

4. Ergebnisse

4.1 Entwicklung des GFP-Reportersystems in *Legionella*

Für ein *in vivo* Monitoring intrazellulärer Pathogene wie *Legionella* ist das Reportergen *gfp* (Green Fluorescent Protein) besonders geeignet. Das Protein faltet sich ohne Zusatz von Substraten oder Kofaktoren spontan selbst, in Anwesenheit von Luftsauerstoff. Die Emission der Grünfluoreszenz bei 507 nm kann nach Anregung bei 488 nm detektiert und quantifiziert werden. In dieser Arbeit wurden die in ihrer Fluoreszenzstärke und ihren Faltungseigenschaften stark verbesserten GFP-Varianten *gfpmut2* (B. Cormack *et al.*, 1996) und *gfpmut3* (Bo Andersen *et al.*, 1998) verwendet.

4.1.1 Konstruktion der GFP-Expressionsvektoren

Der DNA-Sequenz für das *gfpmut2*-Gen wurde aus dem von B. Cormack zu Verfügung gestellten Plasmid pKEN durch die Restriktionsenzyme *XbaI* und *PstI* als ein 0.75 kB großes Fragment ausgeschnitten. Auf diesem Fragment wurde eine im optimalen Abstand zum Startcodon des *gfp*-Gens lokalisierte Shine-Dalgarno-Sequenz (T7 *gene10*) mit kloniert. Das Fragment wurde in den mit den selben Enzymen aufgeschnittenen „high copy“-Vektor pBC KS einligiert. Das so erzeugte Plasmid wurde als pRK6(pBC(*gfp*)) bezeichnet. Für die Expression des *gfpmut2*-Gens ist die Anwesenheit eines Promoters erforderlich, der über eine ausreichende Stärke verfügt. Der Mip-Promoter wurde aufgrund seines ubiquitären Vorkommens im Genus *Legionella* und der dem *lac*-Promoter vergleichbaren Expressionstärke ausgewählt. Für die Amplifikation des *mip*-Promoters wurden die Primer Mip5'375(GFPM1) und Mip3'822(GFPM2) verwendet.

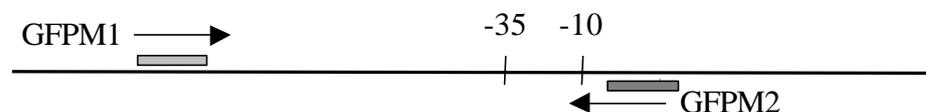


Abb.5): Amplifikation der *mip*-Promotersequenz. Als Template wurde chromosomale DNA von *L. pneumophila* JR32 PhilI eingesetzt. Gekennzeichnet sind die -10 und -35 Regionen und die verwendeten Primer, diese sind komplementär zu den an Position 375 und 822 beginnenden DNA-Abschnitten in der von Engleberg *et al.* (1989) veröffentlichten *mip* Gen-Sequenz.

In die Primer wurden Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *SacI* (GFPM1) und *XbaI* (GFPM2) eingeführt. Als Template wurde chromosomale *Legionella*-DNA eingesetzt und ein 440 bp großes Fragment amplifiziert. Auf diesem Sequenzabschnitt liegen upstream vor dem *mip* Gen die Konsensussequenzen für einem Sigma70 Promoter (-10, -35 Bereich), der die

Expression des *gfp*-Gens steuert. Das PCR Produkt wurde mit dem GeneClean Kit aufgereinigt und direkt einer Restriktionsbehandlung unterzogen. Anschließend wurde die Promotersequenz in den Vektor pRK6(pBC(*gfp*)) einkloniert. Das daraus resultierende Plasmid wurde pRK10(pBC(*gfp*)P_{mip}) genannt (Abb. 6).

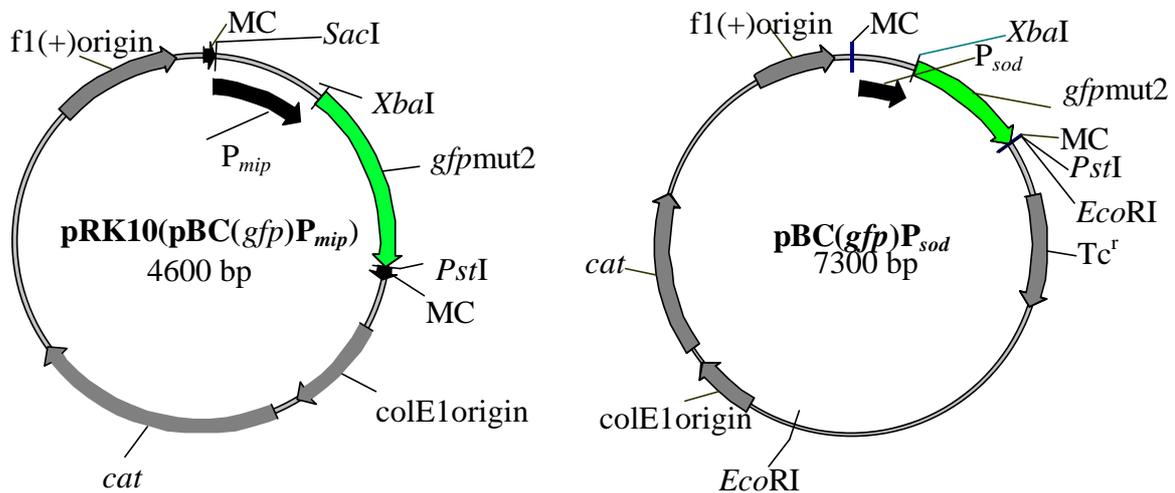


Abb.6): Vektorkarten der GFP-Expressionsvektoren pRK6(pBC(*gfp*)P_{mip}) und pBC(*gfp*)P_{sod}. Die für die Klonierung verwandten Restriktionsschnittstellen sind angegeben. Beide Vektoren besitzen ein Chloramphenicol-Resistenzgen, das zur Selektion verwendet wurde. Das Plasmid pBC(*gfp*)P_{sod} wurde freundlicher Weise von Herrn Dr. A. Bubert zur Verfügung gestellt.

Nach Transformation der Plasmide pRK10(pBC(*gfp*)P_{mip}) und pRK6(pBC(*gfp*)) in *E. coli* DH5 α wurden die erhaltenen Klone auf Expression einer Grünfluoreszenz unter einer UV-Lampe bzw. im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Das promoterlose Konstrukt des Vektors pRK6 zeigte keine Grünfluoreszenz, was eine unspezifische Expression bzw. Autofluoreszenz des Konstrukts innerhalb der Zellen ausschloss. Die Konstrukte pRK10(pBC(*gfp*)P_{mip}) und das Plasmid pRK50(pBC(*gfp*)P_{sod}) vermittelten beide eine starke Grünfluoreszenz. Die Expression des *gfpmut2* Gens wurde in diesem Plasmid durch den in *E. coli* und *Listeria* konstitutiv exprimierten *Legionella* unabhängigen Promoter P_{sod} gesteuert (A. Bubert, pers. Mitteilung).

4.1.2 Analyse der *mip*- und *sod*-Promoteraktivitäten in *L. pneumophila* durch GFP-vermittelte Fluoreszenz

Durch Transformation (Elektroporation) der Konstrukte pRK10(pBC(*gfp*)P_{mip}) und pBC(*gfp*)P_{sod} in verschiedene *Legionella*-Stämme sollte geklärt werden, ob auch in diesem Stammhintergrund eine spezifische Grünfluoreszenz vermittelt wird. Die Selektion erfolgte auf ABCYE Agarplatten. Nach Inkubation für 4-8 Tage (37°C, 5 % CO₂) konnten nach mehrfachen Wiederholungen wenige grünfluoreszierende Kolonien detektiert werden. Die meisten der so

erhaltenen Kolonien zeigten Wachstum auf ABCYE Agarplatten, jedoch keine GFP-Fluoreszenz. Eine PCR-Analyse mittels spezifischer Primer führte zur Amplifikation eines promoterlosen GFP-Gens. Demnach wurde der Mip-Promoter durch das sehr effiziente *Legionella* Restriktionssystem selektiv deletiert, das Plasmid hinsichtlich der neu erworbenen Choramphenicol-Resistenz jedoch behalten. Kolonien, die eine Grünfluoreszenz zeigten, wurden auf ABCYE-Agarplatten vereinzelt, mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht und der Anteil fluoreszierender Bakterien durch FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorter) bestimmt.

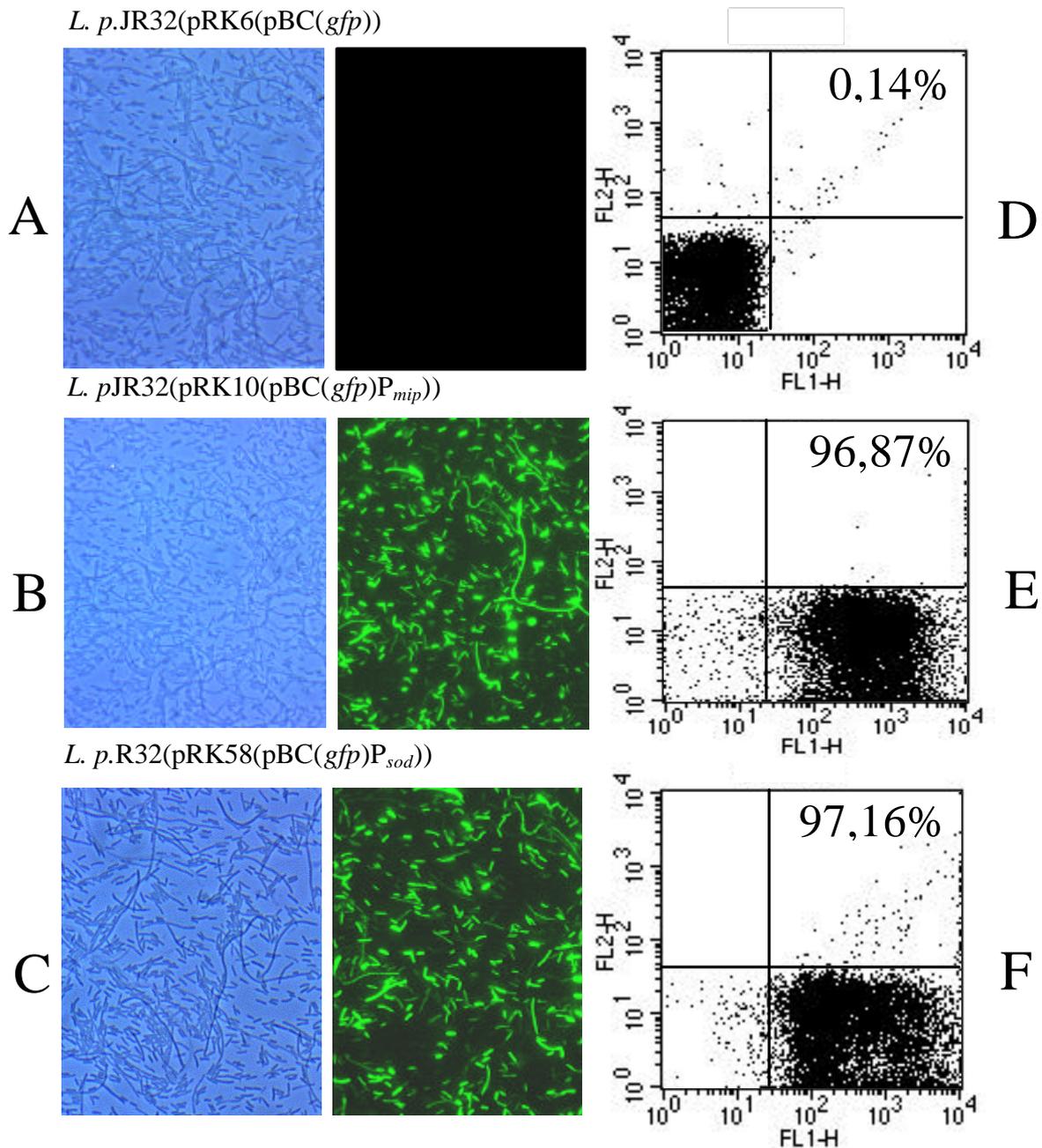


Abb.7): Analyse der GFP-vermittelten Fluoreszenz in *L. pneumophila* JR32: A-C: Fluoreszenzmikroskopie in der Hell- und Dunkelfeld-Darstellung; D-F: Quantitative Auswertung des prozentualen Anteils grünfluoreszierender Ereignisse (Bakterien) durch die FACS-Analyse.

Wie in Abbildung 7 A zu erkennen, zeigt das promoterlose Konstrukt pRK6(pBC(*gfp*)) in dem Stamm *L.p.* JR32 PhilI keine erkennbare Autofluoreszenz. Dies wird durch die Daten der FACS-Analyse deutlich, in der nur 0.14 % der analysierten Ereignisse als schwach fluoreszent detektiert wurden. Darüber hinaus befanden sich 99 % der Zellen im linken unteren Quadranten, mit einem mittleren Fluoreszenzintensitätswert von 59 (willkürliche Einheit). Die beiden *Legionella*-Stämme JR32(pRK10(pBC(*gfp*)P_{mip})) und JR32(pRK58(pBC(*gfp*)P_{sod})) zeigten in der Dunkelfeld-Betrachtung eine starke Grünfluoreszenz der Bakterien (vgl. Abb. 7: B und C). Die FACS-Analyse (vgl. Abb. 7: E und F) quantifizierte den Anteil der Bakterien mit einer erkennbaren Grünfluoreszenz für beide Stämme auf ca. 97% der Gesamtzellen. Auch der Anstieg der Fluoreszenzintensität auf der Achse FL1-H mit mittleren Fluoreszenzintensitätswerten von 916 (E) bzw. 918 (F) belegt die funktionale Expression des GFP-Gens in *Legionella*.

4.1.3 FACS–Analyse der GFP-exprimierenden *Legionella*-Stämme.

Es ist bekannt, dass von einer Population GFP-transformierter Bakterien nicht alle Zellen eine stabile GFP-Expression erkennen lassen (A. Bubert, pers. Mitteilung). Aus diesem Grund wurden FACS-Analysen durchgeführt, um den genauen Anteil der vom FACS als grünfluoreszierend erkannten Bakterien zu quantifizieren.

Tab.9): Quantitative Auswertung der mit GFP transformierten *Legionella*-Stämme in der FACS-Analyse. Angegeben ist der prozentuale Anteil der als grünfluoreszierend erkannten Bakterien.

Stamm (<i>L. pneumophila</i>)	% fluoreszierender Bakterien
Negativkontrolle: PhilI JR32(pRK6)	0.14
PhilI JR32(pRK10(pBC(<i>gfp</i>)P _{mip}))	96.87
PhilI JR32-2(pRK10(pBC(<i>gfp</i>)P _{mip}))	85.86
Corby pBC(pRK10(<i>gfp</i>)P _{mip}))	84.18
Corby KH1(pRK10(pBC(<i>gfp</i>)P _{mip}))	87.03
PhilI JR32(pRK10(pBC(<i>gfp</i>)P _{sod}))	97.16
PhilI JR32 25D(pRK10pBC(<i>gfp</i>)P _{mip}))	82.28

4.1.4 *In vitro* Analyse der *mip*- und *sod*-Promoteraktivitäten

Für die *in vitro* Analyse der *mip*- und *sod*-Promoteraktivitäten wurden verschiedene GFP-exprimierende *Legionella*-Stämme durch Spektrofluorimetrie analysiert. Die Messung der GFP-Fluoreszenz der rekombinanten *Legionella*-Stämme wurde wie unter 3.11.3 beschrieben durchgeführt und in einem SPEX FluoroMax Fluorimeter bestimmt.

Tab.10): Mittlere Fluoreszenzintensitäten gemessen in einem SPEX FluoroMax Fluorimeter. Die Werte stellen Mittelwerte aus 3 unabhängigen Messungen dar und sind auf 5×10^6 eingesetzte Bakterien standardisiert.

Stamm (<i>L. pneumophila</i>)	Fluoreszenz (willkürliche Einheiten)
PhilI JR32(pRK6(pBC(<i>gfp</i>)))	als Null definiert
PhilI JR32(pRK10(pBC(<i>gfp</i>)P _{sod}))	2.84×10^6
PhilI JR32(pRK10pBC(<i>gfp</i>)P _{mip}))	3.69×10^5
PhilI JR32-2(pRK10pBC(<i>gfp</i>)P _{mip}))	7.33×10^5
Phili JR32 25D(pRK10pBC(<i>gfp</i>)P _{mip}))	5.64×10^5
Corby(pRK(pBC10(<i>gfp</i>)P _{mip}))	2.63×10^5
Corby-KH1(pRK10(pBC(<i>gfp</i>)P _{mip}))	2.83×10^5

Der rekombinante Stamm *L. pneumophila* JR32(pBC(*gfp*)P_{sod})) zeigte mit einem Wert von 2.84×10^6 eine 10-fach höhere Fluoreszenz, bei einer Emissions-Wellenlänge von 507 nm im Vergleich zu den Stämmen, in denen das *gfp*-Gen durch die Aktivität des *mip*-Promoters exprimiert wird. Um zu untersuchen, ob eine Veränderung der Mip-Expression in *Legionella*-Stämmen zu beobachten ist, die sich hinsichtlich ihrer Virulenz unterscheiden, wurden der hochvirulente Stamm *L.p.* Corby und *L.p.* JR32 25D, ein avirulenter Stamm, mit dem Konstrukt pRK10(pBC(*gfp*)P_{mip})) transformiert und die Fluoreszenz bestimmt. Alle untersuchten Stämme zeigten eine vergleichbare GFP-vermittelte Fluoreszenz. Hieraus kann geschlossen werden, dass die Unterschiede in der Virulenz der *Legionella*-Stämme nicht durch unterschiedliche Mip-Expression verursacht wird. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der *Legionella* Mip Promoter auch unter extrazellulären Wachstumsbedingungen in *Legionella pneumophila* exprimiert wird.

Inwieweit der *Legionella* Mip-Promoter einer konstitutiven Expression unterliegt, wurde in Experimenten untersucht, in denen eine destabilisierte GFP-Variante (*gfp*LVA) verwendet und die resultierende Fluoreszenz in der FACS-Analyse bestimmt wurde.

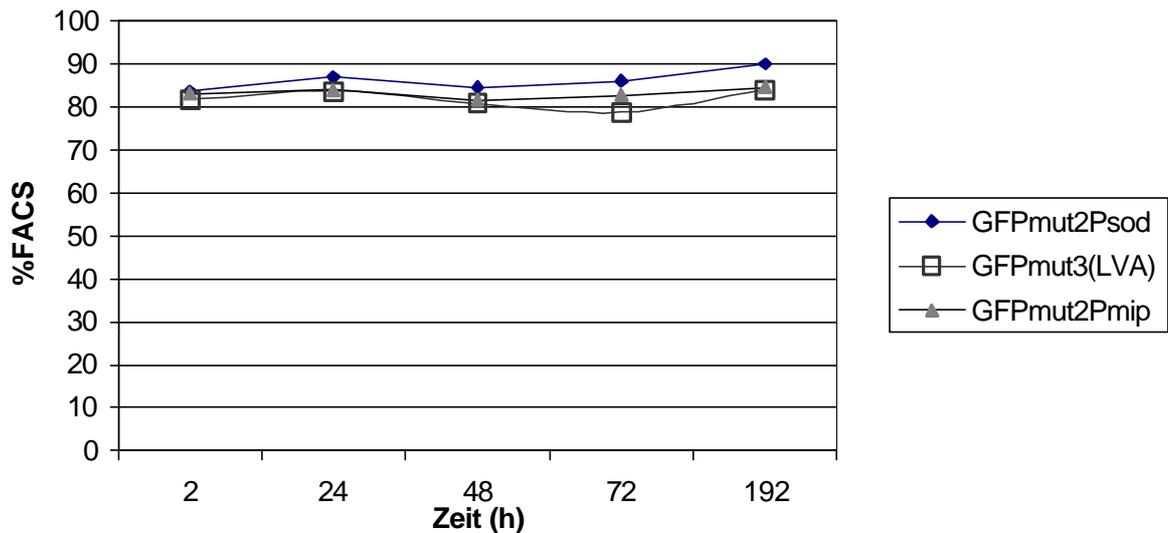


Abb.8): FACS-Analyse zur konstitutiven Expression des *Legionella* Mip-Promoters unter Verwendung einer destabilisierten GFP-Variante. Die Expression von GFPmut3(LVA) und von GFPmut2 wird durch den *mip* bzw. *sod* Promoter vermittelt.

Für die Analyse der Expression des *Legionella* Mip-Promoters wurde eine destabilisierte GFP-Variante mit einem Protease-„tag“ (LVA) verwendet (Anderson *et al.*, 1998). Dazu wurde der Sequenzbereich, der für den *Legionella* Mip-Promoter kodiert (vgl. 4.1.1), direkt vor das destabilisierte GFP kloniert, um so die Expression zu steuern. Das verwendete GFP-Protein (LVA) hat in *E. coli* und Pseudomonaden eine Halbwertszeit von 40 min. Die mit den GFP-Konstrukten transformierten Stämme *L.p.* JR32-2(pBC(*gfp*)P_{sod}), *L.p.* JR32-2(pRK10(pBC(*gfp*)P_{mip})) und *L.p.* JR32-2(pRK110(LVA)) wurden in AYE-Flüssigmedium unter Zusatz von Chloramphenicol bis zu einer OD von 1 angezogen und 10 min bei 4000 rpm pelletiert. Die Zellen wurden in H₂O resuspendiert und über einen Zeitraum von 7 Tagen weiter inkubiert. Proben wurden zu den Zeitpunkten 0, 24, 48, 72 und 192 h entnommen und einer FACS-Analyse unterzogen.

Wie aus Abbildung 8 deutlich wird, kann für die destabilisierte GFP-Variante *gfp*(LVA) im Vergleich zur stabilen GFP-Variante keine Reduktion in der Anzahl GFP-exprimierender Zellen festgestellt werden. Der Prozentsatz GFP-exprimierender Zellen bleibt über einen Zeitraum von 7 Tagen in allen drei Stämmen nahezu konstant. Für den *Listeria sod*-Promoter wurde eine konstitutive Expression in *E. coli* und *Listeria* beschrieben (A. Bubert, pers. Mitteilung) Dies lässt vermuten, dass die Expression des *Legionella* Mip-Promoters unter *in vitro*-Bedingungen ebenfalls konstitutiv verläuft.

4.1.5 *In vivo*-Monitoring einer *Legionella*-Infektion in *Acanthamoeba castellanii*

Wie unter 4.1.4 beschrieben, zeigten die rekombinanten *Legionella*-Stämme eine starke Grünfluoreszenz, die unabhängig von intrazellulären Wachstumsbedingungen, über den Mip-Promoter gesteuert, exprimiert wurde. Zur Überprüfung, ob sich die generierten Stämme intrazellulär vermehren und die GFP-Expression sich nicht störend auf das intrazelluläre Überleben auswirkt, wurde *Acanthamoeba castellanii* mit GFP-transformierten *Legionella*-Stämmen wie unter 3.6 beschrieben infiziert und mittels Fluoreszenzmikroskopie zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert.

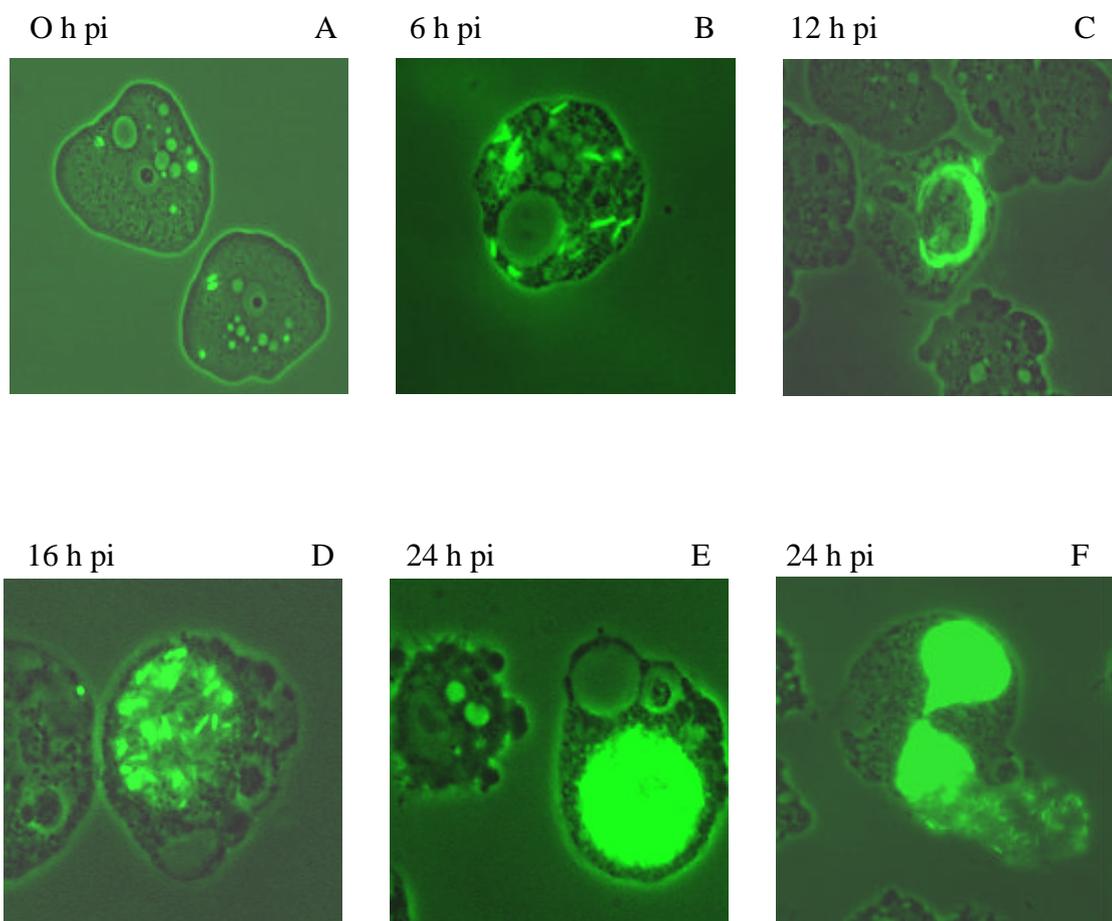


Abb.9): Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten der intrazellulären Replikation von *L. pneumophila* JR32(pRK10(pBC(*gfp*)P_{mip})) in dem Protozoenwirt *Acanthamoeba castellanii*. Die Aufnahmen sind in Dunkelfeld mit Blaulicht-Anregung (488 nm) aufgenommen und zeigen eine 650-fache Vergrößerung.

In Abbildung 9 A können zum Zeitpunkt 0 h nach der Infektion (pi) einzeln internalisierte Legionellen im Cytoplasma der Amöbe detektiert werden. Nach 6 h pi beginnt die intrazelluläre Vermehrung, zum Zeitpunkt 12 h pi können sich teilende Legionellen innerhalb eines

replikativen Phagosoms in der Amöbe beobachtet werden. Nach 16 h bzw. 24 h ist die Anzahl der Legionellen innerhalb des Phagosoms so groß, dass die Zelle letztlich ruptiert und die Legionellen freigesetzt werden. Die mikroskopischen Daten belegen, dass GFP markierte Legionellen in der Lage sind, sich intrazellulär zu vermehren und zur Lyse der Wirtszelle führen. Die Daten stimmen mit den Erkenntnissen aus der Elektronenmikroskopie überein.

4.1.6 Quantifizierung des intrazellulären Wachstums mittels FACS-Analyse

Da unter 4.1.5 gezeigt werden konnte, dass die Expression von GFP keinen Einfluss auf das intrazelluläre Überleben von *Legionella* hat, sollte versucht werden, Invasivität und Replikation durch den Einsatz GFP-markierter Legionellen zu quantifizieren. Dazu wurde *A. castellanii* mit *L. pneumophila* JR32(pRK10(pBC(*gfp*)P_{mip})) infiziert und zu bestimmten Zeitpunkten durch Fluoreszenzmikroskopie und FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) analysiert. Der Vorteil einer solchen Methode liegt in der Zeitersparnis, da nicht mehr ausplattiert werden muss, sondern die Werte unmittelbar nach FACS-Analyse verfügbar sind.

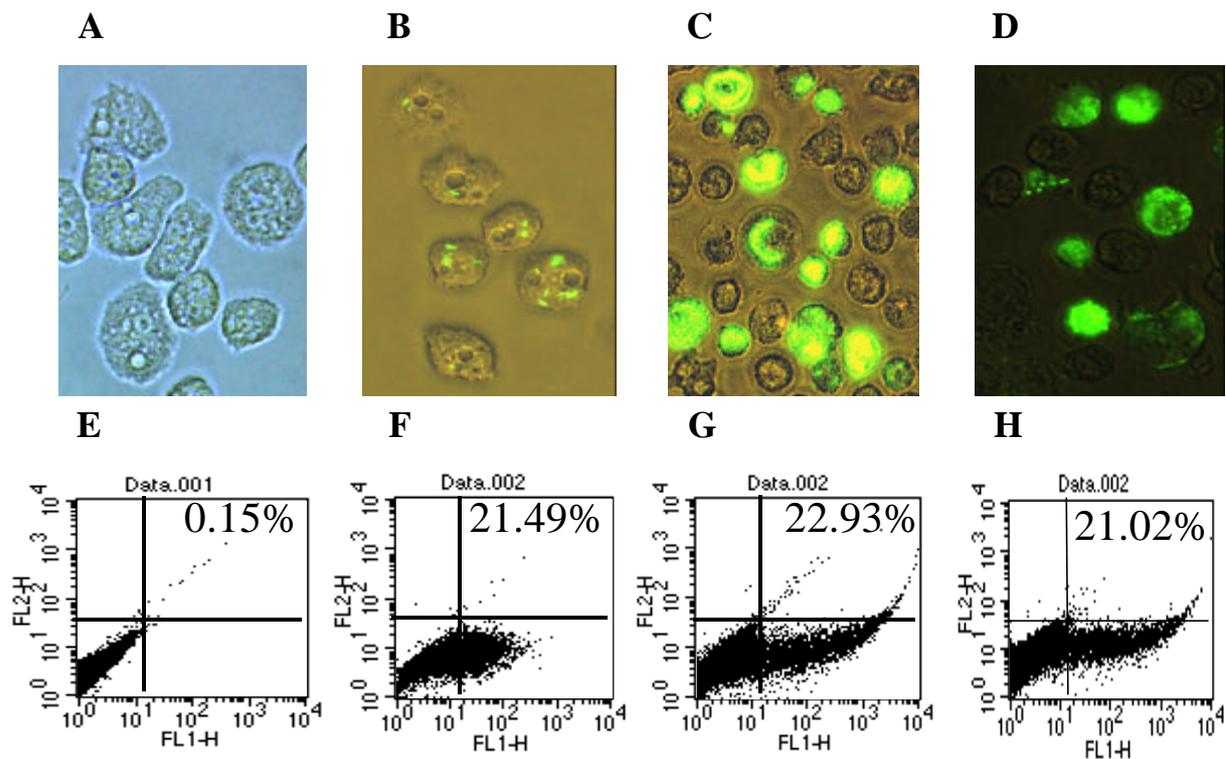


Abb.10): *In vivo*-Monitoring des intrazellulären Wachstums von *L. pneumophila* JR32 (pRK10(pBC(*gfp*)P_{mip})) in fluoreszenzmikroskopischer Darstellung (A-D) und Quantifizierung durch FACS-Analyse (E-F). Analysezeitpunkte nach erfolgter Infektion (pi): 0 h (A, E), 3 h (B, F), 24 h (C, G), 48 h (D, H).

Für die Analyse einer intrazellulären Infektion in *A. castellanii* mit *L. pneumophila* musste sicher gestellt werden, dass das FACS-Gerät eindeutig zwischen infizierten und nicht infizierten Amöben unterscheiden konnte. Abbildung 10 E zeigt eine nicht infizierte Negativkontrolle (Population von *A. castellanii*). In der FACS-Analyse wurden 99.9 % der Zellen im linken unteren Quadranten wiedergefunden, d.h. es konnten keine fluoreszierenden Ereignisse durch das FACS detektiert werden. In Abbildung 10 F beträgt der Anteil mit *Legionella* infizierten Amöben ca. 21% der Gesamtzellen. Das bedeutet, dass bei einer MOI von 50 ein großer Anteil der Zellen uninfiziert bleibt. Dieses Ergebnis wurde durch die Daten aus der Fluoreszenzmikroskopie bestätigt. Für die Quantifizierung der intrazellulären Vermehrung ist der Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität auf der Achse (FL1-H) ein wichtiges Kriterium. Die Infektionsrate blieb über einen Zeitraum von 48 h nahezu konstant, jedoch konnte durch den Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität von 56 auf 390 eine intrazelluläre Vermehrung der GFP markierten Legionellen detektiert werden.

Aufgrund entsprechender Einstellungen der internen Schwellenwerte (FSC, forward scatter und SSC, side scatter) bei der FACS-Analyse wurden nur solche Ereignisse detektiert, die die Größe von Amöbenzellen aufwiesen. Nicht internalisierte Bakterien, die ein Signal aufgrund ihrer ausgesandten Fluoreszenz darstellen, wurden in der FACS-Analyse nicht erfasst. Dies bedeutet aber auch, dass bereits lysierte Amöben ebenfalls nicht in der Analyse erfasst wurden.

4.1.7 FACS-Analyse der Invasion und intrazellulärer Wachstumscharakteristika verschiedener GFP-exprimierender *Legionella*-Stämme

Die Unterschiede hinsichtlich Invasivität und intrazellulärer Wachstumscharakteristika der Stämme *L.p.* JR32(pRK10(pBC(*gfp*)P_{mip})), *L.p.* Corby(pRK10(pBC(*gfp*)P_{mip})) und der avirulenten Mutante *L.p.* JR32 25D(pRK10(pBC(*gfp*)P_{mip})) wurden durch den Einsatz der FACS-Analyse untersucht. Dazu wurde *A. castellanii* mit den Stämmen infiziert und zu bestimmten Zeitpunkten analysiert.

Wie aus Abbildung 11 zu entnehmen ist, konnte für *L.p.* JR32 25D(pRK10(pBC(*gfp*)P_{mip})) eine initiale Infektionsrate von 3 % für den Protozoen-Wirt bestimmt werden. Nach 48 h ist die Infektionsrate auf einen Wert von nur noch 0.1 % gefallen. Demzufolge ist dieser Stamm nicht befähigt, sich intrazellulär zu vermehren und wurde durch den Wirtsorganismus abgetötet. Dieses Ergebnis wurde durch ein gleichbleibend niedriges Niveau der mittleren Fluoreszenzintensität über den Zeitraum des Infektionsgeschehens bestätigt (vgl. Abb. 12). Der parentale Wildtypstamm *L.p.* JR32(pRK10(pBC(*gfp*)P_{mip})) zeigte im Vergleich dazu eine initiale Infektionsrate von ca. 22 % der Gesamtzellen zum Zeitpunkt $t = 0$ h pi. Der prozentuale Anteil

der infizierten Amöben blieb für den Zeitraum von 48 h nahezu konstant (vgl. Abb. 11). Wie aus Abb. 12 zu ersehen, beginnt *L.p.* JR32(pRK10(pBC(*gfp*)P_{mip})) sich nach t = 3 h pi zu vermehren, was durch den Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität von 56 auf 388 bei t = 24 h pi deutlich wurde. Dieser Anstieg ist von einem Abfall des Fluoreszenzwertes bei t = 48 h pi begleitet und resultiert aus der bereits einsetzenden Lyse der Wirtsorganismen. Diese wurde auch durch die zunehmende Anzahl extrazellulär auftretender fluoreszierender Legionellen im Fluoreszenzmikroskop evident.

Im Vergleich zu *L.p.* JR32(pRK10(pBC(*gfp*)P_{mip})) zeigte der Wildtyp-Stamm *L.p.* Corby (pRK10(pBC(*gfp*)P_{mip})) eine 2-fach höhere Infektionsrate, die zum Zeitpunkt t = 0 h pi 47 % der Gesamtzellen betrug. Die Anzahl der infizierten Zellen erfuhr einen langsameren Abfall und war zum Zeitpunkt t = 48 h auf einen Wert von 28 % gefallen. Da die mittlere Fluoreszenzintensität ein direktes Maß für die Anzahl internalisierter Legionellen darstellt, müssen zum Zeitpunkt t = 24 h weniger Legionellen, verglichen mit dem Wildtyp Stamm *L.p.* JR32 (pRK10(pBC(*gfp*)P_{mip})), pro einzelner Amöbe internalisiert sein. Der Fluoreszenzwert stieg von 59 auf 270 bei t = 24 h pi und fiel nachfolgend auf einen Wert von 195 bei t = 48 h pi. Der Abfall in der Fluoreszenzintensität steht auch hier für eine bereits einsetzende Lyse der Amöbenzellen. Die verwendeten Stämme zeigten wie unter 4.1.4 beschrieben alle eine vergleichbare Fluoreszenz für 5×10^6 analysierte Bakterien. Darüber hinaus konnte in der FACS-Analyse (vgl. Tab. 9) der Anteil der als fluoreszent erkannten Bakterien mit 82-97 % quantifiziert werden.

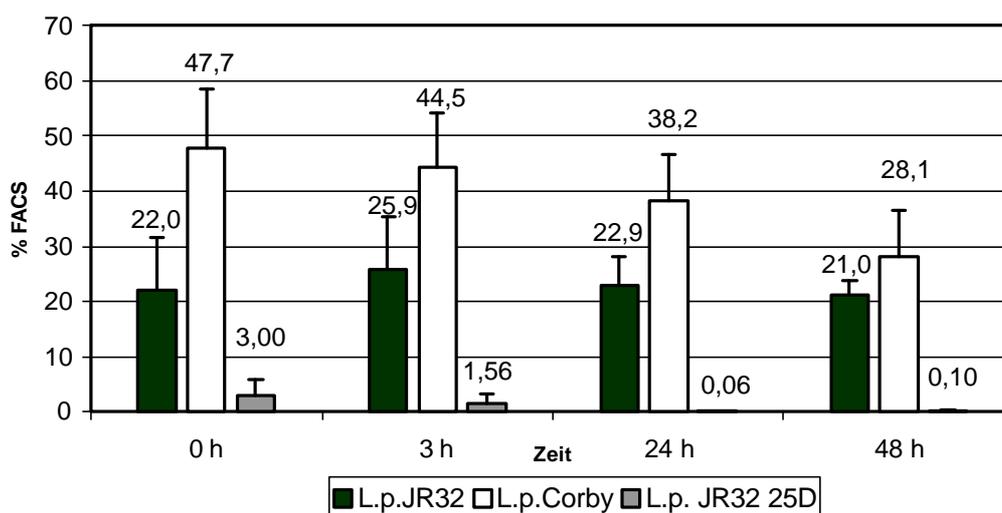


Abb.11): FACS-Analyse des prozentualen Anteils, der mit GFP-exprimierender Legionellen infizierten Amöbe *A. castellanii*. Infektion von *A. castellanii* mit den *Legionella*-Stämmen *L.p.* JR32(pRK10(pBC(*gfp*)P_{mip})), *L.p.* Corby(pRK10(pBC(*gfp*)P_{mip})), *L.p.* JR32 25D (pRK10(pBC(*gfp*)P_{mip})). Analysezeitpunkte: t = 0 h, 3 h, 24 h, 48 h pi. Für die Infektion von 1×10^5 Amöben wurden 5×10^6 Bakterien (MOI 50) eingesetzt.

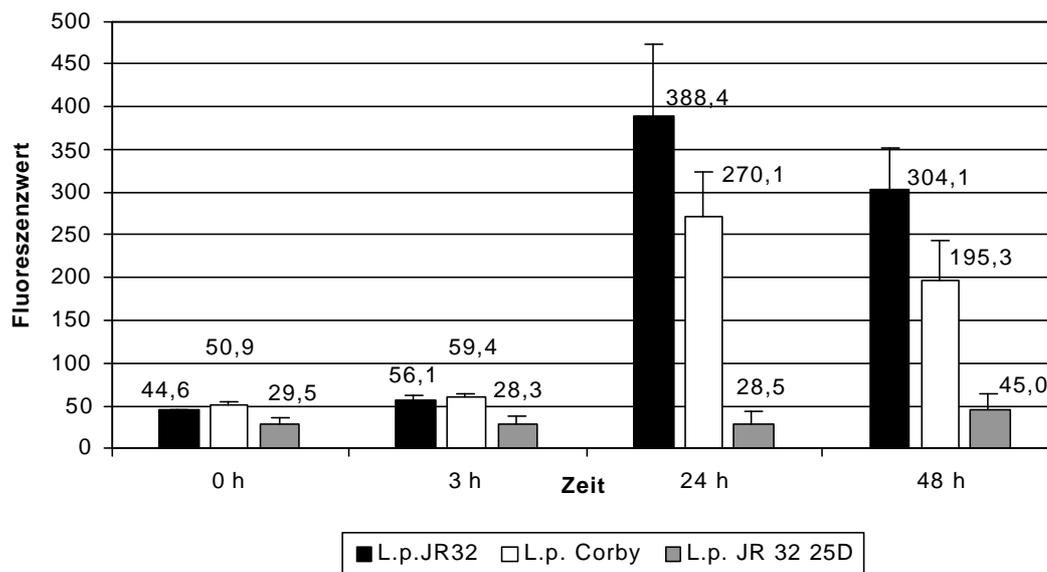


Abb.12): Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensitätswerte für die intrazelluläre Vermehrung GFP-exprimierender Legionellen. Infektion von *A. castellanii* mit den *Legionella*-Stämmen *L.p.* JR32(pRK10(pBC(*gfp*)P_{mip})), *L.p.* Corby(pRK10(pBC(*gfp*)P_{mip})), *L.p.* JR32 25D(pRK10(pBC(*gfp*)P_{mip})). Analysezeitpunkte: t = 0 h, 3 h, 24 h, 48 h pi. Für die Infektion von 1×10^5 Amöben wurden 5×10^6 Bakterien (MOI 50) eingesetzt.

4.1.8 Einfluss von Inhibitoren auf die Phagozytose bei *H. vermiformis* und *A. castellanii*

Die Aufnahmemechanismen innerhalb der Protozoen sind sehr komplex und bislang unzureichend charakterisiert. Für die Untersuchung von Phagozytoseleistungen wurden die Amöben mit entsprechenden Inhibitoren vorinkubiert und die Infektion mit GFP exprimierenden Legionellen in Gegenwart dieser Substanzen durchgeführt. Mit Hilfe der Inhibitoren sollte versucht werden mittels FACS-Analyse Aussagen über Unterschiede beteiligter Aufnahme-Mechanismen bei zwei Protozoen Arten zu machen. Die verwendeten Inhibitoren waren Cytochalasin D, welches inhibierend auf die Polymerisation von Actinfilamenten wirkt. Cycloheximid wurde als Inhibitor der Proteinbiosynthese verwendet und Methylamin für die Inhibition des Phagozytosemechanismus der adsorptive Pinozytose bzw. Rezeptor vermittelten Endozytose. Für die Durchführung der Versuche wurde der Stamm *L.p.* JR32(pRK10(pBC(*gfp*)P_{mip})) verwendet und die Ergebnisse der FACS-Analyse durch die parallel Bestimmung der CFU-Werte verifiziert.

4.1.8.1 Inhibition der Phagozytose bei *Hartmannella vermiformis*

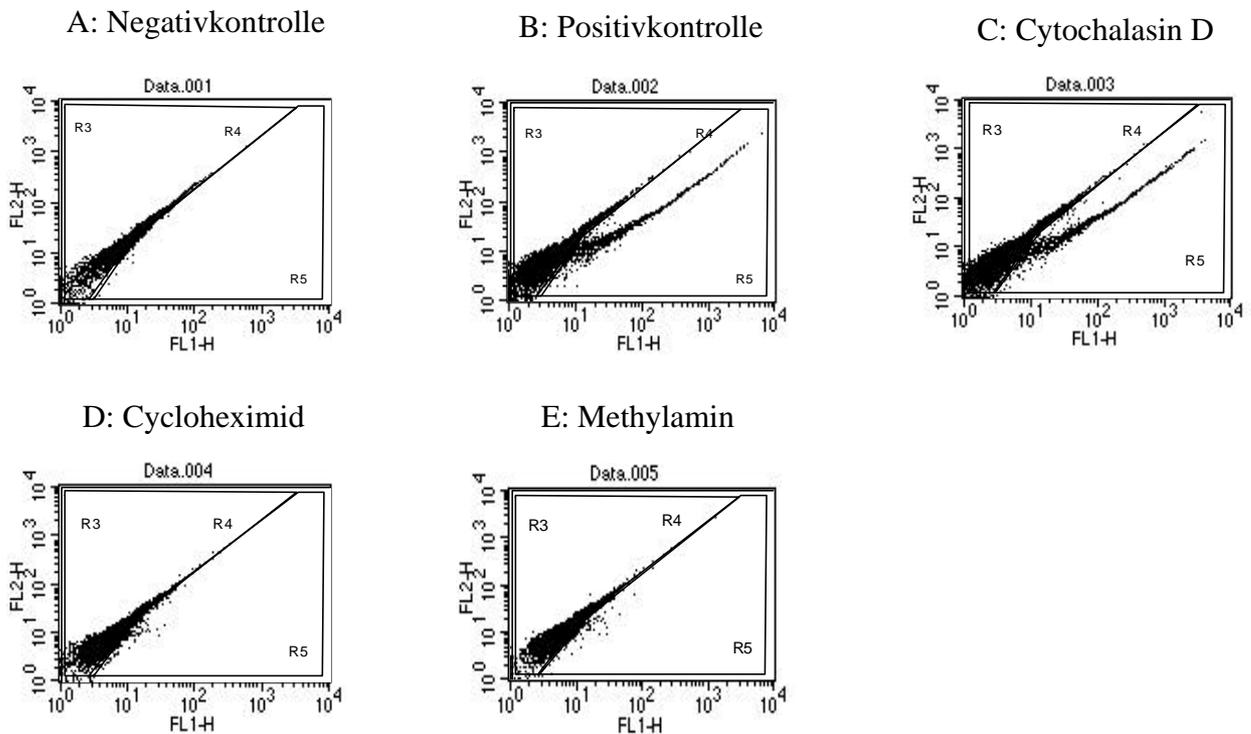


Abb.13): FACS-Analyse des Einflusses verschiedener Inhibitoren auf das Phagozytoseverhalten der Amöbe *Hartmannella vermiformis*. Für die Infektion wurde *L. pneumophila* JR32(pRK10(pBC(*gfp*)*P_{mip}*)) verwendet und diese wie unter 3.6 beschrieben durchgeführt und quantifiziert. Zur Positivkontrolle wurde kein Inhibitor zugegeben, die Negativkontrolle ist nicht infiziert. Verwendete Konzentration der Inhibitoren: Cytochalasin D 5 µg/ml; Cycloheximid 100 µg/ml; Methylamin 100-200 mM, variierend.

In Abbildung 13 A und B ist die jeweilige Analyse der Negativ- und Positivkontrolle dargestellt. Die Infektion der Amöben ist durch das Auftreten eines zusätzlichen Arms in dem „gate“ R5 (vgl. Abb. 13 B) gekennzeichnet. Der Inhibitor Cytochalasin D besitzt keinen Einfluss auf die Phagozytose der Amöbenart *H. vermiformis*. Sowohl bei der Positivkontrolle als auch beim Einsatz von Cytochalasin D wurden vergleichbare Invasionsraten von ca. 10 % erreicht. Im Gegensatz dazu wird die Aufnahme bzw. Invasion der Legionellen durch den Einsatz der Inhibitoren Cycloheximid und Methylamin vollständig reprimiert. Daraus lässt sich schließen, dass die Proteinbiosynthese (inhibiert durch Cycloheximid) bei der Aufnahme von *Legionella* durch *H. vermiformis* von entscheidender Bedeutung ist. Zur Überprüfung dieser Ergebnisse wurden parallel Invasionsassays durchgeführt, die mittels CFU-Bestimmung (Colony forming units) quantifiziert wurden.

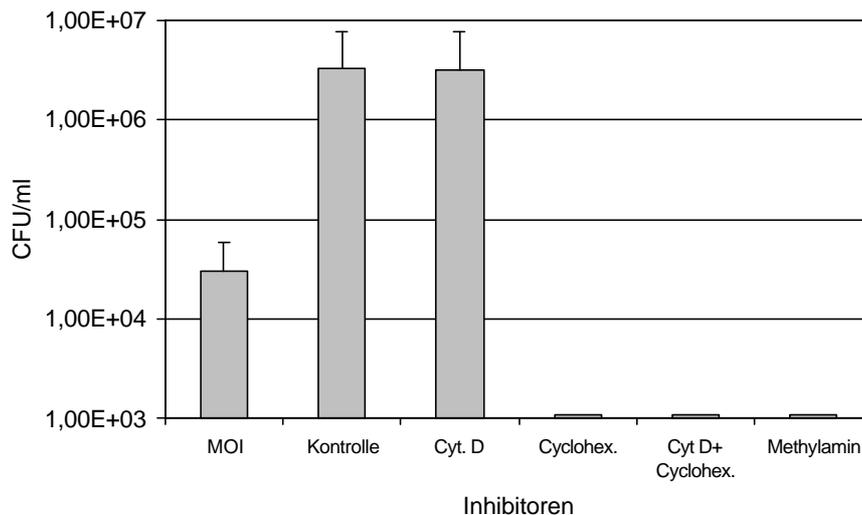


Abb.14): Bestimmung der CFU-Werte nach Infektion von *H. vermiformis* mit *L. pneumophila* JR32(pRK10(pBC(*gfp*)*P_{mip}*)) in Gegenwart der Inhibitoren Cytochalasin D, Cycloheximid und Methylamin. Durchführung wie unter 3.6 beschrieben. Die Experimente wurden 3 mal unabhängig voneinander durchgeführt, die resultierende Standardabweichung ist in Form von Fehlerbalken angegeben.

Wie aus Abbildung 14 deutlich wird, konnten durch die CFU-Bestimmung die Ergebnisse aus der FACS-Analyse (vgl. Abb. 13) zum Einfluss der Inhibitoren bestätigt werden. Auch hier konnte kein Einfluss von Cytochalasin D festgestellt werden. In Übereinstimmung mit der FACS-Analyse konnte für die Inhibitoren Cycloheximid und Methylamin eine vollständige Inhibition der Phagozytose nachgewiesen werden. Diese Experimente bestätigen die Validität der Methode, den Einfluss von Phagozytose-Inhibitoren mittels FACS-Analyse und GFP-exprimierenden Legionellen zu quantifizieren.

4.1.8.2 Inhibition der Phagozytose bei *Acanthamoeba castellanii*

Um Aussagen betreffend der Unterschiede beteiligter Phagozytosemechanismen innerhalb einer Amöbengattung machen zu können, wurde der Einfluss der schon zuvor verwendeten Inhibitoren zusätzlich bei *Acanthamoeba castellanii* untersucht. Die gewonnenen Daten wurden ebenfalls durch FACS-Analyse generiert und parallel durch CFU-Bestimmung verifiziert.

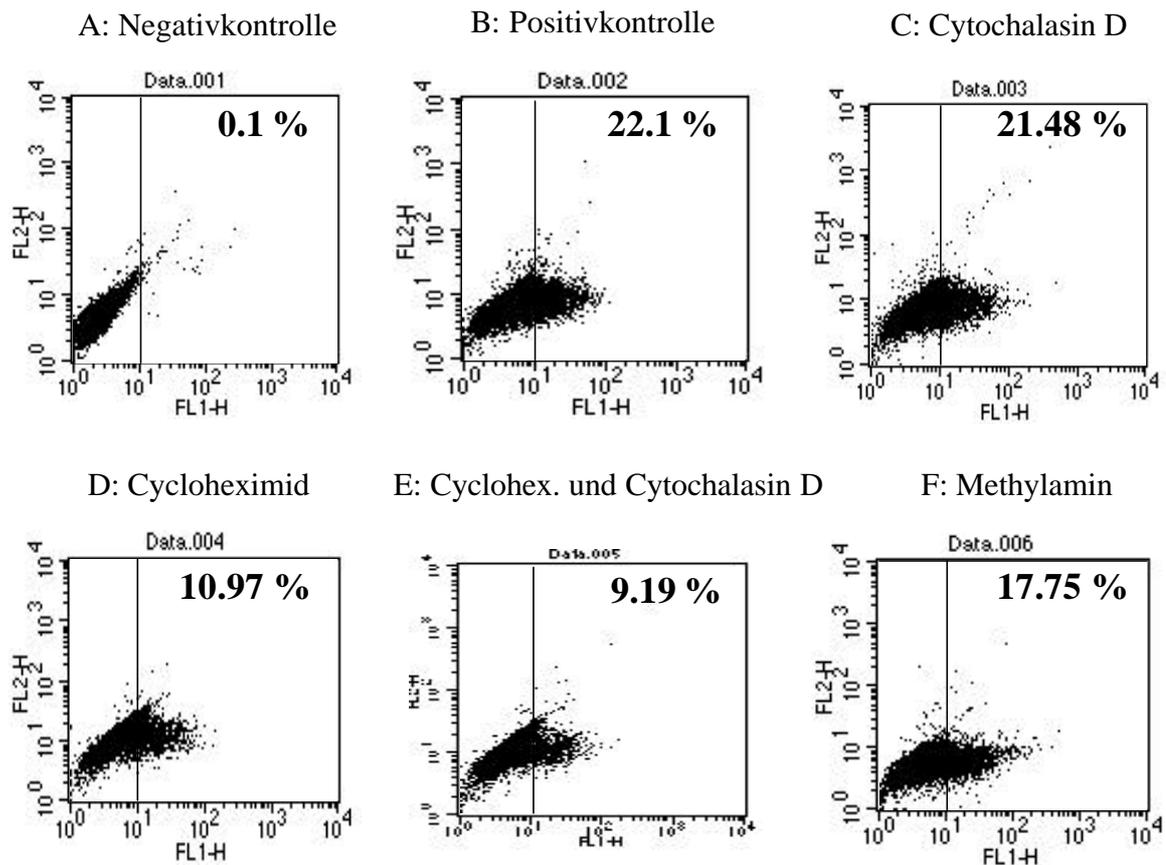


Abb.15): FACS-Analyse des Einflusses verschiedener Inhibitoren auf das Phagozytoseverhalten der Amöbe *A. castellanii*. Für die Infektion wurde *L. pneumophila* JR32(pRK10(pBC(*gfp*)*P_{mip}*)) verwendet und diese wie unter 3.6 beschrieben durchgeführt und quantifiziert. In der Positivkontrolle wurde kein Inhibitor zugegeben, die Negativkontrolle ist nicht infiziert. Verwendete Konzentrationen der Inhibitoren: Cytochalasin D 5 µg/ml; Cycloheximid 100 µg/ml; Methylamin 100-200 mM.

Wie aus Abbildung 15 zu entnehmen, konnte bei Verwendung von Cytochalasin D kein Einfluss auf die Invasionsrate im Vergleich zur unbehandelten Positivkontrolle festgestellt werden. Es wurden jeweils Invasionsraten von ca. 21-22 % erreicht. Der Einsatz von Cycloheximid hatte dagegen eine Reduzierung der Invasionsrate auf nur noch 10.9 % der Gesamtzellen zur Folge. Die simultane Verwendung von Cycloheximid und Cytochalasin D resultierte in einer zusätzlichen Reduktion um ca. 1.8 % auf nur noch 9.19 % der Zellen. Der Inhibitor Methylamin zeigte dagegen nur minimale Effekte bei einer Konzentration von 100 mM. Bei höheren Konzentrationen wurden zytotoxische Effekte beobachtet, die eine Abrundung und Aggregation der Amöben zur Folge hatten.

In Abbildung 16 A und B wurden die Daten aus der FACS-Analyse und der CFU-Bestimmung für den Zeitpunkt Null der Infektion einander gegenüber gestellt. Wie deutlich wird, korrelieren die Ergebnisse gut und zeigen eine vergleichbare Quatifizierung des Einflusses der verwendeten Inhibitoren auf die bakterielle Aufnahme.

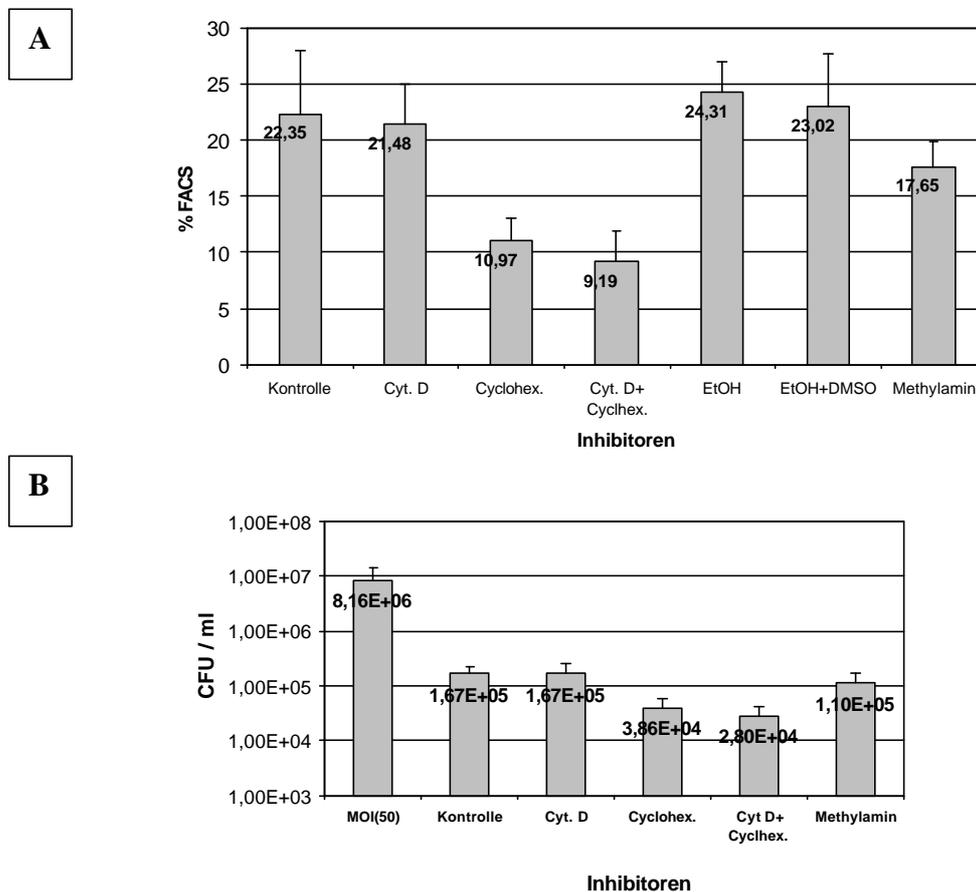


Abb.16): FACS-Analyse (A) und CFU-Bestimmung (B) infizierter *A. castellanii* nach 0 h (pi). Die verwendeten Inhibitoren wurden bereits in Abb. 15 beschrieben. Zusätzlich wurden Effekte der verwendeten Lösungsmittel durch entsprechende Kontrollexperimente (nur FACS) ausgeschlossen. Die Experimente wurden 5 mal unabhängig voneinander durchgeführt. Die resultierende Standardabweichung ist in Form von Fehlerbalken angegeben.

Wie Darstellung 17 A zu entnehmen, konnte die Wirksamkeit der Inhibitoren auch nach 24 h Inkubation noch nachgewiesen werden. Die Daten waren vergleichbar mit dem Wert bei 0 h, darüber hinaus konnte in der CFU-Bestimmung eine Zunahme der sich intrazellulär vermehrenden Legionellen um ca. 2 log-Stufen beobachtet werden. Zur Kontrolle wurden die Lösungsmittel allein in parallelen Ansätzen mitgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass bis zu einer Konzentration von max. 0.5 % im Test keine Lösungsmittelleffekte in Anbetracht einer reduzierten Vitalität der Wirtsorganismen zu beobachten waren.

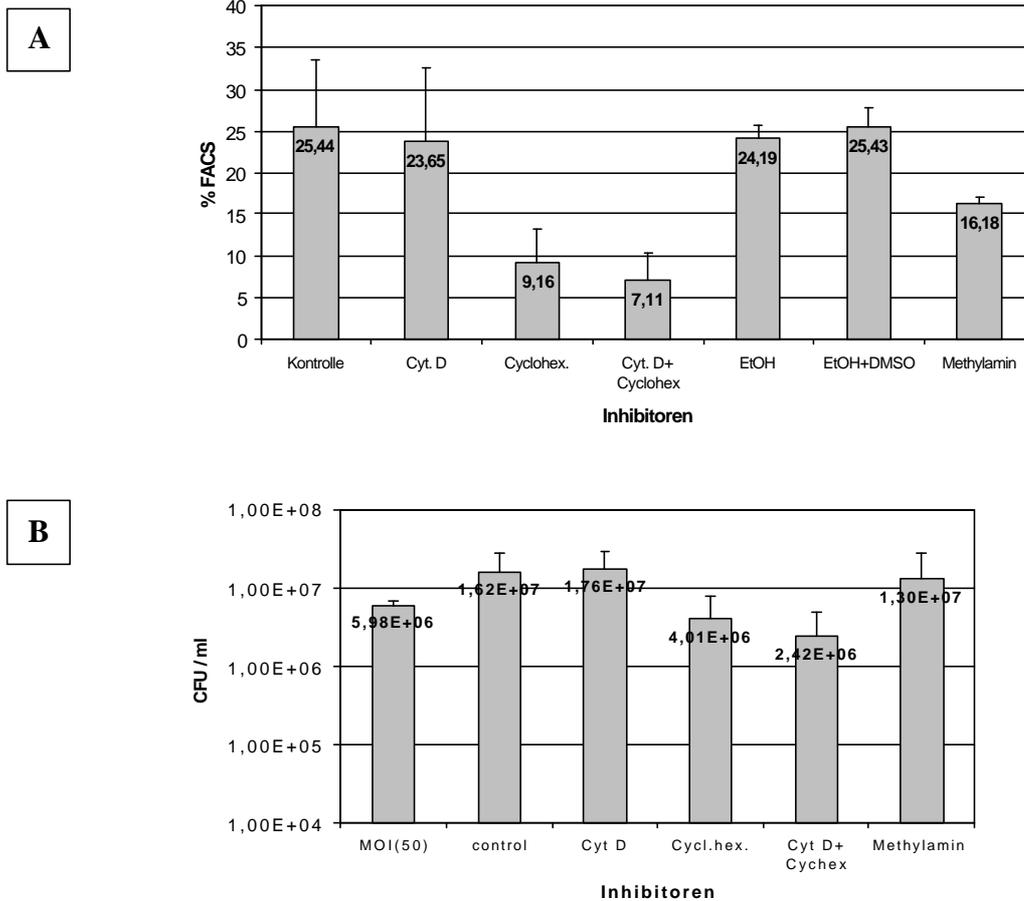


Abb.17): FACS-Analyse (A) und CFU-Bestimmung (B) von mit *L.p.*JR32(pRK10) infizierten *A. castellanii* nach 24 h. Zusätzlich wurden Effekte der verwendeten Lösungsmittel durch entsprechende Kontrollexperimente (nur FACS) ausgeschlossen. Die Experimente wurde 5 mal unabhängig voneinander durchgeführt und die resultierende Standardabweichung ist in Form der Fehlerbalken angegeben.

Tab.11): Vergleich der durch die Inhibitoren verursachten Effekte auf die Invasionsrate von *L. pneumophila* pRK10(pBC(*gfp*)P_{mip}) in die Amöben *H. vermiformis* und *A. castellanii*. Die beobachteten Effekte sind in % Aufnahme gegenüber einer nicht inhibierten Aufnahme berechnet.

Inhibitoren	<i>H. vermiformis</i>	<i>A. castellanii</i>
Cytochalasin D	100 %	100 %
Cycloheximid	0 %	49 %
Cyt. D + Cycloheximid	0 %	39 %
Methylamin	0 %	76 %

Die für Cycloheximid in *H. vermiformis* bestimmten Werte deuten auf die Notwendigkeit der Proteinbiosynthese für die Aufnahme der Legionellen hin. Diese Daten stimmen mit den von Harb *et al.* (1998) vorgestellten überein. Auch für *A. castellanii* konnte eine Reduktion der Aufnahme um 51 % bei Verwendung von Cycloheximid beobachtet. Die simultane Verwendung

von Cycloheximid und Cytochalasin D verursachte bei *A. castellanii* eine weitere Reduktion der Aufnahme um 10 %. Der Inhibitor Methylamin hat für *H. vermiformis* die vollständige Reprimierung der Aufnahme zur Folge. Dagegen konnte für *A. castellanii* nur eine leichte Reduktion der Aufnahme beobachtet werden. Durch den Einsatz von Phagozytose-Inhibitoren in Kombination mit FACS-Analysen konnten Unterschiede, der an der bakteriellen Aufnahme beteiligten Mechanismen für die beiden Protozoen *Hartmanella* und *Acanthameoba* identifiziert werden.

4.1.9 Zusammenfassung

Wie in diesem Abschnitt der Arbeit gezeigt, konnte durch die Konstruktion und Expression der GFP-Expressionsvektoren die Funktionalität von *gfp* als ein neues Reportergen in *Legionella* nachgewiesen werden. Wodurch ein *in vivo* Monitoring von *Legionella*-Infektionen in verschiedenen Wirtszellen ermöglicht wurde. Durch die Anwendung von FACS-Analysen konnten die erzeugten rekombinanten *Legionella*-Stämme hinsichtlich ihrer Virulenz voneinander unterschieden und damit eine Alternative zum klassischen Invasionsassay etabliert werden. Durch *in vitro* Analysen der *mip*-Promoter Aktivitäten konnte ausgeschlossen werden, dass Unterschiede in der Virulenz verschiedener *Legionella*-Stämme durch eine unterschiedliche *mip*-Promoter Expression verursacht waren. Darüber hinaus wurde durch den Einsatz einer GFP-Variante mit geringer Halbwertszeit die konstitutive Expression des *mip*-Promoters *in vitro* bestätigt. Weiterhin konnten mittels kombiniertem Einsatz von FACS-Analysen und verschiedenen Phagozytose-Inhibitoren die zwei Protozoenwirte *A. castellanii* und *H. vermiformis* hinsichtlich der von ihnen verwendeten Aufnahme-Mechanismen der bakteriellen Internalisierung untersucht und Unterschiede festgestellt werden.

4.2 Konstruktion von Mip::GFP-Fusionsproteinen

4.2.1 Klonierung der Konstrukte

Für das Monitoring von intrazellulären Translokationsprozessen wurden translationale Mip::GFP-Fusionsproteine konstruiert und deren Verwendbarkeit evaluiert. Das „Green Fluorescent Protein“ wurde dafür an das C-terminale Ende des Mip-Proteins fusioniert, um Translokationsereignisse von Mip innerhalb der Wirtszellen mittels Fluoreszenzmikroskopie zu untersuchen.

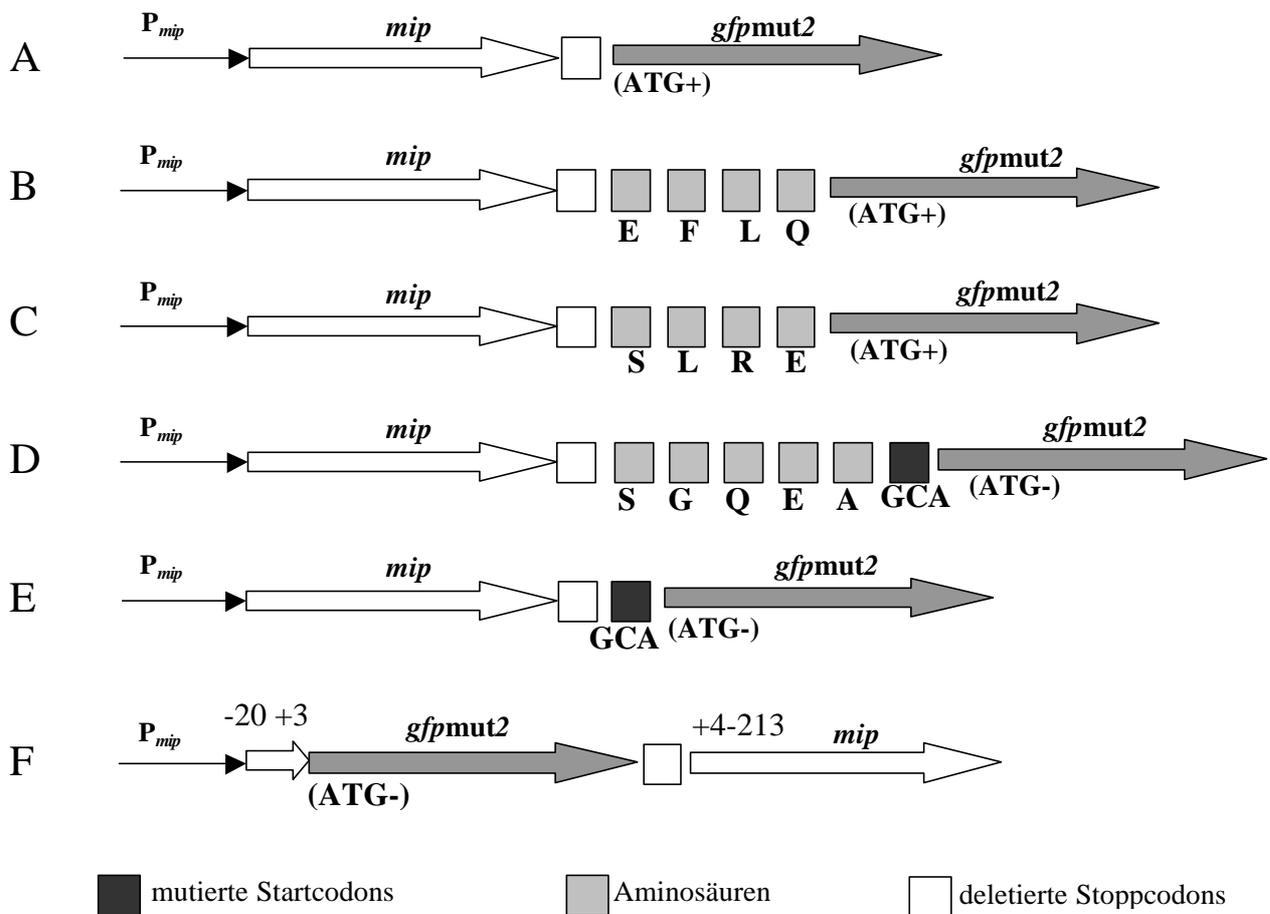


Abb.18): Schematische Darstellung der erzeugten Mip::GFP-Fusionsproteinvarianten (A-F) mit verschiedenen Linkersequenzen und veränderten Start- bzw. Stoppcodons. A: pRK62, B: pRK79, C: pRK80, D: pRK111, E: pRK78 und F: hypothetisches Konstrukt (siehe Text).

Für die Amplifikation der Mip-Sequenz wurden die Primer Mip5'375(GFPM1) und Mip3'1540 und als Template chromosomale DNA von *L. pneumophila* JR32 verwendet. Der Primer mip3'bgl2 bindet am 3'-Ende des *mip* Gens und enthält die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *bgl*II. Zusätzlich wurde das Stoppcodon mutiert und in das für die

Aminosäure Arginin kodierende Tripletts umgewandelt, so dass keine Termination der Translation mehr erfolgen konnte. Das so erzeugte Plasmid wurde als pRK70 bezeichnet. Für die Amplifikation des *gfpmut2* Gens wurde das Plasmid pRK10(pBC(*gfp*)P_{mip}) als Template-DNA verwendet. Hierbei wurde in die am 5' Ende bindenden GFP-Primer eine *bgIII* Schnittstelle eingeführt und als 3' Primer der M13 Reverse primer verwendet, aufgrund dessen zusätzliche Restriktionsschnittstellen für die nachfolgende Umklonierung zur Verfügung standen. Die 5' GFP Primer wurden so gewählt, dass die Linkersequenzen und die *bgIII* Schnittstelle in dem 5' überhängenden und nicht komplementären Teil zur GFP Sequenz des Primers eingebaut wurden. Die generierten PCR-Produkte wurden nach Aufreinigung in den Vektor pGEM T-easy ligiert und in *E. coli* DH5 α transformiert. Die Expression von GFP wurde durch spezifische Primer in der PCR und durch den Einsatz der Fluoreszenzmikroskopie verifiziert. Die *mip*- und *gfp*-Gene wurden jeweils über die *bgIII* Schnittstelle ligiert und der korrekte Übergang, d.h. das Vorhandensein des richtigen Leserasters (in frame), durch Sequenzierung verifiziert. Nachfolgend wurden die erzeugten Fusionsproteine auf ihre Expression im Westernblot untersucht. Für die Transformation in *Legionella* mussten die Fusionsproteine in den Vektor pBC KS umkloniert werden. Die C-terminalen Fusionsproteinklone (vgl. Abb. 18 A-D) wurden konstruiert und ihre Funktionalität evaluiert. Das N-terminale Konstrukt F (vgl. Abb. 18 F) wurde nicht fertiggestellt, da nach der Klonierung der Signalsequenz des Mip-Proteins vor den Anfang des *gfp*-Gens keine Fluoreszenz mehr zu beobachten war, obwohl keine Verschiebung des Leserasters gefunden werden konnte.

4.2.2 Westernblot-Analyse der Mip::GFP- Fusionsproteine

Die funktionale Expression eines Mip::GFP-Fusionsproteins sollte im Westernblot durch die Detektion einer ca. 48 kDa großen Fusionsproteinbande erkennbar sein. Da sowohl das Mip als auch das GFP Protein mit einer Größe von ca. 24 kDa im SDS-PAGE detektiert werden. Da in ersten Versuchen zur Konstruktion eines Mip::GFP-Fusionsproteins keine ausreichende Stabilität des Konstrukts erreicht werden konnte, wurde versucht die Verbindung der beiden Proteine durch Insertion kurzer Linkersequenzen (vgl. Abb. 18) flexibler werden zu lassen. Da vermutet wurde, dass eine sterische Behinderung bei Faltungsvorgängen beider Proteine eine Ursache für die geringe Stabilität des Konstrukts darstellen könnte. Die verwendeten Linkersequenzen wurden bei der Konstruktion anderer GFP-Fusionsproteine bereits verwendet und waren in diesen Zusammenhängen funktionell. Zur Überprüfung der Proteinstabilität wurden 1.5 ml ÜN-Kulturen der Fusionsprotein-exprimierenden *E. coli* Klone pelletiert, in

Proteinaseinhibitorenmix (Complete) resuspendiert, anteilig SDS Probenpuffer dazugegeben und 10 µl davon auf ein SDS-PAGE aufgetragen.

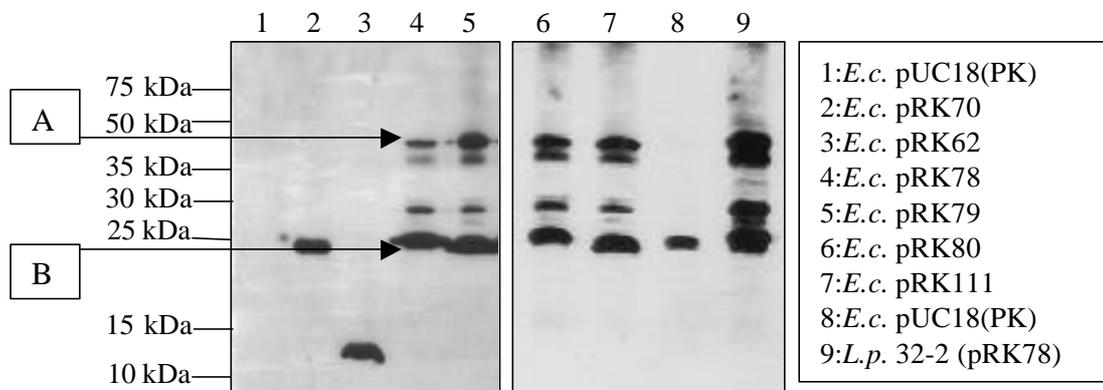


Abb.19): Westernblot-Analyse der Stabilität verschiedener Mip::GFP-Fusionsproteine. Die Pfeile A und B markieren die Fusionsproteinbande (48 kDa) und die Mip-Bande (24 kDa). Spur 1 zeigt die Negativkontrolle, in den Spuren 2 und 8 ist pRK70 als Positivkontrolle aufgetragen. Die Spuren 3, 4, 5, 6, 7 und 9 zeigen verschiedene Fusionsproteine in unterschiedlichen Stammhintergründen (*E. coli* und *Legionella*). Zur Detektion wurde ein Mix der monoklonalen Anti-Mip Antikörper 2D8, 22/1 und 23/1 verwendet.

Wie aus Abbildung 19 zu ersehen, werden neben der erwarteten Hauptbande A, welche das stabile Mip::GFP-Fusionsprotein bei 48 kDa zeigt, auch Mip-Protein (B, 24 kDa) und zahlreiche Degradationsbanden nachgewiesen. Demzufolge kann auch durch die Insertion von flexiblen Linkersequenzen zwischen Mip und GFP keine ausreichende Stabilität erzielt werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Mip::GFP-Fusionsproteine in *E. coli* und *Legionella* keine stabile Struktur einnehmen und teilweise proteolytisch degradiert werden.

4.2.3 Fluoreszenzmikroskopische Analyse von *L. pneumophila* JR32-2(pRK78)

Für GFP-Fusionsproteine konnte bei der Sporulation von *B. subtilis* eine lokale Konzentration bei der Septenbildung an den Grenzen zwischen Mutter- und Tochter-Zelle beobachtet werden. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Expression eines Mip::GFP-Fusionsproteins (pRK78) in *L. pneumophila* JR 32-2 zeigte eine lokale Konzentration von Grünfluoreszenz. Wie in Abbildung 20 zu erkennen, kommt es bei vereinzelt Zellen zu einer Konzentration des Mip::GFP-Fusionsprotein entweder an den Zellpolen oder auch perlschnurartig verteilt über das gesamte Bakterium.

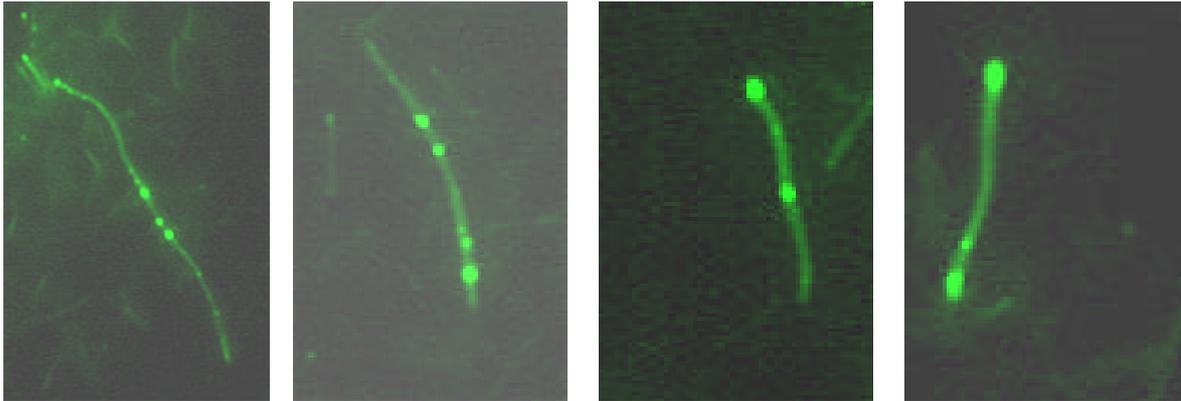


Abb.20): Fluoreszenz-Mikroskopie von *L. pneumophila* JR32-2(pRK78). Die Grünfluoreszenz resultiert aus der Expression eines Mip::GFPFusionsproteins. Dunkelfeld-Darstellung. Vergrößerung 650-1000 fach.

Effekte, wie sie in Abbildung 20 dargestellt sind, konnten für nur mit GFP transformierte Legionellen nicht beobachtet werden. Diese zeigten immer eine homogene Grünfluoreszenz, die über das gesamte Bakterium verteilt war. Inwieweit diese Ergebnisse mit dem tatsächlichen Phänomen des „Protein-Targeting“ in Zellen zusammenhängt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden.

4.2.4 Analyse der Mip::GFP-Fusionsprotein-Prozessierung in *E. coli* und *L. pneumophila*

Um eine mögliche intrazelluläre Translokation des Mip-Proteins innerhalb der Wirtszellen untersuchen zu können, musste sichergestellt werden, dass das Fusionprotein analog dem nativen Mip prozessiert wird. Das Mip-Protein besitzt eine N-terminale Signalsequenz, die von einer Signalpeptidase erkannt und für den Transport über die Cytoplasmamembran hinweg abgespalten wird. Diese Prozessierung ist notwendig, damit Mip als Oberflächen-assoziiertes Protein lokalisiert werden kann. Zur Untersuchung der Lokalisation wurden Periplasma-Präparationen von *E. coli* und *L. pneumophila* durchgeführt, die zuvor mit dem Plasmid pRK78 transformiert wurden. Nachfolgend wurde die periplasmatische Fraktion und das die restlichen Zellbestandteile enthaltene Pellet im Westernblot untersucht.

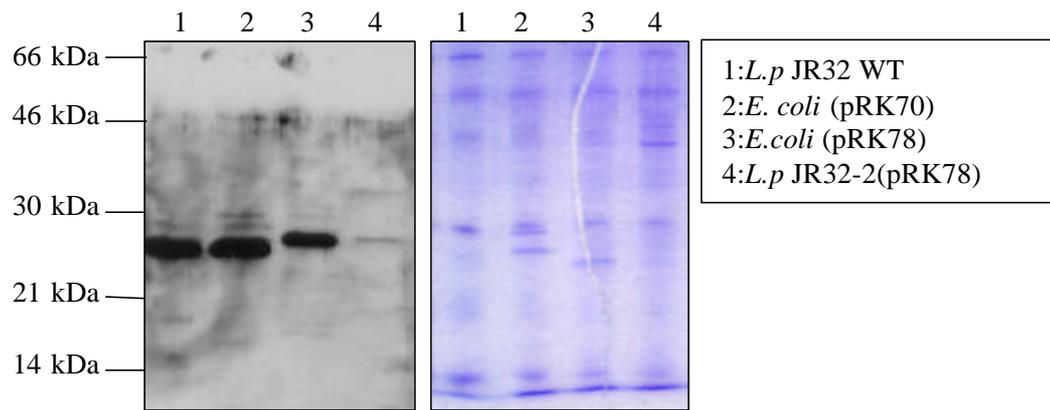


Abb.21): Westernblot-Analyse (links) und SDS-PAGE (rechts) der periplasmatischen Fraktion von *L. pneumophila* WT (1), Mip exprimierenden *E. coli* (2), Mip::*GFP*-Fusionsprotein-exprimierenden *E. coli* (3) und mit Mip::*GFP*-Fusionsprotein komplementierte Mip-Mutante JR32-2 (4). Detektion der Mip Expression im Westernblot mit einem Mix aus monoklonalen Anti-Mip Antikörpern 2D8, 22/1 und 23/1 (Titer: 1:1000).

Wie in Abbildung 21 gezeigt, kann in der periplasmatischen Fraktion von *Legionella* WT und rekombinanten *E. coli* (Spuren 1 und 2) das Vorhandensein von prozessiertem Mip-Protein mit einer Bande von 24 kDa nachgewiesen werden. Für die mit Mip::*GFP*-Fusionsprotein (pRK78) transformierten *Legionella* und *E. coli* Stämme (Spuren 3 und 4) konnte keine entsprechende Mip::*GFP*-Fusionsprotein-Bande im Periplasma nachgewiesen werden. In Spur 3 und 4 wurden mit ca. 26 kDa etwas größere Mip-Banden identifiziert. Die Größenverschiebung wird wahrscheinlich durch von *GFP* stammenden Aminosäuren, die C-terminal fusioniert blieben, verursacht. Da das Fusionsprotein weder im Periplasma von *Legionella* noch von *E. coli* detektiert werden konnte, wurden die aus der Periplasma Präparation resultierenden Pellets auf das Vorhandensein der Fusionsproteinbande hin untersucht.

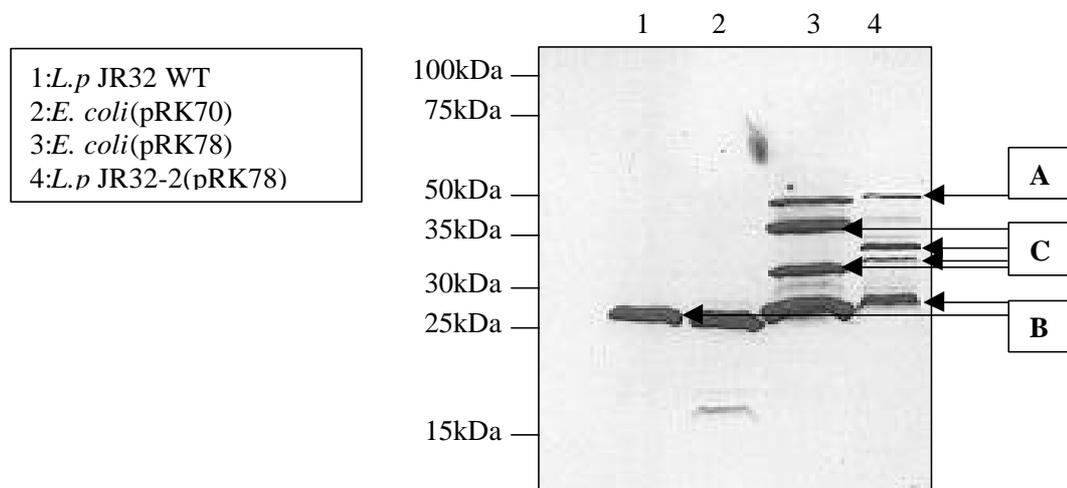


Abb.22): Westernblot-Analyse der aus der Periplasma-Präparation resultierenden Zellpellets. Zur Detektion wurde ein Mix aus den monoklonalen Anti-Mip Antikörpern 2D8, 22/1 und 23/1 eingesetzt. A: Mip::*GFP*-Fusionsproteinbande, B: native Mip-Bande, C: Degradationsbanden.

Wie aus der Westernblot-Analyse (Abb.22) zu ersehen, wird in den Pellets, die hauptsächlich cytoplasmatischen Zellanteil enthalten wahrscheinlich vorwiegend unprozessiertes Mip mit einer Größe von 26 kDa detektiert (Spuren 1 und 2). In Spuren 3 und 4 reagieren sowohl Mip::GFP-Fusionsprotein-, Mip- und Degradationsbanden gleichzeitig mit dem Anti-Mip Antikörpern. Ein vergleichbares Bild von Degradationsbanden des Fusionsproteins lässt sich durch die Verwendung von polyklonalem Anti-GFP Antikörpern darstellen (nicht gezeigt). Demzufolge wird das Fusionsprotein nicht über die Cytoplasmamembran transportiert. Diese Ergebnisse lassen die Verwendung von Mip::GFP-Fusionsproteinen, zur Detektion von Translokationsereignissen innerhalb von Wirtszellen als nicht sinnvoll erscheinen.

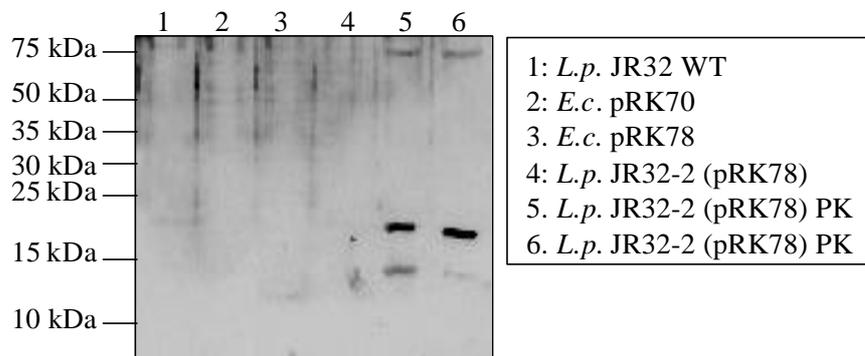


Abb.23): Westernblot-Analyse der Periplasmapräparation zur Kontrolle auf cytoplasmatische Protein-Verunreinigungen. Spuren 1-4 Periplasmapräparation, Spur 5 lysiertes Bakterienpellet und Spur 6 vollständig osmolysierte Zellen (H₂O und Deoxycholat). Zur Detektion wurde polyklonaler Anti-Lcy-Antikörper verwendet.

Zur Kontrolle auf cytoplasmatische Proteine in der Periplasmapräparation wurde der in Abbildung 22 dargestellte Blot gestrippt und mit dem polyklonalen Antikörper α -Lcy 280 inkubiert (vgl. Abb. 23). Dieser Antikörper erkennt das cytoplasmatisch lokalisierte *Legionella* Cyclophilin Lcy. Es konnten keine cytoplasmatischen Proteine für die in Spuren 1-4 aufgetragenen Periplasmapräparationen nachgewiesen werden. In den Spuren 5 und 6 wurden das lysierte Zellpellet und eine Periplasmapräparation, die mit destilliertem Wasser und Deoxycholat vollständig osmolysiert wurde als Kontrolle verwendet. Die in Spuren 5 und 6 zu detektierende Proteinbande in der Höhe von 18 kDa entspricht der des *Legionella* Cyclophilins. Da in den Spuren 1-4 eine solche Bande nicht zu detektieren war konnte gezeigt werden, dass die Periplasmapräparation vorwiegend nur periplasmatische Proteine, bzw. kaum cytoplasmatische Proteinverunreinigungen enthält.

4.2.5 Zusammenfassung

Durch die Konstruktion eines Mip::GFP-Fusionsproteins sollte die Möglichkeit einer Translokation des Mip-Proteins während der intrazellulären Vermehrung untersucht werden. Erste Versuche einer direkten Fusion beider Proteine resultierten in einer Instabilität des Fusionsproteins. Dies ist wahrscheinlich auf die dimere Mip-Struktur und einer damit einhergehenden sterischen Behinderung bei der Faltung des Fusionsproteins zurückzuführen. Durch die Einführung verschiedener kurzer Linkersequenzen (4-5 AS) wurde versucht, die Flexibilität im Fusionsbereich beider Proteine zu erhöhen. Es wurden jedoch weiterhin starke Degradationsbanden im Westernblot festgestellt. Wie Lokalisationsstudien in *Legionella* zeigten, wurden die Fusionsproteine nicht mehr durch den TypII-Sekretionssystem-vermittelten Transport über die Cytoplasmamembran transportiert. Aus diesen Gründen erschien die Verwendung eines Mip::GFP Fusionsproteins im Zusammenhang der Untersuchung der Protein-Translokation innerhalb von Wirtszellen als nicht sinnvoll.

4.3 Konstruktion eines N-terminal verkürzten Mip-Proteins

In *in vitro* Assays, die zur Untersuchung der Isomeraseaktivität von Mip durchgeführt werden, konnte ein stabiles C-terminales Fragment des Mip-Proteins, bezeichnet als *L.p.FKBP25*₍₇₈₋₂₁₃₎ identifiziert werden. Durch N-terminale Sequenzierung konnten die Aminosäuren bestimmt werden an denen das Fragment proteolytisch gespalten wird. Das stabile C-terminale Fragment beginnt bei AS 79 des prozessierten Mip-Proteins (Schmidt, 1998, Fanghänel, 1998). Durch die Klonierung des C-terminalen Fragments war es möglich, das Protein näher zu charakterisieren. Die Konstruktion des N-terminal verkürzten Mip-Proteins *L.p.FKBP25*_(-20-3; 80-213) und dessen Charakterisierung wurden von Jörg Fanghänel (Halle) im Rahmen seiner Diplomarbeit durchgeführt. Durch Deletion der N-terminalen Aminosäuren 4-79 wurde ein C-terminales Fragment *L.p. FKBP* des Mip-Proteins erzeugt. Das Fragment AS 80-213 wurde mit dem für die Signalsequenz und das Startcoden (ATG), sowie die ersten 3 AS kodierende Sequenzabschnitt fusioniert. Dieses Fragment verfügt über vollständige Isomerase-Aktivität, ist aber nicht mehr in der Lage *in vitro* zu dimerisieren, da die Dimerisierung über den N-terminalen Bereich des Proteins vermittelt wird (Schmidt, 1996; Fanghänel, 1998).

Das von Jörg Fanghänel (Halle) zur Verfügung gestellte Plasmid pJFM1 diente als Ausgangspunkt für die Klonierung eines „Suicide“-Vektors, der die chromosomale Integration des N-terminal verkürzten Mip-Proteins *L.p.FKBP25*_(-20-3; 80-213) in eine Mip-negative *Legionella* Mutante ermöglichen sollte. Die so erzeugte Mutante, die nur monomeres Mip exprimiert, sollte

dann hinsichtlich ihres intrazellulären Überlebens in *Acanthamoeba castellanii* untersucht werden.

4.3.1 Integration des N-terminal verkürzten *Legionella* Mip *L.p.*FKBP_(-20-3; 80-213) in das Chromosom der Mip negativen Mutante *L.p.* JR32-2

Die Komplementation des Mip-negativen Phänotyps mit dem monomeren Mip-Protein wurde zuerst durch das Einbringen des Plasmids pJFM2 in *trans* versucht. Anschließende Untersuchungen zeigten jedoch, dass das Konstrukt im Verlauf der intrazellulären Vermehrung austitriert wurde.

Die Konstruktion des „Suicide“-Vektors pRK105, der die chromosomale Integration des N-terminal verkürzten Mip-Proteins *L.p.*FKBP_(-20-3; 80-213) ermöglichen sollte, wurde wie folgt durchgeführt. Das N-terminal verkürzte *mip*-Gen wurde als ein 1.5 kB großes Fragment aus dem Plasmid pJFM2 mit den Restriktionsenzymen *Sac*I und *Xba*I herausgeschnitten. Die Bande wurde aus dem Gel eluiert und in den ebenfalls mit *Sac*I und *Xba*I aufgeschnittenen „Suicide“-Vektor pMSS704-1 einkloniert. Dieser Vektor kann sich extrachromosomal nur in Gegenwart des durch den ϕ -Phagen kodierten Pir-Proteins replizieren. Das Konstrukt wurde in den *E. coli* Stamm SY327 ϕ pir transformiert und durch Selektion auf Chloramphenicol-Platten konnten positive Klone erhalten werden. Die Identifizierung der *E. coli* Klone, die *L.p.*FKBP_(-20-3; 80-213) plasmidkodiert (pRK105) exprimieren, wurde zuerst auf DNA-Ebene mittels PCR überprüft. Positive Klone wurden in der Westernblot-Analyse auf die Expression des N-terminal verkürzten Mip-Proteins analysiert. Es konnte ein Klon identifiziert werden, der sowohl in der PCR als auch im Westernblot die richtige Fragmentgröße zeigte. Dieses Konstrukt wurde zur Transformation von *L.p.* JR32-2 (Mip-) verwandt, um die Komplementation des Mip-negativen Phänotyps in *cis* zu erreichen. Diese Strategie ist in Abbildung 24 schematisch dargestellt.

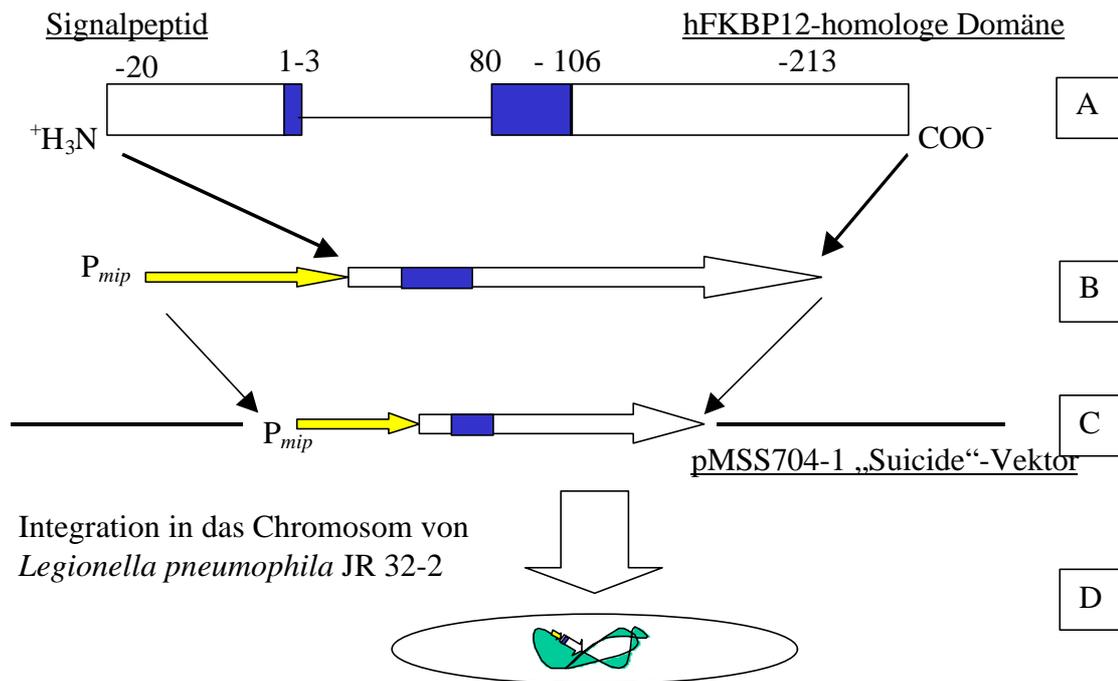


Abb.24): Schematische Darstellung der klonierten *L.p.* FKBP25_(-20-3; 80-213) Fragmente in A, Konstrukt unter Kontrolle des Mip Promoters in B; Umklonierung in den „Suicide“-Vektor pMSS704-1 in C und Integration des Konstrukts in das Genom von *L. pneumophila* JR32-2 in D.

4.3.2 Westernblot-Analyse der Expression von *L.p.* FKBP25_(20-3; 80-213) in *L. pneumophila* JR32-2.4

Des N-terminal verkürzte Mip-Protein besitzt im SDS-PAGE eine Größe von nur 17 kDa und lässt sich somit leicht von der Expression des nativen Mip-Proteins (24 kDa) unterscheiden. Dafür wurden ÜN-Kulturen verschiedener Mip-Protein exprimierender Stämme wie unter 3.9.4 beschrieben angezogen und der Analyse im Westernblot unterzogen (vgl. Abb.25). In Spuren 1 und 2, in der *L.p.* JR32WT und der Mip-exprimierende *E. coli* Stamm pRK70 aufgetragen wurden, kann das native Mip-Protein mit einer Bande von 24 kDa detektiert werden. In den Spuren 3-5 konnte jeweils das N-terminal verkürzte Mip mit einer Größe von 17 kDa in verschiedenen Stammhintergründen detektiert werden. In Spur 6, in der als Negativkontrolle eine Mip-negative Mutante aufgetragen wurde, konnte kein Signal erhalten werden. Die Ergebnisse der Westernblot-Analyse belegen, dass in der Komplementante *L.p.* JR32-2.4, die mit dem „Suicide“-Vektor pRK105 transformiert wurde, im Gegensatz zum WT nur das N-terminal verkürzte Mip-Protein exprimiert wird.

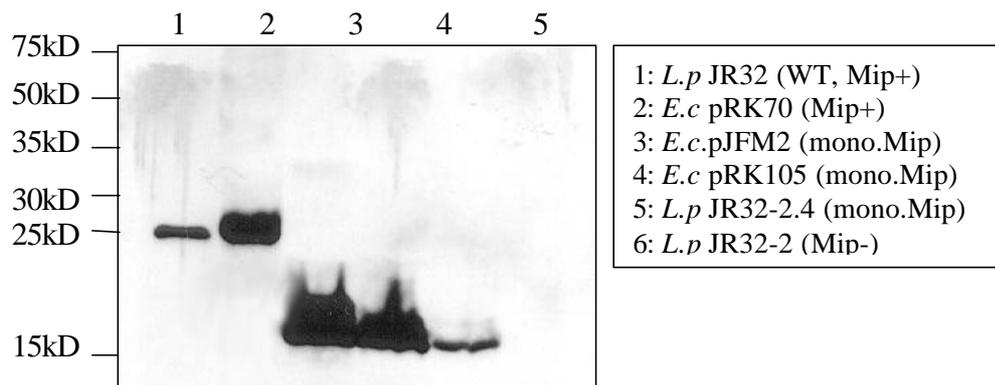


Abb.25): Westernblot-Analyse der rekombinanten *E. coli* und *Legionella*-Stämme, die mit den Vektoren pRK70, pJFM2 und dem „Suicide“-Vektor pRK105 transformiert wurden. Die Westernblot-Analyse wurde mit einem Mix aus den monoklonalen Anti-Mip Antikörpern 2D8, 22/1 und 23/1 (1:1000) entwickelt.

4.3.3 Southernblot-Analyse der chromosomalen Integration in *L.p.* JR32-2.4

Zur Analyse der Integration des „Suicide“-Vektors pRK105 in das Chromosom von *L. pneumophila* JR32-2 wurde eine Southernblot-Analyse durchgeführt.

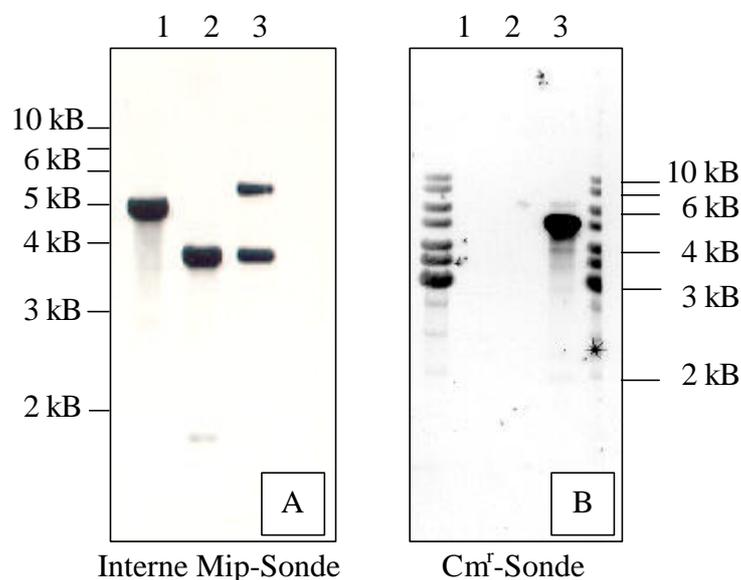


Abb.26): Southernblot-Analyse von chromosomaler DNA aus *L. pneumophila* PhilII JR32 (*mip*+)(1), *L. pneumophila* PhilII JR32-2 (*mip*-)(2), *L. pneumophila* PhilII JR32-2.4 (*mip*+,*L.p.*FKBP_(-20-3, -80-213))(3). Die DNA wurde mit *Bam*H1 und *Cla*I gespalten und mit einer internen *mip*-spezifischen Sonde (A), sowie dem Chloramphenicolresistenzgen (B) hybridisiert.

Dazu wurde wie unter 3.7.3 beschrieben chromosomale DNA der Stämme *L.p.* JR32, *L.p.* JR32-2, *L.p.* JR32-2.2 isoliert und nach Restriktion mit den Enzymen *Cla*I und *Bam*H1 in einem Agarosegel aufgetrennt und im Southernblot untersucht. Für die Amplifikation der 0.8 kB großen Mip-Sonde wurden die Primer Mip2 92 und Mip3 912 und als Template chromosomale DNA von *L. pneumophila* PhilII JR32 verwendet. Im Chromosom des Wildtyp-Stammes *L.p. PhilII JR32* liegt das *mip*-Gen auf einem 4.5 kB großen *Bam*H1/*Cla*I- Fragment vor.

Wie in Abbildung 26 A Spur 1 zu erkennen, kann bei 4.5 kB ein Hybridisierungssignal, das dem wildtypischen Fragment entspricht, detektiert werden. In Spur 2 ist das Hybridisierungsereignis bei einer Größe von 3.5 kB zu erkennen. Die Verkleinerung des Fragments im Mip negativen Stamm *L.p.* JR32-2 lässt sich durch die Integration einer Kanamycin-Kassette und des *Sac*B Gens in das *mip*-Gen erklären. Hierbei wurden zusätzliche Restriktionsschnittstellen für *Bam*H1 und *Cla*I eingeführt. Die Sonde wurde jedoch nur aus N-terminalen Sequenzabschnitten des *mip* Gens amplifiziert. In Spur 3 ist die Komplementante *L.p.* JR32-2.4 (Monomer) aufgetragen, die zusätzlich zur 3,5 kB Bande noch eine 5.3 kB Bande aufweist.

Bei Verwendung einer Sonde, die komplementäre Sequenzen zu dem *cat* Gen aus pMSS704-1 aufweist, amplifiziert durch die Primer *cat*5'RE und *cat*3'RE (ca. 3 kB), konnte beim Stamm *L. pneumophila* PhilII JR32 und der Mip-Mutante *L. pneumophila* PhilII JR32-2 wie erwartet kein Hybridisierungsereignis festgestellt werden. Dagegen konnte im Southernblot (Abb. 26 B Spur 3) eine Bande der Größe 5.3 kB detektiert werden. Diese Bande stimmt mit der in Abbildung 26 A Spur 3 auftretenden Bande überein und bestätigt die Integration des „Suicide“-Vektors pRK105MM in das Chromosom von *L. pneumophila* PhilII JR32-2. Der resultierende Stamm wurde *L. pneumophila* PhilII JR32-2.4 genannt.

4.3.4 Intrazelluläre Vermehrung von *L. pneumophila* JR32-2.4 in *A. castellanii*

Um den Einfluss des Monomer-Zustandes des Mip-Proteins auf das intrazelluläre Überleben von *L. pneumophila* innerhalb des natürlichen Wirtes *A. castellanii* zu untersuchen, wurden wie unter 3.6 beschriebene Invasionsassays durchgeführt und über Bestimmung der CFU die intrazelluläre Vermehrung quantifiziert. Neben der im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Komplementante *L. pneumophila* PhilII JR32-2.4 wurden zum Vergleich der Mip positive Wildtyp Stamm *L. p.* PhilII JR32, die Mip-negative Mutante *L.p.* PhilII JR32-2 und die mit nativem Mip transformierte Komplementante *L.p.* PhilII JR32-2.1 untersucht.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 dargestellt. Die Zellzahlen, die aus den Amöben nach 0, 24 und 48 Stunden (nach Gentamicin) intrazellulärem Wachstum isolierten Legionellen sind in Form der Zehnerlogarithmen der CFU-Mittelwerte angegeben.

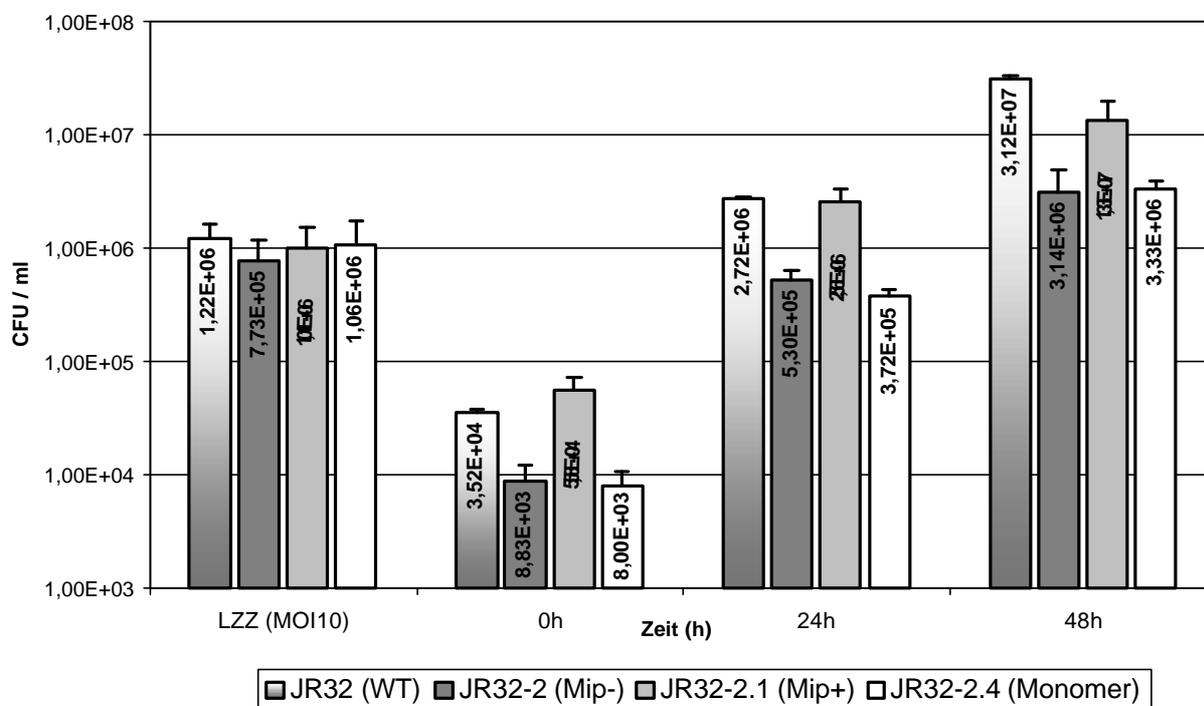


Abb.27): Quantifizierung der intrazellulären Vermehrung der mit monomerem Mip komplementierten Mutante *L.p.* PhilII JR32-2.4, der Mip-Komplementante *L.p.* PhilII JR32-2.1 und des Mip negativen Stammes *L.p.* PhilII JR32-2, sowie der Komplementante *L.p.* PhilII JR32-2.1 in *A. castellanii*. 1×10^5 Zellen wurden mit einer MOI von 10 für 2 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ infiziert.

Wie aus Abbildung 27 zu entnehmen, kann zwischen dem Wildtyp-Stamm *L.p.* PhilII JR32 und der Mip-negativen Mutante *L.p.* PhilII JR32-2 ein Unterschied in der initialen Aufnahme von ca. Faktor 10 festgestellt werden. Die Legionellen vermehren sich insgesamt um 2 bis 3 log-Stufen über einen Zeitraum von 48 Stunden. Die Mip-Komplementante *L.p.* PhilII JR32-2.1₍₋₂₀₋₂₁₃₎ zeigte ein intrazelluläres Wachstum, das vergleichbar dem des Wildtypstammes ist.

Für *L.p.* PhilII JR32-2.4_(-20-3,80-213) wird deutlich, dass keine Komplementation entsprechend dem wildtypischen Wachstum erreicht wurde. Der Stamm erreichte die gleichen CFU-Werte wie die Mip negative Mutante. Da das Konstrukt chromosomal stabil integriert war, kann eine Vektor-Titration während des Infektionsverlaufs ausgeschlossen werden. Alle der willkürlich ausgewählten, ohne Selektion auf BCYE-Agarplatten gewachsenen Kolonien von *L.p.* PhilII JR32-2.4_(-20-3, 80-213), die auf das Vorhandensein des integrierten Konstrukts untersucht wurden,

zeigten nach 48 Stunden intrazellulärer Vermehrung eine positive Reaktion in der PCR (nicht gezeigt). Auch diese Daten bestätigen die stabile Integration in das Chromosom von *Legionella pneumophila* JR32-2. Die intrazelluläre Replikation der verschiedenen *Legionella*-Stämme in *A. castellanii* ist durch das Fehlen des ganzen bzw. N-terminal verkürzten Mip-Proteins nicht beeinträchtigt, was durch die vergleichbaren Generationszeiten deutlich wird. Darüber hinaus machen die Ergebnisse dieser Untersuchung deutlich, dass das Mip-Protein für die Invasion bzw. frühe Etablierung innerhalb der Amöben wichtig ist.

4.3.5 Zusammenfassung

Durch die Konstruktion des „Suicide“-Vektors pRK105 und dessen Integration in das Chromosom von *L. pneumophila* JR32-2 wurde der nur noch monomeres Mip exprimierende Stamm *L. pneumophila* JR32-2.4 erzeugt. Die korrekte chromosomale Integration und die Expression des veränderten monomeren Mip-Proteins (*L.p.*FKBP_(-20-3, 4-213)) wurden durch Southernblot- bzw. Westernblot-Analysen verifiziert. Die Durchführung von Invasionsassays in *A. castellanii* zeigte, dass diese *Legionella*-Komplementante *L.p.* JR32-2.4, den durch die Mip-Deletion verursachten Phänotyp im monozellulären System nicht zu komplementieren vermag und demzufolge die dimere Struktur des *Legionella* Mip-Proteins entscheidend zur Virulenz im monozellulären System beiträgt.

4.4 Site-spezifische Mutagenese der N-terminalen Mip-Domäne

Die site-spezifische Mutagenese bestimmter Aminosäuren im N-terminalen Bereich des Mip-Proteins wurde durchgeführt, um Aussagen über die an der Dimerisierung beteiligten Aminosäuren zu machen. Der Einfluss einer N-terminalen Deletion des Mip-Proteins auf die Pathogenität von *L. pneumophila* konnte, wie im vorherigen Kapitel gezeigt, nachgewiesen werden. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass über den N-Terminus nicht nur die Dimerisierung bewerkstelligt wird, sondern dieser noch andere Funktionen übernimmt, sollte durch Einführung gezielter Mutationen (site-spezifische Mutagenese) in die N-terminale Domäne des Mip-Proteins die Dimerisierung unterbunden und ein stabiles monomeres Protein erzeugt werden. Die Durchführung erfolgte wie unter 3.7.17 beschrieben.

4.4.1 Auswahl und Konstruktion der Mip-Proteinvarianten

Die Auswahl der durchzuführenden Aminosäureaustausche erfolgte basierend auf der dreidimensionalen Struktur des Mip-Proteins, die mittels Röntgenkristallstrukturanalyse erhalten

wurde (Riboldi-Tunnicliffe *et al.*, 2000). Dabei wurden Aminosäurereste der Dimerisierungsdomäne, die aufgrund ihres Abstandes potentiell in der Lage sind mit Resten des anderen Monomers zu interagieren, für die Mutationsanalysen ausgewählt. Die Auswahl der neu eingeführten Aminosäurereste erfolgte hinsichtlich einer Verhinderung der jeweiligen Wechselwirkung durch Wegfall der entsprechenden funktionellen Gruppe. Es wurden folgende Aminosäureaustausche eingeführt:

- | | |
|--|-------------------------|
| 1) K ¹¹ A/D ³² A | 5) M ⁴² A |
| 2) S ¹⁵ A | 6) M ^{38,42} A |
| 3) Y ¹⁶ F/D ⁴⁴ A | 7) M ^{38,42} E |
| 4) A ³⁷ F | |

Für die Generierung der site spezifisch veränderten Mip-Proteinsequenzen wurde entweder als Ausgangsplasmid pRK31 (komplette Amplifikation des Plasmids) oder chromosomale DNA (Teilamplifikation von Genabschnitten) des Stamms *L. pneumophila* PhilI JR32 eingesetzt. Die für die site spezifischen Mutagenese verwendeten Primer (*vgl.* 3.4.3) wurden aus der Mip-Sequenz von Engleberg *et al.*, 1989 abgeleitet und Basenaustausche an den jeweiligen Positionen, des zu mutierenden Codons innerhalb der Sequenz eingeführt. Dazu wurden wie unter 3.7.17 beschrieben, das Mip-Gen in zwei aneinanderstoßenden Sequenzabschnitten mittels PCR amplifiziert und diese nachfolgend durch Ligation verbunden. Durch eine nochmalige PCR wurde mit Mip 5' und Mip 3' Primern speziell der ligierte Genabschnitte amplifiziert, nachfolgend in den Vektor pGEMTeasy inkloniert und in *E. coli* DH5 α transformiert. Als praktikabler erwies sich die Amplifikation des gesamten Plasmids pRK31 (komplette Mip-Sequenz + Mip-Promoter) unter Verwendung entsprechender Mutageneseprimer (*vgl.* 3.4.3). Zur Identifikation positiver Klone, wurde die funktionale Expression der Proteinvarianten mittels Immunokolonieblot-Analyse (*vgl.* 3.9.5) nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Die Richtigkeit der eingeführten Mutationen wurde durch Sequenzierung der Konstrukte bestätigt. Alle der so erzeugten Proteine wurden bis zur Homogenität gereinigt und auf ihren Dimerisierungsstatus bzw. Stabilität hin untersucht.

4.4.2 Sequenzanalyse der veränderten Mip-Proteine

Zur Dokumentation der einzelnen Basenaustausche wurden die Konstrukte sequenziert und in der BLAST Datenbank (*vgl.* 3.7.18) ein Sequenzvergleich durchgeführt. Im folgenden werden die Sequenzen als „Alignment“ zusammen mit der ermittelten Ursprungssequenz des *Legionella* Mip-Proteins dargestellt. Die site-spezifischen Basenaustausche der einzelnen Mutanten sind aus

F) pRK118(K¹¹A, D³²A)

```

                                10 11 12 13 14
Query: 332 gcaaccgatgccacatcattagctacagacgcggataagttgtcttatagcattggtgcc 391
          |||
Sbjct: 61 gcaaccgatgccacatcattagctacagacaaggataagttgtcttatagcattggtgcc 120
          |||
          Lys11>Ala

```

```

                                29 30 31 32 33 34
Query: 392 gatttggggaagaattttaaaaaatcaaggcataggctgtaataccggaagcaatggctaaa 451
          |||
Sbjct: 121 gatttggggaagaattttaaaaaatcaaggcataggatgtaataccggaagcaatggctaaa 180
          |||
          Asp32>Ala

```

G) pRK123(M^{38,42}E)

```

                                                37 38 39 40
Query: 378 gatttggggaagaattttaaaaaatcaaggcatagatgtaataccggaagcagaagctaaa 437
          |||
Sbjct: 121 gatttggggaagaattttaaaaaatcaaggcatagatgtaataccggaagcaatggctaaa 180
          |||
          Met38>Glu

          41 42 43
Query: 438 ggcgaacaagacgctatgagtgccgctcaattggctttaaccgaacagcaaatgaaagac 497
          |||
Sbjct: 181 ggcatgcaagacgctatgagtgccgctcaattggctttaaccgaacagcaaatgaaagac 240
          |||
          Met42>Glu

```

Abb.28): Ergebnisse aus der Sequenzanalyse der site spezifisch veränderten Mip-Proteine. Die Analyse wurde mittels „BLAST search“ durchgeführt. Dargestellt sind nur die Teilbereiche der Sequenzen, in denen die Mutationen eingeführt wurden.

4.4.3 Reinigung und Stabilität der Proteinvarianten

Die Analyse der Expression der Proteinvarianten im Westernblot zeigte, dass einige der Proteinvarianten offensichtlich proteaselabil sind, was durch das Auftreten von niedermolekularen Banden im Vergleich zum *E. coli*- Klon DH5á (pRK31), der das wildtypische Mip enthält, gekennzeichnet war (vgl. Abb. 29). Um sicherzustellen, dass alle Proteinfragmente detektiert werden, wurde eine Mischung verschiedener Anti-Mip monoklonaler Antikörper, die verschiedene N- und C-terminale Epitope des Proteins erkennen, zur Westernblot-Analyse verwendet. Die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Bettina König (Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft, Halle) durchgeführt.

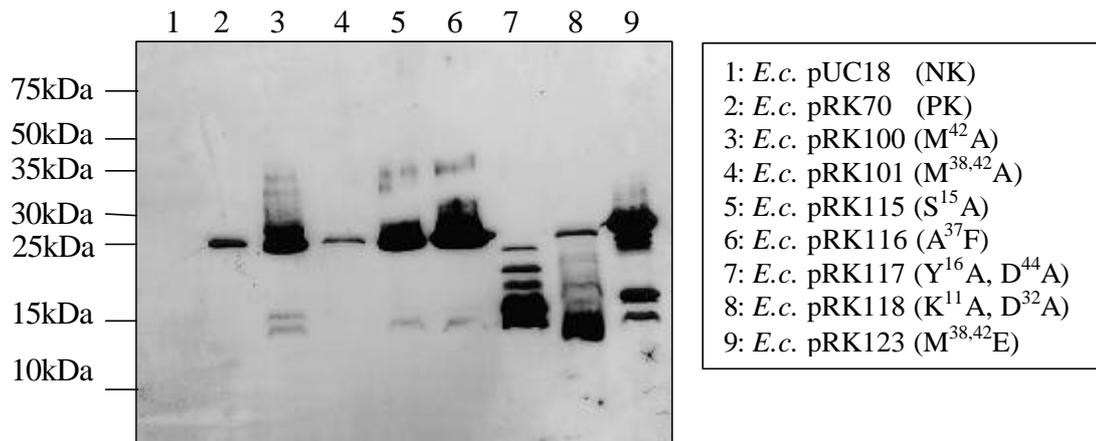


Abb.29): Westernblot-Analyse von Gesamtzelllysaten der site-spezifisch veränderten Mip-Proteine in *E. coli* DH5 α . Die Detektion erfolgte mit einer Mischung aus den monoklonalen Antikörpern 2D8, 22/1 und 23/1, die N und C-terminal verschiedene Mip-Epitope erkennen. Bahn 1: pUC18 (Negativkontrolle); Bahn 2: *E.c.* pRK70 (Positivkontrolle).

Nachfolgend wurden alle Proteinvarianten ausgehend von den entsprechenden rekombinanten *E. coli*-Stämmen bis zur Homogenität gereinigt. Hierbei bestätigten sich die Ergebnisse des Westernblots hinsichtlich der Proteaselabilität einiger Proteinvarianten. Während die Proteinvarianten S¹⁵A, A³⁷F, M⁴²A und M^{38,42}A über die Reinigungsprozedur hin stabil waren, wurden für die Proteinvarianten K¹¹A/D³²A, Y¹⁶F/D⁴⁴A und M^{38,42}E hauptsächlich Fragmente und kaum oder gar kein Vollängenprotein erhalten. Für die Proteinvariante M^{38,42}E gelang es allerdings, durch Zusatz von Proteaseinhibitoren zum Zellaufschluß die Proteolyse größtenteils zu verhindern, so dass auch hier fast bandenreines Protein erhalten wurde. Die Charakterisierung dieser Proteinvariante dauerte bei Fertigstellung dieser Arbeit noch an. Bei der Variante K¹¹A/D³²A brachte der Einsatz von Proteaseinhibitoren dagegen keine Verbesserung der Proteinestabilität mit sich. Um die entstandenen Fragmente näher zu charakterisieren, wurden Westernblot-Analysen mit monoklonalen Antikörpern, die verschiedene N- und C-terminale Epitope des Mip-Proteins erkennen, durchgeführt. Die Fragmente der Proteinvariante K¹¹A/D³²A im Molekulargewichtsbereich von 10-12 kDa reagierten nur mit monoklonalen Antikörpern, die Epitope in der N-terminalen Domäne des Proteins erkennen (2D8, 20/5, 32/2, vgl. Abb. 31). Mit den Antikörpern 22/1 und 48/2, die in der C-terminalen Domäne des Mip-Proteins binden, konnte eine schwache Bande bei ca. 24 kDa angefärbt werden, die vermutlich dem Vollängenprotein entspricht.

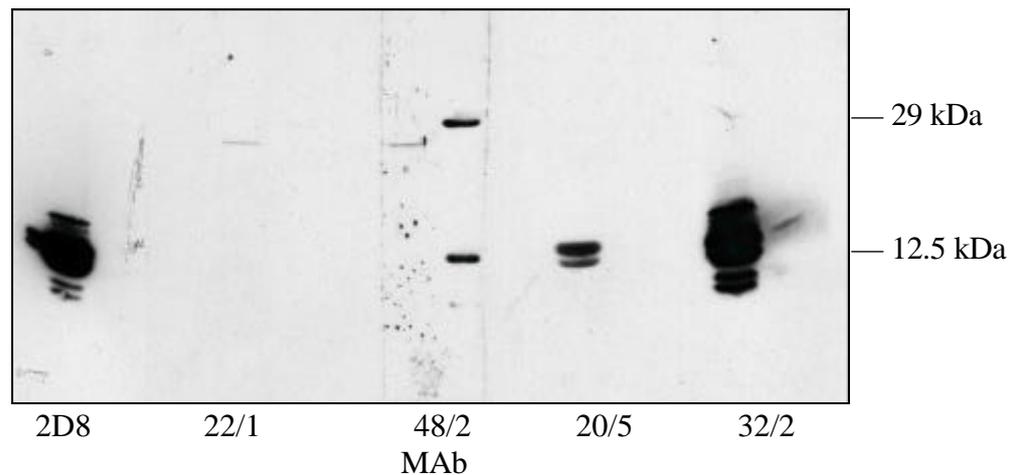


Abb. 30): Westernblot-Analyse der gereinigten Mip-Proteinvariante $K^{11}A/D^{32}A$ mit verschiedenen Anti-Mip monoklonalen Antikörpern (MAb) (Titer 1:1000). Die Antikörper 2D8, 20/5 und 32/2 erkennen Epitope innerhalb der N-terminalen Domäne des Mip-Proteins, die Antikörper 22/1 und 48/2 binden innerhalb der C-terminalen Mip-Domäne.

Die Westernblot-Analyse der Variante $Y^{16}F/D^{44}A$ zeigte dagegen, dass offensichtlich nur C-terminale Fragmente vorhanden sind, da keine Bindung der Antikörper, die N-terminale Epitope erkennen, zu beobachten war (Daten nicht gezeigt). Zur weiteren Charakterisierung der Fragmente wurden diese einer N-terminalen Sequenzierung und einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Zur Analyse der Variante $K^{11}A/D^{32}A$ wurde Protein auf PVDF-Membran geblottet und sequenziert, im Fall der Variante $Y^{16}F/D^{44}A$ wurde die Probe mittels HPLC aufgereinigt, entsalzt und ebenfalls sequenziert. Für die massenspektrometrische Analyse wurde in allen Fällen HPLC-gereinigte Proben verwendet. Bei der Variante $K^{11}A/D^{32}A$ wurde für alle untersuchten Fragmente die N-terminale Sequenz des Mip-Proteins beginnend mit Aminosäure 1 (Ala) des reifen Proteins ermittelt. Schlussfolgernd aus den mittels ESI-MS bestimmten molekularen Massen lagen folgende Fragmente des Proteins vor: 1-185, 1-113, 1-108, 1-106, 1-93, 1-75, wobei der Hauptanteil aus den Fragmenten 1-113, 1-108 und 1-106 besteht. Diese Fragmente, die der Doppelbande bei 10-12 kDa im SDS-PAGE entsprechen (vgl. Abb. 30), bestehen damit aus der N-terminalen Domäne und der gesamten Helix α_3 des Mip-Proteins. Die N-terminale Sequenzierung der Mip-Variante $Y^{16}A/D^{44}A$ lieferte 3 N-Termini, RTAEF, AKRTA und TAEFN, die der Mip-Sequenz ab Aminosäurerest 73, 71 bzw. 74 des reifen Proteins entsprechen. Die massenspektrometrische Analyse zeigte, dass keine C-terminale Verkürzung vorliegt, so dass für diese Proteinvariante die Fragmente 73-213, 71-213 und 74-213 erhalten wurden. Das korreliert auch mit dem Auftreten einer Bande bei ca. 17 kDa im SDS-PAGE (vgl.

Abb. 29). Das so erzeugte Fragment ist nahezu identisch mit dem unter 4.3 beschriebenen monomeren Fragment, dass mittels einer N-terminalen Sequenzdeletion erzeugt wurde.

4.4.4 Analyse des oligomeren Zustandes der Proteinvarianten

Der Einfluss der eingeführten Mutationen auf den oligomeren Zustand der erzeugten Proteinvarianten wurde mittels Gelfiltration und chemischer Quervernetzung untersucht.

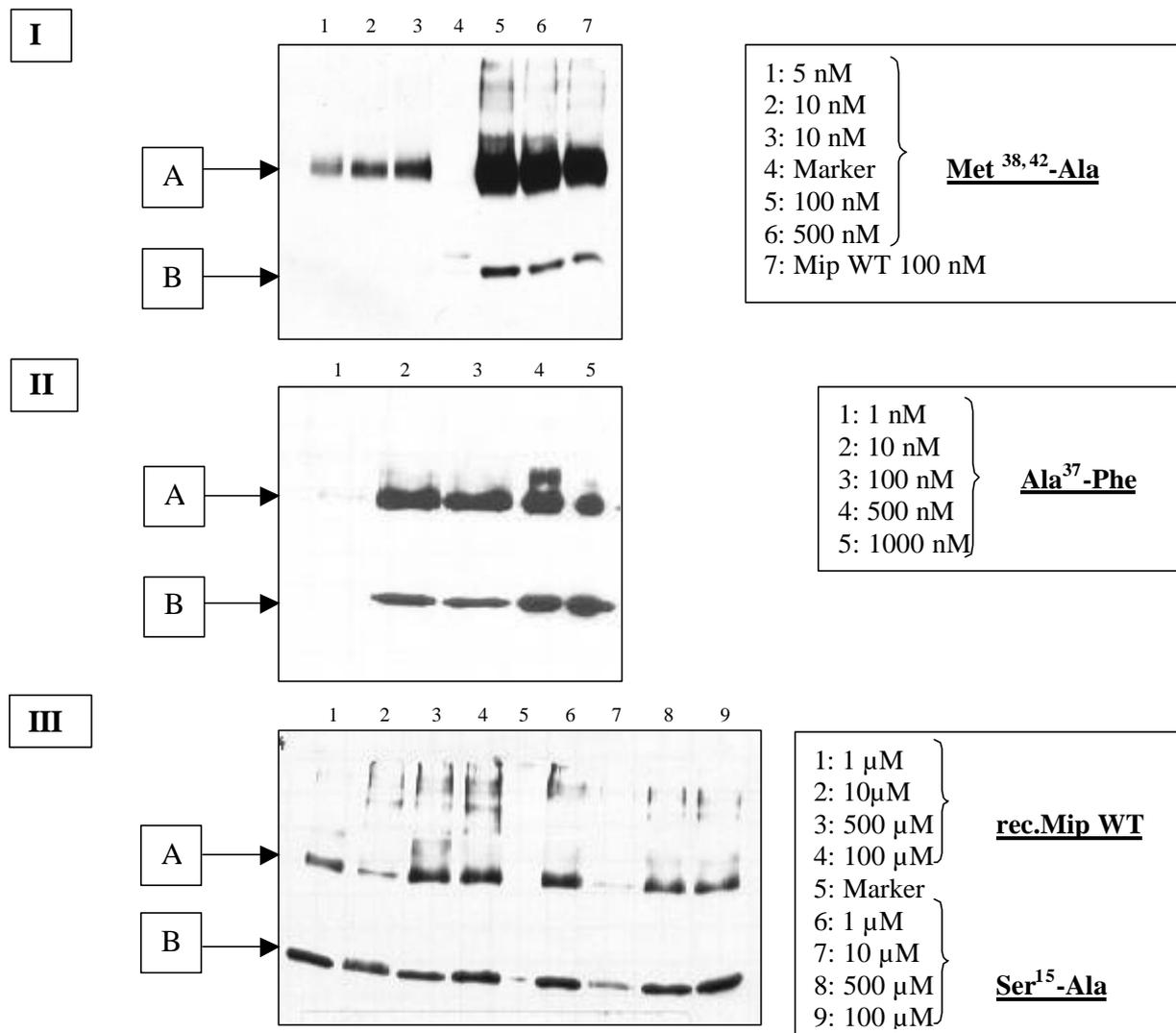


Abb.31): Westernblot-Analyse der Quervernetzung der site-spezifischen veränderten Mip-Proteinvarianten S¹⁵A (I), A³⁷F (II) und M^{38,42}A (III) mit Dimethylpimelimidat. Die Proben wurden entsprechend verdünnt, über Nacht bei 4°C inkubiert, mit oder ohne Zusatz von DMP (10 mM) für eine Stunde bei 25°C in 0.1 M Na-Phosphat-Puffer, pH 9.1 inkubiert und mit SDS-Probenpuffer versetzt. A: Mip-Dimer (48 kDa) und B: Mip-Monomer (24 kDa). Die verwendeten Protein-Konzentrationen sind im Kasten daneben angegeben

Für die Varianten M⁴²A und M^{38,42}A konnte in der Gelfiltration an Superdex 75 (Smart-System) bis zum Detektionslimit (nM) keine Monomerbande gefunden werden, die Proteine zeigten ein

Laufverhalten identisch dem des Wildtyp-Proteins (Daten nicht gezeigt). Der oligomere Zustand der Variante $M^{38,42}A$ wurde weiterhin in Quervernetzungsexperimenten mit Dimethylpimelimidat analysiert. Wie in Abb. 31 I zu sehen, konnten durch DMP bis zu einer Konzentration von 5 nM dimere Moleküle der Variante quervernetzt werden, was durch das Auftreten einer Bande bei 48 kDa gekennzeichnet ist. Für die Variante $A^{37}F$ konnte der dimere Zustand des Proteins bis zu einer Konzentration von 1 nM durch Quervernetzung nachgewiesen werden (Abb. 31 II). Eine Quervernetzung der Varianten $S^{15}A$ (Abb. 31, III) und $K^{11}A/D^{32}A$ (Abb. 32) bei mikromolaren Konzentrationen war ebenfalls möglich.

Für die molekulare Masse der Proteinvariante $Y^{16}F/D^{44}A$ wurde in Gelfiltrationsexperimenten ein Wert von 16.8 kDa bestimmt, was mit der mittels ESI-MS bestimmten Masse der Fragmente übereinstimmt und den monomeren Zustand des Fragmentes unter den gewählten Bedingungen belegt. Dieser monomere Zustand konnte in Quervernetzungsexperimenten bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Für die Variante $K^{11}A/D^{32}A$ wurde in der Gelfiltration ein Laufverhalten gefunden, das einer molekularen Masse von 36 kDa entspricht und damit den in den Quervernetzungsexperimenten gefundenen dimeren Zustand der Fragmente bestätigt. Untersuchungen bei niedrigeren Konzentrationen mit dieser Variante wurden noch nicht durchgeführt.

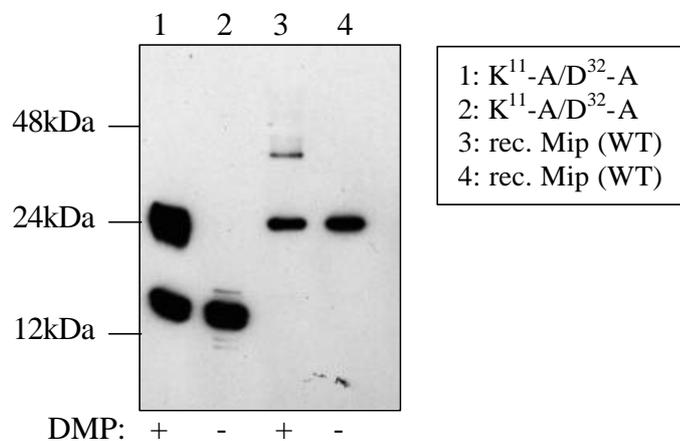


Abb.32): Westernblot-Analyse der Quervernetzung Mip-Variante $K^{11}A/D^{32}A$ mit Dimethylpimelimidat. Die Proteinvariante und der Mip-Wildtyp (WT) wurden jeweils in mikromolaren Konzentrationen 1 h mit (+) oder ohne (-) Zusatz von DMP (5 mM) in 0.1 M Na-Phosphat-Puffer, pH 9.1 bei 25°C inkubiert und danach mit SDS-Probenpuffer versetzt.

In der Tabelle 12 sind die erhaltenen Daten der untersuchten Mip-Proteinvarianten bezüglich Proteasestabilität und Dimerisierung zusammengefaßt.

Tab. 12): Zusammenfassung der proteinchemischen Eigenschaften untersuchten Mip-Proteinvarianten.

Proteinvariante	<i>E. coli</i> -Stamm	Proteasestabilität	oligomerer Zustand
K ¹¹ A/D ³² A	<i>E. coli</i> (pRK118)	instabil, N-terminale Fragmente	dimer
S ¹⁵ A	<i>E. coli</i> (pRK115)	stabil	dimer
Y ¹⁶ F/D ⁴⁴ A	<i>E. coli</i> (pRK117)	instabil, C-terminale Fragmente	monomer
A ³⁷ F	<i>E. coli</i> (pRK116)	stabil	dimer
M ⁴² A	<i>E. coli</i> (pRK100)	stabil	dimer
M ^{38,42} A	<i>E. coli</i> (pRK101)	stabil	dimer
M ^{38,42} E	<i>E. coli</i> (pRK123)	bedingt stabil	n.u.

n.u., nicht untersucht

4.4.5 Zusammenfassung

Mittels site-spezifischer Mutagenese wurden Aminosäuren, die vermutlich an der Dimerisierung des Mip-Proteins beteiligt sind, gezielt ausgetauscht und deren Substitution durch Sequenzierung bestätigt. Die resultierenden Mip-Proteinvarianten wurden hinsichtlich ihrer Proteinstabilität und des oligomeren Zustands untersucht und ermöglichten somit eine Identifizierung, an der Dimerisierung beteiligter Aminosäuren. Weiterhin wurde bestätigt, dass der dimere Status des Mip-Proteins ausschließlich über die N-terminale Domäne des Proteins vermittelt wird.

4.5. Versuche zur Identifizierung eines bakteriellen Interaktionspartner

Das Mip-Protein gehört zur Familie der Peptidyl-prolyl *cis/trans* Isomerasen (PPIasen) und hier zur Untergruppe der FK506 bindenden Proteine der sogenannten FKBP's. Für einige dieser Enzyme sind bereits Substrate oder Interaktionspartner beschrieben wurden wie z.B. für das hFKBP12 (Cardenas *et al.*, 1994), dass eine Interaktion mit Calcineurin A im Rahmen der T-Zell-Aktivierung zeigt. Ein natürliche Substrat für das *Legionella* Mip-Protein wurde bis heute noch nicht beschrieben. Die Methode der chemischen Quervernetzung (Cross-linking) kann zur Identifizierung von Oligomerisierungsstadien von Proteinen, aber darüber hinaus auch zur Identifizierung von potentiellen Bindungspartnern bzw. räumlich assoziierten Proteinen

verwandt werden. *L.p.*FKBP25 lässt sich auf der Oberfläche von *Legionella* durch Cross-linking-Experimente als dimeres Protein nachweisen (Schmidt *et al.*, 1994). Im folgenden wurde untersucht, ob sich mittels dieser Methode noch andere Proteinbanden identifizieren lassen würden, die dann mittels Immunpräzipitation und N-terminaler Sequenzierung identifiziert werden sollten.

4.5.1 Chemische Quervernetzung der *Legionella*-Oberfläche

Die chemische Quervernetzung mittels Dimethylpimelimidat (DMP) wurde wie unter 3.9.13 beschrieben durchgeführt und die Proben im Westernblot analysiert.

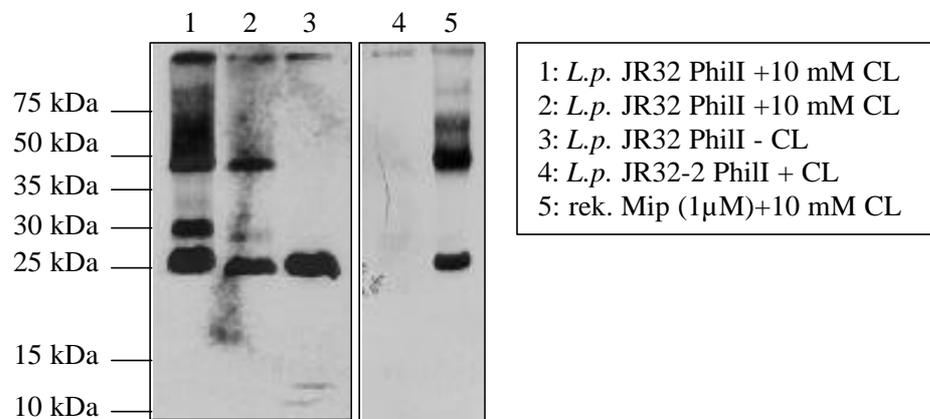


Abb.33): Westernblot-Analyse nach Quervernetzung mit 10 mM DMP. Detektion der Mip spezifischen Banden mit den monoklonalen Anti-Mip Antikörpern 2D8, 22/1 und 23/1 (Titer 1:1000).

Wie in Abbildung 33 zu erkennen, kann für den *Legionella* WT (Spuren 1 und 2) (Zugabe von 10 mM DMP) zusätzlich zu den Mip Monomer- und Dimerbanden bei 24 und 48 kDa eine zusätzliche Bande bei 30 kDa detektiert werden. Demzufolge wurde durch den Quervernetzer DMP ein ca. 6-7 kDa großes Protein bzw.- Peptid an das Mip-Protein gekoppelt. Wird bei dem Mip-positiven Stamm *L.p.* PhilI JR32 kein DMP zugegeben (Spur 3) sind vergleichbare Banden nicht nachzuweisen. Unter den gleichen Bedingungen wurde der Mip-negative Stamm *L.p.* PhilI JR32-2 der chemischen Quervernetzung unterzogen. In Spur 4 treten keinerlei Kreuzreaktivitäten der monoklonalen Antikörper 2D8, 22/1 und 23/1 auf. Als Positivkontrolle wurde in Spur 5 1 µM aufgereinigtes Mip-Protein mit Zusatz von DMP aufgetragen.

4.5.2 Immunpräzipitation, Auswahl der Antikörper

Für die Identifikation des putativen Bindungspartners sollte der Komplex aus Mip und „Interaktionspartner“ mittels Immunpräzipitation spezifisch angereichert und anschließend N-terminal sequenziert werden. Zur Durchführung der Immunpräzipitation wurden die *Legionella* Zellen entsprechend dem unter 3.9.13 beschriebenen Vorgehen mit dem Cross-linking Reagenz DMP vorinkubiert und nachfolgend einer Triton-Behandlung unterzogen. Die Zellen wurden sedimentiert und der membranhaltige Überstand für die Immunpräzipitation mit verschiedenen Antikörpern verwandt. Diese wurde wie unter 3.9.14 beschrieben durchgeführt und nachfolgend einer Westernblot-Analyse unterzogen. Da durch die Cross-linking Reaktion essentielle Epitope des Mip-Protein-Komplexes für die Erkennung durch Anti-Mip Antikörper maskiert sein könnten, wurde in Vorversuchen die Reaktivität einer Auswahl sowohl monoklonaler Antikörper als auch eines polyklonalen Serums untersucht (Abb. 34).

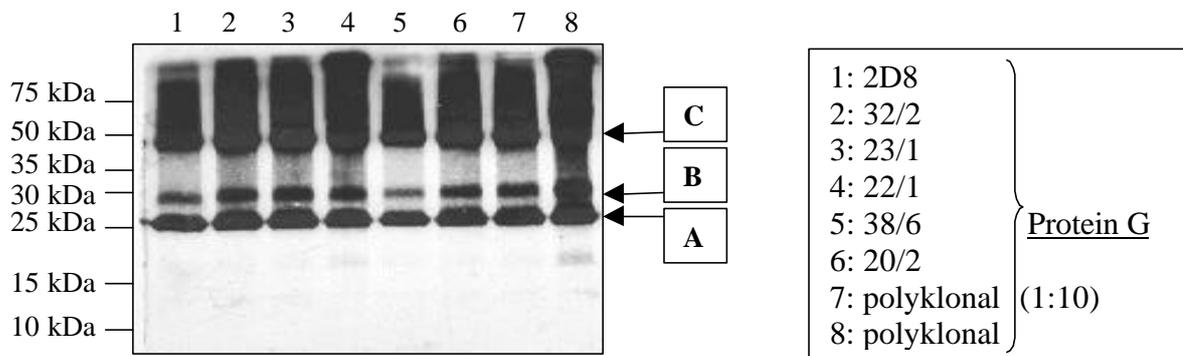


Abb.34): Westernblot-Analyse der Immunpräzipitate, die mit verschiedenen Anti-Mip Antikörpern (monoklonal und polyklonal) aus den membranhaltigen *Legionella* Präparationen, die zuvor mit DMP behandelt wurden, erkannt werden. Der Westernblot wurde mit polyklonalen Anti-Mip Antikörper inkubiert.

Aus Abbildung 34 geht hervor, dass alle der verwendeten monoklonalen Anti-Mip Antikörper, 2D8, 32/2 (beide erkennen N-terminale Mip-Epitope) und 23/1, 22/1, 38/6 und 20/2 (C-terminale Epitope), sowie das polyklonale Serum die zusätzliche Bande in Höhe von 30 kDa erkennen. Demzufolge sind durch das Cross-linking keine für die Antigen (Mip)-Erkennung relevanten Epitope maskiert. Aufgrund dessen kann der Komplex mittels Immunpräzipitation (Anti-Mip Antikörper und Protein G Sepharose „beads“) spezifisch angereichert werden. In den Spuren 7 bzw. 8 wurden unterschiedliche Konzentrationen des polyklonalen Serums aufgetragen (Spur 7: 1:10, Spur 8 unverdünnt). Da gleiche Volumina Membranextrakt verwandt wurden, es beim Einsatz des polyklonalen Anti-Mip Serums aber zu einer quantitativ besseren Reaktion im

Westernblot kam, wurde in nachfolgenden Versuchen zur Immunpräzipitation nur noch polyklonales Serum verwendet.

4.5.3 Immunpräzipitation, Anreicherung des Immunkomplexes

Die Immunpräzipitation wurde wie unter 3.9.14 beschrieben durchgeführt und analysiert. Da die Methode der Immunpräzipitation trotz der hohen Spezifität der verwendeten Antikörper immer einen Hintergrund an unspezifisch bindenden Proteinen mit sich bringt, sollte durch Verwendung bestimmter Kontrollen der Hintergrund eingeschätzt werden.

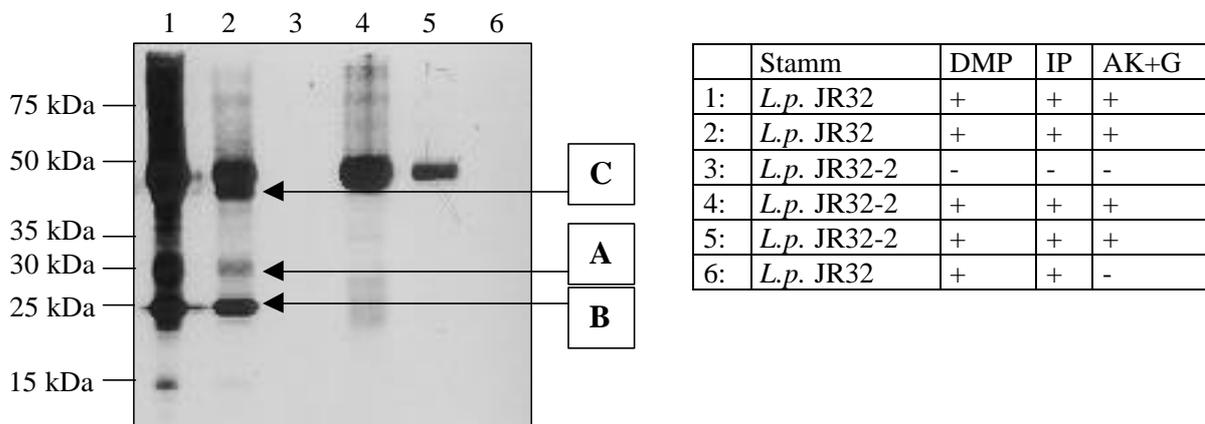


Abb.35): Westernblot-Analyse zur Kontrolle der mittels Immunpräzipitation unspezifisch detektierten und von der Protein G Sepharose eluierten Proteine. Zur Detektion wurde polyklonales Anti-Mip-Serum verwendet. Die Tabelle gibt Aufschluss über die verwendeten *Legionella*-Stämme, die Verwendung von DMP, den Einsatz von Protein G zur Immunpräzipitation (IP) und der daran gekoppelten Antikörper (AK+G). A: 30 kDa Bande, B: Mip- Monomer, C Mip-Dimer.

Wie aus Abbildung 35 hervor geht, wurde die Immunpräzipitation sowohl für einen Mip positiven Stamm *L.p.* PhilI JR32 (Spur 1-2) als auch für einen Mip- negativen Stamm *L.p.* PhilI JR32-2 (Spur 3-5) durchgeführt. Hierbei konnten im Bereich von 10-40 kDa keine Kreuzreaktivitäten des verwendeten polyklonalen Anti-Mip Antikörpers mit Produkten der Immunpräzipitation für den Mip-negativen Stamm *L.p.* PhilI JR32-2 festgestellt werden. Die 50 kDa Bande über der Mip-Dimer-Bande ist koeluiertes Antikörper. Die 30 kDa-Bande wurde nur spezifisch in einem Mip positiven Stammhintergrund bei Verwendung von polyklonalem Anti-Mip Serum, gekoppelt an Protein G Sepharose, eluiert. Für den Mip-negativen Stamm *L.p.* JR32-2 und die Präinkubation von Protein G Sepharose mit *Legionella* WT konnte keine 30 kDa Bande detektiert werden. Die so erhaltenen Eluate wurden über ein SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die erhaltene Bande (30 kDa) wurde von Peter Rücknagel (Halle) N-terminal sequenziert. Die Sequenz zeigte nur die Aminosäuren der N-terminalen Mip-

Sequenz. Neben den erhaltenen Signalen für die Mip-Sequenz konnten noch schwache Signale anderer Aminosäuren detektiert werden, deren „random Sequenzanalyse“ aber keinerlei Homologie zu bis jetzt bekannten *Legionella* Proteinen aufweist. Es ist nicht auszuschließen, dass eine N-terminale Blockierung des an Mip gebundenen Proteins die Aufklärung der Sequenz unter Verwendung dieser Methodik verhindert.

Inwieweit die Detektion des putativen bakteriellen Partners (30 kDa Bande) nur in Membran-Assoziation beider Komponenten auftritt oder ob diese auch möglich ist, wenn eine Komponente in Lösung vorliegt (Mip und „Interaktionspartner“), wurde eine Mip-negative *Legionella* Mutante verwendet und unter Zugabe verschiedener Konzentrationen an aufgereinigtem rekombinanten Mip (5 μ M, 100 nM, 10 nM) eine stattfindende Bindung untersucht. Die Zellen wurden für 2 h bei 4°C zusammen mit rekombinantem Mip-Protein inkubiert, anschließend mit DMP behandelt und nachfolgend einer Triton –Behandlung unterzogen. Die Analyse der erhaltene Überstände wurde im Westernblot durchgeführt. Wie aus Abbildung 36 hervorgeht, konnte neben den Monomer- (A) und Dimer-Banden (B) keine zusätzliche Bande in Höhe von 30 kDa (C) wie in Spur 5 der Positivkontrolle detektiert werden. Spur 4 zeigt die Ereignisse für den Mip-negativen Stamm *L.p.* Phill JR32, der mitgeführten Negativkontrolle. Somit ist es wahrscheinlich, dass eine Interaktion von Mip mit einem putativen prokaryotischen Interaktionspartner nur durch eine direkte räumliche Nähe möglich ist.

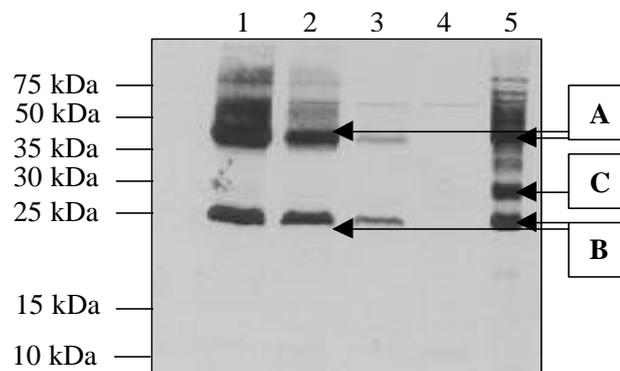


Abb.36): Westernblot-Analyse zur Interaktion von in Lösung befindlichem rekombinanten *Legionella* Mip-Protein und dem putativen Interaktionspartner auf der Bakterienoberfläche von *L. pneumophila* JR32-2 (Mip-negativ). In den Spuren 1-3 wurden verschiedene Konzentrationen (1 μ M, 100 nM, 10 nM) rekombinantem Mip-Protein mit *L.p.* JR32-2 (Mip-) inkubiert. In Spur 4 ist als Negativkontrolle *L.p.* JR32-2 (Mip-) und in Spur 5 als Positivkontrolle *L.p.* JR32 (Mip+) aufgetragen.

4.5.4 Zusammenfassung

Wie in diesem Teil der Arbeit gezeigt, wurde durch den Einsatz chemischer Quervernetzung mittels DMP ein putativer bakterieller Interaktionspartner des *Legionella* Mip-Proteins detektiert. Durch Immunpräzipitation wurde der Immunkomplex (Mip und putativer Interaktionspartner) angereichert und N-terminal sequenziert. Neben der Sequenz für das Mip-Protein wurde ein schwacher Hintergrund an Aminosäuren ermittelt, bei deren Sequenzanalyse jedoch keinerlei Homologie zu bereits bekannten *Legionella*-Proteinen detektiert werden konnte. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine N-terminale Blockierung die Aufklärung der Sequenz ursächlich verhindert.

4.6. Der Einfluss der Isomeraseaktivität im Tiermodell (Meerschweinchen)

Wie Arbeiten von Wintermeyer *et al.* zeigen konnten besitzt die Isomerase-Aktivität des Mip-Proteins keinen Einfluss innerhalb monozellulärer Systeme (Wintermeyer *et al.*, 1995). Um Aussagen über den Einfluss der Isomeraseaktivität des Mip-Proteins für die Virulenz von *L. pneumophila* innerhalb eines immunologisch komplexen Systems machen zu können, wurden Infektionen im Tiermodell durchgeführt. Hierbei wurden neben dem Wildtypstamm *L.p.* Phill JR32, der Mip-negativen Mutante JR32-2 und der mit wildtypischen Mip komplementierten Mutante JR32-2.1, die site-spezifischen, sich in ihrer *in vitro* Isomerase-Restaktivität unterscheidende Mutanten *L.p.* JR32-2.2 und *L.p.* JR32-2.3 eingesetzt. Darüber hinaus sollte durch die Einbeziehung der mit monomeren Mip komplementierten Mutante *L.p.* JR32-2.4 der Einfluss der Dimerisierung des Mip-Proteins auf die intrazelluläre Vermehrung innerhalb des Tiermodells für *L. pneumophila* untersucht werden. Die Versuche zur Infektion der Meerschweinchen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. M. Frosch und Dr. E. Lüneberg vom Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg durchgeführt. Dazu wurden die 500-1000 g schweren Tiere narkotisiert und mit einem Inokulum von 300 µl physiologischer NaCl Lösung, das 5×10^6 bis 1×10^7 Legionellen aufwies, intratracheal infiziert. Nach 48 Stunden wurden die Tieren getötet, die Lunge herauspräpariert und eine CFU-Bestimmung der sich in der Lunge vermehrten *Legionellen* durchgeführt.

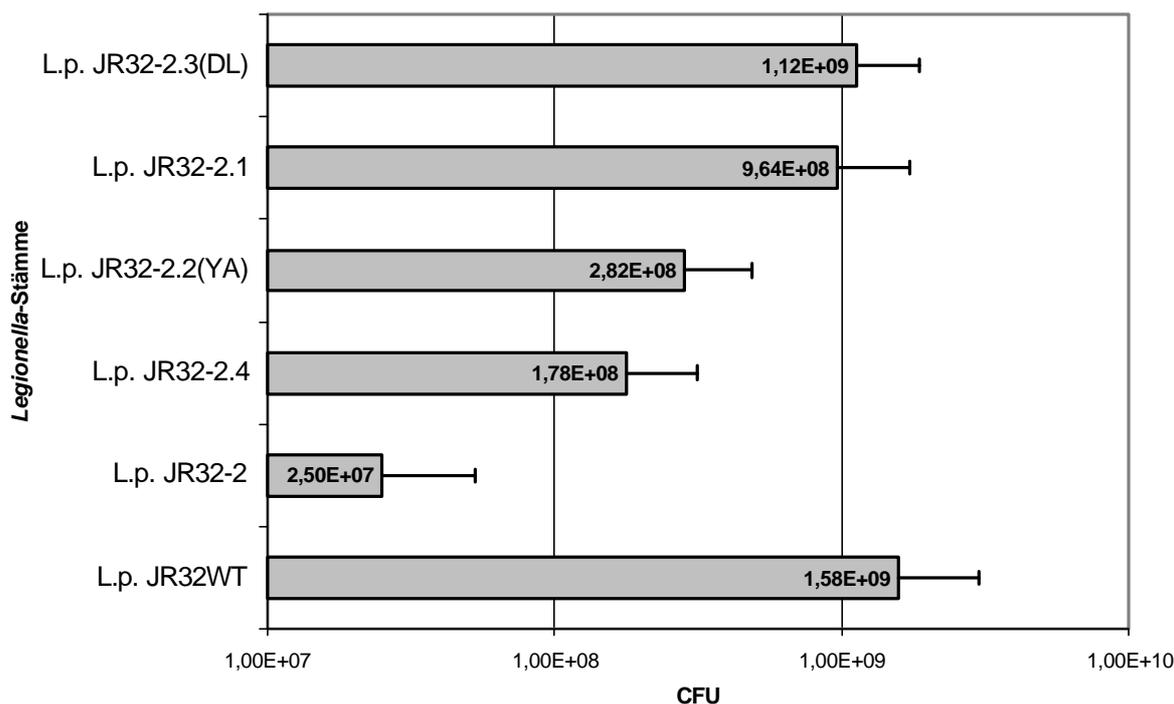


Abb.37): Darstellung der erreichten CFU–Werte verschiedener *Legionella*-Stämme nach 48 Stunden Vermehrung im Tiermodell (Meerschweinchen). Die für jeden Stamm erreichten Zellzahlen (Gesamtzellzahl/Lunge) sind Mittelwerte aus min. für 3 Tiere unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Die Werte sind für die Darstellung auf eine einheitliches Inokulum von 1×10^7 Zellen/ml standardisiert. Die resultierende Standardabweichung ist in Form von Fehlerbalken angegeben.

Im Tiermodell zeigte sich für die einzelnen *Legionella*-Stämme (vgl. Abb. 37) ein deutlicher Unterschied im Vergleich zu standardisierten Zelllinien wie *A. castellanii* oder der humanen Histiozyten-Lymphomzelllinie U937. Im Unterschied dazu, verglichen mit dem intrazellulären Überleben in monozellulären Systemen, kann für die Mip-Mutante *L.p.* JR32-2 eine stärkere Reduktion der intrazellulären Vermehrung um einen Faktor 100 festgestellt werden. Die in den oben genannten Zelllinien beobachteten Unterschiede waren eher minimal. Für die Mip-Komplementante *L.p.* JR32-2.1 kann die Rekonstitution des wildtypischen Wachstumsverhalten auch innerhalb des Tiermodells nachgewiesen werden.

Für die in ihrer Isomerase-Aktivität veränderten site-spezifischen Mutanten-Stämme *L.p.* JR32-2.3 (DL) und *L.p.* JR32-2.2 (YA), die jeweils 6 bzw. 2 % Isomerase-Restaktivität (Schmidt Dissertation 1998) im Vergleich zum nativen Protein aufweisen, konnte ein Einfluss dieses Unterschieds auf die intrazelluläre Vermehrungsfähigkeit beobachtet werden. Hierbei vermehrt sich die Mutante *L.p.* JR32-2.2 (2 % Isomerase-Restaktivität) nach 48 Stunden nur auf eine durchschnittliche Zellzahl von $2,8 \times 10^8$ Zellen/Lunge. Für den sich mit einer höheren

Isomerase-Restaktivität von 6 % vermehrenden *Legionella* Stamm *L.p.* JR32-2.3 (DL) konnte annähernd wildtypisches Wachstum festgestellt werden. Mit 1.12×10^9 Zellen/ Lunge wurde eine viermal höhere Zellzahl für diesen Stamm erreicht. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die Isomerase-Aktivität des *Legionella* Mip-Proteins, in Abhängigkeit der *in vitro* gemessenen Isomerase-Restaktivität, eine wichtige Rolle für die intrazelluläre Vermehrung von *L. pneumophila* im höheren Organismus spielt. Darüber hinaus wurde der Stamm *L.p.* JR32-2.4, der die vollständige Isomerase-Aktivität (100 %) gegenüber Peptidsubstraten besitzt, aber das Mip-Protein nur noch als Monomer exprimiert, analog den anderen Stämmen getestet. Hierbei sollte der Einfluss der Dimerisierung des Proteins auf das intrazelluläre Wachstumsverhalten im Tiermodell untersucht werden. Wie aus Abbildung 37 hervorgeht, erreicht dieser Stamm trotz vollständiger Isomerase-Aktivität mit einer Zellzahl von 1.78×10^8 nur eine um den Faktor 10 niedrigere Zellzahl im Vergleich zum Wildtypstamm *L.p.* JR32. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass neben der Isomerase-Aktivität, die zum Erreichen der vollständigen Virulenz im Tiermodell notwendig ist, die Dimerisierung des Mip-Proteins einen entscheidenden Beitrag zur Etablierung der Virulenz von *L. pneumophila* im höheren Organismus leistet.