

IV. Ergebnisse

1. Genetische Studien zur Pathogenität und Ökologie von *L. pneumophila*

1.1. Genotypische Charakterisierung der *lly*-Region

In der späten stationären Phase des Bakterienwachstums von *L. pneumophila* findet eine intensive Pigmentierung des Kulturmediums statt. Um die physiologischen Zusammenhänge der Pigmentgenerierung näher zu untersuchen, wurde zunächst ein kleiner Bereich der *lly*-Region kloniert und sequenziert (Wintermeyer et al., 1994). Dieses 2,6 kb großes *EcoRI-SmaI*-Fragment des rekombinanten Plasmids pEWL 113 beinhaltet 3 offene Leseraster, die für verschiedene Proteine kodieren. Position und Größe der Open Reading Frames (ORF), sind bereits einleitend in Abbildung 1 (Genetische Struktur der *lly*-Determinante) dargestellt worden. Es konnte gezeigt werden, daß die Expression von Legiolysin in die Synthese des Pigments involviert ist (Wintermeyer et al., 1991).

1.1.1. Sequenzhomologien der *lly*-Region

Durch Sequenzvergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit den Proteindatenbanken EMBL, GenBank und SwissProt konnten weitgehende Übereinstimmungen aller Leseraster zu Enzymen des Katabolismus' aromatischer Aminosäuren nachgewiesen werden. Der Homologiegrad ist in Tabelle 6 dargestellt.

Der Größenvergleich der aufgelisteten Dehydrogenasen zu ORF 2 ließ für dieses Leseraster auf eine Erweiterung im 5'-Bereich schließen. Um diese Vermutung zu bestätigen, wie auch in Erwartung weiterer offener Leseraster mit Funktionalität in Bezug zur Legiolysin-Determinante wurde die Gesamtsequenz des 7,8 kb umfassenden *PstI*-Inserts des Plasmids pEWL 1 sequenziert und analysiert.

1.1.2. Vergleich der Aminosäure-Sequenzen verschiedener HPPD-like Proteine

Die Auflistung des Proteinvergleichs der abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen von 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-like Enzymen (HPPD) verschiedener Organismen wurde mittels Lasergene Software package ausgeführt. Den höchsten Homologiegrad mit dem *Lly*-Protein von *L. pneumophila* Phil. I JR 32 zeigten das *MelA*-Protein des aquatischen Bakteriums *Shewanella colwelliana*, das HPPD-like Enzym von *Pseudomonas sp.* und das Hämolyysin VIIY von *Vibrio vulnificus* (Wintermeyer et al., 1994; Fuqua et al., 1991; Rüetschi et al., 1992;

Chang et al., 1997). Wie aus Abbildung 2 ersichtlich, ist der Homologiegrad der aufgelisteten HPPD-like Proteine im N-Terminus relativ gering, im C-terminalen Bereich hingegen größer.

Tabelle 6. Homologie verschiedener Leseraster der *lly*-Region von *L. pneumophila* zu diversen Genprodukten

| | Homologie zu | Organismus | % Homologie | % Identität |
|--------------|--|--------------------------------------|----------------------|--------------------------|
| ORF 1 | 3-O-Acylltransferase | <i>Streptomyces mycarofaciens</i> | 63 | 44 |
| | Caffeoyl-CoA- 3-O-Methyltransferase | <i>Synechocystis sp.</i> | 64 | 49 |
| | | <i>Petroselinum crispum</i> | 57 | 38 |
| | | <i>Eucalyptus gunnii</i> | 57 | 38 |
| | | <i>Nicotiana tabacum</i> | 56 | 37 |
| ORF 2 | Phenylalanin-Dehydrogenase | <i>Bacillus sphaericus</i> | 57 | 41 |
| | | <i>Sporosarcina ureae</i> | 60 | 41 |
| | | <i>Thermoactinomyces intermedius</i> | 55 | 39 |
| | Leucin-Dehydrogenase | <i>Bacillus stearothermophilus</i> | 67 | 48 |
| | | <i>Bacillus cereus</i> | 66 | 47 |
| | | <i>Bacillus licheniformis</i> | 64 | 47 |
| | | <i>T. intermedius</i> | 64 | 47 |
| | | <i>Bacillus subtilis</i> | 63 | 47 |
| | | <i>Chlamydia trachomatis</i> | 56 | 41 |
| | | Lly | Vibrio Hämolysin Vly | <i>Vibrio vulnificus</i> |
| | 4-HPPD Dioxygenase | <i>Pseudomonas sp.</i> | 66 | 50 |
| | Mel A | <i>Shewanella colwelliana</i> | 64 | 44 |
| | 4-HPPD Dioxygenase | <i>Streptomyces avermitilis</i> | 54 | 38 |

1 MQNN--NPCGLDGFALFEFS-----GADR--N----- Lly-Lp
 1 MASEQ-NPLGLLGIEFTEFA-----TPDL--D----- MelA-Scol
 1 MVDAI-NPLGTDGFEFVEYT-----AADNTGIE----- Lly-Vibrio
 1 ADLYE-NPMGLMGFEFIELA-----SPTP--N----- HPPD-Pseud
 1 MTQTT-HHTPDRTARQADFPF-----VKGM--DAVVFVGNAKQAAH HPPD-Streptmyc
 1 VANWQ-KIQHQLSELQIETT-----PVIH--P----- HPPD-Synecestis
 1 MAPGALLVTSQNGRTSPLYSDGYVPAPAALVVGGEVNYRGY--HHAEWVGNAKQVAQ HPPD-Mycosh
 1 MAPAADSPTLQPAQPSDLNQ-----YRGY--DHVHWVGNAKQAAT HPPD-Coccid
 1 MT-----TFDKGAKPDIGT-----FVAF--DHVRFVGNAKQAA Y HPPD-Caenorh
 1 TT-----YNNKGPKEPERG-----FLHF--HSVTFWGNAKQAAS HPPD-Mouse
 1 -----YWDKGPKEPERG-----FLHF--HSVTFWGNAKQAAS HPPT-Rat
 1 TS-----YSDKGEKPERG-----FLHF--HSVTFWGNAKQAAS HPPT-Pig
 1 TT-----YSDKGAKPERG-----FLHF--HSVTFWGNAKQAAS HPPT-Human

 M.....G.....V...VGNAKQAA. Cons-funct

24 K-LHQQFSEMGFQAVAHKKNQDITLQGEIQ-----FIVNAA--SHCQAEHA-- Lly-Lp
 25 F-MHKVFIDFGFSKLLKHKQKDIVYKQNDIN-----FLLNNE--KQGFSAQFA-- MelA-Scol
 28 Q-LKHLFSSLGFAEVAKHRSEAWLYRQGDIN-----FVVNAQ--PHSQAEEFA-- Lly-Vibrio
 25 T-LEPIFEIMGFTKVATHRSKDVHLYRQGA IN-----LILNNE--PHSVASYFA-- HPPD-Pseud
 39 Y-STAFGMQLVAYS GPENGSRETASVVL TNGSARFVLT SVIKPATP--WGHFLADHV-- HPPD-Streptmyc
 25 L-TKAEGLTF-----LLWGDV--HHSIYPV---- HPPD-Synecestis
 58 FYITRMGFEPVAHKGLETGSRFFASHVQNNGVRFVFTSPVRSARQTLKAAPLADQARL HPPD-Mycosh
 40 YYVTRMGFERVAYRGLTGSKAVASHVVRNGNITFILTSPLRSVEQ--ASRFPED EALL HPPD-Coccid
 34 WYCANFGFEPFAYKGLTGSRITAQHAIRQDKIVFIFESALLPD-----NSELGNHL-- HPPD-Caenorh
 34 FYCNKMGFEPLAYRGLTGSREVVSHVIKRGKIVFVLSALNPW-----NKEMGDHL-- HPPD-Mouse
 32 FYCNKMGFEPLAYRGLTGSREVVSHVIKQKIVFVLSALNPW-----NKEMGDHL-- HPPT-Rat
 34 YYCSKIGFEPLAYRGLTGSREVVSHVVKQDKIVFVFSALNPW-----NKEMGDHL-- HPPT-Pig
 34 FYCSKMGFEPLAYRGLTGSREVVSHVIKQKIVFVLSALNPW-----NKEMGDHL-- HPPT-Human

 .Y....GFE..AY.GLETGSR...SHV.....F...S.L.....DHA-- Cons-funct

70 -----STHGPACAMGFVKDAKAAFQHAIAHG GIAFQ-D-----APHANHGLPAIQ Lly-Lp
 71 -----KTHGPAISSMGWRVEDANFAFEGAVARGAKP--AA-----DEVKDLPPAIY MelA-Scol
 74 -----KVHGPSVCGMAFRVQDAASALKHALTNGAE EYKTE-----IGPMEL SIPAVY Lly-Vibrio
 71 -----AEHGPSVCGMAFRVKDSQKAYKRALELGAQPIHIE-----TGP MELNLPAIK HPPD-Pseud
 93 -----AEHGDGVVDLAI EVPDARAAHAYAI EHGARS--VAEPYELKDEHGTVVLAAIA HPPD-Streptmyc
 47 ----- HPPD-Synecestis
 118 DEMYDHLDKHGDGVKDVAFEVDDVLA VYENAVANGAES--VSSPHTDSCDEGDVISA AAIK HPPD-Mycosh
 97 KEIHAHLERHGDGVKDVAFEVDCVESVFSAAVRNGAEV--VSDVRTVEDE DGQIKMATIR HPPD-Coccid
 86 -----VQHGDGVKDVCFEVEDLDSIIAHAKAAGATI--VHDITEESDADGSIRYATLR HPPD-Caenorh
 86 -----VKHGDGVKDI AFEVEDCDHIVQKARERGA KI--VREPWVEQDKFGKVKFAVLQ HPPD-Mouse
 84 -----VKHGDGVKDI AFEVEDCEHIVQKARERGA KI--VREPWVEEDKFGKVKFAVLQ HPPT-Rat
 86 -----VKHGDGVKDI AFEVEDCDYIVQKARERGA I I--VREEVCCAADVRGHHTPLDR HPPT-Pig
 86 -----VKHGDGVKDI AFEVEDCDYIVQKARERGA KI--MREPWVEQDKFGKVKFAVLQ HPPT-Human

 -----..HGDGVKD.AFEV.D.....A...GA.--V.....D..G....AAI. Cons-funct

| | | |
|-----|--|-----------------|
| 116 | AIGGSVIYFVDEEHQPFS-HEWNI-----TSPEPV-----V-----GNG----LT | Lly-Lp |
| 116 | GIGDSLIIYFIDTFGDDNN-IYTS-----FEALDEPII---T-----QEK----GF | MelA-Scol |
| 121 | GIGGSLLYFVDRYKQSI-YDVDF-----RFYDDA-----AQRLAKSDVG----LY | Lly-Vibrio |
| 118 | GIGGAPPLYLIDRFEGESSIYDIDF-----VFLEGV---DRHPV-----GAG----LK | HPPD-Pseud |
| 144 | TYGKTRHTLVDRGTGYDGP-YLPGY-----VAAAPI-----V-----EPPAHRFTFQ | HPPD-Streptmyc |
| 47 | -----RSEL-----NQNKTL-----H-----GVG----LT | HPPD-Synecestis |
| 176 | TYGDTTHTFIQRTTYTGP-FLPGYRSCTTVDSANKFL-----P-----PVN----LE | HPPD-Mycosh |
| 155 | TYGETTHTLIERSGYRGG-FMPGYRMESNADATSKFL-----P-----KVV----LE | HPPD-Coccid |
| 137 | TYGETDHTLLERKNYRGA-FLPGFKAHPMPATFFKTL-----P-----RVG----LN | HPPD-Caenorh |
| 137 | TYGDTTHTLVEKINYTGR-FLPGFEAPTYKDTLLPKL-----P-----RCN----LE | HPPD-Mouse |
| 135 | TYGDTTHTLVEKINYTGR-FLPGFEAPTYKDTLLPKL-----P-----SCN----LE | HPPT-Rat |
| 137 | ARQVWEGTLVEKMTFCLD-SRPQPSQTLHLRLLSKL-----P-----KCG----LE | HPPT-Pig |
| 137 | TYGDTTHTLVEKMNYIGQ-FLPGYEAPAFMDPLLPKL-----P-----KCS----LE | HPPT-Human |
| | TYG.T.HTLV...Y.G...PG.....L-----P-----G----L. | Cons-funct |
| 150 | AIDHLTHNVYRGNMDKWSFYASIFNFQEIRFFNIKGMTGLVS-RALGSPCGKIKIPLN | Lly-Lp |
| 153 | IEVDHLTNNVHKGTMEYWSNFYKIDIFGFTEVRYFDIKGSQTALI-SYALRSPDGSFCIPI | MelA-Scol |
| 162 | EIDHLTHTLKRNNMDTWAGSMSVLVISVKIRYFDIERKLTGLVS-RAMNAPCGKIRIPIN | Lly-Vibrio |
| 158 | IIDHLTHNVYRGRMAYWANFYEKLFNFREIRYFDIKGEYTGLTS-KAMTAPDGMIRIPLN | HPPD-Pseud |
| 183 | AIDHCVGNVELGRMNEWVGFYNKVMGFTNMKEFVGDIIATEYSALMSKVVDGTLKVKFP | HPPD-Streptmyc |
| 64 | TIDHVVLNIAADQFTQASQWYQOVFGWSVQQSFTVNTPHSGLYS-EALASANGKVQFNLN | HPPD-Synecestis |
| 218 | AIDHCVGNQDWDDEMSDACDFYERCLGFHRFWSVDDDKICTEFALKSIVMSSPNQVVKMP | HPPD-Mycosh |
| 197 | RIDHCVGNQDWDDEMERVCDYEEKILGFHRFWSVDDDKICTEFALKSIVMASPNDIVKMP | HPPD-Coccid |
| 179 | FLDHCVGNQPDQLQMSAVQWYEVKLVKFRFWSVDDSMIHTEYSALRSIVVTNFEETIKMP | HPPD-Caenorh |
| 179 | IIDHIVGNQPDQEMQSASEWYLKNLQFHRFWSVDDTQVHTEYSSLRSIVVTNYEESIKPM | HPPD-Mouse |
| 177 | IIDHIVGNQPDQEMESASEWYLKNLQFHRFWSVDDTQVHTEYSSLRSIVVANYEESIKPM | HPPT-Rat |
| 179 | IIDHIVGNQPDQEMESASQWYMRNLQFHRFWSVDDTQIHTEYSALRSVVMANYEESIKPM | HPPT-Pig |
| 179 | MIDHIVGNQPDQEMVSASEWYLKNLQFHRFWSVDDTQVHTEYSSLRSIVVANYEESIKPM | HPPT-Human |
| | .IDH.VGNQ...M..A...Y.K.L.FHRFWSVDD...TE.SSLRS.V.....IKMP | Cons-funct |
| 209 | E-SKDDLSQIE--EFLHEYHG--EGIQHIALNTNDIYKTVNGLRKQGVKFL-DVPDTYY- | Lly-Lp |
| 212 | NEGKGDDRNI--DEYLKEYD--GPGVQHLAFRSRDIRVASLDAMEGSSIQT-LDIIPEY- | MelA-Scol |
| 221 | E-SSDDKSQIE--EFIREYNG--EGIQHIALTTDDIYQTVQTLRDRGMDFM-PTPDTYY- | Lly-Vibrio |
| 217 | EESKAGQIE--EFLMQFNG--EGIQHVAFLSDDLIKTWDHLKSI GMR FMTAPPDTYY- | HPPD-Pseud |
| 243 | -INEPALAKKK--SQIDEYLEFYGGAGVQHIALNTGDIVETVRTMRAAGVQ-FLDTPDSY | HPPD-Streptmyc |
| 123 | -CPTNNSSIQ--TFLANNHG--AGIQHVAFSTTSITRTVAHLRERGVNFL-KIPTGYQ | HPPD-Synecestis |
| 278 | -INEPAHGKKK--SQIEEYVDFYNGPGVQHIALRTPNII EAVSNLRSRGVE-FISVPDTY | HPPD-Mycosh |
| 257 | -INEPAGKKK--SQIEEYVDFYNGAGVQHIALRTNII IDAITNLKARGTE-FIKVPETY | HPPD-Coccid |
| 239 | -INEPATSDKKAISIQIEYVDYGGSGVQHIALNTSDIITAI EALRARGCE-FLSIPSSY | HPPD-Caenorh |
| 239 | -INEPAPGRKK--SQIQEYVDYNGGAGVQHIALKTEDIIITAIRHLRERGETE-FLAAPSSY | HPPD-Mouse |
| 237 | -INEPAPGRKK--SQIQEYVDYNGGAGVQHIALRTEDIITIRHLRERGM E-FLAVPSSY | HPPT-Rat |
| 239 | -INEPAPGKKK--SQIQEYVDYNGGAGVQHIALKTEDIIITAIRSLRERGV E-FLAVPFTY | HPPT-Pig |
| 239 | -INEPAPGKKK--SQIQEYVDYNGGAGVQHIALKTEDIIITAIRHLRERGLE-FLSVPSTY | HPPT-Human |
| | -INEPA.G.KK--SQI.EYVD..GG.GVQHIAL.T..II.A...LR.RG.E-F...P..Y | Cons-funct |

| | | |
|-----|--|-----------------|
| 262 | -EMINDRLPWHK----EPLNQLHAEKILIDGEADPKD-GLLLQIFTENIFGP--VFFEII | Lly-Lp |
| 266 | -YDTIFEKLPQV----TEDRDRIKHHQILVDGD--E-DGYLLQIFTKNLFG--PIFIEI | MelA-Scol |
| 274 | -DKVDSRVEGHK----ENVSRLRDLRILIDGAP-LKD-GILLQIFTQTVIGP--VFFEII | Lly-Vibrio |
| 272 | -EMLEGRLPNHG----EPVGELQARGILLDGSSESGDKRLLQIFSETLMGP--VFFEFI | HPPD-Pseud |
| 299 | YDTLGEVWGDTR----VPVDTLRELKILADRDE---D-GYLLQIFTKPVQDRPTVFFEII | HPPD-Streptmyc |
| 177 | QQRNSSYFNYS----LDWDTLQCLEILLDDQDNTGE-RLLLQIFSQCYPYGVGTLFWEII | HPPD-Synecestis |
| 334 | YENMRLRLKAAGMKLEESFDIIQKLNILIDFDE---G-GYLLQLFTKPLMDRPTVFEII | HPPD-Mycosh |
| 313 | YEDMKIRLKRQGLVLDDEFETLKSLLIDFDE---N-GYLLQLFTKHLMDRPTVFEII | HPPD-Coccid |
| 297 | YDNLKERLAASSMVVKEEDMDRLQKLHILVDFDE---N-GYLLQIFSKPCQDRPTLFLEII | HPPD-Caenorh |
| 295 | YKLLRENLKSARKIQVKEESMDVLEELHILVDYDE---K-GYLLQIFTKPMQDRPTLFLEVI | HPPD-Mouse |
| 293 | YRLLRENLKTSKIQVKENMDVLEELKILVDYDE---K-GYLLQIFTKPMQDRPTLFLEVI | HPPT-Rat |
| 295 | YKQLQEKLKSARKIRVKESIDVLEELKILVDYDE---K-GYLLQIFTKPMQDRPTVFLEVI | HPPT-Pig |
| 295 | YKQLREKLKTAKIKVKENIDALEELKILVDYDE---K-GYLLQIFTKPVQDRPTLFLEVI | HPPT-Human |
| | Y..L..RL...K----E..D.L..L..IL.D.DE---.-GYLLQIFTKP..DRPTVF.EII | Cons-funct |
| 314 | QRKGNQ-GFGEGNFQALFEAIERDQVRGTL-----KELS. | Lly-Lp |
| 316 | IQRKNN-LGFGEGNFKAFFESI ERDQVRGV-----L. | MelA-Scol |
| 326 | QRKGNQ-GFGEGNFQALFEAIERDQVRGTL-----L. | Lly-Vibrio |
| 325 | QRKGDG-GFGEGNFQALFEAIERDQVRGTL-----ST-D | HPPD-Pseud |
| 351 | ERHGSM-GFGKGNFKALFEAIEREQEKRGNL | HPPD-Streptmyc |
| 232 | ERRHRAKGFGQGNFQALYEAVE | HPPD-Synecestis |
| 390 | QRNNFD-GFGAGNFKSLFEAIEREQDLRGNL | HPPD-Mycosh |
| 369 | QRNNFS-GFGAGNFRALFEAIEREQALRGTL-----I | HPPD-Coccid |
| 353 | QRQNHQ-GFGAGNFQALFEAIEREQTKRGNLFYDQVKGDNK | HPPD-Caenorh |
| 351 | QRHNNQ-GFGAGNFNSLFKAFEEEQALRGNLTDLEPNGVRSKM | HPPD-Mouse |
| 349 | QRHNNQ-GFGAGNFNSLFKAFEEEQALRG | HPPT-Rat |
| 351 | QRHNNQ-GFGAGNFNSLFKAFEEEQELRGNLTDTPNGVVPFR | HPPT-Pig |
| 351 | QRHNNQ-GFGAGNFNSLFKAFEEEQNLRGNLTNMETNGVVPGM | HPPT-Human |
| | QR.N..-GFGAGNF.ALFEAIE.EQ..RG.L.....----- | Cons-funct |

Abb.2) Aminosäuresequenz-Alignment verschiedener 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (HPPD)-like Proteine von Eubakterien: Lly-Lp, *Legionella pneumophila* JR 32 (Wintermeyer et al., 1994); MelA-Scol, *Shewanella colwelliana* (Fuqua et al., 1994); Lly-Vibrio, *Vibrio vulnificus* (Chang et al., 1997); HPPD-Pseud, *Pseudomonas* sp. (Rüetschi et al., 1992); HPPD-Streptomyces, *Streptomyces avermitilis* (Denoya et al., 1994), Cyanobakterien: HPPD-Synecestis, *Synechocystis* sp. (Nakamura et al., 1998); eukaryotische Pilze: HPPD-Mycosh, *Mycosphaerella graminicola* (GenBank Accession AF038152); HPPD-Coccid, *Coccidioides immitis* Wyckoff et al., 1995); Invertebraten: Hppd-Caenorh, *Caenorhabditis elegans* (GenBank Accession Z50016) und Vertebraten: HPPD-Mouse, (Endo et al., 1995); HPPD-Rat, Gershwin et al., 1987); HPPD-Pig, (Endo et al., 1992); und HPPD-Human, (Rüetschi et al., 1993).

Die Konsensussequenz basiert auf konservierten Aminosäure-Resten mit Austauschfunktion einer Mehrheit (>50 %) aller HPPD-Enzyme. Diese ist gegeben, wenn alle Aminosäuren innerhalb einer der folgenden Substitutionsgruppen fallen: D und E; H, K und R; A, F, I, L, M, P, V und W. Solche Aminosäuren, die der Konsensus-Sequenz entsprechen, sind rot gekennzeichnet.

1.2. Subklonierung der *lly*-Region

Eine Restriktionsanalyse des 5'-Bereichs des *Pst*-Fragments pEWL 1 sollte zeigen, welche Restriktionsschnittstellen für die Subklonierung dieses Abschnitts in Frage kommen würden. Dazu wurde zunächst der 5'-*Pst*I-*Eco*RI-Bereich (4.5 kb) in die entsprechenden Sites von pUC 19 inkloniert (vgl. dazu Abb.6). Die Klonierung wurde durch Kontrollspaltung mit den Enzymen *Eco*RI, *Bam*HI und *Pst*I überprüft (Abb.3; Spuren 1 - 3). Der erhaltene Klon wurde mit pMFL3 bezeichnet. Die Spaltung von pMFL3 mit Enzymen der Multi Cloning Site (MCS) des pUC-Vektorsystems lieferte keine weiteren Schnittstellen für *Eco*RI, *Kpn*I, *Sma*I, *Bam*HI und *Xba*I (Abb.3;Spuren 4, 6 -9). Die Restriktionsenzyme *Hind*III (Spur 11), *Sac*I (Spur 5) und *Sph*I (Spur 10) jedoch spalten je einmal. Aufgrund ihrer Positionierung im Bereich von pMFL3 eigneten sich diese Sites zu einer weiteren Subklonierung. Die Restriktionskarte von pMFL 3 veranschaulicht die Klonierungsstrategie und die Größe der Subklone (Abb. 4b). Die erhaltenen Subklone von pMFL 3 wurden mit pMFL 33, 34 und 35 bezeichnet.

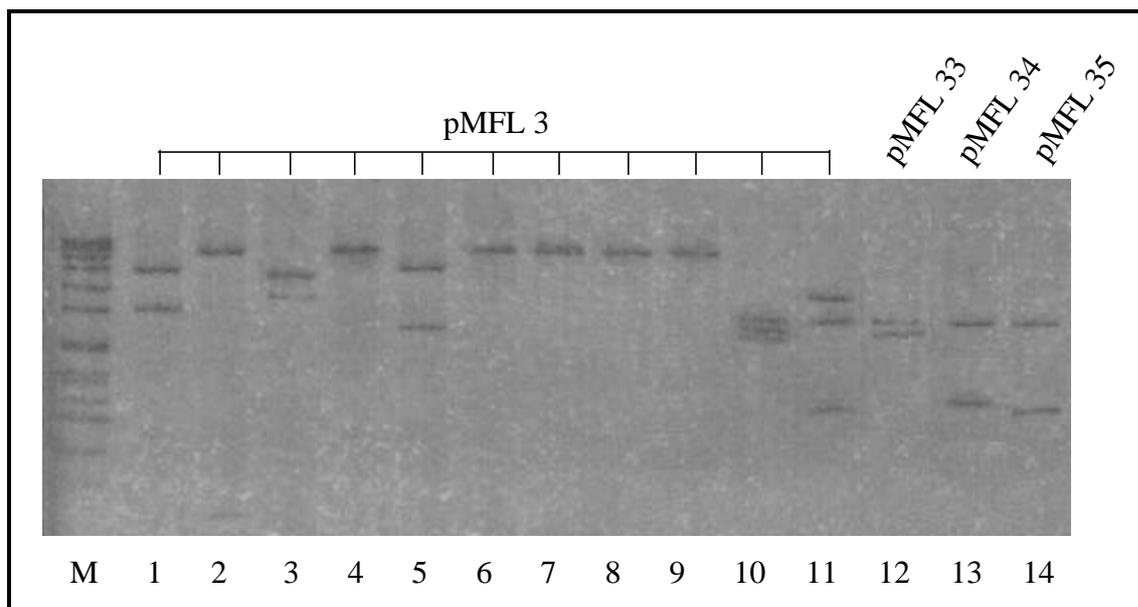


Abb. 3) Subklonierung des 5'-*Pst*I - *Eco*RI - Fragments von pEWL 1.

In Klammern sind die verwendeten Restriktionsenzyme und die Größe der Banden in kb angegeben.

Spur 1: pMFL 3 (*Pst*I, *Eco*RI; 2,7 +4,5); Spur 2. pMFL 3 (*Bam*HI, *Eco*RI; 6,95 + 0,25); Spur 3: pMFL 3 (*Pst*I, *Bam*HI; 4,25 + 2,95); Spur 4: pMFL 3 (*Eco*RI; 7,2); Spur 5: pMFL 3 (*Eco*RI, *Sac*I; 4,9 + 2,3); Spur 6: pMFL 3 (*Eco*RI, *Kpn*I; 7,2); Spur 7: pMFL 3 (*Eco*RI, *Sma*I; 7,2); Spur 8: pMFL 3 (*Eco*RI, *Bam*HI; 7,2); Spur 9: pMFL 3 (*Eco*RI, *Xba*I; 7,2); Spur 10: pMFL 3 (*Eco*RI, *Sph*I; 2,7 + 2,34 + 2,16); Spur 11: pMFL 3 (*Eco*RI, *Hind*III; 3,42 + 2,7 + 1,08); Spur 12: pMFL 33 (*Eco*RI, *Sac*I; 2,7 + 2,3); Spur 13: pMFL 34 (*Hind*III, *Sph*I; 2,7 + 1,26); Spur 14: pMFL 35 (*Pst*I, *Hind*III; 2,7 + 1,08); M = Marker *Spp*1

1.3. Sequenzierung und Analyse der *lly*-Region

Das 4,5 kb große *Pst*I - *Eco*RI - Fragment von pMFL 3, wie auch ein verbleibendes 0,74 kb großes *Sma*I - *Pst*I - Fragment downstream der *lly*-Determinante im 3'- Bereich von pEWL1 wurden wie beschrieben sequenziert. Neben den zum ^{T7}Sequencing™ Kit (Pharmacia) gehörenden Oligonukleotid-Uniprimer und -Reverseprimer des M13-Systems wurden weitere spezifische Oligonukleotide als Primer zur Sequenzierung eingesetzt (siehe Tabelle 1). Der gesamte Bereich wurde durch vollständige Sequenzierung des DNA-Doppelstranges in beiden Richtungen analysiert. Da es sich bei dem noch verbleibenden 2,7 kb *Eco*RI - *Sma*I - Fragment (*lly*-Region) um eine bekannte Sequenz handelt (Wintermeyer et al., 1994), wurde von einer Sequenzierung dieses Bereiches von Plasmid pEWL1 abgesehen. Die Gesamtsequenz von pEWL 1 ist in VII.2. (siehe Anhang) dargestellt. Die Analyse der kodierenden Bereiche lieferte Daten für vier weitere Leseraster (Abb. 4; ORF 3, 4, 5 und 6). Der Vergleich der abgeleiteten Proteinsequenzen zeigte die in Tabelle 7 zusammengefaßten Homologien auf. Zudem konnte das ORF2 der *lly*-Determinante wie erwartet im 5'-Bereich erweitert werden. Es ist um 350 Basen größer, als ursprünglich angenommen und kodiert somit für ein Protein mit 357 Aminosäuren. In Abbildung 4 ist die genetische Struktur von pEWL 1 schematisch dargestellt.

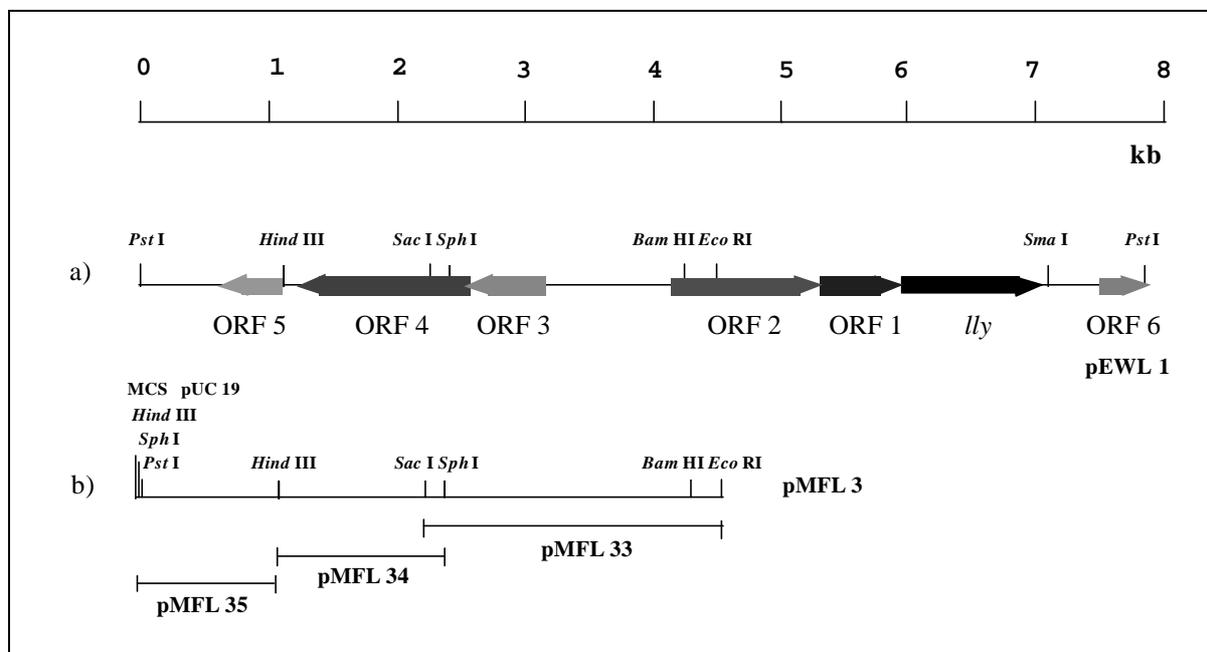


Abb. 4) a) Schematische Darstellung der genetischen Struktur von pEWL 1. Die kodierenden Sequenzbereiche sind in Leserichtung durch Pfeile gekennzeichnet. Wichtige Restriktionsschnittstellen sind eingefügt.
b) Subklonierung von pMFL 3. Das *Pst*I-*Eco*RI-Fragment ist Teil von pEWL 1.

Tabelle 7. Homologie verschiedener Leseraster von pEWL 1 zu diversen Genprodukten

| | Position in pEWL 1 | Homologie zu | Organismus | % Homologie | % Identität |
|--------------|--------------------------|--|---|-------------|-------------|
| ORF 3 | 3081 - 2424 (657 bp) | Glycerophosphoryldiester Phosphodiesterase UgpU | <i>E. coli</i> | 56 | 43 |
| | | Glycerophosphoryldiester Phosphodiesterase GlpQ | <i>B. subtilis</i> | 47 | 29 |
| | | hypothet. Protein, UgpU-homol. | <i>Staphylococcus aureus</i> | 59 | 37 |
| | | GlpQ2 | <i>M. tuberculosis</i> | 40 | 24 |
| ORF 4 | 2425 - 1114 (1311 bp) | Glycerin-3-phosphat Transportsystem; periplasmat. Bindungsprotein UgpB | <i>E. coli</i> | 51 | 35 |
| | | UgpB | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 38 | 22 |
| ORF 5 | 970 - 481 (489 bp) | Permease für aromatische Aminosäuren | <i>Corynebacterium glutamicum</i> | 45 | 25 |
| | | Bacitracin Transport Permease Protein BcrB | <i>Bacillus licheniformis</i> | 44 | 25 |
| | | Cytochrom <i>c</i> Oxidase CytN Untereinheit | <i>Azospirillum brasilense</i> | 44 | 20 |
| | | Cytochrom <i>c</i> Oxidase Polypeptid 1 | <i>Azorhizobium caulinodans</i> | 46 | 19 |
| ORF 6 | 7407 - 7842 (435 bp) | 2-Hydroxyhepta-2,4-dien-1,7-dioat Isomerase HpcE-1 | <i>Archaeoglobus fulgidus</i> | 47 | 24 |
| | | " | <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> | 42 | 23 |
| | | " | <i>Rhodobacter capsulatus</i> | 46 | 22 |
| | | Fumarylacetoacetat Hydrolase | <i>Emericella nidulans</i> | 46 | 31 |

1.4. Nachweis von *lly* auf Transkriptionsebene

Wie bereits einleitend dargestellt, konnten unmittelbar upstream von *lly* zwei weitere offene Leseraster identifiziert werden (vgl. Abb.1), deren Sequenzen vermutlich einen Bezug zu Legiolysin aufweisen (Wintermeyer et al., 1991). ORF 1 codiert für ein 654 bp großes Protein, liegt im gleichen Leseraster wie das *lly*-Gen und weist eine hypothetische Promotorstruktur auf. Das ORF 2 ist 1071 bp groß und besitzt ebenfalls eine Promotorstruktur. Vor dem *lly*-Gen konnte hingegen keine Polymerasebindungsstelle nachgewiesen werden. Diese Daten weisen auf ein polycistronisches Transkript hin, bei dem *lly* im Verbund mit einem oder mehreren upstream liegenden Genen transkribiert wird.

Der Nachweis einer Operonstruktur konnte mittels Northernanalyse erbracht werden (Abb. 5). Die ermittelte Größe der mRNA beläuft sich auf 1,8 kb (Spur 1). Sie stimmt damit rein rechnerisch mit dem Bereich von *lly* und ORF 1 überein und ist in Abbildung 5 als blauer Balken gekennzeichnet. Als Probe wurde ein 787 Basen großes internes Fragment aus *lly* eingesetzt. Positionierung und Größe sind als roter Balken markiert. In Spur 3 hybridisiert dieses Fragment mit sich selbst und dient als Marker. Als Negativkontrolle ist in Spur 2 die RNA von *E. coli* DH5 α aufgetragen.

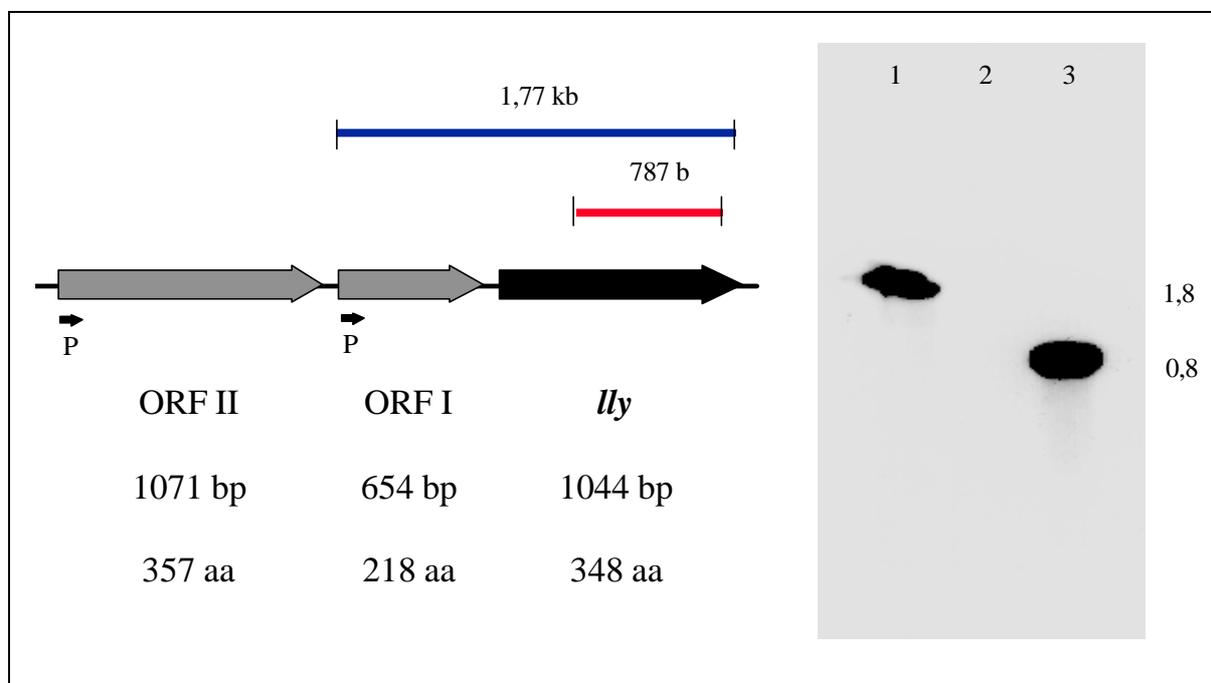


Abb. 5) Northernblot von *L. pneumophila* JR 32 und *E. coli* DH5 α - Zellextrakten.

Die eingesetzte *lly*-spezifische Probe ist rot markiert. Die Positionierung der in Spur 1 detektierten Bande ist in blau eingezeichnet.

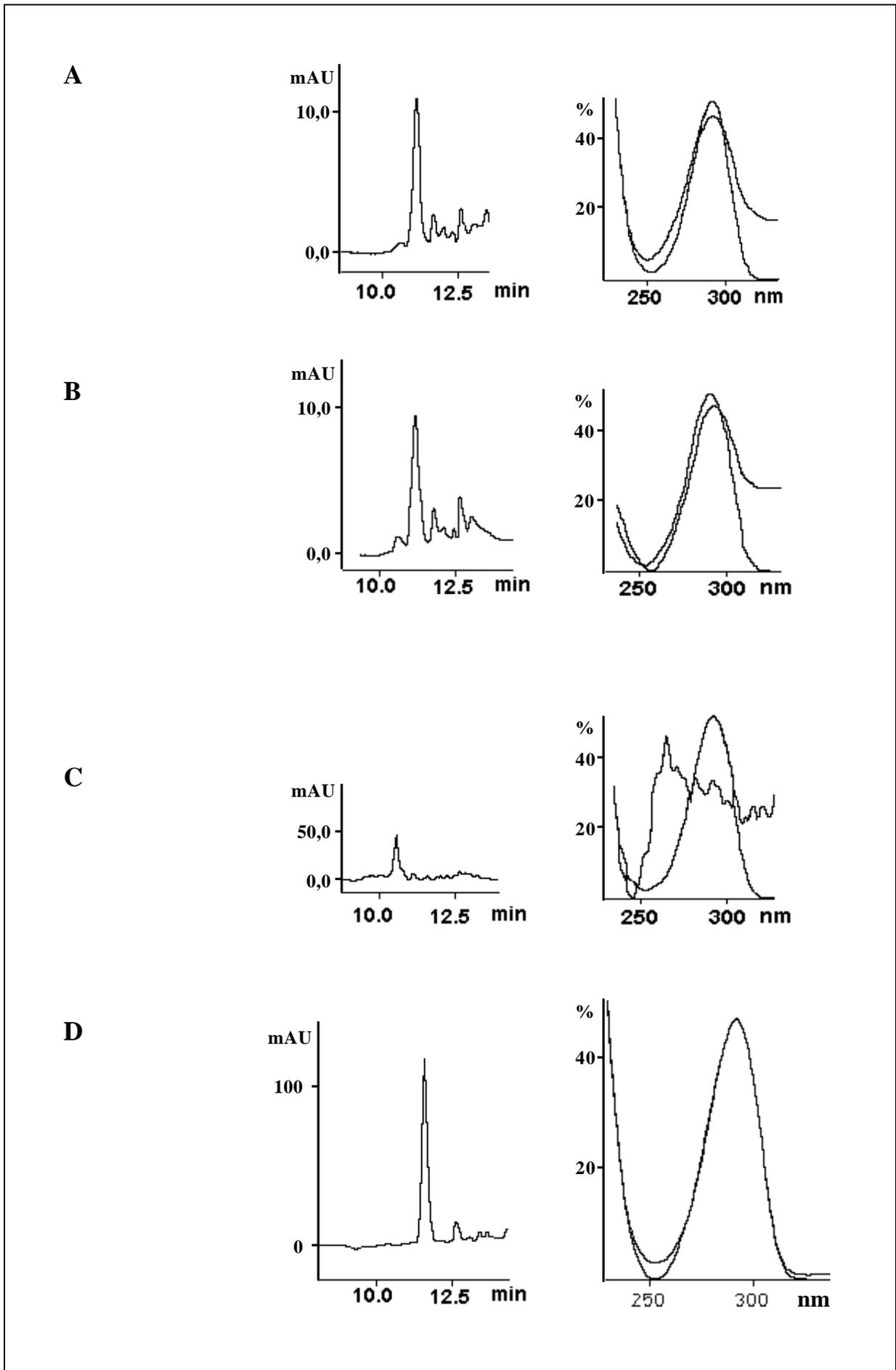
Spur 1: *L. pneumophila* JR 32 (*lly* +); Spur 2: *E. coli* DH5 α (*lly* -); Spur 3: internes 787 b *SphI* – *AsuII* - Fragment aus *lly*.

1.4. Nachweis von Homogentisat durch High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Der Nachweis, daß *lly* für eine *p*-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase kodiert, erfolgte indirekt durch qualitativen Nachweis von Homogentisat (HGA) als Endprodukt der durch dieses Enzym katalysierten Reaktion. Die Pigmentierung der Kulturüberstände von *L. pneumophila* JR 32 und *L. pneumophila* JR32-1 (pEWL 34-114), wie auch von *E. coli* DH5 α (pEWL 1) und *E. coli* DH5 α (pEWL 113) erfolgt in der späten stationären Phase des Bakterienwachstums und wird nach ca. 72 h sichtbar. Im Gegensatz dazu vermitteln *L. pneumophila* JR 32-1 und *E. coli* DH5 α (pUC 18) keine Pigmentierung ihres Kulturmediums und wurden daher als Negativkontrollen eingesetzt.

Der Nachweis von HGA erfolgte durch Proteinfractionierung mittels einer mit Photodiodendetektor (uv-vis Detektor UVD 340 S, Gynkotek, Germering) ausgestatteten HPLC. Die chromatographische Auswertung der Kulturüberstände wurde in Zusammenarbeit mit A. Supriyono aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. P. Proksch am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie (Würzburg) durchgeführt.

Wie der Vergleich der UV-Spektren mit einer Standard-Lösung von HGA (Abb.6,G) zeigte, konnten die nach 11,3 min eluierten Peaks der *lly*-positiven Stämme *L. pneumophila* JR 32 (Abb.6, D) und JR 32-1 (pEWB 34-114) (Abb.6, F), sowie *E. coli* DH5 α (pEWL 1) (Abb.6, A) und *E. coli* DH5 α (pEWL 113) (Abb.6, B) als von Homogentisat herrührend identifiziert werden. Im Gegensatz dazu konnte kein HGA bei *L. pneumophila* JR 32-1 (Abb.6, E) und *E. coli* DH5 α (pUC 18) (Abb.6, C) nachgewiesen werden. Diese Daten veranschaulichen somit die enge Korrelation zwischen der Existenz des *lly*-Gens und der Präsenz von HGA im Kulturüberstand. Aufgrund dieser in Übereinstimmung mit den Sequenzanalysedaten ermittelten Ergebnisse konnte nachgewiesen werden, daß *lly* für eine *p*-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase kodiert.



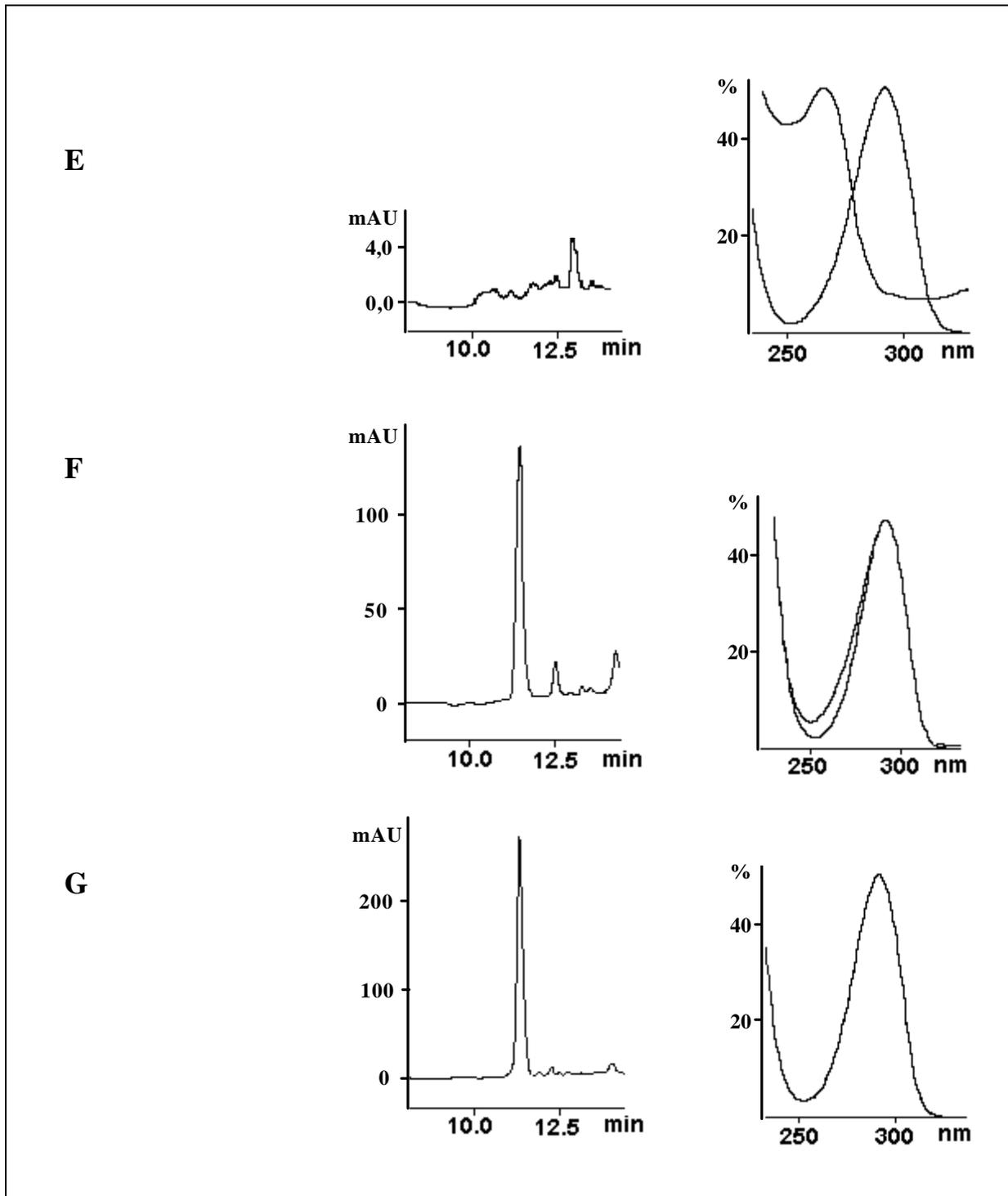


Abb. 6) Nachweis von Homogentisat als Produkt der Umsetzung durch Legiolysin. Die Kulturüberstände von (A) *E. coli* DH5 α (pEWL 1) (*lly*-positiv), (B) *E. coli* DH5 α (pEWL 113) (*lly*-positiv), (C) *E. coli* DH5 α (pUC 18) (*lly*-negativ), (D) *L. pneumophila* JR 32 (*lly*-positiv), (E) *L. pneumophila* JR 32-1 (*lly*-negativ), (F) *L. pneumophila* JR 32 (pEWB 34-114) (*lly*-positiv) und (G) einer Standardlösung von HGA wurden mittels HPLC auf Homogentisat getestet. Dargestellt sind die Chromatogramme in Kombination mit der Spektralanalyse der 11,3 min - Peaks jeder Probe.

1.5. Chromosomale Integration von *lly* in die λ att-site von *E. coli* WM 2269

1.5.1. Prinzip der Integration

Der chromosomalen Integration von *lly* liegt die Frage zugrunde, ob die gentechnische Veränderung des Organismus einen Einfluß auf dessen Persistenzvermögen ausübt. Diese Fragestellung ist im Zusammenhang mit der biologischen Sicherheitsforschung zu sehen. Ziel der Sicherheitsforschung ist es, möglichst frühzeitig biologische und ökologische Risikopotentiale gentechnisch veränderter Mikroorganismen (gVO) zu erkennen und ein hohes Maß an Sicherheit zu gewährleisten. Des Weiteren ist die Mutagenisierung im Zusammenhang mit der nachfolgenden Nutzung des generierten Stammes in Langzeitstudien (Persistenzstudien in Boden und Wasser) zu sehen. Zum einen können plasmidkodierte Eigenschaften nicht unbedingt über die nötige Stabilität verfügen und im Laufe der Versuche verloren gehen. Zum anderen können Plasmide über einen Multi-Copy-Effekt einen unerwünschten Einfluß auf die Genexpression des klonierten Faktors nehmen.

Im Rahmen der *E. coli* K-12 Sicherheitsforschung wurden daher chromosomale Integrationsmutationen der aus *L. pneumophila* stammenden Gene *lly* (und *mip*; siehe IV.1.6.) in *E. coli* K-12 Stämmen erstellt und nachfolgend in ökologisch ausgerichteten Langzeitstudien eingesetzt.

Die chromosomale Integration von *lly* liegt einem Integrationssystem zugrunde, daß in Anlehnung an den Integrationsmechanismus des Bacteriophagen λ entwickelt wurde (Diederich et al., 1992). Dieses System besteht aus einem Set von Klonierungsvektoren, die mit unterschiedlichen Resistenzmarkern (pLDR 9: Neomycin; pLDR 10: Chloramphenicol; pLDR 11: Tetracyclin) ausgestattet sind und die Attachment site *att P* des Bacteriophagen λ auf dem Plasmid tragen, sowie einem Helferplasmid pLDR 8, das für das λ -Integrasegen unter der Kontrolle des temperatursensitiven Repressors cI_{857} kodiert.

Das gewünschte Insert wird dabei in die Multi Cloning Site (MCS) eines der Klonierungsvektoren eingebracht und anschließend das *NotI* - Fragment mit dem Origin ausgeschnitten und der Vektor wieder religiert. Er ist damit nicht mehr replikationsfähig. Nun wird er durch Transformation in den Stamm mit dem Helferplasmid eingebracht. Durch einen Temperatur-shift auf 42°C wird die Expression des Integrase-Gens induziert. Diese Temperaturerhöhung führt allerdings auch gleichzeitig zum Verlust des Helferplasmids nach ein paar Zellgenerationen, da die Replikationsfähigkeit des Plasmids bei 42°C geblockt ist. Die Integration des gewünschten Inserts erfolgt nun wie beim Bacteriophagen λ als

ortsspezifische Rekombination unter katalytischer Mithilfe der Integrase in die λ att - site von *E. coli*. Das Rekombinationsschema für die chromosomale Integration in die λ att - site ist in Abbildung 7 dargestellt.

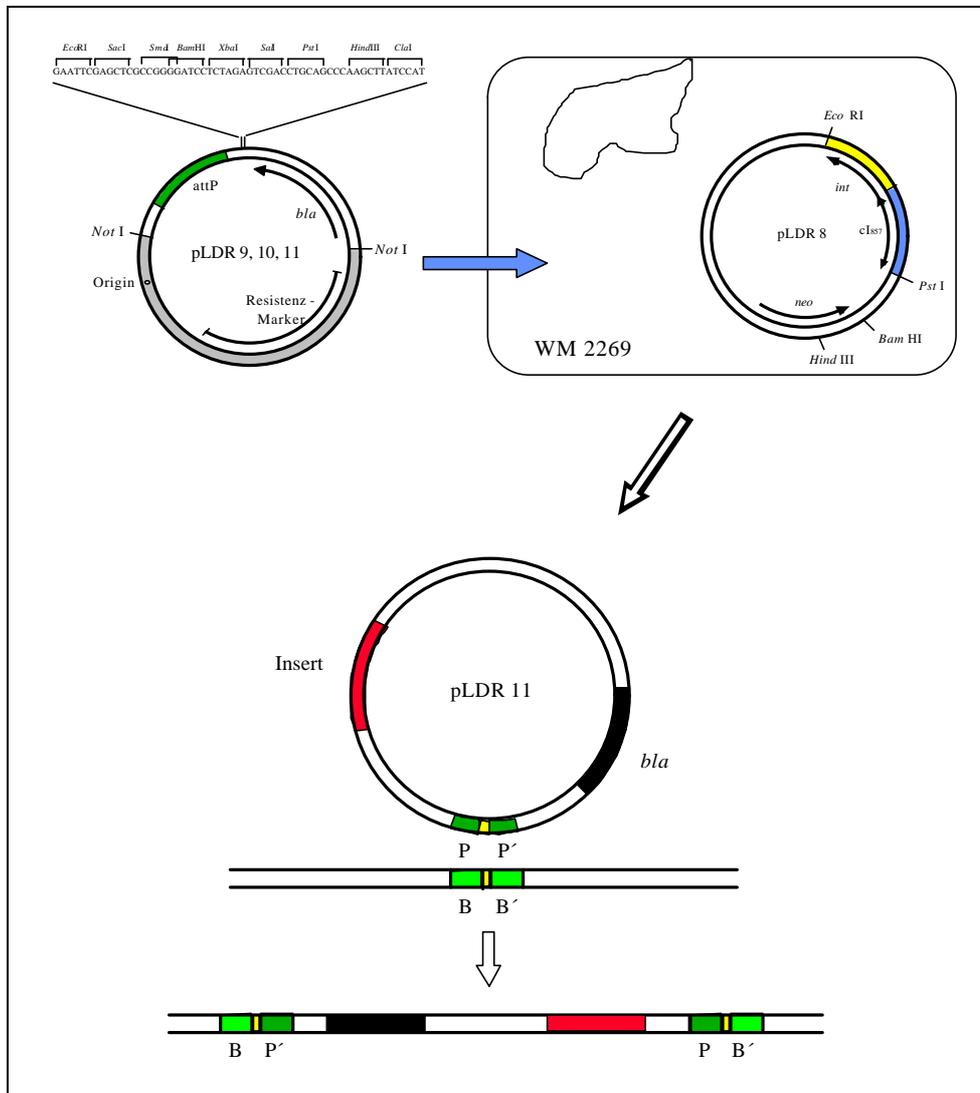


Abb. 7) Rekombinationsschema zur chromosomalen Integration in die λ Attachment Site von *E. coli* WM 2269. Die Anlagerungsstelle für λ in der *E. coli* - DNA, att B genannt, liegt spezifisch zwischen *galE* und *bioA*, Genen des Galactose- bzw. Biotinoperons. Die Basensequenz von att B wird durch B-O-B' symbolisiert (B steht für Bakterium). Die spezifische Anlagerungsstelle von λ ist in die Klonierungsvektoren pLDR 9 -11 integriert worden und wird mit att P bezeichnet. Die Basensequenz von att P wird durch P-O-P' symbolisiert (P steht für Phage). O (gelb markiert) bezeichnet die gemeinsamen Core-Sequenzen der Phagen- und Bakteriensegmente, die rekombinieren. Die Integrase, das vom *int*-Gen auf dem Helferplasmid pLDR 8 codierte Protein, erkennt die P-O-P' - Sequenz der Phagen-DNA und die B-O-B' - Sequenz der *E. coli* - DNA und katalysiert dann einen reziproken Transfer von DNA-Ketten: P wird mit B' verknüpft, B mit P'. Das vorher inklonierte Insert eines der Klonierungsvektoren pLDR 9 - 11 ist nun inklusive Ampicillin-Resistenz Teil des Bakterienchromosoms von *E. coli* WM 2269.

1.5.2. Mutagenese von *E. coli* WM 2269: chromosomale Integration von *lly*

Für die Integration von *lly* wurde ein 3,4 kb großes *EcoRI* - *PstI* - Fragment aus dem Plasmid pEWL 1 ausgewählt. Es beinhaltet die *lly*-Determinante mit dem Leseraster von ORF 1 und einem Teil des Leserasters von ORF 2. Die Größe dieses Fragments wurde so ausgewählt, daß *lly* unter eigenem Promoter abgelesen werden konnte. Das Klonierungsschema ist in Abbildung 8 aufgezeigt. Abbildung 9 zeigt die Klonierungsschritte im Gel anhand ihres Restriktionsmusters. Das 3,4 kb große *EcoRI* - *PstI* - Fragment mit der *lly*-Determinante (Spur 1) wurde in die MCS des 4,1 kb großen Klonierungsvektors pLDR 11 einkloniert (Spur 2), das 2,3 kb große *NotI* - Fragment mit dem Origin (Spur 3) ausgeschnitten und der jetzt mit pLDR 11-1 bezeichnete Vektor wieder religiert (Spur 4). Dieses Konstrukt wurde in den *E. coli*-Stamm WM 2269 transformiert und durch Temperaturshift auf 42°C die Integration induziert. Der rekombinierte Stamm wurde WM 2269-1 genannt.

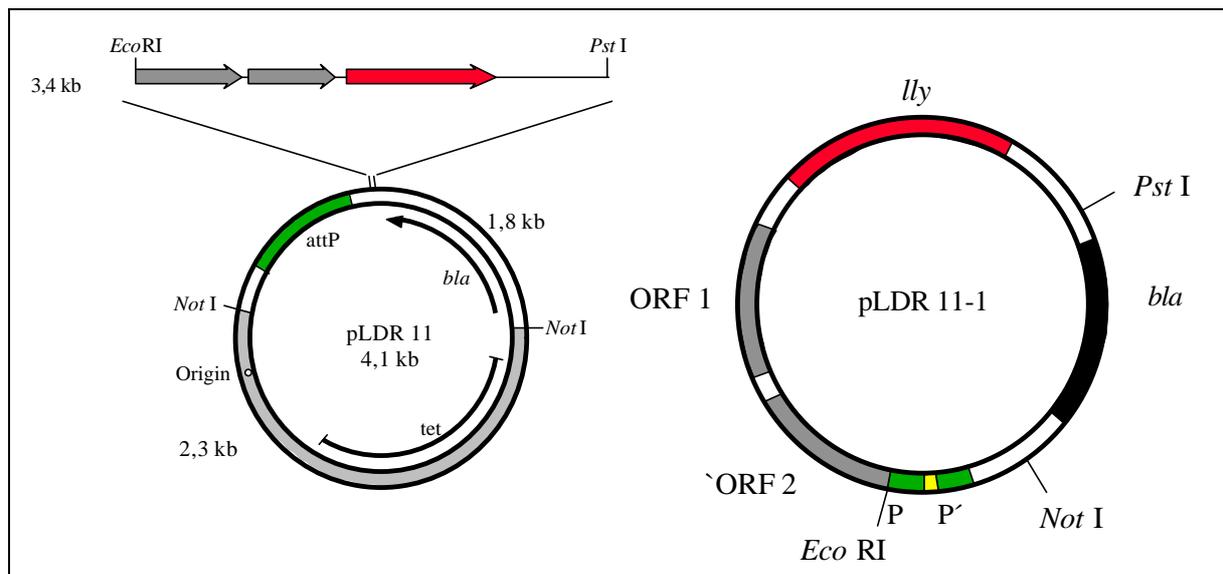


Abb. 8) Klonierungsschema für die Integration der *lly*-Determinante in den Vektor pLDR 11.

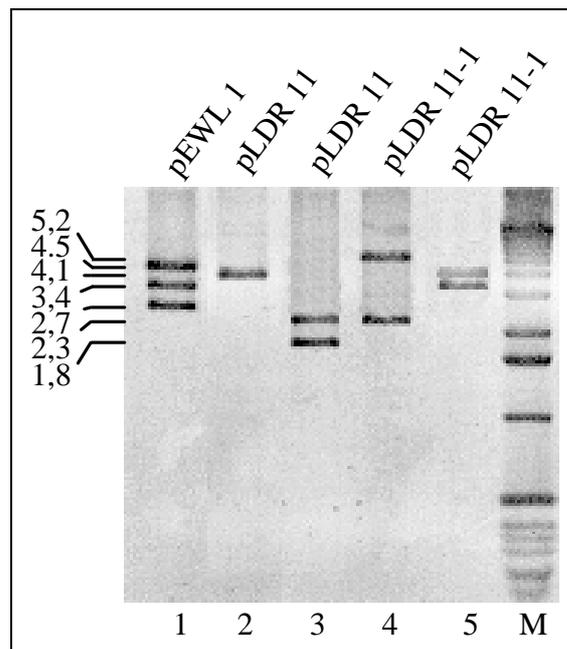


Abb. 9) Restriktionsmuster von pLDR 11 vor und nach Integration der *lly*-Determinante.
 Spur 1: pEWL 1 (*EcoRI*, *PstI*); Spur 2: pLDR 11 (*EcoRI*, *PstI*); Spur 3: pLDR 11 (*NotI*); Spur 4: pLDR 11-1 (*NotI*); Spur 5: pLDR 11-1 (*EcoRI*, *PstI*);
 M = Marker (1kb-Leiter)

1.5.3. Nachweis der chromosomalen Integration von *lly*

Im Southernblot konnte die ortsspezifische Rekombination belegt werden (Abb. 10). Als Probe wurde das radioaktiv markierte 3,4 kb große *EcoRI* - *PstI* - Fragment aus pEWL 1 mit der *lly*-Determinante eingesetzt. Die chromosomale DNA von WM 2269-1 wurde zum einen mit *PstI* verdaut (Spur 1), zum anderen mit *BamHI* und *HindIII* (Spur 2). Nach *PstI* - Verdau hybridisiert ein 8 kb großes Fragment, während nach *BamHI* - *HindIII* - Verdau eine 4,5 kb -Bande hybridisiert. (Wäre die Integration der *lly*-Determinante nicht vollzogen worden, so hätte in beiden Fällen das 5,2 kb große Plasmid hybridisiert.) Zudem wurde die mit *PstI* verdaute chromosomale DNA von WM 2269 als Negativkontrolle aufgetragen (Spur 3). Als Marker wurde die Plasmid-DNA von pEWL 1 eingesetzt, die *PstI* und *PstI* / *EcoRI* gespalten wurde. Durch den Auftrag eines Gemisches beider Spaltungen hybridisiert ein 8,1 kb -*PstI* -Fragment und ein 3,4 kb -*EcoRI* - *PstI* - Fragment mit der Probe.

Die Genkarte in Abbildung 11 veranschaulicht die genetische Organisation nach chromosomaler Integration der *lly*-Determinante im Stamm WM 2269-1. Die

Integrationsmutante WM 2269-1 exprimiert Legiolysin, wie die Pigmentierung des Kulturmediums nach 48 h aufzeigte.

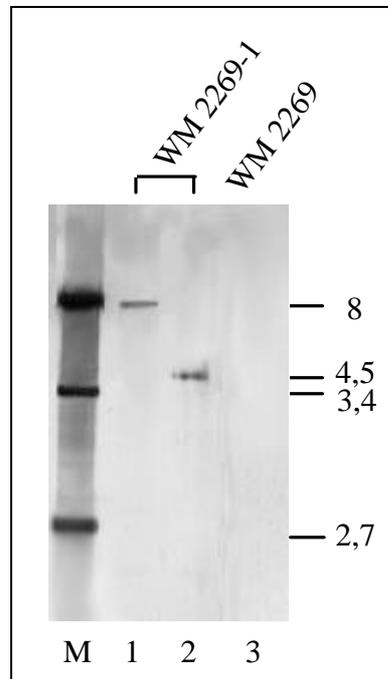


Abb. 10) Southernblot von WM 2269-1.
 Spur 1: WM 2269-1 (*Pst*I);
 Spur 2: WM 2269-1 (*Bam*HI,
*Hind*III); Spur 3: WM 2269
 (*Pst*I); M = Marker: pEWL 1
 (*Pst*I / *Pst*I, *Eco*RI).

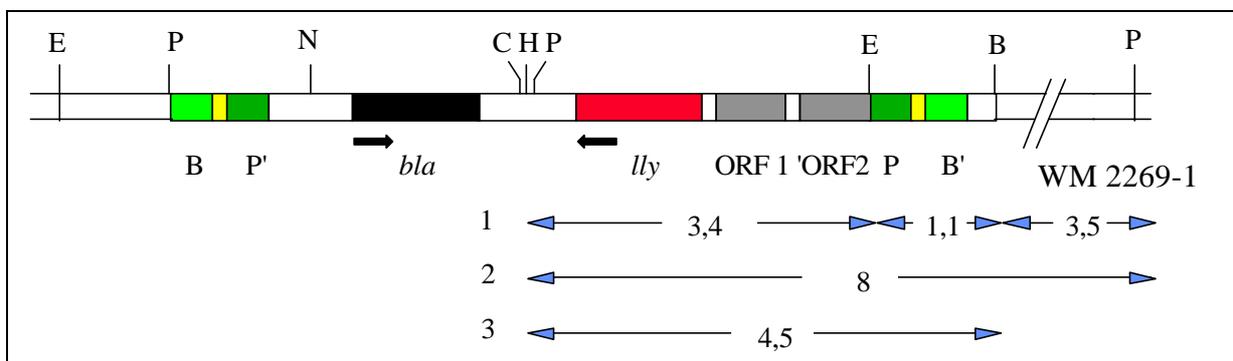


Abb. 11) Genkarte von WM 2269-1. Die Pfeile unterhalb der Skizze geben Größe und Position der mit der Probe im Southernblot hybridisierten DNA-Bereiche an. Die dicken Pfeile zeigen die Leserichtung von *lly* und *bla* an. Restriktionsschnittstellen sind wie folgt abgekürzt: B, *Bam*HI; C, *Cla*I; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; N, *Not*I; P, *Pst*I.

1.6. Chromosomale Integration von *mip* in das *E. coli* K-12 - Genom

durch homologe Rekombination

Der chromosomalen Integration von *mip* liegt in Analogie zur Zielsetzung einer Integration von *lly* (siehe IV.1.5.1). die gleiche Frage nach dem Persistenzvermögen gentechnisch veränderter Organismen zugrunde. Auch dieser Stamm sollte nachfolgend für ökologische Studien zur Persistenz in Boden und Wasserproben im Rahmen der biologischen Sicherheitsforschung dienen.

Die Integration von *mip* erfolgte in die *fim*-Region des *E. coli* K-12-Stammes AAEC 160 (Blomfield et al., 1991a; 1991b). Dieser Stamm zeichnet sich durch den Einsatz einer *sacB/Neo^r* - Kasette upstream des *fim*-Genclusters aus. *SacB* codiert für die Levansaccharase aus *Bacillus subtilis*. Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse von Saccharose, sowie deren Umsetzung zu verzweigtkettigen Polymeren aus Fructoseresten, die als Levane bezeichnet werden. In *E. coli* ist die Expression von *sacB* nach Zusatz von Sucrose zum Wachstumsmedium bei 37°C lethal, da die exzessive Levansynthese zum Verschuß der Zellporen führt, und damit der Zellstoffwechsel zum Erliegen kommt (Gay et al., 1985). Die genetische Organisation der *fim*-Region des Stammes AAEC 160 ist in Abb. 12 dargestellt.

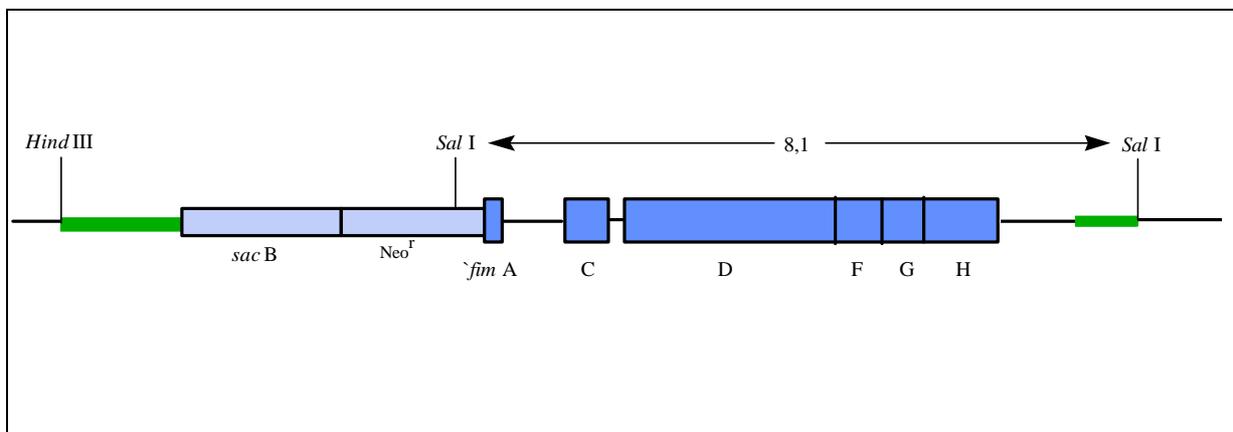


Abb. 12) Genetische Organisation des *fim* - Genclusters im Stamm AAEC 160

Durch die Einführung der *sacB/Neo^R* - Markerkassette wird eine neue *SalI* - Site in die Region eingeführt, was in einem 8,1 kb *SalI* - Fragment resultiert. Grün markiert sind die lateralen Bereiche des *fim*-Genclusters für die homologe Rekombination.

Als Vektor für die Integration von *mip* diente das Plasmid pPILVV₃, ein Derivat von pIB 310 (Vetter, V., Würzburg). Dieses Plasmid zeichnet sich im Gegensatz zu pIB 310 durch den zusätzlichen Besitz einer *Cla*I - Site aus, die die Klonierung von *mip*, flankiert von lateralen Sequenzen des *fim*-Genclusters, ermöglichte. Analog zu pIB 310 zeichnet sich auch pPILVV₃ durch Temperatursensitivität und Chloramphenicolresistenz aus.

Die Generierung von pPILVV₃ ist in Abb. 13 schematisch dargestellt.

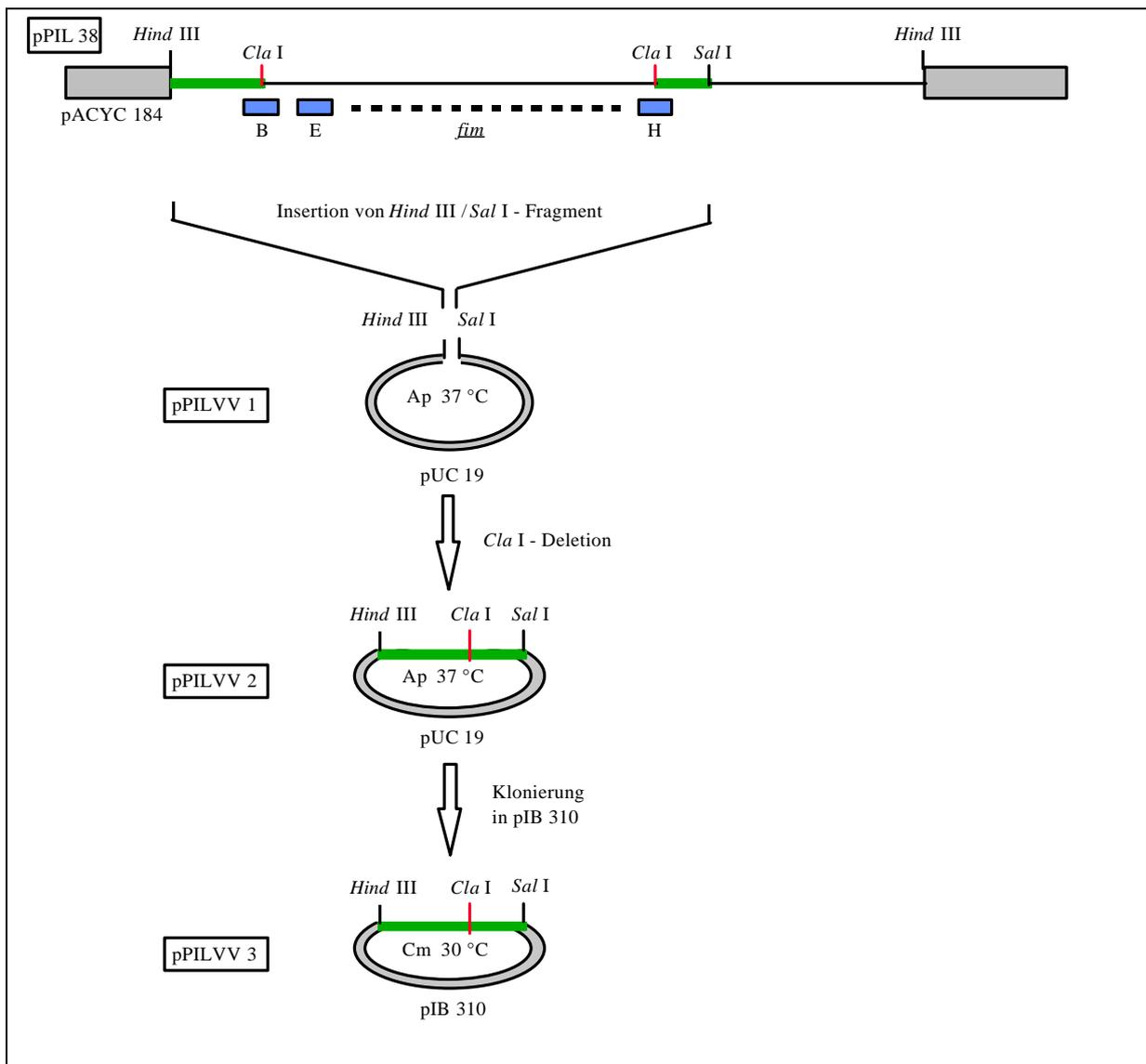


Abb. 13) Konstruktion von Plasmid pPILVV₃

Das *Hind*III - *Sal*I - Fragment mit dem kompletten Fimbrien-Gencluster wurde zunächst in die entsprechenden Sites von Vektor pUC 19 einligiert (pPILVV₁). Daraufhin wurde der Bereich zwischen den Genen *fimB* und *fimH* durch *Cla*I - Spaltung deletiert (pPILVV₂), und das verbleibende Fragment schließlich in den temperatursensitiven Vektor pIB 310 umklont (pPILVV₃). pPILVV₃ beinhaltet nur noch die lateralen Bereiche des *fim*-Genclusters (grün markiert).

1.6.1. Amplifizierung von *mip*

Die genetische Determinante von *mip* läßt eine direkte Klonierung in den Vektor pPILVV₃ nicht zu, da die entsprechenden *Cla*I - Sites für eine "sticky end" - Ligation fehlen.

Die Auswahl geeigneter Primer zur Amplifizierung sollte jedoch nicht nur zur Generierung von *Cla*I-Sites bei möglichst geringem Basenaustausch führen, sondern auch die Gesamtsequenz inklusive Promotor- und Terminationsstrukturen umfassen. Dies ist insbesondere dahingehend von Interesse, da *mip* über eine N-terminale Signalsequenz verfügt, die dem Protein nach Integration in *E. coli* weiterhin den Transport über die Cytoplasmamembran gewährleisten sollte.

Zur Amplifizierung des *mip*-Gens wurde 1 µl chromosomale DNA des Stammes *L. pneumophila* Philadelphia I in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt. Als Primer wurden folgende Sequenzen ausgewählt:

upstream: 5'-d[CCATTTAAAATCGATTATCAG]-3'

downstream: 5'-d[AAATGAAATCGATAAAACAGGCGC]-3'

Durch je einen Basenaustausch (rot gekennzeichnet) konnte je eine *Cla*I-Restriktionsschnittstelle generiert werden (schwarz unterstrichen).

Das PCR-Produkt war ein 1310 bp großes, von *Cla*I-Schnittstellen flankiertes DNA-Fragment, daß für das Mip-Protein aus *L. pneumophila* Philadelphia I kodiert.

1.6.2. Klonierung von *mip* in pPILVV₃

Durch Ligation des mittels Restriktionsendonuklease *Cla*I gespaltenen Vektors pPILVV₃ mit der ebenso verdauten PCR-generierten *mip*-Sequenz konnte eine "sticky end" - Klonierung vorgenommen werden (Abb. 14). Der erhaltene Klon wurde als pPILMF₁ bezeichnet. Nach Transformation der rekombinanten Plasmid-DNA in kompetente *E. coli* DH5α - Zellen wurden die Transformanten auf chloramphenicolhaltigen Selektionsplatten ausplattiert und bei 30°C inkubiert. Gewachsene Klone wurden auf neue Platten überpickt, um sie einer Restriktionsanalyse zu unterziehen.

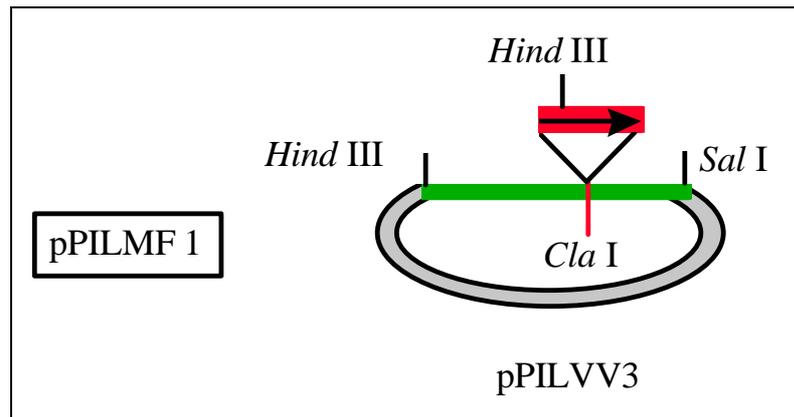


Abb. 14) Klonierung von pPILMF₁
 Das 1,3 kb *mip*-Fragment ist rot gekennzeichnet. Die Orientierung ist durch Pfeil markiert.

In Abb. 15 ist die Klonierung von pPILMF₁ durch Ermittlung des Restriktionsmusters belegt. Spur 1 des Gels zeigt die 1,3 kb große Bande des durch PCR amplifizierten *mip*-Fragments. In den Spuren 2 - 5 ist die in verschiedenen Kombinationen mit den Enzymen *Cla*I, *Hind*III und *Sal*I gespaltene Plasmid-DNA von pPILVV₃ aufgetragen, in den Spuren 6 - 8 gefolgt von der in gleicher Weise verdauten DNA des neu generierten Klons pPILMF₁.

Wird der Vektor mit *Cla*I bzw. *Hind*III verdaut, so resultiert daraus aufgrund der singulären Präsenz dieser Schnittstellen lediglich je eine 8 kb große Bande (Spur 2 + 3). Der Verdau mit *Cla*I und *Sal*I liefert 2 Banden (Spur 4), da aus dem Vektor der hintere, 1,4 kb große Bereich des für die homologe Rekombination benötigten Anteils des Fimbrien-Genclusters herausgespalten wird. Die Größe des als Rest verbliebenen Vektoranteils beläuft sich auf 6,6 kb. Der mit den gleichen Enzymen verdauter Klon pPILMF₁ führt dagegen zu 3 Banden, da das *mip*-Insert zu einer weiteren, 1,3 kb großen Bande führt (Spur 8).

Wird der Vektor mit *Hind*III und *Cla*I geschnitten, so separiert man den vorderen, 3 kb großen Teil des verbliebenen *fim*-Genclusters vom 5 kb großen Rest des Vektors (Spur 5). Im analog verdauten pPILMF₁ tauchen diese beiden Banden wieder auf. Durch die Existenz einer *Hind*III-Site im *mip*-Gen wird das Insert ebenfalls in zwei Fragmente von 0,3 und 1 kb gespalten (Spur 7). Die Orientierung des Inserts läßt sich schließlich anhand einer *Hind*III-Spaltung dokumentieren (Spur 6): da die *Hind*III-Site in *mip* näher zum N-terminalen Bereich liegt, belegt die Präsenz der 3,3 kb großen Bande (3kb vorderer Bereich des *fim*-Clusters zur homologen Rekombination + 0,3 kb N-terminaler Bereich von *mip*) eine Leserichtung, wie in Abb. 14 durch Pfeil markiert.

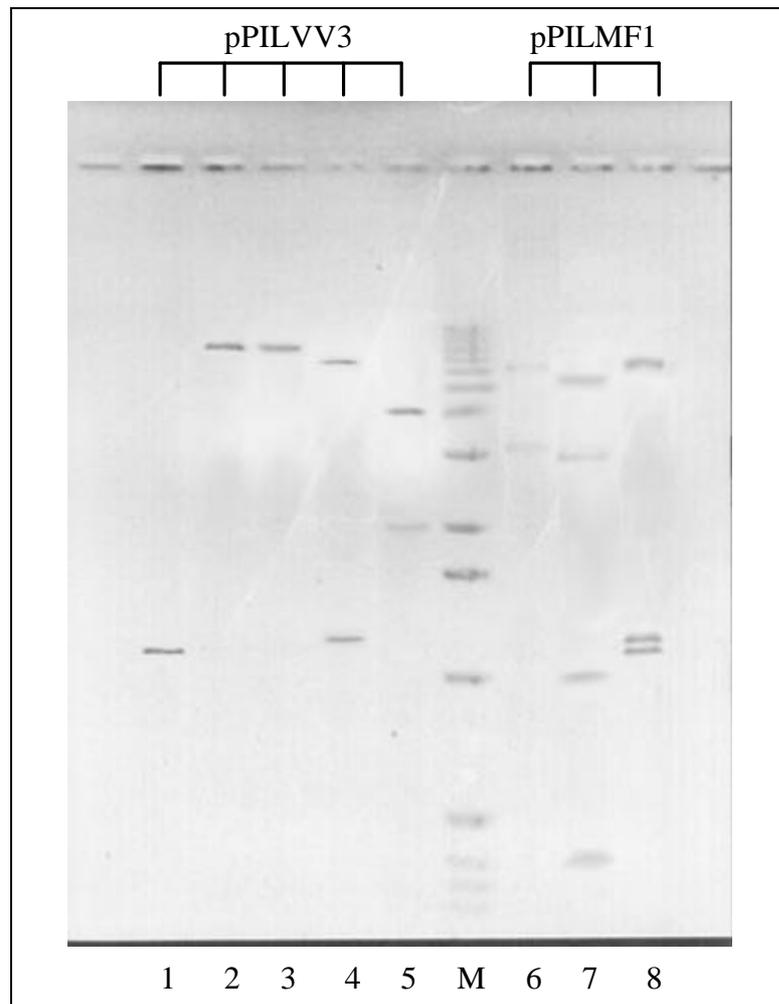


Abb. 15) Restriktionsmuster von pPILVV₃ und pPILMF₁
Spur 1: PCR-generiertes *mip*-Fragment; Spur 2: pPILVV3 (*Cla*I)
Spur 3: pPILVV3 (*Hind*III); Spur 4: pPILVV3 (*Cla*I, *Sal*I);
Spur 5: pPILVV3 (*Cla*I, *Hind*III); Spur 6: pPILMF1 (*Hind*III)
Spur 7: pPILMF1 (*Cla*I, *Hind*III); Spur 8: pPILMF1 (*Cla*I, *Sal*I);
M = Marker (1 kb-Leiter).

1.6.3. Sequenzierung von *mip*

Um sicherzustellen, daß die Taq-Polymerase während der Amplifizierung von *mip* keine fehlerhaften Kopien erzeugt hat, wurde das in pPILVV₃ einklonierte PCR-Produkt nach der Sanger-Methode, wie unter III. 9.19. beschrieben, durchsequenziert. Neben den als Primer für die PCR eingesetzten Oligonukleotiden wurden weitere spezifische Oligonukleotide eingesetzt. Die Amplifizierung hat zu keinerlei Basenaustausch geführt. Somit konnte pPILMF₁ für die chromosomale Integration von *mip* eingesetzt werden.

1.6.4. Westernblotanalyse von Mip

Die erfolgreiche Klonierung von *mip* konnte durch den Nachweis der Expression des Gens mittels Westernblotanalyse wie unter Punkt III.8.14 beschrieben, erbracht werden (Abb. 16). Als Positivkontrolle diente das Gesamtzellsat von pBLL 100, als Negativkontrolle jenes von pPILVV₃.

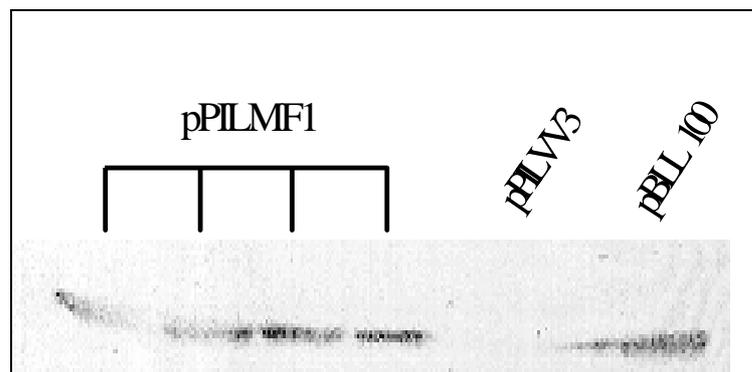


Abb. 16) Westernblot von pPILMF₁

1.6.5. Mutagenese von *E. coli* AAEC 160: chromosomale Integration von *mip*

Als Ausgangsstamm für die homologe Rekombination diente der weiter oben bereits beschriebene, von Blomfield et al. (1991) konstruierte *E. coli* K-12 - Stamm AAEC 160. Dieser Stamm zeichnet sich durch für die Rekombination notwendigen homologen Sequenzen im lateralen Bereich des Fimbrien-Genclusters aus. Ferner wurde eine Markerkassette in diesen Bereich einkloniert, um Integrationsmutationen gezielt screenen zu können. Der eingangs vorgestellte Vektor pPILVV₃ besitzt die gleichen genetischen Bereiche aus dem Umfeld des *fim*-Genclusters. Das Prinzip der Integration folgt der von Blomfield et al. (1991) entwickelten

Methode, die in Abb. 17 schematisiert dargestellt ist. Vorteil dieses Protokolls zum Allelaustausch ist die nach jedem Schritt mögliche Selektionskontrolle.

Nach Transformation des Stammes AAEC 160 mit pPILMF₁ macht man sich die Temperatursensitivität des Vektors zur Selektion auf Plasmid-Integrate zunutze. Die Transformanden wurden zwecks Plasmid-Integration zunächst in Übernachtskultur bei 30°C und Chloramphenicolzusatz inkubiert. Die Kontrolle dieses Schritts des Allelaustauschs erfolgte durch Ausplattieren auf Cm- und Km-Platten. Auf Sucroseplatten (6%) erfolgte hingegen kein Wachstum. Die Integration kann entweder durch Rekombination homologer Genbereiche upstream der *sacB*/Neo^R-Kassette erfolgen (Bild 1a), oder downstream des Markers wie in dem mit b) bezeichneten Weg dargestellt. Ein Wachstum bei 42°C ohne Selektionsdruck führt schließlich zur Plasmid-Exzision (Bild 2) und anschließendem Curing (Bild 3), was entweder zum erfolgreichen Allelaustausch, oder zur Wiederherstellung der Ausgangssituation führt (Bild 4). Die Temperatur von 42°C ist nicht-permissiv für Plasmid-Replikationen. Die Anreicherung von Rekombinanden erfolgte durch Temperaturshift auf 30°C ohne Selektionsdruck, Plasmide gehen durch Ausdünnen verloren. Eine Selektion war nun über Sucroseplatten möglich, da bei erfolgreicher Integration das Fehlen von *sacB* nicht zum Zelltod führt. Umgekehrt war kein Wachstum auf Neo oder Cm möglich (Tabelle 8). Eine Inkubation bei 30°C unterdrückte das Wachstum von Background-Mutationen von Plasmid-Integraten, die durch Beschädigungen der Markerkassette infolge fehlerhafter Rekombination entstehen können.

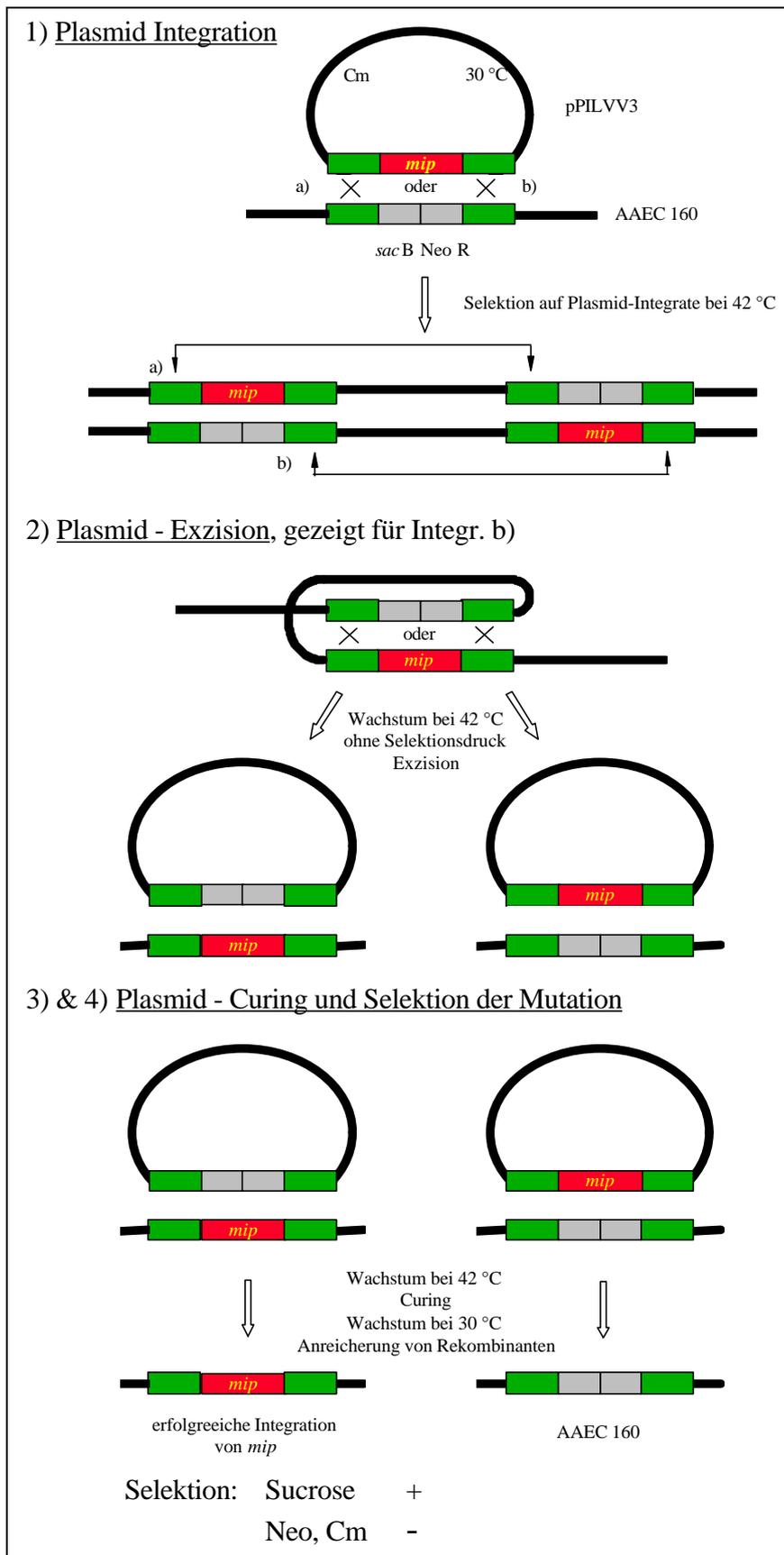


Abb. 17) Schema der chromosomalen Integration von *mip* durch homologe Rekombination. Schritt 1: Plasmid-Integrate werden bei nicht-permissiver Temperatur für die Plasmid-Replikation selektiert (42°C). Schritte 2+3: Wachstum bei 42°C ohne Selektionsdruck führt zur Plasmid Exzision (Schritt 2) und anschließendem Curing (Schritt 3). Schritt4: Selektion auf gewünschte Rekombinanten.

| Klon | Neo | Cm | Sucrose |
|------|-----|----|---------|
| 1 | - | + | + |
| 2 | + | + | + |
| 3 | - | + | + |
| 4 | + | + | + |
| 5 | - | + | + |
| 6 | - | - | + |
| 7 | + | - | + |
| 8 | + | - | + |
| 9 | - | - | + |
| 10 | + | - | + |
| 11 | - | + | + |
| 12 | + | + | + |
| 13 | + | + | + |
| 14 | + | + | + |
| 15 | + | + | + |
| 16 | + | + | + |
| 17 | + | - | + |
| 18 | - | - | + |
| 19 | - | - | + |
| 20 | - | - | + |
| 21 | + | + | + |
| 22 | + | + | + |
| 23 | - | - | + |
| 24 | + | + | + |
| 25 | + | + | + |
| 26 | + | + | + |
| 27 | + | - | + |

Tabelle 8: Selektion von Rekombinanten nach homologer Rekombination. Sucrose-positive Klone wurden zusätzlich auf Neo- und Cm-Resistenz gescreent. Erfolgreiche Integrationen sind rot gekennzeichnet. In Cm-Medium wachsende Klone beinhalten noch Vektorbestandteile, während ein Wachstum in Neo-Medium eine fehlerhafte Rekombination im homologen Bereich dokumentiert.

1.6.6. Nachweis der Expression von chromosomal integriertem *mip* durch Westernblot

Die 6 Neo- und Cm-sensitiven Klone wurden im Immunoblot auf korrekte Expression von *mip* getestet (Abb. 18). Als Positivkontrolle diente pBLL 100, als Negativkontrolle pPILVV₃. Lediglich Klon 20 (vergl. Tabelle 8) exprimierte *mip*. Dieser Klon wurde mit AAEC 160-1 bezeichnet und im Southernblot eingehender analysiert.

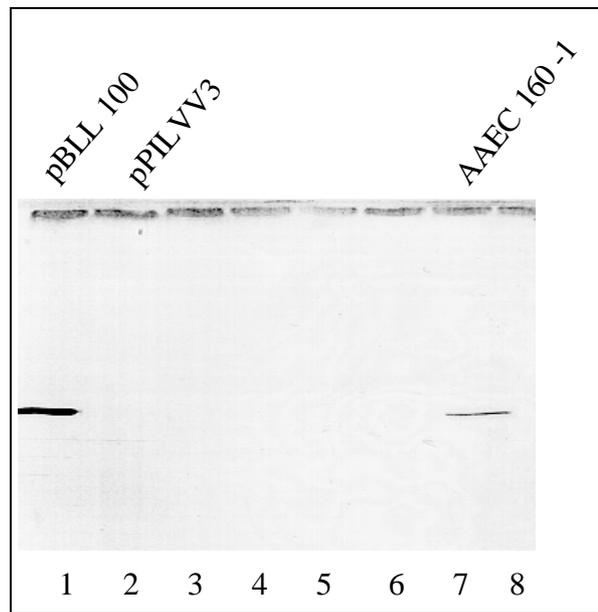


Abb. 18) Westernblot zum Nachweis der Expression von *mip* nach homologer Rekombination.
Spur 1: Positivkontrolle; Spur 2: Negativkontrolle;
Spur 3: Klon 6; Spur 4: Klon 9; Spur 5: Klon 18;
Spur 6: Klon 19; Spur 7: Klon 20 (AAEC 160-1);
Spur 8: Klon 23.

1.6.7. Nachweis der chromosomalen Integration von *mip* in das *E. coli* K-12 - Genom

Um die chromosomale Integration von *mip* in Stamm AAEC 160-1 zu belegen, wurden Southernblots angefertigt und mit verschiedenen Proben hybridisiert (Abb. 19). In Blot 1 diente das 1,3 kb *mip*-Fragment, das durch PCR generiert wurde, als Probe. Die chromosomale DNA der Stämme AAEC 160 und AAEC 160-1 wurde ebenfalls *Cla*I gespalten und auf das Gel aufgetragen. Zudem wurden Kontrollspaltungen von pPILMF₁ mit den Enzymen *Hind*III und *Cla*I ausgeführt. Da das *mip*-Insert lediglich im AAEC 160-1 hybridisieren kann, ließ sich auch nur dort die zugehörige 1,3 kb - Bande ermitteln (Spur 1). Im Ausgangsstamm AAEC 160 vermochte hingegen kein Fragment mit der Probe zu hybridisieren (Spur 2). Wird pPILMF₁ *Hind*III gespalten (Spur 3), so hybridisieren ein 3,3 und ein 6 kb großes Teilstück des Plasmids, da beide über *mip*-Anteile im jeweiligen Fragment verfügen. Der Verdau des Plasmids mit *Hind*III und *Cla*I (Spur 4) führte im Southernblot nach Hybridisierung nur zur Markierung der beiden Insert-Banden, die beiden Vektorbanden wurden nicht markiert (vergl. hierzu Abb. 16; Spur 7). Ein Verdau mit *Cla*I markierte auch bei pPILMF₁ analog zu AAEC 160-1 die 1,3 kb - Bande des *mip*-Inserts.

In Blot 2 wurde das 2,4 kb große *Hind*III-*Sal*I - Fragment aus pPILMF₁ als Probe eingesetzt. Wird der Ausgangsstamm AAEC 160 ebenso gespalten (Spur 2), hybridisiert ein 8,1 kb großes Fragment (vergl. dazu Abb. 15). In AAEC 160-1 ist das markierte Fragment nur 2,4 kb groß (Spur 1), da *mip* eine zusätzliche *Hind*III - Schnittstelle in die rekombinierte *fim*-Region einbringt und das Fragment damit verkleinert. Auch ein Verdau der chromosomalen DNA beider Stämme mit *Hind*III allein führte zu einer Verkleinerung des markierten Fragments in AAEC 160-1 gegenüber dem Ausgangsstamm AAEC 160. Die exakte Größe dieser Fragmente ließ sich jedoch mangels Kenntnis der genauen Position der *Hind*III-Site downstream des *fim*-Genclusters nicht ermitteln. Als Kontrolle zur Ermittlung der Bandengrößen wurde pPILMF₁, mit *Hind*III und *Sal*I gespalten, eingesetzt.

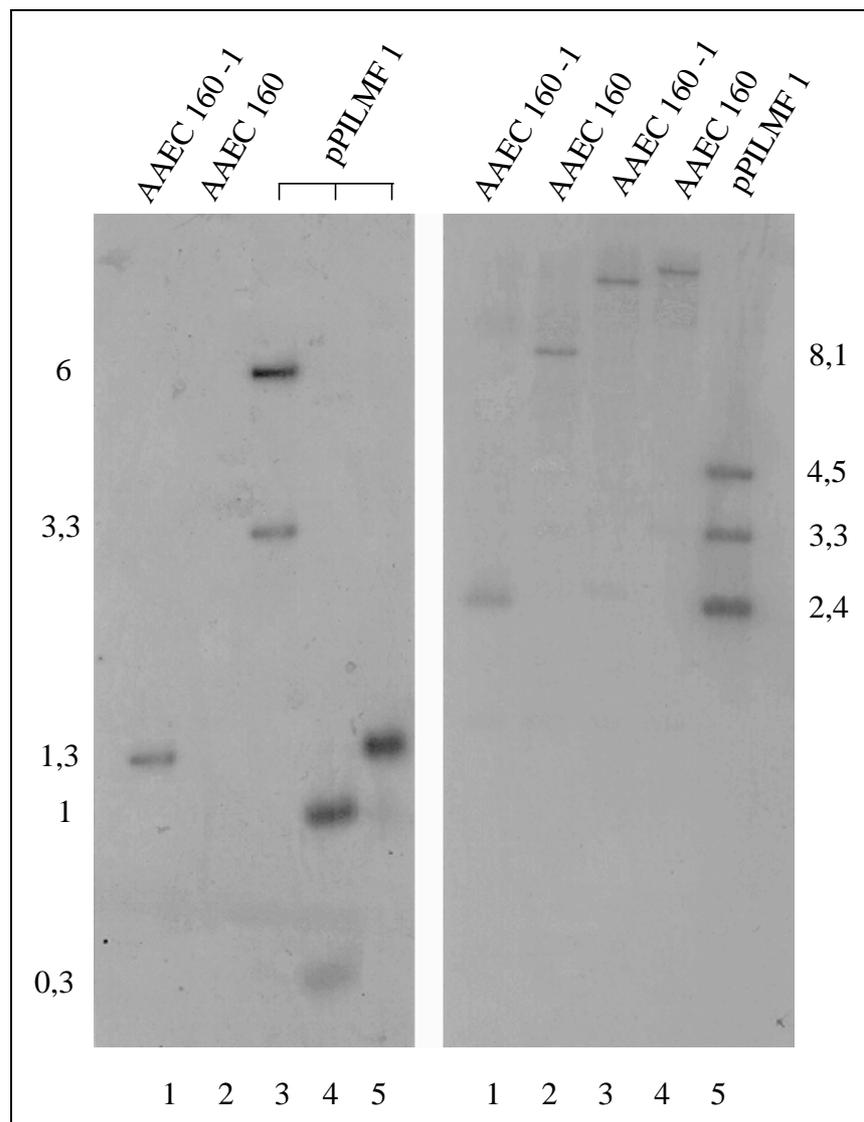


Abb. 19) Southernblot von AAEC 160-1

Blot 1: Spur 1: AAEC 160-1 (*Cla*I); Spur 2: AAEC 160 (*Cla*I); Spur 3: pPILMF₁ (*Hind*III); Spur 4: pPILMF₁ (*Hind*III, *Cla*I); Spur 5: pPILMF₁ (*Cla*I). Probe: 1,3 kb *mip*-Fragment.

Blot 2: Spur 1: AAEC 160-1 (*Hind*III, *Sal*I); Spur 2: AAEC 160 (*Hind*III, *Sal*I); Spur 3: AAEC 160-1 (*Hind*III); Spur 4: AAEC 160 (*Hind*III); Spur 5: pPILMF₁ (*Hind*III, *Sal*I). Probe: 2,4 kb Fragment aus pPILMF₁ (*Hind*III, *Sal*I).

2. Ökologische Studien zur Persistenz von *L. pneumophila* und *E. coli* in der Umwelt

2.1. Einfluß von *lly* und *mip* auf die Persistenz von *L. pneumophila* und *E. coli* K-12 unter Lichtstreß

Es konnte bereits gezeigt werden, daß die Exprimierung von *lly*, und damit die Pigmentierung des Kulturmediums zu einer Persistenz unter Lichtstreß führt (Steinert et al, 1995). Dazu wurden *L. pneumophila* JR 32 und die *lly*-negative Mutante JR 32-1 acht Tage ununterbrochen unter Lichtstreß gesetzt. Als Lichtquelle diente eine 12 V Halogenglühlampe mit Kaltlichtreflektor mit einer Leistung von 75 Watt und geringem UV-Anteil (Decostar 51, Osram). Von 10^{10} Zellen / ml in GC-FC-Medium konnten nach acht Tagen Lichtbestrahlung keine *lly*-negativen Mutanten mehr kultiviert werden, während der Wildtyp (WT) zu persistieren vermochte. Im Kulturüberstand des WT war die Mutante hingegen in der Lage, den Lichtstreß zu überstehen. In der Dunkelkontrolle war keine Abnahme der Zellzahl zu beobachten.

In Ergänzung zu diesen Daten wurde der Effekt von Licht auf das Überleben von rekombinanten *E. coli* K-12 in einem analogen Experiment getestet (Abb. 20 a und b). Nach Aufzucht der *E. coli* K-12 *lly* +/- Stämme in Übernachtskultur unter Selektionsdruck wurde die Zelldichte auf 10^9 CFU / ml eingestellt. Je 3 ml Zellsuspension wurden in 12-well Gewebekulturplatten überführt. Diese waren zwecks Verhinderung von Verdunstung durch Parafilm abgedichtet. Die Lichtquelle wurde 40 cm oberhalb der Platte installiert. Die Temperatur betrug 18 °C. Die Messung der Lebendzellzahl erfolgte durch tägliches Ausplattieren geeigneter Verdünnungen. Während *E. coli* DH5 α (pEWL2) in seinem eigenem Kulturüberstand bei leichter Abnahme der Zellzahl zu persistieren vermochte, war bei *E. coli* DH5 α (pUC 18) eine rapide Abnahme der Zellzahl um 4 Zehnerpotenzen zu registrieren. Durch Austausch der sterilfiltrierten Kulturüberstände ließ sich auch hier das Ergebnis umkehren (Abb. 20 a). Die experimentelle Kontrolle erfolgte durch Halten der Zellen im Dunkeln (Abb. 20 b).

Die Mutagenisierung bzw. Komplementierung des Pathogenitätsfaktors *mip* zeigte hingegen keinerlei Einfluß auf die Persistenz von *L. pneumophila* unter Lichtstreß (Abb 21).

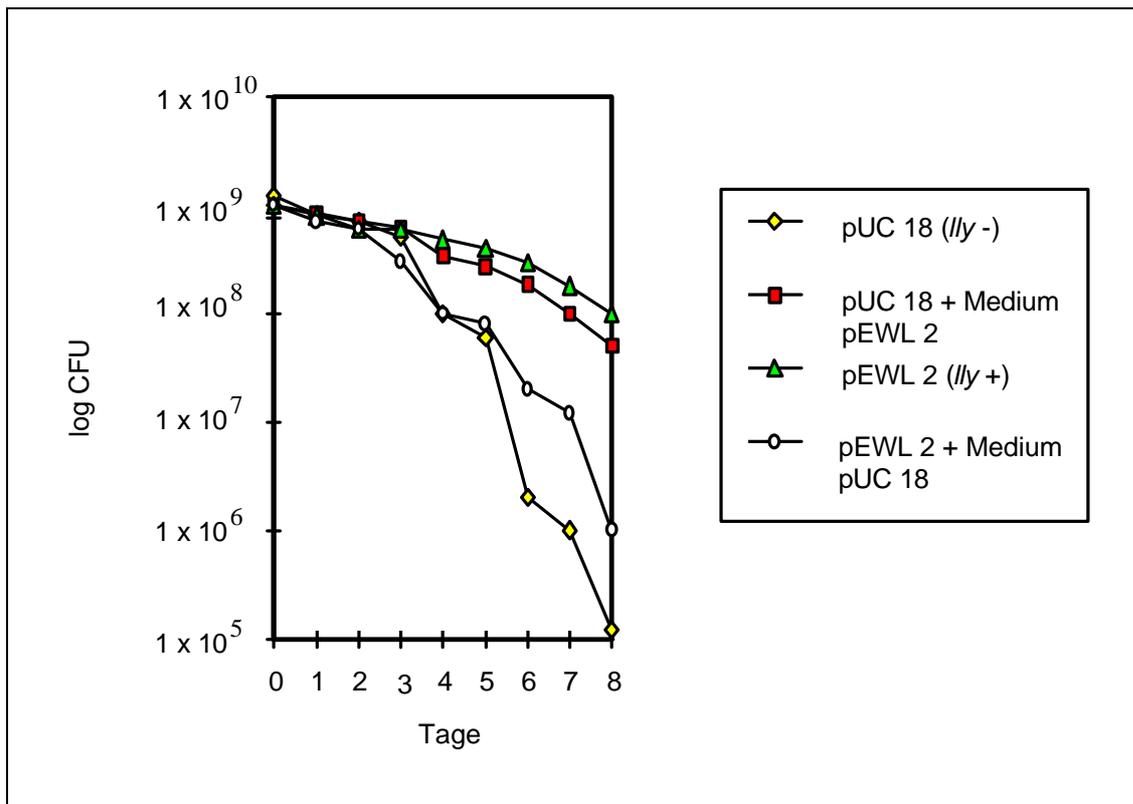


Abb. 20 a) Einfluß von *lly* auf die Persistenz von *E. coli* K-12 unter Lichtstreß.

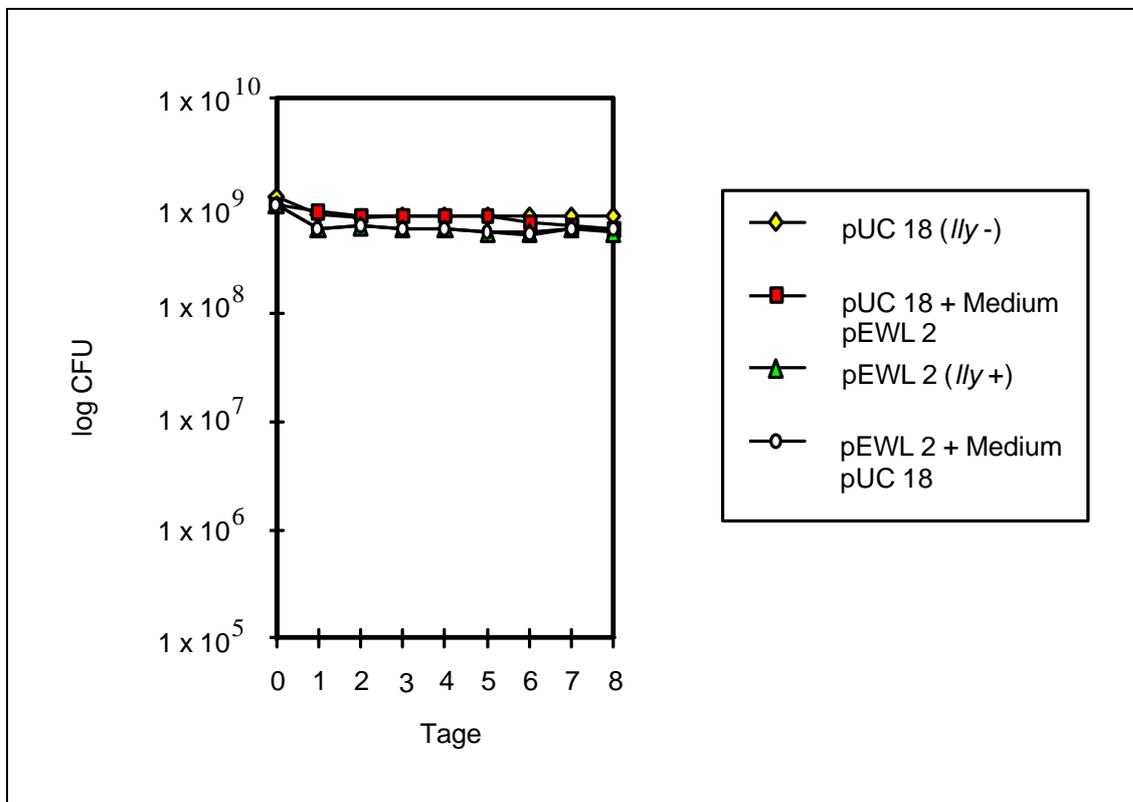


Abb. 20 b) Einfluß von *lly* auf die Persistenz von *E. coli* K-12 unter Lichtstreß. Dunkelkontrolle

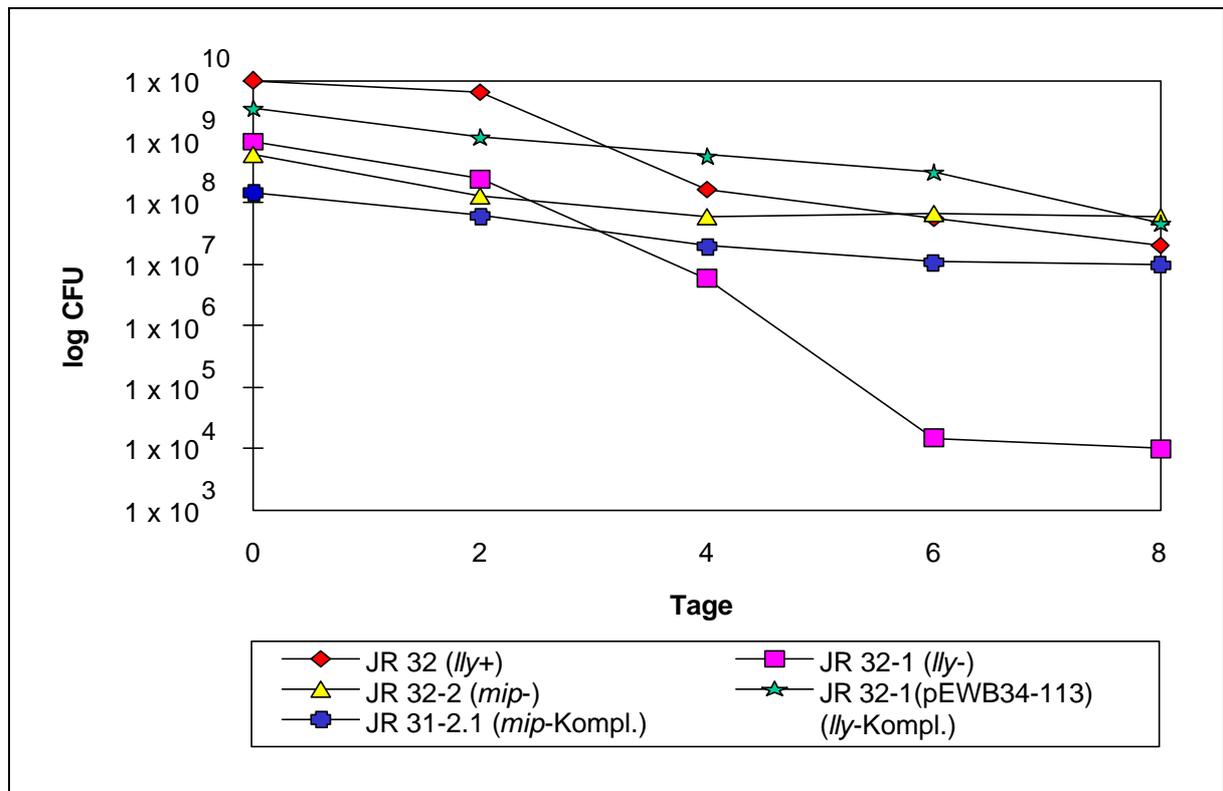


Abb. 21) Einfluß von *lly* und *mip* auf die Persistenz von *L. pneumophila* unter Lichtstreß.

2.2. Assoziation von *L. pneumophila* mit *Fischerella* sp.

Cyanobakterien sind im Süßwasserhabitat verbreitet, kommen aber auch in feuchten Böden vor. Sie sind die größte, und am weitesten verbreitete Gruppe photosynthetisch aktiver Prokaryonten. Aufgrund ihrer Fähigkeit, Stickstoff zu fixieren, sind viele Arten Pioniere an nährstoffarmen Standorten. Die Präsenz von *L. pneumophila* in den Algenmatten von *Fischerella* und der Schwingalge *Oscillatoria* wurde bereits 1980 beschrieben. Die Assoziation zu den genannten Cyanobakterien dient dabei vermutlich der Bereitstellung von Wachstumsfaktoren (Tison et al., 1980). In den Abbildungen 23a) und 23b) ist *Fischerella* durch Rasterelektronenmikroskopie dargestellt.

Die Assoziation von *L. pneumophila* JR32 und JR32-1 (*lly*-negativ) mit *Fischerella* wurde in Mikrokosmen über einen Verlauf von sieben Tagen beobachtet. Dazu wurden Übernachtskulturen von 1×10^4 Bakterien / ml mit frisch angesetzter *Fischerella*-Kultur versetzt und bei 37 °C inkubiert. Aufgrund des photoautotrophen Wachstums der Cyanobakterien wurden die Reaktionskölbchen von einer tageslichtähnlichen Leuchtstoffröhre, die das Spektrum des Sonnenlichtes weitgehend imitiert, mit einer Lichtstärke von 4000 lux bestrahlt (Lichtquelle: Osram Biolux L15W/72). Zur Kontrolle wurde *Legionella* bei gleichen Reaktionsbedingungen mit frischem *Fischerella*-Medium, sowie *Fischerella*-Überstand versetzt. In dem Überstand war *Fischerella* zuvor 14 Tage lang präsent und schließlich steril ausfiltriert worden.

Während *Legionella* in Assoziation mit *Fischerella* bzw. in dessen Überstand zu persistieren vermag, ist dies den Bakterien in frischem *Fischerella*-Medium nicht möglich. Wie die Coinkubation der Fischerellen mit *L. pneumophila* JR32-1 zeigte, spielt die Expression von *lly* dabei keine Rolle (Abb. 22). Ein Wachstum der Bakterienkulturen konnte weder in frischem Medium, noch in *Fischerella*-Überstand beobachtet werden.

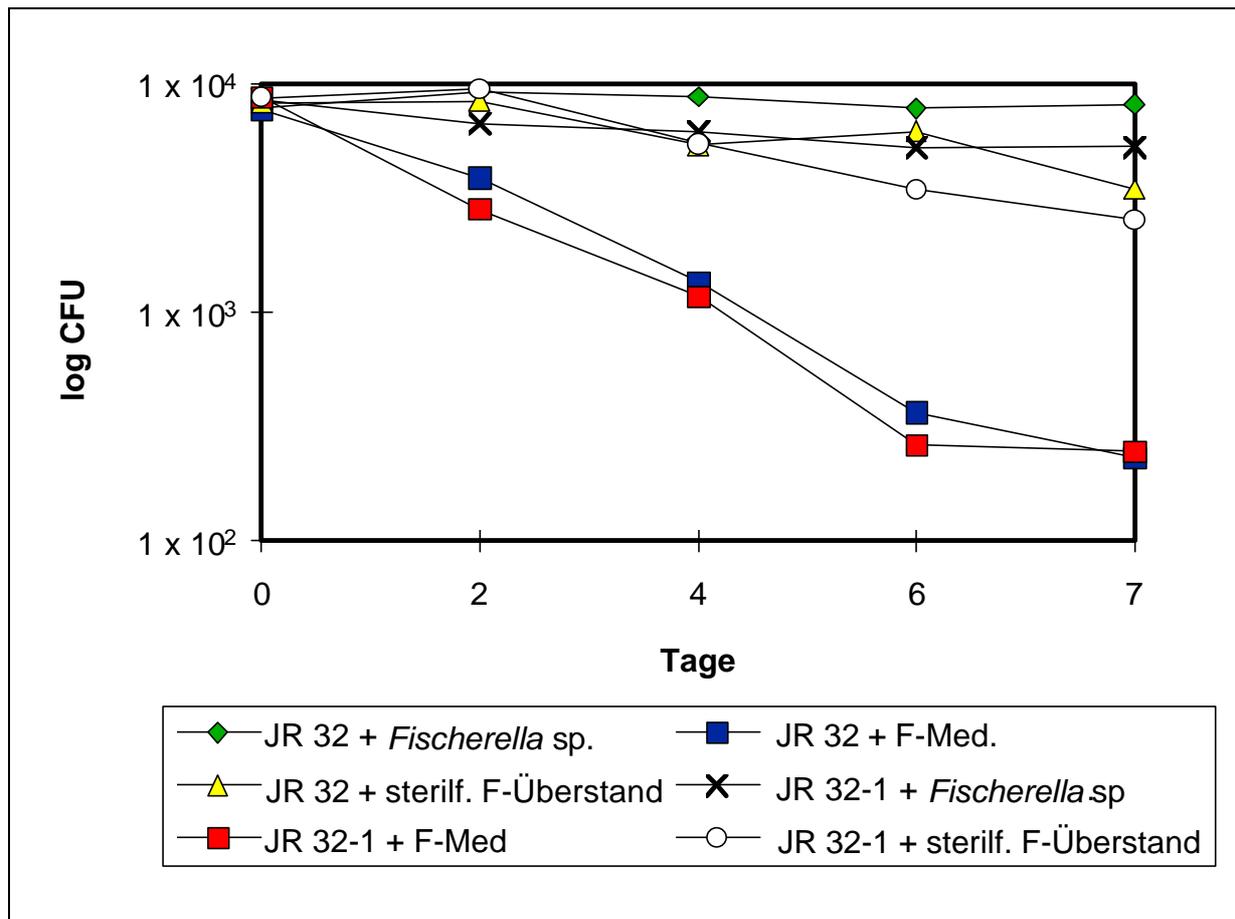


Abb. 22) Assoziation von *L. pneumophila* JR32 und JR32-1 (*lly*-negativ) mit *Fischerella* sp.
(F-Med = *Fischerella*-Medium)

Durch Rasterelektronenmikroskopie konnte der adhäsive Charakter der Assoziation von *L. pneumophila* zu *Fischerella* dokumentiert werden. Um den Einfluß verschiedener Pathogenitäts- und Umweltfaktoren zu testen, wurden neben dem Wildtyp *L. pneumophila* JR32 auch Deletionsmutationen für *lly* (*L. pneumophila* JR32-1), *mip* (*L. pneumophila* JR32-2) und *fla* (*L. pneumophila* Corby KH1) eingesetzt. Alle getesteten Stämme zeigten ein gutes Adhäsionsvermögen. Lediglich bei *L. pneumophila* JR 32-1 war im Vergleich zum Referenzstamm *L. pneumophila* JR 32 eine leichte Verringerung im Adhäsionsvermögen festzustellen. Es konnte zudem beobachtet werden, daß die Anlagerung der Bakterien unspezifisch war, wie die Cokultivierung von *Fischerella* mit *E. coli* DH5 α zeigte. In Tabelle 9 ist die optische Quantifizierung des Adhäsionsvermögens der eingesetzten Stämme zusammengefaßt. Nachfolgend dokumentieren die REM-Aufnahmen die Assoziation (Abb. 24a bis 30b)

Tabelle 9: Adhäsionsvermögen von *L. pneumophila* zu *Fischerella* sp.

| Bakterienstamm | Adhärenz |
|---------------------------------|-----------------|
| <i>L. pneumophila</i> JR32 | gut (++) |
| <i>L. pneumophila</i> Corby | gut (++) |
| <i>L. pneumophila</i> RIGP | gut (++) |
| <i>L. pneumophila</i> JR32-1 | gut (+) |
| <i>L. pneumophila</i> JR32-2 | gut (++) |
| <i>L. pneumophila</i> Corby KH1 | gut (++) |
| <i>E. coli</i> K12 DH5 α | sehr gut (+++) |

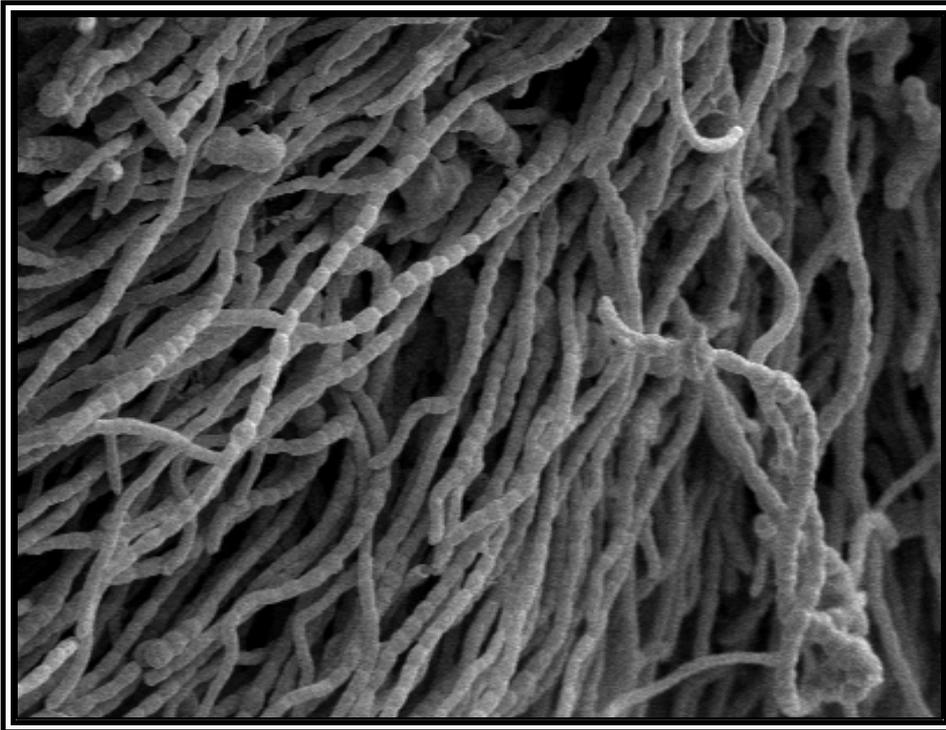


Abb. 23a) *Fischerella* sp.
500 fach vergr.

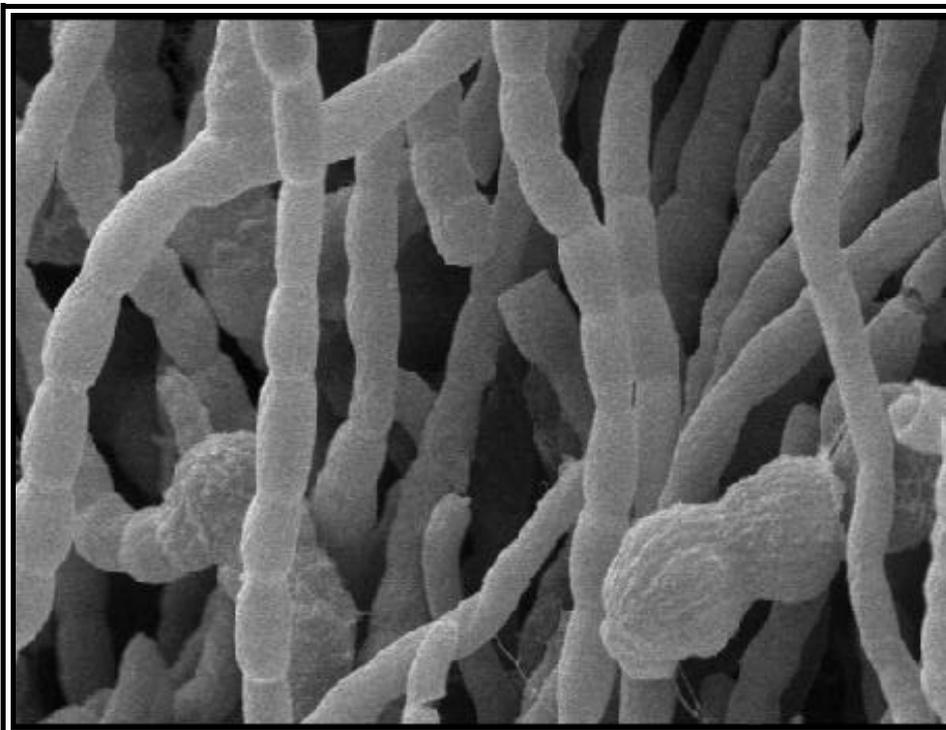


Abb. 23b) *Fischerella* sp. Die knollenartigen Verdickungen sind Heterozysten, in denen die Stickstofffixierung erfolgt. 2000 fach vergr.



Abb. 24a) Cokultivierung von *L. pneumophila* JR32 mit *Fischerella* sp.
10 000 fach vergr.

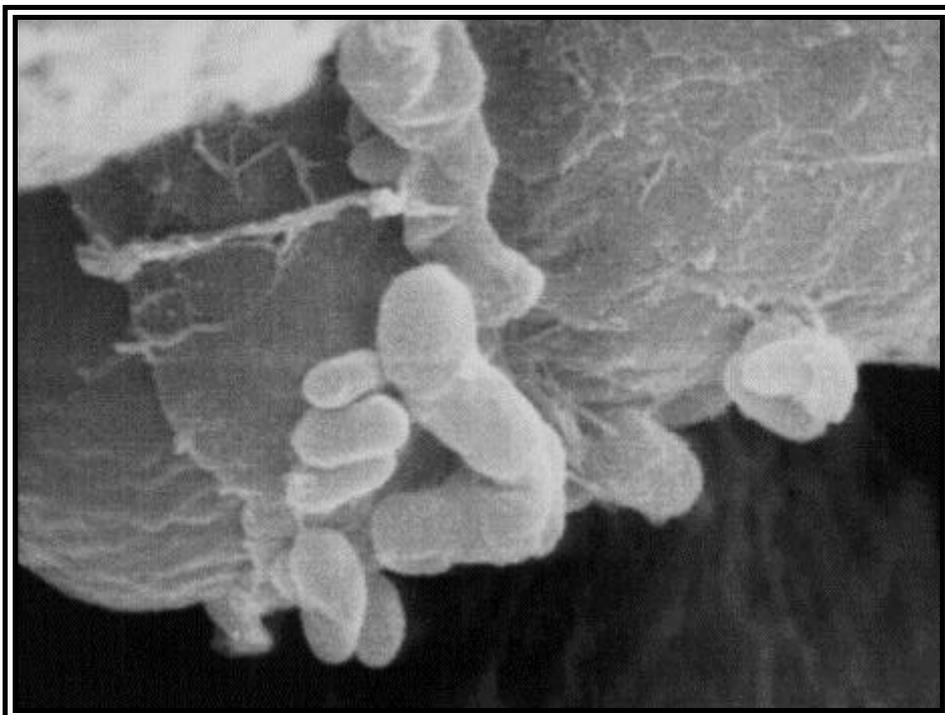


Abb. 24b) Cokultivierung von *L. pneumophila* JR32 mit *Fischerella* sp.
20 000 fach vergr.

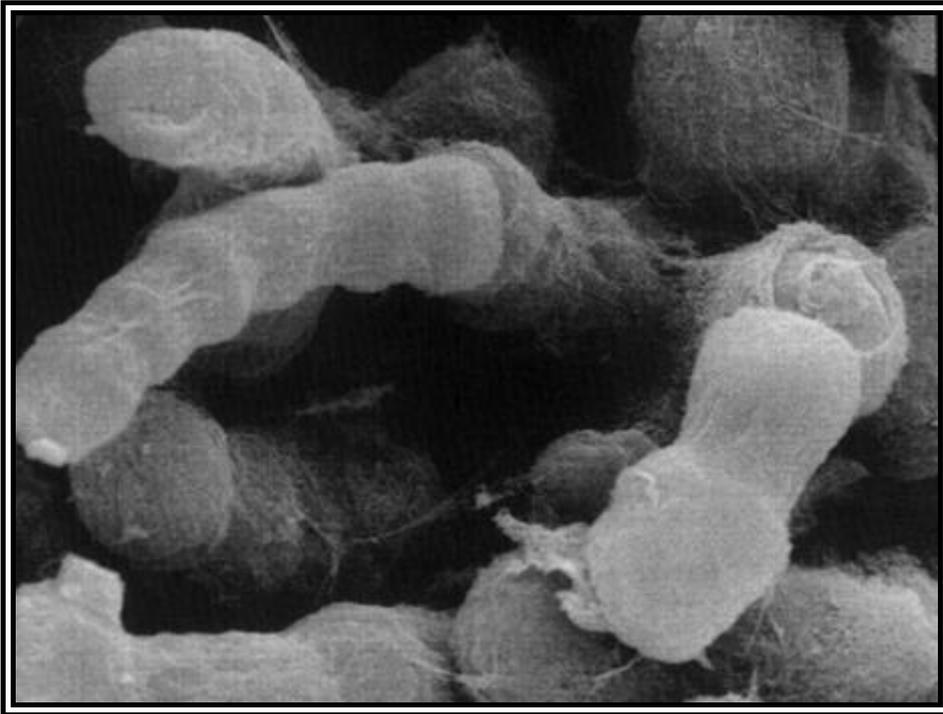


Abb. 25a) Cokultivierung von *L. pneumophila* Corby mit *Fischerella* sp.
3000 fach vergr.

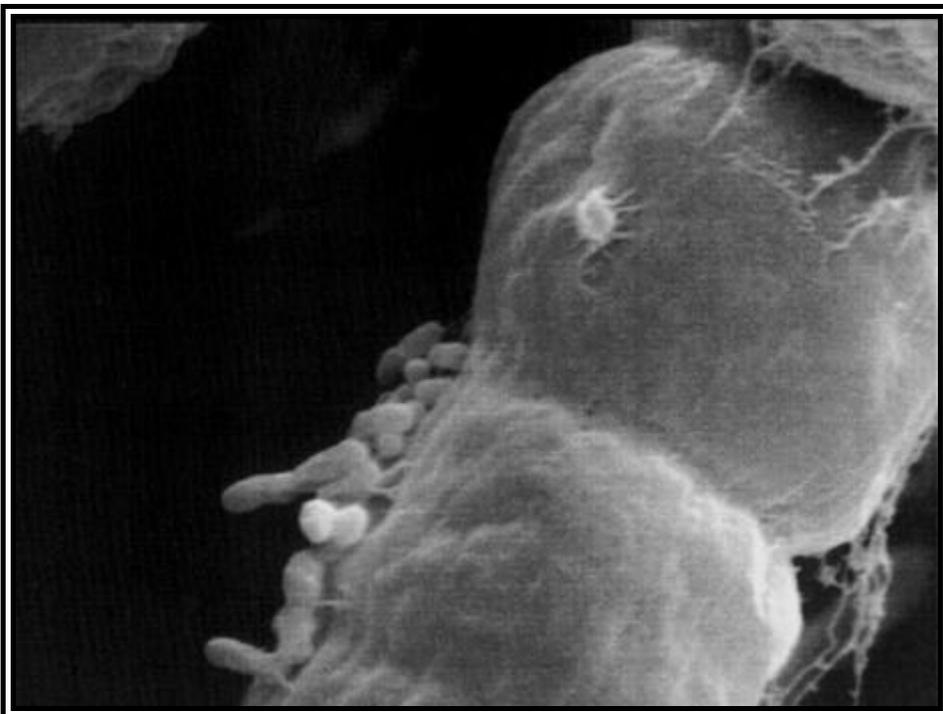


Abb. 25b) Cokultivierung von *L. pneumophila* Corby mit *Fischerella* sp.
10 000 fach vergr.

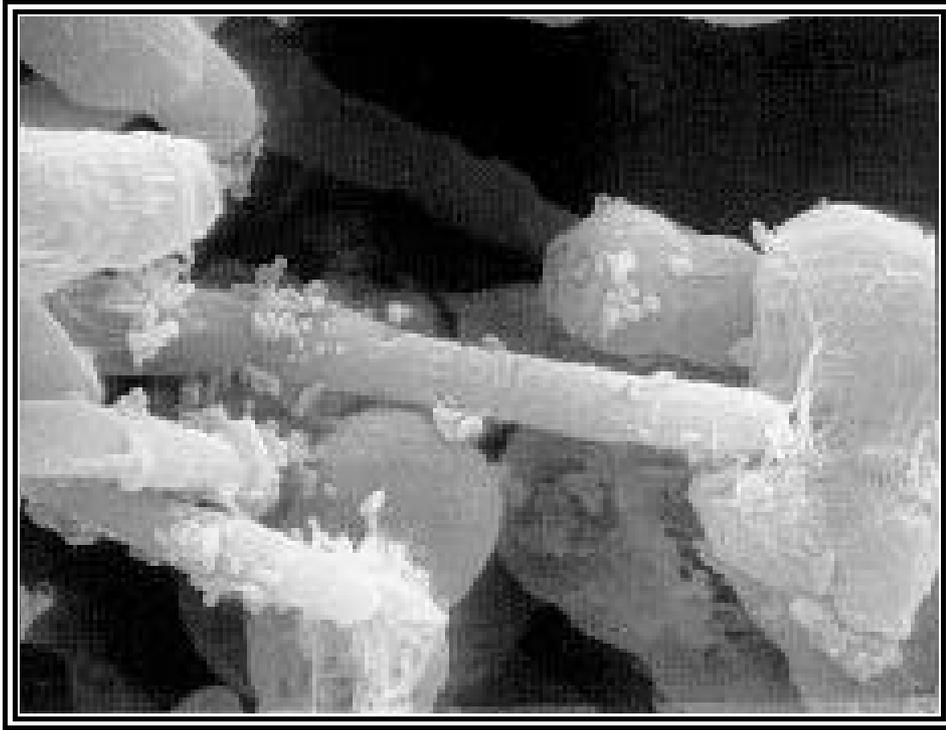


Abb. 26a) Cokultivierung von *L. pneumophila* RIGP mit *Fischerella* sp.
3000 fach vergr.

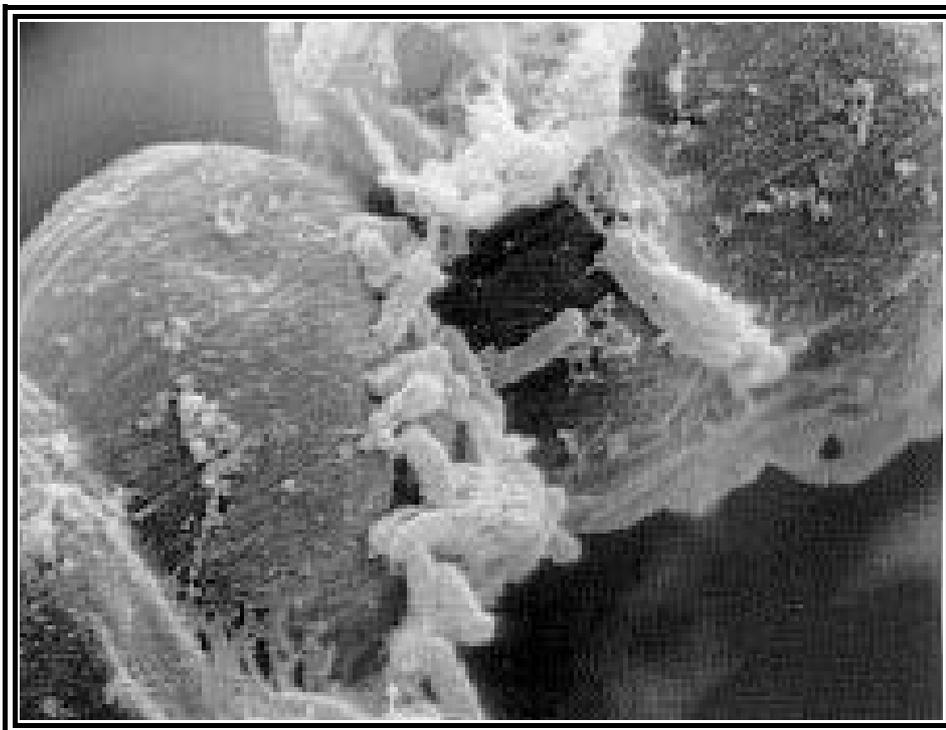


Abb. 26b) Cokultivierung von *L. pneumophila* RIGP mit *Fischerella* sp.
10 000 fach vergr.

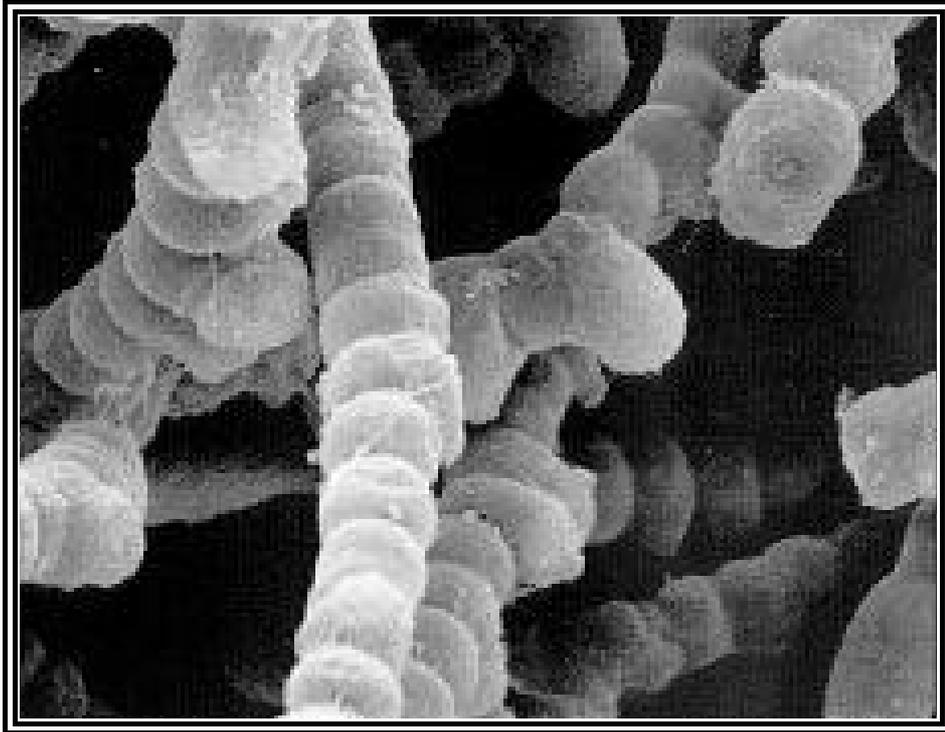


Abb. 27a) Cokultivierung von *L. pneumophila* JR32-1 mit *Fischerella* sp.
2000 fach vergr.

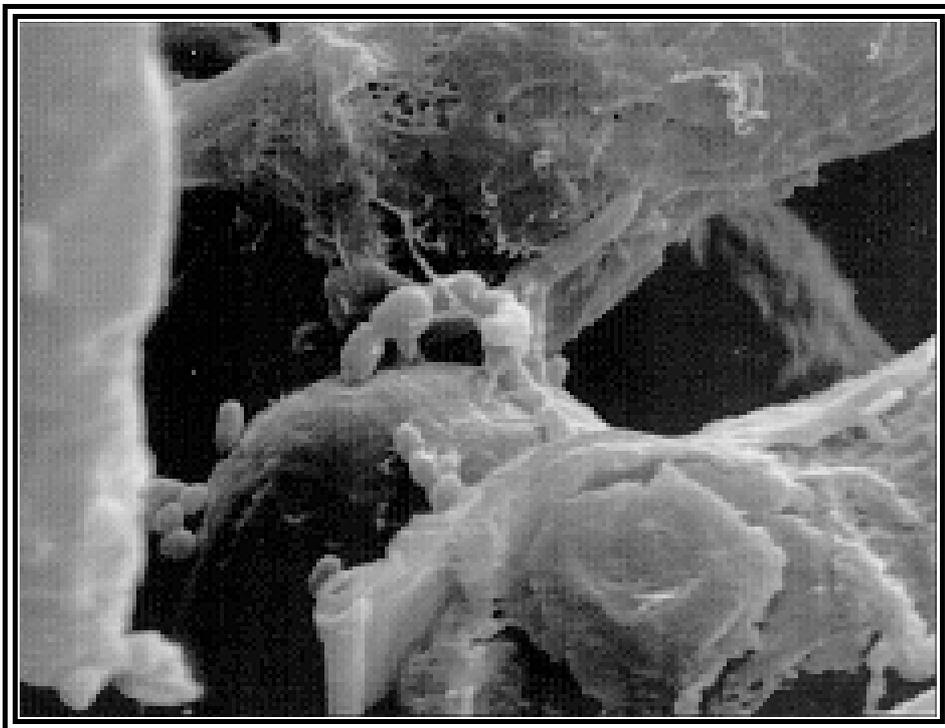


Abb. 27b) Cokultivierung von *L. pneumophila* JR32-1 mit *Fischerella* sp.
10 000 fach vergr.

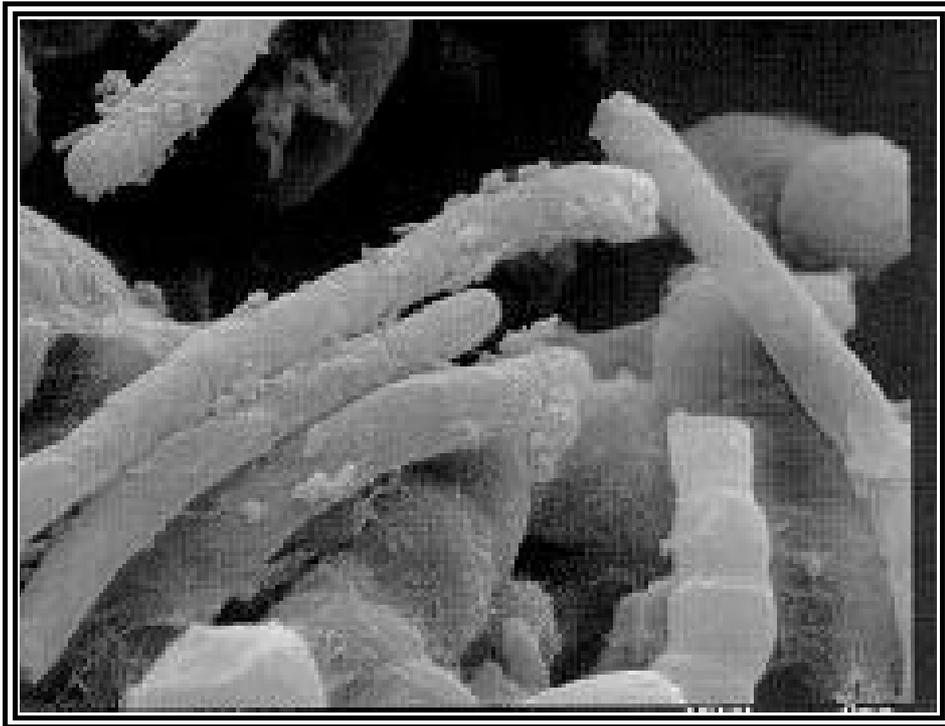


Abb. 28a) Cokultivierung von *L. pneumophila* JR32-2 mit *Fischerella* sp.
3000 fach vergr.

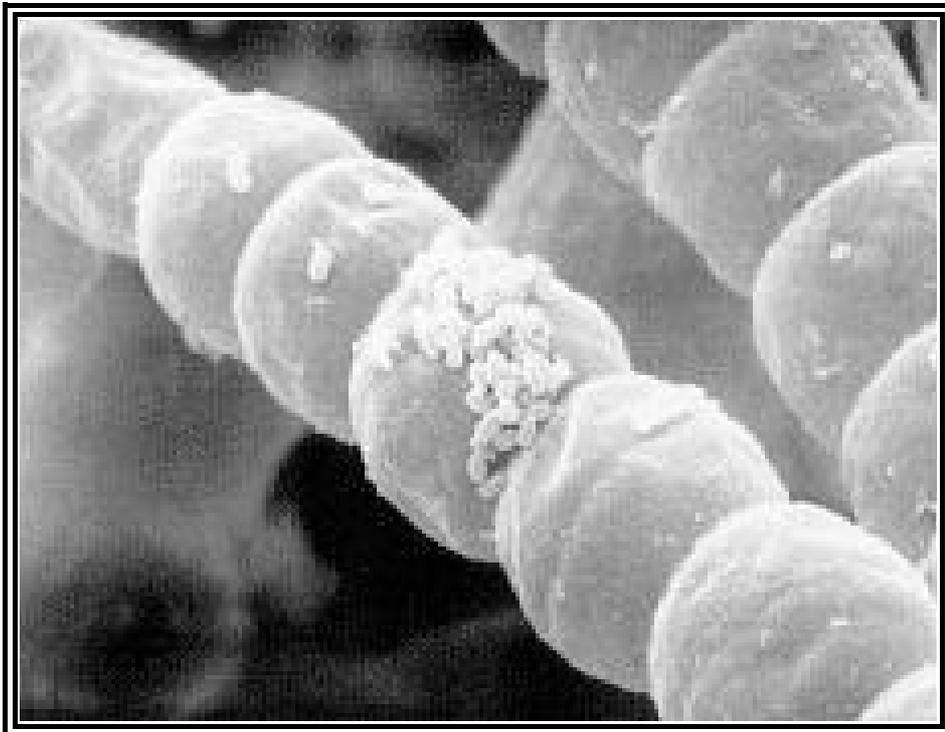


Abb. 28b) Cokultivierung von *L. pneumophila* JR32-2 mit *Fischerella* sp.
5000 fach vergr.

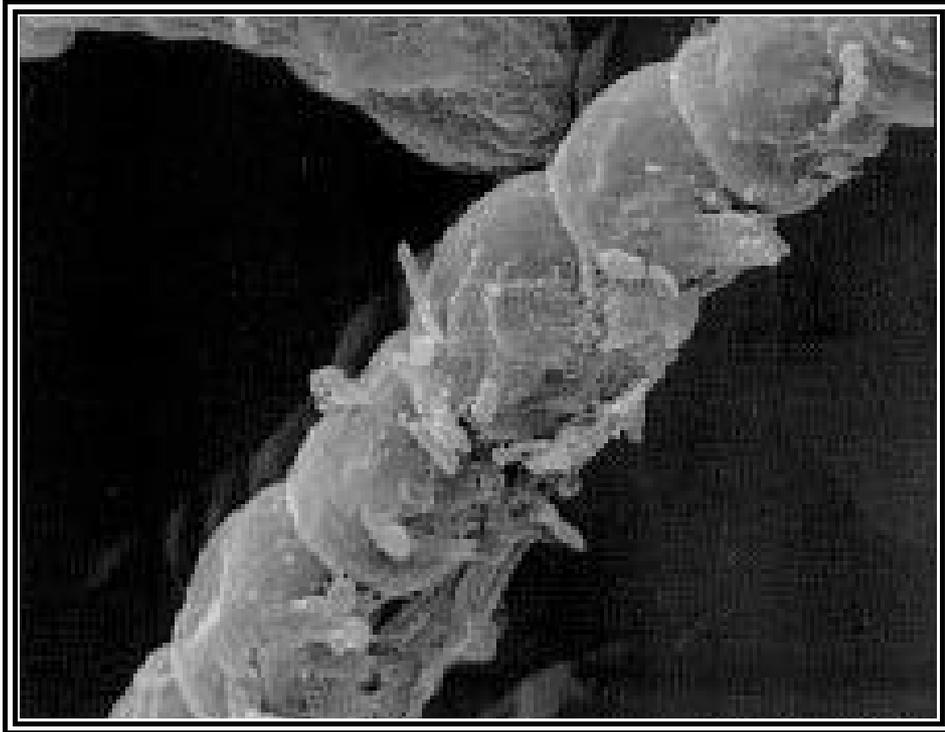


Abb. 29a) Cokultiveirung von *L. pneumophila* Corby KH1 mit *Fischerella* sp.
5000 fach vergr.

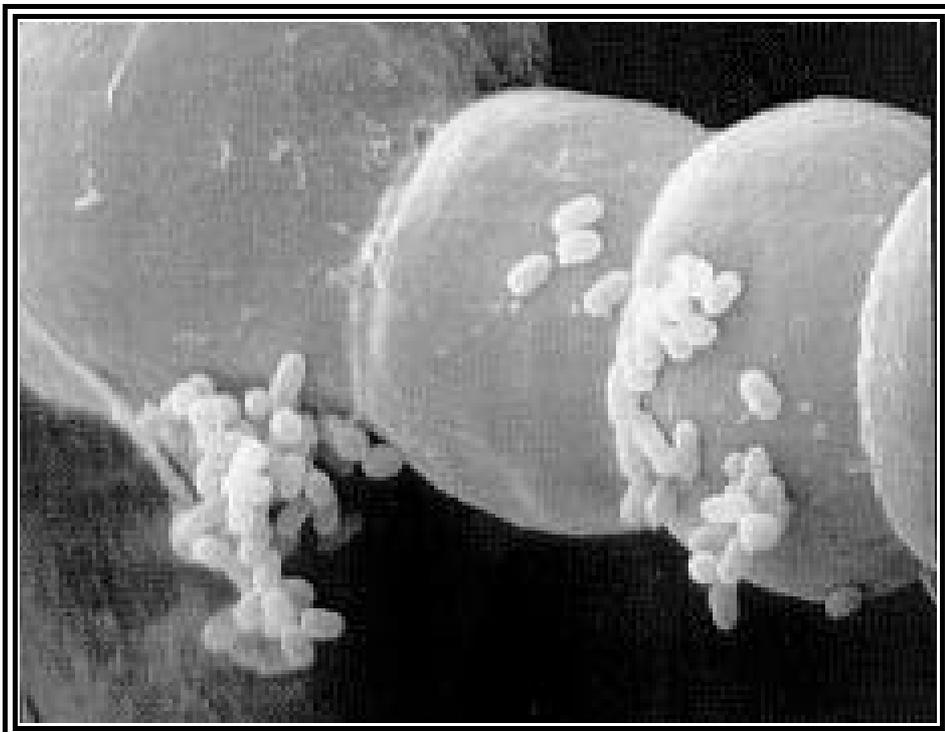


Abb. 29b) Cokultivierung von *L. pneumophila* Corby KH1 mit *Fischerella* sp.
10 000 fach vergr.

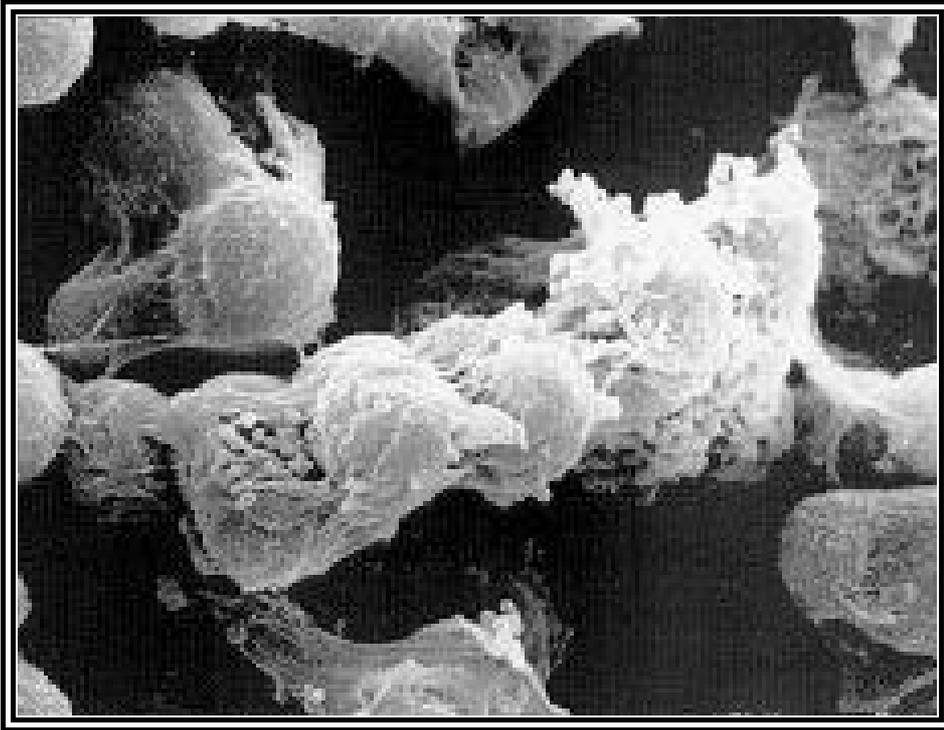


Abb. 30a) Cokultivierung von *E. coli* K12 DH5 α mit *Fischerella* sp.
3000 fach vergr.

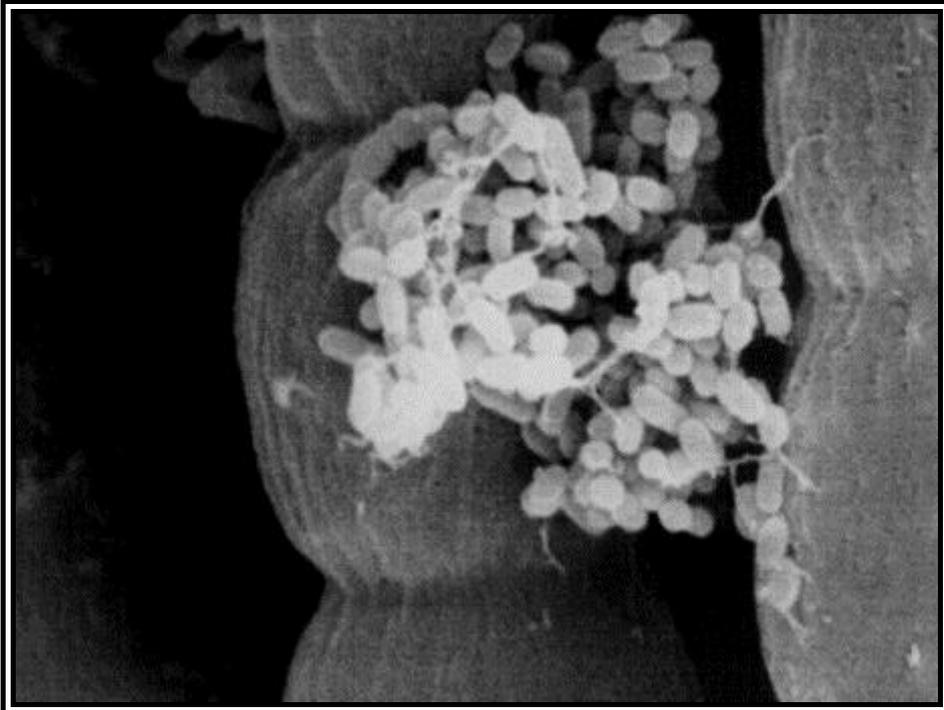


Abb. 30b) Cokultivierung von *E. coli* K12 DH5 α mit *Fischerella* sp.
10 000 fach vergr.

2.3. Studien zur Persistenz von *L. pneumophila* und *E. coli* in Boden-Mikrokosmen

2.3.1. Persistenz von *L. pneumophila* in Boden-Mikrokosmen

Die Verbreitung von *L. pneumophila* erfolgt in enger Assoziation mit freilebenden Protozoen, die in den meist nährstoffarmen Lebensräumen die erforderlichen Wachstumsfaktoren beisteuern. Insbesondere Amöben, wie z.B. *A. castellanii* sind als Wirte weit verbreitet. Deren Verbreitungsspektrum ist jedoch nicht auf wässriges Milieu beschränkt, sondern erstreckt sich auch auf feuchte Böden. Ziel der durchgeführten Persistenzstudien war daher die Ermittlung einer möglichen Besiedlungskapazität von *L. pneumophila* in Boden, wobei jedoch nicht die Wechselwirkung zu Protozoenwirten, sondern die Persistenz des Keims in suboptimaler Umgebung Gegenstand der Untersuchungen war.

Zu diesem Zweck wurde Blumenerde mit definierter Zusammensetzung durch Autoklavieren sterilisiert. Um insbesondere das Auskeimen von Sporen zu verhindern, wurde dieser Prozeß im Abstand von 48 h drei Mal wiederholt. Daraufhin wurden im Großmaßstab je 1 kg Erde und im Kleinmaßstab je 10 g Erde mit 1×10^4 Bakterien / g beimpft. Um die Zellzahl der kultivierbaren Zellen zu ermitteln, wurde die Erde in PBS resuspendiert. Nachdem grobe Bodenbestandteile absacken konnten, wurden geeignete Verdünnungen ausplattiert und die CFU bestimmt. Die Entnahme eines Bohrkerns aus dem Großmaßstab erfolgte über einen Spezialbohrer, der durch Abflammen sterilisiert wurde.

Neben *L. pneumophila* RIGP wurden in diesem Experiment die *lly*-, *mip*- und *fla*-negativen Mutanten *L. pneumophila* JR32-1, JR32-2 und Corby KH1 eingesetzt.

Wie aus der Graphik in Abb. 31 ersichtlich, ist für *Legionella* eine rapide Abnahme der Zellzahl schon nach kurzer Zeit zu detektieren. Nach 6 Tagen konnten keine Zellen mehr kultiviert werden. Die Defizienz der Pathogenitäts- und Umweltfaktoren *Mip*, *Fla* und *Lly* hatte keinen Einfluß auf die Persistenz der Bakterien in den Boden-Mikrokosmen.

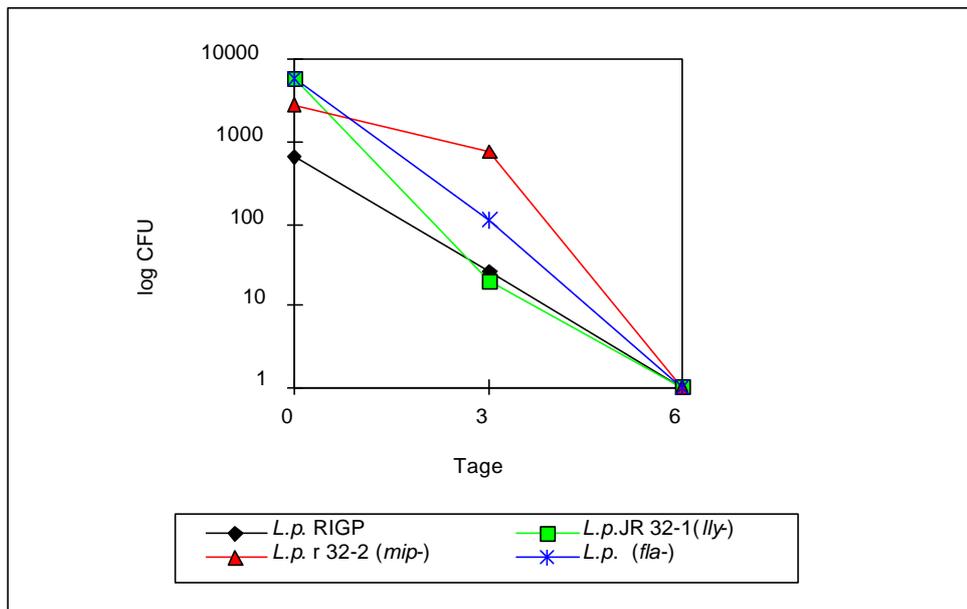


Abb. 31) Verlust der Kultivierbarkeit verschiedener *L. pneumophila* - Stämme in Boden-Mikrokosmen

2.3.2. Persistenz von *E. coli* in Boden-Mikrokosmen

In Analogie zu der Versuchsreihe mit *L. pneumophila* wurden auch mit verschiedenen *E. coli* - Stämmen Persistenzstudien in Boden-Mikrokosmen durchgeführt. Die Besiedlungskapazität gentechnisch veränderter Organismen ist dabei in Bezug auf die biologische Sicherheit von großer Bedeutung. Um den Einfluß der Faktoren *Mip* und *Lly* auf die Überlebensfähigkeit in Erde zu testen, wurden neben *E. coli* K-12 DH5 α die Integrationsmutanten AAEC 160-1 (genomische *mip*-Integration) und WM 2269-1 (genomische *lly*-Integration) (siehe Abschnitt 1.5. und 1.6.) herangezogen (Abb. 32). Diese im Rahmen der *E. coli* K-12 - Sicherheitsforschung generierten chromosomalen Integrationen eignen sich gegenüber plasmidkodierten Stämmen durch eine wesentlich verringerte Gefahr des Verlustes der einklonierten Eigenschaften im Verlauf von Langzeitstudien. Als Kontrollen wurden die EHEC-Stämme O157 : H7 st.933 und O157 : H7 st.86-24 eingesetzt.

Für *E. coli* DH5 α und die Integrationsmutanten WM 2269-1 und AAEC 160-1 war über den gesamten Zeitraum die kontinuierliche Reduktion der Zellzahl zu beobachten. Von anfänglich 2×10^4 Zellen / ml waren nach vier Wochen Inkubationszeit keine Zellen mehr kultivierbar.

Die EHEC - Stämme O157 :H7 st.933 und st.86-24 vermochten hingegen über diesen Zeitraum zu persistieren.

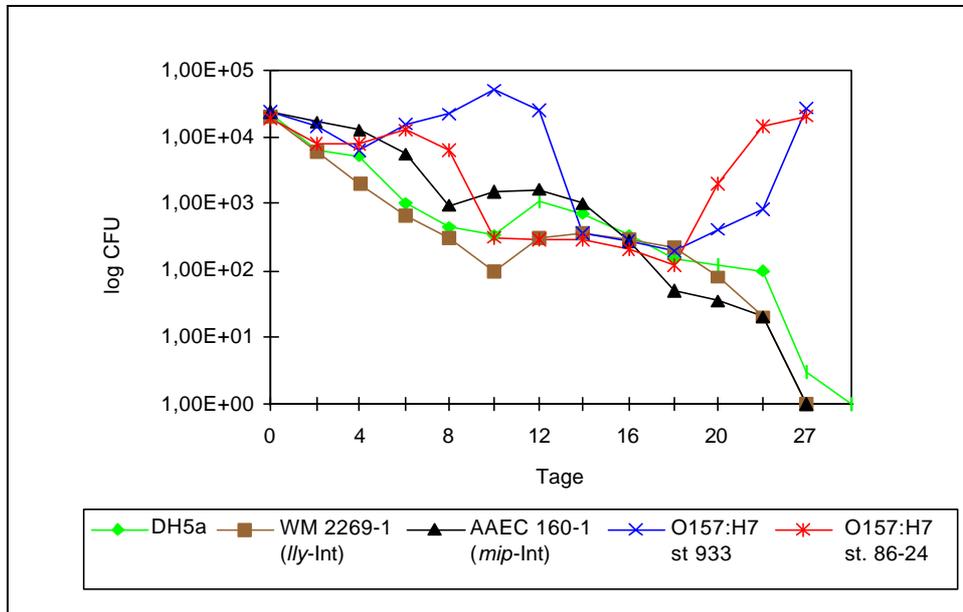


Abb. 32) Persistenz verschiedener *E. coli* - Stämme in Boden-Mikrokosmen

2.4. Persistenzstudien von *L. pneumophila* und *E. coli* in Wasser-Mikrokosmen

2.4.1. Persistenz von *L. pneumophila* in sterilem Leitungswasser

Die Lebensbedingungen von Umweltbakterien sind in freier Natur von mehreren Faktoren abhängig. Temperaturschwankungen, Assoziationsmöglichkeit zu Protozoenwirten und ein häufiges Unterangebot an Nährstoffen charakterisiert die Lebensverhältnisse von Legionellen. Um ungünstige Phasen zu überdauern, ist *L. pneumophila* zum Übergang in ein lebensfähiges, aber nicht mehr kultivierbares Ruhestadium (viable but nonculturable; VBNC) befähigt. Die metabolische Aktivität der Bakterien ist dabei stark herabgesetzt, eine Vermehrung findet nicht statt.

Wie in Abbildung 33a dargestellt, verlieren logarithmisch gewachsene *L. pneumophila* Zellen in sterilen Leitungswasser zunehmend ihre Kultivierbarkeit. Dazu wurden 1×10^4 Bakterien / ml in 400ml-Mikrokosmen in autoklaviertem Leitungswasser inokuliert und über einen Zeitraum von 200 Tagen die CFU-Werte bestimmt. Die Expression der Faktoren *lly* und *fla* hatte keinen Einfluß auf das Persistenzvermögen, wie der Vergleich von *L. pneumophila* JR32-1 (*lly*-

negativ) und *L. pneumophila* Corby KH1 (*fla*-negativ) mit den Referenzstämmen *L. pneumophila* JR32 und RIGP zeigt.

Von den anfänglich 1×10^4 Zellen / ml konnten nach durchschnittlich 170 Tagen keine Bakterien mehr nachgewiesen werden. Um den exakten Zeitpunkt des Übergang zur Nichtkultivierbarkeit zu dokumentieren, wurden gegen Ende des Versuchs bis zu 20 ml Mikrokosmen-Kultur durch Filtration aufkonzentriert und die CFU-Werte bestimmt.

Die *mip*-Mutante *L. pneumophila* JR32-2 verliert jedoch früher ihre Kulturfähigkeit und läßt sich nach 60 Tagen nicht mehr nachweisen. Es ist aber zu berücksichtigen, daß die Zellzahl zu Anfang des Experiments um 1 log-Stufe unterhalb der CFU-Werte der Referenz liegt. Es wird daher auch früher die Nachweisgrenze erreicht.

Parallel zur Bestimmung der CFU-Werte wurde während des Verlaufs des Experiments die Lebendzellzahl mittels LIVE/DEAD *BacLight*TM Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Leiden, NL) ermittelt. Diese zeigte eine weitaus höhere Anzahl noch lebensfähiger Zellen, selbst nachdem deren Kultivierbarkeit nicht mehr nachweisbar war (Abb. 33b).

Der Kit enthält zwei Fluoreszenzfarbstoffe. Bakterien mit intakter Membran fluoreszieren grün (lebende Zellen), solche mit beschädigter Membran rot (tote Zellen).

Einige Beispiele für die Diskriminierung von lebenden und toten Zellen durch den Bacterial Viability Kit sind in den Abbildungen 34 a), b), c), d) dargestellt.

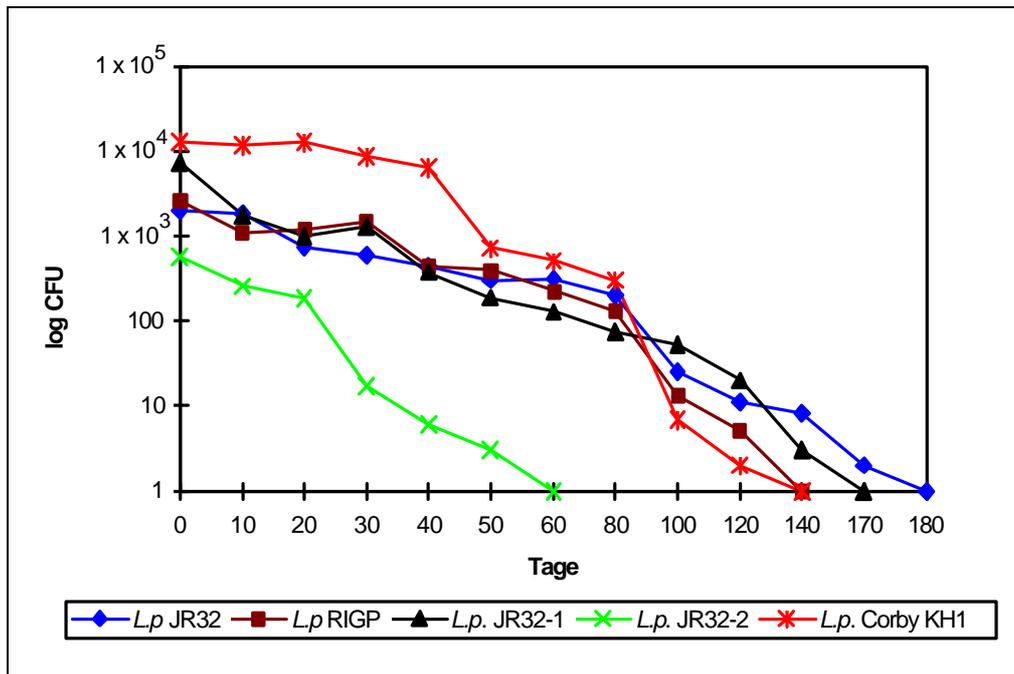


Abb. 33a) Verlust der Kultivierbarkeit von *L. pneumophila* in sterilen Leitungswasser-Mikrokosmen

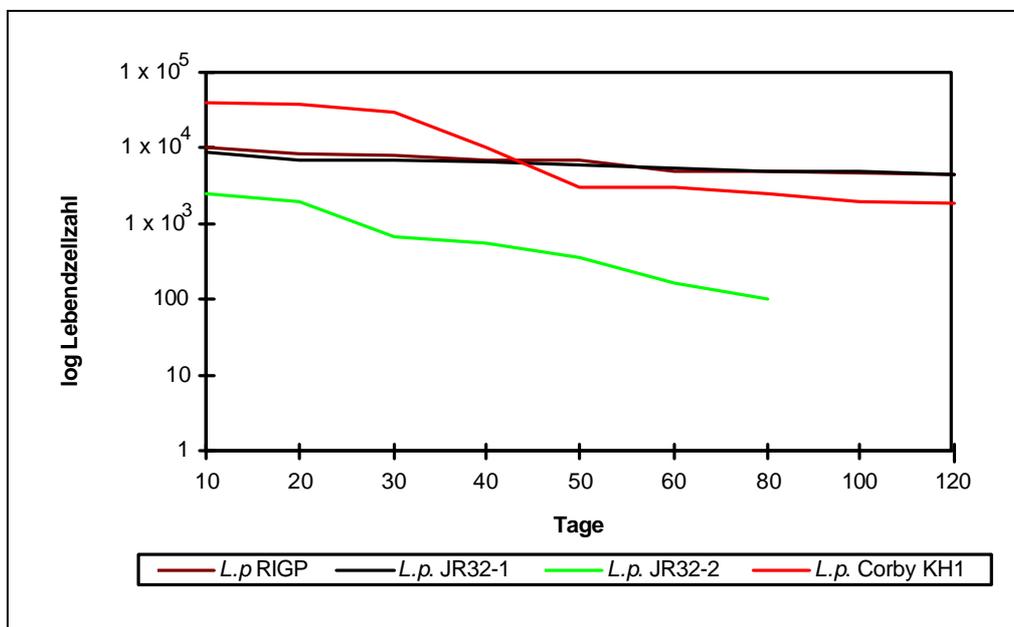


Abb. 33b) Lebendzellzahl von *L. pneumophila* in sterilem Leitungswasser. Die Zellzahl wurde mittels LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Leiden, NL) ermittelt.

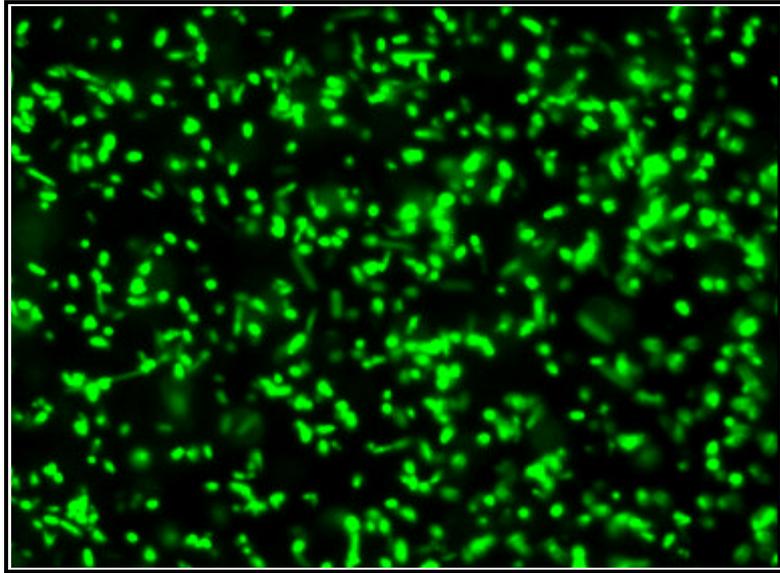


Abb. 34b) Lebendfärbung von *L. pneumophila* RIGP nach 10 Tagen Inkubation in sterilem Leitungswasser. Die Probe ist mit "SYTO 9" und Propidiumjodid angefärbt, über einen Fluorescein-Filter werden jedoch lediglich lebende Zellen separat sichtbar gemacht.

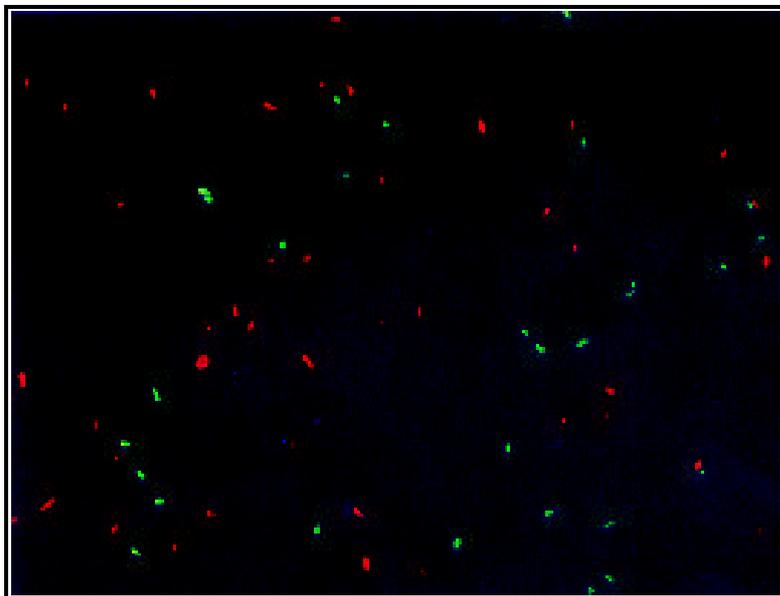


Abb. 34a) Lebendfärbung von *L. pneumophila* RIGP nach 40 Tagen Inkubation in sterilem Leitungswasser. Es wurde mit "SYTO 9" und Propidiumjodid angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Lebende Zellen sind grün, tote Zellen rot abgebildet.

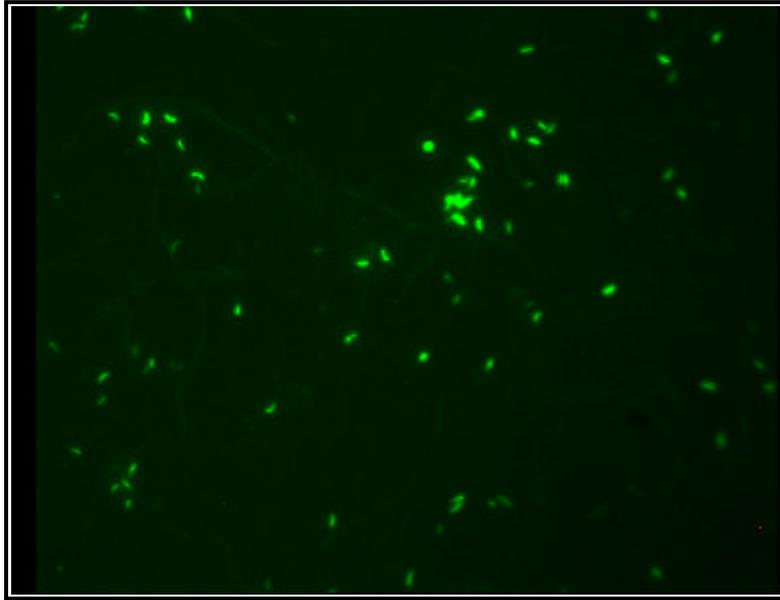


Abb. 34c) Lebendfärbung von *L. pneumophila* RIGP nach 40 Tagen Inkubation in sterilem Leitungswasser. Die Probe ist mit "SYTO 9" und Propidiumjodid angefärbt, über einen Fluorescein-Filter werden jedoch lediglich lebende Zellen separat sichtbar gemacht.

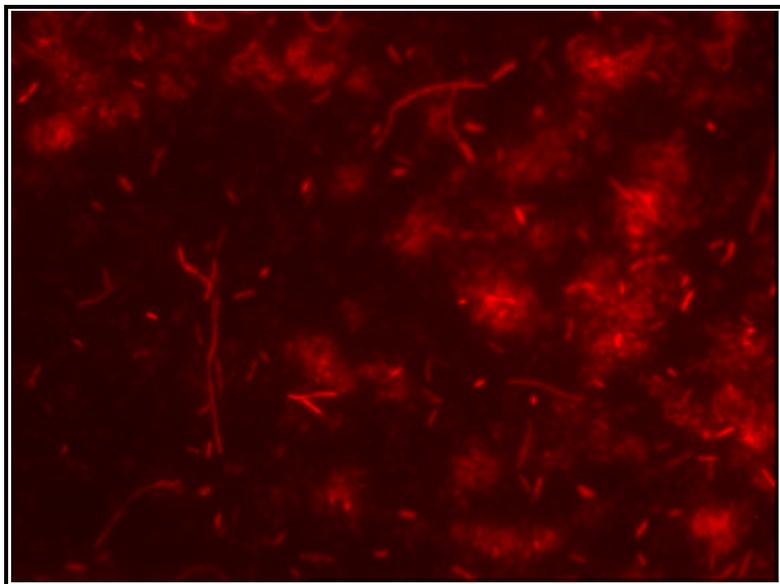


Abb. 34d) Anfärbung von *L. pneumophila* RIGP nach 80 Tagen Inkubation in sterilem Leitungswasser. Die Probe ist nur mit Propidiumjodid markiert und sondiert tote Zellen.

2.4.2. Persistenz von *L. pneumophila* im Umweltmedium Mainwasser

Parallel zu dem Versuchsansatz in sterilem Leitungswasser wurde die Persistenz von Legionellen in einem natürlichen Habitat getestet. Dazu wurde Flußwasser aus dem Main bei Würzburg entnommen, mit verschiedenen *Legionella*-Stämmen beimpft und bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei galt es festzustellen, ob dieses Medium möglicherweise zu einem anderen Zeitpunkt als Leitungswasser den Übergang der Bakterien in das VBNC-Stadium vermittelt. Um grobe Verunreinigungen zu vermeiden, wurden die Mikrokosmen zunächst über einen Faltenfilter gereinigt. Ein Ansatz wurde daraufhin sterilfiltriert, um Schwebeteilchen und Fremdbewuchs unter Beibehaltung der nativen Struktur gelöster Stoffe zu entfernen. In einem weiteren Ansatz wurde das Mainwasser bei fortdauernder Präsenz von Schwebstoffen und kristalliner Substanzen autoklaviert.

Wie Abbildung 35a veranschaulicht, ist unabhängig vom *Legionella*-Stamm eine lang anhaltende Persistenz in sterilfiltriertem Mainwasser möglich. Die Ergebnisse decken sich mit denen einer Inkubation dieser Stämme in sterilfiltriertem Leitungswasser. Die Bestimmung der Lebendzellzahl mittels LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Leiden, NL) (Abb. 35b) verdeutlicht, daß trotz beginnender Abnahme der Kultivierbarkeit nach 40 Tagen bei *L. pneumophila* Corby KH1 bzw. nach 80 Tagen bei *L. pneumophila* RIGP die Lebensfähigkeit der Bakterien auf hohem Niveau erhalten bleibt.

Als besonders ausdauernd ist der Stamm JR32-1 anzusehen: über den gesamten Verlauf des Versuchs findet keine Abnahme der Kultivierbarkeit statt.

In autoklaviertem Mainwasser ist hingegen bei den Stämmen *L. pneumophila* RIGP, JR32-2 und Corby KH1 eine drastische Abnahme der CFU-Werte innerhalb von ca. 30 Tagen zu beobachten. In Analogie zum Verhalten in sterilfiltriertem Flußwasser ist auch hier für *L. pneumophila* JR32-1 ein sehr gutes Persistenzvermögen festzustellen. Nach 120 Tagen betrug die Abnahme der Kultivierbarkeit nur eine halbe log-Stufe (Abb. 36).

Aufgrund der Präsenz kristalliner Substanzen im Wasser war eine Auswertung der Lebendzellzahl nicht möglich; die Hintergrundfluoreszenz war zu groß.

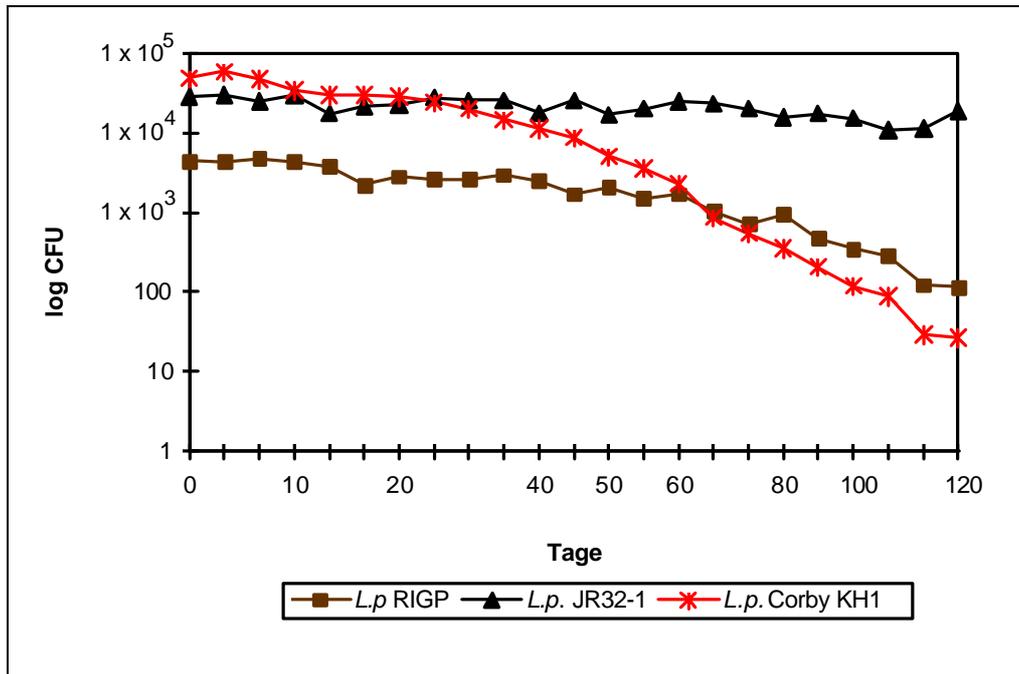


Abb. 35a) Persistenz von *L. pneumophila* in sterilfiltrierten Mainwasser-Mikrokosmen

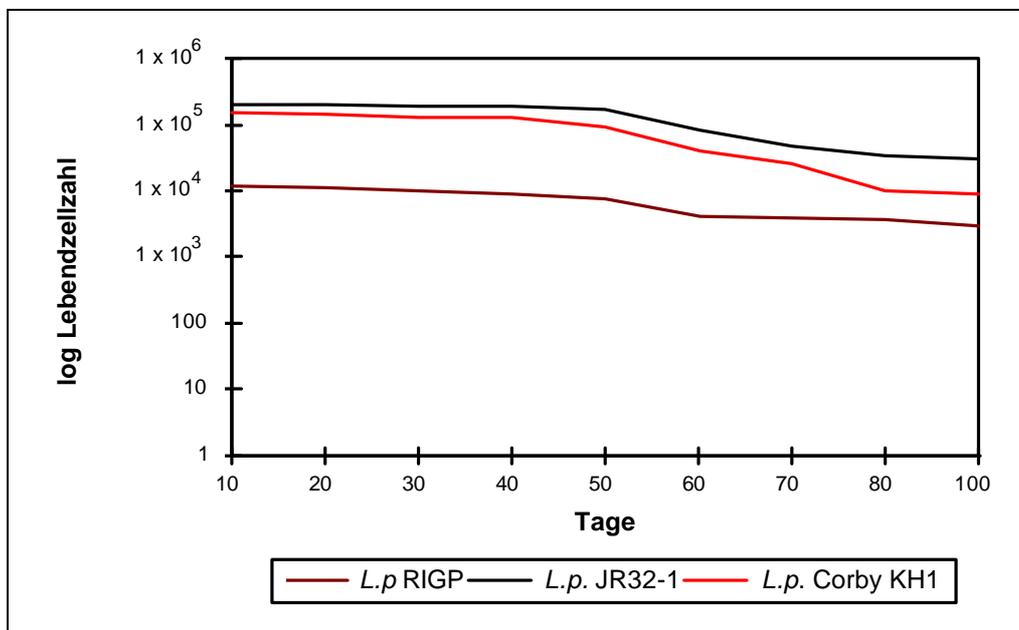


Abb. 35b) Lebendzellzahl von *L. pneumophila* in sterilfiltriertem Mainwasser. Die Zellzahl wurde mittels LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Leiden, NL) ermittelt.

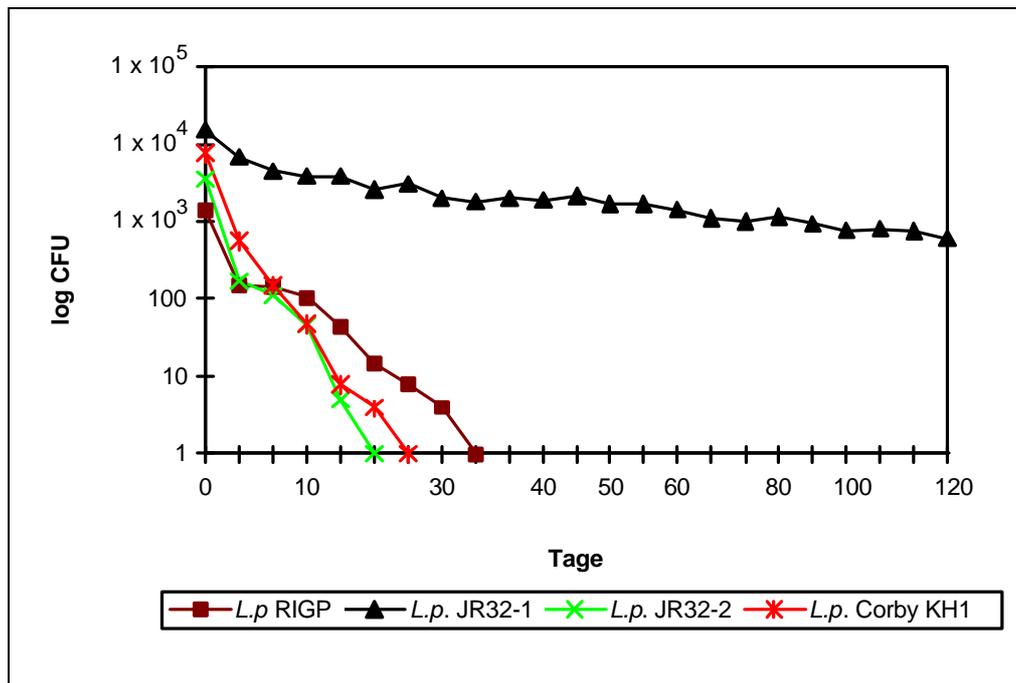


Abb. 36) Verlust der Kultivierbarkeit von *L. pneumophila* in autoklavierten Mainwasser-Mikrokosmen

2.4.3. Identifizierung von *L. pneumophila* VBNC-Stadien durch *in situ*-Hybridisierung

Der Übergang zum VBNC-Stadium wurde für *Legionella* zudem durch 16 S rRNA-Hybridisierungen mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden (LEG705) dokumentiert. Zum Zeitpunkt der Inokulation der Bakterien in sterilem Leitungswasser ist die metabolische Aktivität anhand der starken Fluoreszenz ersichtlich (Abb. 37a - 40a). Nach Eintritt in das Ruhestadium nimmt diese vermutlich aufgrund der Reduktion des rRNA-Gehalts in den Zellen ab. Kurz vor Reaktivierung können noch ca. 20 - 30 % der Legionellen detektiert werden (Abb. 37b - 40b).

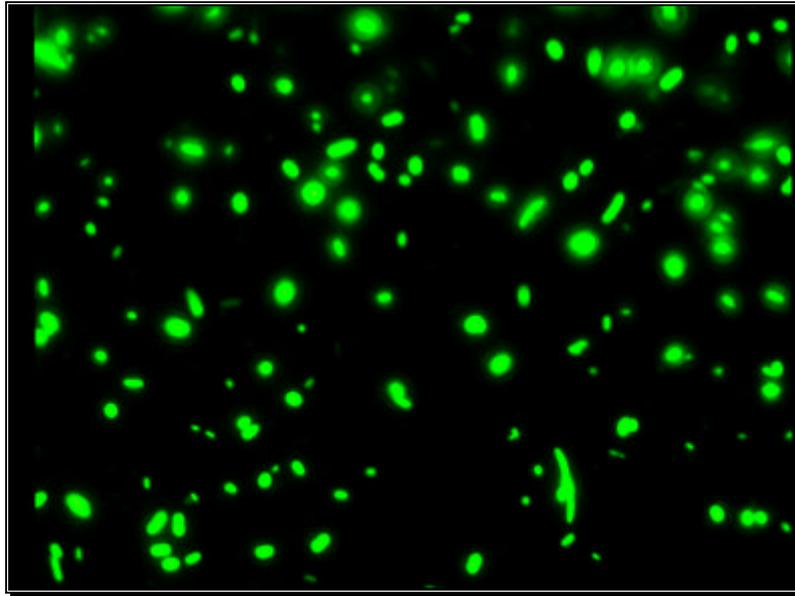


Abb. 37a) *In situ*-Hybridisierung von *L. pneumophila* JR 32 mit 16 S rRNA-Oligonukleotidsonde (LEG705) zum Zeitpunkt der Inokulierung der Zellen in sterilem Leitungswasser.

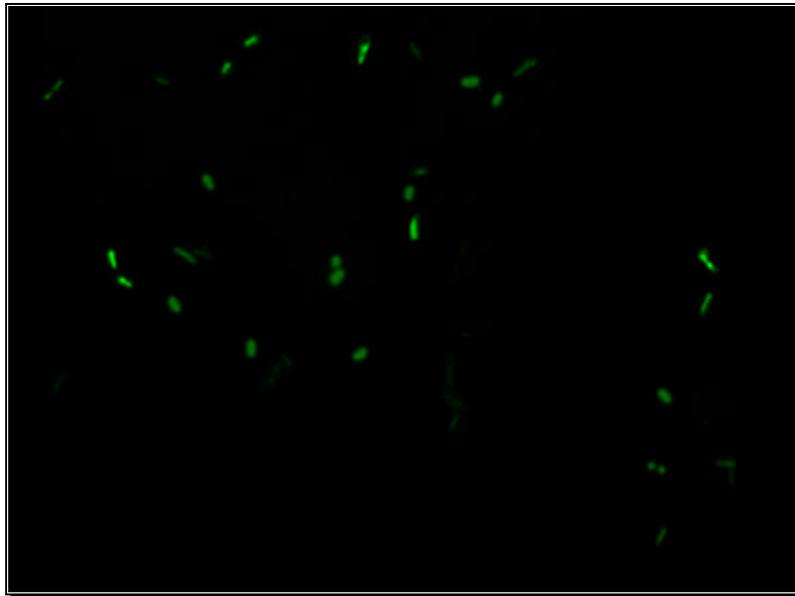


Abb. 37b) *In situ*-Hybridisierung von VBNC-Stadien von *L. pneumophila* JR 32 mit 16 S rRNA-Oligonukleotidsonde (LEG705) nach 200 Tagen Inokulierung der Zellen in sterilem Leitungswasser.

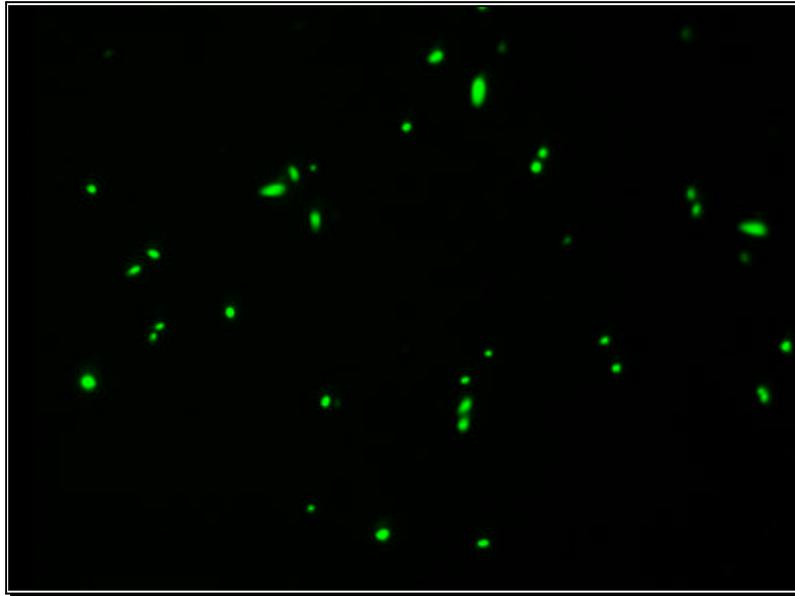


Abb. 38a) *In situ*-Hybridisierung von *L. pneumophila* JR 32-1 mit 16 S rRNA-Oligonukleotidsonde (LEG705) zum Zeitpunkt der Inokulierung der Zellen in sterilem Leitungswasser.

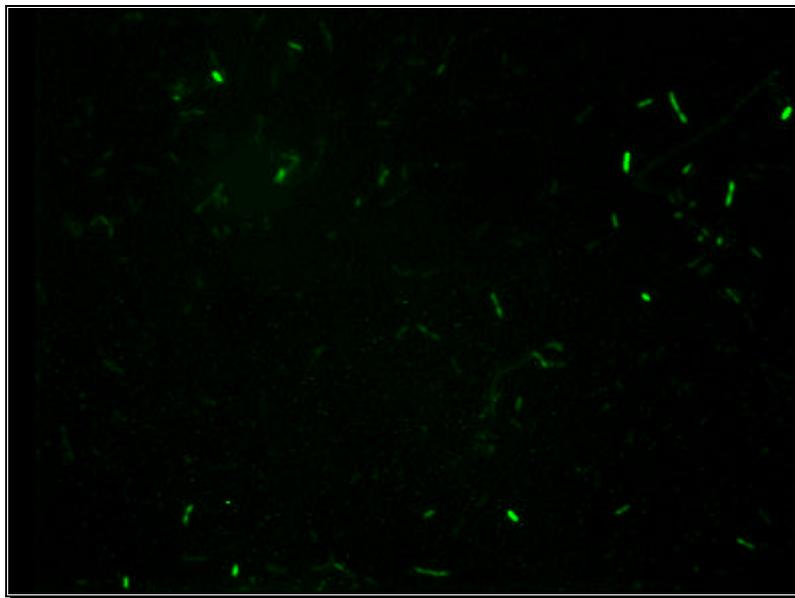


Abb. 38b) *In situ*-Hybridisierung von VBNC-Stadien von *L. pneumophila* JR 32-1 mit 16 S rRNA-Oligonukleotidsonde (LEG705) nach 200 Tagen Inokulierung der Zellen in sterilem Leitungswasser.

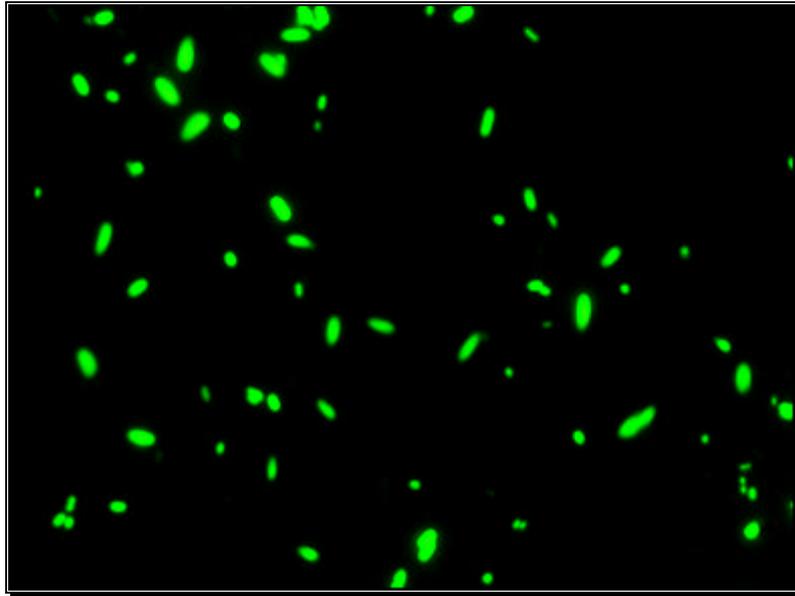


Abb. 39a) *In situ*-Hybridisierung von *L. pneumophila* JR 32-2 mit 16 S rRNA-Oligonukleotidsonde (LEG705) zum Zeitpunkt der Inokulierung der Zellen in sterilem Leitungswasser.

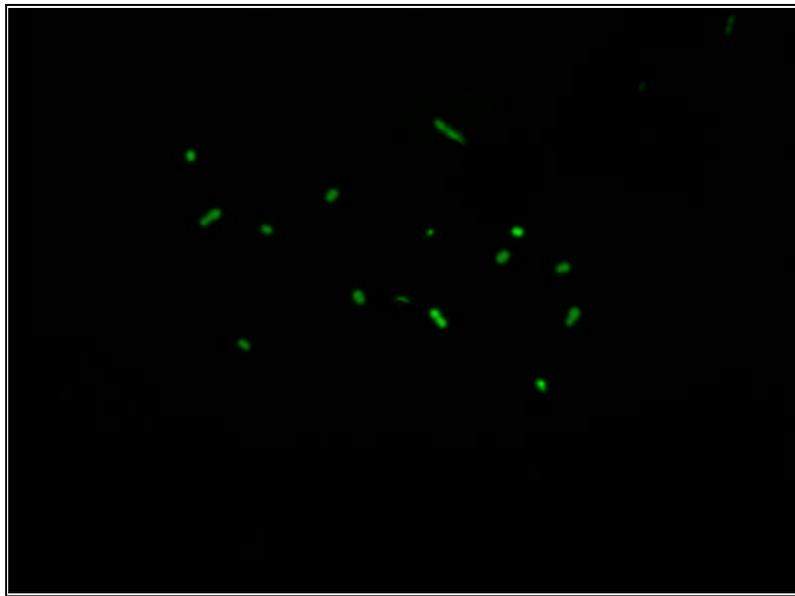


Abb. 39b) *In situ*-Hybridisierung von VBNC-Stadien von *L. pneumophila* JR 32-2 mit 16 S rRNA-Oligonukleotidsonde (LEG705) nach 100 Tagen Inokulierung der Zellen in sterilem Leitungswasser.

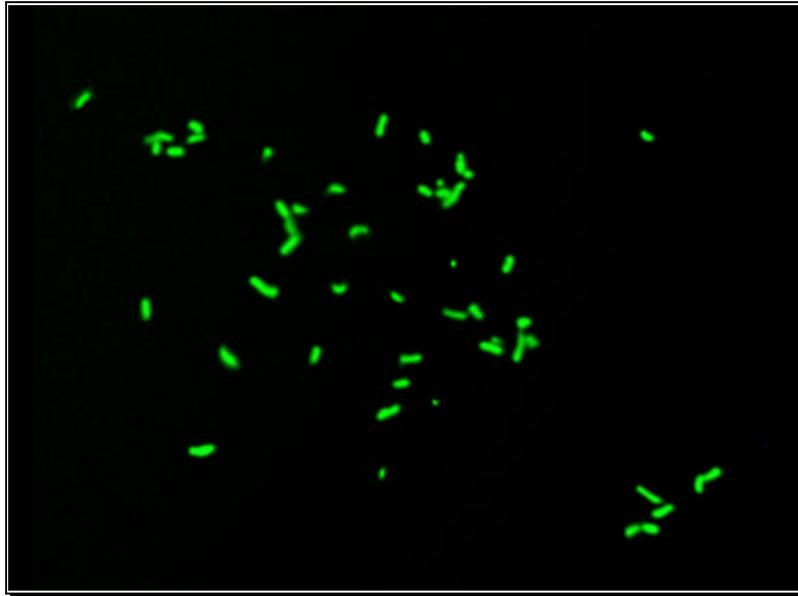


Abb. 40a) *In situ*-Hybridisierung von *L. pneumophila* Corby KH1 mit 16 S rRNA-Oligonukleotidsonde (LEG705) zum Zeitpunkt der Inokulierung der Zellen in sterilem Leitungswasser.

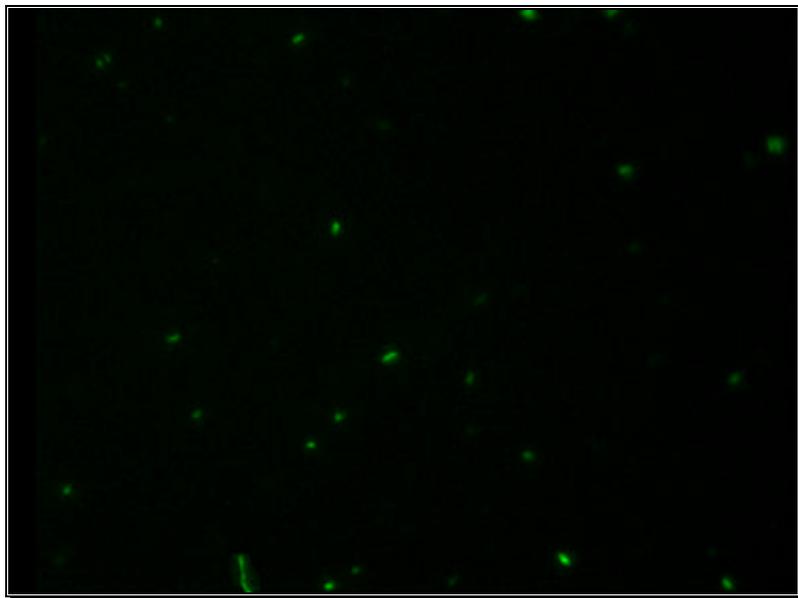


Abb. 40b) *In situ*-Hybridisierung von VBNC-Stadien von *L. pneumophila* Corby KH1 mit 16 S rRNA-Oligonukleotidsonde (LEG705) nach 200 Tagen Inokulierung der Zellen in sterilem Leitungswasser.

2.4.4. Persistenz von *E. coli* in PBS

Die Persistenzstudien in verschiedenen Flüssigmedien wurden neben *L. pneumophila* auch mit *E. coli* durchgeführt. Dabei sollte ermittelt werden, wie lange die verschiedenen *E. coli* - Stämme zu persistieren vermögen, und ob eine Kapazität zum Übergang ins VBNC-Stadium vorhanden ist. Für die Studien wurden die genomischen Integrationsmutanten *E. coli* WM 2269-1 (*lly*-Integration) und AAEC 160-1 (*mip*-Integration) (siehe Abschnitte IV.1.5. und IV:1.6.) eingesetzt. Als Kontrollen dienten der Laborstamm *E. coli* DH5 α und die beiden EHEC-Stämme O157 : H7 st.933 und st.86-24. Da *E. coli* in reinem Leitungswasser zu schnell abstirbt, wurde als Medium PBS eingesetzt.

Wie aus Abbildung 41a ersichtlich, war für alle *E. coli* - Stämme eine lang anhaltende Persistenz zu beobachten. Insbesondere die beiden EHEC-Stämme vermochten zu persistieren, wobei sich die ermittelten Zellzahlen über einen Zeitraum von 130 Tagen nicht verringerten. Das Kultivierungsvermögen von *E. coli* DH5 α und den genomischen Integrationsmutanten WM 2269-1 und AAEC 160-1 nahm hingegen ab Tag 55 kontinuierlich ab. Nach 130 Tagen Inkubation in PBS reduzierten sich die CFU-Werte um den log-Faktor 3.

Die mittels LIVE/DEAD BacLightTM Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Leiden, NL) ermittelte Lebendzellzahl für diesen Ansatz zeigt auf, daß in Bezug auf die EHEC-Stämme nach 110 Tagen die lebensfähigen Zellen auch kultivierbar waren (Abb. 41b). Die Zellzahl der noch kultivierbaren Bakterien der Stämme *E. coli* DH5 α , WM 2269-1 und AAEC 160-1 war während des Verlaufs der Studie zwar abnehmend, es konnte aber durch die Fluoreszenzfärbungen gezeigt werden, daß die nicht kultivierbaren Zellen auch weiterhin lebensfähig waren. So betrug die Diskrepanz zwischen Lebendzellzahl und ermitteltem CFU-Wert für *E. coli* WM 2269-1 nach 110 Tagen eine log-Sufe, für den Stamm AAEC 160-1 bereits zwei und für *E. coli* DH5 α sogar 2,5 log-Stufen.

Die Studie zur Persistenz von *E. coli* in PBS konnte damit aufzeigen, daß die Stämme DH5 α , WM 2269-1 und AAEC 160-1 nach ca. 55 Tagen in das VBNC-Stadium übergangen.

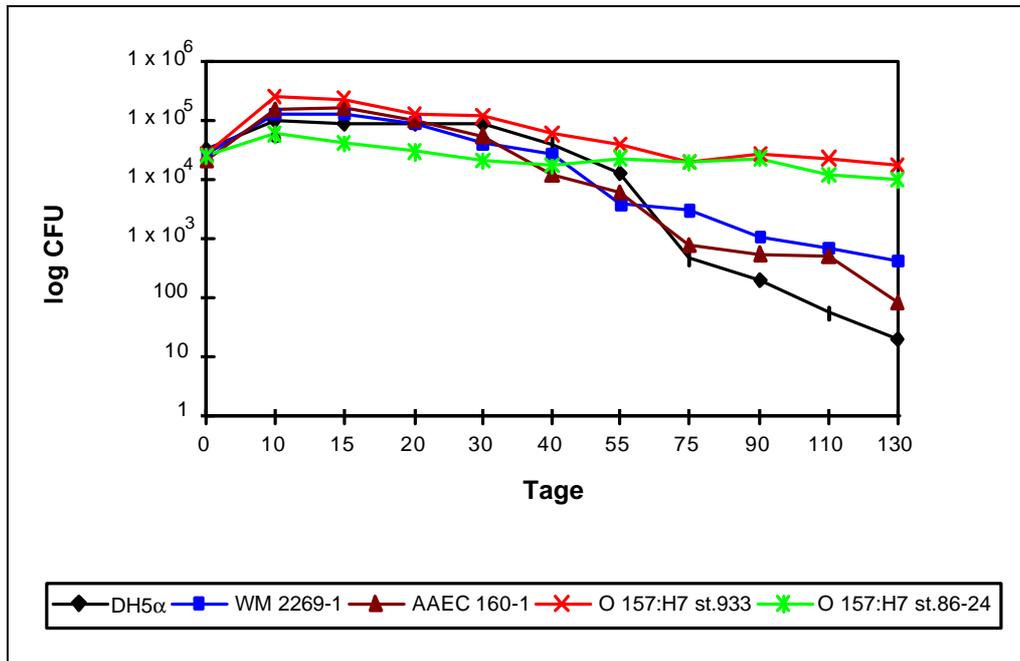


Abb. 41a) Persistenz von verschiedenen *E. coli* - Stämmen in PBS

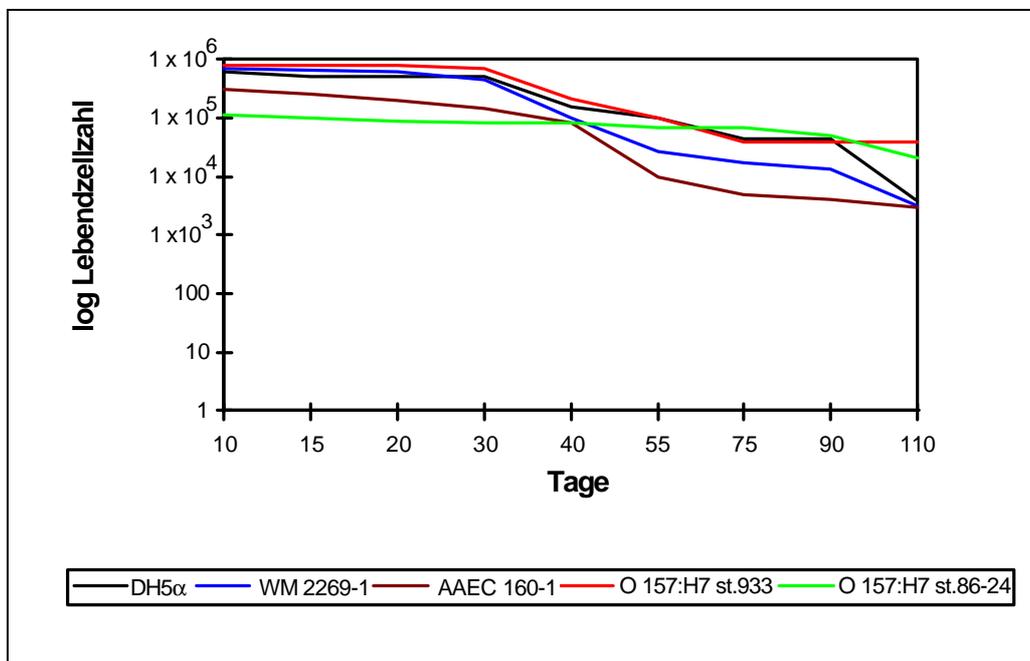


Abb. 41b) Lebendzellzahl von verschiedenen *E. coli* - Stämmen in PBS. Die Zellzahl wurde mittels LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Leiden, NL) ermittelt.

2.4.5. Persistenz von *E. coli* in Mainwasser-Mikrokosmen

In Analogie zu den Persistenzstudien mit *Legionella* wurden auch die *E. coli* - Stämme in Mainwasser-Mikrokosmen auf ihr Persistenzvermögen getestet. Dies hat insbesondere für EHEC-Stämme einige Relevanz, da die Konzentration von *E. coli* in Süßwasser mit dem Grad einer Fäkalkontamination korreliert.

Werden die Stämme bei Raumtemperatur in sterilfiltriertem Mainwasser inokuliert (Abb. 42a), so findet in einem Zeitraum von 140 Tagen eine kontinuierliche Reduktion der Kultivierbarkeit statt. Mit Ausnahme des EHEC-Stammes O157 : H7 st.933 konnten von anfänglich durchschnittlich 1×10^4 Zellen / ml gegen Versuchsende keine CFU-Werte mehr ermittelt werden. Der Stamm O157 : H7 st.933 vermochte etwas besser zu persistieren; erst nach 85 Tagen erfolgte eine Abnahme der kultivierbaren Zellen. Nach weiteren 55 Tagen erfolgte eine Reduktion um zwei log-Stufen und entsprach damit einer vergleichbaren Reduktionsrate in Bezug auf die anderen Stämme.

Auch hier zeigt ein Vergleich mit der ermittelten Lebendzellzahl durch Fluoreszenzfärbungen (LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability Kit, Molecular Probes), daß trotz Abnahme der kultivierbaren Zellen lebensfähige Bakterien in hohem Maße erhalten blieben (siehe Abb. 42b). In autoklavierten Flußwasser-Mikrokosmen (Abb. 43) war über den gesamten beobachteten Zeitraum von 110 Tagen eine gleichbleibende Persistenz der eingesetzten *E. coli* - Stämme auf hohem Niveau festzustellen.

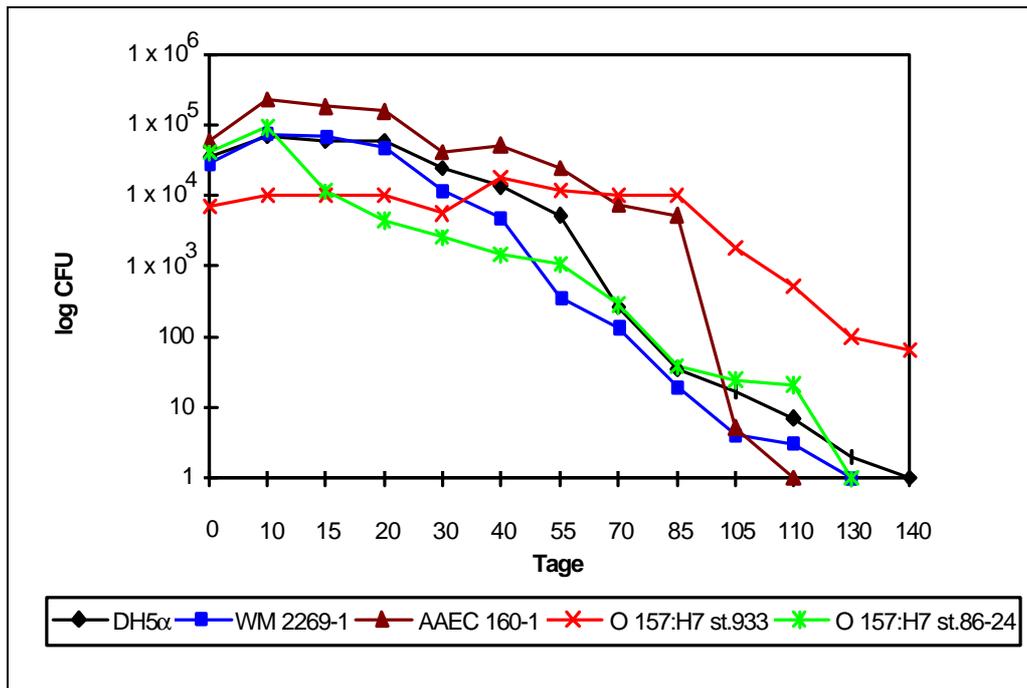


Abb. 42a) Verlust der Kultivierbarkeit von verschiedenen *E. coli* - Stämmen in sterilfiltrierten Mainwasser-Mikrokosmen

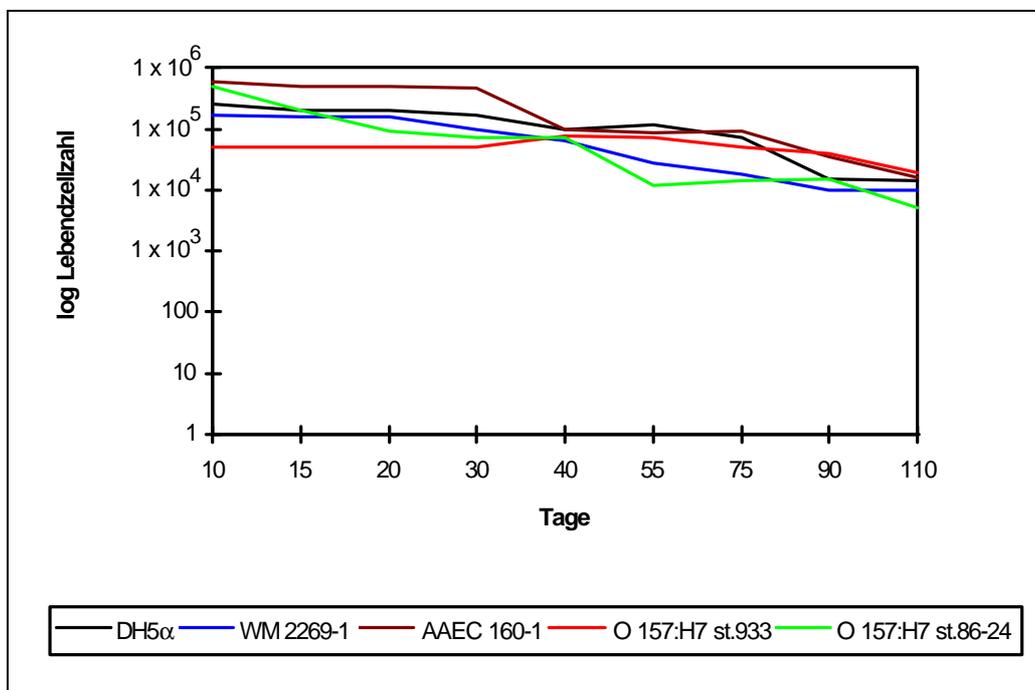


Abb. 42b) Lebendzellzahl von *E. coli* in sterilfiltriertem Mainwasser. Die Zellzahl wurde mittels LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Leiden, NL) ermittelt.

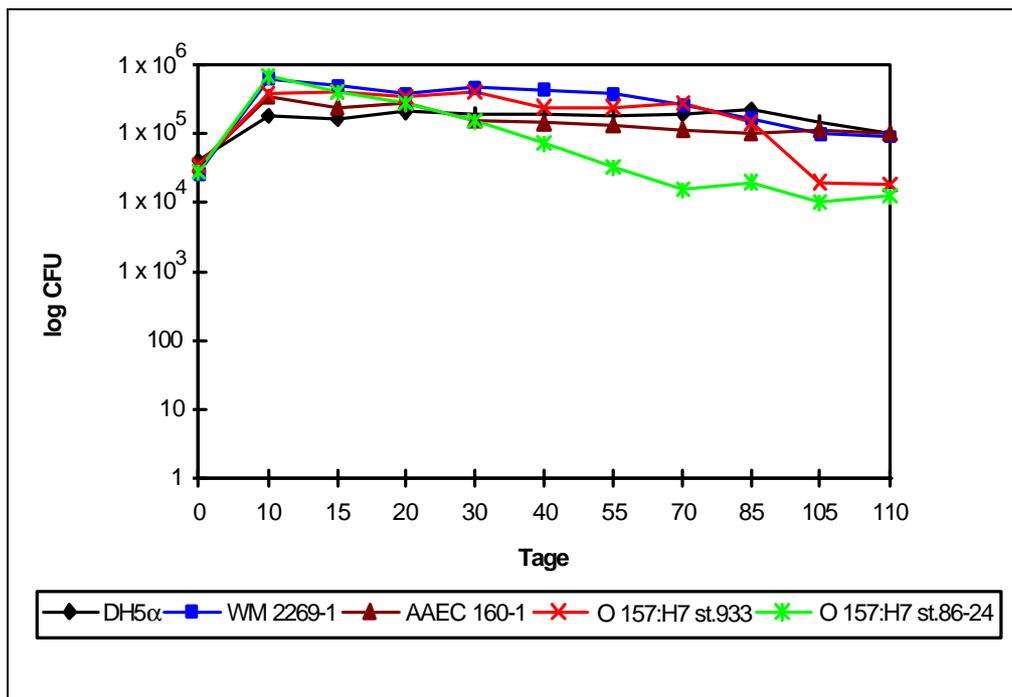


Abb. 43) Persistenz von verschiedenen *E. coli* - Stämmen in autoklavierten Mainwasser-Mikrokosmen

2.5. Reaktivierung von *L. pneumophila* aus dem VBNC-Stadium

Die Reaktivierung der VBNC-Ruhestadien von *L. pneumophila* erfolgte durch Cokultivierung mit axenisch gewachsenen *A. castellanii*-Kulturen. Hierzu wurden 10^5 Amoeben mit 1 ml aus den VBNC-Mikrokosmen inokuliert und täglich die CFU-Rate ermittelt (Abb. 44).

Bereits nach 1 Tag Coinkubation konnten Legionellen wieder kultiviert werden. Die exponentiell ansteigende Zellzahl der Bakterien nach 3 - 5 Tagen Coinkubation mit *Acanthamoeba* ist dabei auf die intrazelluläre Vermehrung der Legionellen zurückzuführen. Es zeigte sich, daß das Virulenz-Potential von den beiden Philadelphia I -Derivaten JR32 und RIGP am stärksten ist. So waren bereits nach zwei Tagen Inkubationsdauer CFU-Werte von 1×10^4 /ml zu beobachten. Diese Zellzahlen entsprachen jenen zum Zeitpunkt der Animpfung der Mikrokosmen. Nach einem weiteren Tag der Cokultivierung mit *Acanthamoeba* stieg die Vermehrungsrate dann um 3 log-Stufen auf 1×10^7 /ml.

Die Reaktivierung von *L. pneumophila* JR32-1 (*lly*-negativ) und JR32-2 (*mip*-negativ) fand hingegen deutlich zeitverzögert statt. Erst nach fünf Tagen wurden die Zellzahlen vom Zeitpunkt der Animpfung dieser Mikrokosmen überschritten.

Die Flagellin-Mutante *L. pneumophila* Corby KH1 ließ sich dagegen im gleichen Zeitmaß reaktivieren, wie die Stämme JR32 und RIGP. Bereits nach zwei Tagen konnten in Bezug auf *L. pneumophila* JR32 und RIGP vergleichbare Zellzahlen ermittelt werden. Diese wurden im weiteren Verlauf der Infektion jedoch nicht nennenswert erhöht.

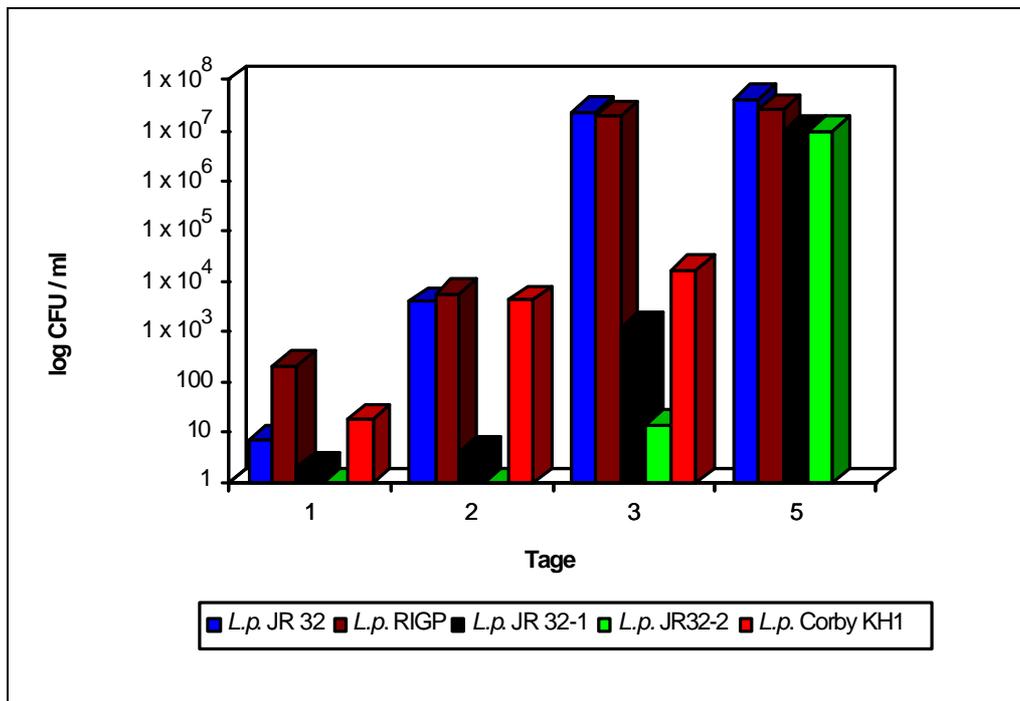


Abb. 44) Reaktivierung von nichtkultivierbaren *L. pneumophila* - Zellen (VBNC) durch Coinkubation mit *A. castellanii*. 10^5 Amöben wurden mit 1 ml aus bis zu 200 Tage alten Leitungswasser-Mikrokosmen inokuliert. Nach 1, 2, 3, 5 Tagen wurden die CFU-Werte auf BCYE-Agar ermittelt.