Bacteriol. **179**: 6133–6137
- Dietrich C, Heuner K, Brand BC, Hacker J, Steinert M. (2001)
Flagellum of *Legionella pneumophila* Positively Affects the Early Phase of Infection of Eukaryotic Host Cells
Infect. Immun. **69**: 2116–22
- Dowling JN, Saha AK, Glew RH. (1992)
Virulence Factors of the Family *Legionellaceae*.
Microbiol. Rev. **56**: 32-60

- Duménil G, Isberg RR. (2001)
The Legionella pneumophila lcmR protein exhibits chaperone activity for lcmQ by preventing its participation in high-molecular-weight complexes.
Mol. Microbiol. **40**: 1113-27
- Duménil G, Montminy TP, Tang M, Isberg RR. (2004)
lcmR-regulated Membrane Insertion and Efflux by the *Legionella pneumophila* lcmQ Protein
J. Biol. Chem. **279**: 4686 - 4695
- Edelstein PH, Nakahama C, Tobin JO, Calarco K, Beer KB, Joly JR, Selander RK (1986)
Paleoepidemiologic investigation of Legionnaires disease at Wadsworth Veterans Administration Hospital by using three typing methods for comparison of legionellae from clinical and environmental sources.
J. Clin. Microbiol. **23**: 1121 – 1126
- Edelstein PH. (1987).
The laboratory diagnosis of Legionnaires' disease.
Semin. Respir. Infect. **2**: 235–241
- Edelstein PH. (1993)
Legionnaires' disease.
Clin. Infect. Dis. **16**: 741–749
- Edelstein PH, Hu B, Shinzato T, Edelstein MAC, Xu W, Bessman MJ. (2005)
Legionella pneumophila NudA Is a Nudix Hydrolase and Virulence Factor
Infect. Immun. **73**: 6567 - 6576
- Eisenbrandt R, Kalkum M, Lai EM, Lurz R, Kado CI, Lanka E. (1999)
Conjunctative pili of IncP plasmids, and the Ti plasmid T pilus are composed of cyclic subunits.
J. Biol. Chem. **274**: 22548-55
- Eisenbrandt R, Kalkum M, Lurz R, Lanka E (2000)
Maturation of IncP Pilin Precursors Resembles the Catalytic Dyad-Like Mechanism of Leader Peptidases
J. Bacteriol. **182**: 6751 - 6761
- Feldman M, Zusman T, Hagag S, Segal G. (2005)
Coevolution between nonhomologous but functionally similar proteins and their conserved partners in the *Legionella* pathogenesis system.
PNAS **102**: 12206-12211
- Fernandez-Moreira E, Helbig JH, Swanson MS. (2006)
Membrane Vesicles Shed by *Legionella pneumophila* Inhibit Fusion of Phagosomes with Lysosomes
Infect. Immun. **74**: 3285–3295

- Fettes PS, Forsbach-Birk V, Lynch D, Marre R. (2001)
Overexpression of the *Legionella pneumophila* homologue of the *E. coli* regulator *csrA* affects cell size, flagellation, and pigmentation.
Int. J. Med. Microbiol. **291**: 353–360
- Fields BS, Barbaree JM, Sanden GN, Morrill WE. (1990)
Virulence of a *Legionella anisa* strain associated with Pontiac fever: an evaluation using protozoan, cell culture, and guinea pig models.
Infect Immun. **58**: 3139–3142
- Fields BS. (1996)
The molecular ecology of *legionellae*.
Trends Microbiol. **4**: 286-290
- Fliermans CB. (1995)
Ecology of *Legionella*: From Data to Knowledge with a little Wisdom
Microb. Ecol. **32**: 203-228
- Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, Parkin WE, Beecham HJ, Sharrar RG, Harris J, Mallison GF, Martin SM, McDade JE, Shepard CC, Brachman PS. (1977)
Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia.
N. Engl. J. Med. **297**:1189–1197
- Fürste J P, Pansegrau W, Ziegelin G, Kroger M, Lanka E. (1989)
Conjugative Transfer of Promiscuous IncP Plasmids: Interaction of Plasmid-Encoded Products with the Transfer Origin.
PNAS **86**: 1771-1775
- Fuqua C, Winans SC. (1994)
A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium ti* plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite.
J. Bacteriol. **176**: 2796-2806
- Fuqua C, Winans SC. (1996)
Conserved cis acting promotor elements are required for density-dependent transcription of *Agrobacterium tumefaciens* conjugal transfer genes.
J. Bacteriol. **178**: 435-440
- Gao LY, Abu Kwaik Y. (1999)
Apoptosis in Macrophages and alveolar epithelial cells during early stages of infection by *Legionella pneumophila* and its role in cytopathogenicity.
Infect. Immun. **67**:862-70
- Gao LY, Abu Kwaik Y. (2000).
The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba polyphaga* by *Legionella pneumophila*.
Environ. Microbiol. **2**:79–90

- Grahn AM, Haase J, Bamford DH, Lanka E. (2000)
 Components of the RP4 Conjugative Transfer Apparatus Form an Envelope Structure Bridging Inner and Outer Membranes of Donor Cells: Implications for Related Macromolecule Transport Systems
J. Bacteriol. **182**: 1564–1574
- Garduno R, Faulkner G, Trevors M, Vats N, Hoffman P. (1998a)
 Immunolocalization of hsp60 in *legionella pneumophila*.
J. Bacteriol. **180**: 505–513.
- Garduno R, Garduno E, Hoffman P (1998b)
 Surface-associated hsp60 chaperonin of *legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model.
Infect. Immun. **66**:4602–4610.
- Glick TH, Gregg MB, Berman B, Mallison G, Rhodes WW, Kassanoff I Jr. (1978).
 Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department. I. Clinical and epidemiologic aspects.
Am. J. Epidemiol. **107**:149–160
- Glöckner G, Albert-Weissenberger C, Weinmann E, Jacobi S, Schunder E, Steinert M, Hacker J, Heuner K. (2007)
 Identification and characterization of a new conjugation/type IVA secretion system (trb/tra) of *Legionella pneumophila* Corby localized on two mobile genomic islands.
Int. J. Med. Microbiol.; [Epub ahead of print]
- Haase J, Lurz A, Grahn M, Bamford DH, Lanka E. (1995)
 Bacterial conjugation mediated by plasmid RP4: RSF 1010 mobilization, donor specific phage propagation, and pilus production require the same Tra2 core components of a proposed DNA transport complex.
J. Bacteriol. **177**: 4779-4791
- Haase J, Kalkum M, Lanka E. (1996)
 TrbK, a small cytoplasmatic membrane lipoprotein, functions in entry exclusion of the IncP α plasmid RP4.
J. Bacteriol. **178**: 6720-6729
- Haase J, Lanka E. (1997)
 A specific protease encoded by the conjugative DNA transfer system of IncP and Ti plasmids is essential for pilus synthesis.
J. Bacteriol. **179**: 5728–5735
- Hamilton CM, Lee H, Li PL, Cook DM, Piper KR, von Bodman SB, Lanka E, Ream W, Farrand SK. (2000).
 TraG from RP4 and TraG and VirD4 from Ti plasmids confer relaxosome specificity to the conjugal transfer system of pTiC58.
J. Bacteriol. **182**:1541–1548

- Hammer BK, Swanson MS. (1999).
 Coordination of *Legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp.
Mol. Microbiol. **33**: 721–731
- Hammer BK, Tateda E, Swanson MS. (2002).
 A two-component regulator induces the transmission phenotype of stationary phase *Legionella pneumophila*.
Mol. Microbiol. **44**: 107–118
- Hanahan D. (1983)
 Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.
J. Mol. Biol. **166**: 557-80
- Harb OS, Venkataraman C, Haack BJ, Gao LY, Abu Kwaik Y. (1998)
 Heterogeneity in the attachment and uptake mechanisms of the Legionnaires' disease bacterium, *Legionella pneumophila*, by protozoan hosts.
Appl. Environ. Microbiol. **64**:126–132
- Hapfelmeier S, Domke N, Zambryski PC, Baron C. (2000):
 VirB6 is required for stabilization of VirB5 and VirB3 and formation of VirB7 homodimers in *Agrobacterium tumefaciens*.
J. Bacteriol. **182**: 4505-4511.
- Heuner K, Hacker J, Brand BC. (1997).
 The alternative sigma factor σ^{28} of *Legionella pneumophila* restores flagellation and motility to an *Escherichia coli* *fliA* mutant.
J. Bacteriol. **179**: 17–23
- Heuner K, Dietrich C, Skriwan C, Steinert M, Hacker J. (2002)
 Influence of the alternative σ^{28} factor on virulence and flagellum expression of *Legionella pneumophila*.
Infect. Immun. **70**: 1604-08
- Husmann LK, Johnson W. (1994)
 Adherence of *Legionella pneumophila* to guinea pig peritoneal macrophages, J774 mouse macrophages, and undifferentiated U937 human monocytes: role of Fc and complement receptors.
Infect. Immun. **60**: 5212 - 5218
- Hwang I, Li PL, Zhang L, Piper KR, Cook DM, Tate ME, Farrand SK. (1994)
 Tral, a LuxI homologue, is responsible for production of conjugation factor, the Ti plasmid N-acyl homoserine lactone autoinducer.
PNAS **91**: 4639-4643
- Ilyina TV, Koonin EV. (1992).
 Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes and archaeobacteria.
Nucleic Acids Res. **20**: 3279-3285

- Jepras RI, Fitzgeorge RB, Baskerville A. (1985)
A comparison of virulence of two strains of *Legionella pneumophila* based on experimental aerosol infection of guinea-pigs.
J. Hyg. (Lond) **95**: 29-38
- Jones AL, Shirasu K, Kado CI. (1994)
The product of the *virB4* gene of *Agrobacterium tumefaciens* promotes accumulation of VirB3 protein.
J. Bacteriol. **176**: 5255-5261.
- Kado CI. (1994)
Promiscuous DNA transfer system of *Agrobacterium tumefaciens*: role of the *virB* operon in sex pilus assembly and synthesis.
Mol. Microbiol. **12**: 17-22
- Kalkum M, Eisenbrandt R, Lurz R, Lanka E (2002)
Tying rings for sex.
*Trends Microbiol.***10**: 382-387
- King CH, Fields BS, Shotts EB Jr., White EH. (1991)
Effects of cytochalasin D and methylamine on intracellular growth of *Legionella pneumophila* in amoebae and human monocyte-like cells.
Infect. Immun. **59**: 758-63
- Simon R, Priefer U, Pühler A. (1983)
A Broad Host Range Mobilization System for *In Vivo* Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria
Bio/Technology **1**: 784-791
- Krause S, Barcena M, Pansegrau W, Lurz R, Carazo JM, Lanka E. (2000)
Sequence related protein export NTPases encoded by the conjunctive transfer region of RP4 and by the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* share similar hexameric ring structure.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**: 3067-3072
- Kumar RB, Das A. (2001):
Functional analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA transport pore protein VirB8. *J. Bacteriol.* **183**: 3636-3641.
- Lammertyn E, Van Mellaert L, Meyen E, Lebeau I, De Buck E, Anné J, Geukens N (2004)
Molecular and functional characterization of type I signal peptidase from *Legionella pneumophila*
Microbiology **150**: 1475 – 1483
- Lanka E, Wilkins BM. (1995)
DNA processing reactions in bacterial conjugation.
Annu. Rev. Biochem. **64**: 141-169.

- Lessl M, Pansegrau W, Lanka E. (1992)a
Relationship of DNA-transfer systems: essential transfer factors of plasmids RP4, Ti and F share common sequences.
Nucleic Acids Res. **20**: 6099–6100
- Lessl M, Balzer D, Lurz R, Waters V, Guiney DG, Lanka E. (1992)b
Dissection of IncP conjugative plasmid transfer definition of the transfer region Tra2 by mobilisation of the Tra1 region in trans.
J. Bacteriol. **174**: 2493-2500
- Lessl M, Lanka E. (1994)
Common mechanisms in bacterial conjugation and Ti-mediated T-DNA transfer to plant cells.
Cell **77**: 321-324
- Lessl M, Balzer D, Weyrauch K, Lanka E. (1993)
The mating pair formation system of plasmid RP4 defined by RSF1010 mobilisation and donor-specific phage propagation.
J. Bacteriol. **175**: 6415-6425
- Li PL, Everhart DM, Farrand SK (1998)
Genetic and sequence analysis of the pTiC58 *trb* locus, encoding a mating-pair formation system related to members of the type IV secretion family.
J. Bacteriol. **180**:6164-6172
- Li PL, Hwang I, Miyagi H, True H, Farrand SK (1999)
Essential components of the Ti plasmid *trb* system, a type IV macromolecular transporter.
J. Bacteriol. **181**: 5033-5041
- Liu MY, Gui G, Wei B, Preston JF 3rd, Oakford L, Yuksel U, Giedroc DP, Romeo T. (1997)
The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem. **272**:17502-17510
- Liu Y, Luo ZQ. (2006)
The *Legionella pneumophila* effector SidJ is required for efficient recruitment of endoplasmic reticulum proteins to the bacterial phagosome
Infect. Immun. 10.1128/IAI.01278-06
- Llosa M, Bolland S, de la Cruz F. (1994)
Genetic organization of the conjugal DNA processing region of the Incw plasmid R388.
J. Mol. Biol. **235**: 448–464
- Laguna RK, Creasey EA, Li Z, Valtz N, Isberg RR. (2006)
A *Legionella pneumophila*-translocated substrate that is required for growth within macrophages and protection from host cell death
PNAS **103**: 18745-18750

- Losick V, Isberg RR (2006)
NF- κ B translocation prevents host cell death after low-dose challenge by *Legionella pneumophila*
JEM **203**: 2177-2189
- Lüneberg E, Mayer B, Daryab N, Koolstra O, Zähringer U, Rohde M, Swanson J, Frosch M. (2001)
Chromosomal insertion and excision of a 30 kb unstable genetic element is responsible for phase variation of lipopolysaccharide and other virulence determinants in *Legionella pneumophila*.
Mol. Microbiol. **39**: 1259-1271
- Lynch D, Rieser N, Glogglar K, Forsbach-Brik V, Marre R. (2003).
The response regulator LetA regulates the stationary-phase stress response in *Legionella pneumophila* and is required for efficient infection of *Acanthamoeba castellanii*.
FEMS Microbiol. Lett. **219**: 241–248
- Maiwald M, Helbig JH, Lück PC. (1998)
Laboratory methods for the diagnosis of *Legionella* infections.
J. Microbiol. Methods **33**: 59–79
- Maki H, Sekiguchi M. (1992)
MutT protein specifically hydrolyzes a potent mutagenic substrate for DNA synthesis.
Nature (London) **355**: 273-275
- Mann BJ, Torian BE, Vedvick TS, Petri WAJ. (1991)
Sequence of a cysteine-rich galactose-specific lectin of *Entamoeba histolytica*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 3248–3252
- Marra A, Shuman HA. (1989)
Isolation of a *Legionella pneumophila* restriction mutant with increased ability to act as a recipient in heterospecific matings.
J. Bacteriol **171**: 2238 - 2240.
- McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, et al. (1977)
Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease.
N. Engl. J. Med. **297**: 1197–1203
- Miyamoto H, Yoshida S, Taniguchi H, Shuman HA. (2003)
Virulence Conversion of *Legionella pneumophila* by Conjugal Transfer of Chromosomal DNA
J. Bacteriol **185**: 6712 - 6718.
- Molmeret M, Horn M, Wagner M, Santic M, Abu Kwaik Y. (2005)
Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens
Appl. Environ. Microb. **71**: 20–28

- Molofsky A, Swanson MS. (2003).
Legionella pneumophila CsrA is a pivotal repressor of transmission traits and activator of replication.
Mol. Microbiol. **50**: 445–461
- Molofsky AB, Swanson MS. (2004)
 Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle.
Mol. Microbiol. **53**: 29-40
- Moncalián G, Cabezón E, Alkorta I, Valle M, Moro F, Valpuesta JM, Goni FM, de la Cruz F. (1999)
 Characterization of ATP and DNA binding activities of TrwB, the coupling protein essential in plasmid R388 conjugation.
J. Biol. Chem. **274**: 36117–36124
- Morales VM, Backman A, Bagdasarian M. (1991)
 A series of wide-host-range low-copy-number vectors that allow direct screening for recombinants
Gene **97**: 39-47
- Murga R, Forster TS, Brown E, Pruckler JM, Fields BS, Donlan RM. (2001)
 Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system.
Microbiology **147**: 3121–3126
- Nagai H, Roy CR. (2001)
 The DotA protein from *Legionella pneumophila* is secreted by a novel process that requires the *Dot/lcm* transporter.
EMBO J. **20**: 5962–5970
- Nagai H, Kagan JC, Zhu X, Kahn RA, Roy CR (2002)
 A Bacterial Guanine Nucleotide Exchange Factor Activates ARF on *Legionella* Phagosomes.
Science **295**: 679 - 682
- Neumeister B. (1996)
 Legionelleninfektionen –Epidemiologie, Diagnostik, Klinik und Pathogenese.
Clin. Lab. **42**: 715-729
- Neumeister B, Faigle M, Lauber K, Northoff H, Wesselborg S. (2002)
Legionella pneumophila induces apoptosis via the mitochondrial death pathway.
Microbiology **148**: 3639-50
- Neuwald AF, Aravind L, Spouge JL, Koonin EV (1999)
 AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes.
Genome Res. **9**: 27-43

- Ohno A, Kato N, Yamada K, Yamaguchi K. (2003)
Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water.
Appl. Environ. Microbiol. **69**: 2540–2547
- Paetzel M, Dalbey RE. (1997)
Catalytic hydroxyl/amine dyads within serine proteases.
Trends Biochem. Sci. **22**: 28-31
- Pansegrau W, Balzer D, Kruff V, Lurz R, Lanka E. (1990)
In vitro assembly of relaxosomes at the transfer origin of plasmid RP4.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**: 6555-6559.
- Pansegrau W, Lanka E. (1991)
Common sequence motifs in DNA relaxase and nick regions from a variety of DNA transfer systems.
Nucleic Acids Res. **19**: 3455
- Pansegrau W, Schröder W, Lanka E. (1993)
Relaxase (Tral) of IncPa plasmid RP4 catalyzes a site-specific cleaving-joining reaction of single-stranded DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 2925-2929
- Pansegrau W, Lanka E, Barth PT, Figurski DH, Guiney DG, Haas D, Helinski DR, Schwab H, Stanisich VA, Thomas CM. (1994) a
Complete nucleotide sequence of Birmingham IncP α plasmids. Compilation and comparative analysis.
J. Mol. Microbiol. **239**: 623-663
- Pansegrau W, Schröder W, Lanka E. (1994) b
Concerted action of three distinct domains in the DNA cleaving-joining reaction catalyzed by relaxase (Tral) of conjugative plasmid RP4.
J. Biol. Chem. **269**: 2782-2789
- Pansegrau W, Lanka E. (1996)
Mechanisms of initiation and termination reactions in conjugative DNA processing. Independence of tight substrate binding and catalytic activity of relaxase (Tral) of IncP α plasmid RP4.
J. Biol. Chem. **271**: 13068–13076
- Piper KR, Beck von Brodman S, Farrand SK. (1993)
Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction.
Nature **362**: 448-450
- Piper KR, Farrand SK. (2000)
Quorum sensing but not autoinduction of Ti plasmid conjugal transfer requires control by the opine regulon and the antiactivator TraM.
J. Bacteriol. **182**: 1080-1088

- Qin Y, Luo ZQ, Smyth AJ, Gao P, Beck von Brodman S, Farrand SK. (2000)
Quorum-sensing signal binding results in dimerization of TraR and its release from membranes into the cytoplasm.
EMBO J. **19**: 5212-5221
- Rechnitzer C. (1994)
Pathogenetic aspects of Legionnaires` disease: Interaction of *Legionella pneumophila* with cellular host defenses.
APMIS **43**: 1-43
- Rees CED, Wilkins BM. (1990)
Protein transfer into the recipient cell during bacterial conjugation: studies with F and RP4. *Mol. Microbiol.* **4**: 1199-1205.
- Retzlaff C, Yamamoto Y, Okubo S, Hoffman P, Friedman H, Klein T (1996)
Legionella pneumophila heat-shock protein-induced increase of interleukin-1 beta mRNA involves protein kinase c signalling in macrophages.
Immunology, **89**:281–288.
- Ridenour DA, Cirillo SLG, Feng S, Samrakandi MM, Cirillo JD. (2003)
Identification of a gene that affects the Efficiency of host cell infection by *Legionella pneumophila* in a temperature-dependent fashion.
Infect. Immun. **71**: 6256-63
- Rivas S, Bolland S, Cabezon E, Goni FM, de la Cruz F. (1997)
TrwD, a protein encoded by the IncW plasmid R388, displays an ATP hydrolase activity essential for bacterial conjugation.
J. Biol. Chem. **272**: 25583–25590
- Rodgers FG, Greaves PW, Macrae AD, Lewis MJ. (1980)
Electron microscopic evidence of flagella and pili on *Legionella pneumophila*.
J. Clin. Pathol. **33**:1184–1188
- Rossier O, Ciancotto NP. (2001)
Type II secretion is a subset of the PilD-dependent processes that facilitate intracellular infection by *Legionella pneumophila*.
Infect. Immun. **69**: 2092-98
- Roy, CR, Isberg RR. (1996)
Topology of *Legionella pneumophila* DotA: an Inner Membrane Protein Required for Replication in Macrophages.
Infect. Immun. **65**: 571-578
- Sagulenko E, Sagulenko V, Chen J, Christie PJ. (2001)
Role of Agrobacterium VirB11 ATPase in T-pilus assembly and substrate selection.
J. Bacteriol. **183**: 5813-5825

- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. (1988)
Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase.
Science **239**: 487-491
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989)
Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, cold Spring Harbour Laboratory Press, N.Y.
- Samrakandi MM, Cirillo SL, Ridenour DA, Bermudez LE, Cirillo JD. (2002)
Genetic and phenotypic differences between *Legionella pneumophila* strains.
J. Clin. Microbiol. **40**: 1352-1362
- Samuels AL, Lanka E, Davies JE. (2000)
Conjugative junctions in RP4-mediated mating of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. **182**: 2709–2715
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977)
DNA sequencing with chain terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**: 5463-5467
- Saraste M, Sibbald PR, Wittinghofer A. (1990)
The P-loop-a common motif in ATP- and GTP-binding proteins.
Trends Biochem. Sci. **15**: 430–434
- Saunders NA, Doshi N, Harrison TG (1992)
A second serogroup of *Legionella erythra* serologically indistinguishable from *Legionella rubrilucens*.
J. appl. bacteriol. **72**: 262-265
- Schmidt-Eisenlohr H, Rittig M, Preithner S, Baron C. (2001)
Biomonitoring of pJP4-carrying *Pseudomonas chlororaphis* with Trb protein-specific antisera.
Environ. Microbiol. **3**: 720-730
- Schneider E, Hunke S. (1998)
ATP-binding-cassette (ABC) transportsystems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains.
FEMS Microbiol. Rev. **22**: 1–20
- Schröder G, Krause S, Zechner EL, Traxler B, Yeo HJ, Lurz R, Waksman G, Lanka E. (2002)
TraG-like proteins of DNA transfer systems and of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system: inner membrane gate for exported substrates?
J. Bacteriol. **184**: 2767-2779

- Segal G, Shuman HA. (1998)
Intracellular multiplication and human macrophage killing by *Legionella pneumophila* are inhibited by conjugal components of IncQ plasmid RSF 1010.
Mol. Microbiol. **30**: 197-208
- Segal G, Russo JJ, Shuman HA. (1999a)
Relationship between a new Type IV secretion system and the *icm/dot* virulence system of *Legionella pneumophila*.
Mol. Microbiol. **34**: 799-809
- Segal G, Shuman HA. (1999b)
Legionella pneumophila utilizes the same genes to multiply within *Acanthamoeba castellanii* and human macrophages.
Infect. Immun. **67**: 2117-2124
- Söderberg MA, Rossier O, Cianciotto NP. (2004)
The type II protein secretion system of *Legionella pneumophila* promotes growth at low temperatures
J. Bacteriol. **186**: 3712–3720
- Southern EM. (1975)
Detection of specific sequences among DNA Fragments separated by gel electrophoresis.
J. Mol. Microbiol. **98**: 503-517
- Shuman HA, Horwitz MA. (1996)
Legionella pneumophila invasion of mononuclear phagocytes.
Curr. Topics Microbiol. **209**: 99-115
- Shuman HA, Purcell M, Segal L, Hales L, Wiater LA. (1998)
Intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*: A human pathogen or accidental tourist?
Curr. Top. Microbiol. Immunol. **225**: 99-112
- Stone BJ, Abu Kwaik Y. (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**:1768–1775.
- Stone BJ, Abu Kwaik Y. (1999)
Natural competence for DNA Transformation by *Legionella pneumophila* and its association with expression of type IV pili
J. Bacteriol. **181**: 1395–1402
- Strack B, Lessl M, Calendar R, Lanka E. (1992)
A common sequence motif, -E-G-Y-A-T-A-, identified within the primase domains of plasmid-encoded I- and P-type DNA primases and the α protein of the *Escherichia coli* satellite phage P4.
J. Biol. Chem. **267**: 13062-13072.

- Sturgill-Koszycki S, Swanson MS. (2000)
Legionella pneumophila replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles.
J. Exp. Med. **192**: 1261-72
- Surman BJ., Morton LHG, Keevil CW, Fitzgeorge RB, Skinner A. (2001)
Legionella pneumophila proliferation is not dependent on intracellular replication. *Legionella-Proceedings of the 5th International Symposium*.
 Marre R.; Abu Kwaik Y; Barlett C.; Ciancotto N; Fields BS; Frosch M.; Hacker J.; Lück PC.
 ASM press, Washington DC, 2001
- Swanson MS, Isberg RR. (1995)
 Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic reticulum
Infect. Immun **63**: 3609 – 3620
- Swanson MS, Fernandez-Moreira E. (2002)
 A microbial strategy to multiply in macrophages : the pregnant pause.
Traffic **3**: 170-177.
- Szpirer, C. Y., M. Faelen, M. Couturier. (2000)
 Interaction between the RP4 coupling protein TraG and the pBHR1 mobilization protein Mob.
Mol. Microbiol. **37**: 1283–1292.
- Stout JE, Yu VL. (1997)
Legionellosis.
N. Engl. J. Med. **337**: 682-688
- Thorsted PB, Macartney DP, Akhtar P, Haines AS, Ali N, Davidson P, Stafford T, Pocklington MJ, Pansegrau W, Wilkins BM, Lanka E, Thomas CM. (1998)
 Complete Sequence of the IncPβ plasmid R751; implications for the evolution and organisation of the IncP backbone.
J. Mol. Biol. **282**: 969-990.
- Thuring RW, Sanders JP, Borst P. (1975)
 A freeze-squeeze method for recovering long DNA from agarose gels.
Anal. Biochem. **66**:213-20
- van Dijl JM, de Jong A, Venema G, Bron S. (1995)
 Identification of the potential active site of the signal peptidase SipS of *Bacillus subtilis*. Structural and functional similarities with LexA-like proteases.
J. Biol. Chem. **270**: 3611–3618.
- Venkataraman C, Haack BJ, Bondada S, Abu Kwaik Y. (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**:537–547.

- Vogel JP, Andrews HL, Wong SK, Isberg RR. (1998)
 Conjugative Transfer by the Virulence System of *Legionella pneumophila*
Science **279**: 873.
- Ward, JE, Dale Jr., EM, Nester EW, Binns AN. (1990): Identification of a VirB10
 protein aggregate in the inner membrane of *Agrobacterium tumefaciens*.
J. Bacteriol. **172**: 5200-5210.
- Waters VL, Hirata KH, Pansegrau W, Lanka E, Guiney DG. (1991)
 Sequence Identity in the Nick Regions of IncP Plasmid
 Transfer Origins and T-DNA Borders of *Agrobacterium* Ti Plasmids
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **88**:1456-1460
- Winans SC, Burns DL, Christie PJ. (1996)
 Adaptation of a conjugal transfer system for the export of pathogenic
 macromolecules.
Trends Microbiol. **4**: 64-68.
- Yanofsky C, Cox EC, Horn V. (1966)
 The unusual mutagenic specificity of an *E. coli* mutator gene.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **55**: 274-281.
- Yeo HJ, Waksman G (2004)
 Unveiling Molecular Scaffolds of the Type IV Secretion System
J. Bacteriol. **186**: 1919–1926.
- Ziegelin G, Pansegrau W, Lurz R, Lanka E (1992)
 TraK Protein of Conjugative Plasmid RP4 Forms a Specialized Nucleoprotein
 Complex with the Transfer Origin
J. Biol. Chem. **267**: 17279-17266
- Ziegelin G, Pansegrau W, Strack B, Balzer D, Kroger M, Krufft V, Lanka E. (1991)
 Nucleotide sequence and organization of genes flanking the transfer origin of
 promiscuous plasmid RP4.
DNA Sequence **1**: 303-327.
- Zink SD, Pedersen L, Cianciotto NP, Abu Kwaik Y 2002
 The *dot/icm* type IV secretion system of *Legionella pneumophila* is
 essential for the induction of apoptosis in human macrophages
Infect. Immun. **70**: 1657–1663
- Zhu J, Winans SC. (1999)
 Autoinducer binding by the quorum-sensing regulator TraR increases affinity for
 target promoters in vitro and decreases TraR turnover rates in whole cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 4832-4837.
- Zusman T, Gal-Mor O, Segal G. (2002)
 Characterization of a *Legionella pneumophila relA* insertion mutant and roles
 of RelA and RpoS in virulence gene expression. *J. Bacteriol.* **184**: 67–75.

Danksagung

Diese Arbeit wurde unter der Betreuung von Herrn Dr. Klaus Heuner am Institut für molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg angefertigt. Mein ganz besonderer Dank gilt seiner äußerst engagierten Betreuung und Unterstützung. Herrn Prof. Dr. Hacker danke ich dafür, dass ich die Möglichkeit hatte an seinem Institut diese Arbeit durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. Vogel, Institut für Hygiene und Mikrobiologie danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Ebenso danke ich allen Mitarbeitern des Institutes für molekulare Infektionsbiologie für deren Hilfsbereitschaft und das kollegiale Klima.

Insbesondere sollen hier erwähnt sein: Sebastian Jacobi, Christiane Albert-Weissenberger, Frank Galka, Christoph Batzilla, Johannes Putze und Markus Wehrl. Meinen Eltern möchte ich für alles danken was sie für mich getan haben, natürlich besonders für die Unterstützung meines Studiums. Meiner Freundin Claudia danke ich für ihre ausdauernde Geduld.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Weinmann
Vorname: Erik Johannes Michael
Geburtsdatum/-ort: 21.09.1979, Dettelbach
Anschrift: Platenstr. 3
97072 Würzburg
Familienstand: ledig

Schulbildung:

09/1986 – 08/1990 Nikolaus-Fey Grundschule Wiesentheid
09/1990 – 06/1999 Landschulheim Wiesentheid
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

09/1999 – 07/2000 Evangelische Sozialstation der Diakonie in Würzburg

Hochschulbildung:

10/2000 Beginn Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
08/2002 Ärztliche Vorprüfung
08/2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2005 Praktisches Jahr
10/2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Klinische Tätigkeit:

Seit 01/2007 Neurologie im Juliusspital Würzburg (Dr. Molitor)

Würzburg, den 28.02.2008

Erik Weinmann