

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. M. Frosch

**Klonierung und Sequenzierung der zur
Lipopolysaccharid-Biosynthese
notwendigen Gene von
Legionella pneumophila
Serogruppe 1**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von:

Nicole Metter

aus Buckenhof/Erlangen

Würzburg, Januar 2003

Referent: Prof. Dr. med. M. Frosch

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. J. Hacker

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 09.07.2003

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhalt

1.	Einleitung	1
1.1	<i>Legionella pneumophila</i> : Geschichte und Epidemiologie	1
1.2	Klinik, Diagnostik, Therapie	1
1.3	Pathogenese und Virulenzfaktoren von <i>Legionella pneumophila</i>	3
1.3.1	Pathogenese	3
1.3.2	Virulenzfaktoren	4
1.4	Immunregulation	8
1.5	Das Lipopolysaccharid (LPS) von <i>Legionella pneumophila</i>	9
1.5.1	LPS-Phasenvariation bei <i>Legionella pneumophila</i> -Stämmen	9
1.6	Zielsetzung der Arbeit	10
2.	Material und Methoden	13
2.1	Material	13
2.1.1	Puffer und Lösungen	13
2.1.2	Chemikalien, Enzyme und Reaktionskits	14
2.1.3	Nährmedien und Agarplatten	16
2.1.4	Geräte und Verbrauchsmaterial	17
2.1.4.1	Meßgeräte	17
2.1.4.2	Inkubatoren, Zentrifugen und sonstige Geräte	17
2.1.4.3	Verbrauchsmaterial	18
2.1.5	Plasmide	18
2.1.6	Bakterienstämme	19
2.1.7	Oligodesoxynukleotide	23
2.2	Methoden	27
2.2.1	Methoden für das Arbeiten mit DNA	27
2.2.1.1	Agarosegelelektrophorese	27
2.2.1.2	Aufreinigung von DNA	28
2.2.1.3	Phenolisieren und Fällern von DNA	28
2.2.1.4	Schnellmethode zur Isolierung von Plasmid-DNA (Birnboim und Doly, 1979)	28
2.2.1.5	Mini-, Midi- und Maxi-Präparation von Plasmid-DNA	29

2.2.1.6	Präparation chromosomaler Bakterien-DNA mit der Tischultrazentrifuge	29
2.2.1.7	Schnell-Präparation chromosomaler Bakterien-DNA	30
2.2.1.8	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	31
2.2.1.9	Digoxigenin-Markierung von DNA-Sonden	31
2.2.2	Klonierungsmethoden	32
2.2.2.1	Restriktionsverdau	32
2.2.2.2	Dephosphorylierung von DNA-5'-Enden	32
2.2.2.3	5'-Phosphorylierung von DNA	33
2.2.2.4	Ligation	33
2.2.3	Vorbereitung von Bakterienzellen für Elektroporationen (Böttger, 1988)	33
2.2.4	Elektroporation (Böttger, 1988; Calvin und Hanawalt, 1988)	33
2.2.5	Colony Blot für DNA-DNA-Hybridisierungen (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	34
2.2.6	Hybridisierung mit DIG-markierten DNA-Sonden	34
2.2.7	Stripping von DNA-Blots	35
2.2.8	Southern Blot (Southern, 1975)	35
2.2.9	PCR	36
2.2.9.1	PCR (Saiki <i>et al.</i> , 1988)	36
2.2.9.2	PCR-Aufreinigung	37
2.2.10	Sequenzierung (Sanger <i>et al.</i> , 1977)	37
2.2.11	Konservierung von Bakterienstämmen	37
2.2.12	Kultur von Legionellen	38
3.	Ergebnisse	39
3.1	Identifizierung der Mutation in einem LPS-Synthese-Gen der Mutante 137 von <i>Legionella pneumophila</i> Sg 1	39
3.2	Klonierung von LPS-Biosynthese-Genen von <i>Legionella pneumophila</i> Sg1 Stamm RC1	41

3.2.1	Erstellung einer Genbank des <i>Legionella pneumophila</i> Stammes RC1	41
3.2.2	Präparation von DNA-Sonden	42
3.2.3	DNA-Hybridisierung von Colony Blots	43
3.2.4	Charakterisierung der isolierten Klone	44
3.2.5	Sequenzanalyse der klonierten DNA Fragmente	47
3.2.6	Homologien der ermittelten Leserahmen der genomischen Sequenzen des Stammes RC1	49
3.3	Sequenzanalyse der Mutante 811	57
3.4	Verteilung von LPS-Biosynthese-Genen in der Gattung <i>Legionella</i>	59
3.4.1	Erstellung von Gensonden	59
3.4.2	Southern Blot-Hybridisierungen	59
4.	Diskussion	63
4.1	Phänotypische LPS-Variation bei <i>Legionella pneumophila</i>	63
4.2	LPS-Biosynthese-Gene von <i>Legionella pneumophila</i>	64
4.3	Der molekulare Mechanismus der Phasenvariation bei <i>Legionella pneumophila</i>	68
5.	Zusammenfassung	70
6.	Anhang	71
6.1	Abkürzungen	71
6.2	Literatur	73

1. Einleitung

1.1 *Legionella pneumophila*: Geschichte und Epidemiologie

Im Juli 1976 traten während einer Versammlung der „Amerikanischen Legion“, dem Veteranenverband der USA, im Bellevue-Stratford-Hotel in Philadelphia, unter den Teilnehmern 182 Fälle einer akuten Pneumonie auf, die in 29 Fällen tödlich verlief. Als Erreger dieser Erkrankung, die als Legionärskrankheit bezeichnet wurde, konnte durch Isolation aus dem Lungengewebe verstorbener Patienten ein kleines, pleomorphes, gramnegatives Stäbchenbakterium durch das „Center for Disease Control“ in Atlanta identifiziert werden. Dieses Bakterium wurde später *Legionella pneumophila* benannt (Rechnitzer, 1994). Inzwischen umfasst die Gattung *Legionella* insgesamt 40 Spezies. Darunter spielt *Legionella pneumophila* als Erreger von etwa 90% aller Legionellose-Erkrankungen die wichtigste Rolle, gefolgt von *Legionella micdadei*. Unter den 14 bekannten Serogruppen von *Legionella pneumophila* dominiert die Serogruppe 1 (Sg 1) mit einem Anteil von 80% an allen Erkrankungen (Stout und Yu, 1997).

Die Infektion mit Legionellen erfolgt durch Inhalation eines Legionellenhaltigen Aerosols oder durch Mikroaspiration von kontaminiertem Wasser. Das Erregerreservoir der Legionellen stellt vorwiegend die öffentliche Wasserversorgung dar, durch die Vermehrung der Bakterien in den im Wasser lebenden Protozoen. Die Infektion erfolgt dann beispielsweise über Klimaanlage, Duschen oder medizinische Verneblergeräte (Stout und Yu, 1997, Neumeister, 1996).

1.2 Klinik, Diagnostik, Therapie

Die Bandbreite der Manifestationen einer Legionelleninfektion reicht von einer leichten grippeähnlichen fieberhaften Erkrankung, bis zur fulminanten Pneumonie mit respiratorischer Insuffizienz und Multiorganversagen (Stout und Yu, 1997). Die grippeähnliche Infektionserkrankung wird nach dem Ort ihres ersten Auftretens in Pontiac/Michigan als Pontiac-Fieber bezeichnet. Nach

einer Inkubationszeit von ein bis zwei Tagen entwickelt sich eine akute fieberhafte Erkrankung, die ohne pneumonisches Infiltrat und selbstlimitierend verläuft (Dowling *et al.*, 1992, Kayser *et al.*, 1993). Als typische Manifestation der Legionelleninfektion ist die Pneumonie zu sehen. Bei konsequenter Testung findet man Legionellen unter den vier häufigsten Erregern der ambulant erworbenen Pneumonien, jedoch auch im Rahmen von schwer verlaufenden nosokomialen Infektionen. Zu den allgemeinen Krankheitssymptomen zählen Fieber, ein trockener Husten sowie Myalgien. An weiteren Symptomen finden sich in 20-40% wässrige Diarrhoen, neurologische Symptome, Leber- und/oder Nierenversagen und bei älteren Patienten häufig Bradykardien. Die häufigste extrapulmonale Manifestation im Rahmen einer Bakteriämie betrifft vor allem das Herz als Myo-, Peri- oder Endokarditis (Stout und Yu, 1997, Rechnitzer, 1994). Als Risikofaktoren für eine manifeste Legionelleninfektion sind das Rauchen, chronische pulmonale Erkrankungen, sowie eine vorbestehende Immunschwäche, beispielsweise durch eine Corticoidtherapie, zu nennen (Stout und Yu, 1997).

Die Diagnostik der Legionelleninfektion umfasst die Bereiche Mikroskopie und kultureller Nachweis, den serologischen und molekularbiologischen Antigennachweis, sowie den Antikörpernachweis. Den Goldstandard der Legionellendiagnostik stellt der kulturelle Erregernachweis dar, wobei die Anzucht des über das Sputum des Patienten gewonnenen Erregermaterials auf einem speziellen Hefeextrakt-Aktivkohle-Agar erfolgt. Der Nachweis von Legionellen-Antigen im Urin mittels ELISA oder Latexagglutination beinhaltet eine Sensitivität von 70% und eine Spezifität von nahezu 100%, und ist zudem eine schnelle und kostengünstige Testmethode. Der gängige Routinetest der serologischen Legionellen-Diagnostik ist die indirekte Immunfluoreszenz. Als signifikant wird hierbei ein vierfacher Titeranstieg auf 1:128 gewertet. Die Serokonversion erfolgt bei etwa 50% der Patienten innerhalb von 14 Tagen nach den ersten klinischen Symptomen (Stout und Yu, 1997, Neumeister, 1996). In der Therapie der Legionelleninfektion ist das Makrolid Erythromycin das Antibiotikum der ersten Wahl. Eine Kombination aus Erythromycin und Rifampicin wird vor allem für immunsupprimierte Patienten empfohlen. Inzwischen werden häufig auch andere Makrolide wie Azithromycin oder

Clarithromycin aufgrund ihrer guten Verträglichkeit und Wirksamkeit eingesetzt. Typisch für die Legionellenpneumonie ist die lange Rekonstitutionsphase des Patienten, die etwa zwei bis drei Monate beträgt (Stout und Yu, 1997, Neumeister, 1996).

1.3 Pathogenese und Virulenzfaktoren von *Legionella pneumophila*

1.3.1 Pathogenese

In ihrer natürlichen wässrigen Umgebung leben Legionellen als Parasiten in Protozoen, darunter 13 Amöbenarten und 2 Arten von Ziliaten (Fields, 1996). Beim Menschen erfolgt die Aufnahme der Legionellen zumeist in Form eines Aerosols über die Lunge. Dort werden sie von Alveolarmakrophagen und zum Teil auch von neutrophilen Granulozyten phagozytiert. Histopathologisch bietet sich zu diesem Zeitpunkt das Bild einer eitrigen Pneumonie, bei der die Alveolen mit Neutrophilen, Makrophagen, Fibrin und Erythrozyten angefüllt sind. Die Fähigkeit der Legionellen zur Invasion und Replikation in Wirtszellen stellt den entscheidenden Faktor der Pathogenität dar. (Neumeister, 1996).

Die Adhäsion der Bakterien an die Alveolarmakrophagen erfolgt über die Komplementkomponenten C3b und C3bi, die an eine Untereinheit des major outer membrane protein (MOMP) der Legionellen binden. Hierdurch sind die Bakterien in der Lage, an die Komplementrezeptoren CR1 und CR3 der Makrophagen zu binden. Diese Bindung induziert die Aufnahme der Legionellen durch Phagozytose in die Wirtszellen (Shuman und Horwitz, 1996). Um die intrazelluläre Vermehrung zu sichern, erfolgt eine Hemmung der Phagosom-Lysosom-Fusion. Das Phagosom wird nicht angesäuert und es findet kein „oxidative burst“ statt, das heißt es werden keine intrazellulären Sauerstoffradikale produziert. Als wichtige Genloci für die intrazelluläre Vermehrung wurden die Gene *mip*, *icm* und *dot* identifiziert (Neumeister, 1996, Belyi, 1999, Vogel und Isberg, 1999). Zudem scheinen einzelne Legionellenstämme in der Lage zu sein, den Membranaufbau ihres Phagosoms zu verändern, um somit Lysosomen-Marker, wie zum Beispiel Klasse I und II

MHC-Moleküle, daraus zu entfernen. Das Phagosom wird daher Legionella-specialized phagosome (LSP) genannt (Shuman und Horwitz, 1996). Die Wirtszelle wird etwa 18 h nach der Invasion zerstört, wobei als mögliche Ursachen dafür bakterielle Zytotoxine, die Bakterien-induzierte Apoptose oder die Zellschädigung durch Legionellen-typische Metabolite wie zum Beispiel Ammoniak, in Frage kommen (Shuman *et al.*, 1998).

1.3.2 Virulenzfaktoren

Die verschiedenen Legionellen-Stämme unterscheiden sich deutlich in ihrer Virulenz, so dass einige Stämme als Krankheitserreger dominieren, während andere seltener in Erscheinung treten. Um die Virulenz eines Legionellen-Stammes zu bestimmen wird die Pathogenität im Meerschweinchen-Modell, nach direkter Inokulation einer Bakteriensuspension, oder eines bakterienhaltigen Aerosols, über die Trachea, herangezogen. Die Virulenz korreliert dabei mit der Fähigkeit der Legionellen, in die Wirtszellen einzudringen, sich darin zu vermehren und diese zu zerstören (Rechnitzer, 1994). Als alternative Modelle stehen auch Zellkulturen von Makrophagen-ähnlichen U937-Zellen (Pearlman *et al.*, 1988) oder HeLa-Zellen (Garduno *et al.*, 1998) zur Verfügung.

Legionellen produzieren ein spezifisches Legionellentoxin, das von den Bakterien in das umgebende Medium sezerniert wird. Es hemmt die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten, möglicherweise durch die Blockade der Produktion von Sauerstoffmetaboliten. Das hitzestabile Peptidtoxin, greift zu einem frühen Zeitpunkt in den Aktivierungszyklus der Neutrophilen ein und hemmt dabei die Aktivierung des Enzyms Phospholipase C direkt oder über Zwischenprodukte (Dowling *et al.*, 1992). Unter den extrazellulären bakteriellen Produkten der Legionellen, finden sich vor allem Enzyme, deren Aufgabe die Gewebsdestruktion und die Bekämpfung von Abwehrmechanismen des Wirtsorganismus ist. Durch die Aktivität von Phospholipase A und C werden Phospholipide wie beispielsweise Phosphatidylcholin, eine wichtige Komponente von Lungensurfactant und Gewebszellmembranen, zerstört (Dowling *et al.*, 1992, Flieger *et al.*, 2000a, Flieger *et al.*, 2000b, Baine, 1985).

Unter den Proteasen ist vor allem die Zink-Metalloprotease mit einem Molekulargewicht von 38 kDa, die auch als major secretory protein (Msp) bezeichnet wird, von Interesse (Szeto und Shuman, 1990). Zu ihren Substraten zählen unter anderem Kollagen, Gelatine und Casein. Darüber hinaus ist jedoch auch ein zytotoxischer Effekt auf eukaryote Zellen bekannt, der Läsionen des Lungengewebes und eine Hämolyse erzeugt (Moffat *et al.*, 1993, Dowling *et al.*, 1992). Ein weiterer Einfluß der Protease auf die Pathogenität wird durch die Hemmung der Chemotaxis der neutrophilen Zellen bedingt (Rechnitzer und Kharazmi, 1992). Für die Replikation in Makrophagen scheint die Protease jedoch entbehrlich zu sein (Moffat *et al.*, 1994). Weitere hämolytische Aktivität, sowie die Produktion eines braunen Pigments, zeigt das 39 kDa Protein Legiolysin, bei dem es sich jedoch nicht um eine Protease handelt (Wintermeyer *et al.*, 1991). Zum Schutz vor toxischen Sauerstoffradikalen, finden sich zwei Superoxiddismutasen (SOD) und eine Peroxidase. Während die periplasmatisch gelegene CuZn-SOD wohl eher extrazellulär gebildete Radikale eliminiert, scheint die zytoplasmatische FeSOD intrazellulär gebildete Radikale des aeroben Metabolismus zu neutralisieren (Dowling *et al.*, 1992, Sadosky *et al.*, 1994). Zur weiteren enzymatischen Ausstattung der Legionellen zählen noch Phosphatasen und Proteinkinasen, welche die Neutrophilenfunktion beeinflussen sowie weitere Endo- und Exopeptidasen (Dowling *et al.*, 1992).

Legionellen besitzen einzelne polar oder subpolar angeordnete Flagellen, die aus einer 47 kDa-Untereinheit aufgebaut sind. Die Beweglichkeit der Legionellen korreliert mit den Wachstumsphasen der Bakterien: In der frühen Phase der intrazellulären Replikation finden sich vor allem unbewegliche Bakterien, während in der späteren Phase, wenn die Nährstoffe knapp werden, die Bakterien zunehmend mobiler werden und es schließlich zur Lyse der Wirtszelle kommt (Pruckler *et al.*, 1995, Bosshard *et al.*, 1997, Byrne und Swanson, 1998). Flagellen selbst sind nicht als Virulenzfaktor der Legionellen zu werten, jedoch sind sie ein Marker für die mögliche Virulenz eines Stammes. Die Verbindung zwischen der Flagellenexpression und der Infektiosität eines Stammes scheint in der Co-Regulation von Virulenzfaktoren und Flagellen zu liegen (Bosshard *et al.*, 1997).

Legionellen besitzen ein sogenanntes major outer membrane protein (MOMP), ein Oberflächenprotein der äußeren Membran. Dieses stellt bei *Legionella pneumophila* ein Kationen-selektives Porin dar, das eng mit dem LPS verbunden und in der Peptidoglykanschicht verankert ist. Es besteht aus einer 28 kDa- und einer 31 kDa-Untereinheit, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Dowling *et al.*, 1992, Rechnitzer, 1994). Durch die Bindung der Komplementkomponente C3 an das MOMP wird die Phagozytose der Legionellen, unter Zuhilfenahme der Komplementrezeptoren CR1 und CR3 der Makrophagen, vermittelt (Bellinger-Kawahara und Horwitz, 1990, Shuman und Horwitz, 1996). Es gibt jedoch auch Hinweise für eine Beteiligung des MOMP an einer Opsonin-unabhängigen Bindung an Wirtszellen (Krinos *et al.*, 1999). Ebenso befindet sich an der Legionellenoberfläche ein sogenanntes Mip-Protein (macrophage infectivity potentiator) mit einem Molekulargewicht von 24 kDa. Eine Mutation des betreffenden Gens, die ein Fehlen dieses Proteins bedingt, führt zu einer 80fach verminderten Infektiosität der Bakterien im Infektionsversuch mit Makrophagen und U937-Zellen. Darüber hinaus zeigen die Mutanten auch eine deutlich verringerte Virulenz im Tierversuch (Cianciotto *et al.*, 1990). Es konnte gezeigt werden, daß die Produktion des Mip-Proteins etwa 4-8 Stunden nach der Infektion hochreguliert wird (Susa *et al.*, 1996). Das Hitzeschockprotein Hsp60 der Legionellen hat ein Molekulargewicht von 60 kDa und ist sehr immunogen. Es ist im Bereich des periplasmatischen Raumes lokalisiert oder wird an der Zelloberfläche der Bakterien exprimiert und zeigt signifikante Homologien zu anderen bakteriellen Hitzeschockproteinen. (Rechnitzer, 1994, Dowling *et al.*, 1992). Ein weiteres 19 kDa-Oberflächen-Lipoprotein wird wegen seiner engen Bindung an die Peptidoglykan-Schicht peptidoglycan-associated protein (Ppl) genannt, und hat ebenso immunogene Eigenschaften (Rechnitzer, 1994).

Legionella pneumophila benötigt Eisen für ein optimales Wachstum. Die Fähigkeit zur intrazellulären Infektion und die Virulenz im Tiermodell sind unter Eisenmangel deutlich vermindert (Pope *et al.*, 1995, James *et al.*, 1995). Substanzen, die das Eisenangebot für die Bakterien limitieren, sind Interferon-Gamma oder Chelatoren wie beispielsweise Apolactoferrin. Bislang sind sieben Eisen-bindende Proteine der Legionellen bekannt, beispielsweise das häufig

vorkommende major iron containing protein (MICP) (Mengaud und Horwitz, 1993, Shuman und Horwitz, 1996). Über die Mechanismen der Eisenaufnahme ist bislang wenig bekannt. Es gibt Hinweise auf eine Legiobactin genannte Substanz mit Siderophor-artiger Aktivität im Zellkulturüberstand von *Legionella pneumophila*, die unter Eisenmangel exprimiert wird (Liles *et al.*, 2000). Die erhöhte Anfälligkeit für Eisenchelatoren, sowie die verminderte Virulenz, nach Mutation im Bereich der Gene *iraA* und *iraB*, läßt auf eine Funktion dieser beiden Gene im Zusammenhang mit der Eisenaufnahme schließen (Viswanathan *et al.*, 2000).

Einen weiteren entscheidenden Pathogenitätsfaktor von *L. pneumophila* stellt die Genfamilie der *icm*- und *dot*-Gene dar. Diese Gene fielen zunächst dadurch auf, daß eine Mutation in ihrem Bereich einen Defekt der intracellular multiplication oder einen defect in organelle traficking bedingt. Die insgesamt 23 Gene dieser Familie werden in vier unterschiedliche Gruppen eingeteilt und befinden sich in zwei unverbundenen Regionen des Legionellen-Genoms. Mutationen dieser Gene führen zu einem Verschmelzen der Phagosomen mit den wirtseigenen Lysosomen, und somit zu einem Abtöten der Bakterien in ihrer Wirtszelle (Shuman *et al.*, 1994, Segal und Shuman, 1998). Bei Mutationen des *dotA*-Gens wurden beispielsweise LAMP-1 Marker auf der Membran des Phagosoms nachgewiesen, die zu den Endozytosemarkern zählen und normalerweise nicht auf der Phagosomenmembran der Legionellen vorkommen (Kirby und Isberg, 1998, Vogel *et al.*, 1998). 14 der 23 Proteine, die sich aus dieser Genfamilie ableiten, sind im Bereich der bakteriellen Innenmembran lokalisiert, und für vier davon ist eine ATP/GTP-Bindungsstelle nachgewiesen. Vier weitere Proteine zeigen Homologien zu Plasmid-kodierten Genen, die in den konjugativen DNA-Transfer integriert sind (Segal und Shuman, 1998). *Icm*- und *dot*-Gene sind einerseits involviert in die sofortige Zytotoxizität, die das Bakterium auf den Wirt ausübt, und sichern andererseits das intrazelluläre Überleben durch die Unterbindung der Phagosom-Lysosom-Fusion (Kirby und Isberg, 1998). Es zeigen sich Homologien zu Genen von *Agrobacterium tumefaciens*, die bei diesem Bakterium den konjugativen DNA-Transfer bewirken. Bei Legionellen ist als Substrat dieses Systems ein Makromolekül als Effektorprotein anzunehmen (Vogel *et al.*, 1998, Segal *et al.*,

1998). Dieses Effektorprotein, das vermutlich in das Zytoplasma des Wirts abgegeben wird, nimmt seinen Weg offensichtlich durch eine Pore, die ebenso durch die Beteiligung der *icm*- und *dot*-Gene in die Membranen des Wirts integriert wird. Auf diese Weise kann das Effektorprotein in den Endozytoseweg der Wirtszelle eingreifen, und zu Gunsten der Legionellen die Phagosom-Lysosom-Fusion auf eine bislang noch unbekannt Weise inhibieren (Kirby und Isberg, 1998, Segal und Shuman, 1998).

1.4 Immunregulation

Legionellen werden von Monozyten und Makrophagen phagozytiert. Die Phagozytose wird durch spezifische Antikörper, die vor allem gegen das LPS, MOMP, das Hitzeschockprotein und Flagellen gebildet werden, gefördert (Rechnitzer, 1994, Neumeister, 1996). Im Tierversuch konnte gezeigt werden, daß die verbesserte Phagozytose der opsonisierten Bakterien durch Makrophagen komplementunabhängig verläuft und zu einem verminderten intrapulmonalen Wachstum führt (Brieland *et al.*, 1996). Darüber hinaus erfolgt durch Legionellen eine Komplementaktivierung sowohl auf dem klassischen Weg durch spezifische Antikörper, als auch auf dem alternativen Weg über Oberflächenproteine (Neumeister, 1996). Werden Makrophagen durch Zytokine von Lymphozyten aktiviert, so sind diese in der Lage, die intrazelluläre Vermehrung der Bakterien zu verhindern. Dies geschieht unter anderem über eine verminderte Eisenbereitstellung. Die Aktivierung der Makrophagen erfolgt hauptsächlich durch Interferon-Gamma von T-Helfer-Zellen oder NK-Zellen. Es gibt jedoch auch eine endogene Stimulation der Makrophagen durch die eigene Produktion von TNF-Alpha. Die infizierten Makrophagen können schließlich durch NK-Zellen abgetötet werden. Insgesamt stellt vor allem die zelluläre Immunität den entscheidenden Faktor zur Limitierung der Legionelleninfektion dar (Rechnitzer, 1994, Neumeister, 1996, Skerret und Martin, 1996).

1.5 Das Lipopolysaccharid (LPS) von *Legionella pneumophila*

Als ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor von *Legionella pneumophila* wird das Lipopolysaccharid (LPS) angesehen. Bei *Legionella pneumophila* ist das LPS das dominierende immunogene Antigen und stellt die Basis für die Serogruppenklassifikation dar (Ciesielski *et al.*, 1986, Nolte *et al.*, 1986, Otten *et al.*, 1986). Durch das LPS kann das Komplementsystem über den klassischen Weg aktiviert werden (Mintz *et al.*, 1992). Die Struktur des LPS von *Legionella pneumophila* Serogruppe 1 wurde bislang vor allem am Beispiel des Stammes Philadelphia 1 untersucht. Die O-Kette dieses LPS besteht aus einem Homopolymer eines α -(2→4) verbundenen Zuckers, der 5-Acetamido-7-acetamido-8-O-acetyl-3,5,7,9-tetradecyloxy-D-glycero-D-galacto-Nonulosonsäure, genannt Legionaminsäure. Da freie Hydroxylgruppen fehlen, ist die Bakterienoberfläche sehr hydrophob, was somit die Adhäsion an die Wirtszelle unterstützen könnte (Zähringer *et al.*, 1995, Knirel *et al.*, 1994). Der Core-Anteil des LPS besteht aus einem inneren und einem äußeren Bereich, wobei der äußere Anteil ebenso einen hydrophoben Charakter aufweist (Zähringer *et al.*, 1995). Inzwischen wurde die gesamte Core-Region des Stammes Philadelphia 1 chemisch analysiert. Die enthaltenen Bestandteile sind Kdo, Mannose, N-Acetyl-Glucosamin, N-Acetyl-Quinovosamin und Rhamnose (Moll *et al.*, 1997). Das Lipid A ist von einer ebenso einzigartigen Struktur wie die O-Kette. Das Grundgerüst besteht aus einem biphosphorylierten Disaccharid. Es finden sich auch langkettige Fettsäuren, die möglicherweise die geringe Endotoxin-Aktivität des Lipid A der Bakterien bedingen (Zähringer *et al.*, 1995).

1.5.1 LPS-Phasenvariation bei *Legionella pneumophila*-Stämmen

In der Arbeitsgruppe Lüneberg wurde mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers (mAk) 2625, der ein Epitop im Bereich des LPS von *L. pneumophila* Sg 1 Subgruppe OLDA bindet, eine spontane LPS-Mutante des virulenten Stammes RC1 isoliert. Diese Mutante, genannt 811, zeigte sich phänotypisch instabil, das heißt es traten Revertanten auf, die wiederum den Phänotyp des Wildtyps hatten (Lüneberg *et al.*, 1998). Die strukturelle Veränderung zeigte auch

Auswirkungen auf die Virulenz der LPS-Mutante. Im Infektionsversuch mit HL-60 Zellen war zwar das Eindringen in die Wirtszellen möglich, jedoch eine intrazelluläre Replikation blieb aus, während die mAk 2625-positiven Revertanten dieses erneut vermochten. Im Gegensatz zum Wildtyp RC1 war die Mutante zudem serumsensibel und vermochte im Tierversuch im Meerschweinchen keine Pneumonie zu induzieren. Zusammenfassend lieferten diese Untersuchungen starke Hinweise für eine Bedeutung des LPS als Virulenzfaktor bei *L. pneumophila* Sg 1 (Lüneberg *et al.*, 1998). Experimentelle Daten zeigten außerdem, daß die Phasenvariabilität des LPS der *L. pneumophila*-Stämme im Wirtstier und im menschlichen Serum gefördert wurde. Somit ergaben sich Hinweise darauf, daß dieser Mechanismus eine mögliche Anpassung an veränderte Umweltbedingungen sein könnte (Lüneberg *et al.*, 1998).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Wie unter 1.5.1 beschrieben, wurde in der Arbeitsgruppe Lüneberg die Phasenvariation eines LPS-Epitops bei *L. pneumophila* Sg 1 beschrieben, die mit dem Verlust von Virulenz und Serumresistenz einhergeht (Lüneberg *et al.*, 1998). Um die Frage nach dem molekularen Mechanismus der Phasenvariation beantworten zu können, war es von großem Interesse zunächst die für die LPS-Biosynthese bei *L. pneumophila* notwendigen Gene zu isolieren. Zum Zeitpunkt der Aufnahme dieser Arbeit waren nur zwei der Gene bekannt, die bei *L. pneumophila* an der LPS-Biosynthese beteiligt sind: Das *lag-1*-Gen kodiert für die O-Acetyl-Transferase, welche die Acetyl-Gruppe auf Position C8 der Legionaminsäure des Stammes Philadelphia (*L. pneumophila* Sg 1) transferiert (Zou *et al.*, 1999). Das Gen *waaA* kodiert für die Kdo-Transferase (Brabetz *et al.*, 2000). Daten aus der Genomsequenzierung von *L. pneumophila* lagen zu diesem Zeitpunkt ebenfalls noch nicht vor. Allerdings hatten Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe zur Isolierung eines Plasmids geführt, das ein 12 kb-Insert enthielt, auf dem LPS-Synthese-Gene von *L. pneumophila* lokalisiert waren. Der Zugang zu diesem Bereich erfolgte mit Hilfe des avirulenten *L. pneumophila*-Stammes 5097, von dem die stabile, spontane LPS-Mutante 137

isoliert werden konnte, die nicht mehr in der Lage war, den mAk 2625 zu binden. Im Gegensatz zur instabilen Switch-Mutante 811 stellte die stabile Mutante 137 ein geeignetes Werkzeug für weitere molekularbiologische Arbeiten zur LPS-Biosynthese bei *L. pneumophila* dar. Die Mutante 137 wurde mit einer Genbank des Wildtypstammes 5097 transformiert. Die so erhaltenen Transformanten wurden mit Hilfe des mAk 2625 auf das Vorhandensein des von mAk 2625 erkannten LPS-Epitops gescreent. Auf diese Weise konnte aus einem Klon, der von mAk 2625 gebunden wurde, das Plasmid pEL28 isoliert werden, das ein 12 kb-Insert trägt (Abb. 1). Mit Hilfe von Subklonierungen des 12 kb-Bereiches, konnte der für die Rekonstitution des mAk 2625-Epitops notwendige DNA-Abschnitt des Wildtyps auf 3 kb, lokalisiert auf dem Plasmid pEL281, eingeeengt werden.

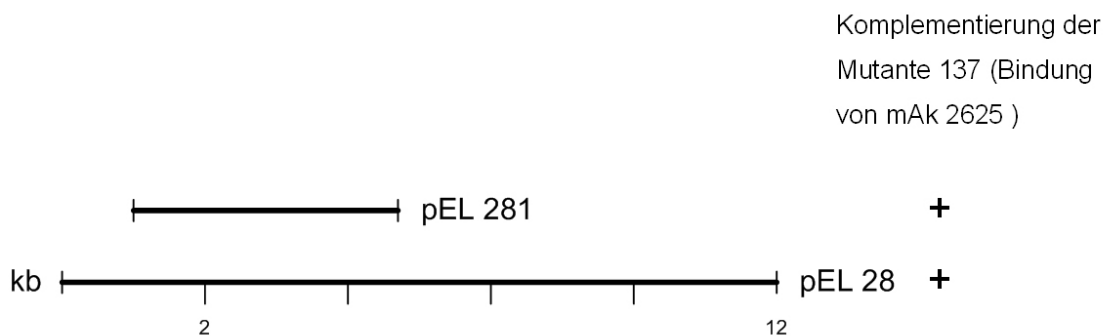


Abb. 1. Schematische Darstellung des Plasmids pEL28 und des davon abgeleiteten Subklons pEL281. Die Plasmide pEL28 und pEL281 waren in der Lage, den LPS-Phänotyp des Wildtyps zu rekonstruieren, wie auf der rechten Seite dargestellt ist.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die entsprechenden sowie weitere LPS-Biosynthese-Gene des virulenten *L. pneumophila* Sg 1 Wildtyp-Stammes RC1 zu isolieren. Bei diesem Stamm unterliegt das mAk 2625-Epitop einer Phasenvariation, deren molekularer Mechanismus an Hand der LPS-Biosynthese-Gene aufgeklärt werden sollte. Dazu sollte zunächst eine Genbank des Stammes RC1 in *E. coli* generiert werden. Diese Klone sollten dann im Colony Blot-Verfahren mit DNA-Hybridisierungen auf das Vorhandensein von LPS-Synthese-Genen gescreent werden. Die dafür benötigten

Hybridisierungssonden sollten von dem Insert des Plasmides pEL28 abgeleitet werden. Die so erhaltenen Klone sollten dann sequenziert werden. Darüber hinaus sollte die Mutation beim Stamm 137, die zum Verlust des mAk 2625-Epitops führte, ermittelt werden. Dazu sollte die Sequenzierung von entsprechenden PCR-Produkten eingesetzt werden. Die Ermittlung der Mutationsstelle sollte erste Anhaltspunkte darüber liefern, welcher Natur das phasenvariable LPS-Epitop ist, das von mAk 2625 erkannt wird. Des Weiteren sollten die chromosomalen LPS-Biosynthese-Bereiche des Wildtyp-Stammes RC1 mit denen des Stammes 811 vergleichend analysiert werden, um auf diese Weise möglicherweise einen Zugang zu den molekularbiologischen Grundlagen der Phasenvariation zu erhalten. Diese vergleichenden Untersuchungen sollten wiederum mit Hilfe von PCR-Analysen und Sequenzierung von PCR-Fragmenten erfolgen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Puffer und Lösungen

Agarosegelelektrophorese:

TAE:	40 mM Tris-Acetat pH 8,0, 1 mM EDTA
TBE:	100 mM Tris-HCl pH 8,3, 100 mM Borsäure, 25 mM EDTA
GEBS:	20% Glycerin, 50 mM EDTA, 0,05% Bromphenolblau, 0,5% Sarkosyl

Schnellmethode zur Isolierung von Plasmid-DNA:

Lösung A:	10 mM EDTA, 25 mM Tris-Cl pH 8,0, 50 mM Glucose
Lösung B:	0,2 N NaOH, 1% SDS
Lösung C:	3 M Kaliumacetat, 2 M Eisessig
TE 10/1:	10 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA

Präparation chromosomaler DNA mit Tischultrazentrifuge:

NTE:	100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0
------	---

Präparation chromosomaler DNA:

Lösung A:	0,15 M NaCl, 0,1 M EDTA pH 8,0
Lösung B:	20% Saccharose, 10 mM Tris-Cl pH 8,0
TES:	30 mM Tris-Cl pH 8,0, 5 mM EDTA pH 8,0, 50 mM NaCl

Vorbereitung von Bakterien zur Elektroporation:

HEPES:	1 mM pH 7,0
--------	-------------

Colony Blot:

20 x SSPE: 3,6 M NaCl, 100 mM Na₂HPO₄, 20 mM EDTA

Hybridisierung mit DIG-markierten DNA-Sonden:

20 x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat pH 7,0

Maleinsäurepuffer: 0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, mit NaOH auf pH 7,5

Waschpuffer: Maleinsäurepuffer, 0,3% Tween 20

Detektionspuffer: 0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂ pH 9,5

Stripping-Lösung: 0,2 M NaOH, 0,1% SDS

Blocking-Lösung: 10% Blocking-Reagenz in Maleinsäurepuffer

2.1.2 Chemikalien, Enzyme und Reaktionskits

AppliChem, Heidelberg:

EDTA, NaCl, Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)

Difco Laboratories, Augsburg:

Bacto-Trypton, Hefeextrakt

Fresenius, Bad Homburg:

Ampuwa

Genomed, Bad Oeynhausen:

JETsorb Gel Extraction Kit 300

Gibco BRL, Eggenstein:

T4 DNA-Ligase

Life Technologies, Karlsruhe:

Cäsiumchlorid ultraPURE™, LB-Agar, LB-Broth Base

Macherey und Nagel, Düren:

Nucleobond AX 100 Plasmidpräparationskit

NucleoSpin Plasmidpräparationskit

Merck, Darmstadt:

Bromphenolblau, CH₃COOK(Kaliumacetat), Eisessig, Ethanol, Glucose, Glycerin 87%, HCl, Isopropanol, KCl, MgCl₂, MgSO₄, NaClO₄, NaOH, Proteinase K, Tween 20

NEB, Schwalbach:

Restriktionsenzyme und Puffer

PAN Systems, Nürnberg:

PowerScript DNA Polymerase

Perkin Elmer, Weiterstadt:

BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready-Reaction Kit

Pharmacia Biotech, Freiburg:

ATP, Lambda-DNA, Restriktionsenzyme, T4-Polynukleotidkinase

Qiagen, Hilden:

Qiagen Plasmid Midi/Maxi Kit, QIAprep Spin Miniprep Kit, , QIAquick Gel Extraction Kit, QIAquick PCR Purification Kit

Riedel de Haen, Seelze:

Saccharose, Triton-X-100

Roche, Mannheim:

DIG DNA Labeling Kit, DIG Luminescent Detection Kit, alkalische Phosphatase (CIP), Lysozym

Roth, Karlsruhe:

Agarose

Serva, Heidelberg:

BSA, Ethidiumbromid, SDS, TRIS

Sigma, Deisenhofen:

Antibiotika, HEPES, Mineralöl, RNase, Sarkosyl

2.1.3 Nährmedien und Agarplatten

Luria Bertani Broth (LB-Medium): 1% Bacto Trypton, 0,5% Hefeextrakt,
1% NaCl pH 7,5

LB-Agarplatten: LB Medium mit 1,5% Bacto-Agar

SOB-Medium: 2% Bacto Trypton, 0,5% Hefeextrakt,
10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM
MgCl₂, 10 mM MgSO₄

SOC-Medium: SOB-Medium mit 20 mM Glucose

Einfriermedium: 20% Glycerin in LB-Medium

Legionellen-Agar: CYE Legionellen-Agar mit BCYE
Wachstumszusatz und MWY
Selektivzusatz, Unipath-Oxoid, Wesel

Zugesetzte Antibiotika

für *E. coli*-Kultur: Chloramphenicol 30 µg/ml

2.1.4 Geräte und Verbrauchsmaterial

2.1.4.1 Meßgeräte

Analysenwaagen, Modelle R160P und PT 1200 (Sartorius, Göttingen)

Eppendorfpipetten (Eppendorf, Hamburg)

pH-Meter, Modell pH530 (WTW, Weilheim)

Spektrophotometer, U-2000 (Hitachi, San Jose, CA, USA)

Sequenziergerät, ABI Prism™ Sequencer 377 (Perkin Elmer, Weiterstadt)

2.1.4.2 Inkubatoren, Zentrifugen und sonstige Geräte

Brutschrank, KB 500 (Heraeus, Hanau)

Elektrophoresekammer, DNA Subcell™ (BioRad, München)

Elektroporation-Spannungsgenerator, Gene Pulser™ und Pulse Controller™
(BioRad, München)

Fotodokumentationsanlage (Herolab, Wiesloch)

Gel-Dokumentationssystem, MidiDoc (Herolab, Wiesloch)

Heizblöcke, BT1 und BT3 (Grant Instruments, Cambridge, UK)

Hybridisierungsöfen, DUO-Therm OV5 (Biometra, Göttingen)

Schüttelinkubatoren, G25 (New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, USA)
und KS 10 (Bühler, Tübingen)

Spannungsgeräte, Gene Power Supply GPS 200/400 (Pharmacia, Freiburg)
und Power Supply 3000Xi (BioRad, München)

Speed Vac Plus SC110A (Savant, New York, USA)

Thermocycler, TRIO (Biometra, Göttingen), Personal Cycler (Biometra,
Göttingen)

UV-Crosslinker, Stratalinker 1800 (Stratagene Europe, Amsterdam,
Niederlande)

Wasserbad, SW20 (Julabo, Seelbach)

Zentrifugen, Biofuge 15 (Heraeus, Hanau)

Biofuge 15R (Heraeus, Hanau)

Omnifuge 2.0 RS (Heraeus, Hanau)

Kühlzentrifuge RC-5B (Sorvall Heraeus, Hanau)

Ultrazentrifuge L7 (Beckman, München)

Tisch-Ultrazentrifuge TL-100 (Beckman, München)

2.1.4.3 Verbrauchsmaterial

Blotting-Papier (Hartenstein, Würzburg)

Elektroporationsküvetten (Eurogentec, Seraing, Belgien)

Nitrozellulosemembran (Sartorius, Göttingen)

Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht)

15 ml Röhrchen, steril (Greiner, Nürtingen)

Röntgenfilm HyperfilmTM-MP (Amersham, Braunschweig)

Zentrifugengefäße Falcon (Heidelberg)

2.1.5 Plasmide

pEL28 pBluescript mit CAT-Gen (Chloramphenicol-Resistenz) an
Schnittstelle *Pst*I/*Hind*III, sowie 12 kb chromosomales
*Sau*3A-Fragment des WT 43109 an Schnittstelle *Bam*HI

pEL281 pBluescript mit 3 kb-Insert als *Hind*III-geschnittener
Subklon von pEL28

pNZA6 Subklon von chromosomaler DNA von RC1 in Vektor pBC
(Pos. 1-11578)

pNZB17	Subklon von chromosomaler DNA von RC1 in Vektor pBC (Pos. 10554-20870)
pNZA1	Subklon von chromosomaler DNA von RC1 in Vektor pBC (Pos. 13626-25324)
pNZB13	Subklon von chromosomaler DNA von RC1 in Vektor pBC (Pos. 20868-32663)
pBC	pBC SK(+) Phagemidvektor von Stratagene; Chloramphenicol ^r , ColE1ori, F1ori, lacZ, Multiple cloning site flankiert von T3 und T7-Promoter

2.1.6 Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> SURE	recB, recJ, sbcC201, uvrC, umuC::Tn5(Kan ^R), mcrA, mcrB, mrr, lac, Δ(hsdRMS), endA1, gyrA96, thi, relA1, supE44, [F', proAB, lacIqZΔM15, Tn10(TetR)]; Wirtsstamm für pBC Stratagene, Heidelberg
<i>Legionella pneumophila</i> Sg 1 Stamm 5097 (OLDA)	American Type Culture Collection, Rockville, Md. (ATCC 43 109)

<i>L. pneumophila</i> Sg 1 Stamm RC1 (OLDA)	B. Wright, Dept. of Clinical Microbiology, Rigshospitalet, Copenhagen, DK; klinisches Isolat
<i>L. pneumophila</i> Sg 1 Stamm 5097 (OLDA), Mutante 137	Ak 2625-negative Mutante des Wildtyps 5097
<i>L. pneumophila</i> Sg 1 Stamm RC1 (OLDA), Mutante 811	mAk 2625-negative Mutante des Wildtyps RC1
<i>L. pneumophila</i> Sg 1 Philadelphia	ATCC 33 152
<i>L. pneumophila</i> Sg 1 Camperdown	ATCC 43 113
<i>L. pneumophila</i> Sg 1 Allentown	NCTC 12 024
<i>L. pneumophila</i> Sg 1 Bellingham	NCTC 11 404
<i>L. pneumophila</i> Sg 1 Cambridge	NCTC 11 231
<i>L. pneumophila</i> Sg 1 Heysham	NCTC 12 025
<i>L. pneumophila</i> Sg 1 Kingston	NCTC 11 378
<i>L. pneumophila</i> Sg 1 Knoxville	ATCC 33 153
<i>L. pneumophila</i> Sg 1 Benidorm	ATCC 43 108
<i>L. pneumophila</i> Sg 1 France	ATCC 43 112
<i>L. pneumophila</i> Sg 1 Washington	NCTC 11 201
<i>L. pneumophila</i> Sg 1 Pontiac	NCTC 11 191
<i>L. pneumophila</i> Sg 2	ATCC 33 154
<i>L. pneumophila</i> Sg 3	ATCC 33 155
<i>L. pneumophila</i> Sg 4	ATCC 33 156
<i>L. pneumophila</i> Sg 5	ATCC 33 216

<i>L. pneumophila</i> Sg 6	ATCC 33 215
<i>L. pneumophila</i> Sg 7	ATCC 33 823
<i>L. pneumophila</i> Sg 8	ATCC 35 096
<i>L. pneumophila</i> Sg 9	ATCC 35 289
<i>L. pneumophila</i> Sg 10	ATCC 43 283
<i>L. pneumophila</i> Sg 12	ATCC 43 290
<i>L. pneumophila</i> Sg 13	ATCC 43 736
<i>L. pneumophila</i> Sg 14	ATCC 43 703
<i>L. cherii</i>	ATCC 35 252
<i>L. gormanii</i>	ATCC 33 297
<i>L. steigerwaltii</i>	ATCC 35 302
<i>L. maceachernii</i>	ATCC 35 300
<i>L. hackeliae</i>	ATCC 35 250
<i>L. anisa</i>	ATCC 35 291
<i>L. feeleii</i>	ATCC 35 072
<i>L. pariensis</i>	ATCC 35 299
<i>L. dunoffii</i>	ATCC 33 279
<i>L. oakridgensis</i>	ATCC 33 761
<i>L. jamestowniensis</i>	ATCC 35 298
<i>L. wadsworthii</i>	ATCC 33 877
<i>L. sainthelensi</i>	ATCC 35 248
<i>L. rubrilucens</i>	NCTC 11 987
<i>L. longbeachae</i>	ATCC 33 462
<i>L. micdadei</i>	ATCC 33 204
<i>L. bozemanii</i>	ATCC 33 217

L. jordanis

ATCC 33 623

Pseudomonas fluorescens

ATCC 49 271; J. Helbig, Dresden

2.1.7 Oligodesoxynukleotide

Die nachfolgenden Oligodesoxynukleotide stammen von den Firmen ARK Scientific, Darmstadt (1), Pharmacia Biotech, Freiburg (2) oder Roth GmbH, Karlsruhe (3).

Sequenzierprimer für pEL28:

EL122	5' TTGTTTACCAGTTAACCTG 3'	(3)
EL160	5' CTAATTGGATTAATTTTTATAAAGG 3'	(3)
EL124	5' CAAAAGATCAAAGGAATTG 3'	(3)
EL143	5' CCCTCTACTTTTTGCACTATAACC 3'	(3)
EL150	5' CCTTTTGAGTTGGTATAGT 3'	(3)
EL145	5' TCATCTCAAATCCTTTTGAGTTGG 3'	(3)
EL154	5' CTCTTTTTCAATTTTTTGAGCTC 3'	(3)
EL140	5' GCTCAAAAATTGAAAAGAG 3'	(3)
EL161	5' GTGTCATCATCTTATATAAATTTAG 3'	(3)
EL141	5' CTAATTAAGCTATCCCCTA 3'	(3)
EL202	5' CAGCAATAATTGCAGGATCC 3'	(1)
EL137	5' ATCTGGCTTCTGTTTCAAG 3'	(3)
EL125	5' CATATCTTCATAGTTTTGA 3'	(3)
EL127	5' GATACCTTCTTTACCAAT 3'	(3)
EL129	5' GACTTTCAACCAAGATTAA 3'	(3)
EL130	5' TATAAAAATTTTTAATCCG 3'	(3)
EL135	5' CAATGAAGGAATTTATTTTG 3'	(3)
EL133	5' TTCAATTTGATTGCATTGA 3'	(3)
EL164	5' CAATATTCCTTGAGGGAAACG 3'	(3)
EL132	5' CAGCCGTCGGAAATATAAT 3'	(3)
EL128	5' CCGGAATAGATGTTTTTGA 3'	(3)
EL131	5' CGGTTGGAATATTTTTTGT 3'	(3)
EL180a	5' ACAATTGGTCCATTCTCTGTT 3'	(3)
EL134	5' GGTACTTTTTTTAATCAGG 3'	(3)
EL139	5' TGCCAATTTACCCTTCATAG 3'	(3)
EL203	5' GTCCTGATGGACATCCTGC 3'	(1)

EL126	5' AAAACATTGGTTTAAGTCG 3'	(3)
EL136	5' GGTAATGAAAAACATTGGT 3'	(2)
EL165	5' GCCAAGACTCTTGAAACAAT 3'	(2)
EL168	5' GTTAGAAACCCTACTTGGAAC 3'	(2)
EL174	5' AATGAAGAAGAAAACACTCACTC 3'	(2)
EL175	5' AGATGTAATTTTGCTAACGC 3'	(2)
EL166	5' CGAATAGCAAATCTAACACTAC 3'	(2)
EL156	5' GTAACAAGAATTTTCACACTATC 3'	(2)
NZ 30	5' TTCTTATCCTTGTAATAATTGTTT 3'	(1)
EL204	5' CCTCCTATCCTACGCCAAT 3'	(1)
EL149	5' GCCAGGGGATGATAATCCA 3'	(2)
EL148	5' TCAAACATTAAATATTGAGGAACA 3'	(2)
EL158	5' GGTTTGTAGCTTTTTTTCTAATTG 3'	(2)
EL157	5' GAATGTCAGATATAATTGATGGC 3'	(2)
EL147	5' AGGCTTTTATCAAATAATTCTCTA 3'	(2)
EL146	5' TTTGATGAAATTTATGGAAACTCA 3'	(2)
EL159	5' GTCTTCAAAAACATACAGAGC 3'	(2)
EL167	5' GATATTTATGATGATAAATACAC 3'	(2)
EL176	5' TTGAATAACTTGAACATTTTGC 3'	(2)
NZ 31	5' TCACCTTGCACCTCACCTAC 3'	(1)
EL180	5' CTGGAGGATTATGCAGCA 3'	(2)
EL181	5' ACGGGACTTGCCCAGATG 3'	(2)
EL177	5' GAACGGTGAAAATGTCGGGA 3'	(2)
EL169	5' GCCGACAGCACTATGCTTGC 3'	(2)
EL162	5' TCTTATTGTTGGTGATCTGTCA 3'	(2)
EL155	5' GTTAGGTCAAGCAATAATAAATG 3'	(2)
EL144	5' TTTATCAAGATTTTGCCTGATTC 3'	(2)
EL142	5' GCAACTATAAGTTTTATAG 3'	(2)
EL151	5' ATTTTGATACCATTTTACC 3'	(2)
EL138	5' CCACCAGTTAGTTCTATTG 3'	(2)
EL123a	5' CGAACTTTTATATATATTG 3'	(2)
EL172	5' CTGGCAAATTTCTTGTATAAA 3'	(2)
NZ 58	5' TGATTAGCAGCACTAGGCTC 3'	(1)

Sequenzierprimer für pNZA6:

NZ 56	5' CTCCACCAAACAAATTCCATTT 3'	(1)
NZ 57	5' GGAGGAGCACGCTTTTATTG 3'	(1)
NZ 55	5' TCCGGTGAGGTCCGCAAG 3'	(1)
NZ 49	5' AATGAACCTTGATCCAGAAA 3'	(1)
NZ 51	5' GATGTAGCGTGCAAATTGG 3'	(1)
NZ 52	5' GTATTCATGCAGGCTTTCCC 3'	(1)
NZ 48	5' CTTTGATTACGGTTGGGGTG 3'	(1)
NZ 42	5' ATAGTCAATTATAATTCGGGCG 3'	(1)
NZ 43	5' CCTCATTTACAGCTCCATCTT 3'	(1)
NZ 29	5' GATTGTGAAATACGACATAGAA 3'	(1)
NZ 16	5' GAACTCTATAAGCATAACCAAA 3'	(1)
NZ 17	5' CAACAACAAGGCTATGATGTT 3'	(1)
NZ 18	5' GTAGCAGTACTCGAACTCAG 3'	(1)
NZ 19	5' CTCCAGCATCTCCACCATAT 3'	(1)
NZ 22	5' AAATTAGCCCGGAATATCCC 3'	(1)
NZ 15	5' ATGCTCCAATTTTGATATTTATC 3'	(1)
NZ 23	5' GATGTGTACCATATTAGCGG 3'	(1)
NZ 10	5' TCGAGTATTGAAAATTTACCCG 3'	(1)
NZ 11	5' GGTATGGCAATTATAACTTTCC 3'	(1)
NZ 03	5' CACAATATATAGCAAAAAGAC 3'	(1)
NZ 08	5' GGTCTATCAAGTTATTAATTATTA 3'	(1)

Sequenzierprimer für pNZA1:

NZ 58	5' TGATTAGCAGCACTAGGATC 3'	(1)
NZ 59	5' TCAATATGTTCCCATACAAAGT 3'	(1)
NZ 44	5' AGCTACCTCAAAATTGTTTTGTT 3'	(1)
NZ 01	5' GGCCAAATTGCTAATTGC 3'	(1)
NZ 02	5' CTGTTGTGAAAGGCGTACC 3'	(1)
NZ 12	5' GATGCAGGAATATGAATTAGAT 3'	(1)

Sequenzierprimer für pNZB13:

NZ 60	5' CTGGAAATACTTTACCGCGG 3'	(1)
-------	----------------------------	-----

NZ 53	5' TTCTCCTCGATCTCCCAGC 3'	(1)
NZ 54	5' ATGAATCCCTTGACCGTGAC 3'	(1)
NZ 45	5' CATGATGCCAGAGATAACCC 3'	(1)
NZ 47	5' AAGCAACAAACAAAGTATGGTC 3'	(1)
NZ 24	5' ACACCTCCTGCCCCAGAA 3'	(1)
NZ 13	5' AGGCGCAATATGTGAACACG 3'	(1)
NZ 14	AACCAGGTGCCTTCTATTCC 3'	(1)

Sequenzierprimer für pNZA2:

NZ 50	5' TCATGATAGGCTCCCTCCTT 3'	(1)
NZ 20	5' CCTTCCAGAGGGTTTTAAACT 3'	(1)

Die folgenden Oligodesoxynukleotide stammen von Stratagene, Heidelberg:

Sequenzierprimer für pBC:

T7:	5' AATACGACTCACTATAG 3'
T3:	5' ACCATGATTACGCCAAGC 3'

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden für das Arbeiten mit DNA

2.2.1.1 Agarosegelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde die Gelelektrophorese mit TBE-Agarosegelen in Konzentrationen von 0,4% bis 0,8% eingesetzt. Die präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in TAE-Agarosegelen der Konzentrationen 0,6% bis 1%. Es wurde zur Herstellung der Gele jeweils die entsprechende Menge Agarose abgewogen und mit TBE- bzw. TAE-Puffer gemischt. Dieses Gemisch wurde etwa fünf Minuten lang in der Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Die beim Erhitzen verdampfte Flüssigkeit wurde durch VE-Wasser ersetzt, und nach Abkühlung im kalten Wasserbad auf ca. 60°C, wurde der Ansatz in die Gelkammer gegossen, und nach dem Auskühlen der Agarose-Gelmatrix der entsprechende TAE- oder TBE-Puffer zugegeben. Um Taschen für die später einzubringende DNA zu erzeugen, wurden vor dem Auskühlen Kämme in das Gel eingetaucht. Als optischer Marker für die Gelpassage wurde den DNA-Proben jeweils 7-10 µl GEBS, welches Bromphenolblau enthält, zugefügt. Um die Größenverhältnisse der aufgetrennten DNA-Fragmente abschätzen zu können, wurde *Hind*III geschnittene λ-DNA (23,13 kb, 9,41 kb, 6,68 kb, 4,36 kb, 2,32 kb, 2,02 kb, 0,56 kb bzw. 0,135 kb) jeder Gelelektrophorese als Standard beigefügt. Nach dem Einpipettieren der zu trennenden DNA-Fragmente in die vorgefertigten Taschen, wurde für etwa ein bis zwei Stunden eine Spannung von 100-250 V an die Gelkammer gelegt, um die Trennung im elektrischen Feld zu erreichen. Schließlich wurde die DNA nach der Elektrophorese in Ethidiumbromid gefärbt (1µg/ml) und unter UV-Licht (302 nm) fotografiert und gegebenenfalls ausgeschnitten.

2.2.1.2 Aufreinigung von DNA

Nach der TAE-Gelelektrophorese konnten die gefärbten Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA-Fragmente daraus aufgereinigt werden. Dies erfolgte mit dem JetSorb-Kit von Genomed, wobei die DNA zum Abschluß in 40-50 µl H₂O bidest. eluiert wurde. Alternativ wurde auch der NucleoSpin-Kit von Macherey und Nagel verwendet, mit einem Elutionsvolumen von 50 µl H₂O bidest. (pH 8,5). Die Aufreinigung wurde jeweils nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.1.3 Phenolisieren und Fällern von DNA

Zur Aufreinigung von DNA nach Ligationen und Restriktionen wurden die Ansätze phenolisiert und anschließend gefällt, um Enzyme und Puffer abzutrennen. Dafür wurde zunächst das Volumen des Ansatzes mit H₂O bidest. auf 100 µl aufgefüllt. Nun wurden 250 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) unter dem Abzug zugegeben, durch kräftiges Schütteln gut mit dem Ansatz vermischt und für 2 min bei 13000xg zentrifugiert. Der Überstand mit der darin enthaltenen DNA wurde vorsichtig abpipettiert und der Vorgang wiederholt. Den erhaltenen ca. 200 µl DNA-Lösung wurden 12 µl 5 M NaCl und 400 µl eiskalter 96% Ethanol zugefügt und dieses bei mindestens -70°C eine halbe Stunde stehen gelassen. Es folgte eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 4°C mit 15000xg, woraufhin der Überstand abgekippt und die Probe mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und wiederum zentrifugiert wurde. Das entstandene Pellet wurde nach Trocknung in der Speed-Vac in H₂O bidest. oder TE 10/1 in einem geeigneten Volumen aufgenommen.

2.2.1.4 Schnellmethode zur Isolierung von Plasmid-DNA (Birnboim und Doly, 1979)

Eine gepickte Bakterienkolonie wurde in 4 ml LB-Medium unter Zusatz des entsprechenden, für diese Bakterien selektionierenden Antibiotikums, angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. 1,5 ml dieser Kultur wurden für 5 min bei

15000xg zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Nach Zugabe von 100 µl Lösung A (10 mM EDTA, 25 mM Tris-Cl pH 8,0, 50 mM Glucose) sowie einer Spatelspitze Lysozym, wurde das Pellet 10 min unter Rütteln resuspendiert. Die folgende Zugabe von 200 µl frisch angesetzter Lösung B (0,2 N NaOH, 1% SDS) erfolgte möglichst rasch, um das NaOH nicht zu lange einwirken zu lassen, wobei die Probe nur vorsichtig geschwenkt und danach 5 min auf Eis gestellt wurde. Anschließend wurden 150 µl Lösung C (3 M Kaliumacetat, 2 M Eisessig) hinzu gegeben und erneut nach sorgfältigem Mischen für 5 min auf Eis inkubiert. Es folgte die Zentrifugation des Ansatzes für 5 min bei 15000xg zur Abtrennung von chromosomaler DNA, Membranen und Proteinen. Der Überstand wurde mit 250 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und der Extrakt mit Ethanol gefällt. Das entstandene DNA-Pellet wurde in der Speed-Vac getrocknet und schließlich in 20 µl TE 10/1 mit 3 µg/ml RNase aufgenommen.

2.2.1.5 Mini-, Midi- und Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung größerer Mengen von Plasmid-DNA wurden die QIAGEN Plasmid-Präparations-Kits, Mini, Midi und Maxi, sowie der Nucleobond AX 100-Kit von Macherey und Nagel verwendet. Hierbei erfolgte jeweils nach alkalischer Lyse der Bakterien die Plasmid-Isolation über Ionenaustauscher-Säulen nach dem Hersteller-Protokoll. Die Plasmid-DNA wurde mit dem 0,7fachen Volumen des Eluats mit Isopropanol versetzt, zentrifugiert bei 15000xg und mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde bei 37°C getrocknet und in eine entsprechende Menge TE 10/1 aufgenommen.

2.2.1.6 Präparation chromosomaler Bakterien-DNA mit der Tischultra-zentrifuge

Etwa eine halbe bewachsene Platte Bakterien wurde abgeerntet und in 1 ml NTE 100/20/10 (100 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA pH 8) sowie einer Spatelspitze Lysozym resuspendiert. Es folgte eine Inkubationsphase auf Eis von 10 min und anschließend die Zugabe von 50 µl 20% Triton-X-100 mit

erneuter Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur. Der Zugabe von 50 µl 10% Sarkosyl folgte eine Inkubationszeit von 1 h bei Raumtemperatur. Schließlich wurde nach Zugabe von 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) noch für 1-2 h bei 52°C inkubiert. Die somit entstandene Lösung war klar geworden und konnte so zunächst eingefroren werden. Nun wurde je Probe 1,6 g CsCl in ein Minisorb-Gefäß eingewogen und hierzu 500 µl NTE 100/20/10, sowie ca. 1 ml der aufgetauten Proteinase K-behandelten DNA-Suspension zugegeben. Sobald sich das Cäsiumchlorid vollständig gelöst hatte wurden 20 µl 1% Ethidiumbromid zugegeben und die entstandene DNA-Lösung für 4 h mit der Tischultrazentrifuge zentrifugiert (Rotor TLA 100,3 bei 100.000 rpm). Anschließend wurde die Bande der chromosomalen DNA isoliert, das Ethidiumbromid mit Isoamylalkohol extrahiert und die DNA-Lösung für 24 h gegen TE 10/1 dialysiert. Es folgte eine photometrische Konzentrationsbestimmung.

2.2.1.7 Schnell-Präparation chromosomaler Bakterien-DNA

Die Bakterien etwa einer halben bewachsenen Agarplatte wurden abgeerntet, in 2 ml der Lösung A (0,15 M NaCl, 0,1 M EDTA pH 8,0) aufgenommen und in einer Tischzentrifuge pelletiert. Nach erneutem Waschen mit 400 µl Lsg. A wurde wieder zentrifugiert bei 15000xg und das Pellet in 200 µl Lsg. B (20% Saccharose, 10 mM Tris-Cl pH 8,0) aufgenommen. Es folgte die Zugabe von 100 µl 250 mM EDTA und 50 µl 10% SDS woraufhin der Ansatz 15 min lang bei Raumtemperatur geschüttelt wurde. Weiterhin wurden 650 µl TES sowie 6 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugegeben und eine Stunde lang bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Das Lysat wurde in ein 12 ml Falcon Tube überführt und 250 µl NaClO₄ (5M) sowie 1 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben. Nach 1-2 h kräftigen Schüttelns entstand somit eine homogene weiße Phase, die nach Rücküberführung in ein Eppendorf-Cap 10-15 min auf der Tischzentrifuge bei 15000xg abzentrifugiert wurde. Die wäßrige Phase, mit der enthaltenen DNA, wurde vorsichtig abpipettiert und durch die Zugabe des doppelten Volumens an eiskaltem 96 % Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation

und Waschen des Pellets mit 70% Ethanol wurde das entstandene Pellet schließlich in 50 µl TE 10/1 aufgenommen.

2.2.1.8 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA (Sambrook *et al.*, 1989)

Die Messungen wurden bei 260 nm in einer gereinigten Quarzküvette durchgeführt. Für die Konzentrationsbestimmung von doppelsträngiger DNA wurden 5 µl der zu bestimmenden DNA-Lösung in ein Volumen von 1 ml H₂O bidest. gegeben. Die Quantifizierung erfolgte auf folgender Basis: 1 OD entspricht 50 µg/ml bei ds DNA.

2.2.1.9 Digoxigenin-Markierung von DNA-Sonden

10 ng bis 3 µg DNA, gewonnen aus PCR oder Restriktion, wurden in 15 µl H₂O bidest. aufgenommen und für 10 Minuten bei 95°C im Wasserbad denaturiert. Um die Markierungsreaktion zu initialisieren, wurden 2 µl eines Hexanucleotid-Gemisches, die als Primer fungierten, zugegeben. Anschließend folgten 2 µl dNTP-labeling mixture, sowie 1 µl Klenow-Enzym als Polymerase. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Reaktionsstop erfolgte mit 2 µl EDTA-Lsg. (0,2 M, pH 8,0), sodann wurde der Ansatz mit 2,5 µl Na-Acetat (3 M, pH 4,3) und 75 µl eiskaltem 96 % Ethanol gefällt. Das entstehende Pellet wurde in 50 µl TE 10/1 (pH 8.0) aufgenommen. Zur Beurteilung der Güte der Markierungsreaktion und Quantifizierung der DIG-markierten DNA wurde anschließend ein dot-blot durchgeführt. Hierbei wurde eine Verdünnungsreihe der markierten DNA (1:10 bis 1:10⁶) sowie einer Kontroll-DNA bekannter Konzentration auf eine Nylonmembran getropft und die Detektionsschritte nach Herstellerangaben durchgeführt. Durch den Vergleich der Signalintensität der beiden Verdünnungsreihen, konnte ungefähr die Konzentration der DIG-markierten DNA abgeschätzt werden.

2.2.2 Klonierungsmethoden

2.2.2.1 Restriktionsverdau

Die Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen erfolgte in der Regel in einem Reaktionsvolumen von 10 oder 20 μl , bei besonderen Anwendungen wurde auch ein größeres Volumen bis zu 100 μl gewählt. Als Enzymmenge wurde jeweils etwa 2 U pro μg DNA eingesetzt. Zusätzlich wurden die entsprechenden Reaktionspuffer der Firmen Pharmacia (One-Phor-All-Buffer) und NEB angewendet, wobei bei einigen NEB-Enzymen nach Herstellerangaben noch BSA zugegeben wurde. Die Dauer einer Restriktion betrug etwa 1-2 h bei 37°C und wurde durch die Zugabe von GEBS beendet.

Einen Sonderfall stellte die sogenannte partielle Restriktion dar, bei welcher zunächst die Enzymkinetik durch wiederholte Versuche mit unterschiedlicher Enzymkonzentration sowie variierender Reaktionsdauer bestimmt wurde. Die enzymatische Spaltung wurde hierbei nicht vollständig durchgeführt, sondern nach einem individuell festgelegten Zeitraum abgebrochen, so daß durch die unvollständige Spaltung überlappende Fragmente entstanden.

2.2.2.2 Dephosphorylierung von DNA-5'-Enden

Die spontane Religation von linearisierten Plasmidvektoren wurde dadurch verhindert, daß die DNA durch eine alkalische Phosphatase (calf intestine phosphatase/CIP) am 5'-Ende dephosphoryliert wurde. Die Reaktion, in einem Volumen von 50 μl durchgeführt, erfolgte zunächst für 1,5 h bei 37°C, wobei der Ansatz 1 μl Enzym (1 U/ μl) enthielt. Nach dem Phenolisieren und Fällern dieses Ansatzes wurde die Reaktion erneut in gleicher Weise wiederholt, um eine vollständige Dephosphorylierung zu gewährleisten. Es wurden zwei verschiedene AP-Enzym-Kits der Firmen Roche und NEB verwendet, wobei bei letzterer die Reaktion durch die Zugabe von 0,5 μl 5 mM EDTA und das Erhitzen auf 75°C für 10 min terminiert wurde. Abschließend wurde die Probe jeweils ein weiteres Mal phenolisiert und gefällt.

2.2.2.3 5'-Phosphorylierung von DNA

Mit Hilfe der T4 –Polynukleotidkinase wurde eine Phosphatgruppe des ATP auf die 5'-terminale Hydroxylgruppe von DNA übertragen. Für die Reaktion wurden 2 µl der Kinase (10 U/µl) sowie PNK-Puffer und ATP nach Herstellerangabe eingesetzt und in einem Volumen von 50 µl bei 37°C für 1 h inkubiert. Der Ansatz wurde im Anschluß phenolisiert und gefällt.

2.2.2.4 Ligation

Die Ligation von Restriktionsfragmenten in linearisierte und dephosphorylierte Plasmidvektoren erfolgte über Nacht im Wasserbad bei 16°C. Für den Ansatz wurde ein Volumen von 20 µl gewählt, in welchem 2 µl Ligase-Puffer sowie 1 µl einer 1:5-Verdünnung des Ligase-Enzyms enthalten waren, sowie jeweils 100 ng der Vektor-DNA und des Inserts. Im Anschluß wurde der Ansatz phenolisiert und gefällt und das Pellet in einer entsprechenden Menge H₂O bidest. gelöst.

2.2.3 Vorbereitung von Bakterienzellen für Elektroporationen (Böttger, 1988)

5 ml einer Übernachtskultur eines Bakterienstammes wurden zu 1000 ml LB-Medium gegeben und bis zum Erreichen einer OD₅₅₀ von 0,6 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach 10 minütigem Abkühlen auf Eis erfolgte für 15 min bei 4°C eine Zentrifugation bei 15000xg. Es erfolgten anschließend Waschschrte des Bakterienpellets mit zunächst 1000 ml 1mM HEPES pH 7, dann 500 ml 1mM HEPES und schließlich mit 20 ml kaltem 10 % Glycerin. Abschließend wurden die Bakterien in 2,5 ml kaltem 10 % Glycerin resuspendiert, zu je 40 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff gefroren und bei –70 °C aufbewahrt.

2.2.4 Elektroporation (Böttger, 1988; Calvin und Hanawalt, 1988)

Eine zuvor mit 70%igem Alkohol und sterilem Wasser gereinigte Küvette wurde auf Eis kalt gestellt. Die entsprechend vorbereiteten Bakterienzellen (vgl. 2.2.3)

wurden auf Eis aufgetaut und etwa 100 ng der ligierten DNA einpipettiert. Anschließend erfolgte die sofortige Elektroporation unter folgenden Bedingungen: Kapazität 25 μ F, Spannung 2,5 kV, Widerstand 400 Ω . Nun wurde mit einer Pasteurpipette 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium (2% Bacto-Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose) hinzu gegeben und dieser Ansatz für eine Stunde bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Abschließend wurde die Suspension in geeigneten Verdünnungen auf LB-Agarplatten, die mit einem selektierenden Antibiotikum versetzt waren, ausplattiert. Die Platten wurden schließlich über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.2.5 Colony Blot für DNA-DNA-Hybridisierungen (Sambrook *et al.*, 1989)

Für den Colony Blot wurden auf Agarplatten gewachsene transformierte Bakterienkolonien verwendet, wobei die Verdünnungen der Bakteriensuspensionen so gewählt worden waren, daß pro Platte etwa 400-500 Einzelkolonien anwachsen konnten. Um zunächst die Kolonien von der Platte abzuziehen, wurde ein Nylon-Filter vorsichtig aufgelegt und hierbei die exakte Position des Filters auf der Platte markiert. Nach dem Abheben des Filters wurden die Agarplatten erneut im Brutschrank bei 37°C über Nacht inkubiert, um die Kolonien nachwachsen zu lassen. Der nun Bakterien-bestückte Filter wurde mit der Kolonieseite nach oben für 5 min auf ein mit 10% SDS getränktes Filterpapier gelegt, um die Bakterien zu lysieren. Anschließend folgten weitere Passagen auf getränktem Filterpapier für jeweils 5 min mit 0,5 M NaOH/ 1,5 M NaCl zur Denaturierung der chromosomalen DNA, 1,5 M NaCl/ 0,5 M Tris-Cl pH 8,0 und 2xSSPE zur Neutralisation. Nach einer Trockenphase von 30-60 min bei Raumtemperatur wurde die DNA per Crosslinking mit UV-Licht auf der Filtermembran fixiert.

2.2.6 Hybridisierung mit DIG-markierten DNA-Sonden

Die Filter mit der fixierten Bakterien-DNA wurden zunächst für 20 min bei 57°C in 5xSSC, 0,5% SDS und 1 mM EDTA gewaschen und anschließend das

verbliebene Koloniematerial mit einem Kleenextuch abgewischt und die Filter erneut bei Raumtemperatur getrocknet. Zum Absättigen der freien Bindungsstellen wurden die Filter dann eine Stunde lang bei 68°C mit Hilfe der Hybridisierungslösung DIG EasyHyb vorhybridisiert. Danach wurde die zuvor denaturierte DIG-markierte DNA-Sonde zugegeben und die Filter bei 60°C damit über Nacht inkubiert. Nach der Hybridisierung wurden die Filter unter Schütteln zweimal 5 min in 2xSSC und 0,1% SDS bei Raumtemperatur gewaschen sowie anschließend zweimal 15 min in 0,1xSSC und 0,1% SDS bei 60°C.

Die Detektion der markierten DNA erfolgte durch einen Enzymimmunoassay mit Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmenten, die an eine alkalische Phosphatase gekoppelt waren. Die Visualisierung erfolgte mittels Chemilumineszenzreaktion durch Zugabe des Substrates CSPD, dessen enzymatische Dephosphorylierung zu einer Licht-emission führt. Die Exposition eines Röntgenfilmes führte an den Orten der Lichtemission zu einer Schwärzung des Filmes.

2.2.7 Stripping von DNA-Blots

Nach Hybridisierung und Detektionsverfahren wurden die Filter zunächst in H₂O bidest. abgespült und daraufhin 2x15 min bei 37°C in 0,2 M NaOH und 0,1% SDS gewaschen, um die DIG-markierte Sonde wieder zu entfernen. Nach erneutem Waschen in 2xSSC konnten die Filter für eine neue Hybridisierung verwendet werden. Die Aufbewahrung erfolgte in 2xSSC-Lösung.

2.2.8 Southern Blot (Southern, 1975)

Die DNA-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese in einem 0,8% TBE-Agarosegel bei 150V aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden in Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht fotografiert. Es erfolgte ein 30 minütiger Depurinierungsschritt in 0,25 M HCl, anschließende die ebenso lange Equilibrierung in 0,4 N NaOH. Für den Transfer der DNA auf Nitrozellulose wurde zunächst ein etwa 5 cm hoher Stapel Papiertücher aufgeschichtet, auf dem drei dünne Filterpapiere, in Gelgröße zurecht geschnitten, gelegt wurden.

Hierauf wurde zunächst die ebenfalls gelgroße Nitrozellulosemembran aufgelegt und darüber das ausgeschnittene Agarosegel. Den Abschluß des Aufbaus bildeten zwei weitere Lagen dünnen Filterpapiers bedeckt von einer Lage dickem Filterpapier, das seitlich mit den Enden in zwei Schalen, gefüllt mit dem Transferpuffer 0,4 N NaOH eintauchte. Obenauf wurde eine Glasplatte gelegt, die mit einem etwa 500 g schweren Gewicht beschwert wurde. Vor dem Aufbau wurden alle Filterpapiere sowie die Nitrozellulosemembran im Transferpuffer equilibriert. Nach 2,5 h Transferdauer wurden beim Abbau zunächst die Taschen des Gels vorsichtig auf der NC-Membran nachgezeichnet. Die Membran wurde für 2 mal 10 min in 2xSSC gewaschen, danach luftgetrocknet und die DNA durch Crosslinking fixiert. Die weitere Verfahrensweise entsprach der Anleitung zur Hybridisierung mit DNA-Sonden, wobei beim Southern Blot eine Hybridisierungstemperatur von 50°C gewählt wurde.

2.2.9 PCR

2.2.9.1 PCR (Saiki *et al.*, 1988)

Zur Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte wurde die PCR eingesetzt, unter Zuhilfenahme spezifischer Oligonukleotide (Primer), die den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankieren. Der Reaktionsablauf wurde in einem Thermocycler durchgeführt, wobei der Zyklus aus Denaturierung des DNA-Doppelstranges, Annealing sowie Polymerase-Reaktion (Extension) 36 Mal durchlaufen wurde. Die Annealingtemperatur ergab sich aus den Schmelztemperaturen T_m der jeweils verwendeten Primer, und wurde so gewählt, daß sie 2°C unter der niedrigeren der beiden Schmelztemperaturen lag. Die Denaturierung bei 94°C sowie das Annealing erfolgten für jeweils eine Minute, die Polymerase-Reaktion bei 72°C erfolgte für 1,5 Minuten. Für den letzten Zyklus wurde die Extensionszeit auf 10 Minuten verlängert, um sicher zu stellen, daß die Enden des amplifizierten PCR-Produktes aufgefüllt wurden. Für den Reaktionsansatz wurden 5 µl 10xPuffer, 2 µl $MgCl_2$, 10 µl Enhancer, 5 µl dNTP-Gemisch, jeweils 1 µM der beiden Primer, 2,5 U Powerscript-Polymerase

und 1 µl der template-DNA (20-100 ng) mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt. Als Matrizen-DNA kamen sowohl Plasmide als auch chromosomale DNA, zum Teil in Form von Bakterienkolonien, die direkt von der Platte gepickt wurden, zur Verwendung. Zum Schluß wurde der Reaktionsansatz mit zwei Tropfen Mineralöl als Verdunstungsschutz überschichtet. Parallel wurde zu jeder PCR eine Negativkontrolle durchgeführt, wobei jeweils der gleiche Ansatz ohne Zugabe der template-DNA pipettiert wurde.

2.2.9.2 PCR-Aufreinigung

Um nach abgelaufener Reaktion das PCR-Produkt aus dem Ansatz aufzureinigen, wurde der QIAquick PCR PurificationKit von QIAGEN eingesetzt. Hierbei wurde die gesamte Probe verwendet und die Reinigung den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

2.2.10 Sequenzierung (Sanger *et al.*, 1977)

Die Sequenzierungen wurden mit dem Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit von Perkin Elmer nach der automatisierten Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger durchgeführt. An die zu sequenzierende DNA lagert sich der komplementäre Primer an, und durch die Polymerase wird ein Gegenstrang synthetisiert. Der Einbau von Didesoxynukleotiden bedingt einen Kettenabbruch der Polymerisation, so daß DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge entstehen. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Fragmente erfolgt die automatisierte Auswertung der Nukleotidsequenz.

2.2.11 Konservierung von Bakterienstämmen

Zur Aufbewahrung von *E. coli* - und *Legionella*-Stämmen wurden die Kolonien einer möglichst dicht bewachsenen Agarplatte mit einem sterilen Wattetupfer abgenommen und in 1,0 ml Einfriermedium (Standard I Nährbouillon mit 20% Glycerin) resuspendiert. Diese Aliquots wurden dann bei -70°C eingefroren.

2.2.12 Kultur von Legionellen

Zur Anzucht von Legionellen erfolgte auf CYE Legionellen-Agar mit BCYE Wachstumszusatz und MWY Selektivzusatz. Die Beimpfung der Platten erfolgte durch Ösenausstrich oder mittels eines Wattetupfers. Es wurde für 48 h bei 37°C unter 10% CO₂ inkubiert.

3. Ergebnisse

3.1 Identifizierung der Mutation in einem LPS-Synthese-Gen der Mutante 137 von *Legionella pneumophila* Sg 1

Der *L. pneumophila* Sg 1 Stamm 137 ist eine spontane, stabile LPS-Mutante, die von dem LPS-spezifischen mAk 2625 nicht gebunden wird. Die Rekonstitution des vom mAk 2625 erkannten LPS-Epitops war möglich, durch Transformation der Mutante 137 mit dem Plasmid pEL281 (siehe 1.4). Zum Zeitpunkt der Aufnahme dieser Arbeit lag bereits die komplette Sequenz des 3 kb Inserts von Plasmid pEL281 vor. Um die Mutation bei der Mutante 137, die zum Verlust der mAk 2625 Reaktivität führte, zu ermitteln, wurde der entsprechende 3 kb Bereich aus dem Chromosom der Mutante 137 mittels PCR amplifiziert. Für die Amplifikation sowie für die anschließende Sequenzierung des PCR-Produktes, wurden die Oligonukleotid-Primer verwendet, die bereits aus der Sequenzierung der Plasmide pEL281 und pEL28 zur Verfügung standen. Der Sequenzvergleich zwischen Wildtyp 5097 und der LPS-Mutante 137 zeigte das Fehlen eines Cytosinrestes im Genom der Mutante, 88 Nukleotide stromabwärts des ATG-Start-Codons eines offenen Leserasters, das später als Orf 8 bezeichnet wurde (Abb. 2). Diese Deletion führt zu einer Verschiebung des Leserasters, darüber hinaus sind polare Effekte auf die abwärts liegenden Leseraster nicht auszuschließen (Abb. 3). Datenbankvergleiche ergaben, daß Orf 8 Homologien zu Methyltransferase-Genen von anderen Bakterien aufwies (Geller *et al.*, 1993). Zu diesem Zeitpunkt waren jedoch keinerlei Methylgruppen als Bestandteil des LPS von *L. pneumophila* bekannt, obwohl das LPS der Serogruppe 1 bereits eingehend chemisch analysiert worden war (Zähringer *et al.*, 1995). Diese Homologie zu Methyltransferasen erlaubte also zunächst keine Lokalisierung des mAk 2625 Epitops innerhalb der chemischen Struktur des LPS von *L. pneumophila* Sg 1.

```

TCA ACTGTCGCG CAATAC AAGAACTACTAT CATTAT ATTTCC GAC GGCTGG AGCAAAGAACCTAAAGAAATGTTTC 75
M S T V A Q Y K N Y Y H Y I S D G W S K E P K E M

AAATTTCTTGCC CAAAAAATTAAGAGTTG CCATTA AAGCCT GGA AGCAAACCTATTA GATATAGGATGTGCAACA 150
F K F L A Q K I K E L P L K P G S K L L D I G C A

GGA GAATTA ATTCATTTTTT GAGTAAACATTTCCCA CAACTG CAG TATACC GGAATAGATGTTTTT GATGACTTG 225
T G E L I H F L S K H F P Q L Q Y T G I D V F D D

ATTGAGGTATGTAAAGTACTACAACCG AATGTAATTTTTATT AATGCATCAGCCTTG GATCTGCCTTTTGAATTT 300
L I E V C K V L Q P N V N F I N A S A L D L P F E

GAAAATCAATTTGATATTACTGTTGTAAGTGTATTCTATCTTCGATACTATCGACTTAGATATATTCTGG 375
F E N Q F D I I T V V S V I S I F D T I D L D I F

GATAATCTCTTTAAAGCAACC AAAGATAACGGAGTA ATCTATGTC TTGTCA CCATTTAATGAATATGGGGTA GAT 450
W D N L F K A T K D N G V I Y V L S P F N E Y G V

TGTGAAATACGACATAGAAAAGAATAAATAATATT AAAGGGGAATGGGAGCGCGGTGG AATATTTTTTGT AAA 525
D C E I R H R K R I N N I K G E W E R G W N I F C

GAAACGATAGCAGAATATCTTGAGGGT CGTTGTA AAAAATTGG TTTTTCCAT CCTTTC AAATTTAATCTTGAATTG 600
K E T I A E Y L E G R C K N W F F H P F K F N L E

AATCAGCGTGAAGACGTAATTAGAACC TGG ACAATG AAAACC GAGTTTAATGATAAGCAA TTA ACT AATGGTATG 675
L N Q R E D V I R T W T M K T E F N D K Q L T N G

AAATTACTG GTA GATCATTATTTATTA GAAATTCACATA 714
M K L L V D H Y L L E I H

```

Abb. 2. Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des Orf 8 von *L. pneumophila* Sg 1 Stamm 5097. Der markierte Cytosinrest ist bei der Mutante 137 deletiert und führt zu einer Verschiebung des Leserasters. Am rechten Rand ist die Anzahl der Nukleotide angegeben. Start- und Stopcodon sind nicht dargestellt.

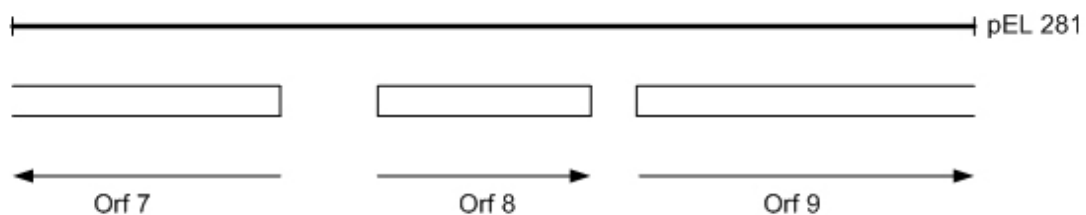


Abb. 3. Schematische Darstellung des 3 kb Inserts von pEL281 mit den offenen Leserastern 7, 8 und 9. Die Leserichtung ist durch Pfeile dargestellt. An Position 88 des Orf 8 befindet sich die Mutation bei Mutante 137.

3.2 Klonierung von LPS-Biosynthese-Genen von *Legionella pneumophila* Sg 1 Stamm RC1

3.2.1 Erstellung einer Genbank des *Legionella pneumophila* Stammes RC1

Im Anschluß an die Untersuchung des avirulenten Wildtyp-Stammes 5097, war es nun das Ziel, die entsprechenden LPS-Synthese-Gene sowie flankierende Genombereiche des virulenten Wildtyp-Stammes RC1 zu klonieren. Daher wurde eine Genbank des Stammes RC1 von *L. pneumophila* in *E. coli* erstellt, um diese im Colony Blot mit Gensonden zu screenen. Diese Gensonden leiteten sich aus dem Bereich des Inserts des Plasmids pEL28, mit dem die Komplementierung der LPS-Mutante 137 erfolgt war, ab.

Zur Erstellung der Genbank wurde zunächst chromosomale DNA des Stammes RC1 mit Hilfe des Enzyms *Sau3A* partiell restringiert. Hierbei wurden Restriktionsfragmente in der Größenordnung von 9 bis 15 kb gewonnen (Abb. 4).

Die somit erhaltenen Fragmente wurden in den Plasmidvektor pBC ligiert, der zuvor mit dem Enzym *Bam*HI geschnitten, und mit alkalischer Phosphatase zweimal dephosphoryliert worden war. Die entstandenen Ligationsprodukte wurden anschließend durch Elektroporation in *E. coli* SURE transformiert.

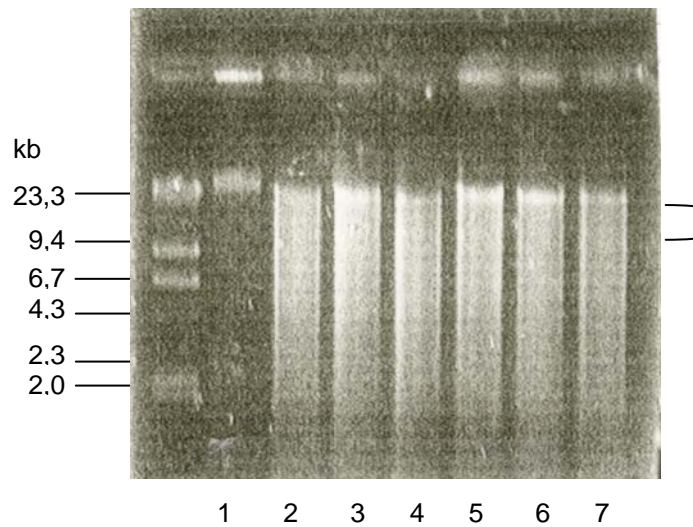


Abb. 4. Auftrennung von Restriktionsfragmenten in einem 0,6%igen Agarosegel. Die partielle Restriktion der chromosomalen DNA von *L. pneumophila* Sg 1 Stamm RC1 wurde mit dem Enzym *Sau3A* durchgeführt. Um eine ausreichende Menge an Fragmenten zu erzielen, wurde der Verdau sechsfach durchgeführt (Spuren 2-7). Zum Vergleich ist in Spur 1 ungeschnittene chromosomale DNA des Stammes RC1 aufgetragen. An der rechten Seite ist der Längenbereich markiert, der für die Klonierungen verwendet wurde.

3.2.2 Präparation von DNA-Sonden

Für die Colony-Hybridisierung der *E. coli*-Klone wurden drei unterschiedliche DNA-Sonden hergestellt, mit deren Hilfe LPS-Biosynthese-Gene aus der Genbank des Stammes RC1 detektiert werden sollten. Dafür wurden zunächst drei PCR-Fragmente generiert, die aus den bisher bekannten Sequenzen abgeleitet waren. Als PCR-template wurde chromosomale DNA des Stammes RC1 verwendet. Die drei entstandenen PCR-Fragmente erhielten die Bezeichnung A, B und C und wurden im Anschluß mit Digoxigenin markiert, so daß sie als Sonden für die folgenden DNA-DNA-Hybridisierungen zur Verfügung standen.

3.2.3 DNA-Hybridisierung von Colony Blots

Zur Identifizierung von LPS-Biosynthese-Genen im Genom von RC1 erfolgte die DNA-DNA-Hybridisierung der markierten Sonden mit der RC1-Genbank. Dazu wurden die transformierten *E. coli* SURE auf LB-Agarplatten, denen zur Selektion Chloramphenicol zugesetzt worden war, ausplattiert und über Nacht bebrütet. Anhand von Vorversuchen war zuvor das Volumen der auszuplattierenden Aliquots ermittelt worden, so daß pro Agarplatte eine Koloniezahl von 350-450 Kolonien erzielt wurde. Das Koloniematerial wurde auf Nitrozellulosefilter abgezogen und, nach einer lytischen Behandlung zur Freilegung des DNA-Materials, über Nacht mit jeweils einer der Sonden hybridisiert. Durch die folgenden Wasch- und Detektionsschritte erfolgte im Fall der Sondenbindung an die freiliegende DNA die positive Signalgebung durch eine Lumineszenzreaktion (Abb. 5). Insgesamt wurden etwa 12000 Klone auf das Vorhandensein der LPS-Biosynthese-Gene untersucht.

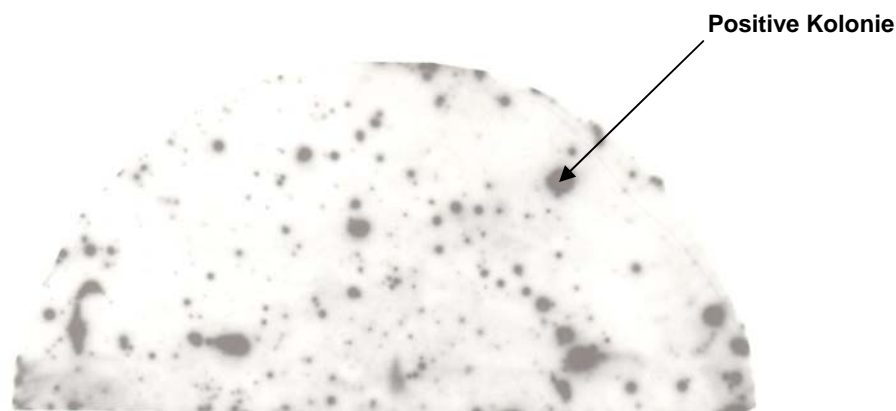


Abb. 5. Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt eines Röntgenfilmes. Durch eine Chemilumineszenzreaktion erfolgt im Fall der Sondenbindung an die DNA einer Bakterienkolonie eine Lichtemission, die zur Schwärzung des Röntgenfilmes führt. Der Pfeil markiert das Signal einer Kolonie, bei der die Sondenbindung stattgefunden hat.

Durch Zuordnung von Agarplatte, Nitrozellulosefilter und Röntgenfilm anhand von zuvor angebrachten Markierungen wurden die positiven Klone isoliert.

3.2.4 Charakterisierung der isolierten Klone

Nach der erfolgten Zuordnung der positiven Signale zu den entsprechenden Kolonien, wurden diese von der Agarplatte gepickt und über Nacht in LB-Nährmedium unter Zusatz von Chloramphenicol angezüchtet. In der folgenden Tabelle ist die Anzahl der isolierten positiven Klone für die einzelnen Sondenhybridisierungen aufgelistet:

Sonde	Anzahl der positiven Klone
A	18
B	17
C	12

Tab. 1. Isolierte positive Klone der Sonden-Hybridisierungen

Aus den angezüchteten *E. coli*-Kolonien wurden anschließend die Plasmide isoliert. Die Überprüfung der Plasmide erfolgte im Southern Blot. Dazu wurden durch Verdau mit den Enzymen *NotI* und *EcoRI*, die die *Bam*HI cloning site des Vektors pBC flankieren, die jeweiligen DNA-Inserts aus den isolierten Plasmiden geschnitten. Nach Auftrennung der erhaltenen Fragmente im Agarose-Gel (Abb. 6) wurde die DNA auf Nylonfilter geblottet und mit den jeweiligen Sonden, mit denen die einzelnen Klone detektiert worden waren, hybridisiert.

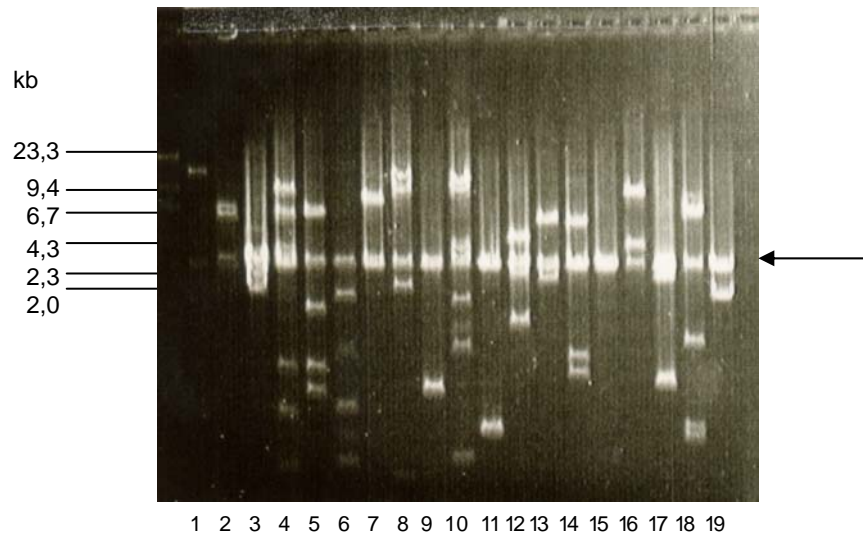


Abb. 6. Elektrophoretische Auftrennung der Fragmente der 18 isolierten Klone aus der Hybridisierung mit Sonde A (Spuren 2-19) nach Restriktion mit den Enzymen *NotI* und *EcoRI*, die die cloning site des Vektors flankieren, in 0,8%igem Agarosegel. Der Pfeil zeigt auf die Bande bei 3,4 kb, die in allen Spuren durch den Vektor pBC nach dem Herausschneiden des Inserts entsteht. In Spur 1 ist der Vektor p28 nach Verdau mit *NotI* und *EcoRI* zur Kontrolle aufgetragen.

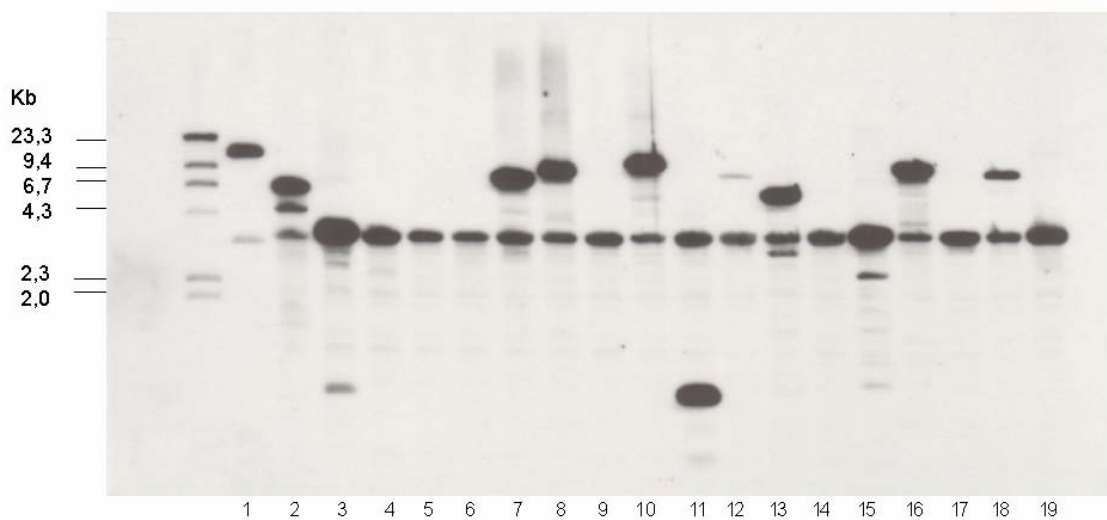


Abb. 7. Southern Blot Analyse der 18 isolierten Klone aus der Hybridisierung mit Sonde A. In dieser Kontrollhybridisierung zeigen die Inserts der Klone der Spuren 2, 3, 7, 8, 10, 11, 13, 15 und 16 eine positive Reaktion. Die Vektorbande zeigt bei 3,4 kb ein Hintergrundsignal.

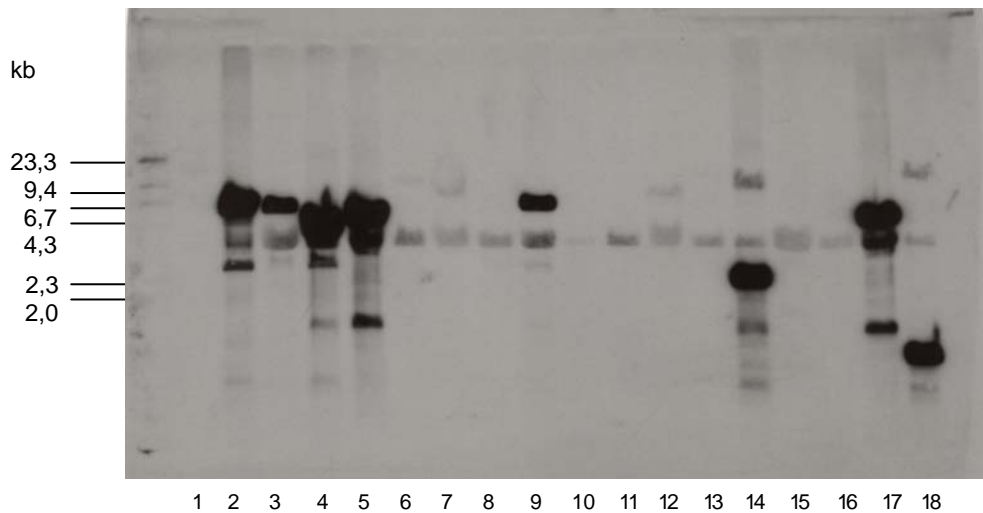


Abb. 8. Southern Blot Analyse der 17 Klone aus der Hybridisierung mit Sonde B. Die Inserts der Klone der Spuren 2, 3, 4, 5, 9, 14, 17 und 18 zeigen in der Kontrollhybridisierung eine positive Reaktion mit der Sonde. In der Spur 1 ist wie in Abb. 6. Vektor-DNA von p28 nach Verdau mit *NotI* und *EcoRI* zur Kontrolle aufgetragen.

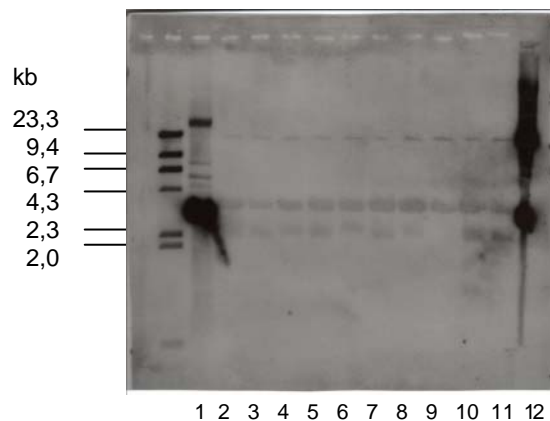


Abb. 9. Southern Blot Analyse der 12 Klone (Spuren 1-12) der Hybridisierung mit Sonde C. Die Inserts der Klone in den Spuren 1 und 12 zeigen ein positives Signal in der Kontrollhybridisierung.

Von den 18 Klonen, die mit der Sonde A detektiert worden waren, konnten in der Kontrollhybridisierung 9 Klone als positiv bestätigt werden (Abb. 7). Die Überprüfung der 17 Klone, die mit der Sonde B entdeckt worden waren, zeigte 8 positive Klone (Abb. 8) und bei Sonde C blieben 2 von 12 Klonen in der Kontrollhybridisierung positiv (Abb. 9).

Sonde	Anzahl der ursprünglichen Klone	Anzahl der bestätigten Klone	Bezeichnung der daraus präparierten Plasmide
A	18	9	pNZA1-9
B	17	8	pNZB10-17
C	12	2	pNZC18-19

Tab. 2. Darstellung der Anzahl der ursprünglichen und der im Southern Blot bestätigten Klone der einzelnen Selektionen, sowie der Bezeichnung der daraus isolierten Plasmide.

3.2.5 Sequenzanalyse der klonierten DNA Fragmente

Aus den insgesamt 19 positiven Klonen wurde die Plasmid-DNA präpariert, um genügend Material für die nachfolgenden Sequenzierungen zur Verfügung zu haben. Zunächst wurden die klonierten RC1-Fragmente von beiden Enden her mit den Vektorprimern T3 und T7, welche die cloning site flankieren, ansequenziert.

Nach der Ansequenzierung wurde durch Primer-Walking jeweils weiter in die Inserts hinein sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der pEL28 Sequenz sowie untereinander verglichen. Um Überlappungen und Doppelsequenzierungen zu vermeiden, wurden die Plasmide pNZA6, pNZB17, pNZB13 und pNZA1 zur vollständigen Sequenzierung ausgewählt (Abb. 10). Diese vier Plasmide wurden durch Primer-Walking vollständig sequenziert, so daß schließlich eine Gesamtsequenz von 32 661 bp erhalten wurde. Die gefundenen 30 offenen Leseraster (Orf), die in 5 Operons organisiert sind, wurden anschließend mit Hilfe von Datenbankvergleichen analysiert. Damit war erstmals ein LPS-Biosynthese-Gencluster von *L. pneumophila* identifiziert und charakterisiert.

3.2.6 Homologien der ermittelten Leserahmen der genomischen Sequenzen des Stammes RC1

300 Basenpaare stromabwärts des 5'-Endes des pNZA6-Inserts beginnt das Startcodon des ersten offenen Leserahmens Orf 1. Das Genprodukt, das sich aus der Basensequenz ableiten lässt, enthält zwei transmembranöse Abschnitte im Bereich der Positionen 13 bis 35 und 266 bis 288 der abgeleiteten Aminosäuresequenz, bei einer Gesamtlänge von 339 Aminosäuren und einem kalkulierten Molekulargewicht von 38,9 kDa. Anhand des Vergleichs der Sequenzhomologien mit vorhandenen Sequenzen aus Datenbanken, ergibt sich für das Genprodukt des 1017 bp langen Orf 1 eine 28%ige Identität und 44%ige Homologie der Sequenz zum Protein WbbL, von *E. coli* (Liu und Reeves, 1994, Yao und Valvano, 1994). In *E. coli* K12 (O16) codiert das *wbbL*-Gen für die dTDP-Rhamnosyl-Transferase, ein Enzym, das den Zucker Rhamnose auf den Glukoserest der O-Ketten-Untereinheit überträgt. Stromabwärts von Orf 1 ist Orf 2 lokalisiert, ein 891 bp langes DNA-Fragment, das für ein 297 Aminosäuren großes Protein von 33,7 kDa kodiert, das ebenso wie bei Orf 1, Homologien zum WbbL von *E. coli* aufweist (23% Identität, 37% Homologie). Die aus der Basensequenz abgeleiteten Aminosäuresequenzen von Orf 1 und Orf 2 zeigten untereinander 26% Identität und 41% Homologie. Eine Kodierung beider Gene für eine Rhamnosyl-Transferase wäre somit möglich. Im äußeren Core-Anteil des Stammes Philadelphia von *L. pneumophila* Sg 1 sind zwei Rhamnosereste beschrieben worden (Zähringer *et al.*, 1995, Moll *et al.*, 1997). Demnach könnten zwei Rhamnosyl-Transferasen für den Aufbau des Core-Oligosaccharids beim Stamm RC1, der zu der Subgruppe OLDA der Sg 1 von *L. pneumophila* gehört, benötigt werden. Die Orfs 3-7 sind 13 Nukleotide stromabwärts des Orf 2-Stop-Codons lokalisiert und verlaufen in der entgegengesetzten Transkriptionsrichtung. Der 1146 bp lange Orf 3 könnte für ein 382 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 44,4 kDa kodieren. Zu der Aminosäuresequenz, die sich aus diesem Orf 3 ableitet, konnten keine signifikanten Homologien gefunden werden.

Die Orfs 4 und 5 schließen direkt an Orf 3 an, und ihre abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte signifikante Homologie zu Proteinen der ABC-Transporter-Familie, die üblicherweise am Aufbau von bakteriellen Oberflächenpolysacchariden beteiligt ist. Der Orf 4 kodiert für ein 54 kDa großes Protein, das vermutlich eine ATP/GTP-Bindungsstelle (GQNGCGKS, Position 97-104) enthält. Die abgeleitete Aminosäuresequenz, zeigt im Bereich zwischen den Positionen 80 bis 364 39% Identität und 60% Homologie zum Protein RfbB von *Myxococcus xanthus* (Guo *et al.*, 1996), das vermutlich die ATP-Bindungsstelle eines ABC-Transporters darstellt, der für die Translokation des LPS O-Antigens benötigt wird. In ähnlichem Umfang konnten Homologien zum Protein Wzt (RfbB) von *Klebsiella pneumoniae* (Bronner *et al.*, 1994, Kelly und Whitfield, 1996) beobachtet werden, dessen Aufgabe es ist, das LPS O-Antigen über die zytoplasmatische Membran zu transportieren. Darüber hinaus wurden Homologien geringeren Ausmaßes zu weiteren bakteriellen ABC-Transporter-Proteinen gefunden. Unter anderem zum AbcA-Protein von *Aeromonas salmonicida* (Chu und Trust, 1993), zu TagH von *Bacillus subtilis* (Lazarevic und Karamata, 1995), zu Wzt (RfbE) von *Yersinia enterocolitica* (Zhang *et al.*, 1993), zu KpsT von *E.coli* (Smith *et al.*, 1990), zu CtrD von *Neisseria meningitidis* (Frosch *et al.*, 1991) und dem BexA-Protein von *Haemophilus influenzae* (Kroll *et al.*, 1988). Die meisten dieser Proteine haben ihre Funktion in der Translokation von Oberflächenpolysacchariden des LPS O-Antigens oder der Kapsel über die Zellmembran.

Der folgende Orf 5 kodiert für ein Protein, das, anhand der abgeleiteten Aminosäuresequenz, 8 Membranhelices enthalten könnte, und das 24% Identität und 48% Homologie zum RfbA-Protein von *Myxococcus xanthus* (Guo *et al.*, 1996), sowie 26% Identität und 46% Homologie zum RfbA-Protein von *Klebsiella pneumoniae* (Bronner *et al.*, 1994, Kelly und Whitfield, 1996) aufweist. Anhand dieser Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz, ist anzunehmen, daß die Orfs 4 und 5 der ABC-2 Subfamilie der ABC-Transporter angehören, die in die Translokation der LPS O-Antigene über die Innenmembran involviert ist (Reizer *et al.*, 1992). In Anlehnung an die Gennomenklatur für bakterielle Oberflächenpolysaccharide nach Reeves *et al.* (Reeves *et al.*, 1996) wurden die Orfs 4 und 5 *wzt* und *wzm* bezeichnet.

Orf 6 kodiert für ein Protein von 62,8 kDa Größe, aus dessen Aminosäuresequenz sich drei transmembranöse Helices im Bereich der Positionen 105-124, 230-253 und 423-446 ableiten ließen. Die Sequenz dieses Proteins zeigte jedoch keinerlei Homologie zu bekannten Proteinen in der Datenbank. Auffallend war im Sequenzvergleich zwischen den Stämmen RC1 und 5097 der Subgruppe OLDA, daß sich im Bereich dieses Orf 6 der Stamm 5097, am C-terminalen Ende des Proteins, in 99 Aminosäuren von RC1 unterscheidet. Trotz dieses Sequenzunterschieds haben beide Stämme eine transmembranöse Region im Bereich der Positionen 105-124. Aus Orf 7 ergibt sich eine Aminosäuresequenz für ein 59 kDa großes Protein, wobei jedoch ebenso wie bei Orf 6 keine Homologie zu bekannten Proteinen festzustellen war.

Der folgende Orf 8 ist durch 315 bp vom vorhergehenden Leserahmen getrennt, und führt in die entgegengesetzte Transkriptionsrichtung. Im Bereich der intergenischen Region, zwischen Orf 7 und 8, befinden sich die Promoterregionen der beiden Transkriptionseinheiten. Die Aminosäuresequenz, die sich aus Orf 8 ableiten ließ, zeigte Homologien (Homologie zwischen 45 und 52 %) zu bakteriellen Methyltransferasen des Menaquinon- und Cyclopropanfettsäuren- Phospholipidwegs (Geller *et al.*, 1993, Wang *et al.*, 1992).

Im Bereich der Positionen 90 bis 368 zeigt das Protein, das sich aus der Sequenz von Orf 9 ableiten läßt, 23% Identität und 42% Homologie zum SpsE-Protein (ipa-67d) von *B. subtilis* (Glaser *et al.*, 1993). Das SpsE-Protein ist involviert in die Synthese der Sporenhüllenpolysaccharide des Bakteriums, jedoch die exakte Funktion ist bislang noch ungeklärt. Außerdem zeigt das Orf 9-kodierte Protein 25% Identität zum SiaC-Protein von *N. meningitidis* (Edwards *et al.*, 1994), einer Sialinsäuresynthetase. Ebenso zeigt auch das Genprodukt von Orf 24 Homologien zu diesem Protein, der Grund für das Vorhandensein zweier redundanter SiaC-Homologe ist jedoch ungeklärt.

Aus der Aminosäuresequenz, die sich von Orf 10 ableitet, ergibt sich ein membrangebundenes Protein mit einer transmembranösen Helix. Das Protein, das sich aus der Sequenz von Orf 11 ableitet, könnte zwei Helices enthalten. Beide Genprodukte, sowie auch das von Orf 12, zeigten keine signifikante

Homologie zu bekannten Aminosäuresequenzen der Datenbanken. Insgesamt ist die Funktion der Gene von Orf 8 bis 12 bislang unbekannt, jedoch die Einflußnahme dieser Region auf die LPS-Biosynthese konnte gezeigt werden, durch die Komplementierung der LPS-Mutante 137, deren Mutation im Bereich des Orf 8 identifiziert werden konnte. (siehe 3.1)

Auf Orf 12 folgt eine intergenische Region von 368 bp Länge. Daran schließt sich eine lange Transkriptionseinheit an, die insgesamt 16 Orfs umfaßt (Orf 13 bis Orf 28). Die Mehrheit der Proteine, die durch diese Leseraster kodiert werden, zeigt deutliche Homologien zu bekannten Proteinen der Lipopolysaccharid-Biosynthese, die von anderen gramnegativen Bakterien bekannt sind. Orf 13, am Transkriptionseende dieses Operons gelegen, kodiert für ein 36,3 kDa großes Protein mit einer transmembranösen Helix, das jedoch keine Homologien zu bekannten Proteinsequenzen aufweist. Durch Orf 14 könnte ein 38,5 kDa großes hydrophobes Protein mit 11 transmembranösen Helices kodiert werden. Es zeigt eine moderate Sequenzhomologie von 23% Identität und 40% Homologie zum Rfe (*WecA*)-Protein von *H. influenzae* (Fleischmann *et al.*, 1995). Dieses Protein stellt eine UDP-GlcNAc:undecaprenylphosphat GlcNAc-1-phosphat-Transferase dar, die einen und-PP-GlcNAc-Primer bildet, der für die Initialisierung der Wzy-unabhängigen O-Antigen-Synthese notwendig ist (Whitfield, 1995; Whitfield *et al.*, 1997). Jedoch die Lokalisierung des möglichen *wecA*-Gens inmitten eines Genclusters für die Rhamnose-Biosynthese (siehe unten), unterscheidet sich von den bekannten Anordnungen bei anderen gramnegativen Bakterien. Bei *E. coli* beispielsweise liegt das *wecA*-Gen (früher *rfe*) in unmittelbarer Nähe der für die Core-Oligosaccharid-Synthese verantwortlichen *rfa*-Operons (Raetz, 1996).

Die Sequenz des Orf 15 zeigt Homologie (37% Identität und 57% Homologie) zum Protein GalE von *Vibrio cholerae* O139 (Comstock *et al.*, 1996). GalE ist eine UDP-Galactose-Epimerase und wurde bei *V. cholerae* auf Grund seiner Homologie zu GalE von *N. meningitidis* so benannt (Comstock *et al.*, 1996).

Die Gene der Orfs 16, 18, 19 und 20 konnten zusammengefaßt werden als Rhamnose-Biosynthese-Gene. Entsprechend den Homologien zu bekannten Rhamnose-Biosynthese-Genen anderer gramnegativer Bakterien (Jiang *et al.*, 1991), wurden diese Orfs als *rmIA*, *rmIB*, *rmID* und *rmIC* bezeichnet. Im

Gegensatz zu den Enterobakterien war in diesem Fall die Reihenfolge der Gene C, D, B und A. Darüberhinaus unterbricht eine durch Orf 17 codierte Glukose-6-Phosphat-Isomerase (Gpi) zwischen A und B die Reihenfolge. Das durch Orf 17 kodierte Protein zeigt deutliche Homologien zu zahlreichen Gpi-Enzymen, beispielsweise 39% Identität und 55% Homologie mit der *E. coli*-Gpi (Froman *et al.*, 1989).

An die Rhamnose-Biosynthese-Gene schließt sich Orf 21 an, der für ein 32 kDa großes lösliches Protein kodiert, das Homologie zu verschiedenen Proteinen der DegT/DnaJ/EryC1-Familie zeigt (Bult *et al.*, 1996, Glaser *et al.*, 1993, Jiang *et al.*, 1991). Es wird vermutet, daß die Mitglieder dieser Proteinfamilie eine Funktion als Regulatorproteine ausüben, indem sie Umweltsignale aufnehmen und entsprechend Gene aktivieren oder hemmen. Gemeinsame Charakteristika dieser Proteine sind die Membranverankerung und Helix-turn-Helix-Motive. Beide konnten bei dem Orf 21-Protein nicht entdeckt werden. Insgesamt muß die Funktion des durch Orf 21 kodierten Proteins noch weiter untersucht werden.

Die aus Orf 22 abgeleitete Aminosäuresequenz von 419 Aminosäuren entspricht einem Protein mit einem Molekulargewicht von 45 kDa. Die Aminosäuren der Positionen 100 bis 210 zeigten signifikante Homologien zum CysE-Protein von *Synechocystis sp.* (Kaneko *et al.*, 1996) und zu NodL von *Rhizobium meliloti* und *R. leguminosarum* (Baev und Kondorosi, 1992, Downie, 1989). Dies sind lösliche Acetyl-Transferasen, und die homologen Abschnitte könnten im Bereich des für die enzymatische Aktivität verantwortlichen Anteils liegen. Es wurde bereits gezeigt, daß das Core-Oligosaccharid von *L. pneumophila* Sg 1 Subgruppe Philadelphia, zahlreiche Acetylgruppen enthält (Zähringer *et al.*, 1995; Knirel *et al.*, 1996; Moll *et al.*, 1997). Es besteht daher die Möglichkeit, daß das Genprodukt des Orf 22 für die Acetylierung von Core-Zuckern verantwortlich sein könnte. Es fanden sich keinerlei Homologien zum *lag-1*-Gen (Zou *et al.*, 1999), das für die membrangebundene O-Acetyltransferase kodiert, die für den Transfer einer Acetylgruppe auf Position C8 der Legionaminsäure, verantwortlich ist.

Das Protein, das sich aus der Sequenz von Orf 23 ableitet, enthält 377 Aminosäuren und besitzt eine Größe von 42 kDa. Zudem konnten Homologien

zu bakteriellen N-Acetyl-Glukosamin-2-Epimerasen gefunden werden. Beispielsweise 30% Identität zum *siaA*-Genprodukt von *N. meningitidis* (Edwards *et al.*, 1994), 22% Identität und 41% Homologie zu WecB (RfbC) von *Salmonella borreze* (Keenleyside und Whitfield, 1995) und 28% Identität und 41% Homologie zu WecB von *E. coli* (Kiino *et al.*, 1993). Die Aufgabe des Enzyms ist es, N-Acetyl-D-Glukosamin in N-Acetyl-D-Mannosamin zu überführen, welche schließlich ein Vorläufer der N-Acetyl-Neuraminsäure (NANA, Sialinsäure) ist. Die Legionaminsäure, das strukturelle Zuckermolekül der *L. pneumophila* O-Kette, ist ein Sialinsäure-Derivat. Nach den Vorschlägen von Reeves (Reeves *et al.*, 1996) wurde Orf 23 *mnaA* genannt.

Das Genprodukt von Orf 24 zeigt signifikante Homologien (45% Identität und 63% Homologie) zum hypothetischen Protein MJ1065 von *Methanococcus jannaschii* (Bult *et al.*, 1996), sowie zum SpsE-Protein (ipa-67d) von *B. subtilis* (35% Identität und 52% Homologie) (Glaser *et al.*, 1993). Die Funktion beider Proteine ist bislang ungeklärt. Desweiteren wurde eine 31%ige Identität zum SiaC-Protein von *N. meningitidis* (Edwards *et al.*, 1994) beobachtet. Das SiaC-Protein dient als Neu5Ac-Kondensierungsenzym, das die Biosynthese der Sialinsäure durch Kondensation von N-Acetyl-Mannosamin und Phosphoenolpyruvat katalysiert. Diese Entdeckung ließ daher den Schluß zu, daß es sich beim Genprodukt von Orf 24 um das Neu5Ac-Kondensierungsenzym handelt und es wurde somit *neuB* benannt.

Die 232 Aminosäuren, die sich aus der Sequenz des Orf 25 ableiten, ergeben ein Protein mit einem Molekulargewicht von 25,8 kDa. Dieses Protein zeigt auffällige Homologien zu NeuA-Proteinen von zahlreichen Bakterien, darunter NeuA von *E. coli* (Zapata *et al.*, 1989), *N. meningitidis* (Edwards und Frosch, 1992) und *H. influenzae* (Fleischmann *et al.*, 1995). Die Homologie zu diesen Proteinen beträgt zwischen 54% und 50%. Das Protein NeuA ist eine Acylneuraminat-Cytidylyl-Transferase (CMP-Neu5Ac-Synthetase), welche die Synthese von CMP-N-Acetylneuraminsäure katalysiert. Dabei stellt CMP-Neu5Ac das aktivierte Molekül dar, das zur Polysialinsäure polymerisiert wird. Auf diesen Sequenzähnlichkeiten basierend wurde Orf 25 *neuA* benannt. Das Produkt des *neuA*-Gens ist möglicherweise verantwortlich für die Aktivierung der Legionaminsäure, die vor der Polymerisation der O-Kette stattfinden

müsste. Es ist somit anzunehmen, daß die Gene der Orfs 23-25 für die Legionaminsäure-Biosynthese kodieren.

Die Orfs 26 und 27 zeigen große Homologien zu Genen der Histidin-Biosynthese, *hisH* und *hisF* (Delorme *et al.*, 1992, Fani *et al.*, 1989). Die Beobachtung, daß Histidin-Biosynthese-Gene den LPS-Genlokus flankieren, findet sich konstant in der genomischen Organisation von LPS-Biosynthese-Genen bei Enterobakterien, wobei das *his*-Operon an den *rfb*-Genlokus (Schnaitman und Klena, 1993) grenzt. Die übrigen Orfs 28-30 zeigen keinerlei signifikante Homologie zu bekannten Sequenzen der Datenbanken.

Der 32 kb große Genombereich beinhaltet drei Promoterregionen. Die erste davon liegt stromaufwärts von Orf 1, die zweite in der intergenischen Region zwischen Orf 7 und Orf 8, und die dritte in der intergenischen Region zwischen Orf 28 und Orf 29. Jede dieser Regionen umschließt die regulatorischen Elemente für zwei in entgegengesetzter Richtung transkribierte Operons. In allen Fällen wurde eine -10 und -35-Sequenz entdeckt. Es wurde hingegen keine JUMPstart-Sequenz gefunden, die ein konserviertes 39 bp großes Stück darstellt, das stromaufwärts von einigen bakteriellen Genloci lokalisiert ist, die in die Oberflächenpolysaccharidsynthese involviert sind (Hobbs und Reeves, 1994). Stromabwärts von Orf 12 wurde eine 32 bp große Palindromsequenz gefunden, die als Rho-unabhängiger Terminator dienen könnte. Stromabwärts von Orf 2, Orf 3 und Orf 13 wurden keine Sequenzen gefunden, die Terminatorsequenzen, weder Rho-abhängig noch Rho-unabhängig, ähnelten. Die Charakteristika der isolierten und sequenzierten Gene sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Orf	Position	Molekular- gewicht [kDa]	IP[pH]	A+T- Gehalt %	Homologien
1	303-1322	38,9	9,2	64,8	Rhamnosyl-Transferase
2	1316-2209	33,7	9,0	66,2	Rhamnosyl-Transferase
3	3371-2223	44,4	8,8	68,5	-
4	4801-3377	54,0	9,3	62,9	Wzt / ABC-Transporter- Familie
5	5650-4798	31,9	9,6	62,0	Wzm / ABC-Transporter Familie
6	7262-5617	62,8	8,8	69,2	-
7	9012-7495	59,2	8,9	69,5	-
8	9328-10047	28,3	5,6	67,8	Methyltransferase
9	10059-11150	40,6	6,0	63,3	SpsE / Syntheseprotein für Sporenhüllenpolysaccharide SiaC / Sialinsäuresynthetase
10	11140-12141	39,2	8,5	67,5	-
11	12152-13261	42,3	6,8	65,0	-
12	13264-15060	69,9	5,6	67,8	-
13	16404-15334	39,1	9,0	64,9	-
14	17523-16518	38,5	8,6	71,1	WecA / Transferase zur Initialisierung des Wzy- unabhängigen O-Antigen- Syntheseweges
15	18463-17507	36,1	8,0	66,1	GalE / UDP-Galactose- Epimerase
16	19359-18484	33,0	6,1	61,6	RmlA / Rhamnose- Biosynthese
17	21009-19516	56,1	5,9	64,5	Glukose-6-Phosphat- Isomerase
18	22103-21048	40,2	6,3	64,6	RmlB / Rhamnose- Biosynthese

19	22947-22063	33,4	6,9	61,8	RmlD / Rhamnose-Biosynthese
20	23514-22948	21,5	5,4	64,2	RmlC / Rhamnose-biosynthese
21	24446-23604	31,9	8,9	61,7	DegT-Familie / Regulatorproteine
22	25728-24469	45,0	6,0	58,6	Acetyl-Transferase
23	26851-25717	42,1	6,0	61,5	MnaA (NeuC,SiaA) / Sialinsäuresynthese
24	27874-26858	37,0	5,1	61,6	NeuB (SiaC) / Sialinsäuresynthese
25	28569-27871	25,8	5,7	61,5	NeuA (SiaB) / Sialinsäuresynthese
26	29223-28582	23,3	5,1	60,1	HisH / Histidin-Biosynthese
27	29982-29344	23,0	5,3	59,1	HisF / Histidin-Biosynthese
28	31364-29982	53,6	6,6	60,7	-
29	31524-32342	31,0	8,7	60,8	-
30	32381-32661				Unvollständige Sequenz

Tab. 4. Tabellarische Darstellung der Orfs und der daraus abgeleiteten Proteine mit Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt.

3.3 Sequenzanalyse der Mutante 811

In den folgenden Untersuchungen wurde ein Sequenzvergleich der bislang detektierten LPS-Biosynthese-Gene des *L. pneumophila* Sg 1 Stammes RC1 und den homologen DNA-Abschnitten der entsprechenden LPS-Mutante 811 durchgeführt. Das Ziel dieser Untersuchung war es, Hinweise auf den molekularen Mechanismus der phänotypischen LPS-Variation der Mutante zu finden. Die gesamte Länge des analysierten Sequenzabschnittes zwischen dem Wildtyp RC1 und der LPS-Mutante 811 beträgt 15970 bp (Abb. 11). Der Abschnitt beginnt im Bereich des Orf 6 und endet im Bereich von Orf 19 (Tab. 5). Insgesamt finden sich in diesem Abschnitt an 11 Stellen Differenzen

zwischen den Basensequenzen der beiden Stämme. Ein Vergleich von PCR-Fragmenten von Wildtyp und Mutante die jeweils mit den gleichen Primern generiert worden waren, zeigte keine Unterschiede in den Fragmentlängen der PCR-Produkte. Zusammenfassend finden sich einige einzelne Sequenzunterschiede, jedoch resultiert daraus keine Verschiebung des Leserasters, und es ergibt sich kein Hinweis auf die molekulare Ursache der Phasenvariation.

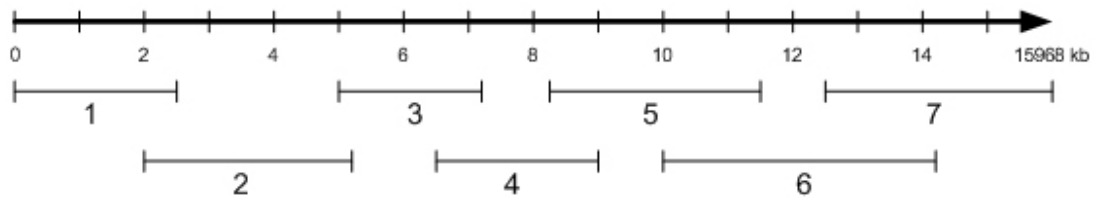


Abb. 11. Schematische Darstellung der 7 PCR-Fragmente von *L. pneumophila* Sg 1 Mutante 811. Die Länge der Gesamtsequenz beträgt 15968 bp und überlappt mit der Sequenz des Stammes RC1 in den Bereichen von Orf 6 bis Orf 19 (vgl. Abb. 10).

Fragment	Position
1	1-2675
2	2083-5124
3	5012-7151
4	6512-9025
5	8248-11438
6	10997-14112
7	12570-15968

Tab. 5. Liste der PCR-Fragmente der Mutante 811 mit Angabe der Positionen in der Gesamtsequenz

3.4 Verteilung von LPS-Biosynthese-Genen in der Gattung *Legionella*

3.4.1 Erstellung von Gensonden

Nachdem im Genom des Stammes RC1 ein etwa 32 kb großer DNA-Bereich gefunden werden konnte, der Sequenzen enthält, die LPS-Biosynthese-Genen entsprechen, sollte die Frage beantwortet werden, ob Abschnitte dieser Sequenz auch in anderen Stämmen der Gattung *Legionella* vorkommen.

Um diese homologen Sequenzen zu detektieren, wurden zunächst aus dem 32 kb großen Sequenzbereich von RC1 sechs Gensonden durch Restriktion oder per PCR erstellt und mit Digoxigenin markiert.

3.4.2 Southern Blot-Hybridisierungen

Die *Legionella*-Stämme, deren Genom nach LPS-Biosynthese-Genen durchsucht werden sollte, wurden zu drei Gruppen zusammen gefaßt.

- 16 Stämme von *Legionella pneumophila* Serogruppe 1
- 11 Stämme der weiteren *L. pneumophila*-Serogruppen 2-14
- 18 non-*pneumophila* Legionellen-Stämme und *Pseudomonas fluorescens*

Die chromosomale DNA dieser Stämme wurde jeweils mit dem Enzym *Hind*III restringiert, und die Fragmente der Verdauung in der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die DNA der resultierenden Agarosegele wurde via Southern Blot auf Nitrozellulosefolie übertragen. Diese wurden dann jeweils mit den verschiedenen Sonden hybridisiert. Die Sonden enthalten folgende offenen Leseraster (siehe auch Abb. 10):

- Sonde 1: Orf 1-3
- Sonde 2: Orf 4-8
- Sonde 3: Orf 8-13
- Sonde 4: Orf 12-19
- Sonde 5: Orf 19-26
- Sonde 6: Orf 23-30

Eine positive Reaktion mit Sonde 1, die den Bereich der Orfs 1 bis 3 umfaßt, zeigten alle Stämme der Serogruppe 1 von *L. pneumophila*, des weiteren *L. pneumophila* Serogruppe 7 (Abb. 13) und *L. sainthelensi* als einziger non-*pneumophila*-Stamm. Da der Bereich der Orfs 1 bis 3 Homologien zu Rhamnosyl-Transferasen enthält, kann also davon ausgegangen werden, daß das Vorkommen von Rhamnosereisten im Core-Anteil des LPS eine Gemeinsamkeit dieser Stämme darstellt. Diese Beobachtung wird dadurch bekräftigt, daß ebenso alle genannten Stämme mit der Sonde 4 reagieren. Diese beinhaltet die Orfs 12 bis 19, welche Homologien zu Rhamnose-Biosynthese-Genen enthalten.

Alle Stämme der Serogruppe 1, alle getesteten Stämme der weiteren Serogruppen, sowie *L. jamestowniensis* und *L. sainthelensi* als non-*pneumophila* Stämme zeigten gemeinsam eine positive Reaktion mit den Sonden 5 und 6 (ohne Abbildung), die Homologien zu Genen der Legionaminsäure-Synthese enthalten und insgesamt den Bereich der Orfs 19 bis 30 umfassen. Es ist daher eine Strukturähnlichkeit im Aufbau der O-Kette dieser Stämme anzunehmen.

Da alle Stämme der Serogruppe 1, die Serogruppe 7 und *L. sainthelensi* mit der Sonde 2 reagierten (Abb. 14), welche im Bereich der Orfs 4 bis 8 Homologien zum ABC-Transporter-System enthält, ist anzunehmen, daß dieses System bei den genannten Stämmen zur Translokation von Oberflächenpolysacchariden dient. Eine positive Reaktion mit der Sonde 3, die den Bereich von Orf 8 bis 13 abdeckt, zeigte außer allen Stämmen der Serogruppe 1 (Abb. 12) lediglich noch *L. sainthelensi*. Insgesamt scheinen vor allem die Stämme *L. jamestowniensis*, *L. sainthelensi* und *L. pneumophila* Serogruppe 7 im Bereich der LPS-Biosynthese Ähnlichkeiten zu den Stämmen der Serogruppe 1 aufzuweisen.

Im Rahmen der Southern Blot-Hybridisierungen mit den verschiedenen Sonden wurde auch jeweils eine Probe mit chromosomaler DNA von *Pseudomonas fluorescens* untersucht, da das O-Antigen dieses Stammes Legionaminsäure enthält, die sich nur im Grad der O-Acetylierung von der Legionaminsäure des Stammes Philadelphia 1 von *L. pneumophila* Sg 1 unterscheidet (Helbig *et al.*, 1995; Knirel *et al.*, 1995; Knirel *et al.*, 1996). Ein positives Signal der Sonden mit diesem Stamm konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

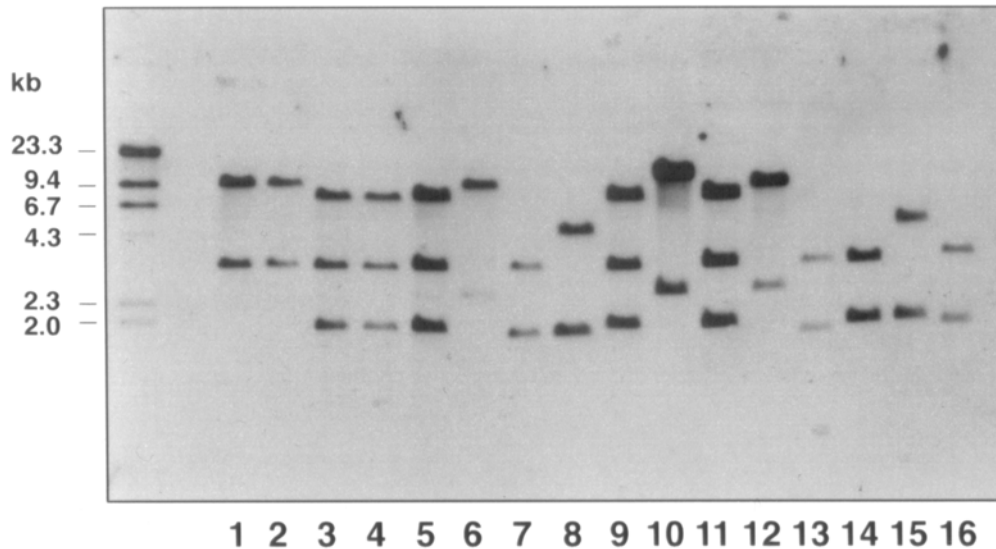


Abb. 12. DNA von *L. pneumophila* Sg 1-Stämmen hybridisiert mit Sonde 3. Alle Stämme zeigen eine Reaktion mit der Sonde. Die Verteilung der DNA der einzelnen Stämme auf die Spuren des Blots erfolgte gemäß der nachfolgenden Reihenfolge: OLDA Wildtyp RC1; LPS-Mutante 811; OLDA Wildtyp 5097; Mutante137; Philadelphia (ATCC 33152); Camperdown (ATCC 43113); Allentown (NCTC 12024); Bellingham (NCTC 11404); Cambridge (NCTC 11231); Heysham (NCTC 12025); Kingston (NCTC 11378); Knoxville (ATCC 33153); Benidorm (ATCC 43108); France (ATCC 43112); Washington (NCTC 11201); Pontiac (NCTC 11191).

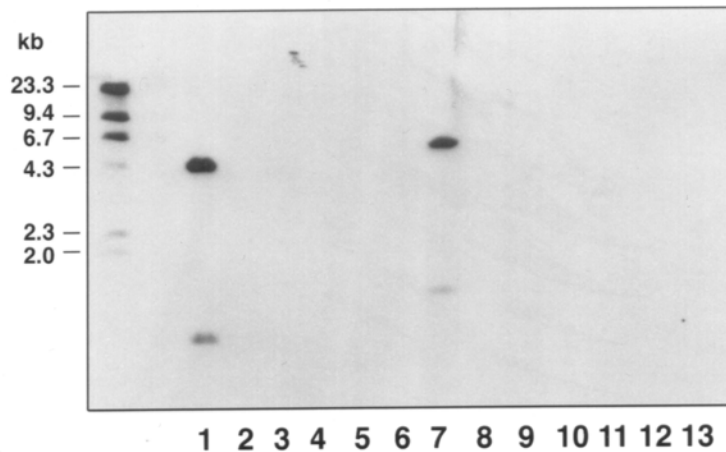


Abb. 13. DNA von *L. pneumophila* Sg 2-14 hybridisiert mit Sonde 1. Eine Reaktion zeigen lediglich die Stämme RC1 (Vergleichsstamm) und Sg 7. Die DNA der Stämme wurde nach folgendem Schema aufgetragen: Sg 1 Stamm RC1; Sg 2 (ATCC 33154); Sg 3 (ATCC 33155); Sg 4 (ATCC 33156); Sg 5 (ATCC 33216); Sg 6 (ATCC 33215); Sg 7 (ATCC 33823); Sg 8 (ATCC 35096); Sg 9 (ATCC 35289); Sg 10 (ATCC 43283); Sg 12 (ATCC 43 290); Sg 13 (ATCC 43 736); Sg 14 (ATCC 43 703).

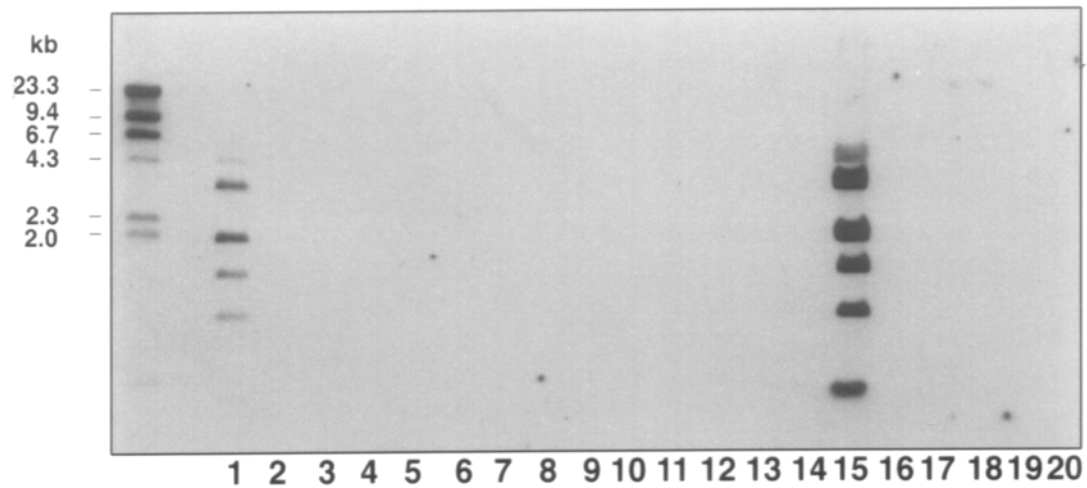


Abb. 14. DNA von non-*pneumophila*-Stämmen hybridisiert mit Sonde 2. Eine Reaktion zeigt außer Stamm RC1 nur *L. sainthelensi*. Folgende Stämme wurden in den Spuren des Blots aufgetragen: OLDA Wildtyp RC1; *P. fluorescens* (ATCC 49271); *L. cherrii* (ATCC 35252); *L. gormanii* (ATCC 33 297); *L. steigerwaltii* (ATCC 35302); *L. maceachernii* (ATCC 35300); *L. hackeliae* (ATCC 35250); *L. anisa* (ATCC 35291); *L. feeleii* (ATCC 35 072); *L. parisiensis* (ATCC 35 299); *L. dumoffii* (ATCC 33279); *L. oakridgensis* (ATCC 33761); *L. jamestowniensis* (ATCC 35298); *L. wadsworthii* (ATCC 33877); *L. sainthelensi* (ATCC 35248); *L. rubrilucens* (NCTC 11987); *L. longbeachae* (ATCC 33462); *L. micdadei* (ATCC 33204); *L. bozemanii* (ATCC 33217); *L. jordanis* (ATCC 33623).

4. Diskussion

4.1 Phänotypische LPS-Variation bei *Legionella pneumophila*

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung der LPS-Biosynthese-Gene von *Legionella pneumophila*. In vorangehenden Untersuchungen konnte eine LPS-Mutante, genannt Mutante 811, des virulenten Stammes RC1 von *L. pneumophila* Sg 1 Subgruppe OLDA identifiziert werden. Diese avirulente Mutante zeigte einen instabilen Phänotyp, das heißt, es war eine Phasenvariation zwischen dem LPS-Phänotyp des Wildtyps RC1 und der Mutante 811 zu beobachten. Gefördert wurde diese Phasenvariation besonders im Meerschweinchen-Tiermodell und durch Inkubation mit humanem Serum (Lüneberg *et al.*, 1998). Die Variation von Oberflächenkohlenhydraten bei *L. pneumophila*, zumal dem LPS als wichtigstem immunogenen Antigen der Bakterienoberfläche (Ciesielski *et al.*, 1986), könnte einen Selektionsvorteil darstellen, der die Adaptation an unterschiedliche Umweltbedingungen erleichtern könnte. Auf Grund des Spektrums der verschiedenen Wirtszellen, Protozoen und Alveolarmakrophagen (Fields, 1996), scheinen Anpassungsmechanismen an die variierenden Lebensbedingungen notwendig für das Überleben und die Vermehrung der Legionellen zu sein. Beispielsweise zeigen bereits Legionellen, die *in vitro* auf Agarplatten angezüchtet wurden signifikante Unterschiede bezüglich der Oberflächenproteine, des LPS und der Struktur der Fettsäuren im Vergleich mit Legionellen, die in Amöben herangewachsen waren (Barker *et al.*, 1993). Die Phasenvariation von Oberflächen-Kohlenhydraten durch hochfrequentes, reversibles Switchen von Zuckerepitopen ist bereits von verschiedenen Gram-negativen Bakterien bekannt. So wird bei *Haemophilus influenzae* die Expression von Enzymen der LPS-Biosynthese durch multiple Repeats von Nukleotid-Tetrameren der *lic*, *lex2* und *IgtC*-Genloci kontrolliert (Weiser *et al.*, 1989, Jarosik und Hansen, 1994, Hood *et al.*, 1996). Hierbei führt eine Veränderung der Anzahl der Nukleotid-Tetramere zu einer Verschiebung des Leserasters und schließlich zur Nicht-Expression der betreffenden Gene. Einem vergleichbaren Mechanismus entsprechend, hängt die Expression der Gene des *Igt*-Locus, die bei Neisserien

für Glycosyltransferasen der LPS-Biosynthese kodieren, von der Anzahl der Guanosin-Reste in einem Poly-G-Stretch der Sequenz ab (Gotschlich, 1994, Jennings *et al.*, 1995, Yang und Gotschlich, 1996). Diese Formen der phänotypischen LPS-Variation, hervorgerufen durch intragenische Veränderungen, wird als Virulenzmechanismus angesehen, der den Bakterien eine Adaptation an unterschiedliche Umweltbedingungen ermöglicht (Roche und Moxon, 1995). Über die Mechanismen der LPS-Phasenvariation bei *L. pneumophila* war zum Zeitpunkt der Aufnahme dieser Arbeit nichts bekannt.

4.2 LPS-Biosynthese-Gene von *Legionella pneumophila*

Ebenso waren die für die LPS-Biosynthese notwendigen Gene bei *L. pneumophila* nicht identifiziert. Da in Analogie zu anderen Gram-negativen Bakterien der molekulare Mechanismus der Phasenvariation bei *L. pneumophila* zunächst als Veränderung an den LPS-Biosynthese-Genen vermutet werden konnte, war es notwendig diese Gene zu finden und zu charakterisieren.

Aus vorherigen Arbeiten stand dafür als Ausgangsmaterial ein kurzer DNA-Abschnitt zur Verfügung, der durch die Komplementierung der stabilen LPS-Mutante 137, die als spontane Mutante aus einem avirulenten *L. pneumophila* Stamm hervorgegangen war, isoliert werden konnte. Auf diesem kurzen DNA-Abschnitt mußten Gensequenzen liegen, die an der Ausbildung des mAk 2625-Epitops beteiligt waren, da die Mutante 137 (ebenso wie die Switch-Mutante 811) nicht mehr vom mAk 2625 gebunden wurde. Daher wurde in dieser Arbeit zunächst der DNA-Abschnitt, der für die Rekonstitution des mAk 2625-Epitops ausreichte, sequenziert. Die Sequenzierung des entsprechenden DNA-Bereiches bei der Mutante ergab eine Deletion in einem offenen Leserahmen, der später als Orf 8 bezeichnet wurde. Die von Orf 8 abgeleitete Proteinsequenz zeigte Homologien zu bakteriellen Methyltransferasen. Bis zu diesem Zeitpunkt waren allerdings keine Methylgruppen als LPS-Substituenten bei *L. pneumophila* identifiziert worden, obwohl die chemische Struktur des LPS von *L. pneumophila* bekannt war (Zähringer *et al.*, 1995, Knirel *et al.*, 1994). Interessanterweise fanden sich in neueren Untersuchungen der Arbeitsgruppe

Zähringer (Forschungszentrum Borstel) N-Methylgruppen als Substituenten der Legionaminsäure, der strukturellen Einheit der LPS-O-Kette bei *L. pneumophila*. Diese N-Methylgruppen konnten auch als Bestandteil des mAk 2625-Epitops identifiziert werden (Kooistra *et al.*, 2002a, Kooistra *et al.*, 2002b). N-Methyl-Substituenten in der Struktur, wie sie hier bei allen untersuchten *L. pneumophila* Stämmen gefunden wurden, waren bisher bei bakteriellen Oberflächen-Polysacchariden unbekannt.

In weitergehenden Arbeiten konnte auch gezeigt werden, dass der Verlust des mAk 2625-Epitops allein nicht ausreicht, um einen Virulenzverlust bei *L. pneumophila* zu induzieren (Kooistra *et al.*, 2002b). Es handelt sich offenbar vielmehr um eine von mehreren phänotypischen Veränderungen, die durch die Phasenvariation hervorgerufen werden (Lüneberg, 2002). Der aus vorangegangenen Untersuchungen zur Verfügung stehende DNA-Bereich wurde ebenfalls zum Screening einer Genbank von *L. pneumophila* in *E. coli* eingesetzt. Auf diese Weise konnte ein 32 kb umfassender Genbereich isoliert werden.

Die Analyse der 30 möglichen Orfs, die sich aus der 32 kb umfassenden Sequenz der chromosomalen DNA des Stammes RC1 von *L. pneumophila* Sg 1 Subgruppe OLDA ableiten lassen, zeigt für ein Großteil der ermittelten Orfs Homologien zu Genen der Core- und O-Ketten-Synthese. Beispielhaft für mögliche Gene der Core-Synthese stehen die Orfs 1, 2, 16, 18, 19 und 20, deren Genprodukte an der Rhamnose-Biosynthese und dem Transfer der Rhamnosereste in den Bereich des äußeren Coreabschnitts beteiligt sein könnten. Ebenso wäre eine Beteiligung einer Acetyl-Transferase, als potentielles Genprodukt des Orf 22, am Transfer der O-Acetyl-Gruppen auf die Zuckerreste des Core-Abschnitts denkbar. Aus Untersuchungen der Arbeitsgruppen Lück (Dresden) und Zähringer (Borstel) ist bereits das *lag-1*-Gen bekannt, das für eine O-Acetyl-Transferase kodiert, die im Stamm Philadelphia 1 der Serogruppe 1 die Legionaminsäure O-acetyliert, während dies bei Stämmen der Subgruppe OLDA nicht der Fall ist. Insgesamt wird jedoch die Existenz mehrerer Acetyl-Transferasen angenommen, die für die O-Acetylierung der Core-Region und kurzkettiger O-Polysaccharide verantwortlich sind (Kooistra *et al.*, 2001).

Die möglichen Genprodukte, die sich aus den Orfs 23, 24 und 25 ableiten lassen, könnten an der Synthese der Legionaminsäure, und somit an der O-Ketten-Synthese, beteiligt sein. Um die mögliche Funktion, welche die abgeleiteten Genprodukte einnehmen könnten, zu bestätigen, wurden weiterführende Experimente mit K1-Kapsel-defekten *E. coli*-Mutanten durchgeführt. Die Transformation des Orf 25 in den *neuA*-defekten *E. coli*-Stamm führt durch Expression der CMP-Neu5Ac-Synthetase zur Komplementierung, und somit zur erneuten Kapselexpression. Entsprechend führt die Transformation des Orf 24 in den *neuB*-defekten Stamm über die Expression des Neu5Ac-condensing Enzyms zur Kapselexpression (Lüneberg *et al.*, 2000a). Da die Kapseln dieser *E. coli*-Stämme aus Polyneuraminsäure bestehen, weist die Komplementierung der K1 Kapsel-defekten Mutanten zudem auf eine Analogie zwischen der Legionamin- und der Sialinsäuresynthese, und einen möglichen gemeinsamen molekularen Ursprung der Synthesegene, hin. Ob *L. pneumophila* das Gencluster der Orfs 23-25 jedoch von einem anderen gramnegativen Bakterium übernommen hat, bleibt bislang Spekulation.

Als weitere potentielle Gene der O-Ketten-Synthese können die Orfs 4 und 5 angeführt werden mit ihrer Homologie zu Proteinen der ABC-Transporter-Familie. Das Vorkommen von Proteinen dieses Transporters spricht für eine Variante der O-Ketten-Synthese bei *L. pneumophila*. Dieser Weg ist bekannt von O-Ketten-Homopolymeren bei *E. coli* und *K. pneumoniae*, und führt zu einer sequenziellen Verlängerung der wachsenden O-Kette, die an ein Akzeptormolekül angeheftet wird. Es finden sich hierbei keine Rfc- oder Rol-Proteine, die sonst für den Erhalt der strukturellen Genauigkeit und der Kettenlänge verantwortlich sind. Entsprechend konnten *rol*-homologe Gene auch in der bisherigen untersuchten Sequenz nicht gefunden werden. Es wird vermutet, daß auch für diese Form der O-Ketten-Synthese Regulatorenzyme vorhanden sein müssen, die jedoch bislang auch für andere Bakterienstämme noch unbekannt sind. Für das Protein Rfe, das als Initiationsenzym dieses Syntheseweges angesehen wird, konnte bei Orf 14 eine moderate Homologie gefunden werden, während weitere Homologien zu Enzymen der Rfb-Genfamilie bislang noch fehlen. Da die Polymerisationsreaktion der O-Kette im

Bereich des Zytoplasmas vermutet wird, im Gegensatz zum periplasmatischen Raum beim Wzy-abhängigen Syntheseweg, wird der ABC-Transporter als integrales Membranprotein mit ATP-Bindungsstelle benötigt, um den Komplex an die Zelloberfläche zu translozieren (Whitfield, 1995; Whitfield *et al.*, 1997). Zusammenfassend ist festzustellen, daß in dem untersuchten Sequenzabschnitt potentielle Gene der LPS-Biosynthese des Core-Abschnitts und der O-Kette bei *L. pneumophila* gefunden wurden, diese stellen jedoch nicht die Gesamtheit aller LPS-Biosynthese-Gene von *L. pneumophila* dar und weiterführende Untersuchungen sind notwendig, um beispielsweise die Gene einer Legionaminsäurepolymerase oder –transferase zu identifizieren.

Untersuchungen über die Verteilung der LPS-Biosynthese-Gene des Genclusters in der Gattung *Legionella* ergaben Hinweise für homologe Gene in allen weiteren untersuchten Stämmen der Serogruppe 1, was auf einen ähnlichen LPS-Aufbau schließen läßt. Bekannt ist die LPS-Struktur jedoch nur von den Subgruppen Philadelphia 1 und OLDA. (Zähringer *et al.*, 1995, Lüneberg *et al.*, 1998). Für die weiteren untersuchten Serogruppen kann nur für die Serogruppe 7 ein potentielles Vorhandensein der Rhamnosyl-Transferase und des ABC-Transporters spekuliert werden, was zumindest Übereinstimmungen im Core-Abschnitt wahrscheinlich macht. Alle weiteren getesteten Serogruppen zeigten Homologien zu den Genen der Legionaminsäure-Synthese, jedoch nicht zum ABC-Transporter was ebenso für den non-*pneumophila*-Stamm *L. jamestowniensis* gilt. Dies wäre durch ein unterschiedliches O-Kettensynthese-System bei gleich bleibenden Grundeinheiten der O-Kette denkbar. Es könnte sich demnach hierbei um ein Rol- und Rfc-abhängiges Synthesesystem handeln. Überraschenderweise zeigte der non-*pneumophila*-Stamm *L. sainthelensi* Übereinstimmungen in allen untersuchten Abschnitten des Genclusters. Eine strukturelle Ähnlichkeit zu den Stämmen der Serogruppe 1 wäre daher möglich. Als Pneumonieerreger im Rahmen von Endemien ist *L. sainthelensi* bereits in Erscheinung getreten, jedoch weniger häufig als Stämme der Serogruppe 1 (Loeb *et al.*, 1999, Benson *et al.*, 1990). Im Rahmen der non-*pneumophila*-Stämme wurde auch eine Probe von *Pseudomonas fluorescens* getestet, deren O-Antigen auch Legionaminsäure enthält. Jedoch konnte keine Übereinstimmung mit den

gefundenen LPS-Synthese-Genen gefunden werden, was möglicherweise auf einer nur geringen Sequenzübereinstimmung beruht (Lüneberg *et al.*, 2000a).

4.3 Der molekulare Mechanismus der Phasenvariation bei *Legionella pneumophila*

Der Vergleich der Sequenzen der LPS-Biosynthese-Gene des Wildtyp-Stammes RC1 und der LPS-Mutante 811 zeigte einige Unterschiede in Form von Basenaustauschen oder Deletionen einzelner Basen, es fand sich jedoch kein Hinweis auf eine Verschiebung des Leserasters. Ebenso konnten keine Repeats tetramerischer Nukleotide, wie bei *Haemophilus*, oder ein Poly-G-Stretch wie bei Neisserien festgestellt werden. Zusammenfassend ergaben sich aus den hier untersuchten Sequenzabschnitten keine Hinweise auf den molekularen Mechanismus der Phasenvariation des LPS bei *L. pneumophila*. Durch weiterführende Untersuchungen von Lüneberg *et al.* konnte inzwischen jedoch dieser Mechanismus entschlüsselt werden. Die Grundlage der LPS-Phasenvariation bildet ein 30 kb großes instabiles genetisches Element, das im virulenten Wildtyp RC1 in das Bakterienchromosom integriert ist, während es in der Mutante 811 außerhalb des Bakterienchromosoms als high-copy-Plasmid vorliegt. Die Phasen-Variation korreliert mit dem Auftreten dieses 30 kb-Elements, dessen Gene teilweise Homologien zu Genen der DNA-Rekombination und zu Bakteriophagen-Genen aufweisen, somit wäre eine Herkunft aus einem Bakteriophagen-Genom möglich. Hingegen wurden keine Homologien zu LPS-Biosynthese-Genen oder Genen der Synthese von Oberflächenpolysacchariden gefunden. Ein direkter Einfluß des 30 kb-Elements auf die Phasenvariation des LPS scheint daher unwahrscheinlich, es ist eher denkbar, daß ein Genprodukt, das in der high-copy-Phase des Plasmids exprimiert wird, mit einem Regulatorprotein interferiert und somit zur Phasenvariation führt (Lüneberg *et al.*, 2000b). An der Zelloberfläche der Mutante 811 konnten zwei Proteine gefunden werden, die durch das 30 kb-Plasmid kodiert werden, so daß von einer Expression der Plasmid-gebundenen Gene auszugehen ist. Weitere phänotypische Unterschiede zwischen Wildtyp-Stamm RC1 und der Mutante 811 konnten inzwischen gefunden werden.

So besitzt die Mutante nicht nur eine geringere Virulenz und Serumresistenz, sie besitzt auch keine Flagellen im Gegensatz zum Wildtyp. Ebenso ist die Oberflächenladung weniger negativ und es gibt Hinweise auf Veränderungen des LPS, die nicht nur den Kohlehydratanteil, sondern auch das Lipid A betreffen. Eine mögliche Erklärung für die multiplen phänotypischen Veränderungen die durch die Phasenvariation hervorgerufen werden, könnte beispielsweise die Beteiligung eines Regulatorproteins sein, dessen Funktion durch Genprodukte des 30 kb-Elements behindert werden könnte (Lüneberg *et al.*, 2000b; Lüneberg, 2002). Wodurch der Virulenzverlust der Mutante 811 verursacht wird, kann derzeit noch nicht sicher festgestellt werden. Ebenso bleibt die Frage offen, worin der selektive Vorteil der Phasenvariation durch die Integration eines instabilen genetischen 30 kb-Elements liegt.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals ein LPS-Biosynthese-Gencluster von *L. pneumophila*, das 30 Gene umfaßt, kloniert und sequenziert. In Voruntersuchungen konnte für den virulenten Stamm RC1 von *L. pneumophila* Sg 1 Subgruppe OLDA mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers mAk 2625, der ein Epitop im Bereich des LPS dieses Stammes bindet, eine spontane, instabile LPS-Mutante isoliert werden. Einhergehend mit der Phasenvariation des LPS-Epitops zeigte sich zudem ein Verlust von Virulenz und Serumresistenz der Mutante. Um Zugang zum molekularen Mechanismus der Phasenvariation des LPS zu bekommen, erfolgte zunächst die Komplementierung der stabilen, ebenfalls mAk 2625-negativen *L. pneumophila* Sg 1 LPS-Mutante 137 mit der Genbank des zugehörigen Wildtyps. Die Komplementierung und Rekonstitution des mAk 2625-Epitops gelang mit einem 3 kb langen klonierten genomischen Fragment. Die Mutation des Stammes 137 liegt in der Deletion eines Cytosinrests im Leseraster eines Gens, dessen abgeleitetes Protein Homologien zu Methyltransferasen zeigt. Spätere chemische Untersuchungen konnten schließlich Methylgruppen im LPS dieses Stammes und aller weiteren untersuchten *L. pneumophila*-Stämme nachweisen. In einem weiteren Schritt wurden im Rahmen dieser Arbeit, ausgehend von den oben genannten klonierten Fragmenten DNA-Sonden generiert, mit deren Hilfe eine Genbank des virulenten Stammes RC1 nach möglichen LPS-Biosynthese-Genen durchsucht wurde. Auf diese Weise gelang die Identifizierung einer 32661 bp lange Region des Genoms von *L. pneumophila*, die 30 mögliche offene Leseraster enthielt. Einige der abgeleiteten Genprodukte zeigten signifikante Homologien zu Proteinen, die der LPS-O-Ketten- oder Core-Synthese zugeordnet werden konnten. Es wurden weiterhin Hinweise gefunden, daß die Legionaminsäuresynthese der O-Kette der Sialinsäure-Biosynthese anderer Gram-negativer Bakterien ähnlich ist. Der Vergleich der Wildtypsequenz mit dem entsprechenden DNA-Bereich der LPS-Mutante erbrachte jedoch keinen Hinweis auf den molekularen Mechanismus der Phasenvariation. Durch Untersuchungen, die sich an diese Arbeit anschließen konnte der molekulare Mechanismus der Phasenvariation inzwischen entschlüsselt werden. Es handelt sich dabei um ein 30 kb instabiles genetisches Element, das vermutlich auf einen Phagenursprung zurückgeht.

6. Anhang

6.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C	Celsius
CIP	Calf intestinal Phosphatase
d	desoxy
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Mischung aller vier Desoxynukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	Farad
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
mAk	monoklonaler Antikörper
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
NCTC	National Type Culture Collection
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PNK	Polynukleotidkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sg	Serogruppe

Tab.	Tabelle
T _M	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
V	Volt

Für Basen und Aminosäuren wurden die gebräuchlichen Ein-Buchstaben-Codes verwendet.

6.2 Literatur

- Baev, N. und A. Kondorosi (1992). Nucleotide sequence of the *Rhizobium meliloti nodL* gene located in locus n5 of the *nod* regulon. *Plant Mol. Biol.*, 18: 843-846
- Baine, W.B. (1985). Cytolytic and phospholipase C activity in *Legionella* species. *J. Gen. Microbiol.*, 131: 1383-1391
- Barker, J., P.A. Lambert und M.R.W. Brown (1993). Influence of Intra-Amoebic and Other Growth Conditions on the Surface Properties of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.*, 61: 3503-3510
- Bellinger-Kawahara, C. und M.A. Horwitz (1990). Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. *J. Exp. Med.*, 172: 1201-1210
- Belyi, Y. (1999). Intracellular parasitism and molecular determinants of *Legionella* virulence. *Int. Microbiol.*, 2: 145-154
- Benson, R.F., W.L. Thacker, F.C. Fang, B. Kanter, W.R. Mayberry und D.J. Brenner (1990). *Legionella sainthelensi* serogroup 2 isolated from patients with pneumonia. *Res. Microbiol.*, 141: 453-463
- Birnboim, H.C. und J. Doly (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.*, 7: 1513-1523
- Bosshard, S.C., R.F. Benson und B.S. Fields (1997). Flagella are a positive predictor for virulence in *Legionella*. *Microb. Pathog.*, 23: 107-112
- Böttger, E.C. (1988). High-efficiency generation of plasmid cDNA libraries using electrotransformation. *Bio Techniques*, 6: 878-880
- Brabetz, W., C.E. Schirmer und H. Brade (2000). 3-Deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid (Kdo) transferase of *Legionella pneumophila* transfers two kdo residues to a structurally different lipid A precursor of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 182: 4654-4657
- Brieland, J.K., L.A. Heath, G.B. Huffnagle, D.G. Remick, M.S. McClain, M.C. Hurley, R.K. Kunkel, J.C. Fantone und C. Engleberg (1996). Humoral Immunity and Regulation of Intrapulmonary Growth of *Legionella pneumophila* in the Immunocompetent Host. *J. Immun.*, 157: 5002-5008

-
- Bronner, D., B.R. Clarke und C. Whitfield (1994). Identification of an ATP-binding cassette transport system required for translocation of lipopolysaccharide O-antigen side-chains across the cytoplasmic membrane of *Klebsiella pneumoniae* serotype O1. *Mol. Microbiol.*, 14: 505-519
- Bult, C.J., O. White, G.J. Olsen, L. Zhou, R.D. Fleischmann, G.G. Sutton, J.A. Blake, L.M. Fitzgerald, R.A. Clayton, J.D. Gocayne, A.R. Kerlavage, B.A. Dougherty, J.F. Tomb, M.D. Adams, C.J. Reich, R. Overbeek, E.F. Kirkness, K.G. Weinstock, J.M. Merrick, A. Glodek, J.L. Scott, N.M. Geoghagen und J.C. Venter (1996). Complete genome sequence of the methanogenic archaeon *Methanococcus jannaschii*. *Science*, 273: 1058-1073
- Byrne, B. und M.S. Swanson (1998). Expression of *Legionella pneumophila* Virulence Traits in Response to Growth Conditions. *Infect. Immun.*, 66: 3029-3034
- Calvin, N.M. und P.C. Hanawalt (1988). High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J. Bacteriol.*, 170: 2796-2801
- Chu, S. und T.J. Trust (1993). An *Aeromonas salmonicida* gene which influences a-protein expression in *Escherichia coli* encodes a protein containing an ATP-binding cassette and maps beside the surface array protein gene. *J. Bacteriol.*, 175: 3105-3114
- Cianciotto, N.P., B.I. Eisenstein, C.H. Mody und N.C. Engleberg (1990). A Mutation in the *mip* Gene Results in an Attenuation of *Legionella pneumophila* Virulence. *J. Infect. Dis.*, 162: 121-126
- Ciesielski, C.A., M.J. Blaser und W.L. Wang (1986). Serogroup specificity of *Legionella pneumophila* is related to lipopolysaccharide characteristics. *Infect. Immun.*, 51: 397-404
- Comstock, L.E., J.A. Johnson, J.M. Michalski, J.G. Morris Jr. und J.B. Kaper (1996). Cloning and sequence of a region encoding a surface polysaccharide of *Vibrio cholerae* O139 and characterization of the insertion site in the chromosome of *Vibrio cholerae* O1. *Mol. Microbiol.*, 19: 815-826

-
- Delorme, C., S.D. Ehrlich und P. Renault (1992). Histidine biosynthesis genes in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. J. Bacteriol., 174: 6571-6579
- Dowling, J.N., A.K. Saha und R.H. Glew (1992). Virulence Factors of the Family *Legionellaceae*. Microbiol. Rev., 56: 32-60
- Downie, J.A. (1989). The *nodL* gene from *Rhizobium leguminosarum* is homologous to the acetyl transferases encoded by *lacA* and *cysE*. Mol. Microbiol., 3: 1649-1651
- Edwards, U. und M. Frosch (1992). Sequence and functional analysis of the cloned *Neisseria meningitidis* CMP-NeuNAc synthetase. FEMS Microbiol. Lett., 75: 161-166
- Edwards, U., A. Müller, S. Hammerschmidt, S.R. Gerardy und M. Frosch (1994). Molecular analysis of the biosynthesis pathway of the alpha-2,8 polysialic acid capsule by *Neisseria meningitidis* serogroup B. Mol. Microbiol., 14: 141-149
- Fani, R., M. Bazzicalupo, G. Damiani, A. Bianchi, C. Schipani, V. Sgaramella und M. Polsinelli (1989). Cloning of histidine genes of *Azospirillum brasilense*: organization of the ABFH gene cluster and nucleotide sequence of the *hisB* gene. Mol. Gen. Genet., 216: 224-229
- Fields, B.S. (1996). The molecular ecology of *legionellae*. Trends Microbiol., 4: 286-290
- Fleischmann, R.D., M.D. Adams, O. White, R.A. Clayton, E.F. Kirkness, A.R. Kerlavage, C.J. Bult, J.F. Tomb, B.A. Dougherty, J.M. Merrick *et al.* (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae*. Rd. Science, 269: 496-512
- Flieger, A., S. Gongab, M. Faigle, H.A. Mayer, U. Kehrer, J. Mussotter, P. Bartmann und B. Neumeister (2000a). Phospholipase A secreted by *Legionella pneumophila* destroys alveolar surfactant phospholipids. FEMS Microbiol. Lett., 188: 129-133
- Flieger, A., S. Gong, M. Faigle, M. Deeg, P. Bartmann und B. Neumeister (2000b). Novel phospholipase A activity secreted by *Legionella* species. J. Bacteriol., 182: 1321-1327

-
- Froman, B.E., R.C. Tait und L.D. Gottlieb (1989). Isolation and characterization of the phosphoglucose isomerase gene from *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, 217: 126-131
- Frosch, M., U. Edwards, K. Bousset, B. Krausse und C. Weisgerber (1991). Evidence for a common molecular origin of the capsule gene loci in gram-negative bacteria expressing group II capsular polysaccharides. *Mol. Microbiol.*, 5: 1251-1263
- Garduno, R.A., F.D. Quinn und P.S. Hoffman (1998). HeLa cells as a model to study the invasiveness and biology of *Legionella pneumophila*. *Can. J. Microbiol.*, 44: 430-440
- Garduno, R.A., G. Faulkner, M.A. Trevors, N. Vats und P.S. Hoffman (1998). Immunolocalization of Hsp60 in *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.*, 180: 505-513
- Geller, B.L., R.G. Ivey, J.E. Trempy und S.B. Hettinger (1993). Cloning of a chromosomal gene required for phage infection of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2. *J. Bacteriol.*, 175: 5510-5519
- Glaser, P., F. Kunst, M. Arnaud, M.P. Coudart, W. Gonzales, M.F. Hullo, M. Ionescu, B. Lubochinsky, L. Marcelino, I. Moszer et al. (1993). *Bacillus subtilis* genome project : cloning and sequencing of the 97 kb region from 325 degrees to 333 degrees. *Mol. Microbiol.*, 10: 371-384
- Gotschlich, E.C. (1994). Genetic locus for the biosynthesis of the variable portion of *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharide. *J. Exp. Med.*, 180: 2181-2190
- Guo, D., M.G. Bowden, R. Pershad und H.B. Kaplan (1996). The *Myxococcus xanthus* *rfbABC* operon encodes an ATP-binding cassette transporter homolog required for O-antigen biosynthesis and multicellular development. *J. Bacteriol.*, 178: 1631-1639
- Helbig, J.H., P.C. Lück, Y.A. Knirel, W. Witzleb und U. Zähringer (1995). Molecular characterization of a virulence-associated epitope on the lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Epidemiol. Infect.*, 115: 71-78

-
- Hobbs, M. und P.R. Reeves (1994). The JUMPstart sequence: a 39 bp element common to several polysaccharide gene clusters. *Mol. Microbiol.*, 12: 855-856
- Hood, D.W., M.E. Deadman, T. Allen, H. Masoud, A. Martin, J.R. Brisson *et al.* (1996). Use of the complete genome sequence information of *Haemophilus influenzae* strain Rd to investigate lipopolysaccharide biosynthesis. *Mol. Microbiol.*, 22: 951-965
- James, B.W., W.S. Mauchline, R.B. Fitzgeorge, P.J. Dennis und C.W. Keevil (1995). Influence of Iron-Limited Continuous Culture on Physiology and Virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 63: 4224-4230
- Jarosik, G.P. und E.J. Hansen (1994). Identification of a new locus involved in expression of *Haemophilus influenzae* type b lipooligosaccharide. *Infect. Immun.*, 62: 4861-4867
- Jennings, M.P., D.W. Hood, I.R. Peak, M. Virji und E.R. Moxon (1995). Molecular analysis of a locus for the biosynthesis and phase-variable expression of the lacto-N-neotetraose terminal lipopolysaccharide structure in *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.*, 18: 729-740
- Jiang, J.R., R.M. McKinney, J.O. Tobin, W.F. Bibb, I.D. Watkins und D. Ramsay (1986). Development of a standardized subgrouping scheme for *Legionella pneumophila* serogroup 1 using monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.*, 23: 768-771
- Kaneko, T., S. Sato, H. Kotani, A. Tanaka, E. Asamizu, Y. Nakamura, N. Miyajima, M. Hirosawa, M. Sugiura, S. Sasamoto, T. Kimura, T. Hosouchi, A. Matsuno, A. Muraki, N. Nakazaki, K. Naruo, S. Okumura, S. Shimpou, C. Takeuchi, T. Wada, A. Watanabe, M. Yamada, M. Yasuda und S. Tabata (1996). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.*, 3: 109-136
- Kayser, F.H., K.A. Bienz, J. Eckert und J. Lindenmann (1993). *Medizinische Mikrobiologie*. 8. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 233-235

- Keenleyside, W.J. und C. Whitfield (1995). Lateral transfer of *rfb* genes: a mobilizable ColE1-type plasmid carries the *rfbO*:54 (O:54 antigen biosynthesis) gene cluster from *Salmonella enterica* serovar Borreze. *J. Bacteriol.*, 177: 5247-5253
- Kelly, R.F. und C. Whitfield (1996). Clonally diverse *rfb* gene clusters are involved in expression of a family of related D-galactan O-antigens in *Klebsiella* species. *J. Bacteriol.*, 178: 5205-5214
- Kiino, D.R., R. Licudine, K. Wilt, D.H. Yang und L.B. Denes Rothman (1993). A cytoplasmatic protein, NfrC, is required for bacteriophage N4 adsorption. *J. Bacteriol.*, 175: 7074-7080
- Kirby, J.E. und R.R. Isberg (1998). Legionnaires` disease: the pore macrophage and the legion of terror within. *Trends Microbiol.*, 6: 256-258
- Knirel, Y.A., E.T. Rietschel, R.Marre und U. Zähringer (1994). The structure of the O-specific chain of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem.*, 221: 239-245
- Knirel, Y.A., H. Grosskurth, J.H. Helbig und U. Zähringer (1995). Structures of decasaccharide and tridecasaccharide tetraphosphates isolated by strong alkaline degradation of O-deacylated lipopolysaccharide of *Pseudomonas fluorescens* strain ATCC 49 271. *Carbohydr. Res.*, 279: 215-226
- Knirel, Y.A., J.H. Helbig und U. Zähringer (1996). Structure of a decasaccharide isolated by mild acid degradation and dephosphorylation of the lipopolysaccharide of *Pseudomonas fluorescens* strain ATCC 49 271. *Carbohydr. Res.*, 283: 129-139
- Kooistra, O., E. Lüneberg, B. Lindner, Y.A. Knirel, M. Frosch und U. Zähringer (2001). Complex O-acetylation in *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. Evidence for two genes involved in 8-O-acetylation of legionaminic acid. *Biochemistry*, 40: 7630-7640
- Kooistra, O., Y.A. Knirel, E. Lüneberg, M. Frosch und U. Zähringer (2002a). Phase-variation in *Legionella pneumophila* serogroup 1 (subgroup OLDA) strain RC1 influences lipid A structure. In *Legionella: Proceedings of the 5th international conference* (Marre, R., Y. Abu Kwaik,

- C. Bartlett, N.P. Cianciotto, B.S. Fields, M. Frosch, J. Hacker und P.C. Lück, eds) pp 68-73. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Kooistra, O., E. Lüneberg, Y.A. Knirel, M. Frosch und U. Zähringer (2002b). N-methylation in polylegionaminic acid is associated with the phase-variable epitope of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. Eur. J. Biochem., 269: 560-572
- Krinos, C., A.S. High und F.G. Rodgers (1999). Role of the 25 kDa major outer membrane protein of *Legionella pneumophila* in attachment to U-937 cells and its potential as a virulence factor for chick embryos. J. Appl. Microbiol., 86: 237-244
- Kroll, J.S., I. Hopkins und E.R. Moxon (1988). Capsule loss in *H. influenzae* type b occurs by recombination-mediated disruption of a gene essential for polysaccharide export. Cell, 53: 347-356
- Lazarevic, V. und D. Karamata (1995). The *tagGH* operon of *Bacillus subtilis* 168 encodes a two-component ABC transporter involved in the metabolism of two wall teichonic acids. Mol. Microbiol., 16: 345-355
- Liles, M.R., T.A. Scheel und N.P. Cianciotto (2000). Discovery of a nonclassical siderophore, legiobactin, produced by strains of *Legionella pneumophila*. J. Bacteriol., 182: 749-757
- Liu, D. und P.R. Reeves (1994). *Escherichia coli* K12 regains its O-antigen. Microbiology, 140: 49-57
- Loeb, M., A.E. Simor, L. Mandell, P. Krueger, M. McArthur, M. James, S. Walter, E. Richardson, M. Lingley, J. Stout, D. Stronach und A. McGeer (1999). Two nursing home outbreaks of respiratory infection with *Legionella sainthelensi*. J. Am. Ger. Soc., 47 547-552
- Lüneberg, E., U. Zähringer, Y.A. Knirel, D. Steinmann, M. Hartmann, I. Steinmetz, M. Rohde, J. Köhl und M. Frosch (1998). Phase-variable expression of lipopolysaccharide contributes to the virulence of *Legionella pneumophila*. J. Exp. Med., 188: 49-60

-
- Lüneberg, E., N. Zetzmann, D. Alber, Y.A. Knirel, O. Kooistra, U. Zähringer und M. Frosch (2000a). Cloning and functional characterization of a 30 kb gene locus required for lipopolysaccharide biosynthesis in *Legionella pneumophila*. Int. J. Med. Microbiol., 290: 37-49
- Lüneberg, E., B. Mayer, N. Daryab, O. Kooistra, U. Zähringer, M. Rohde, J. Swanson und M. Frosch (2000b). 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: 1-14
- Lüneberg, E. (2002). Phase variation of lipopolysaccharide and other virulence determinants in *Legionella pneumophila*. In *Legionella: Proceedings of the 5th international conference* (Marre, R., Y. Abu Kwaik, C. Bartlett, N.P. Cianciotto, B.S. Fields, M. Frosch, J. Hacker und P.C. Lück, eds) pp 56-59. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Mengaud, J.M. und M.A. Horwitz (1993). The major iron-containing protein of *Legionella pneumophila* is an aconitase homologous with the human iron-responsive element-binding protein. J. Bacteriol., 175: 5666-5676
- Mintz, C.S., D.R. Schultz, P.I. Arnold und W. Johnson (1992). *Legionella pneumophila* lipopolysaccharide activates the classical complement pathway. Infect. Immun., 60: 2769-2776
- Moffat, J.F., W.J. Black und L.S. Tompkins (1993). Further Molecular Characterization of the Cloned *Legionella pneumophila* Zinc Metalloprotease. Infect. Immun., 62: 751-753
- Moffat, J.F., P.H. Edelstein, D.P. Regula Jr, J.D. Cirillo und L.S. Tompkins (1994). Effects of an isogenic Zn-metalloprotease-deficient mutant of *Legionella pneumophila* in a guinea-pig pneumonia model. Mol. Microbiol., 12: 693-705
- Moll, H., Y.A. Knirel, J.H. Helbig und U. Zähringer (1997). Identification of an α -D-Man_p-(1→8)-Kdo disaccharide in the inner core region and the structure of the complete core region of the *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. Carbohydr. Res., 304: 91-95

-
- Neumeister, B. (1996). Legionelleninfektionen – Epidemiologie, Diagnostik, Klinik und Pathogenese. Clin. Lab., 42: 715-729
- Nolte, F.S., C.A. Conlin und M.A. Motley (1986). Electrophoretic and serological characterization of the lipopolysaccharides of *Legionella pneumophila*. Infect. Immun., 52: 676-681
- Otten, S., S. Iyer, W. Johnson und R. Montgomery (1986). Serospecific antigens of *Legionella pneumophila*. J. Bacteriol., 167: 893-904
- Pearlman, E., A.H. Jiwa, N.C. Engleberg und B.I. Eisenstein (1988). Growth of *Legionella pneumophila* in a human macrophage-like (U937) cell line. Microb. Pathog., 5: 87-95
- Pope, C.D., W.A. O`Connell und N.P. Cianciotto (1995). *Legionella pneumophila* Mutants That Are Defective for Iron Acquisition and Assimilation and Intracellular Infection. Infect. Immun., 64: 629-636
- Pruckler, J.M., R.F. Benson, M. Moyenuddin, W.T. Martin und B.S. Fields (1995). Association of Flagellum Expression and Intracellular Growth of *Legionella pneumophila*. Infect. Immun., 63: 4928-4932
- Raetz, C.R.H. (1996). Bacterial Lipopolysaccharides: a remarkable family of bioactive macroamphiphiles. In *Escherichia coli* and *Salmonella* (F.C. Neidhardt, ed.), pp. 1035-1063, ASM Press, Washington
- Rechnitzer, C. und A. Kharazmi (1992). Effect of *Legionella pneumophila* cytotoxic protease on human neutrophil and monocyte function. Microb. Pathog., 12: 115-125
- Rechnitzer, C. (1994). Pathogenetic aspects of Legionnaires` disease: Interaction of *Legionella pneumophila* with cellular host defences. APMIS, 43: 1-43
- Reeves, P.R., M. Hobbs, M.A. Valvano, M. Skurnik, C. Whitfield, D. Coplin, N. Kido, J. Klena, D. Maskell, C.R. Raetz und P.D. Rick (1996). Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. Trends. Microbiol., 4: 495-503

-
- Reizer, J., A. Reizer und M.H. Saier Jr. (1992). A new subfamily of bacterial ABC-type transport systems catalyzing export of drugs and carbohydrates. *Protein Sci.*, 1: 1326-1332
- Roche, R.J. und E.R. Moxon (1995). Phenotypic variation of carbohydrate surface antigens and the pathogenesis of *Haemophilus influenzae* infections. *Trends. Microbiol.*, 3: 304-309
- Sadosky, A.B., J.W. Wilson, H.M. Steinman und H.A. Shuman (1994). The Iron Superoxide Dismutase of *Legionella pneumophila* Is Essential for Viability. *J. Bacteriol.*, 176: 3790-3799
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis und H.A. Erlich (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491
- Sambrook, J., E.F. Fritsch und T. Maniatis (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, cold Spring Harbour, N.Y.
- Sanger, F., S. Nicklen und A.R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467
- Schnaitman, C.A. und J.D. Klena (1993). Genetic of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol. Rev.*, 57: 655-682
- Segal, G. und H.A. Shuman (1998). How is the intracellular fate of the *Legionella pneumophila* phagosome determined? *Trends Microbiol.*, 6: 253-255
- Segal, G., M. Purcell und H.A. Shuman (1998). Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 1669-1674
- Shuman, H.A. und M.A. Horwitz (1996). *Legionella pneumophila* invasion of mononuclear phagocytes. *Curr. Topics Microbiol.*, 209: 99-115

-
- Shuman, H.A., M. Purcell, G. Segal, L. Hales und L.A. Wiater (1998). Intracellular Multiplication of *Legionella pneumophila*: Human Pathogen or Accidental Tourist? *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 225: 99-112
- Skerrett, S.J. und T.R. Martin (1996). Roles for Tumor Necrosis Factor Alpha and Nitric Oxide in Resistance of Rat Alveolar Macrophages to *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.*, 64: 3236-3243
- Smith, A.N., G.J. Boulnois und I.S. Roberts (1990). Molecular analysis of the *Escherichia coli* K5 kps locus: identification and characterization of an inner –membrane capsular polysaccharide transport system. *Mol. Microbiol.*, 4: 1863-1869
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol. Microbiol.*, 98: 503-517
- Stout, J.E. und V.L. Yu (1997). Legionellosis. *N. Engl. J. Med.*, 337: 682-688
- Susa, M., J. Hacker und R. Marre (1996). De Novo Synthesis of *Legionella pneumophila* Antigens during Intracellular Growth in Phagocytic Cells. *Infect. Immun.*, 64: 1679-1684
- Szeto, L. und H.A. Shuman (1990). The *Legionella pneumophila* Major Secretary Protein, a Protease, Is Not Required for Intracellular Growth or Cell Killing. *Infect. Immun.*, 58: 2585-2592
- Viswanathan, V.K., P.H. Edelstein, C.D. Pope und N.P. Cianciotto (2000). The *Legionella pneumophila iraAB* locus is required for iron assimilation, intracellular infection and virulence. *Infect. Immun.*, 68: 1069-1079
- Vogel, J.P., H.L. Andrews, S.K. Wong und R.R. Isberg (1998). Conjugative Transfer by the Virulence System of *Legionella pneumophila*. *Science*, 279: 873-876
- Vogel J.P. und R.R. Isberg (1999). Cell biology of *Legionella pneumophila*. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2: 30-34
- Wang, A.Y., D.W. Grogan und J. Cronan (1992). Cyclopropane fatty acid synthase of *Escherichia coli*: deduced amino acid sequence, purification and studies of the enzyme active site. *Biochem.*, 31: 11020-11028

-
- Weiser, J.N., J.M. Love und E.R. Moxon (1989). The molecular mechanism of phase variation of *H. influenzae* lipopolysaccharide. *Cell*, 59: 657-665
- Whitfield, C. (1995). Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens. *Trends. Microbiol.*, 3: 178-185
- Whitfield, C., P.A. Amor und R. Koplín (1997). Modulation of the surface architecture of gram-negative bacteria by the action of surface polymer: lipid A-core ligase and by determinants of polymer chain length. *Mol. Microbiol.*, 23: 629-638
- Wintermeyer, E., U. Rdest, B. Ludwig, A. Debes und J. Hacker (1991). Characterization of legiolysin (lly), responsible for haemolytic activity, colour production and fluorescence of *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.*, 5: 1135-1143
- Yang, Q.L. und E.C. Gotschlich (1996). Variation of gonococcal lipooligosaccharide structure is due to alteration in poly-G tracts in *lgt* genes encoding glycosyl transferases. *J. Exp. Med.*, 183: 323-327
- Yao, Z. und M.A. Valvano (1994). Genetic analysis of the O-specific lipopolysaccharide biosynthesis region (*rfb*) of *Escherichia coli* K12 W 3110: identification of genes that confer group 6 specificity to *Shigella flexneri* serotypes Y and 4a. *J. Bacteriol.*, 176: 4133-4143
- Zähringer, U., Y.A. Knirel, B. Lindner, J.H. Helbig, A. Sonesson, R. Marre und E.T. Rietschel (1995). The lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 (strain Philadelphia 1): chemical structure and biological significance. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 392: 113-139
- Zapata, G., W.F. Vann, W. Aaronson, M.S. Lewis und M. Moos (1989). Sequence of the cloned *Escherichia coli* K1 CMP-N-acetylneuraminic acid synthetase gene. *J. Biol. Chem.*, 264: 14769-14774
- Zhang, L., A. alHendy, P. Toivanen und M. Skurnik (1993). Genetic organization and sequence of the *rfb* gene cluster of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3: similarities to the dTDP-L-rhamnose

biosynthesis pathway of *Salmonella* and to the bacterial polysaccharide transport system. *Mol. Microbiol.*, 9: 309-321

Zou, C.H., Y.A. Knirel, J.H. Helbig, U. Zähringer und C.S. Mintz (1999). Molecular cloning and characterization of a locus responsible for O-acetylation of the O-polysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.*, 181: 4137-4141

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Frau Dr. Edeltraud Lüneberg am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg angefertigt. Ihr gilt mein ganz besonderer Dank für die engagierte Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Frosch möchte ich dafür danken, daß ich die Arbeit an seinem Institut durchführen konnte.

Herrn Prof. Dr. Hacker, Institut für molekulare Infektionsbiologie, danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie für die gute Zusammenarbeit und die Hilfsbereitschaft bedanken. Besonders erwähnen möchte ich: Astrid Schnell, Maike Hartmann, Heike Claus und Gabi Heinze.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meiner Familie und vor allem bei meinem Ehemann Mark bedanken für unendlich viel Verständnis und Geduld.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Nicole Metter, geb. Zetzmann
Anschrift	Obere Büch 22 91054 Buckenhof
Geburtsdatum	07. Oktober 1974
Geburtsort	Coburg
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch

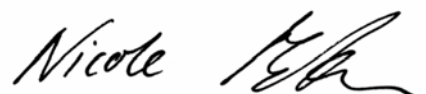
Schulbildung

09/80 – 07/84	Grundschule Untermerzbach
09/84 – 07/93	Friedrich-Rückert-Gymnasium Ebern

Berufsausbildung

10/93 – 04/00	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
06/00 – 12/01	Ärztin im Praktikum Abteilung für Innere Medizin Krankenhaus Nürnberger Land in Lauf a. d. Pegnitz
12/01 – 09/02	Assistenzärztin Abteilung für Innere Medizin Krankenhaus Nürnberger Land in Lauf a. d. Pegnitz
10/02 – heute	Assistenzärztin Medizinische Klinik II Wald- krankenhaus Erlangen. Abteilung für Gastro- enterologie und Onkologie

Buckenhof, 16. Januar 2003



Nicole Metter