

**Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie  
der Universität Würzburg**

**Vorstand: Prof. Dr. med. Matthias Frosch**

**Phasenvariation bei *Legionella pneumophila*:  
Vergleichende Proteomanalyse  
von virulenten und avirulenten *Legionella pneumophila* - Stämmen  
unter Anwendung der zweidimensionalen Gelelektrophorese**

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Michael Klug  
aus Oberleichtersbach-Modlos**

**Würzburg, März 2003**

**Referent: Prof. Dr. med. Matthias Frosch**

**Koreferent: Prof. Dr. Dr. h.c. Jörg Hacker**

**Dekan: Prof. Dr. med. Stefan Silbernagl**

**Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2003**

**Der Promovend ist Arzt**

**Meiner Familie**

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.	Biologie von <i>Legionella pneumophila</i>	1
1.2.	Pathogenitätsfaktoren von <i>Legionella pneumophila</i>	2
1.3.	Phasenvariation bei <i>Legionella pneumophila</i> Serogruppe 1	4
1.4.	Technik und Möglichkeiten der Proteomanalyse	7
1.5.	Ziel der Arbeit	9
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>10</b>
2.1.	Material	10
2.1.1.	Verwendete Geräte	10
2.1.2.	Verwendete Labormaterialien	11
2.1.3.	Verwendete Chemikalien	12
2.2.	Methoden	14
2.2.1.	Bakterienstämme	14
2.2.1.1.	Anzucht und Konservierung der Bakterienstämme	14
2.2.1.2.	Präparation der Bakterien für die zweidimensionale Gelelektrophorese	15
2.2.1.3.	Quantitative Proteinbestimmung der Bakterienlysate	17
2.2.2.	Zweidimensionale Gelelektrophorese	19
2.2.2.1.	Rehydratation der pH-Gradienten-Gelstreifen	19
2.2.2.2.	Isoelektrische Fokussierung (IF)	20
2.2.2.3.	Äquilibrierung der pH-Gradienten-Gelstreifen nach der IF	21
2.2.2.4.	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	22
2.2.3.	Färbung der SDS-Polyacrylamidgele	26
2.2.3.1.	Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R250	27
2.2.3.2.	Silberfärbung	28
2.2.4.	Gelkonservierung	29
2.2.5.	Vergleichende Analyse der Proteinprofile der 2D-Gele	29
2.2.6.	Ermittlung der Aminosäure-Teilsequenzen von Spot-Proteinen	30
2.2.7.	Identifikation der Proteinspot-Sequenzen mit Hilfe von Datenbanken	31

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>32</b>
3.1.	Etablierung der 2D-Gelelektrophorese-Technik mit Bakterien-Zellysaten von <i>Legionella pneumophila</i> Sg1	32
3.2.	Definition des optimalen pH-Bereiches für die isoelektrische Fokussierung	34
3.3.	Protein-Spots zur Molekulargewichts-Abschätzung	35
3.4.	Identifikation von differentiell synthetisierten Proteinen	38
3.4.1.	Proteine, die ausschließlich von der Mutante synthetisiert werden	38
3.4.2.	Proteine, die bei der Mutante stärker ausgeprägt sind als beim Wildtyp	41
3.4.3.	Proteine, die nur vom Wildtyp synthetisiert werden.	42
3.4.4.	Proteine, die beim Wildtyp stärker ausgeprägt sind als bei der Mutante	43
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>48</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>56</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>58</b>

**Danksagung**

**Lebenslauf**

## 1. Einleitung

### 1.1. Biologie von *Legionella pneumophila*

Die fakultativ intrazellulär lebende Bakterienspezies *Legionella pneumophila* [1] hat sich als Lebensraum besondere ökologische Nischen erschlossen: Das Habitat sind natürliche oder künstliche Süßwassersysteme, wo sie als Parasiten in Amöben bzw. Protozoen überleben, sich vermehren [2] und zudem in Assoziation mit Biofilmen häufig angetroffen werden [3]. Mittlerweile sind mehr als 13 verschiedene Amöbenspezies und 2 weitere ziliotragende Protozoenspezies als Wirtszellen von *L. pneumophila* bekannt [2]. Als opportunistischer Krankheitserreger nutzt das Bakterium bei abwehrgeschwächten Menschen professionelle Phagozyten als Wirtszellen, die Alveolarmakrophagen der Lunge [4]. Es infiziert den Makrophagen, repliziert sich intrazellulär und zerstört ihn schließlich [5]. Die Übertragung erfolgt v.a. durch Inhalation kontaminierter Aerosole [6] meist aus künstlichen Süßwassersystemen. Als resultierendes Krankheitsbild kann eine schwere nekrotisierende Lungenentzündung auftreten [7], die auch als Legionärskrankheit bezeichnet wird [8]. Der Zusammenhang zwischen mit *L. pneumophila* und mit Amöben kontaminierten Wassersystemen und Ausbrüchen von Legionellose konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden [9, 10]. In den Niederlanden z.B. ereignete sich im Februar 1999 eine schwere Epidemie, bei der 21 von 231 an Legionellose erkrankten Menschen starben [11]. Eine Übertragung von Mensch zu Mensch ist jedoch nie beobachtet worden [2]. Obwohl mittlerweile 42 Spezies der Gattung *Legionella* bekannt sind [1], werden mehr als 90% der Infektionen von *L. pneumophila* hervorgerufen [12]. Aufgrund der Pathogenität des Erregers, den geschätzten Dunkelziffern der Erkrankung, den immer wieder auftretenden Epidemien und nicht zuletzt aufgrund der ungewöhnlichen Zellbiologie ist diese Bakterienspezies in den letzten Jahren sehr intensiv untersucht worden. Bislang sind jedoch die einzelnen Faktoren, die zur Pathogenität von *L. pneumophila* beitragen, nur bruchstückhaft bekannt.

## 1.2. Pathogenitätsfaktoren von *Legionella pneumophila*

Im menschlichen Organismus sind Alveolarmakrophagen der Lunge die Wirtszellen von *L. pneumophila* [5]. Nach dem Motto „Angriff ist die beste Verteidigung“ entzieht sich das fakultativ intrazellulär lebende Bakterium dadurch nicht nur dem menschlichen Immunsystem, sondern es befällt exakt eines der Kompartimente, das unter normalen Umständen der unspezifischen Abwehr pathogener Organismen dient. Die Invasion des Bakteriums in seine Wirtszellen wird über Komplement- [13] oder F<sub>c</sub>-Rezeptoren [14] vermittelt und erfolgt u.a. [15] über eine spezielle Art der Phagozytose, die sog. „coiling phagocytosis“ [16], bei der das Bakterium von Pseudopodien umschlungen, mehrmals umwickelt und aufgenommen wird. Diese Art der Invasion scheint jedoch keine Voraussetzung für die intrazelluläre Vermehrung zu sein [14].

Die Tatsache, dass *L. pneumophila* in dieser lebensfeindlichen Umgebung überleben, sich replizieren und schließlich die Wirtszelle sogar lysieren kann [5], verdankt sie v.a. der Fähigkeit, Ansäuerung [17] und Fusion des *Legionella*-haltigen Phagosoms mit dem Lysosom zu verhindern [18], was der übliche zellphysiologische Weg der intrazellulären Verdauung phagozytierter Erreger (Heterophopie) ist. Diese Eigenschaft wird als zentrale Pathogenitätsdeterminante angesehen, da das Phagosom sogar letztlich der Ort der intrazellulären Replikation von *L. pneumophila* ist [19]. Bekannt ist, dass sich der biochemische Reifungsprozess Legionellen-haltiger Phagosomen schon wenige Minuten nach Infektion von dem bekannter phagolysosomaler Verdauungswege unterscheidet [20, 21], z.B. fehlt dem Legionellen-Phagosom phasenweise der sog. späte lysosomale Marker LAMP-1, MHC I und II Moleküle [20] oder CD-63 [21]. Die Beobachtung, dass der pH-Wert Erythrozyten-haltiger Heterosomen auf unter 5 sank während *Legionella*-haltige Phagosomen des gleichen Makrophagen einen neutralen pH-Wert beibehielten, ist seit langem bekannt [17]. Mit Legionellen und *Saccharomyces cerevisiae* infizierte Makrophagen lysierten den Pilz per Phagolysosom (Heterophopie), während sich *Legionella* in den biochemisch modifizierten Phagosomen replizierte [22]. Hiermit waren Indizien dafür gegeben, dass ein unbekannter, lokal wirkender Virulenzfaktor (Protein?) des Phagosoms eine isolierte, immunologisch inerte Replikationsvakuole exklusiv für *L. pneumophila* generiert. Swanson und Kollegen beobachteten, dass sowohl vitale als auch mit Formalin fixierte

*L. pneumophila*, durch „coiling phagocytosis“ aufgenommen, sich der endosomalern Verdauung entziehen konnten. Ein Hinweis dafür, dass dieser unbekanntere Virulenzfaktor auf der Zelloberfläche lokalisiert sein könnte. In diesem Zusammenhang ist von promastigoten Formen von Leishmanien z.B. bekannt, dass die Glycokalix, bestehend v.a. aus Lipophosphoglykan, die Phagosomen-Reifung blockiert [23]. Die frühe Abänderung des phagosomalen Reifungsprozesses konnte mit *dot/icm* Genloci von *L. pneumophila* in Verbindung gebracht werden [24, 25]. Diese Genloci umfassen mindestens 24 chromosomale Gene, organisiert in zwei unterschiedlichen 22 kb großen Regionen [26, 27], die „*dot*“ (defective for organelle trafficking) [28, 29] oder „*icm*“ (intracellular multiplication) [26, 30, 31] bezeichnet werden. Da Mutanten mit Defekten auf diesen Genloci sich intrazellulär nicht vermehren [32, 33] bzw. den endosomalern Weg (Heterophopie) nicht umgehen können [24, 29], tragen diese Genloci essentielle Informationen für die Pathogenität von *L. pneumophila*. Mindestens 16 der *dot/icm* Gene zeigen Homologie zu *tra/trb* Genen des konjugativen Plasmids col1b-P9 von *Shigella flexneri* [34] und es konnte gezeigt werden, dass *L. pneumophila* in Abhängigkeit einiger *dot/icm* Gene RSF1010 Plasmide [35] konjugativ transferieren kann [26, 27]. In diesem Sinne kodieren die *dot/icm* Gene für ein Typ IV Transportsystem, von dem bekannt ist, dass außer genetischem Material auch Virulenz-Effektorproteine exportiert werden können [36]. *Bordetella pertussis* z.B. benutzt ein solches Transportsystem um Pertussistoxin in eine Empfängerzelle zu exportieren [37]. Ebenso wurde kürzlich für *H. pylori* das 145 kDa CagA Protein für ein Typ IV Sekretionssystem identifiziert, kodiert durch die *cag*-Pathogenitätsinsel [38, 39]. Von *L. pneumophila* ist bekannt, dass in Abhängigkeit einiger *dot/icm* Gene der Kontakt zur Wirtszelle eine Porenbildung in deren Plasmamembran induziert, was schließlich zur osmotischen Lyse der Wirtszelle führt [40]. In Verbindung mit dem Wissen um das Typ IV Sekretionssystem wird angenommen, dass, kodiert durch *dot/icm* Genloci, ein Effektorprotein vor oder während der Phagozytose [24, 25] über Poren in der Wirtszellmembran [40] durch einen Proteinkanal exportiert wird und die Phagosomen-Reifung so beeinflusst, dass eine geschützte Replikationsvakuole für *L. pneumophila* entsteht [41, 42]. Es wird vermutet, dass *dot/icm* Gene für Proteine dieses Typ IV Systems kodieren. Die meisten potentiellen *dot/icm* Proteine zeigten Homologien zu Proteinen der inneren bakteriellen Membran, teils mit ATP/GTP-

Bindungsstellen [42], jedoch ist bislang weder die Identität eines hypothetischen Effektorproteins, noch die der Kanalproteine oder Poren-formenden Proteine bekannt. Ein von *dotA* kodiertes Protein konnte an der inneren Bakterienmembran lokalisiert und in Zusammenhang mit der Replikationsfähigkeit [43] bzw. frühen Beeinflussung endosomaler Vorgänge [24] gebracht werden. Ein lösliches, zytoplasmatisches Protein, kodiert von *icmW*, wurde als Effektorprotein des *dot/icm* Sekretionssystems in Betracht gezogen, was sich jedoch nicht bestätigen ließ [44].

Neben der oben schon erwähnten, kontaktabhängigen Zytotoxizität [45] in Form von Porenbildung in Wirtszellmembranen mit anschließender osmotischer Lyse [40] sind von *L. pneumophila* auch andere zelltoxisch wirkende Proteine bekannt. Von dem Major Secreted Protein (Msp), einer 39 kDa Zn-Metalloprotease [46, 47] z.B. weiß man, dass sie eine für Legionellose typische Lungenpathologie induzieren kann [48], sowie hämolytische und zytotoxische Eigenschaften besitzt [47], jedoch keinen Einfluss auf das intrazelluläre Wachstum von *L. pneumophila* in Makrophagen hat [49, 50]. Mittlerweile ist bekannt, dass *L. pneumophila* chromosomale Genloci besitzt, die für ein Typ II Sekretionssystem und Elemente der Typ IV Pilus Biogenese kodieren [51, 52]. Mutanten mit Defekten eines dieser Gene (*pilD*) besaßen keine Typ IV Pili und die Sekretion von mindestens drei Exoproteinen einschließlich Msp war mangelhaft, zudem zeigten sie vermindertes Wachstum in verschiedenen Wirtszellen [52]. Da jedoch weder Typ IV Pili [53] noch die Sekretion von Msp [49] für die intrazelluläre Replikation obligat sind, könnten noch unbekannte Exoproteine, exportiert über Typ II Systeme, das intrazelluläre Wachstum virulenter Stämme von *L. pneumophila* fördern.

### **1.3. Phasenvariation bei *Legionella pneumophila***

Im Jahr 1998 ist es der Arbeitsgruppe um Lüneberg erstmals gelungen, eine phasenvariable Expression des Lipopolysaccharids von *Legionella pneumophila* Serogruppe (Sg) 1 zu beschreiben [54]. Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers mAb 2625 wurde von dem virulenten Wildtyp RC1 die avirulente Switch-Mutante 811 isoliert. Während der Wildtyp (WT) den Antikörper bindet, zeigt die Mutante (Mut) keine Affinität zu diesem. Mit der Isolation dieser Bakterienstämme stand ein Werkzeug

zur Verfügung, um die sehr lückenhaften Erkenntnisse zu Virulenzdeterminanten und deren Regulation von *L. pneumophila* zu erweitern.

Der zentrale Unterschied zwischen den Phänotypen der Bakterienstämme ist der Verlust der Virulenz und Serumresistenz der Mutante im Vergleich zum Wildtyp [54]: Während die Mutante durch Faktoren des Komplementsystems nach Inkubation mit menschlichem Serum lysiert wurde, verhielt sich der Wildtyp serumresistent. Der Wildtyp war zudem in der Lage, sich in der makrophagenähnlichen Zelle HL-60 und *Acanthamoeba castellanii* zu replizieren, wogegen die Mutante in HL-60-Zellen zwar genauso effizient eindrang, sich aber weder dort noch in *Acanthamoeba castellanii* zu replizieren vermochte. Bestätigt haben sich diese Eigenschaften auch *in vivo* im Meerschweinchenmodell, wo der Wildtyp eine Pneumonie verursachte und sich stark replizierte, während die Mutante lediglich leichte Allgemeinsymptome hervorrief und eine eingeschränkte Replikationsfähigkeit aufwies. Weiterhin zeigten elektronenmikroskopische Untersuchungen, dass die Mutante im Vergleich zum Wildtyp weder Flagellen, noch Pili exprimiert. Außerdem wurde festgestellt, dass die Lipid A-Struktur der Mutante verändert [55] und die Zelloberflächenladung weniger negativ geladen ist, als die des Wildtyps [56]. Anzumerken ist, dass nicht nur unterschiedliche LPS-Strukturen der Bakterienstämme [57], sondern auch die Zusammensetzung der Membranproteine die Oberflächenladung bestimmen [58, 59].

Alle oben beschriebenen, neuen phänotypischen Eigenschaften der avirulenten Mutante 811 sind direkt mit der LPS-Phasenvariation von *L. pneumophila* Sg 1 assoziiert. Den Arbeitsgruppen um Zähringer, Knirel, Lüneberg und Kooistra gelang es, die LPS-Struktur von *L. pneumophila* Sg1 zu entschlüsseln [54, 55, 60, 61]. Insbesondere das Epitop des Antikörpers mAb 2625 auf der Zelloberfläche von RC1 wurde auf der O-spezifischen Kette des Lipopolysaccharid-Komplexes im Zusammenhang mit der Phasenvariation der Stämme RC1 und 811 identifiziert: Die 5-Acetimidoylaminogruppe eines einzelnen Legionaminsäurerestes ist mit Methylgruppen substituiert [57]. Jedoch konnte diese LPS-Variante die Virulenzunterschiede des Wildtyps und der Mutante nicht erklären [62]. Genetisch definierte Mutanten, denen dieses Epitop fehlte, wiesen die selben Virulenzeigenschaften auf, wie der Wildtyp RC1. Folglich mussten andere phänotypische Veränderungen, die mit der LPS-Phasenvariation einhergehen, für die unterschiedliche Virulenz der Bakterienstämme verantwortlich sein.

Der molekulare Mechanismus der LPS-Phasenvariation wurde von Lüneberg *et al* entschlüsselt [56]. Es wurde eine direkte Beziehung zur chromosomalen Exzision bzw. Insertion einer 30 kb großen Nukleotidsequenz hergestellt: Während der Wildtyp RC1 dieses Element im Chromosom integriert trägt, liegt es bei der Mutante 811 als Plasmid (p811) vor. Die Nukleotidsequenz von p811 wurde identifiziert und 30 Open Reading Frames (ORFs) entschlüsselt, deren Gene offensichtlich während der episomalen „high-copy Phase“ exprimiert werden. Die Mehrzahl der ORFs wiesen keine Homologien zu bekannten Proteinen auf. Einige zeigten jedoch Ähnlichkeit zu Proteinen verschiedener Bakteriophagen bzw. Proteinen, die in DNA-Rekombinationsvorgänge involviert sind [56]. Für *Shigella flexneri* z.B. wurde ein 230 kb großes Plasmid mit mehr als 20 Virulenzgenen beschrieben, das abhängig von dem RecA-Protein von extrachromosomaler in chromosomal inserierte Form wechselt, einhergehend mit Virulenzverlust [63, 64]. Mit Hilfe einer *recA*-Mutante konnte für *L. pneumophila* aber gezeigt werden, dass das *recA*-Gen weder die Exzision der 30 kb großen Nukleotidsequenz, noch Virulenz oder die Phasenvariation der Bakterienstämme RC1 und 811 beeinflusste. Auch der Genloкус der chromosomalen Insertion von p811 wurde sequenziert [56]. Es wurde festgestellt, dass durch die Insertion von p811 keine kodierende Nukleotidsequenz unterbrochen wird. Die dem Plasmid angrenzenden Gene zeigten keine Homologie zu bekannten Proteinen. Die Regulation der Exzision und Insertion von p811 ist bislang unbekannt. Vor allem die Tatsache, dass keine Ähnlichkeiten der Gene der 30 kb Sequenz mit solchen der LPS-Proteinsynthese festgestellt werden konnten, ließ schließlich vermuten, dass die Phasenvariation der LPS-Phänotypen einer indirekten, unbekanntem Regulation unterliegt, die außer dem 30 kb Element noch andere Bereiche des Genoms bzw. der Zellphysiologie von *L. pneumophila* synchron beeinflusst. Die große Anzahl oben beschriebener, unterschiedlichster phänotypischer Veränderungen der avirulenten Switch-Mutante zum virulenten Wildtyp unterstreichen diese Vermutung [56]. Zur globalen Erfassung dieser und eventuell weiterer phänotypischen Differenzen auf Proteinebene, ist eine vergleichende Proteomanalyse der Bakterienstämme ein interessanter Zugangsweg.

## 1.4. Technik und Möglichkeiten der Proteomanalyse

Entsprechend dem Begriff „Genom“ [65] wurde 1995 erstmalig der Begriff „Proteom“ für alle von dem Genom einer Zelle exprimierbaren Proteine verwendet [66, 67]. Proteomanalysen und die Archivierung des Proteoms werden analog zu „Genomics“ [65, 68] unter dem nicht klar definierten Begriff „Proteomics“ subsumiert [66, 69]. Hierbei sind eine Vielzahl verschiedener Methoden kombinierbar [70], die üblicherweise in hierarchischer Folge durchgeführt werden [71].

Die Kerntechnologie der Proteomanalyse ist die zweidimensionale Gelelektrophorese [72] zur Auftrennung komplexer Proteingemische, eine Methode, die im Jahre 1975 von O'Farrell [73] und Klose [74] eingeführt wurde. Hierbei werden im ersten Schritt die Proteine entsprechend ihrer Ladung getrennt, im zweiten Schritt erfolgt eine zusätzliche Trennung aufgrund unterschiedlicher Molekulargewichte der einzelnen Proteine. Technische Verbesserungen [75, 76] und ausgefeilte Protokolle [77, 78] ermöglichen seitdem immer bessere Reproduzierbarkeit [79-81] und hochauflösende, simultane Darstellungen von mehr als 10000 Protein-Spots auf einem einzigen SDS-Polyacrylamidgel sind mit entsprechenden Materialien möglich [76]. Das Proteom von *E. coli* z.B., dessen Umfang auf 4405 Proteine geschätzt wird [82] könnte somit theoretisch auf einem 2D-Gel abgebildet werden. Das zweite Standbein von „Proteomics“ sind Techniken zur strukturellen Charakterisierung der auf 2D-Gelen aufgetrennten Einzelproteine [83]. Für Organismen, deren Genom vollständig sequenziert ist [84], werden hierfür mehr und mehr massenspektrometrische Verfahren durchgeführt [85], die eine schnelle Analyse großer Proteinmengen zulassen [86]. Ein gängiges Verfahren ist z.B. durch Trypsin-Verdau Peptid-Fragmente von Proteinen zu definieren und deren Masse mittels „Matrix-assisted Laser Desorption Ionization“ [87] in einem „Time of Flight Analyser“ (MALDI-TOF) zu bestimmen. Diese so ermittelten „Peptid Mass Fingerprints“ [88] werden mit theoretisch errechneten Peptidfragmentmassen elektronischer Datenbanken verglichen und dienen als Grundlage zur Identifikation der Proteine [89]. Ein zweites Verfahren, die „Electrospray Ionisation“ (ESI) [90] von Peptidfragmenten gekoppelt mit einem „Tandem Mass Spectrometer“ ermöglicht sowohl Aussagen zu Masse wie auch Aminosäuresequenz der Peptidfragmente [86, 91, 92]. Eine traditionellere Form der Strukturanalyse

aufgetrennter Einzelproteine ist die *de novo* Sequenzierung N-terminaler Peptidprimärstrukturen durch Edman-Abbau [93-95] nach Elektroblothing auf PVDF-Membranen [96]. Diese Methode ist langsamer und aufwendiger, bietet sich jedoch u.a. für Organismen an, deren genetischer Code bislang unvollständig sequenziert ist und folglich nur lückenhafte Informationen über hypothetische Proteinsequenzen und Peptidmassen abrufbar sind. Die dritte Säule von Proteomics ist die elektronische Archivierung und Analyse der gewonnenen Informationen. Mittlerweile existieren neben Gendatenbanken große Proteindatenbanken [97] mit Informationen zu Proteinsequenzen und Peptidmassen sowie kommentierten 2D-Gelen [98] vieler Organismen. Mit Hilfe von Datenbank-Suchprogrammen können experimentell ermittelte Proteinstrukturen auf Homologien zu bekannten Sequenzen [99-101] oder Peptidmassen [102] überprüft werden. Die Bioinformatik bietet hierbei Schnittstellen zur Verknüpfung der Proteomdaten mit Genomdaten [103].

Die Anwendungsbereiche für Proteomanalysen mit der 2D-Gelelektrophorese als Kerntechnologie sind mannigfaltig und erstrecken sich auf viele medizinische Fachgebiete. Grundsätzlich lassen sich hierbei zwei Strategien unterscheiden, die Blackstock als „Cell-map Proteomics“ und „Expression Proteomics“ beschreibt [104]: „Cell-map Proteomics“ beinhaltet die systematische Analyse des Proteoms einer Zelle [105]. Untersucht werden v.a. subzelluläre Lokalisation von Proteinen in Zellorganellen [106] oder Proteinkomplexe sowie Protein-Protein Interaktionen [107]. Die Zusammenfassung und Archivierung dieser Informationen soll v.a. zum besseren Verständnis der Zell- und Proteinfunktion beitragen. Der Schwerpunkt von „Expression Proteomics“ hingegen liegt bei der Analyse globaler Veränderungen in Proteinexpressionsmustern. Die Stärke der 2D-Gelelektrophorese-Technik kommt hierbei voll zum Tragen, denn sie erlaubt den direkten Vergleich und die Identifikation unterschiedlich exprimierter Proteine. Interessant sind beispielsweise klinische Fragestellungen zu krankheitsspezifischen Proteinen und Proteinexpressionsmuster bei psychiatrischen [108], kardiologischen [109], onkologischen [110-113] oder neurologischen [114] Erkrankungen. Die Charakterisierung geeigneter Zielmoleküle wäre z.B. für die Entwicklung neuer Medikamente von Vorteil [115].

In der Mikrobiologie wird die 2D-Gelelektrophorese im Rahmen von Proteomics in Kombination unterschiedlichster Methoden auf vielen Gebieten angewendet [116], mit

dem alles überragenden Ziel, globale regulatorische Netzwerke der Zelle zu verstehen und entschlüsseln [117]. Auf dem Weg dorthin finden vergleichende Proteomanalysen mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese-Technik im Sinne von „Expression Proteomics“ vor allem bei Fragen zur Pathogenität von Organismen Anwendung. Verglichen werden z.B. Proteinexpressionsmuster von antibiotikaresistenten und sensiblen Bakterienstämmen [118], von Bakterien als Reaktion auf unterschiedliche Stimuli [119] von virulenten Wildtypen und knock-out Mutanten mit reduzierter Virulenz [120] oder von virulenten und spontan avirulenten Bakterienstämmen [121], mit dem Ziel, phäno- oder genotypische Unterschiede entsprechenden Veränderungen der Proteinexpression zuzuordnen.

In dieser Arbeit wurde eine vergleichende Proteomanalyse von zwei phänotypisch unterschiedlichen Bakterienstämmen von *L. pneumophila* Sg1, Subgruppe OLDA [54] durchgeführt. Die 2D-Gelelektrophorese-Technik kombiniert mit N-terminaler Mikrosequenzierung ermöglichte hierbei den Vergleich der Proteinexpressionsmuster des virulenten Wildtyps RC1 und der avirulenten Switch-Mutante 811 und die Identifizierung differentiell exprimierter Proteine.

### **1.5. Ziel der Arbeit**

Die LPS-Phasenvariation des virulenten Wildtyps RC1 von *L. pneumophila* Sg1 geht einher mit einer großen Anzahl unterschiedlicher phänotypischer Veränderungen der avirulenten Switch-Mutante 811 (siehe 1.3.) [54-56]. Der molekulare Mechanismus dieser Phasenvariation wurde mit der Exzision und Insertion einer 30 kb Nukleotidsequenz identifiziert [56]. Eine interessante Fragestellung war nun, auf welche Art sich die differenten Eigenschaften des Wildtyps und der Mutante in deren globaler Proteinexpression widerspiegeln. Um die Gesamtheit aller phänotypischen Unterschiede dieser Bakterienstämme auf Protein-Ebene festzustellen, wurde in dieser Arbeit eine vergleichende Proteomanalyse mittels 2D-Gelelektrophorese-Technik durchgeführt. Ziel war es, nach der Etablierung dieser Methodik für *L. pneumophila* Sg1, differentiell synthetisierte Proteine der Bakterienstämme RC1 und 811 zu erfassen und zu identifizieren. Ein globaler Überblick über unterschiedlich exprimierte Proteine des virulenten und avirulenten Bakterienstammes stand im Vordergrund.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Verwendete Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Typenbezeichnung; Hersteller</b>
Plattenmikroskop	Olympus SZX 9; Olympus Optical, Hamburg
Zentrifugen	Sorvall® RC-5B, Sorvall® RC-5B Plus DuPont de Nemours, Bad Homburg
French Press	SLM Aminco French® Pressure Cell Press; Heinemann, Schwäbisch Gmünd
ELISA-Reader	Model 3550; Bio-Rad, München
Speed Vac	Speed Vac® Plus SC110A; Savant, Coventry (UK)
Vortex	Vortex-Genie 2; Scientific Industries, Bohemia N.Y. (USA)
Gelstreifen-Rehydratationsplatte	Immobiline DryStrip Reswelling Tray; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
IF-Elektrophorese-Kammer	Multiphor II; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Kühlungsgerät für IF	Multitemp™ III thermostatic circulator; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Stromversorgungsgerät für IF	Elektrophoresis Power Supply EPS 3500 XL; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Gelgießständer	Casting Stand P II; Bio-Rad, München
SDS-Gel-Elektrophorese-Kammer	Protean II xi cell; Bio-Rad, München

## Stromversorgungsgerät für SDS-PAGE

	PowerPac 1000 Power Supply; Bio-Rad, München
Schüttler	Phero-Shaker; Fisher-Scientific, Nidderau
Transparentfolien-Schweißgerät	Vacupac; Krups, Solingen
Scanner	Agfa SnapScan 1212; Agfa-Gevaert, Morstel (Belgien)
Leuchtplatte	Hitachi Tablet Digitizer; Hitachi Data Systems, Feldkirchen
Western Blot Kammer	Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell; Phase®, Lübeck
Sequenzierer	AB`476 A; Applied Biosystems, Weiterstadt

## 2.1.2. Verwendete Labormaterialien

<b>Labormaterial</b>	<b>Typenbezeichnung; Hersteller</b>
Pipetten	Reference; Eppendorf, Köln
Pipetten-Spitzen	Standard Pipet Tips; Bio-Rad, München
Plastik-Caps	Standard Micro Test Tubes; Bio-Rad, München
Microtiter-Platte	Microtiter; Greiner Microlon, Nürten
Filterpapier	Blottingpapier; Hartenstein, Würzburg
Filterpapierstreifen (Elektrode)	IEF Electrode Strip; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Parafilm	Parafilm „M“; Fisher-Scientific, Nidderau
Äußere und innere Glasplatten für SDS-PAGE	Bio-Rad, München
Spacer 1,0 mm, 22,3 cm für SDS-PAGE	Bio-Rad, München
Gelkassettenhalter, 20 cm für SDS-PAGE	Bio-Rad, München
Frischhaltefolie	Quickpack Flexothen®; Haushalt + Hygiene, Renningen
Gelinkubationsschalen (243x243x25 mm)	Nunc Biologische Testschalen; Nunc, Wiesbaden
Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran	Pro Blott Membranes; Applied Biosystems, Weiterstadt

### 2.1.3. Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
30% Acrylamid/Bis(N,N'-Methylen-bisacrylamid)-Lösung	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth, Karlsruhe
Ampuwa, reinst H <sub>2</sub> O	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Ammonium Persulfat (APS)	Bio-Rad, München
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford (USA)
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
CHAPS	Carl Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R-250	Life Technologies, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Life Technologies, Karlsruhe
DNase	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
IF-Lauföl, DryStrip cover fluid	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt

Ethanol zur Analyse	Merck, Darmstadt
Formaldehyd 37%	AppliChem , Darmstadt
Glycerin, wasserfrei	Merck, Darmstadt
Glycin Rotipuran®	Carl Roth, Karlsruhe
2-Iodacetamid	Merck, Darmstadt
Legionella-C.Y.E.-Agar, Basis	Merck, Darmstadt
Legionella-B.C.Y.E. Alpha-Wachstums-Supplement	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Methanol zur Analyse	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat, wasserfrei	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat, wasserfrei	Riedel-de-Haen, Seelze
Pharmalyte™ für IF	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
pH-Gradienten-Gelstreifen pH 3-10, 180x3x0,5 mm	Immobiline DryStrip pH 3-10, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
pH-Gradienten-Gelstreifen pH 4-7, 180x3x0,5 mm,	Immobiline DryStrip pH 4-7, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
pH-Gradienten-Gelstreifen pH 6-11, 180x3x0,5 mm,	Immobiline DryStrip pH 6-11, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Protease inhibitor cocktail tablets	Boehringer, Mannheim
RNAse	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	ICN Biomedicals Inc., Aurora (USA)
Standard I-Nährbouillon	Merck, Darmstadt
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylethyldiamin) zur Analyse	Carl Roth, Karlsruhe
Thioharnstoff	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Bakterienstämme

Folgende Bakterienstämme wurden verwendet [54]:

Stamm RC1: *Legionella pneumophila*, Serogruppe (Sg)1, Subgruppe OLDA,  
klinisches Isolat, virulent.

Stamm 811: Spontane Switch-Mutante von RC1, avirulent.

#### 2.2.1.1. Anzucht und Konservierung der Bakterienstämme

Verwendete Lösungen:

Legionella-C.Y.E.-Agar, Basis:

1,32 g Aktivkohle

3,96 g Hefeextrakt

5,72 g Agar-Agar

ad 440 ml H<sub>2</sub>O reinst

Legionella-B.C.Y.E. Alpha-Wachstums-Supplement

5,0 g ACES-Puffer

0,125 g Eisenpyrophosphat

0,2 g Cystein-Hydrochlorid

0,5 g alpha-Ketoglutarat

ad 50 ml H<sub>2</sub>O reinst

Einfriermedium:

23 ml Glycerin 87% zur Analyse

2,5 g Standard I-Nährbouillon, Merck

ad 77 ml H<sub>2</sub>O reinst

### Durchführung:

Die Anzucht der Bakterienstämme wurde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> durchgeführt. Als Nährboden diente Legionella-C.Y.E.-Agar, Basis, der mit Legionella-B.C.Y.E.-alpha-Wachstums-Supplement entsprechend den Angaben des Herstellers versetzt wurde.

Die Bakterienstämme wurden in Einfriermedium in Plastik-Caps bei -80°C gelagert. Von diesen Stocks wurden die Bakterien mittels fraktioniertem Ausstrich auf den Nährboden aufgetragen. Nach vier Tagen Bebrütungszeit waren Einzelkolonien vom Wildtyp RC1 und der Mutante 811 gewachsen. Diese wurden mit Hilfe eines Plattenmikroskops (Olympus SZX 9) anhand ihrer Kolonie-Morphologie identifiziert.

Hierbei hatten Einzelkolonien des Wildtyps RC1 einen rötliches, die der Mutante 811 ein weißliches Aussehen. Anschließend wurden jeweils Einzelkolonien des Wildtyps und der Mutante mit Hilfe einer Platinöse gepickt, im fraktionierten Ausstrich auf Agarplatten aufgetragen und 48 h bebrütet. In fünf Anzucht-Serien wurden mit fünf verschiedenen Bakterien-Chargen zwischen 8 und 15 Agarplatten mit Einzelkolonien von RC1 und 9 bis 47 Agarplatten mit Einzelkolonien von 811 beimpft. Dann wurden die Bakterien geerntet und für die zweidimensionale Gelelektrophorese präpariert.

### **2.2.1.2. Präparation der Bakterien für die zweidimensionale Gelelektrophorese**

#### Verwendete Lösungen:

##### Waschpuffer (Lösung 1):

10 mM TRIS-HCl, pH 7,5

10 mM EDTA, pH 8,0

##### Protease-Inhibitor-Lösung (Lösung 2):

1 Tablette Protease Inhibitor *ad* 50 ml Lösungsvolumen

10 mM TRIS-HCl, pH 7,5

10 mM EDTA, pH 8,0

DNase-RNase-Lösung (Lösung 3):

10 mg DNase  
2,5 mg RNase  
101,65 mg Magnesiumchlorid  
*ad* 10 ml H<sub>2</sub>O reinst

Durchführung:

Zunächst wurden die Kolonien der Stämme RC1 und 811 auf ihre homogene Kolonie-Morphologie mittels Plattenmikroskop überprüft. Anschließend wurden die Bakterienkolonien mit Hilfe von sterilen Wattetupfern abgenommen und in je 20 ml H<sub>2</sub>O reinst suspendiert. Die geerntete Bakterienmenge wurde mittels optischer Dichtemessung (OD) bestimmt. Gemessen wurde bei 600 nm Wellenlänge. Die so gewonnenen Bakteriensuspensionen des Wildtyps und der Mutante wurden 10 Minuten bei 12000 U/min und 4°C zentrifugiert (Sorvall® RC-5B, Sorvall® RC-5B Plus). Nach Abgießen des Überstandes wurden die Bakterienpellets zweimal mit je 50 ml Waschpuffer (Lösung 1) resuspendiert und wiederum 10 min bei 12000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils abgegossen. Die gewaschenen Zellpellets wurden jeweils in 7,5 ml Protease-Inhibitor-Lösung (Lösung 2) auf Eis gekühlt resuspendiert. Anschließend wurden diese Bakteriensuspensionen mittels French® Pressure Cell Press mechanisch lysiert, bis die Bakterienlysate klar waren. Zur späteren quantitativen Proteinbestimmung wurden jeweils 100 µl Bakterienlysate-Probe entnommen und bei -20°C konserviert. Im Anschluss wurde den Bakterienlysaten (7,4 ml) je 900 µl DNase-RNase-Lösung (Lösung 3) zugegeben. Diese Lösung (7,49 ml) inkubierte 1 h auf Eis und wurde anschließend bei +4°C für maximal 24 h gelagert. Die auf diese Weise behandelten Bakterienlysate wurden nach Proteinbestimmung entsprechend ihrer Proteinkonzentrationen aliquotiert und bei -20°C konserviert.

### 2.2.1.3. Quantitative Proteinbestimmung der Bakterienlysate

Für die quantitative Gesamt-Proteinbestimmung der Bakterienlysate wurde der BCA (bicinchonic acid) Protein Assay Kit (Pierce, Rockford (USA)) verwendet, der folgende Reagenzien enthält:

BCA-Reagenz A, bestehend aus Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Bicinchoninic-Säure und Natriumtartrat in 0,1 M Natriumhydroxid, und

BCA-Reagenz B, das 4% Kupfersulfat enthält. Außerdem war als Protein-Standard-Lösung bovines Serumalbumin (BSA) in einer Konzentration von 2,0 mg/ml enthalten.

Das Prinzip des BCA Protein Assays basiert auf folgenden Reaktionen:

Im alkalischen Medium reagieren  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen mit Peptidbindungen von Proteinen. Hierbei werden  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen reduziert und  $\text{Cu}^{1+}$ -Protein-Komplexe gebildet (Biuret-Reaktion). Ein  $\text{Cu}^{1+}$ -Ion eines  $\text{Cu}^{1+}$ -Protein-Komplexes reagiert mit zwei Bicinchoninic-Säure(BCA)-Molekülen. Bei dieser Farbreaktion erscheint der resultierende BCA- $\text{Cu}^{1+}$ -Protein-Komplex lilafarben. Durch optische Dichtemessung wird die Absorption des lilafarbenen BCA- $\text{Cu}^{1+}$ -Protein-Komplex bei 570 nm bestimmt. Die gemessenen Absorptionswerte verhalten sich linear zu den eingesetzten Proteinkonzentrationen.

Sowohl von der Protein-Standard-Lösung als auch von den Bakterienlysate-Proben (100  $\mu\text{l}$ ) des Wildtyps RC1 und der Mutante 811 wurden Verdünnungsreihen hergestellt. Mittels der jeweils gemessenen Absorptionswerte und den bekannten Konzentrationen der Protein-Standard-Lösung wurden die Proteinkonzentrationen der Bakterienlysate errechnet.

Verwendete Lösungen:

Folgende Verdünnungsreihe wurde von der Protein-Standard-Lösung (BSA-Lösung) hergestellt:

Volumen BSA	Volumen H <sub>2</sub> O reinst	Konzentration der BSA-Lösung	Bezeichnung der BSA-Lösung
300 µl von (Stock)	0 µl	2000 µg/ml	-
375 µl von (Stock)	125 µl	1500 µg/ml	(A)
325 µl von (Stock)	325 µl	1000 µg/ml	(B)
175 µl von (A)	175 µl	750 µg/ml	(C)
325 µl von (B)	325 µl	500 µg/ml	(D)
325 µl von (D)	325 µl	250 µg/ml	(E)
325 µl von (E)	325 µl	125 µg/ml	(F)
100 µl von (F)	400 µl	25 µg/ml	(G)

Folgende Verdünnungsreihe wurde von den Bakterienlysaten hergestellt:

Volumen Bakterienlysat	Volumen H <sub>2</sub> O reinst	Konzentration der Probe	Bezeichnung der Probe
100 µl	0 µl	1 x unbekannt	(1)
50 µl von (1)	50 µl	½ x unbekannt	(2)
50 µl von (2)	50 µl	¼ x unbekannt	(3)
50 µl von (3)	50 µl	1/8 x unbekannt	(4)
50 µl von (4)	50 µl	1/16 x unbekannt	(5)
50 µl von (5)	50 µl	1/32 x unbekannt	(6)
50 µl von (6)	50 µl	1/64 x unbekannt	(7)
50 µl von (7)	50 µl	1/128 x unbekannt	(8)
50 µl von (8)	50 µl	1/256 x unbekannt	(9)
50 µl von (9)	50 µl	1/512 x unbekannt	(10)
50 µl von (10) verwerfen			

Des Weiteren wurde folgende Lösung hergestellt:

Farbreagenz :

30 ml      BCA Reagenz A

0,6 ml      BCA Reagenz B

Durchführung:

Je 50 µl der BSA-Lösungen (A) bis (G), der Bakterienlysate-Proben (1) bis (10) und einer H<sub>2</sub>O reinst – Blindprobe wurden in 1,5 ml Plastik-Caps pipettiert. Hierzu wurde jeweils 1 ml des Farbreagenz zugegeben und vermischt. Nach Inkubation der Lösungen für 30 min bei 37°C wurden je 100 µl von allen Lösungen als Triplet-Werte in eine Microtiterplatte (Greiner Microlon) pipettiert. Die Pipettier-Zeit wurde jeweils konstant gehalten. Die Absorption der Lösungen wurde bei 570 nm Wellenlänge (ELISA-Reader, Bio-Rad, München) gemessen. Anhand der durch die Absorptionswerte der Protein-Standard-Lösungen (BSA) ermittelten Standard-Kurve konnten die Proteinkonzentrationen der Bakterienlysate ermittelt werden.

Auf der Basis der Ergebnisse der Proteinbestimmung wurden die Bakterienlysate-Lösungen (je 7,49 ml) zu Bakterienlysate-Proben mit Proteinmengen von 0,6 mg, 1,0 mg, 1,2 mg, 1,4 mg, 1,6 mg oder 2,4 mg aliquotiert und bei -20°C konserviert. Diese Bakterienlysate-Proben stellten das Ausgangsmaterial für die zweidimensionale Gelelektrophorese dar.

## **2.2.2. Zweidimensionale Gelelektrophorese**

### **2.2.2.1. Rehydratation der pH-Gradienten-Gelstreifen**

Zu diesem ersten Teilschritt der zweidimensionalen Gelelektrophorese wurden pH-Gradienten-Gelstreifen (Immobiline DryStrips) verwendet, auf denen sich eine getrocknete Gelschicht mit immobilisiertem, konstantem pH-Gradienten befand. Es wurden Gelstreifen mit pH-Gradienten von pH 3-10, pH 4-7 oder pH 6-11 verwendet.

In einer Rehydratationsplatte (Immobiline DryStrip Reswelling Tray) wurden je ein getrockneter pH-Gradienten-Gelstreifen mit aliquotierten Bakterienproteinmengen von 0,6 mg, 1,0 mg, 1,2 mg, 1,4 mg, 1,6 mg oder 2,4 mg in Lösung (Lösung 4) rehydriert.

Hierbei saugt der pH-Gradienten-Gelstreifen die in Lösung befindlichen Proteine auf. Dadurch wurden die pH-Gradienten-Gelstreifen mit Bakterienprotein beladen.

Verwendete Lösungen:

Rehydrationslösung (Lösung 4):

2,40 g	Harnstoff
0,76 g	Thioharnstoff
50 mg	CHAPS
50 mg	DTT
26 µl	Pharmalyte™
ad 5 ml	H <sub>2</sub> O reinst

Durchführung:

Die aliquotierten Bakterienlysate wurden aufgetaut, in der Speed Vac (Speed Vac®Plus SC110 A) bei Raumtemperatur eingetrocknet und anschließend in 400 µl Rehydrationslösung (Lösung 4) suspendiert. Die gesamte Lösung mit einem Volumen von 400 µl wurde vollständig in eine Vertiefung der Rehydrationsplatte pipettiert. In die auf diese Weise bestückten Vertiefungen wurde jeweils ein getrockneter pH-Gradienten-Gelstreifen mit seiner Gel-beschichteten Seite nach unten gelegt. Die Rehydrationsplatte wurde dann mit befeuchteten Papiertüchern (TORK) und Frischhaltefolie (Quickpack Flexothen®) abgedeckt, um die Verdunstung der Lösung zu vermeiden. Nach 24 h Inkubation bei Raumtemperatur waren die pH-Gradienten-Gelstreifen auf ihre Originaldicke von 0,5 mm rehydriert und gleichzeitig mit Bakterienprotein bestückt. Im Anschluß an die Rehydratation der pH-Gradienten-Gelstreifen erfolgte unverzüglich die isoelektrische Fokussierung der Bakterienproteine.

**2.2.2.2. Isoelektrische Fokussierung (IF)**

Die isoelektrische Fokussierung [122] der Bakterienproteine in der Gelschicht der rehydrierten pH-Gradienten-Gelstreifen wurde mit einer IF-Elektrophorese-Kammer (Multiphor II) durchgeführt. Ein Kühlungsgerät (Multitemp™ III thermostatic circulator) gewährleistete konstante 20°C während der gesamten IF.

Nach der Rehydrierung wurden die pH-Gradienten-Gelstreifen beidseitig mit H<sub>2</sub>O reinst abgespült und mit der Gelschicht nach oben auf die horizontale Kühlplatte der IF-Elektrophorese-Kammer gelegt. Es konnten bis zu 12 pH-Gradienten-Gelstreifen gleichzeitig parallel zueinander platziert werden. Mit H<sub>2</sub>O reinst gewässerte Filterpapierstreifen (IEF Electrode Strip) dienten an beiden Enden der pH-Gradienten-Gelstreifen als Kontakt zwischen Gelstreifen und Elektrode. Hierbei lag jeweils das Gelstreifen-Ende mit dem niedrigeren pH-Wert der Anode der IF-Elektrophorese-Kammer an. Die pH-Gradienten-Gelstreifen wurden mit IF-Lauföl (DryStrip coverfluid) bedeckt und die IF durchgeführt.

Als Stromquelle diente das Stromgerät Elektrophoresis Power Supply EPS 3500 XL (Amersham Biotech, Freiburg). Das Stromgerät wurde so programmiert, dass automatisch die Spannung innerhalb einer Stunde von 0 Volt auf 500 Volt erhöht, für zwei Stunden die Spannung von 500 Volt konstant gehalten, innerhalb von fünf Stunden von 500 Volt auf 3500 Volt erhöht und für ca. 10 Stunden die Spannung von 3500 Volt konstant gehalten wurde. Nach Beendigung der IF wurden die pH-Gradient-Gelstreifen entweder sofort weiterbearbeitet, oder verpackt in Aluminiumfolie bei -80°C gelagert.

### **2.2.2.3. Äquilibrierung der pH-Gradienten-Gelstreifen nach der IF**

#### Verwendete Lösungen:

#### Äquilibrierungs-Stamm-Lösung (Lösung 5):

180 g	Harnstoff
150 ml	Glycerol 99%
20 g	SDS
50 ml	0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8
ad 500 ml	H <sub>2</sub> O reinst

Die Äquilibrierungs-Stamm-Lösung (Lösung 5) wurde à 12 ml aliquotiert, bei -20°C konserviert und unmittelbar vor Gebrauch aufgetaut.

#### Äquibrierungslösung A (Lösung 6):

32,5 mg DTT

6 ml Äquibrierungs-Stamm-Lösung (Lösung 5)

#### Äquibrierungslösung B (Lösung 7):

325 mg 2-Iodacetamid

6 ml Äquibrierungs-Stamm-Lösung (Lösung 5)

#### Durchführung:

Die Äquibrierung der pH-Gradienten-Gelstreifen erfolgte unmittelbar vor der SDS-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE). Die pH-Gradienten-Gelstreifen wurden zunächst 30 min mit je 6 ml Äquibrierungslösung A (Lösung 6) in einem Reagenzglas äquibriert. Hierzu wurde jeweils 6 ml Äquibrierungslösung A in ein 16 cm langes Reagenzglas pipettiert, ein Gelstreifen mit der Folienseite an der Innenwand des Reagenzglases platziert, die Öffnung mit Parafilm (Parafilm „M“, Biotech-Fischer) verschlossen, das Reagenzglas horizontal auf einen Schüttler (Phero-Shaker, Biotech-Fischer) gelegt, so dass die Äquibrierungslösung den pH-Gradienten-Gelstreifen in dem Reagenzglas auf voller Länge bedeckte und bei kreisförmiger Schüttelbewegung 30 min äquibriert.

Im Anschluß wurden die so behandelten pH-Gradienten-Gelstreifen auf die gleiche Art und Weise mit je 6 ml der Äquibrierungslösung B für 30 min behandelt. Unmittelbar danach erfolgte die SDS-PAGE.

#### **2.2.2.4. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)**

Die vertikale SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese [123] wurde mit isoelektrisch fokussierten und direkt vorher äquibrierten pH-Gradienten-Gelstreifen durchgeführt. Die verwendeten SDS-Polyacrylamidgele wurden einen Tag vor Gebrauch hergestellt.

### **Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele:**

Ein SDS-Polyacrylamidgel (200x170x1,0 mm) setzte sich aus einer Sammelgelschicht (10x170x1,0 mm) und einer Trenngelschicht (190x170x1,0 mm) zusammen. Während die Acrylamidkonzentration der Sammelgellösung immer konstant gehalten wurde, wurden Trenngellösungen mit jeweils 10-, 12- oder 15% Acrylamidanteil verwendet.

### Verwendete Lösungen:

Es wurden Trenngellösungen (Lösung 8) mit folgenden Zusammensetzungen verwendet:

Verwendete Chemikalien	10%iges Trenngel	12%iges Trenngel	15%iges Trenngel
30% Acrylamid	13,3 ml	16,0 ml	20,0 ml
2 M TRIS-HCl, pH 8.8	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
10% SDS	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml
H <sub>2</sub> O reinst	18,4 ml	15,7 ml	11,7 ml
APS	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml
TEMED	0,016 ml	0,016 ml	0,016 ml

Die Sammelgellösung (Lösung 9) setzte sich wie folgt zusammen:

1,5 ml Acrylamid 30%  
2,25 ml 0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8  
90 µl SDS 10%  
5 ml H<sub>2</sub>O reinst  
90 µl APS  
8 µl TEMED

### Durchführung:

Der apparative Aufbau zur Herstellung von zwei SDS-Polyacrylamidgelen beinhaltete folgende Schritte: Zunächst wurden zwei äußere und zwei innere Glasplatten (Bio-Rad, München) sowie vier Spacer (Bio-Rad, München) mit Ethanol 70% gereinigt. Daraufhin wurden je eine äußere Glasplatte, eine innere Glasplatte und zwei Spacer mit

Hilfe von zwei Gelkassettenhaltern zu einer Gelkassette zusammengefügt. Zwei Gelkassetten wurden vertikal in einem Gelgießständer (Bio-Rad, München) arretiert.

Die Herstellung der Trenn- und Sammelgellösungen erfolgte bei Raumtemperatur. Bei der Herstellung von Trenn- und Sammelgel wurden die verwendeten Chemikalien immer in identischer Reihenfolge gemischt: Zunächst wurde H<sub>2</sub>O reinst, dann TRIS-HCl, dann 30% Acrylamid und schließlich 10% SDS in ein Becherglas pipettiert. Unter ständigem Schwenken wurde daraufhin zügig APS und TEMED zugegeben. Da hierdurch die Polymerisation der Gellösung gestartet wird, wurde sofort nach Zugabe von APS und TEMED die Gellösung mittels 10 ml Pipette in die vertikal arretierten Gelkassetten gegeben.

Zunächst wurde die Trenngellösung hergestellt und in die Gelkassetten zwischen innere und äußere Glasplatten pipettiert, so dass 1 cm Abstand zwischen Trenngelschicht und Oberkante der inneren Glasplatte blieb. Im Anschluß wurde die Trenngelschicht sofort mit 1 ml Butanol überschichtet um eine gleichmäßige Trenngelschicht-Sammelgelschicht-Kontaktzone zu gewährleisten. Nach einer Stunde Polymerisationszeit wurde die Butanol-Überschichtung abgeschüttet und die vorbereitete Sammelgellösung auf die polymerisierte Trenngelschicht pipettiert, so dass 1 bis 2 mm Abstand zwischen Sammelgelschicht und Oberkante der inneren Glasplatte blieb. Die Sammelgelschicht wurde mit 500 µl Butanol überschichtet, um eine gleichmäßige Sammelgeloberfläche herzustellen. Nach einer weiteren Stunde Polymerisationszeit wurden die Gelkassetten aus dem Gelgießständer genommen und die Gelkassettenhalter entfernt. Die Gele wurden mit angefeuchteten Papiertüchern und Frischhaltefolie verpackt und über Nacht bei + 4°C gelagert, um eine vollständige und gleichmäßige Polymerisation der Gele zu gewährleisten. Die so hergestellten SDS-Polyacrylamidgele wurden am folgenden Tag zur SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese verwendet.

#### **Durchführung der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese:**

Eine SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurde parallel mit zwei SDS-Polyacrylamidgelen über Nacht durchgeführt. Es wurden kurz zuvor äquilibrierte pH-Gradienten-Gelstreifen verwendet.

Verwendete Lösungen:

Agaroselösung (Lösung 10):

0,5 g	Agarose
6,25 ml	0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8
43,75 ml	H <sub>2</sub> O reinst
1,15 g	SDS
15 mg	Bromphenolblau

SDS-Laufpuffer-Stammlösung (Lösung 11):

30 g	TRIS
144 g	Glycin
10 g	SDS
<i>ad</i> 1000 ml H <sub>2</sub> O reinst	

SDS-Laufpuffer-Gebrauchslösung (Lösung 12):

150 ml	SDS-Laufpuffer-Stammlösung (Lösung 11)
1350 ml	H <sub>2</sub> O reinst

Durchführung:

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurde in einer 2D-Elektrophoresekammer (Protean II xi cell, Bio-Rad, München) durchgeführt. Die Kammer war mit zwei SDS-Polyacrylamidgelen bestückbar.

Zur Durchführung der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese waren folgende Vorbereitungen nötig: Die über Nacht in den Gelkassetten auspolymerisierten SDS-Polyacrylamidgele wurden zunächst im Gelgießständer (Bio-Rad, München) arretiert. Die direkt zuvor äquilibrierten pH-Gradienten-Gelstreifen wurden mittels Pinzette so auf den Sammelgelen der SDS-Polyacrylamidgelen platziert, dass die Folienseite der Streifen der äußeren Glasplatte anlag und die pH-Gradienten-Gelstreifen auf voller Länge Kontakt zum Sammelgel hatten. Die so positionierten pH-Gradienten-Gelstreifen wurden mit Agaroselösung überschichtet. Hierzu wurde die Agarose kurzzeitig auf 100°C erhitzt und bei ca. 75°C in flüssiger Form zur Überschichtung der pH-Gradienten-Gelstreifen verwendet. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur und

abermaliger Verfestigung der Agaroselösung sicherte diese zum einen den Kontakt des pH-Gradienten-Gelstreifens zum Sammelgel, zum anderen diente das enthaltene Bromphenolblau zur Sichtbarmachung der Lauffront während der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese.

Die so mit pH-Gradienten-Gelstreifen und Agaroselösung beladenen Gelkassetten wurden in der 2D-Elektrophoresekammer (Protean II xi cell, Bio-Rad, München) positioniert. Die untere Pufferkammer wurde mit ca. 1100 ml, die obere mit ca. 400 ml SDS-Laufpuffer-Gebrauchslösung (Lösung 12) gefüllt, die unmittelbar vor der Durchführung der 2D-Elektrophorese hergestellt wurde.

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurde bei Stromstärken von 7 mA bis maximal 20 mA pro SDS-Polyacrylamidgel über Nacht durchgeführt. Als Stromquelle diente das Stromversorgungsgerät PowerPac 1000 Power Supply (Bio-Rad, München). Beendet wurde die Elektrophorese sobald die Lauffront, sichtbargemacht durch Bromphenolblau, sich ca. 1 cm vor dem Trenngelende befand. Im Anschluß wurden die SDS-Polyacrylamidgele aus den Gelkassetten gelöst und in Einmal-Plastikschalen (Nunc Biologische Testschalen, NUNC, Wiesbaden) sofort weiterbearbeitet.

### **2.2.3. Färbung der SDS-Polyacrylamidgele**

Der Färbeprozess der SDS-Polyacrylamidgele beinhaltete neben der Sichtbarmachung der Bakterienprotein-Spots auch deren Fixation im Polyacrylamidgel. Die Färbungen wurden sofort nach Ende der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese in Plastikschalen auf einem Schüttler unter leichtem Schütteln durchgeführt. Es wurde entweder eine Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R250 oder eine Silberfärbung vorgenommen.

### **2.2.3.1. Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R250**

#### Verwendete Lösungen:

##### Färbelösung (Lösung 13):

2,0 g	Coomassie Brilliant Blue R250
400 ml	Methanol 100%
100 ml	Essigsäure 100%
500 ml	H <sub>2</sub> O reinst

##### Entfärbelösung (Lösung 14):

400 ml	Methanol 100%
100 ml	Essigsäure 100%
500 ml	H <sub>2</sub> O reinst

#### Durchführung:

Nach Beendigung der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurden die Polyacrylamidgele in Plastikschaalen überführt und zwei Stunden mit 200 ml Färbelösung (Lösung 13) unter leichtem Schwenken gefärbt. Anschließend wurde die Färbelösung abgegossen und die Entfärbung der Gele ebenfalls unter leichtem Schütteln durchgeführt. Hierzu wurde je 200 ml Entfärbelösung (Lösung 14) zu den gefärbten Polyacrylamidgelen gegeben und mindestens 6 h entfärbt. Bis zur vollständigen Entfärbung des Gelhintergrundes wurde die Entfärbelösung mehrfach gewechselt. Mit Beendigung der Entfärbung wurden die Polyacrylamidgele in 200 ml H<sub>2</sub>O reinst in Plastikschaalen gelagert.

### 2.2.3.2. Silberfärbung

Die Silberfärbung wurde in Anlehnung an das Protokoll von Heukeshoven und Dernick [124] durchgeführt. Die Silberfärbung ist ca. 10 bis 100-fach sensitiver als die Coomassiefärbung.

#### Verwendete Lösungen:

##### Fixations-Lösung (Lösung 15):

400 ml     Methanol 100%  
100 ml     Essigsäure 100%  
500 ml     H<sub>2</sub>O reinst

##### Wasch-Lösung (Lösung 16):

1000 ml    Ethanol 100%  
1000 ml    H<sub>2</sub>O reinst

##### Reduktions-Lösung (Lösung 17):

0,2 g       Natriumthiosulfat  
*ad* 1000 ml H<sub>2</sub>O reinst

##### Silbernitrat-Lösung (Lösung 18):

2,0 g       Silbernitrat  
*ad* 1000 ml H<sub>2</sub>O reinst

##### Entwickler-Lösung (Lösung 19):

22 g       Natriumcarbonat  
0,8 ml     Formaldehyd 37%  
*ad* 800 ml H<sub>2</sub>O reinst

##### Stopp-Lösung 1,0% (Lösung 20):

5 g       Glycin  
*ad* 500 ml H<sub>2</sub>O reinst

#### Durchführung:

Im Anschluß an die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurden die Polyacrylamidgele unter leichtem Schütteln in Plastikschaalen eine Stunde mit 200 ml Fixationslösung (Lösung 15) fixiert. Nach Abschütten der Fixationslösung wurden die Polyacrylamidgele 3 x 20 min mit je 200 ml Wasch-Lösung (Lösung 16) gewaschen. Im Anschluß wurden sie 1 min mit 200 ml Reduktionslösung (Lösung 17) behandelt, bevor die Gele 2 x 20 sec mit H<sub>2</sub>O reinst gewaschen wurden. Dann erfolgte eine zwanzigminütige Behandlung mit 200 ml Silbernitrat-Lösung (Lösung 18), wonach die SDS-Gele wiederum 2 x 20 sec mit H<sub>2</sub>O reinst gewaschen wurden. Dann wurden die Gele zuerst 10 sec mit 150 ml Entwickler-Lösung (Lösung 19) behandelt, bevor sie mit weiteren 150 ml Entwickler-Lösung entwickelt wurden, bis die Protein-Spots deutlich sichtbar waren. Die Färbung wurde mit einer zehnminütigen Inkubation der Gele mit 200 ml Stopp-Lösung (Lösung 20) beendet. In 200 ml H<sub>2</sub>O reinst wurden die entwickelten Gele in Gelinkubationsschaalen gelagert.

#### **2.2.4. Gelkonservierung**

Die gefärbten SDS-Polyacrylamidgele wurden in Plastikschaalen (Nunc Biologische Testschalen, Wiesbaden) mit ca. 200 ml H<sub>2</sub>O reinst aufbewahrt. Zur Auswertung der gefärbten Gele wurden diese zwischen zwei transparente Schreibfolien DIN A4 (OHP-Schreibfolie für Direktbeschriftung, EuroOffice) gelegt. Die Ränder der Folien wurden mit Hilfe eines Transparentfolien-Schweißgerätes (Vacupac, Krups, Solingen) luftdicht verschweißt, nachdem ca. 10 ml H<sub>2</sub>O reinst mittels Spritzflasche zwischen die Schreibfolien gegeben wurde. Hierdurch waren die Gele zum einen konservierbar und zum anderen der visuellen und der computergestützten Analyse leichter zugänglich.

#### **2.2.5. Vergleichende Analyse der Proteinprofile der 2D-Gele**

Die Analyse der Proteinprofile der gefärbten 2D-Gele wurde visuell durchgeführt, d.h. der Vergleich der Proteinprofile erfolgte mit dem Auge. Die Originale der 2D-Gele des Wildtyps und der Mutante wurden hierfür auf eine Leuchtplatte (Hitachi Tablet Digitizer) gelegt, verglichen und korrespondierende übereinstimmende oder differente

Protein-Spots der beiden Bakterienstämme festgestellt und markiert. Auf diese Art und Weise wurden die Proteinprofile aller angefertigten 2D-Gele überprüft. Verglichen wurden 10-, 12- und 15%ige SDS-Polyacrylamidgele, die in den pH-Bereichen 3-10, 4-7 und 6-11 isoelektrisch fokussiert wurden. Anhand von acht definierten Orientierungs-Spots wurde die relative Position aller übrigen Protein-Spots bestimmt und Molekulargewichte (MW) anderer Spots abgeschätzt (siehe 3.3.).

Ergänzend zum visuellen Vergleich der 2D-Gele wurde eine computergestützte Analyse vorgenommen. Hierbei wurden die Gel-Originale mit Hilfe eines Scanners (Snap Scan 1212, Agfa) digitalisiert und gespeichert. Mit entsprechender Software (Melanie II, Testversion [125]) wurden die Bild-Dateien bearbeitet und analysiert. Die computergestützte Auswertung konzentrierte sich vor allem auf die Analyse vergrößerter Gel-Ausschnitte, Bestimmung der Gesamt-Protein-Spotzahl und die Archivierung der SDS-Gel-Bilder.

#### **2.2.6. Ermittlung der Aminosäure-Teilsequenzen von Spot-Proteinen**

Die Aminosäuresequenzen ausgewählter Spot-Proteine wurden durch N-terminale Mikrosequenzierung charakterisiert. Hierzu wurden im Anschluß an die SDS-PAGE die Protein-Spots des ungefärbten 2D-Gels auf eine PVDF-Membran gebロットet [96]. Nachdem die PVDF-Membran mit Coomassie Brilliant Blue R250 gefärbt wurde, sind die zu sequenzierenden Spots aus der Membran ausgeschnitten worden. Mit Hilfe eines Sequenators, einem automatischen Analysegerät (Sequenzierer AB 476, Applied Biosystems, Weiterstadt), wurde der N-terminale Teil einer Aminosäuresequenz der in dem PVDF-Membranausschnitt enthaltenen Proteinfragmente ermittelt. Dieser automatisierten Analyse liegt das Prinzip des sog. Edman-Abbaus [93] zugrunde, bei dem eine Aminosäure nach der anderen am Aminoende einer Peptidkette markiert, abgespalten und chromatographisch identifiziert werden kann. Auf diese Art und Weise wurde die Aufklärung einer Aminosäuresequenz von mindestens 7 Aminosäuren angestrebt, um eine einwandfreie Identifikation entsprechender Sequenzbereiche im *L. pneumophila*-Genom zu gewährleisten.

### **2.2.7. Identifikation der Proteinspot-Sequenzen mit Hilfe elektronischer Datenbanken**

Die durch N-terminale Mikrosequenzierung ermittelten Aminosäure-Sequenzen wurden mit dem bis *dato* bekannten Genom von *L. pneumophila* verglichen, welches auf Datenbanken des Columbia Genome Centers (CGC) [126] einzusehen war. Wurde die korrespondierende Genom-Position der Proteinspot-Aminosäure-Sequenz identifiziert, konnte mit Hilfe von Computerprogrammen (EditSeq [127], MapDraw [128]) die komplette Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins ermittelt werden. Das Molekulargewicht (MW) konnte errechnet, der isoelektrische Punkt (IP) kalkuliert und die komplette Aminosäuresequenz mit Sequenzen bekannter Proteine von *L. pneumophila* verglichen werden. Waren gesuchte Proteine bekannt, wurden die Spot-Proteine auf diese Weise identifiziert. Waren gesuchte Proteine von *L. pneumophila* noch nicht bekannt, wurde die komplette Spot-Aminosäuresequenz mit bekannten Proteinen anderer Bakterienspezies verglichen und nach hohen Übereinstimmungen gesucht. Als Proteindatenbank wurde SWISS-PROT [97] verwendet.

### 3. Ergebnisse

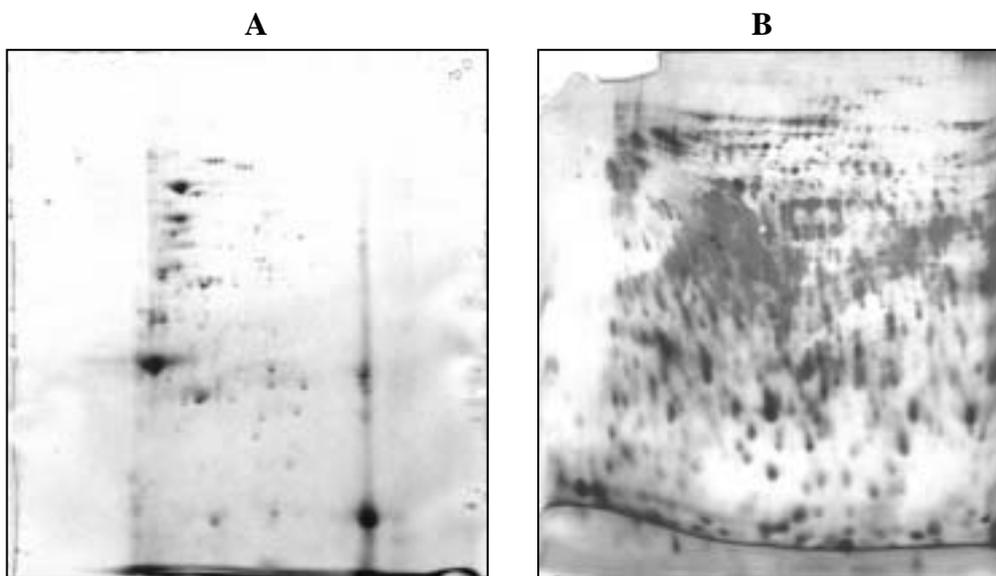
#### 3.1. Etablierung der 2D-Gelelektrophorese-Technik mit Bakterien-Zellysaten von *Legionella pneumophila* Sg1

Zur Durchführung der 2D-Gelelektrophorese wurden Bakterien-Zellysate von *L. pneumophila* Sg1 benötigt. Hierzu wurden die Bakterienstämme RC1 und 811 jeweils bei identischen Bedingungen angezchtet und anschließend präpariert (siehe 2.2.1.). Um ausreichend Zellysat-Material für die zweidimensionalen Auftrennungen zu gewinnen, wurden Anzchtungen fünf verschiedener Bakterien-Chargen vorgenommen. Zudem ermöglichten 2D-Gele der verschiedenen Bakterien-Chargen die Überprüfung und Bestätigung identischer und differenter Protein-Spots, welche auf 2D-Gelen aller Chargen gleichermaßen zu finden waren. Die 2D-Gelelektrophorese wurde wie in Kapitel 2.2.2. beschrieben durchgeführt. Die Bakterienproteine wurden in pH-Bereichen 3-10, 4-7 oder 6-11 isoelektrisch fokussiert und anschließend auf SDS-Gelen mit 10-, 12- oder 15% Polyacrylamidgehalt aufgetrennt. Nach Silberfärbung oder Färbung der 2D-Gele mit Coomassie Brilliant Blue R250 waren die Einzelprotein-Spots des verwendeten Zellysats in einem charakteristischen Verteilungsmuster bzw. Proteinprofil auf den Gelen sichtbar. Es wurden Zellysate mit Bakterien-Proteinmengen zwischen 0,6 mg und 2,4 mg pro 2D-Gel getestet. Die Proteinmenge von 1,2 mg pro 2D-Gel ermöglichte schließlich für isoelektrische Fokussierungen (IF) aller pH-Bereiche sowie für alle verwendeten Polyacrylamidgele und Färbungen optimale Ergebnisse. Somit wurden auf allen auszuwertenden 2D-Gelen die Idealmenge von 1,2 mg Bakterienprotein aufgetrennt. Eine Auswertung, d.h. eine vergleichende Analyse der Proteinprofile der 2D-Gele (siehe 2.2.5.), wurde schließlich nur bei Gelen von hoher Qualität vorgenommen, definiert durch folgende Kriterien:

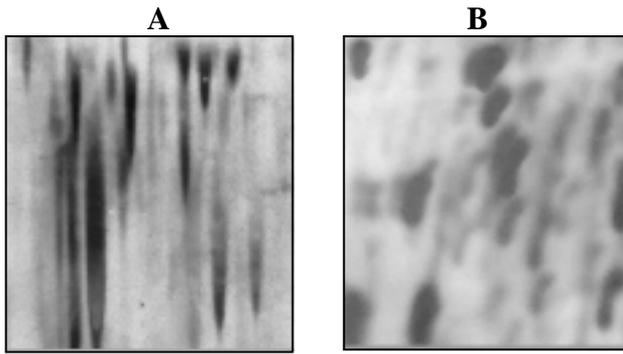
- Die horizontale und vertikale Auftrennung der Proteine auf den 2D-Gelen musste gleichmäßig sein. Unvollständige horizontale oder unregelmäßige, teilweise diagonale Laufrichtung der Proteine waren auf qualitativ minderwertigen Gelen zu beobachten (Abb. 1). Ursächlich sind vermutlich fehlerhafte pH-Gradienten-Gelstreifen und inhomogene Polymerisation der SDS-Polyacrylamidgele.

- Außerdem wurden Form und Randschärfe der Protein-Spots als Qualitätskriterium herangezogen. Qualitativ gute Spot-Darstellungen wiesen eine kreisrunde bis ovale Form mit scharfem Rand auf. Minderwertige Spots erschienen unscharf, langgezogen oder gedoppelt (Abb. 2). Während langgezogene Spots vermutlich auf unzureichende Äquilibrierung der pH-Gradienten-Gelstreifen (siehe 2.2.2.3.) zurückzuführen sind, wurden gedoppelte Spots bei fehlerhaftem Einlegen des pH-Gradienten-Gelstreifens in die Gelkassette (siehe 2.2.2.4.) beobachtet. Dieses Kriterium wurde auch für die Orientierungssspots (siehe 3.3.) angewendet, deren gute Qualität Voraussetzung für die Auswertbarkeit eines Gels waren.
- Schließlich sollten Protein-Spots in unmittelbarer Nähe eines differenten Spots identisch dargestellt sein.

Die Summe dieser Qualitätskriterien entschied über die Auswertbarkeit eines SDS-Gels. Auswertbar war ein Gel, bei dem zumindest Ausschnitte des Proteinprofils eindeutig identifizierbar waren und somit mit entsprechenden Ausschnitten anderer 2D-Gele verglichen werden konnte. Jeder differentielle Spot wurde anhand mehrerer qualitativ hochwertiger Gele, die jeweils mit Proteinen unterschiedlicher Chargen beladen waren, verifiziert.



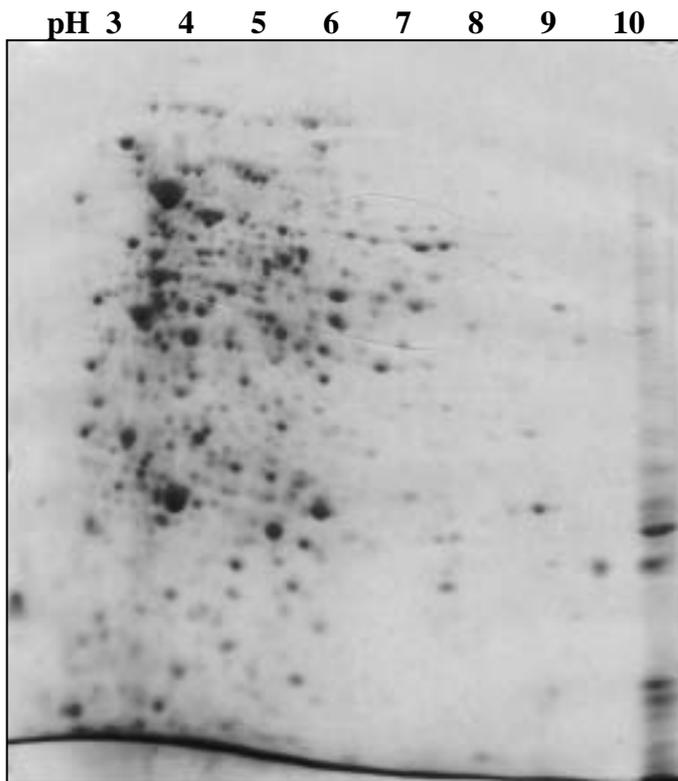
**Abb. 1.** 2D-Gelelektrophorese der Gesamtproteine von *L. pneumophila* Sg1 Stamm RC1. Die IF wurde im pH-Bereich 4-7 durchgeführt, die Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgte in einem 12% SDS-Gel, das anschließend silbergefärbt wurde. **A:** Beispiel für 2D-Gel mit unvollständiger horizontaler Auftrennung der Bakterienproteine während der IF. **B:** Beispiel für unregelmäßige vertikale Laufrihtung der Proteine während der SDS-PAGE.



**Abb. 2.** 2D-Gelelektrophorese der Gesamtproteine von *L. pneumophila* Sg1 Stamm RC1. Die IF wurde im pH-Bereich 4-7 durchgeführt, die Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgte in einem 12% SDS-Gel, das anschließend silbergefärbt wurde. **A:** Vergrößerter Ausschnitt aus 2D-Gel als Beispiel für langgezogene Bakterienprotein-Spots. **B:** Vergrößerter Ausschnitt aus 2D-Gel als Beispiel für gedoppelte Spots.

### 3.2. Definition des optimalen pH-Bereiches für die isoelektrische Fokussierung

Um einen Überblick über das Verteilungsmuster der Proteinprofile von *L. pneumophila* Sg1 auf den 2D-Gelen zu gewinnen, wurden die Zellysate der Bakterien zunächst in einem breiten pH-Bereich von 3-10 isoelektrisch fokussiert. Die anschließende SDS-PAGE wurde mit 12% SDS-Polyacrylamid-Gelen durchgeführt. Auf Gelen, die anschließend mit Coomassie Blue gefärbt wurden, konnten mit dieser Methode ca. 715 Protein-Spots pro 2D-Gel dargestellt werden, während auf silbergefärbten Gelen bis zu 870 Spots differenziert werden konnten. Dabei zeigte sich, dass die Mehrzahl der vorhandenen Proteine einen IP zwischen 4 und 7 ausweisen und sich in einem pH-Bereich von ca. 4 bis 7 konzentrieren (Abb. 3). Um eine deutlichere Auflösung dieses Bereiches zu erhalten, wurden daraufhin pH-Gradienten-Gelstreifen mit einem pH-Bereich von 4-7 eingesetzt (Abb. 4). In folgenden Untersuchungen konnten so Bakterienproteinspots auf 2D-Gelen, die im pH-Bereich 4-7 isoelektrisch fokussiert wurden, optimal und detailliert dargestellt und differenziert werden. Zur vergleichenden Analyse der Proteinprofile der Bakterienstämme RC1 und 811 eignete sich die Verwendung von pH-Gradienten-Gelstreifen des pH-Bereich 4-7 ausgezeichnet.



**Abb. 3.** 2D-Gelelektrophorese der Gesamtproteine von *L. pneumophila* Sg1 Stamm RC1 (WT). Die IF wurde im pH-Bereich 3-10 durchgeführt, die Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgte in einem 12% SDS-Gel, das anschließend nach Coomassie gefärbt wurde. Am oberen Bildrand sind die pH-Bereiche angegeben.

### 3.3. Protein-Spots zur Molekulargewichts-Abschätzung

Da von *L. pneumophila* Sg1 noch keine veröffentlichten, kartierten und beschrifteten Proteinprofile in Form von 2D-Gelen existierten, wurden zur Abschätzung der Molekulargewichte (MW) der Protein-Spots auf den 2D-Gelen 8 Spots (S1 bis S8) als Orientierungs-Spots festgelegt (Tab. 1 und Abb. 4). Dazu wurden solche Spots ausgewählt, die aufgrund ihrer Prominenz, ihrer gleichmäßigen Verteilung und eindeutig korrespondierenden Position auf den 2D-Gelen der beiden hier untersuchten Stämme eindeutig zu identifizieren waren.

Durch N-terminale Mikrosequenzierung konnten die Aminosäuresequenzen von 7 Spots ermittelt werden (S1, S2, S3, S5, S6, S7, S8) und durch Datenbank-Sequenzvergleich die Proteine von 5 dieser sieben Orientierungs-Spots (S2, S3, S6, S7, S8) identifiziert werden (Tab. 1). Errechnete Molekulargewichte (MW) und kalkulierte isoelektrische

Punkte (IP) dieser Proteine ermöglichten auf den 2D-Gelen nun die Abschätzung von Molekulargewicht und isoelektrischen Punkten weiterer Protein-Spots (Abb. 4.).

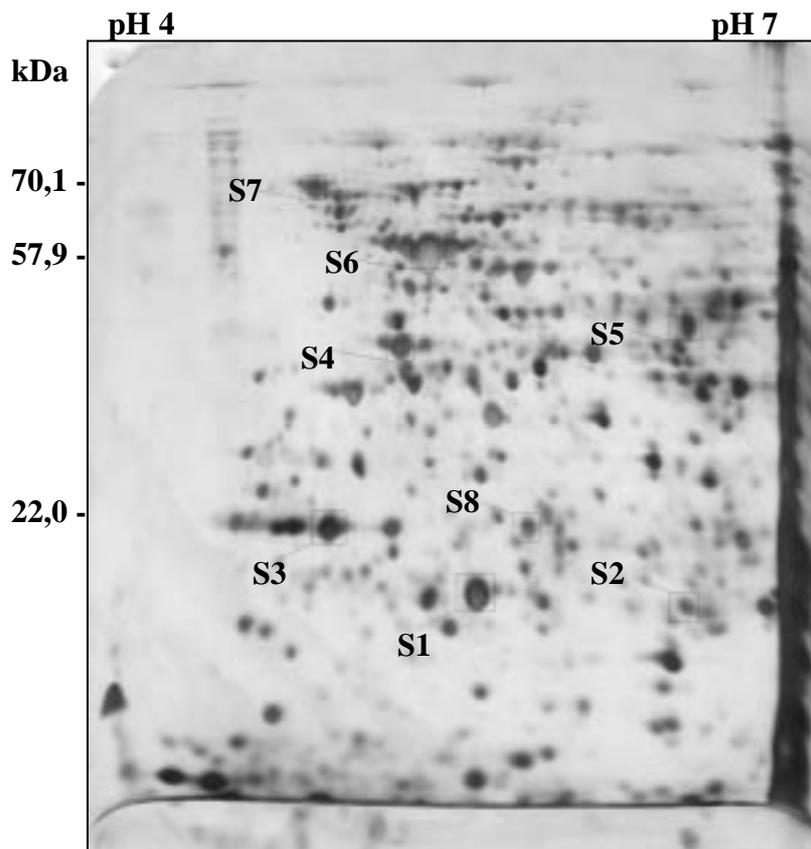
Die Aminosäuresequenzen von S2, S5, S6, S7 und S8 konnten kodierenden Nukleotidsequenzen des bis *dato* unvollständig sequenzierten Genoms von *L. pneumophila* [129] zu 100% zugeordnet und entsprechende Proteine mit bekanntem MW und IP größtenteils identifiziert werden (Tab. 1).

Die Aminosäure-Sequenz von S1 hingegen stimmte bestenfalls auf 6 von 10 Positionen mit dem *L. pneumophila*-Genom überein. Das auf dieser Genomposition kodierte Protein zeigte im Sequenzvergleich lediglich 55% Homologie zu dem Malonyl-CoA-Acyl Carrier-Protein von *H. influenzae* [130] und differiert zudem mit einem errechneten MW von 34,23 kDa deutlich von der Laufposition von S1 auf dem 2D-Gel (Abb. 4). Es ist somit anzunehmen, dass es sich bei S1 um eine noch nicht erfasste Sequenz eines noch unbekanntes Proteins von *L. pneumophila* handelt. Auch für die Aminosäuresequenz von Orientierungs-Spot S3 wurde kein Äquivalent im *L. pneumophila*-Genom ermittelt. Stattdessen zeigte S3 100% Homologie zu Chymotrypsinogen B von *Bos taurus* [131]. Als Ursache für diese konstante, auf allen 2D-Gelen feststellbare „Verunreinigung“ kommt die Verwendung von Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Boehringer, Mannheim, siehe 2.2.1.2.) in Betracht. Obwohl der Hersteller nicht bereit war, Auskunft über die Zusammensetzung der Protease Inhibitor Cocktail Tablets zu erteilen, ist Chymotrypsinogen als Bestandteil denkbar und wahrscheinlich.

Während der Aminoterminus der Sequenz von S4 blockiert und somit keine N-terminale Mikrosequenzierung und Protein-Identifikation möglich war, handelte es sich bei S5 um ein noch unbekanntes Protein von *L. pneumophila* mit einem errechneten MW von 45,8 kDa und IP von 6,01. Lediglich ein hypothetisches Protein von *S. aureus* [132] zeigte geringe Sequenzübereinstimmungen zu S5.

**Tab. 1.** Charakteristika der Proteine der Orientierungs-Spots S1-S8.

Bezeichnung	Funktion / Organismus	MW [kDa]	IP [pH]	Ref.
S1	Aminosäuresequenz unbekannt			
S2	Alkylhydrogenperoxid Reduktase / <i>L. pneumophila</i>	22,0	6,14	[133]
S3	Chymotrypsinogen B / <i>Bos taurus</i>	25,7	4,99	[131]
S4	Aminosäuresequenz nicht ermittelbar			
S5	unbekannt / <i>L. pneumophila</i>	45,8	6,01	
S6	Hsp 60 / <i>L. pneumophila</i>	57,9	5,20	[134, 135]
S7	Hsp 70 / <i>L. pneumophila</i>	70,1	4,85	[136, 137]
S8	GrpE / <i>L. pneumophila</i>	22,8	5,24	[136, 138]



**Abb. 4.** 2D-Gelelektrophorese der Gesamtproteine von *L. pneumophila* Sg1 Stamm RC1 nach IF im pH-Bereich 4-7, Auftrennung in einem 12% SDS-Gel und Silberfärbung. Mit Quadraten markiert sind die Orientierungs-Spots S1 bis S8. Am oberen Bildrand sind die pH-Bereiche angegeben, am linken Bildrand das Molekulargewicht der Spots in kDa (Tab. 1).

### 3.4. Identifikation von differentiell synthetisierten Proteinen

Anhand der relativen Positionen zu den Orientierungs-Spots wurden die übrigen Protein-Spots miteinander verglichen. Dies erfolgte per Hand durch akribischen Vergleich jeweils eines 2D-Gels mit Proteinen des Wildtyps und eines 2D-Gels mit Proteinen der Mutante. Waren differentielle Spots ermittelt, so wurde an jeweils mindestens zwei weiteren Gelen, die mit Bakterienproteinen verschiedener Chargen beladen waren, diese differentielle Synthese verifiziert.

Auf diese Weise wurden bei jedem Vergleich der 2D-Gele der beiden untersuchten Bakterienstämme alle Proteinspots genauestes betrachtet. Es ließen sich pro 2D-Gel ca. 540 Protein-Spots im pH-Bereich von 4-7 auf silbergefärbten Gelen darstellen.

#### 3.4.1. Proteine, die ausschließlich von der Mutante synthetisiert werden

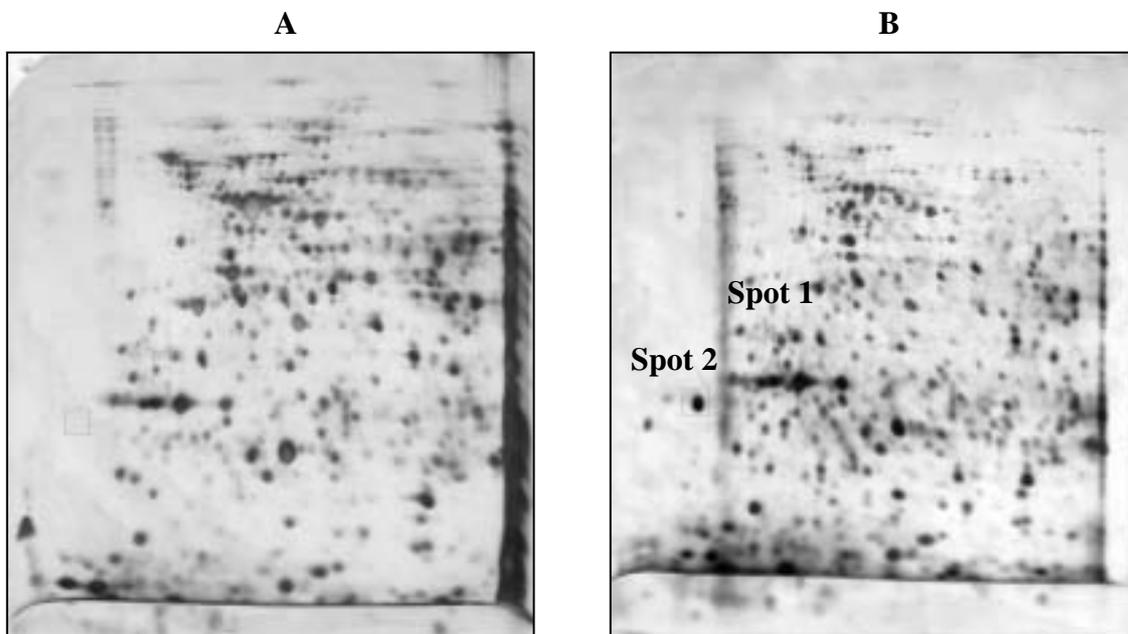
Durch vergleichende Analyse der Proteinprofile der Mutante 811 und des Wildtyps RC1 konnten schließlich sechs Protein-Spots (**1, 2, D, H, I, Z**) identifiziert werden, die bei dem virulenten Wildtyp fehlten.

Die Aminosäure-Sequenzen zweier sehr prominenter Protein-Spots (**1, 2**) (Abb. 5, Abb. 6) konnten durch N-terminale Mikrosequenzierung ermittelt werden (Tab. 2). Interessanterweise sind die korrespondierenden Nukleotidsequenzen auf dem Plasmid p811 (AJ277755, EMBL Datenbank) der avirulenten Mutante 811 von *L. pneumophila* [56] lokalisiert: Spot **1** ist das Proteinbiosynthese-Produkt von ORF T. Wie frühere Untersuchungen zeigten, handelt es sich hierbei um ein Protein der äußeren Zellmembran der Mutante 811 [56]. Weiterhin wurde ORF S (AJ277755, EMBL Datenbank) als kodierende Einheit dem Protein von Spot **2** zu 100% zugeordnet. Diese Ergebnisse bestätigen eindeutig, dass die hier angewandte Methode zur Identifikation differentiell exprimierter Proteine zweifelsfrei funktioniert, da Gene des 30 kb Plasmids in chromosomal inserierter Form nicht exprimiert werden [56]. Zudem stimmten die Laufpositionen beider Spots auf den 2D-Gelen mit den errechneten IP und MW der Proteine (Spot **1**: IP 4,8 / MW 31,8 kDa; Spot **2**: IP 4,4 / MW 27,0 kDa [139]) überein und die prominente Darstellung von Spot **1** und **2** auf Gelen der Mutante bzw. das Fehlen beim Wildtyp war konstant reproduzierbar.

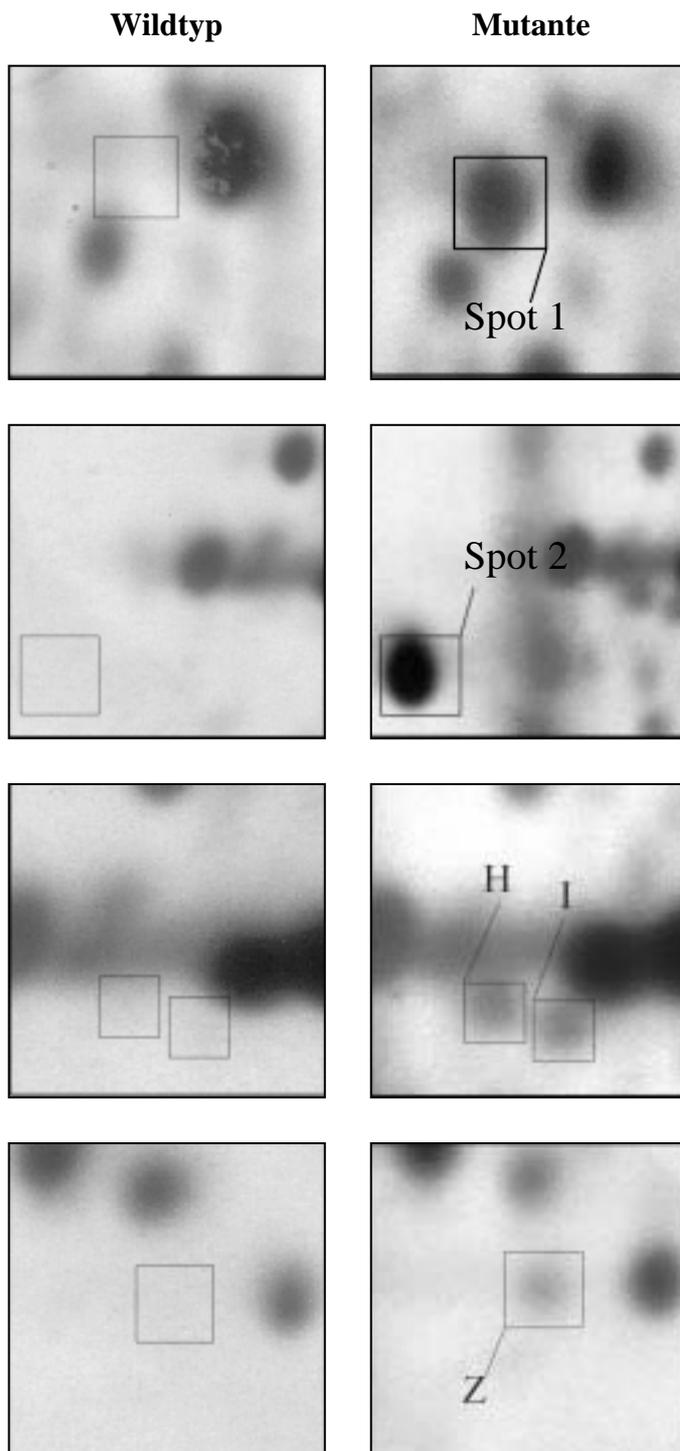
Die Spots **D**, **H**, **I** und **Z** waren auf den 2D-Gelen der Mutante eher diskret dargestellt, fehlten aber eindeutig auf 2D-Gelen des Wildtyps. Die Aminosäure-Sequenzen dieser Spots konnten jedoch aufgrund zu geringer Proteinmengen bzw. Blockade des Aminoterminus mit dem Edman-Abbau nicht ermittelt werden (Tab. 2, Abb. 6).

**Tab. 2.** Eigenschaften der Proteine, die nur bei der Mutante vorhanden waren.

Bezeichnung	Aminosäuresequenz Fkt. / <i>Organismus</i> / Homologie / Nukleotidposition	MW [kDa]	IP [pH]	Ref.
<b>1</b>	SLALSQIEIKQFLSEAHAEFQSEGFLQGA ORF T / <i>L. pneumophila</i> / 100,0% / p811, 20432-19563	31,8	4,8	[56]
<b>2</b>	AFGINYMGRVSTSANNDTQKVWIYNGTA ORF S / <i>L. pneumophila</i> / 100,0% / p811, 19533-18724	27,0	4,4	[56]
<b>D</b>	Aminosäuresequenz mit Edman-Abbau nicht ermittelbar			
<b>H</b>	Aminosäuresequenz mit Edman-Abbau nicht ermittelbar			
<b>I</b>	Aminosäuresequenz mit Edman-Abbau nicht ermittelbar			
<b>Z</b>	Aminosäuresequenz mit Edman-Abbau nicht ermittelbar			



**Abb. 5.** 2D-Gelelektrophorese der Gesamtproteine von *L. pneumophila* Sg1 nach IF im pH-Bereich 4-7, Auftrennung in einem 12% SDS-Gel und anschließender Silberfärbung. Mit Quadraten sind die Gel-Bereiche markiert, in denen die Spots **1** und **2** bei der Mutante vorhanden waren (**B**), bei dem Wildtyp jedoch fehlten (**A**).



**Abb. 6.** 2D-Gelelektrophorese der Gesamtproteine von *L. pneumophila* Sg1 nach IF im pH-Bereich 4-7, Auftrennung in einem 12% SDS-Gel und anschließender Silberfärbung. Auf korrespondierenden Ausschnitten des Proteinprofils des Wildtyps RC1 (linkes Panel) und der Mutante 811 (rechtes Panel) sind mit Quadraten Gel-Bereiche markiert, in denen bei der Mutante Spots vorhanden waren (**1**, **2**, **H**, **I** und **Z**), bei dem Wildtyp jedoch fehlten.

### 3.4.2. Proteine, die bei der Mutante stärker ausgeprägt sind als beim Wildtyp

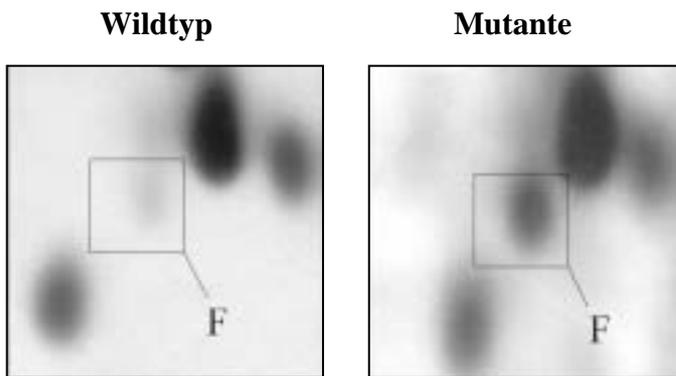
Neben Protein-Spots, die bei der Mutante vorhanden sind und bei dem Wildtyp fehlen, konnten auch drei Spots (**F**, **T**, **U**) charakterisiert werden, die im Proteinprofil der Mutante stärker bezüglich Intensität und Fläche ausgeprägt waren, als bei dem virulenten Wildtyp.

Die Aminosäuresequenz von Spot **F** konnte zu 100% einem bekanntem Nukleotid-Sequenzausschnitt von *L. pneumophila* zugeordnet werden, dessen Genprodukte jedoch noch nicht charakterisiert sind. Ein Vergleich der Sequenz mit bekannten Protein-Sequenzen anderer Organismen in der SWISS-PROT Datenbank [97] ergab maximale Homologien von 78,0% zur beta-Kette der ATP-Synthase mehrerer Bakterienspezies, z.B. *H. influenzae* [130]. Aufgrund dieser Beobachtung ist anzunehmen, dass es sich auch bei dem Protein von Spot **F** um ein Fragment der ATP-Synthase von *L. pneumophila* handelt, mit einem MW zwischen 10 und 15 kDa. Interessanterweise ist die ATP-Synthase Bestandteil der zytoplasmatischen Membran von Bakterien. Viele phänotypische Unterschiede zwischen Mutante 811 und Wildtyp RC1 sind im Membranbereich lokalisiert (siehe 1.3.). ATP-Synthase besteht aus einer oligomeren transmembranalen Einheit (CF 0) und einem extramembranal Kernbereich (CF 1), dessen katalytische Aktivität an der beta-Kette mit ATP/ADP-Bindungsstellen lokalisiert ist. Mit Hilfe eines transmembranalen Protonengradienten produziert das Enzym ATP aus ADP [140].

Die Aminosäure-Sequenzen der schwach dargestellten Spots **T** und **U** konnten aufgrund zu geringer Proteinmengen mittels Edman-Abbau nicht sequenziert werden.

**Tab. 3.** Proteinspots, die bei der Mutante stärker ausgeprägt waren.

Bezeichnung	Aminosäuresequenz Funktion / <i>Organismus</i> / Homologie	MW [kDa]	IP [pH]	Ref.
<b>F</b>	LGTVVEVIGAVVDVEFPRD ATP-Synthase / <i>Haemophilus influenzae</i> / 78,0%	50,0	4,9	[130]
<b>T</b>	Aminosäuresequenz mit Edman-Abbau nicht ermittelbar			
<b>U</b>	Aminosäuresequenz mit Edman-Abbau nicht ermittelbar			



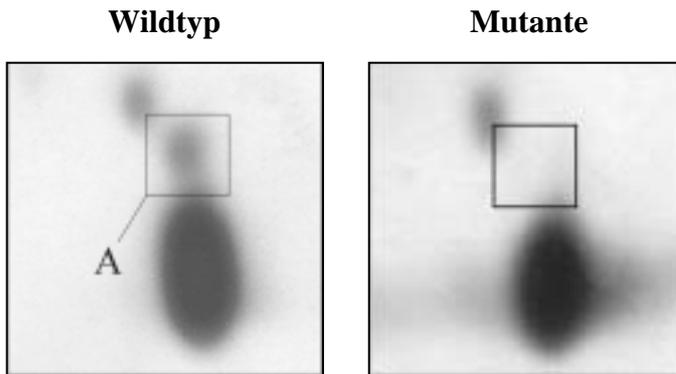
**Abb. 7.** 2D-Gelelektrophorese der Gesamtproteine von *L. pneumophila* Sg1 nach IF im pH-Bereich 4-7, Auftrennung in einem 15% SDS-Gel und anschließender Silberfärbung. Vergrößerter Bereich aus dem Proteinprofil der Mutante, in dem der Spot **F** stärker ausgeprägt ist, als in dem korrespondierenden Proteinprofilareal des Wildtyps.

### 3.4.3. Proteine, die nur vom Wildtyp synthetisiert werden

Neben Protein-Spots, die ausschließlich von der Mutante synthetisiert werden, konnte mit dem Protein-Spot **A** auch ein solcher identifiziert werden, der nur im Proteinprofil des Wildtyps vorhanden war (Tab. 4, Abb. 8). Für die Aminosäure-Sequenz von Spot **A** konnten korrespondierende Nukleotidsequenzen im bis *dato* bekannten *L. pneumophila*-Genom identifiziert werden. Die Funktion des durch diesen Sequenzabschnitt kodieren Proteins ist jedoch für *L. pneumophila* bisher unbekannt. Auch Sequenzvergleiche mit anderen bakteriellen Organismen ergaben lediglich niedrige Homologien, z.B. zu einem hypothetischen Protein von *Coxiella burnetti* [141], so dass über die Funktion zunächst nichts ausgesagt werden kann. Einschränkend ist anzumerken, dass mittels Edman-Abbau eine Sequenz von lediglich sechs Aminosäuren für Spot **A** ermittelt werden konnte, so dass ein suffizienter Sequenzvergleich nur eingeschränkt möglich ist.

**Tab. 4.** Eigenschaften von Spot A, der nur bei dem virulenten Wildtyp vorhanden war.

Bezeichnung	Aminosäuresequenz Funktion / <i>Organismus</i> / Homologie	MW [kDa]	IP [pH]	Ref.
<b>A</b>	XYTNILFXX hypothetisches Protein / <i>Coxiella burnetti</i> / 35,0%	15,8	5,72	[141]



**Abb. 8.** 2D-Gelelektrophorese der Gesamtproteine von *L. pneumophila* Sg1 nach IF im pH-Bereich 4-7, Auftrennung in einem 15% SDS-Gel und anschließender Silberfärbung. Vergrößerter Bereich aus dem Proteinprofil des Wildtyps, in dem der Spot **A** deutlich vorhanden ist, während er im korrespondierenden Proteinprofil der Mutante fehlt.

#### 3.4.4. Proteine, die beim Wildtyp stärker ausgeprägt sind als bei der Mutante

Das Proteinprofil des Wildtyps enthielt schließlich vierzehn Protein-Spots (**AA, B, C, G, M, N, O, P, Q, R, S2, V, X, Y**), die bezüglich Fläche und Intensität deutlich stärker ausgeprägt waren, als die korrespondierenden Protein-Spots der Mutante (Abb. 9 und Tab. 5). Durch N-terminale Mikrosequenzierung konnten die Aminosäure-Sequenzen von Spot **C, G, M, N** und **Y** ermittelt werden (Tab. 5). Die N-Termini der Proteine von Spot **AA, B**, und **Q** waren blockiert, so dass keine Sequenzierung durch Edman-Abbau möglich war. Für die Sequenzierung der Spots **O, P, R, V** und **X** reichte die Proteinmenge der jeweiligen Spots nicht aus, um eine suffiziente Sequenzierung durchzuführen.

Der Spot **C** stellte sich auf 2D-Gelen des Wildtyps im Vergleich zur Mutante scharfrandig-oval, etwa doppelt so groß und intensiver gefärbt dar. Die ermittelte Sequenz von 20 Aminosäuren für Spot **C** konnte dem bislang unvollständigen Genom von *L. pneumophila* zu 100% zugeordnet werden. Jedoch zeigten auch aktuelle Sequenzanalysen nur lücken- bzw. fehlerhafte Nukleotidsequenzen um den Bereich der kodierenden Positionen der Aminosäuresequenz von Spot **C**, so dass die komplette Proteinstruktur nicht bestimmbar war. Auch der Vergleich der ermittelten Aminosäure-

Sequenz von Spot C Sequenzen anderer Bakterienspezies ergab keine Ähnlichkeiten und somit keine Hinweise auf die Funktion des Proteins von Spot C. Weitere Sequenzvergleiche sind deshalb bei Vervollständigung des *L. pneumophila*-Genoms anzustreben.

Die Aminosäuresequenz von Spot G hingegen wurde dem *L. pneumophila*-Genom vollständig zugeordnet und ein MW von 52,5 kDa für die Sequenz dieser Position berechnet. Während für den entsprechenden Sequenzausschnitt von *L. pneumophila* noch kein Protein identifiziert ist, ergaben Sequenzvergleiche Ähnlichkeiten zu dem zytoplasmatischen Enzym Glutamin-Synthetase mehrerer Bakterien: Die höchste Homologie von 68,8% zeigte die Glutamin-Synthetase von *Vibrio cholerae* [142]. Das Enzym gehört zur Familie der Glutamin-Synthetasen und katalysiert die Bildung von Glutamin aus Glutamat und NH<sub>3</sub> [143]. Die errechneten Molekulargewichte [139] der Glutamin-Synthetasen der verglichenen Bakterienspezies (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Azospirillum brasiliense*) liegen mit ca. 52 kDa alle im Bereich des experimentell bestimmten MW von Spot G.

Auch für die ermittelte Aminosäure-Sequenz von Spot M wurde die kodierende Position im Genom von *L. pneumophila* identifiziert. Jedoch ist die Funktion des entsprechenden Proteins bislang unbekannt. Das Molekulargewicht dieser Sequenz wurde mit 37,9 kDa errechnet und ein IP von 5,43 kalkuliert (Tab. 5). Auch der Sequenzvergleich mit Proteinen anderer Bakterienspezies ergab keine Übereinstimmungen oder Ähnlichkeiten. Computergestützte Sequenzanalysen geben jedoch Hinweise auf ein lösliches Protein.

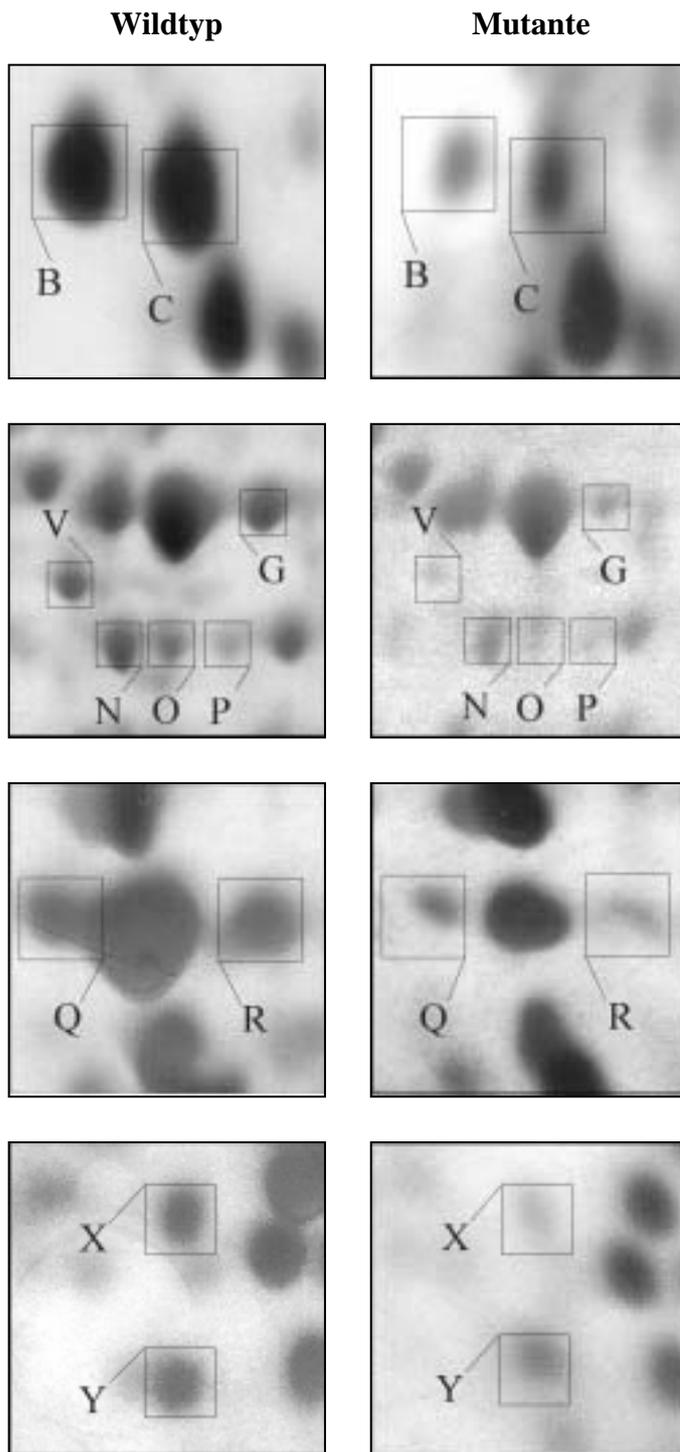
Die für Spot N ermittelte Aminosäuresequenz konnte zu 100% dem *L. pneumophila*-Genom zugeordnet werden. Ein MW von 44,8 kDa und IP von 5,67 wurden für diese Sequenz berechnet. Die Funktion des kodierten Proteins ist jedoch bisher nicht bekannt. Der Sequenzvergleich von Spot N zu Proteinen anderer Bakterien ergab Homologien zu der Dihydrolipoamid-Succinyl- bzw. -Acetyl-transferase (E2) mehrerer Bakterienspezies. Hierbei zeigte E2 von *H. influenzae* [130] mit 56% die höchste Sequenzübereinstimmung (Tab. 5). Das Enzym E2 ist einer der drei Komponenten des 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase-Multienzym-Komplexes (OGCD), der die oxidative Decarboxylierung von 2-Oxosäuren in Acetyl-CoA katalysiert [144]. Interessanterweise gehört E2 zu der Familie der 2-Oxosäure-Dehydrogenasen, der auch Lipid A

Biosynthese-Acetyltransferasen angehören. Die errechneten Molekulargewichte von E2 der Bakterien liegen zwischen 41 kDa und 45 kDa und somit im Bereich des experimentell bestimmten MW von Spot N. Es handelt sich um ein lösliches Protein (SOSUI).

Die Aminosäuresequenz von Spot Y zeigte 100% Homologie zu dem hypothetischen 40,0 kDa Protein ORF 9 von *L. pneumophila* [145]. Der errechnete IP liegt für ORF 9 bei 6,0, was dem experimentell bestimmten entspricht. Die kodierende Nukleotidsequenz wurde von Lüneberg *et al.* in früheren Untersuchungen als Teil eines Genclusters beschrieben, das 25 für die LPS-Biosynthese benötigte Gene (ORF 1 bis ORF 25) (AJ007311, EMBL Datenbank) umfasst. Interessanterweise zeigten ORF 9 und ORF 24 (NeuB) Homologien zu SiaC-Protein von *N. meningitidis* [146]. Als Sialinsäure-Synthetase oder „Neu5Ac condensing enzyme“ katalysiert SiaC die Kondensation von N-acetyl-mannosamin und Phosphoenolpyruvat zu Sialinsäure (N-Acetyl-Neuraminsäure). Funktionelle Untersuchungen bestätigten, dass ORF 24 in der Lage ist, eine *E. coli* K1 NeuB-Mutante zu komplementieren [145]. Die der Legionaminsäure ähnliche Sialinsäure bildet die strukturelle Einheit der Kapsel von *E. coli* K1. Während die Sialinsäure in Position 7, 8 und 9 Hydroxylgruppen trägt, besitzt die Legionaminsäure auf Position 7 eine Acetamido-, auf Position 8 eine O-acetyl- und auf Position 9 eine Methyl-Gruppe. Es wird aufgrund der oben geschilderten Experimente vermutet, dass die Biosynthese der Legionaminsäure ähnlich der der Sialinsäure verläuft [145]. Unklar ist, bei welchem Schritt der Legionaminsäurebiosynthese die differenten Substituenten zugeführt werden. Ebenso ist nicht geklärt, warum mit ORF 9 und ORF 24 zwei Sialinsäure-Synthetase homologe Enzyme im Genom des Wildtyps RC1 enthalten sind.

**Tab. 5.** Proteine, die bei dem Wildtyp stärker ausgeprägt waren.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Aminosäuresequenz Funktion / <i>Organismus</i> / Homologie</b>	<b>MW [kDa]</b>	<b>IP [pH]</b>	<b>Ref.</b>
<b>AA</b>	Sequenz nicht ermittelbar (Aminoterminus blockiert)			
<b>B</b>	Sequenz nicht ermittelbar (Aminoterminus blockiert)			
<b>C</b>	AVSKNEILETISNMTVMEVV kodierende Nukleotidsequenz bislang unvollständig			
<b>G</b>	KNVVLDIAIKEHDAKFVDLR Glutamin-Synthetase / <i>Vibro cholerae</i> / 68,8%	52,5	5,70	[142]
<b>M</b>	MTRLEELLYTLTSVIIRYHD Protein unbekannt / keine Homologie	37,9	5,43	
<b>N</b>	IEVKVPVLPESVADATV Dihydrolipoamide-Succinyltransferase / <i>H. infl.</i> / 56%	44,8	5,67	[130]
<b>O</b>	Sequenz nicht ermittelbar (Proteinmenge zu gering)			
<b>P</b>	Sequenz nicht ermittelbar (Proteinmenge zu gering)			
<b>Q</b>	Sequenz nicht ermittelbar (Aminoterminus blockiert)			
<b>R</b>	Sequenz nicht ermittelbar (Proteinmenge zu gering)			
<b>S2</b>	VLVGRKAPD Alkylhydrogenperoxid Reduktase / <i>L. pneum.</i> / 100%	22,0	6,14	[133]
<b>V</b>	Sequenz nicht ermittelbar (Proteinmenge zu gering)			
<b>X</b>	Sequenz nicht ermittelbar (Proteinmenge zu gering)			
<b>Y</b>	PFTIGPFSVEENHP ORF 9 (SiaC, NeuB) / <i>L. pneumophila</i> / 100%	40,0	6,00	[145]



**Abb. 9.** 2D-Gelelektrophorese der Gesamtproteine von *L. pneumophila* Sg1 nach IF im pH-Bereich 4-7, Auftrennung in einem 12% SDS-Gel und anschließender Silberfärbung. Beispiele vergrößerter, korrespondierender Ausschnitte aus Proteinprofilen zeigen Protein-Spots, die bei dem virulenten Wildtyp stärker ausgeprägt sind (linkes Panel), als bei der avirulenten Mutante (rechts Panel). Vergleichend gegenübergestellt sind Spot **B** und **C**, **N**, **O**, **G**, **P** und **V**, **Q** und **R** und **X** und **Y**.

#### 4. Diskussion

In dieser Arbeit wird die vergleichende Proteomanalyse des virulenten Wildtyps RC1 und der avirulenten Switch-Mutante 811 von *Legionella pneumophila* Sg1, Subgruppe OLDA [54] beschrieben. Interessanterweise wurden assoziiert mit einer LPS-Phasenvariation bei diesen Bakterienstämmen mehrere phänotypische Unterschiede festgestellt. Im Gegensatz zum Wildtyp verhielt sich die Mutante avirulent und serumsensibel, zeigte keine Affinität zu dem Antikörper mAb 2625 [54], exprimierte weder Pili noch Flagellen und zeigte neben einer weniger negativ geladenen Zelloberfläche [56] eine veränderte Lipid A-Struktur [55]. Eine N-methylierte 5-Acetimidoamino-Gruppe eines einzelnen Legionaminsäure-Restes des Wildtyps konnte als Epitop des Antikörpers mAb 2625 identifiziert werden, zeigte jedoch keinen Einfluß auf das Virulenzverhalten [57]. Der Phänotyp der Mutante bzw. des Wildtyps korreliert mit chromosomaler Exzision bzw. Insertion einer 30 kb Nukleotidsequenz. Dieser Sequenzbereich enthält 30 hypothetische ORFs (ORF A bis Z, ZA, ZB, ZC, ZD), deren Genprodukte z.T. Ähnlichkeiten zu Proteinen aufweisen, die in DNA-Rekombinationsvorgänge involviert sind. Jedoch wurden keine Übereinstimmungen der Gene des 30 kb Elements mit solchen der LPS-Biosynthese festgestellt, was bei veränderter LPS-Struktur der Bakterienstämme vermutet werden könnte. Insgesamt deuteten oben beschriebene Beobachtungen darauf hin, dass im Zusammenhang mit der Phasenvariation neben dem 30 kb Element die Expression weiterer Gene indirekt beeinflusst wird. Sowohl die Regulation der Phasenvariation als auch die Ursache des Virulenzverlustes der Mutante sind jedoch bislang weitgehend unklar [56].

Um nun die Gesamtheit aller phänotypischen Unterschiede im Zusammenhang mit der LPS-Phasenvariation zu erfassen, war eine Untersuchungstechnik, die einen globalen Überblick über die differente Genexpression liefern kann, von besonderem Interesse. Ein hierfür geeigneter methodischer Zugang war die vergleichende Proteomanalyse der Bakterienstämme mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese-Technik. Nachdem im Rahmen dieser Arbeit diese Methode für *L. pneumophila* Sg1 adaptiert und etabliert wurde, gelang es, die komplexen Proteingemische der Ganzzellpräparate der Bakterienstämme auf 2D-Gelen aufzutrennen und darzustellen. Somit war ein direkter, globaler Vergleich phänotypischer Unterschiede des virulenten und avirulenten Bakterienstammes auf

Protein-Ebene möglich. Differentiell synthetisierte Proteine konnten erfasst und mit Hilfe N-terminaler Mikrosequenzierung identifiziert werden. Das besondere Augenmerk dieser Arbeit lag auf solchen Proteinen, welche beim Wildtyp vorhanden sind und bei der Mutante fehlen oder *vice versa*. Ebenso konnten Proteine identifiziert werden, die bei einem der untersuchten Stämme jeweils stärker oder schwächer ausgeprägt waren. Nach Etablierung der 2D-Gelelektrophorese-Technik konnten insgesamt 24 Proteine (**1, 2, A, B, C, D, F, G, H, I, M, N, O, P, Q, R, S2, T, U, V, X, Y, Z, AA**) auf den 2D-Gelen identifiziert werden, die von dem Wildtyp RC1 und der Mutante 811 im Rahmen der LPS-Phasenvariation differentiell synthetisiert wurden. Mit Hilfe N-terminaler Mikrosequenzierung war es möglich, die Aminosäuresequenz für 10 (**1, 2, F, A, C, G, M, N, S2, Y**) dieser Proteine der Bakterienstämme zu ermitteln, so dass ein Sequenzvergleich zur Identifikation der Proteine durchgeführt werden konnte.

Zunächst sprangen mit Spot **1** und **2** zwei sehr auffällige Spots ins Auge. Spot **1** konnte als Genprodukt von ORF T identifiziert werden, der Bestandteil des 30 kb Elementes ist, das bei der Mutante in episomaler und bei dem Wildtyp in chromosomal inserierter Form vorliegt [56]. Bereits frühere Untersuchungen zeigten, dass bestimmte Genprodukte des 30 kb Elementes nur während der episomalen „high copy“ Phase des Mutanten-Phänotyps synthetisiert werden. So war das durch ORF T kodierte 35 kDa Protein lediglich aus Membranpräparationen der Mutante darstellbar, nicht jedoch aus entsprechenden Präparationen des Wildtyps [56]. Diese Ergebnisse konnten hier bestätigt werden, da Spot 1 ausschließlich auf 2D-Gelen der Mutante, nicht jedoch auf Gelen des Wildtyps identifiziert werden konnte. Interessanterweise konnte in dieser Arbeit ein weiteres Genprodukt des 30 kb Elementes identifiziert werden, das ebenfalls nur auf 2D-Gelen der Mutante vorhanden ist: Die Aminosäuresequenz von Spot **2** wird durch die Nukleotidsäuresequenz von ORF S [56] kodiert. Diese Ergebnisse zeigen übereinstimmend, dass die Gene der 30 kb Nukleotidsequenz nur während der episomalen Phase des Mutanten-Phänotyps exprimiert werden und bestätigen darüber hinaus, dass die in dieser Arbeit angewandte Methode zweifelsfrei funktioniert.

Bei näherer Betrachtung aller mit Hilfe N-terminaler Mikrosequenzierung sequenzierbaren, differenten Protein-Spots (**1, 2, F, A, C, G, M, N, S2, Y**) kristallisierten sich im folgenden drei Gruppen von Proteinen heraus: Solche, die an der

Zellmembran lokalisiert sind, Proteine, die in die LPS-Biosynthese involviert sind und Proteine des Bakterienstoffwechsels.

Zunächst war auffällig, dass es sich bei zwei differentiell synthetisierten Proteinen (Spot **1** und Spot **F**) um membranständige Proteine handelt. Bereits frühere Untersuchungen von Lüneberg *et al.* zeigten eine weniger negativ geladene Zelloberfläche der Mutante 811 und somit Hinweise auf eine differente Membranprotein-Zusammensetzung der Bakterienstämme [56]. Bei dem bereits erwähnten, durch ORF T kodierten Proteins (Spot 1) bleibt allerdings die Funktion zunächst unbekannt. Auch Sequenzvergleiche mit Proteinen anderer bakterieller Organismen ergaben keinerlei Homologien und somit keinen Hinweis auf eine mögliche Proteinfunktion.

Als weiteres membranständiges Protein konnte Spot **F** identifiziert werden, der bezüglich Größe und Intensität auf 2D-Gelen der Mutante deutlich stärker ausgeprägt war als beim Wildtyp. Der Aminosäuresequenz-Vergleich zeigte bis zu 78,0% Homologie zur beta-Kette der ATP-Synthase verschiedener Bakterienspezies, u.a. *H. influenzae* [130]. Offensichtlich wird dieses an der zytoplasmatischen Membran lokalisierte Enzym, das mit Hilfe von Protonengradienten ATP synthetisiert [140], von der Mutante stärker exprimiert. Vorstellbar ist, dass durch das massenhafte Vorkommen des ORF T-Genproduktes als Membranbestandteil der Mutante die Integration der ATP-Synthetase-Untereinheit in die Zellmembran gestört ist, und die Expression des Enzyms daher hochreguliert wird, um schwerwiegende Folgen für die Physiologie der Bakterienzelle zu vermeiden. Dies ist zunächst nur eine Hypothese, die mit geeigneten experimentellen Ansätzen untersucht werden muss. Von besonderem Interesse im Zusammenhang mit der veränderten Membranstruktur durch die Integration von „fremden Proteinen“ bei der Mutante ist natürlich der Einfluss auf die Serumresistenz der Stämme [147], die ein weites Feld von zu bearbeitenden Fragestellungen darstellt.

Nicht nur Proteine der Zellmembran beeinflussen die Oberflächenladung gram-negativer Bakterien, sondern vor allem auch die Struktur des Lipopolysaccharid-Komplexes. Die LPS-Struktur von *L. pneumophila* Sg1 wurde eingehend untersucht [54, 55, 60, 61] und Unterschiede, assoziiert mit der Phasenvariation zwischen dem virulenten Wildtyp RC1 und der avirulenten Mutante 811 festgestellt [54, 55, 57]. Während sich das Kern-Polysaccharid der Bakterienstämme strukturell nicht

unterscheidet [61, 148, 149] zeigt der Wildtyp eine bislang nicht beobachtete N-Methylierung der Legionaminsäure, die bei der Mutante fehlt [57]. Zudem weist die Mutante eine veränderte Lipoid A-Struktur auf: Die langkettigen 3-hydroxylierten Fettsäuren des Lipid A der Mutante waren durchschnittlich 2 Kohlenstoffreste kürzer als die des Wildtyps [55]. Interessanterweise konnten in dieser Arbeit mit Spot Y und Spot N zwei Proteine identifiziert werden, die in die LPS-Biosynthese involviert sind und die beide vom virulenten Wildtyp stärker exprimiert werden.

Bei dem Protein-Spot Y handelt es sich um das Genprodukt von ORF 9, Teil eines Genclusters (ORF 1-25) von *L. pneumophila* (AJ007311, EMBL Datenbank), auf dem Gene lokalisiert sind, die für Enzyme der LPS-Biosynthese kodieren [145]. In früheren Untersuchungen wurden für ORF 9 als auch für ORF 24 (NeuB) Homologien zur Sialinsäure-Synthetase von *N. meningitidis* [146] festgestellt und aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Sialin- und Legionaminsäure werden ähnliche Biosynthesewege vermutet [145]. Unklar ist bislang, weshalb zwei Sialinsäure-Synthetase homologe Enzyme im Genom von *L. pneumophila* vorhanden sind.

Jüngste Untersuchungen zeigen, dass insbesondere die O-Antigen-Struktur von verschiedenen *L. pneumophila*-Stämmen bezüglich Länge und Zusammensetzung der Zuckermolekül-Ketten sowie Lokalisation und Anzahl der O-Acetyl- und N-Methyl-Substituenten stark variiert [57, 148]. So ist z.B. für *L. pneumophila* Sg1-Stämme der Pontiac-Gruppe bekannt, dass O-Polysaccharidketten jeder Länge in Abhängigkeit einer *lag-1*-kodierten O-Acetyltransferase 8-O-Acetylgruppen tragen. Für *lag-1*-negative Stämme wie RC1, die mit dem *lag-1*-Gen komplementiert wurden, konnte hingegen eine *lag-1*-spezifische O-Acetylierung lediglich auf langkettigen O-Polysacchariden (> 30 Zuckermoleküle) festgestellt werden [148]. Zudem wurden interessanterweise bei allen untersuchten *L. pneumophila* Sg1-Stämmen, einschließlich der *lag-1*-negativen Subgruppen wie z.B. OLDA, eine konstante (*lag-1* unabhängige) O-Acetylierung der ersten drei Legionaminsäure-Reste proximal zum Kernpolysaccharid nachgewiesen werden, jedoch nur auf kurzkettigen O-Polysacchariden (< 10 Zuckermoleküle) [148]. Auch die von Kooistra und Lüneberg *et al.* erstmalig beschriebene N-Methylierung der 5-Acetimidoylamino-Gruppe eines einzelnen Legionaminsäure-Restes ist abhängig von der Zuckerkettenlänge des O-Antigens und wurde nur bei lang- (> 30 Zuckermoleküle) und mittelkettigen (ca. 15 Zuckermoleküle) Legionaminsäure-Resten festgestellt [57].

Diese spezifische N-Methylierung konnte beim Wildtyp RC1 nachgewiesen werden, während sie bei der Mutante 811 fehlt. Auch die N-methylierten Substituenten, von denen zwei Typen ((N,N-dimethylacetimidoyl)amino-Gruppe und die Acetimidoyl(N-methyl)amino-Gruppe) existieren, sind direkt proximal des Kern-Polysaccharides lokalisiert [57]. Eine mögliche Erklärung für das Vorhandensein von zwei Legionaminsäure-Synthetase-Genen bei *L. pneumophila* ist daher eine unterschiedliche Substratspezifität der beiden Enzyme in Abhängigkeit vom Vorhandensein oder der Kombination von Acetyl- und Methylgruppen. Voraussetzung für diese Hypothese ist das Vorhandensein der Substituenten vor der Synthese der Legionaminsäure aus N-Acetyl-Mannosamin und Phosphoenolpyruvat bzw. deren Derivaten. Darüber ist jedoch bisher bei *L. pneumophila* überhaupt nichts bekannt. Hier sind umfangreiche biochemische Arbeiten notwendig, um zunächst die grundlegenden Daten zu ermitteln. Darauf aufbauend kann dann mit isogenen LPS-Mutanten die hier aufgestellte Hypothese überprüft werden.

Mit Spot N konnte weiterhin in dieser Arbeit ein Protein identifiziert werden, das vom Wildtyp RC1 stärker exprimiert wird und Ähnlichkeit zur Dihydrolipoamid-Succinyl- bzw. -Acetyl-transferase (E2) mehrerer Bakterienspezies zeigte [144]. Interessanterweise gehört E2 zu der Familie der 2-Oxosäure-Dehydrogenasen, der auch Lipid A Biosynthese-Acetyltransferasen angehören. Inwiefern jedoch die vermehrte Synthese dieses Enzyms mit dem Lipid A-Strukturunterschied der Bakterienstämme korreliert, bleibt zunächst ungeklärt, zumal die Lipid A-Biosynthesewege bei *L. pneumophila* im einzelnen nicht bekannt sind.

Dass assoziiert mit der LPS-Phasenvariation von *L. pneumophila* Sg1 nicht nur die Genexpression von Membranproteinen und Proteinen der LPS-Biosynthese beeinflusst wird, sondern auch von Proteinen des Bakterienstoffwechsels, zeigen folgende Ergebnisse: Mit dem Spot G wurde ein Protein identifiziert, das auf 2D-Gelen des Wildtyps deutlich stärker vorhanden war und bis zu 68,8% Ähnlichkeit zur Glutaminsynthetase mehrerer Bakterienspezies (z.B. *Vibrio cholerae* [142]) zeigte. Auch die errechneten Molekulargewichte dieser Enzyme liegen mit ca. 52 kDa im Bereich des experimentell bestimmten MW. Die geringere Synthese-Rate des Proteins durch die avirulente Mutante, das die Bildung von Glutamin aus Glutamat und NH<sub>3</sub> katalysiert [143], könnte zur Beeinträchtigung der Vitalität führen, da es sich um eine essentielle

Aminosäure handelt. Bei *in vitro* Kulturen von Wildtyp und Mutante in Flüssigmedium wurden allerdings keine Unterschiede zwischen den Stämmen hinsichtlich der Wachstumsrate festgestellt [150]. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass durch das komplexe Medium mit Hefeextrakt genügend Glutamin zur Verfügung gestellt wird, so dass die Bedeutung der eigenen Synthese der Bakterien in den Hintergrund tritt. *In vivo* dagegen könnte die Glutaminsynthese der Bakterien ein entscheidender Vitalitätsfaktor sein. Interessant für weiterführende Untersuchungen ist natürlich die Frage, wie es zur Repression der Glutamin-Synthetase bei der Mutante kommt.

Ebenfalls am Bakterienstoffwechsel beteiligt ist das Protein von Spot **S2**, dessen Aminosäuresequenz 100% Homologie zur Alkylhydrogenperoxid-Reduktase von *L. pneumophila* [133] aufwies. Dieses Enzym, das ebenfalls deutlich stärker auf 2D-Gelen des virulenten Wildtyps nachzuweisen ist, wird der Ahp (Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase) – Tsa (Thiol-spezifischen-Antioxidantien) -Familie zugeordnet, die mehrere bakterielle Antioxidantien enthält [151]. Von einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-unempfindlichen Mutante von *B. subtilis* ist z.B. bekannt, dass neben Katalase vermehrt zwei Untereinheiten von Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase synthetisiert werden [152]. Für *L. pneumophila* werden Antioxidantien wie CuZn-Superoxid-Dismutase [153], Fe-Superoxid-Dismutase [154] oder Katalase als Virulenzfaktoren der postexponentiellen Wachstumsphase angesehen und u.a. im Zusammenhang mit der interzellulären Verbreitung auf weitere Makrophagen-Wirtszellen nach Lyse der vorherigen Wirtszelle diskutiert [155]. Eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber Oxidantien spielt sicher eine Rolle für die Virulenz des Wildtyps RC1.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass im Rahmen der Phasenvariation von *L. pneumophila* Sg1 Membranproteine, Proteine der LPS-Biosynthese und Stoffwechselproteine differentiell exprimiert werden. Neben den bekannten phänotypischen Unterschieden der Bakterienstämme (siehe 1.3.) sind diese Ergebnisse ein weiteres Indiz dafür, dass durch die Phasenvariation die Expression eines breiten Spektrums von Genen beeinflusst wird. Es kristallisiert sich dabei immer mehr heraus, dass nicht nur ein Faktor allein, sondern das Zusammenspiel vieler Einzelfaktoren zum Virulenzverlust der Mutante führt. Jedoch konnten z.B. keine für *L. pneumophila* diskutierten Virulenz-Effektorproteine, exportiert über Typ IV [41, 42] oder Typ II Transportsysteme [52], identifiziert werden, die der Mutante fehlen und beim Wildtyp

vorhanden sind. Auch liegen keine Hinweise auf die Tätigkeit eines Regulators vor, der die Expression mehrerer Gene synchron steuert, wie es z.B. von einem 230 kb Plasmid von *Shigella flexneri* bekannt ist, das sowohl Virulenzgene als auch Informationen für Regulatorproteine wie VirF enthält [64]. Vielmehr tragen offensichtlich die veränderte LPS- und Membran-Struktur, eine gestörte ATP- und Glutamin-Synthese sowie die verminderte Synthese von Antioxidantien in der Summe zum Virulenzverlust der Mutante bei. Dennoch bleibt zur vollständigen Aufklärung des Virulenzverhaltens der Bakterienstämme ein weites Feld offen. Die Identifikation der 14 differenten Protein-Spots (**D, H, I, Z, T, U, B, O, P, Q, R, V, X, AA**), die aufgrund der Blockade des Aminoterminus oder zu geringer Proteinmenge mit Hilfe N-terminaler Mikrosequenzierung nicht sequenziert werden konnten, sind hierbei von besonderer Bedeutung. Weitere Untersuchungen sind hier notwendig, die jedoch den Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätten. Da (noch) keine der PCR [156] entsprechende Methode zur Proteinamplifikation existiert, muss hier versucht werden, durch chromatographische Anreicherungen [157-159] sequenzierbare Proteinmengen zu erhalten. Durch proteolytische Spaltung von Spot-Proteinen und der anschließenden Sequenzierung dieser Sequenzausschnitte [160] kann dem Problem der N-terminalen Blockade [161] begegnet werden. Auch alternative Verfahren zur Identifikation von Proteinspots, wie z..B. massenspektrometrische Verfahren [88, 89] können ergänzende Informationen liefern. Neurer Färbetechniken mit Fluoreszenzfarbstoffen [162], welche mit weitaus unkomplizierteren Protokollen ähnliche Sensitivität wie die Silberfärbung bei guter quantitativer Aussagekraft bieten, können ergänzende Informationen liefern. Rückschlüsse auf die Funktion unbekannter Proteine können z.B. mit kristallographischen Methoden gezogen werden, jedoch sind solche Untersuchungen sehr aufwendig und nicht als Screening-Methode geeignet [163]. Derartige Methoden müssen Inhalt zukünftiger Untersuchungen sein, um sich der Identität aller 24 differenten Proteine zu nähern.

Anzustreben ist ebenfalls eine Bestätigung der Ergebnisse dieser Arbeit auf Transkriptions-Ebene. Die Korrelation zwischen mRNA- und Protein-Expression [164, 165] der 24 different synthetisierten Proteine ist hier ohnehin eine interessante Fragestellung, die in weiterführenden, molekulargenetisch ausgelegten Untersuchungen

behandelt werden muss. Auch bleibt es molekulargenetischen Arbeiten vorbehalten, die up- und down-Regulation bestimmter Gene feiner darzustellen.

In dieser Arbeit konnte die 2D-Gelelektrophorese-Technik erfolgreich für *L. pneumophila* Sg1 adaptiert und etabliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die vergleichende Proteomanalyse mittels dieser Technik eine suffiziente Methode ist, differentiell synthetisierte Proteine der phasenvariablen Bakterienstämme von *L. pneumophila* Sg1 zu identifizieren. Auf dem Weg zur definitiven Aufklärung der Ursache der unterschiedlichen Virulenz des Wildtyps RC1 und der Mutante 811 von *L. pneumophila* oder der Regulation der Phasenvariation, ist mit Erfassung 24 different exprimierter Proteine ein erster Schritt getan worden, um in weiterführenden Arbeiten mehr Licht in die Geheimnisse des Überlebenskampfes dieser Bakterienstämme zu bringen.

## 5. Zusammenfassung

Die Phasenvariation des Lipopolysaccharids bei *Legionella pneumophila* Sg1 geht einher mit dem Verlust der Virulenz und Serumresistenz. Weitere phänotypische Veränderungen wurden mit dem Fehlen von Pili und Flagellen, einer weniger negativ geladenen Zelloberfläche sowie einer veränderten Lipoid A-Struktur bei der Switch-Mutante 811 festgestellt. Die molekulargenetische Grundlage der Phasenvariation wurde mit der Exzision bzw. Insertion eines 30 kb Genelements mit 30 hypothetischen ORFs identifiziert, welches der Wildtyp in chromosomal integrierter Form trägt, während es bei der Mutante als high-copy Plasmid (p811) vorliegt.

Um zunächst die Gesamtheit der phänotypischen Veränderungen der Bakterienstämme zu erfassen, war eine vergleichende Proteom-Analyse der geeignete methodische Zugang. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der Proteom-Analyse mittels 2D-Gelelektrophorese für *Legionella pneumophila* Sg1 adaptiert und etabliert. Nach Etablierung der Methodik wurde eine vergleichende Proteom-Analyse der Stämme RC1 und 811 durchgeführt, um alle differentiell synthetisierten Proteine zu erfassen. Als Ergebnis der vergleichenden Proteom-Analyse konnten insgesamt 24 Proteine identifiziert werden, auf welche die Kriterien einer differentiellen Expression zutreffen. Darunter waren sowohl Proteine ( $n = 1$ ), die nur beim virulenten Wildtyp nachzuweisen waren, nicht jedoch bei der avirulenten Mutante, als auch solche ( $n = 6$ ) die nur bei der Mutante auftraten. Darüber hinaus fanden sich 14 Proteine, die beim Wildtyp deutlich stärker vorhanden waren als bei der Mutante sowie 3 Proteine, die bei der Mutante stärker ausgeprägt waren.

Mit ORF T und ORF S konnten zwei Proteine identifiziert werden, die ausschließlich auf 2D-Gelen der Mutante zu finden waren. Auch frühere Untersuchungen identifizierten ORF T nur in Membranpräparationen der Mutante. Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass Gene des Plasmids 811 nur während der episomalen Phase des Mutanten-Phänotyps exprimiert werden. Zudem bewiesen sie eindeutig die Suffizienz der in dieser Arbeit angewandten Methode. Neben ORF T wurde ein weiteres membranständiges Protein identifiziert, das auf 2D-Gelen der Mutante stärker vorhanden und ähnlich der ATP-Synthase war. Vermutungen bezüglich unterschiedlicher Membranproteinzusammensetzungen der Bakterienstämme konnten

so bestätigt werden. Interessanterweise zeigten zwei vom Wildtyp stärker synthetisierte Proteine Ähnlichkeiten zu solchen der LPS-Biosynthese: ORF 9 ähnelt der Sialinsäure-Synthetase und entspricht funktionell vermutlich einer Legionaminsäure-Synthetase. Die differentielle Synthese von ORF 9 könnte u.a. im Zusammenhang mit verschiedenen Legionaminsäurederivaten des Wildtyps und der Mutante stehen. Ein zweites auf 2D-Gelen des Wildtyps stärker dargestelltes Protein zeigte Ähnlichkeit zu Acetyltransferasen, die u.a. bei der Lipoid A Biosynthese vorkommen. Zudem konnten differentiell synthetisierte Proteine des Bakterienstoffwechsels identifiziert werden: das lösliche Protein Alkylhydrogenperoxid-Reduktase z.B. wird vom Wildtyp vermehrt synthetisiert und gehört zu einer Familie bakterieller Antioxidantien, eventuell ein Baustein der vermehrten Virulenz von RC1.

Die Aminosäuresequenz von 14 weiteren differenten Proteinen war mit den hier verwendeten Methoden nicht ermittelbar. In weiterführenden Untersuchungen, die jedoch den Rahmen dieser Arbeit sprengen, müssen alternative Methoden herangezogen werden, um auch diese Proteine identifizieren zu können. Anzustreben ist hierbei auch eine Bestätigung der Ergebnisse dieser Arbeit auf mRNA-Ebene mit molekulargenetischen Techniken.

## 6. Literaturverzeichnis

1. **Benson RF, Fields BS.** Classification of the genus *Legionella*. *Semin Respir Infect* 1998; 13:90-9.
2. **Fields BS.** The molecular ecology of *legionellae*. *Trends Microbiol* 1996; 4:286-90.
3. **Marrao G, Verissimo A, Bowker RG, da Costa MS.** Biofilms as major sources of *Legionella spp.* in hydrothermal areas and their dispersion into stream water. *FEMS Microbiol Ecol* 1993; 12:25-33.
4. **Schlossberg D, Bonoan J.** *Legionella* and immunosuppression. *Semin Respir Infect* 1998; 13:128-31.
5. **Shuman HA, Horwitz MA.** *Legionella pneumophila* invasion of mononuclear phagocytes. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 209:99-112.
6. **Muder RR, Yu VL, Woo AH.** Mode of transmission of *Legionella pneumophila*. A critical review. *Arch Intern Med* 1986; 146:1607-12.
7. **Glavin FL, Winn WC, Craighead JE.** Ultrastructure of lung in Legionnaires' disease. Observations of three biopsies done during the Vermont epidemic. *Ann Intern Med* 1979; 90:555-9.
8. **Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, et al.** Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med* 1977; 297:1189-97.
9. **Breiman RF, Fields BS, Sanden GN, Volmer L, Meier A, Spika JS.** Association of shower use with Legionnaires' disease. Possible role of amoebae. *Jama* 1990; 263:2924-6.
10. **Barbaree JM, Fields BS, Feeley JC, Gorman GW, Martin WT.** Isolation of protozoa from water associated with a legionellosis outbreak and demonstration of intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol* 1986; 51:422-4.
11. **Wijgergangs L.** Legionnaires' disease in the Netherlands: update. *Eurosurveill. Wkly.* 1999; 3:990401.
12. **Marston BJ, Lipman HB, Breiman RF.** Surveillance for Legionnaires' disease. Risk factors for morbidity and mortality. *Arch Intern Med* 1994; 154:2417-22.

13. **Payne NR, Horwitz MA.** Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors. *J Exp Med* 1987; 166:1377-89.
14. **Horwitz MA, Silverstein SC.** Interaction of the legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) with human phagocytes. II. Antibody promotes binding of *L. pneumophila* to monocytes but does not inhibit intracellular multiplication. *J Exp Med* 1981; 153:398-406.
15. **Rechnitzer C, Blom J.** Engulfment of the Philadelphia strain of *Legionella pneumophila* within pseudopod coils in human phagocytes. Comparison with other *Legionella* strains and species. *Apmis* 1989; 97:105-14.
16. **Horwitz MA.** Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. *Cell* 1984; 36:27-33.
17. **Horwitz MA, Maxfield FR.** *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *J Cell Biol* 1984; 99:1936-43.
18. **Horwitz MA.** The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J Exp Med* 1983; 158:2108-26.
19. **Horwitz MA.** Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *J Exp Med* 1983; 158:1319-31.
20. **Clemens DL, Horwitz MA.** Membrane sorting during phagocytosis: selective exclusion of major histocompatibility complex molecules but not complement receptor CR3 during conventional and coiling phagocytosis. *J Exp Med* 1992; 175:1317-26.
21. **Clemens DL, Horwitz MA.** Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J Exp Med* 1995; 181:257-70.
22. **Coers J, Monahan C, Roy CR.** Modulation of phagosome biogenesis by *Legionella pneumophila* creates an organelle permissive for intracellular growth. *Nat Cell Biol* 1999; 1:451-453.

23. **Desjardins M, Descoteaux A.** Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Exp Med* 1997; 185:2061-8.
24. **Roy CR, Berger KH, Isberg RR.** *Legionella pneumophila* DotA protein is required for early phagosome trafficking decisions that occur within minutes of bacterial uptake. *Mol Microbiol* 1998; 28:663-74.
25. **Wiater LA, Dunn K, Maxfield FR, Shuman HA.** Early events in phagosome establishment are required for intracellular survival of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 1998; 66:4450-60.
26. **Segal G, Purcell M, Shuman HA.** Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:1669-74.
27. **Vogel JP, Andrews HL, Wong SK, Isberg RR.** Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science* 1998; 279:873-6.
28. **Berger KH, Isberg RR.** Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* 1993; 7:7-19.
29. **Andrews HL, Vogel JP, Isberg RR.** Identification of linked *Legionella pneumophila* genes essential for intracellular growth and evasion of the endocytic pathway. *Infect Immun* 1998; 66:950-8.
30. **Brand BC, Sadosky AB, Shuman HA.** The *Legionella pneumophila* *icm* locus: a set of genes required for intracellular multiplication in human macrophages. *Mol Microbiol* 1994; 14:797-808.
31. **Purcell M, Shuman HA.** The *Legionella pneumophila* *icmGCDJBF* genes are required for killing of human macrophages. *Infect Immun* 1998; 66:2245-55.
32. **Horwitz MA.** Characterization of avirulent mutant *Legionella pneumophila* that survive but do not multiply within human monocytes. *J Exp Med* 1987; 166:1310-28.
33. **Berger KH, Merriam JJ, Isberg RR.** Altered intracellular targeting properties associated with mutations in the *Legionella pneumophila* *dotA* gene. *Mol Microbiol* 1994; 14:809-22.

34. **Segal G, Shuman HA.** Possible origin of the *Legionella pneumophila* virulence genes and their relation to *Coxiella burnetii*. *Mol Microbiol* 1999; 33:669-70.
35. **Scholz P, Haring V, Wittmann-Liebold B, Ashman K, Bagdasarian M, Scherzinger E.** Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host- range plasmid RSF1010. *Gene* 1989; 75:271-88.
36. **Winans SC, Burns DL, Christie PJ.** Adaptation of a conjugal transfer system for the export of pathogenic macromolecules. *Trends Microbiol* 1996; 4:64-8.
37. **Weiss AA, Johnson FD, Burns DL.** Molecular characterization of an operon required for pertussis toxin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:2970-4.
38. **Segal ED, Cha J, Lo J, Falkow S, Tompkins LS.** Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:14559-64.
39. **Stein M, Rappuoli R, Covacci A.** Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:1263-8.
40. **Kirby JE, Vogel JP, Andrews HL, Isberg RR.** Evidence for pore-forming ability by *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* 1998; 27:323-36.
41. **Kirby JE, Isberg RR.** Legionnaires' disease: the pore macrophage and the legion of terror within. *Trends Microbiol* 1998; 6:256-8.
42. **Segal G, Shuman HA.** How is the intracellular fate of the *Legionella pneumophila* phagosome determined? *Trends Microbiol* 1998; 6:253-5.
43. **Roy CR, Isberg RR.** Topology of *Legionella pneumophila* DotA: an inner membrane protein required for replication in macrophages. *Infect Immun* 1997; 65:571-8.
44. **Zuckman DM, Hung JB, Roy CR.** Pore-forming activity is not sufficient for *Legionella pneumophila* phagosome trafficking and intracellular growth. *Mol Microbiol* 1999; 32:990-1001.

45. **Husmann LK, Johnson W.** Cytotoxicity of extracellular *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 1994; 62:2111-4.
46. **Dreyfus LA, Iglewski BH.** Purification and characterization of an extracellular protease of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 1986; 51:736-43.
47. **Quinn FD, Tompkins LS.** Analysis of a cloned sequence of *Legionella pneumophila* encoding a 38 kD metalloprotease possessing haemolytic and cytotoxic activities. *Mol Microbiol* 1989; 3:797-805.
48. **Conlan JW, Baskerville A, Ashworth LA.** Separation of *Legionella pneumophila* proteases and purification of a protease which produces lesions like those of Legionnaires' disease in guinea pig lung. *J Gen Microbiol* 1986; 132:1565-74.
49. **Szeto L, Shuman HA.** The *Legionella pneumophila* major secretory protein, a protease, is not required for intracellular growth or cell killing. *Infect Immun* 1990; 58:2585-92.
50. **Moffat JF, Edelstein PH, Regula DP, Cirillo JD, Tompkins LS.** Effects of an isogenic Zn-metalloprotease-deficient mutant of *Legionella pneumophila* in a guinea-pig pneumonia model. *Mol Microbiol* 1994; 12:693-705.
51. **Liles MR, Viswanathan VK, Cianciotto NP.** Identification and temperature regulation of *Legionella pneumophila* genes involved in type IV pilus biogenesis and type II protein secretion. *Infect Immun* 1998; 66:1776-82.
52. **Liles MR, Edelstein PH, Cianciotto NP.** The prepilin peptidase is required for protein secretion by and the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* 1999; 31:959-70.
53. **Stone BJ, Abu Kwaik Y.** Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infect Immun* 1998; 66:1768-75.

54. **Lüneberg E, Zähringer U, Knirel YA, Steinmann D, Hartmann M, Steinmetz I, Rohde M, Köhl J, Frosch M.** Phase-variable expression of lipopolysaccharide contributes to the virulence of *legionella pneumophila*. J Exp Med 1998; 188:49-60.
55. **Kooistra O, Knirel YA, Lüneberg E, Frosch M, Zähringer U.** 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, Abu Kwaik Y, Bartlett C, Cianciotto NP, Fields BS, Frosch M, Hacker J, Lück PC, eds). American Society for Microbiology, Washington D.C. 2001; 68-73.
56. **Lüneberg E, Mayer B, Daryab N, Kooistra O, Zähringer U, Rohde M, Swanson J, Frosch M.** Chromosomal insertion and excision of a 30 kb instable genetic element is responsible for phase variation of lipopolysaccharide and other virulence determinants in *Legionella pneumophila*. Mol Microbiol 2000; 39:1-14.
57. **Kooistra O, Lüneberg E, Knirel YA, Frosch M, Zähringer U.** N-methylation in poly-legionaminic acid is associated with the phase-variable epitope of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. Eur J Biochem 2002; 269: 560-572.
58. **James AM.** Charge properties of microbial surfaces. In: Moses N, Handley PS, Buscher HJ, Rouxhet PG, eds. In *Microbial Cell Surfaces*: New York: VCR Publishers, 1991:221-262.
59. **Swanson J, Dorward D, Lubke L, Kao D.** Porin polypeptide contributes to surface charge of gonococci. J Bacteriol 1997; 179:3541-8.
60. **Zähringer U, Knirel YA, Lindner B, Helbig JH, Sonesson A, Marre R, Rietschel ET.** The lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1 (strain Philadelphia 1): chemical structure and biological significance. Prog Clin Biol Res 1995; 392:113-39.
61. **Knirel YA, Moll H, Zähringer U.** Structural study of a highly O-acetylated core of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. Carbohydr Res 1996; 293:223-34.

62. **Lüneberg E.** Phase variation of lipopolysaccharide and other virulence determinants in *Legionella pneumophila*. In *Legionella: Proceedings of the 5th International Conference* (Marre R, Abu Kwaik Y, Bartlett C, Cianciotto NP, Fields BS, Frosch M, Hacker J, Lück PC, eds). American Society for Microbiology, Washington D.C. 2001; 56-59.
63. **Dorman CJ, Porter ME.** The *Shigella* virulence gene regulatory cascade: a paradigm of bacterial gene control mechanisms. *Mol Microbiol* 1998; 29:677-84.
64. **Adler B, Sasakawa C, Tobe T, Makino S, Komatsu K, Yoshikawa M.** A dual transcriptional activation system for the 230 kb plasmid genes coding for virulence-associated antigens of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* 1989; 3:627-35.
65. **McKusick VA.** Genomics: structural and functional studies of genomes. *Genomics* 1997; 45:244-9.
66. **Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, et al.** Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 1995; 16:1090-4.
67. **Swinbanks D.** Government backs proteome proposal. *Nature* 1995; 378:653.
68. **Antonarakis SE.** 10 years of Genomics, chromosome 21, and Down syndrome. *Genomics* 1998; 51:1-16.
69. **Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, et al.** From proteins to proteomes: large scale protein identification by two- dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)* 1996; 14:61-5.
70. **Pandey A, Lewitter F.** Nucleotide sequence databases: a gold mine for biologists. *Trends Biochem Sci* 1999; 24:276-80.
71. **James P.** Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Q Rev Biophys* 1997; 30:279-331.
72. **Anderson NG, Anderson NL.** Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. *Electrophoresis* 1996; 17:443-53.
73. **O'Farrell PH.** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975; 250:4007-21.

74. **Klose J.** Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 1975; 26:231-43.
75. **Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, et al.** Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* 1982; 6:317-39.
76. **Klose J, Kobalz U.** Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* 1995; 16:1034-59.
77. **Gorg A, Postel W, Gunther S.** The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 1988; 9:531-46.
78. **Gorg A, Obermaier C, Boguth G, et al.** The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 2000; 21:1037-53.
79. **Corbett JM, Dunn MJ, Posch A, Gorg A.** Positional reproducibility of protein spots in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilised pH gradient isoelectric focusing in the first dimension: an interlaboratory comparison. *Electrophoresis* 1994; 15:1205-11.
80. **Blomberg A, Blomberg L, Norbeck J, et al.** Interlaboratory reproducibility of yeast protein patterns analyzed by immobilized pH gradient two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 1995; 16:1935-45.
81. **Urquhart BL, Atsalos TE, Roach D, et al.** 'Proteomic contigs' of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* (BCG) using novel immobilised pH gradients. *Electrophoresis* 1997; 18:1384-92.
82. **Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, et al.** The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 1997; 277:1453-74.
83. **Cordwell SJ, Basseal DJ, Humphery-Smith I.** Proteome analysis of *Spiroplasma melliferum* (A56) and protein characterisation across species boundaries. *Electrophoresis* 1997; 18:1335-46.
84. **Fountoulakis M, Takacs B, Langen H.** Two-dimensional map of basic proteins of *Haemophilus influenzae*. *Electrophoresis* 1998; 19:761-6.

85. **Roepstorff P.** Mass spectrometry in protein studies from genome to function. *Curr Opin Biotechnol* 1997; 8:6-13.
86. **Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov AV, et al.** Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:14440-5.
87. **Karas M, Hillenkamp F.** Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 1988; 60:2299-301.
88. **James P, Quadroni M, Carafoli E, Gonnet G.** Protein identification by mass profile fingerprinting. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 195:58-64.
89. **Henzel WJ, Billeci TM, Stults JT, Wong SC, Grimley C, Watanabe C.** Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:5011-5.
90. **Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM.** Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989; 246:64-71.
91. **Wilm M, Mann M.** Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal Chem* 1996; 68:1-8.
92. **Link AJ, Hays LG, Carmack EB, Yates JR.** Identifying the major proteome components of *Haemophilus influenzae* type-strain NCTC 8143. *Electrophoresis* 1997; 18:1314-34.
93. **Edman P, Begg G.** A protein sequenator. *Eur J Biochem* 1967; 1:80-91.
94. **Hewick RM, Hunkapiller MW, Hood LE, Dreyer WJ.** A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator. *J Biol Chem* 1981; 256:7990-7.
95. **Sazuka T, Yamaguchi M, Ohara O.** Cyano2Dbase updated: linkage of 234 protein spots to corresponding genes through N-terminal microsequencing. *Electrophoresis* 1999; 20:2160-71.
96. **Matsudaira P.** Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J Biol Chem* 1987; 262:10035-8.

97. **Bairoch A, Apweiler R.** The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Res* 2000; 28:45-8.
98. **Hoogland C, Sanchez JC, Tonella L, et al.** The 1999 SWISS-2DPAGE database update. *Nucleic Acids Res* 2000; 28:286-8.
99. **Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215:403-10.
100. **Altschul SF, Boguski MS, Gish W, Wootton JC.** Issues in searching molecular sequence databases. *Nat Genet* 1994; 6:119-29.
101. **Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, et al.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; 25:3389-402.
102. **Gras R, Muller M, Gasteiger E, et al.** Improving protein identification from peptide mass fingerprinting through a parameterized multi-level scoring algorithm and an optimized peak detection. *Electrophoresis* 1999; 20:3535-50.
103. **Roos DS.** Bioinformatics -- Trying to Swim in a Sea of Data. *Science* 2001; 291:1260.
104. **Blackstock WP, Weir MP.** Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol* 1999; 17:121-7.
105. **Lamond AI, Mann M.** Cell biology and the genome projects - a concerted strategy for characterizing multiprotein complexes by using mass spectrometry. *Trends Cell Biol.* 1997; 7:139-142.
106. **Jung E, Heller M, Sanchez JC, Hochstrasser DF.** Proteomics meets cell biology: the establishment of subcellular proteomes. *Electrophoresis* 2000; 21:3369-77.
107. **Fromont-Racine M, Rain JC, Legrain P.** Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two- hybrid screens. *Nat Genet* 1997; 16:277-82.
108. **Edgar PF, Douglas JE, Cooper GJ, Dean B, Kydd R, Faull RL.** Comparative proteome analysis of the hippocampus implicates chromosome 6q in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2000; 5:85-90.

109. **Dunn MJ.** Studying heart disease using the proteomic approach. *Drug Discov Today* 2000; 5:76-84.
110. **Ostergaard M, Rasmussen HH, Nielsen HV, et al.** Proteome profiling of bladder squamous cell carcinomas: identification of markers that define their degree of differentiation. *Cancer Res* 1997; 57:4111-7.
111. **Celis JE, Ostergaard M, Rasmussen HH, et al.** A comprehensive protein resource for the study of bladder cancer: <http://biobase.dk/cgi-bin/celis>. *Electrophoresis* 1999; 20:300-9.
112. **Bergman AC, Benjamin T, Alaiya A, et al.** Identification of gel-separated tumor marker proteins by mass spectrometry. *Electrophoresis* 2000; 21:679-86.
113. **Alaiya AA, Franzen B, Auer G, Linder S.** Cancer proteomics: from identification of novel markers to creation of artificial learning models for tumor classification. *Electrophoresis* 2000; 21:1210-7.
114. **Tolnay M, Probst A.** REVIEW: tau protein pathology in Alzheimer's disease and related disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1999; 25:171-87.
115. **Drews J.** Genomic sciences and the medicine of tomorrow. *Nat Biotechnol* 1996; 14:1516-8.
116. **Cash P.** Proteomics in medical microbiology. *Electrophoresis* 2000; 21:1187-201.
117. **VanBogelen RA, Greis KD, Blumenthal RM, Tani TH, Matthews RG.** Mapping regulatory networks in microbial cells. *Trends Microbiol* 1999; 7:320-8.
118. **Cash P, Argo E, Ford L, Lawrie L, McKenzie H.** A proteomic analysis of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Electrophoresis* 1999; 20:2259-68.
119. **Abu Kwaik Y, Eisenstein BI, Engleberg NC.** Phenotypic modulation by *Legionella pneumophila* upon infection of macrophages. *Infect Immun* 1993; 61:1320-9.
120. **Cash P, Argo E, Langford PR, Kroll JS.** Development of a *Haemophilus* two-dimensional protein database. *Electrophoresis* 1997; 18:1472-82.

121. **Jungblut PR, Schaible UE, Mollenkopf HJ, et al.** Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. *Mol Microbiol* 1999; 33:1103-17.
122. **Vesterberg O, Svensson H.** Isoelectric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH gradients. IV. Further studies on the resolving power in connection with separation of myoglobins. *Acta Chem Scand* 1966; 20:820-34.
123. **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-5.
124. **Heukeshoven J, Dernick R.** Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 1988; 9:28-32.
125. **Appel RD, Palagi PM, Walther D, et al.** Melanie II--a third-generation software package for analysis of two- dimensional electrophoresis images: I. Features and user interface. *Electrophoresis* 1997; 18:2724-34.
126. **<http://genome3.cpmc.columbia.edu/~legion/index.html>.**
127. **Arnold C, Clewley JP.** From ABI sequence data to LASERGENE's EDITSEQ. *Methods Mol Biol* 1997; 70:65-74.
128. **Plasterer TN.** MAPDRAW. Restriction mapping and analysis. *Methods Mol Biol* 1997; 70:241-56.
129. **Peterson JD, Umayam LA, Dickinson T, Hickey EK, White O.** The comprehensive microbial resource. *Nucleic Acids Res* 2001; 29:123-5.
130. **Fleischmann RD, Adams MD, White O, et al.** Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 1995; 269:496-512.
131. **Smillie LB, Furka A, Nagabhushan N, Stevenson KJ, Parkes CO.** Structure of chymotrypsinogen B compared with chymotrypsinogen A and trypsinogen. *Nature* 1968; 218:343-6.
132. **Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, et al.** Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2001; 357:1225-40.

133. **Rankin SaI, R.R.** sequence submitted to EMBL/Gene bank/DDJB databases, Entrez PubMed Accession: AAA74933, 1995.
134. **Sampson JS, O'Connor SP, Holloway BP, Plikaytis BB, Carlone GM, Mayer LW.** Nucleotide sequence of htpB, the *Legionella pneumophila* gene encoding the 58-kilodalton (kDa) common antigen, formerly designated the 60-kDa common antigen. *Infect Immun* 1990; 58:3154-7.
135. **Hoffman PS, Houston L, Butler CA.** *Legionella pneumophila* htpAB heat shock operon: nucleotide sequence and expression of the 60-kilodalton antigen in *L. pneumophila*-infected HeLa cells. *Infect Immun* 1990; 58:3380-7.
136. **Amemura-Maekawa J, Watanabe H.** Cloning and sequencing of the *dnaK* and *grpE* genes of *Legionella pneumophila*. *Gene* 1997; 197:165-8.
137. **Craig EA.** Essential roles of 70kDa heat inducible proteins. *Bioessays* 1989; 11:48-52.
138. **Georgopoulos C, Welch WJ.** Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu Rev Cell Biol* 1993; 9:601-34.
139. **Bjellqvist B, Hughes GJ, Pasquali C, et al.** The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* 1993; 14:1023-31.
140. **Futai M, Noumi T, Maeda M.** ATP synthase (H<sup>+</sup>-ATPase): results by combined biochemical and molecular biological approaches. *Annu Rev Biochem* 1989; 58:111-36.
141. **Suhan M, Chen SY, Thompson HA, Hoover TA, Hill A, Williams JC.** Cloning and characterization of an autonomous replication sequence from *Coxiella burnetii*. *J Bacteriol* 1994; 176:5233-43.
142. **Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, et al.** DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 2000; 406:477-83.
143. **Purich DL.** Advances in the enzymology of glutamine synthesis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1998; 72:9-42.
144. **Yeaman SJ.** The 2-oxo acid dehydrogenase complexes: recent advances. *Biochem J* 1989; 257:625-32.

145. **Lüneberg E, Zetzmann N, Alber D, Knirel YA, Zähringer U, Frosch M.** Cloning and functional characterization of a 30 kb gene locus required for lipopolysaccharide biosynthesis in *Legionella pneumophila*. *Int J Med Microbiol* 2000; 290:37-49.
146. **Edwards U, Muller A, Hammerschmidt S, Gerardy-Schahn R, Frosch M.** Molecular analysis of the biosynthesis pathway of the alpha-2,8 polysialic acid capsule by *Neisseria meningitidis* serogroup B. *Mol Microbiol* 1994; 14:141-9.
147. **Gundling F, Frosch M and Lüneberg E.** Mechanisms of serum resistance in *Legionella pneumophila*: comparison fo wild type and mutant after phase variation of bacterial surface structures. *Legionella – Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Symposium*. ASM Press 2002; 60-63.
148. **Kooistra O, Lüneberg E, Lindner B, Knirel YA, Frosch M, Zähringer U.** Complex O-acetylation in *Legionella pneumophila* serogroug 1 lipopolysaccharide. Evidence for two genes involved in 8-O-acetylation of legionaminic acid. *Biochemistry* 2001; 40:7630-40.
149. **Moll H, Knirel YA, Helbig JH, Zähringer U.** Identification of an alpha-D-Manp-(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* 1997; 304:91-5.
150. **Lüneberg E.** Persönliche Mitteilung.
151. **Chae HZ, Robison K, Poole LB, Church G, Storz G, Rhee SG.** Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:7017-21.
152. **Hartford OM, Dowds BC.** Isolation and characterization of a hydrogen peroxide resistant mutant of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 1994; 140:297-304.
153. **St John G, Steinman HM.** Periplasmic copper-zinc superoxide dismutase of *Legionella pneumophila*: role in stationary-phase survival. *J Bacteriol* 1996; 178:1578-84.

154. **Sadosky AB, Wilson JW, Steinman HM, Shuman HA.** The iron superoxide dismutase of *Legionella pneumophila* is essential for viability. *J Bacteriol* 1994; 176:3790-9.
155. **Bandyopadhyay P, Steinman HM.** *Legionella pneumophila* catalase-peroxidases: cloning of the katB gene and studies of KatB function. *J Bacteriol* 1998; 180:5369-74.
156. **Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239:487-91.
157. **Fountoulakis M, Langen H, Evers S, Gray C, Takacs B.** Two-dimensional map of *Haemophilus influenzae* following protein enrichment by heparin chromatography. *Electrophoresis* 1997; 18:1193-202.
158. **Fountoulakis M, Takacs MF, Takacs B.** Enrichment of low-copy-number gene products by hydrophobic interaction chromatography. *J Chromatogr A* 1999; 833:157-68.
159. **Fountoulakis M, Takacs MF, Berndt P, Langen H, Takacs B.** Enrichment of low abundance proteins of *Escherichia coli* by hydroxyapatite chromatography. *Electrophoresis* 1999; 20:2181-95.
160. **Aebersold RH, Leavitt J, Saavedra RA, Hood LE, Kent SB.** Internal amino acid sequence analysis of proteins separated by one- or two-dimensional gel electrophoresis after in situ protease digestion on nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84:6970-4.
161. **Bjellqvist B, Basse B, Olsen E, Celis JE.** Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. *Electrophoresis* 1994; 15:529-39.
162. **Steinberg TH, Jones LJ, Haugland RP, Singer VL.** SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains: one-step fluorescent staining of denaturing gels for detection of nanogram levels of protein. *Anal Biochem* 1996; 239:223-37.

163. **Eisenstein E, Gilliland GL, Herzberg O, et al.** Biological function made crystal clear - annotation of hypothetical proteins via structural genomics. *Curr Opin Biotechnol* 2000; 11:25-30.
164. **Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R.** Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 1999; 19:1720-30.
165. **Futcher B, Latter GI, Monardo P, McLaughlin CS, Garrels JI.** A sampling of the yeast proteome. *Mol Cell Biol* 1999; 19:7357-68.

## **Danksagung**

Danken möchte ich allen, die mich bei dieser Arbeit mit Geduld, Rat und Tat unterstützt und ermutigt haben, insbesondere

**Dr. Edeltraut Lüneberg**, meiner geduldigen Betreuerin, für die stets bereitwillige und wegweisende Unterstützung, die diese Arbeit ermöglicht hat,

dem **Laborteam**, für die freundliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre,

**Dr. Katharine Piechaczek**, für die Erlernung spezieller Labortechniken und vielen hilfreichen Tipps und Tricks,

**Dr. Viviane Hoppe** vom Theodor-Boveri-Institut Würzburg, für die stets zuverlässigen und professionellen Sequenzarbeiten (N-terminale Mikrosequenzierung)

und nicht zuletzt dem **Institut für molekulare Infektionsbiologie** und dem **Institut für Hygiene und Mikrobiologie** der Universität Würzburg mit Hilfe deren Einrichtungen diese Arbeit erstellt wurde.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Michael Engelbert Klug  
Adresse: Kolpingstrasse 19  
78239 Rielasingen-Worblingen  
Telefon: 07731-822621  
E-mail: [micha.klug@gmx.de](mailto:micha.klug@gmx.de)  
Geburtsdatum: 04. März 1976  
Geburtsort: Bad Brückenau  
Konfession: römisch-katholisch  
Familienstand: verheiratet, 1 Kind

### Schulbildung:

1982 – 1986 Grundschule Oberleichtersbach  
1986 – 1995 Franz-Miltenberger-Gymnasium Bad Brückenau  
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

### Bundeswehrdienst:

1995 – 1996 Panzergrenadierbataillon Mellrichstadt  
Dienstgrad bei Entlassung: Obergefreiter

### Studium:

seit Mai 1996 Studium der Humanmedizin  
an der Julius-Maximilian-Universität Würzburg  
Frühjahr 1998 Ärztliche Vorprüfung  
Frühjahr 1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
Herbst 2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
Herbst 2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

...

### Studienbegleitende Tätigkeiten:

Aug./Sept. 1996 Pflegepraktikum am Kreiskrankenhaus Bad Brückenau  
(Innere Medizin, Chirurgie)  
Oktober 1998 Famulatur an der Sanitätseinheit West Brixen/Südtirol  
(Chirurgie)  
April 1999 Famulatur am König-Ludwig-Haus Würzburg

August 1999 (Orthopädie)  
Famulatur an der Franz-von-Prümmer-Klinik  
Bad Brückenau  
Sept./Okt. 1999 (Innere Medizin, Rheumatologie)  
Famulatur in der Praxis Dr. Brosi, Würzburg  
(Pädiatrie, Allergologie)

**Praktisches Jahr:**

22.10.01 1. Terial im Fach Innere Medizin  
- 10.02.02 Missionsärztliche Klinik Würzburg  
11.02.02 2. Terial im Fach Chirurgie  
- 02.06.02 Spital Wetzikon, Schweiz  
03.06.02 3. Terial im Fach HNO  
- 22.09.02 Universitätsklinik Würzburg

**Promotion:**

seit März 2000 Am Institut für Hygiene und Mikrobiologie  
der Universität Würzburg zum Thema:  
  
„Phasenvariation bei *Legionella pneumophila*:  
Vergleichende Proteomanalyse von virulenten  
und avirulenten *Legionella pneumophila*-Stämmen  
unter Anwendung der 2D-Gelelektrophorese-  
Technik“

**Tätigkeit als Arzt im Praktikum:**

seit 01.01.2003 Hegau Klinikum Singen/Hohentwiel  
Abteilung Innere Medizin bei Prof. Dr. med. Krieger

**Sonstige Kenntnisse:**

Sprache Englisch: gute Kenntnisse in Schrift und Sprache  
EDV Word, Excel

Rielasingen-Worblingen, 31. März 2003