

## 2. Einleitung

Das erstmals 1977 beschriebene humanpathogene Bakterium *Legionella pneumophila* (McDade *et al.* 1977) kann durch Aerosole übertragen in die Lunge gelangen und zur Entstehung schwerer Pneumonien führen. Die Pathogenität der Legionellen beruht primär auf ihrer Fähigkeit, sich intrazellulär in Alveolarmakrophagen zu vermehren. In der Umwelt sind sie als Parasiten in ihren „natürlichen“ Wirten, den Protozoen, zu finden. Dieses duale Wirtssystem macht *Legionella* zu einem besonders interessanten Modellorganismus als ubiquitärer Umweltkeim und pathogenes Agens.

### 2.1 *Legionella pneumophila* – Umweltkeim und pathogenes Agens

Legionellen sind stäbchenförmige, unipolar begeißelte Gram-negative Bakterien mit einer Länge von 1.5 – 5 µm und einem Durchmesser von 0.3 – 0.9 µm. Sie sind fakultativ intrazellulär und vorwiegend in aquatischen Habitaten zu finden, hier meist in Assoziation mit Protozoen, wie *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Hartmanella* und *Tetrahymena* (Brand & Hacker, 1997). Für die Detektion von Legionellen in der Umwelt hat sich die *in situ* Hybrisierung als Methode der Wahl herausgestellt (Grimm *et al.*, 1998). In den vom Menschen geschaffenen künstlichen Warmwassersystemen wie Klimaanlage, Whirlpools, Luftbefeuchtern oder Duschen (30-50°C) finden Legionellen optimale Lebensbedingungen. Mit Hilfe dieser „technischen Vektoren“ kann eine Übertragung erregerrhaltiger Aerosole durch Mikroaspiration auf den Menschen erfolgen. Damit zählen die Legionellen zur Gruppe der Erreger der „diseases of human progress“ (Hacker, 2000). Eine Übertragung von Mensch zu Mensch wurde bisher nicht beschrieben.

Die Fähigkeit der Legionellen, sich intrazellulär in professionellen Phagozyten zu vermehren, ist die zentrale Voraussetzung für die Etablierung einer *Legionella*-Infektion. Neben Alveolarmakrophagen, Blutmonozyten und polymorphkernigen Leukozyten können auch Epithelzellen des Typs I und II als nicht-professionell phagozytierende Zellen für die intrazelluläre Replikation der Legionellen dienen (Abu Kwaik, 2000). Nach Übertragung *Legionella*-haltiger Aerosole werden entweder eine *Legionella*-Pneumonie („Legionärskrankheit“) oder ein selbstlimitierender respiratorischer Infekt, das Pontiac-Fieber, beobachtet. Nach Schätzungen treten jährlich in Deutschland 8000-12000 und in den USA ca. 25000 durch *Legionella* verursachte Pneumonien auf (Abu Kwaik, 2000). Die Inkubationszeit

beträgt 2-10 Tage und die Krankheit manifestiert sich durch plötzlich einsetzendes Fieber (über 40°C), Husten, Schüttelfrost, Kopfschmerzen und eine Pneumonie (Lück & Helbig, 1997; Susa *et al.*, 1997). Bei Nichtbehandlung verlaufen ca. 10-25 % der Legionellosen in Abhängigkeit des Immunstatus letal. Zur Therapie werden hauptsächlich membrangängige Antibiotika wie Erythromycin, Rifampicin und Ciprofloxacin verwendet (Brand & Hacker, 1997).

Die taxonomische Einteilung der *Legionellaceae* unterscheidet 42 Spezies mit insgesamt 65 Serogruppen (Lück & Helbig, 1997). Von den 42 Spezies wurden mindestens 16 als humanpathogen eingestuft. Neben *Legionella pneumophila* Serogruppe 1, welche bei ca. 90 % der manifest verlaufenden Legionellosen als Ursache identifiziert wird, finden sich *L. micdadei*, *L. bozemanii* und *L. longbeachae* als die häufigsten Verursacher einer solchen atypisch verlaufenden Pneumonie (Atlas *et al.*, 1999).

## 2.2 Intrazelluläre Vermehrung von Legionellen in professionellen Phagozyten

Die Aufnahme von *Legionella* in Makrophagen und Monozyten erfolgt entweder durch die sogenannte „coiling“-Phagozytose oder über konventionelle Phagozytose (Horwitz, 1984). Voraussetzung für die Aufnahme in Makrophagen ist die initiale Bindung des *Legionella* MOMP („major outer membrane protein“) an die eukaryotischen Komplementfaktoren C3b und C3bi. Der MOMP-C3b/C3bi-Komplex bindet dabei an die Komplementrezeptoren CR1 und CR3 auf der Makrophagenoberfläche, und das Bakterium wird nachfolgend durch eine Mikrofilament-abhängige Phagozytose internalisiert (Payne & Horwitz 1987; Bellinger-Kawahara & Horwitz, 1990; King *et al.*, 1991). Alternativ zur Komplement-abhängigen Internalisierung in Makrophagen wurden die Aufnahme von Antikörper-opsonierten Legionellen über die F<sub>C</sub>-Rezeptoren und eine Komplement-unabhängige Aufnahme beschrieben (Husmann, 1992; Stone & Abu Kwaiq, 1998).

Nach erfolgter Phagozytose befinden sich die Bakterien in einem Membran-umschlossenen Phagosom (Horwitz & Maxfield, 1984). Sie verhindern die Fusion des Phagosoms mit Lysosomen und reduzieren sowohl die phagosomale Ansäuerung als auch den „oxidative burst“, die Bildung bakteriozider Sauerstoffradikale im Makrophagen (Horwitz, 1983; Horwitz & Maxfield, 1984; Fields, 1996; Roy, 1999). Clemens und Horwitz konnten eine Modulation der Zusammensetzung der Phagosomenmembran während bzw. nach der Phagozytose und der darin befindlichen MHC I und II-Moleküle (major histocompatibility complex) beobachten (Clemens & Horwitz, 1992, 1993). Die dafür verantwortlichen Faktoren sind weitgehend unbekannt. Während der ersten 2 Stunden der Infektion kommt es zur Assoziation des Phagosoms mit dem

rauen endoplasmatischen Retikulum (RER) und zu einer Rekrutierung von Zellorganellen wie glatten Vesikeln, Ribosomen und Mitochondrien, was zur Ausbildung des sogenannten replikativen Phagosoms führt (Swanson & Isberg, 1995; Bouze & Johnson, 1996). Hierbei scheint das RER aber keine Bedeutung als Proteinquelle für die Bakterien zu haben. Für den Stamm *L. micdadei* konnte in allen untersuchten Zelltypen, Makrophagen, Epithelzellen und Protozoen, nie eine Assoziation mit dem RER nachgewiesen werden (Abu Kwaik, 1998c; Abu Kwaik, 2000).

Nach einer lag-Phase von 3-6 h beginnen sich die Bakterien mit einer Generationszeit von ca. 2 h intrazellulär zu vermehren. Eine solche lag-Phase kann durch die Rekrutierung von Wirtszell-Organellen oder auch durch eine nötige Anpassung der Legionellen an das intrazelluläre Milieu begründet sein (Shuman, 1998; Abu Kwaik, 1998a). Letztlich kommt es nach ca. 24 h zur Lyse der Wirtszelle (Horwitz, 1988; Shuman, 1998). Diese kann rein physikalisch durch die zum Ende der intrazellulären Vermehrung einsetzende starke Motilität der Legionellen („phenotypical switch“) verursacht sein (Rowbothom, 1986; Byrne & Swanson, 1998). Darüber hinaus lassen sich cytotoxische Effekte durch die Anhäufung von Stoffwechselprodukten (z.B.  $\text{NH}_3$  aus Aminosäurestoffwechsel) oder durch die Sekretion eines bislang hypothetischen Cytotoxins bzw. LPS nachweisen (Rowbothom, 1986; Shuman, 1998).

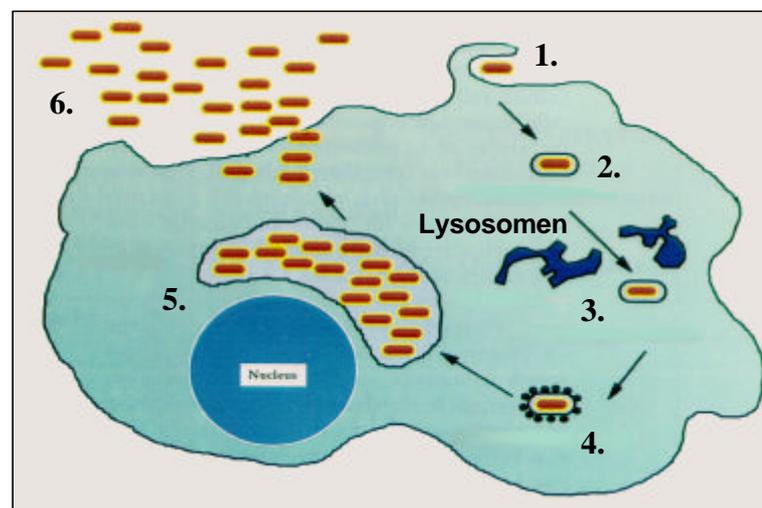


Abb.1): Lebenszyklus von *Legionella pneumophila* in einer phagozytierenden Zelle. 1. Aufnahme durch Phagozytose („coiling“ oder konventionell), 2. Phagosomen-Ansäuerung und „oxidative burst“ werden verhindert, 3. Keine Fusion mit Lysosomen, 4. Assoziation mit RER, 5. Intrazelluläre Vermehrung innerhalb eines replikativen Phagosoms, 6. Wirtszelllyse und Neuinfektion weiterer Zellen (modifiziert nach Roy, 1999).

Zusätzlich zu den schon beschriebenen Phänomenen konnte kürzlich gezeigt werden, dass Legionellen in der Lage sind, in den Makrophagen-ähnlichen Zelllinien HL60 und U937 sowie in peripheren Blutmonozyten und alveolaren Epithelzellen Apoptose zu induzieren (Müller *et al.*, 1996; Hägele *et al.*, 1998; Abu Kwaik, 1998b). Auch vitale, extrazellulär vorliegende Legionellen können Apoptose induzieren. Aufgrund dieser Beobachtungen postulierten Gao und Abu Kwaik, dass die apoptotischen Effekte in den Wirtszellen durch einen Kontakt-vermittelten Export von bakteriellen Faktoren ausgelöst werden (Gao & Abu Kwaik, 1999a,b, 2000). Dies hat die Aktivierung der Signaltransduktionskaskade, insbesondere die Aktivierung von Caspase 3 zur Folge, wodurch der programmierte Zelltod der Wirtszelle ausgelöst wird.

### 2.3 Intrazelluläre Vermehrung von Legionellen in Protozoen

Die intrazelluläre Replikation von *Legionella* in Protozoen ist entscheidend für ihre Persistenz in der Umwelt und vermittelt gleichzeitig einen Schutz gegenüber Dekontaminationsmaßnahmen. Legionellen, die sich in einem VBNC (viable bt non culturable)-Stadium befinden, können durch die Passage in Amöben wieder aktiviert und so zur Infektionsquelle für den Menschen werden (Fields, 1996; Steinert *et al.*, 1997).

Durch Ultrastrukturanalyse mittels Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass der Lebenszyklus der Legionellen innerhalb von humanen phagozytierenden Zellen und Protozoen sehr ähnlich verläuft (Abu Kwaik, 1996; Gao *et al.*, 1997; Harb *et al.*, 1998). Auch in Protozoen kommt es nach erfolgter Phagozytose („coiling“ oder konventionell) zur Veränderungen des phago-lysosomalen Wegs. Durch die Umgestaltung des Phagosoms in ein replikatives Phagosom werden die Bedingungen für eine intrazelluläre Vermehrung innerhalb der Protozoen geschaffen (Abu Kwaik, 1996). Diese Strategie der Verhinderung der Fusion von Phagosom und Lysosomen wird auch von anderen Pathogenen wie *Chlamydia psittaci*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhimurium* und *Toxoplasma gondii* angewandt (Finlay & Falkow, 1997). Im Gegensatz dazu entkommen *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Rickettsia* oder auch der eukaryotische Parasit *Trypanosoma cruzii* der Vakuole und liegen dann frei im Cytoplasma der Zellen vor (Finlay & Falkow, 1997). Der obligat intrazelluläre Erreger des Q-Fiebers *Coxiella burnetii* repliziert sogar in dem angesäuerten Phagolysosom der Wirtszelle (Baca & Paretsky, 1983).

Die von humanen Zellen und Protozoen verwendeten Aufnahmemechanismen für Legionellen unterscheiden sich jedoch grundlegend (King, 1991; Abu Kwaik *et al.*, 1994). Im Gegensatz zu Makrophagen, deren Phagozytose sich durch Inhibitoren wie Cytochalasin D hemmen lässt, kann für Protozoen eine Beteiligung Mikrofilament- und Mikrotubuli-abhängiger

Phagozytoseleistungen nicht nachgewiesen werden (King *et al.*, 1991; Harb *et al.*, 1998). Die initiale Interaktion zwischen Parasit und Wirtszelle, die einen adhäsiven Charakter besitzt, wird durch bakterielle Liganden und Rezeptoren auf der Wirtszelloberfläche bewerkstelligt. Für *L. pneumophila* konnten Typ IV-Pili (CAP, competence and adherence associated pili) identifiziert werden, die an der Aufnahme in Protozoen beteiligt sind (Stone & Abu Kwaik, 1998).

Für die Aufnahme von *L. pneumophila* in den Protozoenwirt *Hartmannella vermiformis* konnte ein spezifischer Rezeptor identifiziert werden, der ein durch Galaktose/N-Acetylgalaktose (Gal/GalNAc) inhibierbares Lektin darstellt. Dieses Lektin wird neben anderen Proteinen während der Interaktion von *Legionella* und Wirt (Liganden-Bindung) an einem Tyrosylrest dephosphoryliert und weist Homologien zu dem  $\beta$ 2-Integrin-ähnlichen 170 kDa Protein des pathogenen Protozoen *Entamoeba histolytica* auf (Venkataraman *et al.*, 1997). Durch die Phosphorylierung solcher Integrine werden multiple Veränderungen im Zytoskelett der Wirtszelle induziert (Finlay & Cossart, 1997; Abu Kwaik, 1998a). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass durch die Invasion von Legionellen in Protozoen die Expression bzw. Repression verschiedener Wirtsproteine induziert wird (Abu Kwaik *et al.*, 1994; Abu Kwaik & Pederson, 1996; Abu Kwaik, 1998d). Inhibitionsstudien mit Cycloheximid konnten zeigen, dass für die Rezeptor-vermittelte Endozytose in *Hartmannella vermiformis*, nicht aber in *Acanthamoeba polyphaga*, eine intakte Proteinbiosynthese notwendig ist (Abu Kwaik *et al.*, 1994; Harb *et al.*, 1998). Die Inhibierung der Phagozytose durch Zugabe von Galaktose oder N-Acetylgalaktose, sowie eine Dephosphorylierung des 170 kDa Lektins konnten für *Acanthamoeba polyphaga* nicht beobachtet werden (Harb *et al.*, 1998). Diese Heterogenität innerhalb der Aufnahmemechanismen steht für eine erstaunliche Adaptation von *L. pneumophila* an verschiedene Protozoenwirte.

Die Ähnlichkeiten während der Infektion von Makrophagen und Protozoen mit *L. pneumophila* unterstützen die These, dass eine Anpassung des Bakteriums an die intrazelluläre Umwelt der Protozoen die Grundlage für eine erfolgreiche intrazelluläre Vermehrung innerhalb humaner Alveolarmakrophagen darstellt und in Folge dessen *L. pneumophila* zu einem humanpathogenen Erreger wurde (Abu Kwaik, 1996; Gao *et al.* 1997).

## 2.4 Virulenzfaktoren von Legionellen

Zur Identifikation spezifischer Virulenz-Determinanten von *Legionella* und ihrer Korrelation mit Phasen des intrazellulären Infektionszyklus wurden verschiedene Methoden eingesetzt. In *E. coli* K12 angelegte Cosmid- und Expressionsgenbanken wurden nach Virulenz-assoziierten Genen bzw. Phänotypen durchsucht. Neben der Komplementation spontaner oder durch chemische Mutagenese auftretende Mutanten, die z.B. durch die Verwendung von NaCl oder EMS (Ethylmethylsulfonat) entstehen können, wurde die randomisierte Transposon-Mutagenese zur Erzeugung spezifischer Gendefekte eingesetzt (Wiater *et al.*, 1994; Arroyo *et al.*, 1994; Pope *et al.*, 1994; Heuner, 1994; Vogel *et al.*, 1996; Edelstein *et al.*, 1999; Cirillo *et al.*, 2000). *Legionella*-Mutanten, die eine spezifische singuläre Gendisruption besitzen, sind wertvolle „Werkzeuge“ bei der Aufklärung der für die intrazelluläre Lebensweise benötigten Gene (Brand & Hacker, 1997).

Hinsichtlich der Modulation von Wirtszellen durch Legionellen sind sekretierte putative Effektormoleküle von besonderem Interesse. Die 38 kDa große von *Legionella* sekretierte  $Zn^{2+}$ -Metalloprotease Msp (major secretory protein) besitzt proteolytische sowie hämolytische Aktivität (Dreyfus *et al.*, 1986, Quinn *et al.*, 1989). Tierexperimente im Meerschweinchen-Modell konnten jedoch keine direkte Virulenz-Beteiligung zeigen (Szeto & Shuman, 1990). Das von Hales und Shuman beschriebene Typ II-Sekretionssystem *lsp* (*l*egionella *s*ecretion *p*athway) scheint unter anderem die Sekretion von Msp zu vermitteln. Mutationen in dem als Operon organisierten System *lspFGHIJK* führten zu einer drastischen Reduktion der intrazellulären Vermehrung innerhalb von *Acanthamoeba castellanii* (Hales & Shuman, 1999b). Durch die Arbeiten von Liles *et al.* konnte die Existenz eines weiteren Typ II-Sekretionssystems für *Legionella* beschrieben werden (Liles *et al.*, 1998, 1999). Sie konnten zeigen, dass Proteinsekretion und Typ IV-Pilus-Biogenese über das als Operon organisierte *pilBCD* Sekretionssystem bewerkstelligt werden. Mutationen in dem beteiligten Gen (*pilD*) führten zu einer Reduzierung der intrazellulären Vermehrungsfähigkeit in humanen und Protozoen-Zelllinien sowie im Tiermodell (Liles *et al.*, 1999). Hierfür wird eine Veränderung des sekretierten Proteinmusters verantwortlich gemacht (Hales *et al.*, 1999; Aragon *et al.*, 2000). Die über dieses Typ II-Sekretionssystem sekretierte Phospholipase und die damit einhergehende Zerstörung membranassoziierter Phospholipide wird als ein wichtiger Virulenzfaktor von Pneumonie-auslösenden Pathogenen betrachtet. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass verschiedene *Legionella*-Spezies Phospholipase A-Aktivität sekretieren und diese zur

Zerstörung von Phospholipiden der Alveolar- bzw. Lungenoberfläche („surfactant“) und damit zur Desintegration der Zellen führt (Flieger *et al.*, 2000a,b).

Für das von *Legionella* sekretierten Legiolysin (*lly*) konnte keine Virulenz-Assoziation nachgewiesen werden, jedoch vermittelt es Schutz vor anhaltendem Lichtstress, der z.B. an Wasseroberflächen auftritt. Daher wird es als Fitneß-Faktor bezeichnet, der zum Überleben in der Umwelt beitragen kann (Wintermeyer *et al.*, 1991, 1994; Steinert *et al.*, 1995; Flügel, 1999).

Neben den oben vorgestellten sekretierten Proteinen werden besonders Oberflächenstrukturen als primäre Virulenzdeterminanten betrachtet (Dowling *et al.*, 1992). Für das *Legionella* LPS konnten für Gram-negative Bakterien strukturelle Besonderheiten im „core“- und Lipid A-Bereich festgestellt werden. Diese begründen sowohl die geringe Pyrogenität als auch die ausgesprochene Hydrophobizität des *Legionella* LPS. Letztere könnte bei der aerogenen Übertragung von Bedeutung sein (Zähringer *et al.*, 1995; Lück & Helbig, 1997). Darüber hinaus konnte eine Beteiligung des *Legionella* LPS an der Virulenz, basierend auf phasenvariabler Expression, sowohl in *in vitro* Assays als auch im Tiermodell nachgewiesen werden (Lüneberg *et al.*, 1998). Die Rolle des *Legionella* LPS während der Adhäsion an Zielzellen konnte bislang nicht ausreichend geklärt werden. Vor kurzem gelang es jedoch, an der LPS-Synthese beteiligte Gene zu identifizieren (Zou *et al.*, 1999; Lüneberg *et al.*, 2000).

Wie bereits erwähnt, exprimieren Legionellen eine unipolare Flagelle, die vorwiegend aus einer ca. 48 kDa großen Untereinheit, codiert durch das *flaA*-Gen, gebildet wird (Heuner *et al.*, 1995). Die Expression der Flagelle wird durch den alternativen  $\sigma^{28}$  Faktor getriggert und scheint für die intrazelluläre Replikation in *A. castellanii* nicht von Bedeutung zu sein (Heuner *et al.*, 1997; Heuner, 1997). Neuere Untersuchungen zeigten, dass eine *flaA*-negative Mutante in den ersten zwei Stunden der Infektion eine verringerte Invasion in *A. castellanii* und HL60 Zellen aufweist. Darüber hinaus ist die intrazelluläre Vermehrung in HL60 Zellen signifikant reduziert (Dietrich *et al.*, 2000). Die Flagelle wird beginnend mit dem Übergang von der logarithmischen zur stationären Wachstums-Phase exprimiert und kann, nach erfolgter Wirtszelllyse, durch die von ihr vermittelte Motilität das Auffinden neuer Wirtsorganismen positiv beeinflussen (Byrne & Swanson, 1998; Heuner *et al.*, 1999; Dietrich *et al.*, 2000).

Neben der Flagelle wurden auch Typ IV-Pili als Oberflächenstrukturen für Legionellen beschrieben, die zur Adhärenz an humane Epithelzellen und Amöben beitragen (Stone & Abu Kwaik, 1998). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass es einen Zusammenhang zwischen den Typ

IV CAP-Pili und dem Auftreten natürlicher Kompetenz in *Legionella* gibt (Stone & Abu Kwaik, 1999).

Das durch *ompS* kodierte Oberflächenprotein MOMP wurde als ein kationenselektives Porin charakterisiert (Hoffman *et al.*, 1992a,b). Neben der Bindung an eukaryotische Komplementfaktoren konnte eine weitere Beteiligung des MOMP an der Virulenz der Legionellen bislang nicht belegt werden, da keine funktionale Deletions-Mutante erzeugt werden konnte. Es wird angenommen, dass das Protein essentiell ist (Brand & Hacker, 1997).

Das durch das Hitzeschock-Gen *htpB* kodierte Hsp60 gehört zur Familie der GroEL-Chaperone und lässt durch seine exponierte Oberflächen-Lokalisation auf eine Lipochaperon-Funktion schließen, die zur Stabilität der Membran beiträgt. Im Verlauf einer Legionellose konnte Hsp60 als dominantes Antigen detektiert und die Sekretion von Hsp60 in neu generierte Phagosomen in Monozyten beobachtet werden (Weeratna *et al.*, 1994; Fernandez *et al.*, 1996; Garduño *et al.*, 1998a,b). Avirulente und virulente *Legionella*-Stämme unterscheiden sich in der Lokalisation von Hsp60 auf der äußeren Membran, wodurch die Adhärenz und Invasion in HeLa-Zellen beeinflusst wird (Garduño *et al.*, 1998b; Hoffman & Garduño, 1999).

Da Legionellen ein verändertes Genexpressionsmuster in Abhängigkeit der intrazellulären Umgebung zeigen, wurde versucht Gene zu analysieren, die nur intrazellulär induziert bzw. reprimiert werden (Cirillo *et al.*, 1994; Abu Kwaik & Pederson, 1996; Susa *et al.*, 1996; Abu Kwaik, 1998d). Mit Hilfe der „differential display“-PCR wurden insgesamt über 50 Gene identifiziert. Zu diesen MI-Genen (macrophage induced) gehört der *eml* Gen-Locus (early stage macrophage induced locus), der während der ersten Stunden nach der Infektion von U937-Zellen exprimiert wird. Nach Deletion von *eml* konnte eine drastische Reduktion der intrazellulären Vermehrungsfähigkeit festgestellt werden (Abu Kwaik & Pederson, 1996). Weitere Beispiele für nur intrazellulär exprimierte Gene sind das 19 kDa große GspA (global stress protein), eine 20 kDa große Pyrophosphatase (*ppa*) und der nur intrazellulär exprimierte Gen-Locus *hel*, der Homologie zu Kationen-Transportern besitzt (Abu Kwaik & Engleberg, 1994; McClain *et al.*, 1996; Abu Kwaik *et al.* 1997, 1998d).

Ein weiteres, nur intrazellulär exprimiertes Protein ist das 44 kDa große *ligA* (Legionella pneumophila infectivity gene A). Neben einer verringerten Cytotoxizität gegenüber humanen Monozyten ist die intrazelluläre Vermehrung von *ligA*-negativen Mutanten in *A. castellanii* stark reduziert. Aufgrund der durch *ligA* vermittelten pleiotropen Effekte auf die Salz-Sensitivität, Cytotoxizität, Motilität und Flagellierung der Legionellen wurde vermutet, dass *ligA* als globaler

Regulator zentrale Bedeutung für die intrazelluläre Vermehrung in Protozoen besitzt (Susa *et al.*; 1996; Fettes *et al.*, 2000).

Während des intrazellulären Wachstums kommt es bei Legionellen zu Wachstumsphasen-abhängigen phänotypischen Modulationen („developmental switch“) (Vogel & Isberg, 1999). Beim Übergang in die post-exponentielle Phase werden Legionellen Salz-sensitiv, osmolytisch resistent, flagelliert, cytotoxisch und infektiös (Byrne & Swanson, 1998). Die Expression dieser Virulenz-assoziierten Phänotypen, d.h. der Übergang von einer replikativen zu einer virulenten Form, erfolgt in Abhängigkeit von Hungersignalen und wird unter anderem durch die Akkumulation von ppGpp (Guanosin 3'5'-bispyrophosphat) vermittelt (Hammer & Swanson, 1999). Ein Faktor, der einen solchen „switch“ auslösen könnte, ist der alternative Sigma-Faktor RpoS. Eine Beteiligung von *rpoS* an der Wachstumsphasen-abhängigen Stress-Resistenz analog zu *E. coli* konnte für *Legionella* nicht nachgewiesen werden. Das intrazelluläre Wachstum einer *rpoS*-Mutante war im Protozoen-Modell (*A. castellanii*) nicht möglich. Daher wird *rpoS* eine Beteiligung an der Regulation der dafür notwendigen Gene zugeschrieben. Im Gegensatz dazu war die Replikation einer *rpoS* Deletionsmutante im Makrophagen nicht beeinträchtigt (Hales & Shuman, 1999a).

Durch Transposon-Mutagenese konnten die Gen-Loci *pmi* (*p*rotozoen and *m*acrophage *i*nfectivity) und *mil* (*m*acrophage *s*pecific *i*nfectivity *l*oci) identifiziert werden (Gao *et al.*, 1997, 1998a). Entsprechende Deletionsmutanten wiesen Defekte in Bezug auf die Adhärenz, das intrazelluläre Überleben und die Replikation entweder nur in Makrophagen (*mil*) oder in Protozoen und Makrophagen (*pmi*) auf. Das Vorhandensein von Gen-Loci, die nicht zur Infektion von Protozoen, aber zur Infektion von Makrophagen durch Legionellen benötigt werden lässt darauf schließen, dass Legionellen sich zuerst als Parasiten von Protozoen in der Umwelt entwickelt haben. Die für intrazelluläre Replikation in Makrophagen wichtigen *mil* Gen-loci könnten zu einem späteren Zeitpunkt erworben oder einfach für die Vermehrung in anderen Protozoen wichtig sein (Abu Kwaik, 2000; Harb & Abu Kwaik, 2000). Die Analyse des *milA* Gen-Locus zeigte Homologien zu einem putativen Transport-Protein aus *B. subtilis*. Die intrazelluläre Vermehrung von *milA*-negativen Legionellen in Makrophagen war reduziert und mit der Kolokalisation des Phagosoms mit den späten lysosomalem Marker LAMP-2 und dem ER-Marker Bip assoziiert (Harb & Abu Kwaik, 2000).

Weitere mit der intrazellulären Vermehrung in Verbindung stehende Gen-Loci sind *icm* (*i*ntracallular *m*ultiplication) und *dot* (*d*efect in *o*rganelle *t*rafficking). Deletionsmutanten weisen Defekte bei der intrazellulären Vermehrung und der Wirtszell-Abtötung auf (Marra *et al.* 1992; Berger & Isberg 1993; Berger *et al.*, 1994; Segal & Shuman, 1998a). Die Gen-Loci befinden sich auf zwei getrennten 20 kB großen chromosomalen Regionen und werden vermutlich in 9 Operons transkribiert (Segal *et al.*, 1998; Vogel *et al.*, 1998). Einige dieser Gene weisen Sequenz- und Funktionshomologien zu Komponenten von Typ IV-Konjugationssystemen auf, wie sie z.B. in *Agrobacterium tumefaciens* und *Bordetella* vorkommen (Vogel *et al.*, 1998; Segal & Shuman, 1998b; Roy, 1999; Vogel & Isberg, 1999; Christie & Vogel, 2000).

Neuere Arbeiten zeigten, dass 14 der *icm/dot*-Gene Homologien zu den Tra/Trb-Proteinen des IncI-Plasmids *colIb-P9* aufweisen. Darüber hinaus konnten für die Gene *icmT/K/S* signifikante Sequenzhomologien zu drei aus *Coxiella burnetii* stammenden Genen gefunden werden (Segal & Shuman, 1999b). Diese Daten liefern erste Hinweise auf einen Ursprung der *icm/dot*-Gene. Es wird angenommen, dass die Produkte der 24 *icm/dot*-Gene einen Membran-assoziierten Komplex bilden, der zur Insertion einer Pore in die Membran der eukaryotischen Wirtszelle führt (Kirby *et al.*, 1998; Kirby & Isberg, 1998). Über diesen Transportapparat (Transferosom) kommt es zur Sekretion von bis lang unbekanntem Effektormolekülen, die an der Modifikation des endosomalen Weges, der zur Phagosom-Lysosom Fusion führt, beteiligt sind (Vogel *et al.* 1998; Roy, 1999; Zuckman *et al.*, 1999).

Wie Roy *et al.* zeigen konnten, wird DotA als Pore in die Phagosomenmembran inseriert und ist entscheidend an der initialen Regulation der Phagosomenreifung beteiligt. Bei DotA-Deletionsmutanten kommt es innerhalb weniger Minuten zur Akkumulation von endosomalen/lysosomalen Markern wie GTP-bindendes Protein Rab7 und LAMP-1 (Lysosomal Associated Membrane Protein 1). Phagosomen, die wildtypische Legionellen beinhalten, lassen keine Kolo-kalisation mit diesen Markern erkennen (Roy *et al.*, 1997, 1998). Das schnelle Erscheinen der Marker lässt vermuten, dass der sekretierte Effektor in Form eines Proteins und nicht als DNA übertragen wird (Wiater *et al.*, 1998).

Neuere Untersuchungen zeigten, dass es sich bei dem putativen Effektor um ein in *cis* wirksames Element handeln muss, da keine generelle Beeinflussung der Phagosomen innerhalb einer Zelle festgestellt werden konnte. Wirtszellen, die sowohl virulente als auch avirulente Legionellen enthielten, zeigten fusionierende und in ihrer Fusion mit Lysosomen gestörte Phagosomen (Coers *et al.*, 1999). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass avirulente Legionellen in der Lage sind, sich in einem durch *Legionella pneumophila* erzeugten Phagosom zu vermehren. Das bedeutet, dass die Gene der *icm/dot* Region weniger die intrazelluläre Replikation steuern,

sondern vorwiegend die Etablierung eines replikativen Phagosoms, das vor der Fusion mit Lysosomen geschützt ist, bewirken (Matthews & Roy, 2000). Weitere mit den *dot/icm*-Genen assoziierte Phänotypen wie konjugativer Plasmidtransfer (RSF 1010), Salz-Sensitivität, Cytotoxizität und Motilität wurden beschrieben (Segal & Shuman, 1998a; Vogel & Isberg, 1999). Kürzlich konnte ein zweites Typ IV-Sekretionssystem in *Legionella* beschrieben werden (Segal *et al.*, 1999). Es umfaßt 11 Gene (*lvh*, *Legionella yir homologues*) und ist wahrscheinlich auf einer DNA-Insel lokalisiert, die mit 44 % einen abweichenden GC-Gehalt im Vergleich zum *Legionella*-Chromosom (39 %) aufweist. Eine Virulenz-Beteiligung konnte für dieses System nicht nachgewiesen werden.

Neuere Gen-Loci wie *rtxA* („structural toxin“) und *enhC* (*enhanced entry*), die insbesondere bei der Aufnahme der Legionellen in Wirtszellen eine Rolle spielen, wurden von Cirillo *et al.* (2000) identifiziert. Deletionsmutanten dieser Gene zeigten eine deutlich verringerte Invasivität der Wirtszellen, der zugrundeliegende Mechanismus ist bisher unbekannt.

## 2.5 Die Rolle von Eisen in der intrazellulären *Legionella*-Infektion

Die Aufnahme bzw. Verfügbarkeit von Eisen ist für die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella* von zentraler Bedeutung. Byrd und Horwitz konnten zeigen, dass  $\alpha$ -Interferon-aktivierte Monozyten durch Verminderung der intrazellulären Eisenverfügbarkeit (über eine verringerte Transferrin-Rezeptor-Expression) die Vermehrung von Legionellen reduzieren können (Byrd & Horwitz, 1989, 2000).

Neben seiner Bedeutung für Prozesse wie Elektronen- und O<sub>2</sub>-Transport ist Eisen auch an der Regulation der Genexpression beteiligt. Legionellen exprimieren Fur (*Ferric uptake regulation*), ein Protein, das die Gentranskription in Abhängigkeit von Eisen reguliert. Durch Inaktivierung eines weiteren an der Eisenaufnahme beteiligten Gens *frgA* (*fur regulated gene*), welches Sequenzhomologien zur Aerobactin-Synthetase von *E. coli* aufweist, konnte der Einfluss auf die intrazelluläre Vermehrung in Makrohagen und Protozoen nachgewiesen werden (Hickey & Cianciotto, 1997). In neueren Untersuchungen wurde die Existenz eines für *L. pneumophila* spezifischen Eisenaufnahmesystems, des Legiobactins, eines nicht klassischen Siderophors, postuliert (Liles *et al.*, 2000). Auch die Beteiligung von Peptid-Transportern wird als putativer Mechanismus der Eisenaufnahme für *Legionella pneumophila* diskutiert (Pope *et al.*, 1996; Viswanathan, *et al.* 2000).

## 2.6 Das *Legionella* Mip-Protein - Virulenzfaktor und Immunophilin

### 2.6.1 Das *Legionella* Mip-Protein ist eine PPIase

Das Mip („*m*acrophage *i*nfectivity *p*otentiator“-)-Protein wurde als einer der ersten Virulenzfaktoren der *Legionellaceae* beschrieben. Deletionsmutanten zeigten eine um den Faktor 10-100 reduzierte initiale Aufnahme bzw. frühe Etablierung und Vermehrung innerhalb von Makrophagen und Protozoen, sowie eine verminderte Virulenz im Tiermodell (Engleberg *et al.*, 1989; Cianciotto *et al.*, 1989; Cianciotto *et al.*, 1990a,b; Cianciotto & Fields, 1992).

Sequenzvergleiche zeigten, dass die C-terminale Domäne des 24 kDa *L. pneumophila* Mip-Proteins Homologien zu FK506-bindenden Proteinen (FKBP) aufweist. FKBP gehören zu den Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen), einer Klasse von Enzymen, die die Einstellung des Isomerengleichgewichts von Peptidyl-Prolyl-Bindungen in Peptiden und Proteinen katalysieren (Fischer *et al.*, 1984). Fischer *et al.* konnten die PPIase-Aktivität des *L. pneumophila* Mip-Proteins (bezeichnet als *L.p.*FKBP25) nachweisen. Die Aktivität kann durch Bindung der Immunsuppressiva FK506 und Rapamycin inhibiert werden, wobei die Affinität für Rapamycin ca. 10-fach höher ist als für FK506 (Fischer *et al.*, 1992; Ludwig *et al.*, 1994; B. König, pers. Mitteilung).

Zusätzlich zum Mip-Protein wurde eine weitere PPIase in *Legionella* identifiziert. Die 18 kDa große cytoplasmatische PPIase (*L.p.*Cyp18) gehört zu den Cyclophilinen (s.u.) und ist in seiner Aktivität durch Cyclosporin A hemmbar. Die Deletion dieses Gens hat eine verminderte Überlebensfähigkeit der Legionellen in *A. castellanii* zur Folge (Schmidt *et al.*, 1996).

### 2.6.2 PPIasen – Einteilung und *in vivo*-Funktionen

Wie bereits erwähnt, katalysieren die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen, EC 5.2.1.8) die langsame Umwandlung der *cis*- und *trans*-Isomeren einer Xaa-Pro-Peptidbindung (Fischer *et al.*, 1984). Aufgrund ihrer zyklischen Struktur übt die Aminosäure Prolin räumliche Zwänge auf benachbarte Aminosäuren in Peptiden und Proteinen aus, wodurch die Rotationsbarriere zwischen den beiden Isomeren *cis* ( $\omega = 0^\circ$ ) und *trans* ( $\omega = 180^\circ$ ) relativ hoch ist. Diese Isomerisierung stellt deshalb häufig einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Ausbildung von Strukturelementen in Proteinen dar, weshalb eine Beteiligung der PPIasen an Faltungs- und Transportprozessen von Proteinen angenommen wird (Schmid, 1993). Die durch Prolin hervorgerufenen räumlichen Zwänge bewirken auch, dass durch die  $180^\circ$ -Rotation einer Xaa-Pro-Peptidbindung Veränderungen in der Proteinkonformation zu erwarten sind (Fischer, 1994).

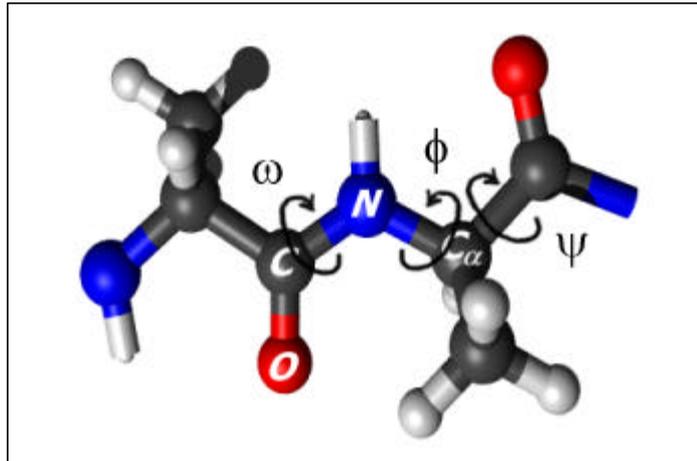


Abb.2): Darstellung der Isomerisierung einer Xaa-Pro-Peptidbindung im Dipeptid (Ala-Ala) und der charakteristischen Winkel ( $\omega, \phi, \psi$ ). Der Winkel  $\omega$  legt fest in welcher Konformation die Peptidbindung vorliegt.  $\omega = 180^\circ$  entspricht der *trans*- und  $\omega = 0^\circ$  der *cis*- Konformation (Fanghänel, 1998).

Neben den bereits erwähnten FKBP stellen die Cyclophiline (hemmbar durch das Immunsuppressivum Cyclosporin A) und die Parvuline (keine Hemmung durch FK506 oder Cyclosporin A) zwei weitere Familien der PPIasen dar (Fischer, 1996). Die Zuordnung zu den Familien erfolgt aufgrund von Sequenzhomologien. PPIasen sind ubiquitär vorkommende Enzyme und konnten bisher in allen untersuchten Organismen nachgewiesen werden (Übersicht in: Galat & Metcalfe, 1995; Fischer, 1994).

Die immunsuppressive Wirkung von Cyclosporin A, FK506 und Rapamycin, die unter anderem bei Organtransplantationen ausgenutzt wird, beruht auf einer Blockierung der T-Zell-Aktivierung durch die Komplexe der Immunsuppressiva mit ihren entsprechenden zellulären Rezeptoren (hCyp18 und hFKBP12). Die Komplexe Cyclophilin-CsA und FKBP-FK506 inhibieren die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin abhängigen Proteinphosphatase Calcineurin (Liu *et al.*, 1991). Als deren Zielmolekül wurde die phosphorylierte Komponente des multimeren Transkriptionsfaktors NF-AT („nuclear factor of activated T cells“) erkannt. Aufgrund fehlender Calcineurin-Aktivität kommt es zu einer Translokationssperre für NF-AT, die Kernlokation wird unterbunden und somit die Transkription der für die T-Zell Aktivierung notwendigen Gene verhindert (Schreiber & Crabtree, 1992; Hacker & Fischer, 1993; Ho *et al.*, 1996). Für den Komplex FKBP-Rapamycin konnte die Inhibition der T-Zell Aktivierung zu einem späteren Zeitpunkt innerhalb der Signalkaskade nachgewiesen werden. Hierbei kommt es zur Blockade des Übergangs von der  $G_1$ - in die S-Phase (Marks, 1996).

Im Gegensatz zur ubiquitären Verbreitung und hohen Sequenzkonservierung der verschiedenen PPIase-Familien erscheint die Aufklärung der physiologischen Funktionen dieser Enzymklasse relativ schwierig. So konnte für *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt werden, dass trotz Deletion von 12 PPIasen der Cyclophilin- und FKBP-Familie die Lebensfähigkeit der Zellen erhalten bleibt (Dolinski *et al.*, 1997). Dagegen resultierte die Deletion des Ess1/Ptf1, einer PPIase der Parvulin-Familie aus *S. cerevisiae*, in einer dramatischen Störung der Mitose (Hanes *et al.*, 1989). Damit ist Ess1/Ptf1 ebenso essentiell in Hefe wie das homologe Protein Pin1 in humanen Zellen. Die Depletion von *pin1* in HeLa Zellen führt zu einem letalen Defekt während der Mitose (M-Phase) und induziert Apoptose (Lu *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1999). In aktuellen Arbeiten wird die Beteiligung von Pin1 innerhalb der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit über eine Bindung von phosphorylierten Tau Protein diskutiert (Lu *et al.* 1999).

Zur Aufklärung der Beteiligung von PPIasen an zellulären Prozessen ist es von entscheidender Bedeutung, Interaktionspartner bzw. natürliche Substrate dieser Enzyme zu identifizieren. Durch die Anwendung verschiedener Methoden konnte die stabile und heterologe Assoziation von PPIasen mit nativen Proteinen nachgewiesen und damit Informationen über ihre *in vivo*-Funktionen erhalten werden.

Für das Cyclophilin NinaA konnte in *D. melanogaster* die Bildung eines stabilen Komplexes mit dem Zielmolekül Rhodopsin Rh-1 und die Beteiligung an der korrekten Biogenese dieses Proteins nachgewiesen werden (Baker *et al.*, 1994). Die Bindung des Virusproteins p55<sup>gag</sup> aus HIV-1 an T-Zell-Cyclophilin (hCyp18) ist in medizinischer Hinsicht von großem Interesse, weil erst die Interaktion dieser beiden Proteine die Infektiosität der Virionen bedingt (Franke *et al.*, 1994; Thali *et al.*, 1994). Aus strukturellen Analysen des hCyp18 und einem aus dem Gag-Protein stammenden 25 AS langen Peptid wurde eine Substrat-ähnliche Konformation innerhalb dieses Komplexes abgeleitet und damit ein Hinweis auf die Beteiligung der PPIase-Aktivität an der Vermittlung der HIV-1 Infektivität erhalten (Zhao *et al.*, 1997). Darüber hinaus wurde eine Assoziation der cytoplasmatischen Domäne des TGF- $\beta$  („transforming growth factor“-)Rezeptors mit hFKBP12 beschrieben (Wang *et al.*, 1994, 1996). Neuere Arbeiten zeigen, dass weder die Inhibition der PPIase-Aktivität noch die Deletion des FKBP12-Gens einen Einfluss auf die TGF- $\beta$  vermittelte Signaltransduktion in *Mus musculus* haben (Bassing *et al.*, 1998).

Für hFKBP12 und hFKBP12.6 konnte eine Assoziation sowohl mit Ryanodin als auch IP<sub>3</sub>-Rezeptoren gezeigt werden. Die Ryanodinrezeptor-sensitiven Ca<sup>2+</sup>-Kanäle des sarkoplasmatischen Reticulums in den Skelett- und Herzmuskelzellen enthalten vier fest gebundene Moleküle hFKBP12 bzw. hFKBP12.6, die vermutlich die Aktivität des Rezeptors regulieren (Jayaraman *et al.*, 1992; Brillantes *et al.*, 1994; Timerman *et al.*, 1996). Hierbei ist

nicht die direkte Rezeptormodulation durch die PPIase-Aktivität des hFKBP12, sondern eher eine Vermittlung der Bindung weiterer Liganden (Calcineurin) durch hFKBP12 entscheidend (Timerman *et al.*, 1995; Cameron *et al.*, 1995).

Über die *in vivo*-Funktionen oder Interaktionspartner bzw. Substrate von prokaryotischen PPIasen ist sehr wenig bekannt. Für die in *E. coli* exprimierten PPIasen SurA und FkpA konnte eine Beteiligung an der Proteinfaltung der äußeren Membranproteine bzw. extracytoplasmatischer Proteine nachgewiesen werden (Missiakas *et al.*, 1996; Lazar & Kolter, 1996). Die gleichzeitige Deletion von PpiD und SurA, PPIasen der Parvulin-Familie, führte zur Letalität, wodurch gezeigt wurde, dass die gleichzeitige Funktion beider PPIasen für *E. coli* essentiell ist (Dartigalongue & Raina, 1998). Die Deletion verschiedener anderer prokaryotischer PPIase-Gene resultierte meist in Phänotypen, die keine dramatischen Einschränkungen in der Überlebensfähigkeit aufwiesen (Horne & Young, 1995; Kleerebezem *et al.*, 1995; Wong *et al.*, 1997). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass dafür eine gegenseitige Kompensation der PPIasen untereinander verantwortlich sein könnte. Für den Trigger-Faktor und das Chaperon DnaK aus *E. coli* wurde ein Modell für deren Interaktion in der *de novo*-Proteinfaltung vorgestellt. Nur die gleichzeitige Deletion beider Gene war letal und ging mit einer Anhäufung nicht korrekt gefalteter Proteine einher. Die Autoren vermuteten eine teilweise funktionale Überlappung beider Chaperone (Deuerling *et al.*, 1999; Pfanner, 2000).

### 2.6.3 Strukturelle und funktionelle Charakterisierung Mip-verwandter Proteine

Mip-verwandte Proteine wurden sowohl in prokaryotischen als auch eukaryotischen intrazellulären Pathogenen beschrieben. So konnten Mip-Homologe in *Chlamydia trachomatis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica* und *Coxiella burnetii* (Lundemose *et al.*, 1991, 1992, 1993a; Mo *et al.*, 1995; Horne *et al.*, 1997; Sydenham *et al.*, 2000) und darüber hinaus in dem eukaryotischen intrazellulären Parasiten *Trypanosoma cruzi* nachgewiesen werden (Moro *et al.*, 1995). Durch DNA-Hybridisierungs-Experimente wurden *mip*-homologe Sequenzen in *Rochalimaea quintana*, *Rickettsia* ssp. und *Ehrlichia*-Spezies detektiert (Cianciotto *et al.*, 1995a). Das Vorkommen von Mip-verwandten Proteinen ist aber nicht nur auf pathogene, sich intrazellulär vermehrende Organismen beschränkt, wie die Charakterisierung eines Mip-verwandten Proteins EcFKBP22 aus *E. coli* und die für das *E. coli*-Gen *fkpA* erhaltenen Sequenzdaten zeigen (Rahfeld *et al.*, 1996, Horne & Young, 1995). In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass Mip-Proteine aus virulenten und avirulenten *Legionella*-Stämmen fast identische Sequenzen und identische enzymatische Eigenschaften aufweisen (Ludwig *et al.*, 1994).

Die Vorinkubation der Pathogene mit FK506 führte zu einer verringerten Infektiösität bei *C. trachomatis* und *T. cruzi*, was auf eine Inhibierung der Mip-PPIase-Aktivität zurückgeführt wurde (Lundemose *et al.*, 1993b; Moro *et al.*, 1995; Horne *et al.*, 1997). In analogen Experimenten konnte kein eindeutiger Hinweis auf die Virulenzreduktion von *L. pneumophila* durch die Immunsuppressiva FK506 bzw. Rapamycin für *A. castellanii* oder U937-Zellen festgestellt werden (Fanghänel, 1998). In *T. cruzi* konnte außerdem eine verstärkte Invasion von Wirtszellen durch externe Zugabe des Mip-verwandten Proteins beobachtet werden, während Zugabe von Anti-Mip-Antikörpern zu einer verringerten Infektiösität führten (Moro *et al.*, 1995).

Durch die Konstruktion site-spezifisch veränderter Mip-Proteine, die defizient in ihrer PPIase-Aktivität sind, wurde die Beteiligung der PPIase-Aktivität an der Virulenz von Legionellen im monozellulären System untersucht (Wintermeyer *et al.*, 1995). Durch Austausch der Aminosäurereste Asp<sup>142</sup> gegen Leu und Tyr<sup>185</sup> gegen Ala wurden Proteinvarianten mit Restaktivitäten von 6.2 % bzw. 2 % im Vergleich zum Wildtypprotein erhalten (Wintermeyer *et al.*, 1995; Schmidt, 1998). Die durch Komplementation *mip*-negativer Legionellen erzeugten Mutanten zeigten keine Beeinträchtigung in der intrazelluläre Vermehrung innerhalb von *A. castellanii*, der Makrophagen-ähnlichen Zelllinie U937 und humanen Monozyten (Wintermeyer *et al.*, 1995). Die Autoren schlussfolgerten, dass die PPIase-Aktivität unter den gewählten Testbedingungen (monozelluläres System) für die Virulenz von *Legionella* nicht von Bedeutung ist.

Neben der PPIase-Aktivität kann die Quartärstruktur des *Legionella* Mip-Proteins für die Virulenz von Bedeutung sein. Wie bereits erwähnt, ist die hFKBP12-homologe PPIase-Domäne der Mip-verwandten Proteine im C-terminalen Bereich des Proteins lokalisiert. Zusätzliche weisen alle bisher beschriebenen Mip-Proteine eine 100-150 Aminosäurereste lange N-terminale Extension auf, die keinerlei Sequenzhomologien zu bekannten Proteinen zeigt (Schmidt, 1998). Das *L. pneumophila* Mip besitzt eine N-terminale Signalsequenz (AS 1-20), die beim Transport über die Cytoplasmamembran hinweg von einer Signalpeptidase abgespalten wird, wodurch es schließlich zu einer Oberflächen-Lokalisation des Proteins kommt (Engleberg *et al.* 1989). Quervernetzungs- und Gelfiltrationsexperimente zeigten, dass das Mip-Protein auf der Legionellenoberfläche und in Lösung als Dimer vorliegt (Schmidt *et al.*, 1994, 1995). Die dafür verantwortliche Dimerisierungsregion liegt in der N-terminalen Domäne des *L. pneumophila* Mip-Proteins (Schmidt *et al.*, 1995). Aminosäurereste des Proteins, die an der Dimerisierung beteiligt sind, konnten bislang nicht identifiziert werden. Erst kürzlich konnte die

dreidimensionale Struktur des *L. pneumophila* Mip-Proteins durch Röntgenkristallstrukturanalyse in der Arbeitsgruppe von Prof. Hilgenfeld in Jena aufgeklärt werden.

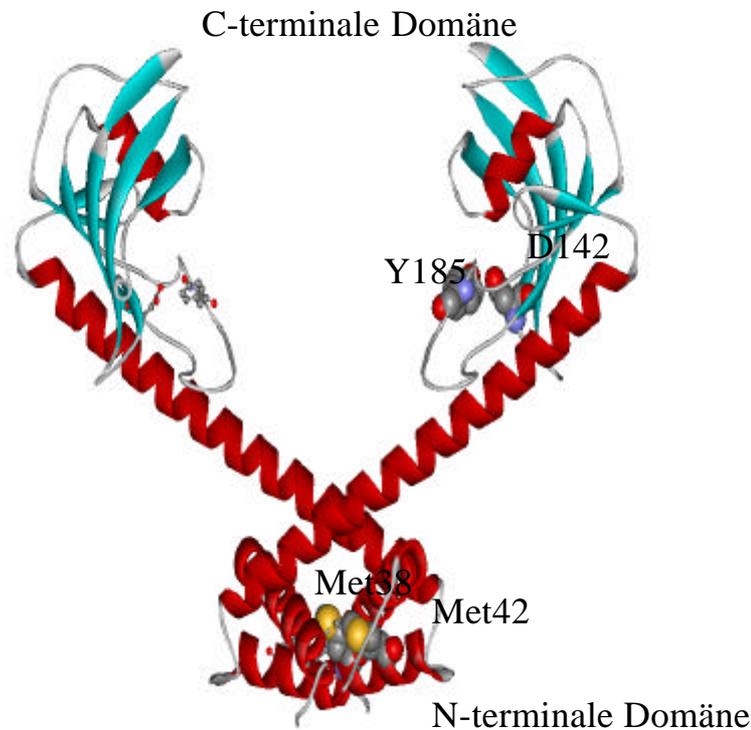


Abb.3): Modell der Röntgenkristallstruktur des Mip Proteins von *L. pneumophila* (*L.p.FKBP25mem*). Die markierten AS Asp<sup>142</sup> und Tyr<sup>185</sup> sind an der Isomerase-Aktivität des Proteins beteiligt. Die AS Met<sup>38</sup> und Met<sup>42</sup> bilden den sogenannten Methioninzipper. Strukturelle Merkmale: rot =  $\alpha$ -helical, türkis =  $\beta$ -Faltblattstrukturen, grau = Loop-Strukturen. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Prof. R. Hilgenfeld (Jena) zur Verfügung gestellt.

Die erhaltene dreidimensionale Struktur des Mip Proteins bestätigte, dass das Protein als Homodimer vorliegt. Jedes Mip-Monomer besteht aus zwei Domänen, die über eine extrem lange  $\alpha$ -Helix miteinander verbunden sind. Die N-terminale Domäne umfasst die Aminosäuren 1-48 und wird aus zwei antiparallelen  $\alpha$ -Helices,  $\alpha 1$  (10-28) und  $\alpha 2$  (35-46), die durch einen 6 Aminosäurereste langen Loop verbunden sind, gebildet. Die lange  $\alpha$ -Helix (65 Å) erstreckt sich über die AS 54 bis 98 und endet in der C-terminalen Domäne, die das PPIase-aktive Zentrum enthält und aus den AS 100-213 besteht. Die C-terminale Domäne zeigt eine typische FKBP-Struktur, die durch 6 antiparallele  $\beta$ -Faltblattstrukturen, die über kurze Loops verbunden sind, und eine kurze  $\alpha$ -Helix, gebildet wird (Michnik *et al.*, 1991; Riboldi-Tunnicliffe *et al.*, 2000).

Die Dimerisierung erfolgt innerhalb der N-terminalen Domäne, vorwiegend durch hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb der 4  $\alpha$ -Helices. In diesem hydrophoben Dimerisierungsbereich

sind besonders die Aminosäurereste Met<sup>38</sup> und Met<sup>42</sup> interessant, da sie einen sogenannten „Methionin-Zipper“ bilden. Hierbei liegen sich die Reste Met<sup>38</sup> und Met<sup>42</sup>, jeweils lokalisiert in der Helix  $\alpha 2$  in den antiparallel verlaufenden Helices, gegenüber. Neben den hydrophoben sind auch polare Wechselwirkungen zwischen den Monomer-Helices an der Bildung des stabilen Dimers beteiligt (Riboldi-Tunnicliffe *et al.*, 2000).

## 2.7 GFP, ein neuer Reporter für intrazelluläre Pathogene

Das ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* stammende Protein GFP, „green fluorescent protein“, emittiert nach Anregung mit blauem Licht eine starke Grünfluoreszenz und wird sowohl in Eukaryoten als auch Prokaryoten seit ca. 1994 als Reporter gen in der modernen Molekularbiologie eingesetzt (Chalfie *et al.*, 1994). GFP wird als fluoreszenter Marker zur Analyse der Genregulation und von Proteintranslokationsereignissen sowohl auf Einzelzellebene als auch in komplexen Systemen verwendet (Webb *et al.*, 1995; Kremer *et al.*, 1995; Valdivia *et al.*, 1996).

Da GFP keine zusätzlichen Kofaktoren oder Substrate benötigt, besitzt es Vorteile im Vergleich zu anderen Reportersystemen (Luziferase oder *lacZ*) und ist besonders interessant in Hinsicht auf das *in vivo* Monitoring von intrazellulären Pathogenen (Dhandayuthapani *et al.*, 1995; Valdivia *et al.*, 1996). Die emittierte Fluoreszenz kann leicht durch Fluoreszenzmikroskopie, Spektrofluorimetrie oder auch in der FACS-Analyse detektiert und ausgewertet werden (Cormack *et al.*, 1996; Misteli & Spector, 1997, Valdivia & Falkow, 1998).

Für Untersuchungen zur Kollokalisierungen von Proteinen innerhalb einer Zelle sind die neuen *gfp*-Varianten, die Fluoreszenzen in unterschiedlichen Farben (blau, gelb, cyan und rot) bei verschiedenen Anregungswellenlängen besitzen, besonders geeignet. Darüber hinaus konnten die Halbwertszeiten der GFP-Proteine durch das Fusionieren mit Protease-„tags“ auf bis zu 40 min reduziert werden, wodurch die Verwendbarkeit dieser destabilisierten GFP-Proteine als Reporter im Rahmen der Genexpression deutlich verbessert wurde (Anderson *et al.*, 1998). In dieser Arbeit wurden die in ihrer Faltungskinetik und Fluoreszenz stark verbesserten Mutanten *gfp*mut2 und *gfp*mut3 verwendet (Cormack *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 1998).

## 2.8 Zielsetzung der Arbeit

Die zur Verfügung stehenden *in vitro* Methoden, das intrazelluläre Überleben von *Legionella pneumophila* zu dokumentieren und qualitativ zu bewerten, sind meist zeitaufwendig und mit artifiziellen Fixierungsschritten verbunden. In der vorliegenden Arbeit sollte das Green Fluorescent Protein (GFP) als ein neues Reportersystem für das *in vivo* Monitoring der intrazellulären Genexpression und des intrazellulären Überlebens von *Legionella pneumophila* innerhalb eukaryotischer Wirtsorganismen etabliert werden. Mittels Einsatz der Durchflußzytometrie (FACS-Analyse) sollte die Methode eine schnelle und effiziente Quantifizierung der *Legionellen*-Aufnahme durch eukaryotische Wirte ermöglichen. Da die Aufnahme in Protozoen einen wesentlichen Bestandteil der Überlebensstrategie von Legionellen in der Umwelt darstellt, sollten zwei ausgewählte Vertreter, *A. castellanii* und *H. vermiformis*, durch Inhibitionsstudien hinsichtlich der von ihnen verwendeten Phagozytose-Mechanismen verglichen werden. Hierbei sollte die zuvor etablierte Methode, die Verwendung von GFP-markierten *Legionellen* in Kombination mit FACS-Analyse, in ihrer Validität überprüft werden.

Für die Etablierung einer replikativen Nische innerhalb phagozytischer Zellen ist die Expression verschiedener Virulenzfaktoren von essentieller Bedeutung. Vor diesem Hintergrund sollte eine mögliche Translokation des *Legionella* Mip Proteins, eines Virulenzfaktors, während der Infektion durch die Konstruktion von translationalen Mip::GFP-Fusionen untersucht werden.

Da die *in vivo* Funktion von PPIasen in Prokaryoten bis heute weitgehend unbekannt ist, sind Aussagen über potentielle Bindungspartner zur Aufklärung beteiligter Signalkaskaden von besonderem Interesse. Durch Quervernetzungs-Experimente sollte versucht werden, einen putativen Bindungspartner für das Mip Protein zu identifizieren. In diesem Zusammenhang sind Homodimerisierung und Oligomerisierung für die Kontrolle von Signaltransduktion und Rezeptor-vermittelter Aktivierung von entscheidender Bedeutung. In dieser Hinsicht sollte der Einfluss der Quartärstruktur (Homodimer) in Zusammenhang mit der Isomerase-Aktivität des Mip-Proteins auf die Pathogenität von *Legionella* in Zelllinien und Tierversuchen untersucht werden.