

1. ZUSAMMENFASSUNG.....	1
1.1 SUMMARY.....	4
2. EINLEITUNG.....	6
2.1 <i>LEGIONELLA PNEUMOPHILA</i> – UMWELTKEIM UND PATHOGENES AGENS.....	6
2.2 INTRAZELLULÄRE VERMEHRUNG VON LEGIONELLEN IN PROFESSIONELLEN PHAGOZYTEN.....	7
2.3 INTRAZELLULÄRE VERMEHRUNG VON LEGIONELLEN IN PROTOZOEN.....	9
2.4 VIRULENZFAKTOREN VON LEGIONELLEN.....	11
2.5 DIE ROLLE VON EISEN IN DER INTRAZELLULÄREN <i>LEGIONELLA</i> -INFEKTION.....	16
2.6 DAS <i>LEGIONELLA</i> MIP-PROTEIN - VIRULENZFAKTOR UND IMMUNOPHILIN.....	17
2.6.1 <i>Das Legionella Mip-Protein ist eine PPIase</i>	17
2.6.2 <i>PPIasen – Einteilung und in vivo-Funktionen</i>	17
2.6.3 <i>Strukturelle und funktionelle Charakterisierung Mip-verwandter Proteine</i>	20
2.7 GFP, EIN NEUER REPORTER FÜR INTRAZELLULÄRE PATHOGENE.....	23
2.8 ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	24
3. MATERIAL UND METHODEN.....	25
3.1 GERÄTE.....	25
3.2 BAKTERIENSTÄMME.....	26
3.3 VEKTOREN.....	27
3.3.1 <i>Rekombinante Plasmide</i>	28
3.4 CHEMIKALIEN.....	29
3.4.1 <i>Antikörper</i>	29
3.4.2 <i>Größenmarker</i>	30
3.4.3 <i>Oligonukleotide</i>	30
3.5 MEDIEN.....	32
3.5.1 <i>LB-Medium für die Anzucht von E. coli</i>	32
3.5.2 <i>A(C)IX-Medium</i>	32
3.5.3 <i>Antibiotika</i>	33
3.5.4 <i>Medien für die Anzucht von Legionella</i>	33
3.5.5 <i>ACES-Yeast-Extract (AYE)-Flüssigmedium (pH 6,9)</i>	33
3.5.6 <i>Buffered-Charocal-Yeast-Extract (BCYE) (pH 6,9)-Agarplatten</i>	33
3.5.7 ZELLKULTURMEDIEN.....	34
3.5.7.1 <i>PYG-712 Medium für Acanthamoeba castellanii</i>	34
3.5.7.2 <i>PYNFH Medium (ATCC #1034) für Hartmannella vermiformis</i>	34
3.6 INFEKTION VON <i>A. CASTELLANII</i> UND <i>H. VERMIFORMIS</i>	35
3.6.2 <i>Invasionsassay, Quantifizierung durch CFU-Bestimmung</i>	36
3.6.3 <i>Invasionsassay, Quantifizierung durch FACS-Analyse</i>	36
3.6.4 <i>Invasionassay in Gegenwart von Phagozytose-Inhibitoren</i>	37
3.7 DNA-TECHNIKEN.....	37
3.7.1 <i>Mini-Plasmidpräparation</i>	37
3.7.2 <i>Plasmidpräparation mit Qiagen-Säulen</i>	38
3.7.3 <i>Isolierung chromosomaler DNA (großer Maßstab)</i>	39
3.7.4 <i>Phenol/Chloroform-Extraktion</i>	40
3.7.5 <i>Ethanol-fällung von DNA</i>	40
3.7.6 <i>Bestimmung der DNA-Konzentration und des Reinheitsgehalts</i>	41
3.7.7 <i>Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen</i>	41
3.7.8 <i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	41
3.7.9 <i>Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen mit dem Gene-clean-Kit</i>	42
3.7.10 <i>Ankonzentrierung und Reinigung von DNA mit dem Gene-clean-Kit</i>	43
3.7.11 <i>Behandlung von Insert-DNA mit dem Klenow-Enzym</i>	43
3.7.12 <i>Behandlung von DNA mit der T4-Polymerase</i>	44

3.7.13 Alkalische Phosphatase-Behandlung	44
3.7.14 Ligation von Vektor- und Insert-DNA	45
3.7.15 Klonierungs-Kits.....	45
3.7.16 PCR Reaktion (Polymerase chain reaction)	46
3.7.17 "Site-spezifische" Mutagenese mittels PCR	47
3.7.18 DNA-Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten Primern.....	48
3.8 TRANSFORMATION	49
3.8.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	49
3.8.2 Heat-shock-Transformation von <i>E. coli</i>	49
3.8.3 Elektroporation von <i>L. pneumophila</i>	50
3.9 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	51
3.9.1 Molekulargewichtsbestimmung mittels SDS-PAGE.....	51
3.9.2 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen	52
3.9.3 Silberfärbung.....	52
3.9.4 Protein-Transfer auf Nitrozellulosemembran (Westernblot)	53
3.9.5 Transfer von Gesamtzellproteinen auf Nitrozellulose (Immunokolonieblot).....	54
3.9.6 Detektion der Antigen-Antikörper Reaktion	54
3.9.7 Stripping von Blotmembranen.....	55
3.9.8 Anzucht von <i>E. coli</i> und die Induktion der Proteinbiosynthese.....	55
3.9.9 French-press, Mechanische Lyse.....	56
3.9.10 TCA-Fällung.....	56
3.9.11 Proteinaufreinigung von Mip.....	56
3.9.12 Periplasma-Präparation von <i>E. coli</i> und <i>Legionella</i>	57
3.9.13 Chemische Quervernetzung von Proteinen (Cross-linking)	57
3.9.14 Protein-Anreicherung mittels Immunpräzipitation.....	58
3.9.15 Proteinreinigung mittels Umkehrphasen-HPLC und N-terminale Sequenzierung.....	59
3.9.16 Bestimmung der molekularen Masse.....	59
3.10 SOUTHERNBLOT	60
3.10.1 Sondenmarkierung (Amersham).....	61
3.10.2 DNA-Hybridisierung.....	61
3.10.3 Chemilumineszenz-(ECL)-Entwicklung.....	62
3.11 FLUORESCENZ GESTÜTZTE METHODEN	62
3.11.1 Fluoreszenzmikroskopie	62
3.11.2 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	63
3.11.3 Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten (Spektrorfluorimetrie)	63
3.12 <i>L. PNEUMOPHILA</i> INFEKTION IM TIERMODELL.....	64
4. ERGEBNISSE.....	65
4.1 ENTWICKLUNG DES GFP-REPORTERSYSTEMS IN <i>LEGIONELLA</i>	65
4.1.1 Konstruktion der GFP-Expressionsvektoren	65
4.1.2 Analyse der <i>mip</i> - und <i>sod</i> -Promoteraktivitäten in <i>L. pneumophila</i> durch GFP-vermittelte Fluoreszenz.....	66
4.1.3 FACS-Analyse der GFP-exprimierenden <i>Legionella</i> -Stämme.	68
4.1.4 <i>In vitro</i> Analyse der <i>mip</i> - und <i>sod</i> -Promoteraktivitäten.....	69
4.1.5 <i>In vivo</i> -Monitoring einer <i>Legionella</i> -Infektion in <i>Acanthamoeba castellanii</i>	71
4.1.6 Quantifizierung des intrazellulären Wachstums mittels FACS-Analyse	72
4.1.7 FACS-Analyse der Invasion und intrazellulärer Wachstumscharakteristika verschiedener GFP-exprimierender <i>Legionella</i> -Stämme.....	73
4.1.8 Einfluss von Inhibitoren auf die Phagozytose bei <i>H. vermiformis</i> und <i>A. castellanii</i>	75
4.1.9 Zusammenfassung.....	81

4.2 KONSTRUKTION VON MIP::GFP-FUSIONSPROTEINEN	82
4.2.1 Klonierung der Konstrukte	82
4.2.2 Westernblot-Analyse der Mip::GFP- Fusionsproteine	83
4.2.3 Fluoreszenzmikroskopische Analyse von <i>L. pneumophila</i> JR32-2(pRK78)	84
4.2.4 Analyse der Mip::GFP-Fusionsprotein-Prozessierung in <i>E. coli</i> und <i>L. pneumophila</i>	85
4.2.5 Zusammenfassung.....	88
4.3 KONSTRUKTION EINES N-TERMINAL VERKÜRZTEN MIP-PROTEINS.....	88
4.3.1 Integration des N-terminal verkürzten <i>Legionella Mip</i> <i>L.p.FKBP</i> _(-20-3; 80-213) in das Chromosom der Mip negativen Mutante <i>L.p. JR32-2</i>	89
4.3.2 Westernblot-Analyse der Expression von <i>L.p. FKBP25</i> _(20-3; 80-213) in <i>L. pneumophila</i> JR32-2.....	90
4.3.3 Southernblot-Analyse der chromosomalen Integration in <i>L.p. JR32-2.4</i>	91
4.3.4 Intrazelluläre Vermehrung von <i>L. pneumophila</i> JR32-2.4 in <i>A. castellanii</i>	92
4.3.5 Zusammenfassung.....	94
4.4 SITE-SPEZIFISCHE MUTAGENESE DER N-TERMINALEN MIP-DOMÄNE	94
4.4.1 Auswahl und Konstruktion der Mip-Proteinvarianten.....	94
4.4.2 Sequenzanalyse der veränderten Mip-Proteine.....	95
4.4.3 Reinigung und Stabilität der Proteinvarianten	97
4.4.4 Analyse des oligomeren Zustandes der Proteinvarianten	100
4.4.5 Zusammenfassung.....	102
4.5. VERSUCHE ZUR IDENTIFIZIERUNG EINES BAKTERIELLEN INTERAKTIONSPARTNER.....	102
4.5.1 Chemische Quervernetzung der <i>Legionella-Oberfläche</i>	103
4.5.2 Immunpräzipitation, Auswahl der Antikörper.....	104
4.5.3 Immunpräzipitation, Anreicherung des Immunkomplexes.....	105
4.5.4 Zusammenfassung.....	107
4.6. DER EINFLUSS DER ISOMERASEAKTIVITÄT IM TIERMODELL (MEERSCHWEINCHEN).....	107
5. DISKUSSION.....	110
5.1 GFP, EIN NEUER REPORTER IN <i>LEGIONELLA</i>	110
5.2 MIP::GFP-FUSIONSPROTEINE	117
5.3 STRUKTURELLE UND FUNKTIONALE CHARAKTERISTIKA DES <i>LEGIONELLA</i> MIP-PROTEINS	118
5.4 UNTERSUCHUNGEN ZUR DIMERISIERUNG DES MIP-PROTEINS MITTELS SITE-SPEZIFISCHER MUTAGENESE.....	125
5.5 DETEKTION EINES PUTATIVEN INTERAKTIONSPARTNERS.....	128
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	130
7. ANHANG	147
7.1 ABKÜRZUNGEN	147
7.2 SEQUENZ DES <i>MIP</i> -GENS	148
7.3 PUBLIKATIONEN.....	149
7.4 TAGUNGSBEITRÄGE	149
7.5 LEBENS LAUF.....	151