

**Molekularbiologische Studien zur
Bedeutung der Flagelle für die Virulenz
von *Legionella pneumophila***

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayrischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

CLAUDIA DIETRICH

aus Ludwigshafen

Würzburg 2000

Eingereicht am: 13. 12. 2000

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. W. Göbel

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Hacker

2. Gutachter: Prof. Dr. J. Kreft

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Weiterhin erkläre ich, dass ich die Dissertation bisher nicht in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen habe und ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den 13. 12. 2000

.....

(Claudia Dietrich)

Die Experimente zu dieser Dissertation wurden in dem Zeitraum März 1997 bis September 2000 am Lehrstuhl für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Jörg Hacker danke ich für die interessante Themenstellung, die Möglichkeit zum selbständigen Arbeiten, sowie die zahlreichen Gelegenheiten, die eigene Arbeit in der Öffentlichkeit zu präsentieren.

Bei Dr. Bettina Brand möchte ich mich herzlich für die begeisternde Einführung in die Welt der Legionellenbiologie und die motivierende Unterstützung bedanken. Ebenso gilt mein Dank Dr. Michael Steinert für das stete Interesse am Fortgang der Arbeit sowie für die Geduld meinen oftmals kritischen Anmerkungen gegenüber. Dr. Klaus Heuner danke ich für die Überlassung einiger *Legionella*-Stämme und die vielen konstruktiven Diskussionen.

Aber was wäre die Arbeit im Labor ohne die vielen netten Kollegen und Kolleginnen! Ihnen allen möchte ich danken für die gute Atmosphäre und Zusammenarbeit, besonders meinen langjährigen Mitstreitern Rolf Köhler, Sonja Hägele, Katharine Piechaczek und dem gesamten Legionellen-Labor!! Alle Instituts- und Zentrumsmitglieder zu nennen, ergäbe eine ziemlich lange Liste, es fanden sich jedoch für alle Probleme, sei es mit der Elektronen- oder Fluoreszenzmikroskopie, dem Sequenzierer, im Proteinlabor oder auch beim Kampf mit widerspenstigen Computern immer hilfsbereite Kollegen, die einem mit Rat und Tat zur Seite standen und wieder Schwung für die zukünftigen Experimente gaben.

Auch allen guten Freunden außerhalb der Biologie sowie meinem Freund Matthias danke ich sehr herzlich für ihr Verständnis, wenn ich wieder keine Zeit für sie hatte und nur eben mal kurz ins Labor musste....

Abschließend ein ganz besonders herzliches Dankeschön an meine Eltern, die mir das Studium erst ermöglicht haben, für die moralische Unterstützung und ihr großes Vertrauen.

Die vorliegende Arbeit wurde finanziert von der deutschen Forschungsgemeinschaft, im Rahmen des Graduiertenkollegs „Infektiologie“.

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
1. SUMMARY	4
2. EINLEITUNG	6
2.1. Allgemeines	6
2.1.1. Historischer Rückblick.....	6
2.1.2. Biologie der Legionellen.....	6
2.1.3. Vorkommen in der Umwelt	7
2.2. Der intrazelluläre Lebenszyklus der Legionellen	9
2.2.1. Aufnahme in die Wirtszelle	10
2.2.2. Etablierung des Phagosoms und intrazelluläre Vermehrung	11
2.2.3. Wirtszelllyse und Freisetzung der Legionellen	12
2.3. Legionella als Pathogen	13
2.3.1. Krankheitsbild beim Menschen.....	13
2.3.2. Potentielle Virulenzfaktoren der Legionellen	14
2.3.3. Wachstumsphasen-abhängiger Phänotyp	19
2.4. Die bakterielle Flagelle	20
2.4.1. Aufbau und Funktionsweise.....	20
2.4.2. Regulationsebenen.....	22
2.4.3. Die Flagelle der Legionellaceae.....	23
2.5. Zielsetzung dieser Arbeit	25
3. MATERIAL UND METHODEN	26
3.1. Organismen	26
3.1.1. Bakterienstämme	26
3.1.2. Zellen und Zelllinien.....	27
3.2. Plasmide	28
3.2.1. Verwendete Vektoren.....	28
3.2.2. Rekombinante Plasmide	28
3.3. Oligonukleotid-Primer	30
3.4. Medien	31
3.4.1. Flüssigmedien und Nährböden.....	31
3.4.2. Antibiotika- und andere Zusätze	32
3.5. Chemikalien und Enzyme	32
3.5.1. Allgemeine Chemikalien	32
3.5.2. Enzyme und Kits.....	32
3.5.3. Größenmarker	33
3.6. Geräte	33

3.7. DNA-Isolierung	34
3.7.1. Isolierung von Gesamt-DNA	34
3.7.2. Isolierung von Plasmid-DNA (kleiner Maßstab)	35
3.7.3. Isolierung von Plasmid- und Cosmid-DNA (großer Maßstab)	35
3.7.4. DNA-Fällung.....	36
3.7.5. DNA-Konzentrationsbestimmung	36
3.8. DNA-Linearisierung und Ligation von linearisierten DNA-Fragmenten	36
3.8.1. DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen.....	36
3.8.2. Dephosphorylierung von linearisierter Plasmid-DNA.....	36
3.8.3. Klenow-Behandlung.....	37
3.8.4. Ligation mit der Gibco-T ₄ -Ligase.....	37
3.8.5. Ligation mit dem pGEM-TEasy Kit.....	37
3.9. Transformation von Bakterien	37
3.9.1. Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> (Calciumchlorid-Methode).....	37
3.9.2. Herstellung kompetenter <i>L. pneumophila</i>	38
3.9.3. Transformation mittels Hitzeschock (<i>E. coli</i>)	38
3.9.4. Transformation mittels Elektroporation (<i>L. pneumophila</i>).....	38
3.10. Polymerase-Ketten-Reaktion und Auftrennung von DNA-Fragmenten	39
3.10.1. PCR mit der Supermix-Polymerase	39
3.10.2. PCR mit der DAP-Goldstar-Polymerase	39
3.10.3. Horizontale Agarose-Gelelektrophorese	40
3.10.4. Elution von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel (Gene-Clean Kit).....	40
3.11. DNA-Sequenzierung	41
3.11.1. Sequenzierungs-PCR mit dem Amersham-Kit	41
3.11.2. Sequenzierungs-PCR mit dem Excel-Kit	41
3.11.3. Gelelektrophorese mit dem LICOR-Sequenzierer/Auswertung.....	41
3.12. Proteinchemische Methoden	42
3.12.1. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen durch SDS-Gelelektrophorese	42
3.12.2. Coomassie-Färbung.....	43
3.12.3. Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran.....	43
3.12.4. Antikörperreaktion	44
3.12.5. Präadsorption der Antikörperlösung.....	45
3.12.6. Herstellung eines konzentrierten Flagellenextrakts	45
3.12.7. Bestimmung der Proteinmenge nach Bradford	46
3.13. Southern Hybridisierung	46
3.13.1. Transfer der DNA auf eine Nylon-Membran (Southernblot).....	46
3.13.2. Screening einer Cosmid-Genbank mittels „Colony-blot“	47
3.13.3. Markierung der DNA-Sonde	48
3.13.4. Vorhybridisieren, Hybridisieren und Waschen des Blots.....	48
3.13.5. Entwickeln des Blots mit dem ECL-Kit	49
3.14. Anzucht der Legionellen für Infektionsversuche	49
3.15. Experimente mit <i>Acanthamoeba castellanii</i>	50
3.15.1. Kultivierung von <i>Acanthamoeba castellanii</i>	50
3.15.2. Adhärenzassays	50
3.15.3. Phagozytoseassays	51
3.15.4. Intrazelluläre Wachstumsassays	51
3.15.5. Zytotoxizitätsassays	51

3.16. Experimente mit HL-60 Zellen und humanen Blut-Monozyten	52
3.16.1. Kultivierung und Differenzierung von HL-60 Zellen.....	52
3.16.2. Adhärenzassays.....	52
3.16.3. Phagozytoseassays.....	52
3.16.4. Intrazelluläre Wachstumsassays.....	53
3.16.5. Zytotoxizitätstest (MTT-Assay).....	53
3.16.6. Isolierung humaner Blut-Monozyten.....	53
3.16.7. Infektionen humaner Blut-Monozyten.....	54
3.17. In situ rRNA-Hybridisierung	54
3.17.1. Fixierung der Zellen und Bakterien.....	54
3.17.2. Hybridisierung mit der Sonde.....	55
3.18. Mikroskopische Untersuchungen	55
3.18.1. Licht- und Fluoreszenzmikroskopie.....	55
3.18.2. Elektronenmikroskopie.....	56
4. ERGEBNISSE	57
4.1. Isolierung und Sequenzbestimmung eines die <i>flaA</i>-Region tragenden Cosmids	57
4.1.1. Screening einer Cosmid-Genbank mit einer <i>flaA</i> -spezifischen Sonde.....	57
4.1.2. Ermittlung der Basenabfolge der Cosmide 2/23 und 17/13.....	58
4.1.3. Zusammenfassung.....	60
4.2. Komplementation und Virulenzeigenschaften <i>flaA</i>-negativer Mutanten	61
4.2.1. Komplementation der <i>flaA</i> -Mutante KH3.....	61
4.2.1.1. <i>In trans</i> Komplementation mit dem intakten <i>flaA</i> -Gen.....	61
4.2.1.2. <i>In trans</i> Komplementation mit den Genen <i>flaA</i> , <i>flaG</i> , <i>fliD</i> und <i>fliS</i>	62
4.2.1.3. Komplementation durch chromosomale Integration des intakten <i>flaA</i> -Gens.....	63
4.2.2. Phänotypische Charakterisierung der Stämme KH3 und CD10.....	65
4.2.2.1. Westernblot-Analyse.....	65
4.2.2.2. Elektronenmikroskopische Untersuchung.....	66
4.2.3. Verhalten der Stämme KH3 und CD10 in Zellkulturexperimenten.....	68
4.2.3.1. Stabilität der chromosomalen Mutationen.....	68
4.2.3.2. Adhärenz an Wirtszellen.....	69
4.2.3.3. Invasion der Wirtszellen.....	71
4.2.3.4. Intrazelluläres Wachstum.....	74
4.2.4. Untersuchungen zur Zytotoxizität der Mutanten KH1 und KH3.....	78
4.2.5. Zusammenfassung.....	81
4.3. Charakterisierung der <i>motA</i>-Region	82
4.3.1. Bestimmung der Nukleotidsequenz des Cosmids 12/44.....	82
4.3.2. Analyse zum Vorkommen <i>motA</i> -homologer Gene bei der Gattung <i>Legionella</i>	83
4.3.3. Zusammenfassung.....	85
4.4. Konstruktion und Charakterisierung einer <i>motA</i>-negativen Mutante	85
4.4.1. Herstellung <i>motA</i> -negativer Mutanten von <i>L. pneumophila</i> Corby.....	85
4.4.2. Genotypische Überprüfung der potentiellen <i>motA</i> -Mutanten.....	87
4.4.3. Bestimmung des Phänotyps.....	89
4.4.3.1. Lichtmikroskopie.....	89

4.4.3.2. Untersuchungen zum Flagellenaufbau.....	89
4.4.3.3. Verhalten der <i>motA</i> -Mutante in Zellkulturassays	90
4.4.4. Komplementationsstrategien.....	94
4.4.4.1. <i>In trans</i> Komplementation mit den Genen <i>motA/motB</i>	94
4.4.4.2. <i>In trans</i> Komplementation durch Fusion des <i>mip</i> -Promotors vor <i>motA/motB</i>	95
4.4.4.3. Komplementation durch chromosomale Integration.....	96
4.4.5. Zusammenfassung	96
4.5. Untersuchungen zu Flagellen-Regulationsgenen.....	97
4.5.1. Klonierung eines Konstrukts zur Mutagenisierung von <i>fliA</i>	97
4.5.2. Verbreitung des Transkriptionsregulators <i>flaR</i> in der Gattung <i>Legionella</i>	99
4.5.3. Untersuchungen zur Funktionalität der <i>flaR</i> und ORF234 Promotoren.....	101
4.5.4. Zusammenfassung	103
5. DISKUSSION.....	104
5.1. Organisation und Vorkommen von Flagellen-assoziierten Genen bei Legionellen.....	104
5.1.1. Charakterisierung der <i>flaA</i> -Region	104
5.1.2. Charakterisierung der <i>motA</i> -Region.....	107
5.2. Flagelle und Motilität als Virulenzfaktoren von <i>Legionella pneumophila</i>.....	110
5.2.1. Funktion als Kolonisations- und Invasionsfaktoren.....	110
5.2.2. Einfluss auf die intrazelluläre Vermehrung und die Virulenz im Tiermodell.....	113
5.2.3. Bedeutung für die Lyse der Wirtszelle und die Sekretion	116
5.3. Untersuchungen zur Regulation der Flagellengene	118
5.3.1. Der Faktor FlaR und andere Regulatorgene.....	119
5.3.2. Komplementation der <i>flaA</i> - und <i>motA</i> -negativen Mutanten.....	122
6. LITERATURVERZEICHNIS	126
7. ANHANG.....	143
7.1. Abkürzungen.....	143
7.2. Sequenzen.....	144
7.3. Publikationen.....	148
7.4. Tagungsbeiträge	148
7.5. Lebenslauf	150

1. Zusammenfassung

Legionella pneumophila, der Erreger der Legionärskrankheit, ist ein fakultativ intrazelluläres, ubiquitär vorkommendes Umweltbakterium, welches sowohl in der Lage ist, sich in Protozoen zu vermehren, als auch in humanen phagozytierenden und nicht phagozytierenden Zellen. Die Rolle, die Flagelle und Motilität der Legionellen im Verlauf einer Infektion spielen können, ist bisher noch nicht genau geklärt.

Um etwas über noch unbekannte Flagellengene und deren Organisation in *Legionella* zu erfahren, wurden zwei Klone einer Cosmid-Genbank des Stammes *L. pneumophila* Philadelphia I, auf denen das Gen *flaA* lokalisiert war, näher charakterisiert. Im 5'-Bereich von *flaA* konnten auf dem Gegenstrang zwei Stoffwechselgene (*accD* und *folC*) identifiziert werden. Im 3'-Bereich schließt sich an *flaA* ein *flaG* benanntes Gen unbekannter Funktion an, gefolgt von zwei offenen Leserastern mit Ähnlichkeiten zu dem Flagellen-Spitzen-Protein *fliD* sowie zu *fliS*. Weiter „downstream“ wurden zwei offene Leseraster mit Homologien zu den erst kürzlich bei *Legionella* beschriebenen Genen *enhA* und *milA* gefunden.

Zur Untersuchung des Einflusses der Flagelle auf den Infektionsverlauf wurde die *flaA*-negative Mutante KH3, bei der das *flaA*-Gen durch Insertion einer Kanamycin-Kassette unterbrochen worden war, wieder komplementiert. Dies gelang durch Reintegration des intakten *flaA*-Gens mit Hilfe des „Suicide“-Vektors pMSS704 in das Chromosom von KH3, wodurch Stamm CD10 entstand. Durch Westernblot-Analyse konnte gezeigt werden, dass der Stamm CD10 wieder in der Lage war, Flagellin zu exprimieren. Elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigten außerdem das Vorhandensein intakter Flagellen.

Mit Hilfe der drei Stämme *L. pneumophila* Wildtyp, der *flaA*-Mutante KH3 und der *flaA*-Komplementante CD10 war es nun möglich, das Verhalten von flagellierten und nicht flagellierten Legionellen bei der Infektion von Wirtszellen hinsichtlich Auffinden, Adhärenz, Invasion, intrazelluläre Vermehrung und Lyse der Zellen zu untersuchen. Als Wirtszellen wurden sowohl Protozoen (*Acanthamoeba castellanii*), als auch humane Zellen (HL-60 Zellen und frisch isolierte Blutmonozyten) verwendet. Dabei wurde deutlich, dass die Flagelle für das Erreichen der Wirtszellen eine wichtige Funktion hat. Wurde der Motilitätsdefekt der *flaA*-Mutanten durch Zentrifugation auf die Zielzellen aufgehoben, so konnten mit den gewählten Versuchsbedingungen bezüglich des Adhärenzvermögens der Stämme keine Unterschiede detektiert werden. Es wurde jedoch eine

signifikante Reduktion der Invasionseffizienz für die nicht flagellierten Legionellen beobachtet. Diese war bei den humanen Zellen besonders ausgeprägt. Hinsichtlich der intrazellulären Vermehrung konnte keine Attenuierung der Mutante festgestellt werden. Allerdings führte vermutlich die Reduktion der Invasivität zu einer geringeren Ausbreitungsgeschwindigkeit im HL-60 Modell, die bei niedriger Infektionsdosis mit einer verlangsamten Wachstumsrate der Bakterien einherging. Bei einer weiteren *flaA*-negativen Mutante (KH1) konnte außerdem noch der Effekt einer deutlich geringeren Zytotoxizität gegenüber den Wirtszellen beobachtet werden, welcher jedoch vermutlich unabhängig von der Flagellierung ist.

Die Sequenzierung des Genbank-Cosmids 12/44, auf welchem die Gene *fliA* und *motA* lokalisiert waren, ergab, dass auch hier mehrere Flagellengene geclustert auf dem Chromosom vorliegen. Im „upstream“-Bereich von *motA* konnten zwei putative Flagellenregulatorgene identifiziert werden (*motR* und *flhF*). Im 3'-Bereich von *motA* schließt sich, um 26 bp überlappend, das Gen *motB* an, welches ebenfalls für den Motor der Flagelle eine Rolle spielt, sowie ein offenes Leseraster unbekannter Funktion. Weiter „downstream“ wurde ein ORF mit Homologien zu *prfB* von *E. coli* gefunden. Eine Southernblot-Analyse verschiedener *Legionella*-Stämme zum Vorkommen von *motA* zeigte, dass dieses Gen bei allen *L. pneumophila*-Stämmen vorhanden ist, sowie auch bei einigen nicht-*pneumophila* Stämmen wie z. B. *L. gormanii*, *L. jordanis*, und *L. bozemanii*.

Durch Insertion einer Kanamycin-Kassette in das *motA*-Gen von *L. pneumophila* Corby konnte in dieser Arbeit eine *motA*-negative Mutante hergestellt werden. Westernblot-Analyse und elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigten, dass es weiterhin zur Expression und zur Polymerisation des Flagellins kommt. Lichtmikroskopisch konnte jedoch gezeigt werden, dass die hergestellte Mutante im Gegensatz zum Wildtyp durch den fehlerhaften Flagellenmotor nicht mehr in der Lage ist, gerichtete Strecken zu schwimmen. Untersuchungen mit den Wirtszellen *A. castellanii* und humanen HL-60 Zellen belegten, wie schon bei der *flaA*-Mutante, eine Beteiligung der Motilität an Vorgängen wie Auffinden der Zielzelle und deren Invasion, wohingegen die Adhärenz und die intrazelluläre Vermehrung nicht beeinträchtigt war.

Vor kurzem wurde beschrieben, dass *L. pneumophila* Corby über einen zur LysR-Familie gehörenden Transkriptionsregulator (*flaR*) verfügt, welcher in der Lage ist, an seinen eigenen Promotor, sowie in einem geringeren Maße auch an den *flaA*-Promotor zu binden. Eine Southernblot-Hybridisierung verschiedener *Legionella*-Stämme mit einer *flaR*-spezifischen Sonde zeigte, dass es sich bei dem Faktor *flaR* vermutlich um einen *L. pneumophila*-spezifischen Faktor

handelt, welcher in Kombination mit dem „upstream“ auf dem Gegenstrang liegenden ORF234 vorkommt. Fusionen der Promotorbereiche dieser beiden Gene mit dem „Green fluorescent protein“ (GFP) zeigten, dass beide Promotoren auch in *Legionella* aktiv sind, und zwar bei 37°C stärker als bei 30°C. Auch beim intrazellulären Wachstum in Amöben wurde eine Aktivität beobachtet.

Durch diese Arbeiten konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Flagelle und die durch sie vermittelte Motilität für die Legionellen von entscheidender Bedeutung für das Erreichen der Wirtszellen und die anschließende Invasionseffizienz der Bakterien sind.

1. Summary

Legionella pneumophila, the etiological agent of Legionnaires' disease, lives as a facultative intracellular bacterium in the environment and has the capability to survive and replicate both in protozoa and human phagocytic and non-phagocytic cells. The role of flagella and motility in the infection of host cells still has to be determined.

To better characterize the *flaA*-region of *Legionella* and to learn about the organisation of flagellar genes, two clones of a cosmid library harbouring this region from the genome of *L. pneumophila* Philadelphia I have been sequenced. Upstream of *flaA*, leading in the opposite direction, two metabolic genes (*accD* and *folC*) could be identified. Downstream of *flaA* an open reading frame (ORF) with unknown function was sequenced (*flaG*), followed by the gene *fliD*, coding for the flagella-capping-protein, and the gene *fliS*. Further downstream, two ORFs with homologies to the recently described *Legionella* genes *enhA* and *milA* have been identified.

To investigate the influence of the flagella on the infection process, the *flaA* negative mutant strain KH3, where the *flaA* gene was inactivated by insertion of a kanamycin cassette, was complemented. This could be achieved, using the suicide vector pMSS704, by integration of the intact *flaA* gene back into the chromosome, leading to the complemented strain CD10. After confirmation of the correct insertion by PCR and Southern blotting, it could be shown by Western blotting that strain CD10 regained the ability to express the flagellin protein. Electronmicrographs also confirmed the presence of intact assembled flagella.

Using the three strains, *L. pneumophila* Corby wild-type, the *flaA* mutant KH3, and the complemented *flaA* mutant CD10, the behaviour of the flagellated and non flagellated strains was investigated concerning encountering, adherence, invasion, intracellular multiplication and lysis of host cells. Both protozoa (*A. castellanii*) and human phagocytes (HL-60 cells and freshly isolated blood monocytes) have been utilized as potential host cells. It could be shown that flagellation enables the bacteria to reach the cells. In contrast, when the motility defect was artificially overcome by centrifugation, no difference in attachment of the three strains could be detected in our experiments. However, there was a significant reduction in the invasion efficiency for the *flaA* negative strain which was extremely relevant to the invasion of human phagocytes. Concerning the intracellular replication

rate no difference could be observed, although most likely the defect in infectivity of the *flaA* mutant leads to a slower growth curve in the HL-60 model when using low MOIs.

For the *flaA* mutant strain KH1, an unexpected decrease in cytotoxicity could also be observed. However, as the *flaA* mutant KH3 showed wildtype behaviour in this respect, the defect is most probably independent of flagellation.

The sequencing of the cosmid library clone 12/44, harbouring the genes *fliA* and *motA*, showed the clustering of further flagellar genes of *Legionella*. Upstream of *fliA* two genes could be identified, showing high similarities to the putative flagellar regulator genes *motR* and *flhF*, respectively. Downstream of *motA*, overlapping by 26 bp, *motB* is located. It also plays a major role in the function of the flagellar motor and is followed by an ORF of unknown function. Still further downstream an ORF with homologies to *prfB* of *E. coli* could be sequenced. Southern blot analysis of different *Legionella*-strains with a *motA* specific probe gave positive signals for all *L. pneumophila* strains, as well as for some non-pneumophila strains (e. g. *L. gormanii*, *L. jordanis*, and *L. bozemanii*).

By insertion of a kanamycin cassette into the *motA* gene of *L. pneumophila* Corby, a *motA* negative mutant could also be constructed. Western blot analysis and electronmicrographs confirmed that flagellin was still expressed and assembled into flagella, while light microscopy demonstrated the inability of the mutant to swim due to the impaired flagellar motor. Experiments with *A. castellanii* and HL-60 cells revealed the importance of motility for the finding and the invasion of host cells as already demonstrated for the *flaA* mutant, while intracellular replication was not affected.

Recently, a gene (*flaR*) has been described for *L. pneumophila* Corby, belonging to the LysR-family of transcriptional regulators. It could be shown that this regulator is able to bind both to its own promotor as well as to a lower extent to the *flaA* promotor. Southern hybridization of different *Legionella* species with a *flaR* specific probe revealed that FlaR must be a *L. pneumophila* specific factor, only being present in *L. pneumophila* strains, together with an upstream gene (ORF234), which is leading in the opposite direction. Fusions of the promotor regions of the two genes with the reporter gene *gfp* (green fluorescent protein gene) demonstrated that both promotors are actually functional in *Legionella*, being more active at 37°C than at 30°C. Furthermore, their activity during intracellular replication in amoebae could be demonstrated.

In conclusion, the flagellum and the motility, both subject to strict regulation, are of great importance to *Legionella*'s ability to reach and infect potential host cells.

2. Einleitung

2.1. Allgemeines

2.1.1. Historischer Rückblick

1976 erkrankten bei einer Tagung der „Pennsylvania American Legion“ in Philadelphia anlässlich des zweihundertsten Jahrestages der amerikanischen Unabhängigkeitserklärung insgesamt 182 Menschen an einer atypisch verlaufenden Pneumonie (Winn, 1988). Die Ungewissheit über den möglichen Erreger dieser neuen Epidemie ließ im folgenden zahlreichen Spekulationen freien Lauf. Nach sechs Monaten gelang es schließlich dem Forscher Mc Dade vom CDC (Center for Disease Control and Prevention) in Atlanta, die verursachenden Bakterien anzuzüchten und zu identifizieren (Fraser et al., 1977; Mc Dade et al., 1977). In Gedenken an das erste Auftreten des Bakteriums bei der Legionärs-Tagung mit insgesamt 29 Toten und wegen des typischen Krankheitsbilds einer Lungenentzündung wurde ihm der Name *Legionella pneumophila* verliehen (Brenner et al. 1979). Rückblickend konnten mehrere weitere mysteriöse Krankheitsfälle auf Legionellen zurückgeführt werden, der älteste bekannt gewordene Fall einer Legionellose ereignete sich bereits 1959 (Winn, 1988).

2.1.2. Biologie der Legionellen

Innerhalb der Familie Legionellaceae mit ihrer einzigen Gattung *Legionella* sind bisher 42 Spezies beschrieben, die in insgesamt 65 Serogruppen unterteilt werden können (Lück 1997). Nur 19 dieser Spezies werden als humanpathogen eingestuft, darunter *L. pneumophila* als wichtigster Vertreter und *L. micdadei* (Brand et al., 1997). Andere Spezies sind bislang nur als Umweltkeime oder Endosymbionten von Amöben beschrieben worden, wie beispielsweise *L. lyticum* (Springer et al., 1992).

Legionellen sind gram-negative, strikt aerobe, unbekapselte, sporenlose Stäbchen, mit einer Größe von ca. 0,5 µm Durchmesser und 1,5 - 5 µm Länge. Es können aber auch filamentöse Formen von

bis zu 50 µm beobachtet werden. Fast alle Spezies sind in der Lage, eine polare Flagelle zu bilden (Heuner et al., 1995). Auch die Ausbildung von Pili wurde beobachtet (Rodgers et al., 1980).

Die Genomgröße der Legionellen liegt etwa bei 4,0 Mbp (Russo et al., 2000) der GC-Gehalt liegt im Durchschnitt bei 39% (Bender et al., 1990). Bei einigen Stämmen konnten Plasmide gefunden werden, die jedoch für die Virulenz nur in seltenen Fällen eine Rolle spielen (Winn, 1988; Lüneberg, 2000).

Die serologische Typisierung der Legionellen beruht auf Variationen in der Lipopolysaccharid-Struktur (LPS) der äußeren Membran. Das LPS besitzt im Unterschied zu anderen gram-negativen Bakterien eine geringe Endotoxizität und ist extrem hydrophob (Zähringer et al. 1995).

Als Hauptenergiequelle werden Aminosäuren verwendet, Kohlenhydrate dienen nur in sehr geringem Maß als C-Quelle (Weiss et al., 1980; Miller et al., 1985). An Kulturmedien stellen die Legionellen als fakultativ intrazelluläre Bakterien besondere Anforderungen. Routinemäßig wird für die Anzucht heutzutage ein auf pH 6,9 gepufferter BCYE-(Buffered Charcoal Yeast Extract-)Agar verwendet, dem zusätzlich Cystein und dreiwertiges Eisen zugegeben werden müssen (Pine et al., 1985). Die beigefügte Aktivkohle dient vermutlich der Elimination freier Sauerstoffradikale. Häufiges Passagieren der Bakterien oder zu hohe NaCl-Konzentrationen können zu avirulenten Mutanten führen (Catrenich et al., 1989).

2.1.3. Vorkommen in der Umwelt

Legionellen sind als typische Wasserbakterien ubiquitär verbreitet. Man findet sie in geringen Konzentrationen von 1-10 Keimen/l (Lück et al., 1990) in den meisten natürlichen aquatischen Habitaten, wie Flüssen oder Seen (Fliermans et al., 1979) und sogar in küstennahem Salzwasser (Ortiz-Roque et al., 1987). Aber auch in künstlichen Wassersystemen, wie Kühltürmen, Wasserleitungen, Whirlpools oder Klimaanlage kommen Legionellen vor. Dabei fällt diesen vom Menschen geschaffenen Wasserreservoirs als Infektionsquelle eine weitreichende Bedeutung zu, besonders wenn es dabei zur unkontrollierten Vermehrung der Bakterien (bis zu 10^6 Keime/l) und mittels Klimaanlage oder Duschköpfen zur Bildung von infektiösen Aerosolen kommen kann (Bollin et al., 1985). So werden die Legionellen aufgrund ihrer Verbreitung im Zuge der modernen Technisierung auch zur Gruppe der Erreger der „diseases of human progress“ gezählt (Hacker, 2000).

In ihrem Wasserhabitat findet man Legionellen nur sehr selten als frei lebende Bakterien. In den allermeisten Fällen liegen sie in Assoziation mit Protozoen oder Blaualgen vor, welche häufig als Bestandteile von Biofilmen auftreten (Fields, 1996). Dies beruht vermutlich auf den speziellen Nährstoffanforderungen der Legionellen, die optimal auf ein intrazelluläres Leben abgestimmt sind. In Wasser oder feuchtem Boden können sie als Einzelbakterien zwar lange Zeit überleben, man beobachtet dann allerdings den Übergang in ein VBNC-(viable but non culturable-)Stadium (Steinert et al., 1996). Dann ist eine Anzucht auf Labormedien nicht mehr möglich und eine Reaktivierung kann nur beispielsweise durch eine Amöbenpassage stattfinden. (Hussong et al., 1987; Steinert et al., 1997).

Eine deutliche Vermehrung der Legionellen, abgesehen von der Kultivation im Labor, erfolgt, soweit bekannt, nur intrazellulär (Lee et al., 1991). Allerdings wird neuerdings auch über die Möglichkeit ihrer Replikation in Biofilmen spekuliert (Keevil, 2000; Surman et al., 2000). Bislang sind 13 verschiedene Amöbenarten (z.B. *Acanthamoeba*, *Echinamoeba*, *Hartmannella*, *Naegleria* oder *Vahlkampfia*) und 2 Ciliaten bekannt, in welchen sich die Legionellen vermehren können (Fields et al., 1993). Die Amöben dienen den Bakterien dabei in mehrerer Hinsicht. Neben der Möglichkeit der Replikation bieten sie ihnen zugleich auch Schutz vor widrigen Umweltbedingungen wie Temperaturextremen oder Bioziden (Hacker, 2000). In Amöbenzysten überleben Legionellen beispielsweise noch Konzentrationen von bis zu 50 mg/l an freiem Chlor (Kilvington et al., 1990; Kuchta et al., 1993). Außerdem können die Protozoen als Vehikel dienen, mit dem eine konzentrierte Anzahl von Erregern z.B. in die menschliche Lunge gelangt (Dowling, 1992). Es konnte gezeigt werden, dass bei gleichzeitiger Respiration vorhandener Hartmannellen der Infektionsverlauf im Tiermodell verstärkt wird (Brieland et al., 1996) und dass Legionellen nach Amöbenpassage deutlich infektiöser und virulenter sind (Cirillo et al., 1994). Ein Modell zur genetischen Untersuchung der Legionellen-Protozoen-Interaktion bietet seit kurzem *Dictyostelium discoideum* (Hägele et al., 2000; Solomon et al., 2000).

Daneben sind noch weitere Endosymbionten von Amöben bekannt, die genetisch eng verwandt mit den Legionellaceae sind. Diese bezeichnet man daher auch als LLAPs (*Legionella*-like amoebal pathogens) und klassifiziert sie phylogenetisch in 12 Gruppen (Adeleke et al., 1996).

2.2. Der intrazelluläre Lebenszyklus der Legionellen

Um eine Protozoenzelle erfolgreich zu infizieren und für die Vermehrung zu nutzen, hat *Legionella* im Laufe der Zeit einige ganz spezifische Mechanismen entwickelt, die ebenso dazu beitragen, das Überleben und die Vermehrung in menschlichen phagozytischen Zellen, wie Alveolarmakrophagen oder Leukozyten, zu ermöglichen (Gao et al., 1997). Diese sollen im folgenden erläutert werden. Eine schematische Übersicht über den intrazellulären Lebenszyklus der Legionellen im Makrophagen mit den einzelnen Infektionsschritten ist in Abbildung 1 dargestellt. Die Infektion von humanen Zellen sollte jedoch eher als zufälliges Ereignis betrachtet werden, das für die Bakterien vom ökologischen Standpunkt her eine Sackgasse darstellt (Hoffman, 1997).

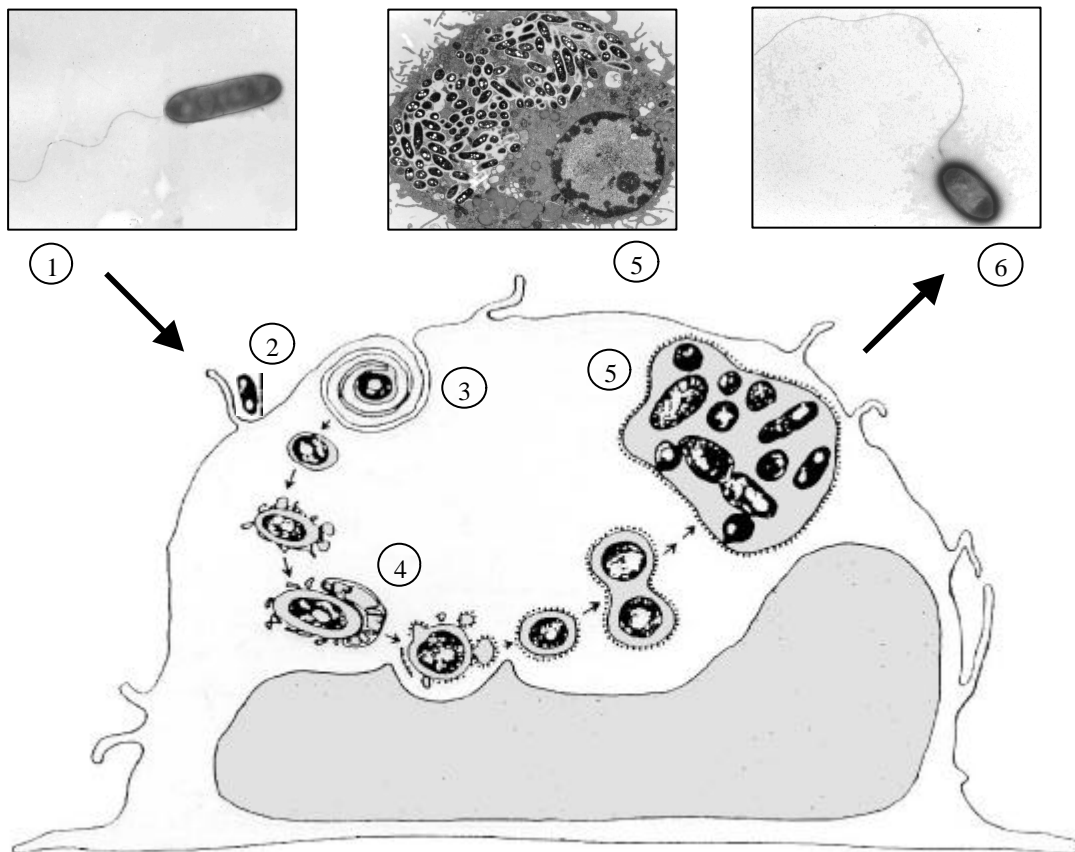


Abb. 1: Die verschiedenen Stadien eines Infektionszyklus von *Legionella*, dargestellt am Makrophagen. Es können folgende Schritte unterschieden werden: (1) Aufsuchen der Wirtszelle (2) Kontaktaufnahme und Adhärenz (3) Aufnahme der Legionellen durch „Coiling“-Phagozytose (4) Bildung eines *Legionella*-spezifischen Phagosoms, Rekrutierung von Organellen (5) Intrazelluläre Vermehrung (6) Lyse der Wirtszelle, Suche eines neuen Wirts.

EM-Bilder: eigene Arbeiten, Hägele 1998. Zeichnung modifiziert nach Shuman et al., 1997.

2.2.1. Aufnahme in die Wirtszelle

Am Anfang einer Infektion steht der initiale Kontakt des Bakteriums mit der potentiellen Wirtszelle. Die Aufnahme der Bakterien durch humane phagozytierende Zellen erfolgt komplementabhängig. Durch die Komplement-Bestandteile C3b und C3bi, welche in der Lage sind an das MOMP (major outer membrane protein) der Legionellen zu binden, wird die Adhärenz an die Komplement-Rezeptoren CR3 und CR1 ermöglicht (Bellinger et al., 1990). Dieses wiederum triggert die Phagozytose, ohne jedoch einen sogenannten „oxidativen Burst“ auszulösen. Die Legionellen werden dabei teilweise durch „Coiling“-Phagozytose aufgenommen (Horwitz, 1984), ein Vorgang, bei dem sich ein unilaterales Pseudopodium um die Bakterien windet (Rittig et al., 1998). Dieses Phänomen konnte auch für andere Pathogene wie beispielsweise *Mycobacterium tuberculosis* (Schlesinger et al., 1990) oder *Borrelia burgdorferi* (Rittig et al., 1992) beobachtet werden. Wenn man die Legionellen hingegen mit einem Anti-*Legionella*-Antikörper beschichtet, werden sie durch konventionelle Phagozytose aufgenommen, wobei etwa 50% der Bakterien abgetötet werden (Horwitz et al., 1981).

Legionellen können an phagozytische Zellen jedoch auch in Abwesenheit von Komplement binden und anschließend aufgenommen werden (Rodgers et al., 1993; Gibson et al., 1994). Ebenso können sie auch nicht professionell phagozytierende Zellen wie beispielsweise Lungenfibroblasten oder Epithelzellen invadieren (Dreyfus, 1987; Mody et al., 1993).

Etwas anders sieht das Bild bei der Invasion von Protozoen aus, obwohl auch hier das Phänomen der „Coiling“-Phagozytose beobachtet werden kann (Bozue et al., 1996). Im Gegensatz zu der durch Cytochalasin D hemmbaren, Mikrofilament-abhängigen Aufnahme der Bakterien, wie sie bei Monozyten oder Makrophagen gefunden wird (Elliot et al., 1986), kann diese bei Hartmannellen durch Zugabe von Methylamin gehemmt werden, einem Inhibitor der adsorptiven Pinozytose (King et al., 1991). Ebenso verschlechtert die Zugabe von Cycloheximid, welches die Proteinsynthese hemmt, die Phagozytoserate bei Acanthamoeben, was für eine Beteiligung von neugebildeten Proteinen an der Aufnahme spricht (Köhler et al., 2000).

Wie die Bakterien an die verschiedenen Amöbenzellen adhären können, ist wahrscheinlich je nach Zelltyp unterschiedlich. Bislang ist nur für *Hartmannella vermiformis* ein Rezeptor für *Legionella* identifiziert worden. Es handelt sich hierbei um ein 170 kD großes Gal/GalNAc (Galactose/N-Acetylgalactosamin) Lektin (Venkataraman et al., 1997). Bei Acanthamoeben hingegen konnte man

den entsprechenden Rezeptor bisher noch nicht identifizieren. Die Aufnahme der Legionellen wird hier nur teilweise durch Gal/GalNAc gehemmt, sodass vermutlich mehrere verschiedene Mechanismen gleichzeitig existieren (Harb et al., 1998). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Typ IV Pili der Legionellen als Adhärenzfaktoren eine Rolle spielen, da eine Mutation in *pilE* zu einer Abnahme von 50 % hinsichtlich der Adhärenz an *A. polyphaga* sowie humane Zellen führte (Stone et al., 1998).

Allein durch das Adhärenzieren der Bakterien kommt es außerdem sowohl bei Protozoen als auch bei Makrophagen zu einer Tyrosin-Dephosphorylierung verschiedener Wirtszellproteine (Venkatamaran et al., 1998).

2.2.2. Etablierung des Phagosoms und intrazelluläre Vermehrung

Der Schlüssel zur erfolgreichen Vermehrung der Legionellen in phagozytierenden Zellen ist die Bildung eines *Legionella*-spezifischen Phagosoms (LSP). Dieses Phagosom ist dadurch gekennzeichnet, dass es nicht mehr dem normalen Reifungsprozess eines Phagosoms unterliegt, sondern auf einer frühen Entwicklungsstufe stehenbleibt. Dadurch fusioniert es nicht mit dem Lysosom (Horwitz, 1983b) und wird auch nicht angesäuert (Horwitz et al., 1984). Ebenso sind die lysosomalen Marker CD63, LAMP1 und LAMP2, sowie MHC I und II vom LSP ausgeschlossen (Clemens et al., 1993).

Das neu gebildete Phagosom wandert zum endoplasmatischen Reticulum, woraus sich mehrere Membranschichten abschnüren und wobei es mit Vesikeln, Mitochondrien und Ribosomen interagiert, die sich schließlich entlang der Phagosomenmembran aufreihen (Horwitz 1983a; Swanson, 1995). Zusätzlich kommt es zu einer Änderung der Proteinexpression der Wirtszelle, mit einer Hochregulation von 35 sowie einer Repression von 32 Proteinen (Abu Kwaik et al. 1993). Außerdem ändert sich die Expression bestimmter *Legionella*-Gene (Abu Kwaik et al., 1994 und 1998; Susa et al. 1996), wie beispielsweise im Falle des *gspA*-(global stress protein-)Gens (Abu Kwaik et al., 1997) oder des *eml*-(early stage macrophage-induced-)Lokus (Abu Kwaik et al., 1996).

Nach etwa vier Stunden beginnt die Replikationsphase. Die Legionellen vermehren sich hierbei mit einer Generationsdauer von etwa 2 h bis die gesamte Zelle von Bakterien ausgefüllt wird. Die intrazelluläre Vermehrung innerhalb eines in der Reifung blockierten Phagosoms ist auch von anderen

Bakterien bekannt. Hierzu gehören beispielsweise *Mycobacterium tuberculosis* (Crowle et al., 1991; Clemens et al., 1995), *Toxoplasma gondii* (Sibley et al., 1985) oder *Afipia felis* (Brouqui et al., 1993). Mit Hilfe von avirulenten Mutanten hat man bestimmte *Legionella*-Gene, die für diese Vorgänge entscheidend sind, charakterisiert. Dabei konnten die sogenannten *icm* (intracellular multiplication) oder *dot* (defect in organelle trafficking)-Gene identifiziert werden. Mutationen innerhalb dieser Gen-Regionen resultieren in avirulenten Mutanten, die zwar von der Wirtszelle noch durch den Vorgang der „Coiling“-Phagozytose aufgenommen werden, dann aber nicht mehr in der Lage sind, Organellen zu rekrutieren und die Ansäuerung des Phagosoms zu verhindern, sodass sie von der Wirtszelle einfach abgedaut werden (Marra et al., 1992; Berger et al., 1993 und 1994; Brand et al., 1994).

Neuerdings gibt es allerdings erste Hinweise darauf, dass es während der Replikationsphase der Legionellen schließlich doch zu einer Phagosom-Lysosom-Fusion kommt (Swanson et al., 2000). In einer entsprechenden Studie konnten nach 18 h bei 70 % aller Vakuolen LAMP-1 sowie das lysosomale Enzym Kathepsin D nachgewiesen werden und der pH-Wert der Phagosomen sank auf 5,5. Wurde die Ansäuerung durch den Inhibitor Bafilomycin gehemmt, so vermehrten sich die Legionellen außerdem signifikant schlechter, was darauf hindeutet, dass die Fusion mit den nährstoffreichen Lysosomen den Bakterien einen deutlichen Vorteil bietet (Sturgill-Koszycki et al., 2000). Ähnliche Beobachtungen der Replikation in einem lysosomalen Kompartiment nach anfänglicher Blockierung der Phagosomenreifung konnten auch für Leishmanien sowie für den eng mit *Legionella* verwandten Erreger des Q-Fiebers, *Coxiella burnetii*, gemacht werden (Desjardins et al., 1997; Maurin et al., 1992).

2.2.3. Wirtszelllyse und Freisetzung der Legionellen

Gegen Ende der intrazellulären Replikationsphase desintegriert die Phagosomenmembran und die Bakterien füllen die gesamte Wirtszelle aus. Die Legionellen werden motil und rotieren in der Zelle (Rowbotham, 1986). Schließlich platzt diese an einer Stelle auf, wodurch die Bakterien freigesetzt werden und einen neuen Wirt infizieren können. Wodurch es letztlich zur Lyse der Wirtszelle kommt, ist bisher noch nicht geklärt. Trotz existierender Berichte über die zellschädigende Wirkung eines peptidähnlichen Toxins, welches von den Legionellen produziert werden soll (Friedman et al., 1992, 1994), gelang es bisher noch keiner Arbeitsgruppe, einen solchen Stoff tatsächlich zu isolieren. Es

konnte jedoch gezeigt werden, dass Legionellen in der Lage sind, bei humanen Zellen (nicht aber bei Protozoen) Apoptose auszulösen (Müller et al., 1996; Hägele et al., 1998). Dieser Vorgang wird über das Caspase 3-System bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Infektion initiiert (Gao et al., 1999a,b), wobei nicht alle Zellen einen apoptotischen Phänotyp annehmen. Möglicherweise spielt auch die Konzentration an LPS oder die Vermehrung der Legionellen selber mit ihrer Produktion von möglicherweise zelltoxischen Stoffwechselprodukten eine Rolle bei der Zerstörung der Wirtszelle. Bisher konnten nämlich nur Mutanten gefunden werden, die neben verminderter Zytotoxizität gleichzeitig auch Defekte in der intrazellulären Multiplikation aufwiesen (Shuman et al., 1998).

2.3. Legionella als Pathogen

2.3.1. Krankheitsbild beim Menschen

Das bekannte Krankheitsbild einer Legionellose, d.h. einer Infektion mit Legionellen, ist eine atypisch verlaufende Pneumonie, auch Legionärskrankheit genannt. Sie wird nach Respiration *Legionella*-haltiger Aerosole mit einer Inkubationszeit von 2 bis 10 Tagen durch die Vermehrung der Bakterien in den Alveolarmakrophagen hervorgerufen (Lück, 1997). Eine Übertragung von Mensch zu Mensch ist nicht bekannt (Yu et al., 1983). Neben der eigentlichen Lungenentzündung mit hohem Fieber (über 40°C) treten auch allgemeine Begleitsymptome wie Schwindel, Durchfall oder Kopfschmerzen auf. Über 90 % der Krankheitsfälle werden dabei allein von der Spezies *L. pneumophila* verursacht (Fields et al., 1996). Schätzungsweise erkranken in den USA jährlich mindestens etwa 20.000 Menschen an einer Legionellose (Marston et al., 1994). Unbehandelt führt diese Erkrankung in ca. 20 % aller Fälle zum Tode. Als intrazellulär gut wirksame Bakteriostatika werden Rifampicin und Erythromycin für die Therapie verwendet, sowie neuerdings auch Makrolid-Antibiotika und Fluorochinolone (Lück, 1997; Edelstein, 2000).

Daneben ist noch ein zweites Krankheitsbild einer Legionellose bekannt. Diese leichtere Form verläuft nach einer Inkubationszeit von 1 bis 2 Tagen mit grippeähnlichen Symptomen, wie leichtem Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen und Husten. Die Krankheit ist nicht behandlungsbedürftig und klingt nach 2 bis 5 Tagen von selber ab. Nach einer Epidemie 1978 in Pontiac, Michigan, bei der *Legionella* als verursachendes Agens zum ersten Mal eindeutig identifiziert werden konnte,

bezeichnete man diese Erkrankung als Pontiac-Fieber (Winn, 1988). Wodurch welches Krankheitsbild bedingt wird, ist noch nicht ausreichend geklärt. Fest steht jedoch, dass der Immunstatus des Wirtes eine wichtige Rolle spielt, wobei ältere oder immungeschwächte Personen eher zur heftigeren Form der Lungenentzündung neigen, wohingegen gesunde Individuen häufiger an Pontiac-Fieber erkranken. Auch die Virulenz oder ein möglicher VBNC-Zustand der Bakterien mag ausschlaggebend sein (Steinert et al., 1997).

Der Nachweis der Legionellen kann über Anzucht auf BCYE-Agar mit anschließender Serotypisierung erfolgen. Die Anzuchtrate schwankt jedoch aufgrund der oftmals starken Begleitflora und der Möglichkeit der Nicht-Kultivierbarkeit der Legionellen zwischen 10 und 70 % (Lück, 1997). Verlässlicher sind Antigennachweise in Untersuchungsmaterial mittels fluoreszierender monoklonaler Antikörper oder ELISA (Tang et al., 1993). Zur epidemiologischen Charakterisierung werden auch molekulargenetische Techniken, wie Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) (Ott et al., 1991a), Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) (Bangsborg et al., 1995), die „Arbitrary-primed“ - PCR (Williams et al., 1990) oder die *in situ*-Hybridisierung mit spezifischen rRNA-Sonden angewendet (Manz et al., 1995; Grimm et al., 1998).

2.3.2. Potentielle Virulenzfaktoren der Legionellen

Mit Hilfe verschiedener Modellsysteme kann das Virulenzpotential von *L. pneumophila* untersucht werden. Durch intranasale, intratracheale oder intraperitoneale Verabreichung von *Legionella* beim Meerschweinchen wird das Krankheitsbild einer Legionellose induziert (Jepras et al., 1985). Ein etwas einfacheres Modell bietet die Infektion von Blutmonozyten oder Makrophagen-ähnlichen Zelllinien (Pearlman et al., 1988; Marra et al., 1990). Durch die Anwendung molekularbiologischer Methoden wie Transposon-Mutagenese (Tully et al., 1992; Wiater et al., 1994), „Screening“ von Cosmid- oder Expressionsgenbanken (Marra et al., 1992; Heuner et al., 1995), „differential display PCR“ (Abu Kwaik, 1996) „signature tagged mutagenesis“ (Edelstein et al., 1999) oder Herstellung von „knock-out“ Mutanten können in diesen Systemen Virulenzfaktoren identifiziert werden. Außerdem existiert ein Projekt (<http://genome3.cpmc.columbia.edu/~legion/>) zur Sequenzierung des *Legionella*-Genoms im Gange. Im folgenden werden einige bis jetzt bekannte potentielle Virulenzfaktoren näher erläutert.

2.3.2.1. Proteine der äußeren Membran

Das von *ompS* kodierte (Hoffman et al., 1992a) 100 kD große MOMP (major outer membrane protein) stellt funktionell ein Porin dar und ist in oligomerer Form mit der Peptidoglykanschicht assoziiert (Gabay et al., 1985; Butler et al., 1990; Hoffman et al., 1992a,b). Wie bereits in Kapitel 2.2.1. erläutert, ist das MOMP der Akzeptor des Komplementfaktors C3b auf der Bakterienoberfläche. Dadurch kommt es zur Bindung an die Komplementrezeptoren CR1 und CR3 der Makrophagen, infolgedessen die Bakterien phagozytiert werden (Bellinger et al., 1990). Da es bisher noch nicht gelang, eine *ompS*-negative Mutante herzustellen, spricht vieles dafür, dass dieses Gen für *Legionella* essentiell ist (Lück, 1994).

Ein weiteres mit der Membran assoziiertes Protein stellt das 24 kD schwere Mip-(macrophage infectivity potentiator-)Protein dar, welches ebenfalls stark immunogen wirkt. Eine *mip*-negative Mutante besitzt eine verminderte Replikationsrate in Protozoen oder Makrophagen und zeigt eine 80 mal höhere LD₅₀ in Meerschweinchen als der Wildtyp (Engelberg et al., 1989; Cianciotto et al., 1989, 1992). Das Mip-Protein wird den FK506-Bindeproteinen zugerechnet und besitzt eine Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Aktivität (PPIase-Aktivität) im C-Terminus (Fischer et al., 1992; Hacker et al., 1993). Diese Aktivität scheint jedoch in Amöben keine große Rolle zu spielen, wie die Untersuchung „site-spezifischer“ Isomerase-defizienter Mutanten gezeigt hat (Wintermeyer et al., 1995). Im Meerschweinchenmodell jedoch kann eine Abhängigkeit von Isomeraseaktivität und Vermehrungsrate beobachtet werden. Wird durch Deletion des N-Terminus die Dimerisierung des Mip-Proteins verhindert, kommt es ebenfalls zu einer Reduktion der Virulenz (Köhler, 2000).

Ebenfalls ein Außenmembranprotein ist das 60 kD große HtpB-Protein, das ausgeprägte Homologie zu dem GroEL-Protein von *E. coli* zeigt (Hoffman et al., 1989). Es gehört zur Gruppe der GroEL/Hsp60-Familie der Hitzeschockproteine und wird durch Stressfaktoren, wie beispielsweise intrazelluläres Wachstum, induziert (Hoffman et al., 1990). Auch dieses Protein ist ein Hauptantigen und besitzt eventuell eine Lipochaperonfunktion, die für die Stabilisierung der Membran wichtig sein könnte. Es konnte gezeigt werden, dass Hsp60 in den Phagosomen der Wirtszellen angereichert wird, wo es möglicherweise mit der Phagosomenmembran assoziiert und an der Bildung des LSP beteiligt sein könnte (Fernandez et al., 1996). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Hsp60 bei der Adhärenz an HeLa-Zellen eine Rolle spielt (Garduno et al., 1998b).

2.3.2.2. Extrazelluläre Enzyme

Sekretierte Enzyme wie Proteinasen oder Phospholipasen sowie Hämolytine werden häufig für zelltoxische Effekte und die Schädigung der Lunge bei einer Legionellose verantwortlich gemacht (Dowling et al., 1992). Die durch das Gen *mspA* kodierte Zink-Metalloprotease, auch „major secretory protein“ (Msp) genannt, verursacht bei intranasaler Applikation, ähnlich wie die Elastase von *Pseudomonas aeruginosa* zu der Sequenzhomologien bestehen (Black et al., 1990), das histologische Bild einer Pneumonie im Meerschweinchen (Williams et al., 1987). Außerdem kann durch subkutane Injektion eine starke Immunantwort ausgelöst werden, welche die Tiere anschließend vor letalen Infektionen mit Legionellen schützt (Blander et al., 1989). Trotz dieser Befunde jedoch zeigen *mspA*-negative *Legionella*-Mutanten keine verminderte Virulenz im Meerschweinchenmodell (Blander et al., 1990; Moffat et al., 1994), womit die Rolle als Virulenzfaktor umstritten bleibt. Ein weiterer hämolytischer Faktor konnte mit dem Legiolysin (Lly) identifiziert werden (Wintermeyer et al., 1991). Auch dieses Enzym spielt jedoch für die *in vivo* Virulenz keine Rolle, sondern katalysiert einen Schritt bei der Bildung von Homogentisat, einem melaninartigen Pigment (Wintermeyer et al., 1994). Dieses vermittelt durch Braunpigmentierung einen Lichtschutz, was für das Überleben in der Umwelt eine Rolle spielen könnte (Steinert et al., 1995). Auch Phospholipasen werden für die histologischen Veränderungen des erkrankten Lungengewebes verantwortlich gemacht. Für *L. pneumophila* wurde eine Phospholipase C mit einem Molekulargewicht von ca. 52 kD (Baine, 1988) identifiziert, sowie eine Phospholipase A, die in der Lage ist, die alveolaren Oberflächen-Phospholipide zu zerstören (Flieger et al., 2000). Desweiteren spielen vermutlich auch noch saure Phosphatasen und Proteinkinasen im Hinblick auf die Modulation der Immunantwort durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung eine Rolle (Thorpe et al., 1981; Saha et al., 1985, 1988).

2.3.2.3. Sekretionssysteme

Seit 1992 zum ersten Mal von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen durch Komplementation einer avirulenten *Legionella*-Mutante Gene für ein Typ IV Sekretionssystem entdeckt wurden, wird über dessen mögliche Funktionen diskutiert. Fest steht, dass die bereits in Kapitel 2.2.2. angesprochen sogenannten *icm*- oder *dot*-Gene (Marra et al., 1992, Brand et al., 1994; Berger et al., 1993, 1994) essentiell für die Etablierung eines replikativen Phagosoms sowie die intrazelluläre Vermehrung der Legionellen sind. Es konnten bisher 24 dieser *icm/dot*-Gene identifiziert werden, welche

geclustert auf zwei verschiedenen Genregionen vorliegen (Segal et al., 1997, 1998b; Purcell et al., 1998, Andrews et al., 1998). Region I umfasst die zuerst entdeckten Gene *dotA*, *icmABC* sowie noch drei weitere Gene, innerhalb der Region II konnten 17 *icm/dot*-Gene lokalisiert werden. Durch Mutationsanalyse konnte gezeigt werden, dass diese Gene den Legionellen neben ihrer Funktion für die Blockierung der Phagosomenreifung außerdem natürliche Kompetenz vermitteln, indem sie den konjugativen Transfer ermöglichen (Segal et al., 1998; Vogel et al., 1998). 14 dieser Gene zeigen Homologien zu plasmidkodierten DNA-mobilisierenden Genen (*tra/trb* von *Shigella sonnei*) (Segal et al., 1999a), *icmE* und *dotB* besitzen schwache Homologien zum Vir Typ IV Sekretionssystem von *Agrobacterium tumefaciens*. Es konnte mittels einer *dotA*-negativen Mutante gezeigt werden, dass *Legionella* Poren in die eukaryontische Membran inserieren kann (Kirby et al., 1998a,b), wodurch es bei hoher Infektionsdosis zu einer osmotischen Lyse der Wirtszellen kommt. Höchstwahrscheinlich werden durch diese Poren jedoch bei einer normalen Infektion Effektormoleküle durch die Phagosomenmembran sekretiert, die innerhalb der ersten Minuten nach der Aufnahme die Bildung eines *Legionella*-spezifischen Phagosoms sichern und die weitere Phagosomenreifung verhindern (Roy, 1999; Vogel et al., 1999; Zuckmann et al., 1999). Durch Fusion von *dotA* mit einem IPTG-induzierbaren Promotor konnte demonstriert werden, dass für eine erfolgreiche Infektion die DotA-Expression bereits vor Aufnahme durch den Makrophagen stattfinden muss, sie für den anschließenden Vorgang der intrazellulären Vermehrung jedoch nicht mehr nötig ist (Roy et al., 1998).

Erst kürzlich wurde ein weiteres unabhängiges Typ IV Sekretionssystem in *Legionella* identifiziert (Segal et al., 1999b). Dieses besteht aus 11 *lvh*-(Legionella vir homologues-) Genen, welche starke Homologien zu den *Agrobacterium tumefaciens* Vir-Proteinen zeigen und innerhalb einer DNA-Region mit höherem GC-Gehalt (44%) als das Restgenom (39%) liegen. Die Vir-Proteine bilden ein Typ IV Sekretionssystem, womit es dem Pflanzenpathogen möglich wird, T-DNA in die Pflanzenzellen zu transferieren (Beyersbergen et al., 1992). Auch bei *Legionella* sind für die Konjugation eine Reihe dieser Gene notwendig. Außerdem können einige *lvh*-Gene bestimmte Mutationen innerhalb des *icm/dot*-Sekretionssystems substituieren. Im Gegensatz zu dem letztgenannten Sekretionsapparat sind jedoch die *lvh*-Gene für die intrazelluläre Vermehrung der Legionellen in Makrophagen oder Protozoen nicht notwendig (Segal et al., 1999).

Daneben sind auch noch andere Sekretionssysteme für *Legionella* bekannt. Wichtig für das Ausschleusen der Flagellenkomponenten und den anschließenden Aufbau der Flagelle ist ein Typ III

Flagellen-Sekretionssystem, wie es auch bei anderen Bakterien gefunden werden konnte. Für *Yersinia* konnte gezeigt werden, dass neben den Flagellenbestandteilen auch weitere virulenzassoziierte Faktoren wie eine Phospholipase und eine Protease über dieses Exportsystem sekretiert werden. Nach einer Mutation des Flagellenexportsystems waren die resultierenden *Yersinia*-Mutanten deutlich in ihrer Virulenz attenuiert (Young et al., 1999). Ob ein solcher Mechanismus auch für *Legionella* existiert, muss noch geklärt werden.

Daneben wurden auch Gene mit Homologien zu Typ II Sekretionssystemen anderer gram-negativer Bakterien bei Legionellen identifiziert. Mutationen innerhalb dieser Gene resultieren in Mutanten, die in ihrer intrazellulären Replikation in Amöben gestört sind. Außerdem kann beispielsweise die Msp-Protease nicht mehr sekretiert werden. (Hales et al., 1999). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Prepilin-Peptidase (*pilD*), welche wichtig ist für den Export der Typ VI Pili der Legionellen, auch Substrate umsetzt, die über das Typ II Sekretionssystem sekretiert werden. Eine *pilD*-negative Mutante ist ebenfalls nicht mehr in der Lage, die Zinkmetalloprotease zu sekretieren oder sich intrazellulär zu vermehren und zeigt eine 100-fach erhöhte LD₅₀ im Meerschweinchenmodell (Liles et al., 1998).

2.3.2.4. Weitere putative Virulenzfaktoren

Das LPS der Legionellen weist im Gegensatz zu den meisten gram-negativen Bakterien nur eine sehr geringe Endotoxizität auf. Dies ist möglicherweise auf die Anwesenheit langer und zahlreich verzweigter Fettsäuren im Lipid A Molekül zurückzuführen (Zähringer et al., 1995). Jedoch vermittelt die ungewöhnliche Zusammensetzung der O-spezifischen Seitenkette und der Core-Region auch eine extreme Hydrophobizität des LPS, was wichtig sein könnte für die Anreicherung im Schaum von Wassersystemen und somit für die aerogene Übertragung (Colbourne et al., 1987). Außerdem konnte gezeigt werden, dass während einer Infektion kontinuierlich LPS an die Wirtszelle abgegeben wird (Susa et al., 1999). Für die Funktion des LPS als Virulenzfaktor spricht auch der attenuierte Phänotyp verschiedener LPS-Mutanten, sowie die Entdeckung eines LPS-“Switch“-Verhaltens (Lüneberg et al., 1998; Helbig et al., 2000).

Eine entscheidender Faktor für das Überleben eines intrazellulären Pathogens ist die ausreichende Verfügbarkeit an Eisen. Für *Legionella* konnte bisher ein 98 kD schweres eisenbindendes Acn-Protein identifiziert werden (Mengaud et al., 1993), sowie ein 15,5 kD heminbindendes Hbp-

Protein, das allerdings für das intrazelluläre Wachstum von *L. pneumophila* nicht notwendig ist (O'Connell et al., 1996). Ebenso wurde ein Fur-homologes 15 kD großes Protein kloniert, was das Vorkommen eines *fur*-abhängigen Regulationssystems bei *Legionella* zeigt (Hickey et al., 1994; 1997). Es konnte außerdem die Existenz eines Legiobactin genannten Siderophor-Systems nachgewiesen werden (Liles et al., 2000).

Die Superoxiddismutase (SOD) SodB ist als ein cytoplasmatisches Fe-Protein charakterisiert worden, das schädliche O₂-Radikale eliminiert (Steinmann et al., 1992). Sie ist im Gegensatz zu SodC, welches für die intrazelluläre Vermehrung keine Rolle spielt (Gregory et al., 1996) sondern nur für das Überleben in der stationären Phase benötigt wird, ein essentielles Protein (Sadosky et al., 1994).

Mittels Transposonmutagenese wurden weitere Gene ermittelt, die für die Vermehrung sowohl in Protozoen als auch in humanen phagozytierenden Zellen wichtig sind und die in ihrer Gesamtheit als *pmi*-(protozoan and macrophage infectivity-)Gene bezeichnet wurden (Gao et al., 1997). Dass zur Besiedelung dieser zwei evolutionär so völlig verschiedenen Zelltypen die gleichen Mechanismen benutzt werden, spricht für eine Übertragung der Überlebensweise im natürlichen Habitat auf den menschlichen Wirt (Segal et Shuman, 1999b; Kwaik, 1998b; Swanson et al., 2000). Allerdings gibt es auch einige zusätzliche Mechanismen, die *Legionella* für die Infektion von humanen Zellen nützt. Dazu gehören beispielsweise Gene wie die sogenannten *mil*-Loci (macrophage-specific infectivity loci), welche für die Vermehrung in Protozoen keine Rolle spielen, jedoch wichtig für das Überleben in Makrophagen sind (Gao et al., 1998). Ebenso lassen sich auch Gene finden, welche die Virulenz allein im Protozoenmodell beeinflussen. Dazu gehört beispielsweise ein globaler Regulator namens *ligA*, der essentiell für die Vermehrung in Acanthamoeben zu sein scheint (Fettes et al., 2000), sowie der σ -Faktor *rpoS* (Hales et al., 1999).

Die mögliche Bedeutung der Flagelle als Virulenzfaktor wird im Kapitel 2.4.3 dargestellt.

2.3.3. Wachstumsphasen-abhängiger Phänotyp

Ein interessantes Phänomen im Lebenszyklus von *Legionella* ist die Wachstumsphasen-abhängige Regulation von virulenzassoziierten Eigenschaften (Hoffman, 1997). Eine systematische Analyse der zwei beobachteten Phänotypen ergab folgendes Bild (Byrne et al., 1998; Hoffman, 1997). Während der logarithmischen Phase (d.h. sowohl intrazellulär, als auch in Flüssigkultur und auf Agarplatten)

liegen die Bakterien als Stäbchen vor, mit einer nicht durch Gimenez-Färbung anfärbbaren Zellwand. Sie sind nicht flagelliert, NaCl-resistent und besitzen keine kontaktabhängige Zytotoxizität. Nach Aufnahme durch phagozytierende Zellen wird ein bestimmter Prozentsatz der Bakterien abgedaut, dabei kolokalisieren lysosomale Marker mit dem Phagosom.

Beim Übergang in die stationäre Phase ändert sich dieser Phänotyp. Kurz vor dem Platzen einer Wirtszelle, oder auch in einer stationären Flüssigkultur, werden die Legionellen zu abgerundeten Kurzstäbchen mit verdickter Außenmembran (vgl. EM-Bilder in Abb. 1), die sich nun mit Gimenez-Reagenz anfärben lässt. Es kommt zur Akkumulation des Speicher-stoffs Poly- β -hydroxybutyrat. Die Bakterien bilden eine Flagelle aus, sind hochmotil (Rowbotham, 1986) und zeigen in hohen Dosen eine kontakt-abhängige zytotoxische Wirkung (Kirby et al., 1998). Außerdem werden sie NaCl-sensitiv und resistenter gegenüber osmotischem Stress. Bei einer Infektion können die Bakterien die Phagosom-Lysosom-Fusion verhindern. Während der anschließenden intrazellulären Multiplikation bildet sich wieder der replikative Phänotyp aus.

Wodurch diese Modulation im Verhalten ausgelöst wird, ist noch nicht vollständig geklärt. Byrne et al. (1998) konnten zeigen, dass Nahrungsdepletion einen entscheidenden Einfluss hat, indem sie mit dem Überstand einer stationären Legionellenkultur die Konversion von exponentiell wachsenden Bakterien induzieren konnten, wobei die Zugabe von Aminosäuren als Energiequelle dieses verhinderte. Eine Rolle als Signal spielt dabei die intrazelluläre ppGpp-Konzentration und das Auslösen der sogenannten „stringent response“ (Swanson et al., 1999). Es muss jedoch noch weitere Modulatoren geben, da intrazellulär wachsende Bakterien im Gegensatz zu Bakterien aus Flüssigkultur beispielsweise einen deutlich säureresistenteren Phänotyp besitzen (Sturgill-Koszycki et al., 2000).

2.4. Die bakterielle Flagelle

2.4.1. Aufbau und Funktionsweise

Die bakterielle Flagelle ist ein hochkomplexes Fortbewegungsorgan, durch welches die Bakterienzelle über ein biochemisches Signal-Netzwerk auf verschiedenste sensorische Reize ihrer Umwelt reagieren kann. Bei *Salmonella typhimurium* oder *Escherichia coli*, den beiden in dieser

Hinsicht am besten untersuchten Organismen, ist für ihren Aufbau eine koordinierte Expression von über 50 verschiedenen Genprodukten nötig, wodurch die Struktur sozusagen „von innen nach außen“ zusammengefügt wird (Macnab, 1996; Harshey et al., 1996).

Eine Flagelle lässt sich strukturell in drei Untereinheiten aufgliedern - den Basalkörper, den Haken und das lange, helikale Filament. Eine schematische Übersicht ist in Abbildung 2 dargestellt.

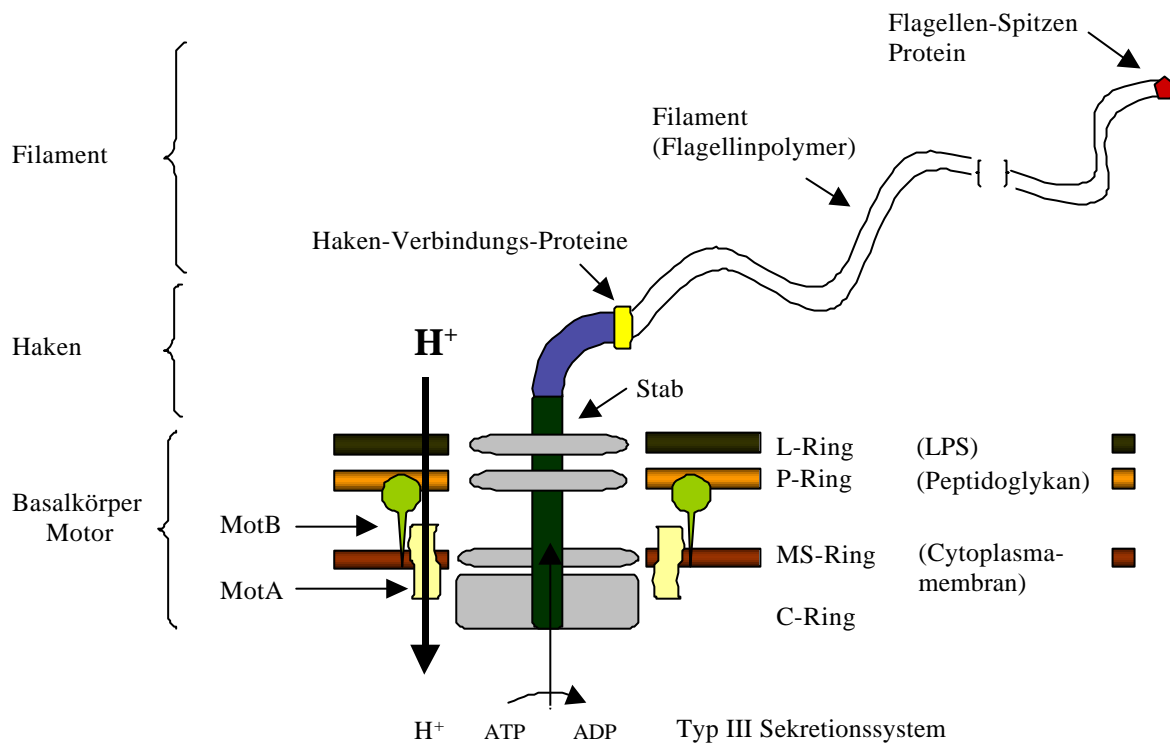


Abb. 2: Schematische Darstellung einer bakteriellen Flagelle mit den drei Untereinheiten Basalkörper, Haken und Filament. Erklärungen siehe Text. Modifiziert nach Macnab, 1996.

Der Basalkörper besteht aus einem Stab, der die Rotation des Motors auf den Haken und damit das Filament überträgt, und dem ihn umgebenden System aus vier Ringen, welche das Auftreten lateraler Scherkräfte verhindern und den rotierenden Anteil lokal in der Membran fixieren (Macnab, 1996). Der Motor selber wiederum, bestehend aus Stator und Rotor, wird bei *S. typhimurium* mit Hilfe von fünf Proteinen aufgebaut: MotA, MotB, FliG, FliM und FliN. Mutationen in diesen Proteinen resultieren in einem paralyisierten Phänotyp, bei dem die Flagelle zwar ausgebildet wird, aber nicht rotieren kann (Yamaguchi et al., 1986; Macnab, 1992).

Die beiden integralen Membranproteine MotA und MotB sind zirkulär um den untersten Ring in der Cytoplasmamembran angeordnet und bilden den Stator. Die Rotation des Motors erfolgt durch einen

Protonengradienten („proton motive force“), bzw. bei marinen *Vibrio*-Spezies oder einigen alkalophilen *Bacillus*-Arten durch einen Na⁺-Gradienten (Glagolev et al., 1978; Imae, 1991). Wie die Rotation der Flagelle letztendlich ausgelöst wird und die Energie des Protonengradienten in mechanische Rotationsenergie umgewandelt wird, ist bisher noch nicht bekannt (Macnab, 1999). Durch Sequenzanalyse der *mot*-Gene bei verschiedenen Bakterienarten konnte jedoch gezeigt werden, dass das MotA-Protein unter anderem vier membrandurchspannende Segmente enthält, welche wahrscheinlich den Protonentunnel ausbilden (Blair et al., 1990; Zhou et al., 1995). Das MotB-Protein hingegen fixiert vermutlich MotA an der Peptidoglykanschicht der Zellwand und scheint den Protonenfluss zu regulieren (Chun et al., 1988). Beide Proteine bilden einen Komplex und müssen in einem äquivalenten Verhältnis zu einander gebildet werden, Überproduktion einer Komponente führt zu einem verlangsamten Zellwachstum (Macnab, 1996).

Die Übergangsstelle von Haken zu Filament wird durch Verbindungsproteine, die sogenannten „hook associated proteins“ (HAP I und III) überbrückt. Das Filament selber besteht aus miteinander verdrillten Einzelketten aus hochpolymeren Flagellinuntereinheiten. Für einzelne Bakterien wie z.B. *Vibrio* (Klose et al., 1998) sind bis zu fünf verschiedene Flagellinogene identifiziert worden. Die Polymerisierung der Flagellinmoleküle wird durch ein sogenanntes Spitzenprotein („flagella capping protein“, auch HAP II genannt) katalysiert (Ikeda et al., 1985). Dieses Protein ist essentiell für das Ausbilden einer Flagelle. Mutationen in dem dazugehörigen Gen führen zur Abgabe von monomeren Flagellinmolekülen nach außen und verhindern den Aufbau des Filaments (Homma et al., 1984). Das Ausschleusen der äußeren Flagellenkomponenten erfolgt über das Typ III Flagellen-Sekretionssystem (Harshey et al., 1996).

2.4.2. Regulationsebenen

Für die koordinierte Expression der verschiedenen Flagellengene existiert ein komplexes Regulationsnetzwerk. Dieses besteht bei den Enterobakterien aus drei verschiedenen Ebenen, bei *Caulobacter crescentus* werden sogar vier Regulationsstufen beschrieben (Wu et al., 1997). Dies alles ist notwendig, damit die energetisch aufwendige Expression aller Flagellengene auch zum richtigen Zeitpunkt und genau in der richtigen Reihenfolge stattfindet (Helmann, 1991).

An der Spitze der Flagellenhierarchie (vgl. Abb. 3) steht bei *S. typhimurium* und *E. coli* ein Operon mit den regulatorischen Genen *flhD* und *flhC* (Liu et al., 1994), welche ihrerseits unter der Kontrolle

von globalen zellulären Signalen stehen, wie z.B. cAMP (als Glucose-Sensor), OmpR (Sensor für osmotischen Stress) oder Hitzeschock-Proteinen (als generelle Stress-Sensoren) (Macnab, 1996). Die Proteine FlhD und FlhC aktivieren die Expression der Flagellengene der zweiten „Ebene“, die beispielsweise die Struktur des Basalkörpers und das Typ III Flagellenexportsystem ausbilden. Außerdem wird ein weiterer Regulator, der σ^{28} -Faktor (entspricht dem FliA-Protein) sowie sein Antagonist, der anti- σ^{28} -Faktor (entspricht dem FlgM-Protein), der durch Bindung an FliA dessen Assoziation mit dem RNA-Polymerase-Core-Enzym verhindern und sogar aktiv rückgängig machen kann, aktiviert (Kutsukake et al., 1994, Chadsey et al., 1998). Ist der Aufbau des Basalkörpers abgeschlossen, so kann das FlgM-Protein über das Exportsystem aus der Zelle ausgeschleust werden. Dadurch wird der σ^{28} -Faktor nicht mehr inhibiert und kann seinerseits die Flagellengene der dritten „Ebene“ aktivieren (Ohnishi et al., 1990). Dazu gehören beispielsweise die Flagellengene und weitere Gene, die den äußeren Teil der Flagelle aufbauen, die Gene für den Flagellenmotor sowie Chemotaxis-Gene (Blair, 1995). Werden innerhalb dieser Regulationskaskade Gene mutiert, so bleibt der Flagellenassembly auf der entsprechenden Stufe stehen und es kommt nicht zur Ausbildung einer intakten Flagelle (Helmann, 1991).

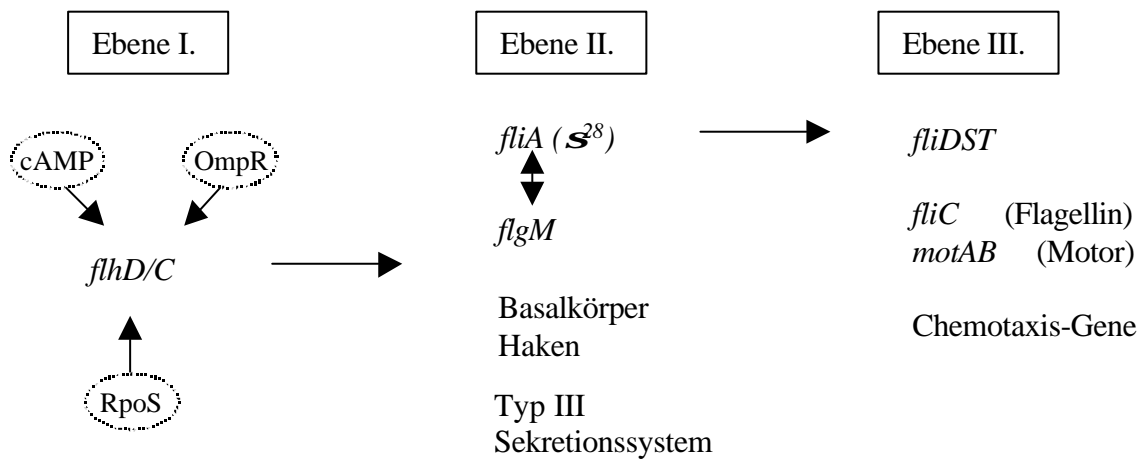


Abb. 3: Schematische Darstellung der Flagellenregulation mit dreistufiger Regulationshierarchie bei *E. coli* und *S. typhimurium* (Modifiziert nach Harshey et al., 1996).

2.4.3. Die Flagelle der Legionellaceae

Die Mehrzahl der *Legionella*-Spezies ist in der Lage, eine einzelne, polare Flagelle auszubilden (Ott et al., 1991b). Diese besteht aus einer einzigen Hauptuntereinheit, dem 48 kD große FlaA-Protein (Flagellin), aufgebaut aus 475 Aminosäuren und kodiert von dem Gen *flaA*. Nur für *L. oakridgensis*

und *L. longbeachae* SG1 konnte kein *flaA*-homologes Gen nachgewiesen werden. Bei wenigen anderen *Legionella*-Stämmen wird das Flagellin nicht exprimiert (Heuner et al., 1995). Strukturell weist es große Homologien zu den Flagellinen von *Pseudomonas aeruginosa*, *S. typhimurium* und *Bacillus subtilis* auf.

Das Flagellin wird bei *Legionella* temperaturabhängig exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer höheren Temperatur die Flagellierung stark zurückgeht. So sinkt der Anteil an flagellierten Legionellen von 65 % bei 30°C auf unter 5 % bei 42°C (Ott et al., 1991b). Die Flagellierung wird aber auch noch durch andere Umweltsignale reguliert. Beispielsweise wurde durch eine Fusion des *flaA*-Promotors mit den Reportergenen *lacZ* und *luxAB* gezeigt, dass eine Reduktion der Flagellinexpression auch durch das Vorhandensein von Aminosäuren, der Hauptenergiequelle von *Legionella*, oder durch die Zunahme der Viskosität des Mediums erfolgt. Einen positiven Einfluss hat die Zunahme der Osmolarität (Heuner et al., 1999; Byrne et al., 1998).

Die Promotorsequenz oberhalb des *flaA* Startcodons weist große Ähnlichkeit mit σ^{28} -abhängigen Promotorsequenzen auf. Es konnte gezeigt werden, dass die Regulation von *flaA* auf Transkriptionsebene bei *Legionella* über den σ^{28} -Faktor FliA gesteuert wird, welcher durch Komplementation einer *fliA*-negativen Mutante von *B. subtilis* aus *Legionella* kloniert wurde (Heuner et al., 1997). Eine ähnliche Regulation wurde auch bei Flagellinen anderer Organismen beobachtet (Helmann, 1991; Harshey et al., 1996).

Bei einer Reihe von Bakterien ist bereits ein Zusammenhang zwischen Motilität und Virulenz nachgewiesen worden. Nicht-motile Mutanten von *Vibrio anguillarum* (Milton et al., 1996), *Bordetella avium* (Temple et al., 1998), *Agrobacterium tumefaciens* (Chesnokova et al., 1997) oder *Azospirillum brasilense* (Vande Broek et al., 1998) sind beispielsweise deutlich in der Fähigkeit attenuiert, ihre natürlichen Wirte zu infizieren und zu kolonisieren. Auch als Adhärenz- oder Invasionsfaktor kann die Flagelle sowie die Motilität selber eine Rolle spielen, wie z. B. für *Campylobacter jejuni* (Yao et al., 1994), oder für *Vibrio alginolyticus* (Morisaki et al., 1999) beschrieben.

Die ersten Berichte über die Begeißelung der Legionellen stammen von Rodgers et al. (1980), Chandler et al. (1980) und Elliot et al. (1981). Rowbotham (1986) fertigte elektronenmikroskopische Aufnahmen der Bakterien an und stellte fest, dass die Bakterien zu Beginn einer Infektion nicht flagelliert sind, sondern erst gegen Ende des Infektionszyklus motil werden. Zur

Bedeutung der Flagelle für *Legionella* sp. gibt es widersprüchliche Angaben in der Literatur, jedoch lässt sich eine Kopplung zwischen Virulenz und Motilität bei *Legionella* beobachten. Wie bereits in Kapitel 2.3.3. beschrieben geht der Übergang zur virulenteren Form immer mit einer Flagellierung einher (Byrne et al., 1998). Auch wurden nicht-motile Mutanten isoliert, die eine deutlich verminderte Virulenz zeigten und sich schlechter intrazellulär vermehren konnten (Pruckler et al., 1995). Bosshard et al. (1997) schlugen sogar eine Unterscheidung der virulenten von den avirulenten *Legionella*-Spezies nur anhand der Flagellierung vor. Hingegen vermehrte sich eine nicht flagellierte *fliI*-negative Mutante im Zellkulturmodell ebenso wie der Wildtyp (Merriam et al., 1997).

Ob also der virulente Phänotyp abhängig von der Flagellierung ist, oder ob es nur zufällig zu einer koordinierten Expression der Virulenz- und der Flagellengene kommt, ist bisher noch nicht geklärt.

2.5. Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Bedeutung der Flagelle und der Motilität für das Infektionsverhalten von *Legionella pneumophila* näher untersucht und charakterisiert werden.

Bei einer Reihe von Bakterien ist ein Einfluss der Flagelle auf die Virulenz bereits beschrieben worden. Für *Legionella* findet man hierzu in der Literatur widersprüchliche Angaben. Zudem sind bis zum jetzigen Zeitpunkt erst wenige Flagellengene von *Legionella* bekannt.

Daher sollten zunächst einmal weitere noch unbekannte Flagellen- und Motilitätsgene von *L. pneumophila* identifiziert und kloniert werden, um mehr über die mögliche Organisation des Flagellenregulons zu erfahren. Um die Frage zu beantworten, inwieweit die Flagelle einen Einfluss auf das Infektionsverhalten der Legionellen hat, sollte eine *flaA*-negative Mutante des Stammes *L. pneumophila* Corby komplementiert werden und anschließend im Vergleich mit Wildtyp und Komplementante hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Adhärenz, Invasion, Replikation und Zytotoxizität in verschiedenen Wirtszellmodellen getestet werden.

Außerdem sollte, unabhängig von der Flagellierung, die Bedeutung der Motilität für die Virulenz der Legionellen untersucht werden. Dazu war es nötig, eine motilitätsdefiziente Mutante von *L. pneumophila* herzustellen, welche noch in der Lage ist, eine Flagelle auszubilden, und deren Phänotyp zu charakterisieren.

Schließlich sollte auch die Fragestellung der Flagellenregulation anhand der Charakterisierung des Regulators *flaR* bearbeitet werden.

3. Material und Methoden

3.1. Organismen

3.1.1. Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in den Tabellen 1 und 2 aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete *Legionella*-Stämme

Stamm	Charakteristika	Referenz/Herkunft
<i>L. pneumophila</i> AA100	Patientenisolat, SG 1	Kwaik et al., 1993
<i>L. pneumophila</i> Corby	Patientenisolat, SG 1	Jepras et al., 1985
<i>L. pneumophila</i> Philadelphia (Phil.) I	Patientenisolat, passagiert durch Meerschweinchen, SG 1	McDade et al., 1977
<i>L. pneumophila</i> U1	Umweltisolat, SG 1	Bender et al., 1990
<i>L. pneumophila</i> U21	Umweltisolat, SG 6	Bender et al., 1990
<i>L. pneumophila</i> U22	Umweltisolat, SG 3	Bender et al., 1990
<i>L. pneumophila</i> U40	Umweltisolat, SG 1	Bender et al., 1990
<i>L. pneumophila</i> 640	Patientenisolat, SG 5	Ott et al., 1991a
<i>L. pneumophila</i> 664	Patientenisolat, SG 6	Ott et al., 1991a
<i>L. pneumophila</i> 667	Patientenisolat, SG 4	Ott et al., 1991a
<i>L. pneumophila</i> 33/52	Patientenisolat	Prof. Marre, Ulm
<i>L. pneumophila</i> Bloomington	Typstamm, SG 3	ATCC 33155
<i>L. pneumophila</i> Los Angeles	Typstamm, SG 4	ATCC 33156
<i>L. pneumophila</i> Chicago 2	Typstamm, SG 6	ATCC 33215
<i>L. pneumophila</i> KH1	<i>flaA</i> -Mutante von <i>L. p.</i> Corby (Km ^R)	Heuner, 1997
<i>L. pneumophila</i> KH3	<i>flaA</i> -Mutante von <i>L. p.</i> Corby (Km ^R)	Heuner, 1997
<i>L. pneumophila</i> CD10	Komplementante der <i>flaA</i> -Mutante KH3 von <i>L. p.</i> Corby (Km ^R , Cm ^R)	diese Arbeit
<i>L. pneumophila</i> Corby (pRK6 (pBC(<i>gfp</i>)))	trägt Plasmid mit promotorlosem <i>gfp</i> (Cm ^R)	Köhler, 2000
<i>L. pneumophila</i> Corby (pRK10 (pBC(<i>gfp</i>)P _{mip}))	trägt Plasmid mit <i>gfp</i> :P _{mip} Fusion (Cm ^R)	Köhler, 2000
<i>L. pneumophila</i> Corby (pBC(<i>gfp</i>)P _{flaR})	trägt Plasmid mit <i>gfp</i> :P _{flaR} Fusion (Cm ^R)	diese Arbeit
<i>L. pneumophila</i> Corby (pBC(<i>gfp</i>)P _{orf234})	trägt Plasmid mit <i>gfp</i> :P _{orf234} Fusion (Cm ^R)	diese Arbeit
<i>L. pneumophila</i> Corby CD17 (pCD12)	trägt Plasmid pCD12 (Suc ^S , Cm ^R)	diese Arbeit
<i>L. pneumophila</i> CD1711	<i>motA</i> -Mutante von <i>L. p.</i> Corby (Km ^R)	diese Arbeit
<i>L. pneumophila</i> CD1716	<i>motA</i> -Mutante von <i>L. p.</i> Corby (Km ^R)	diese Arbeit
<i>L. pneumophila</i> CD1719	<i>motA</i> -Mutante von <i>L. p.</i> Corby (Km ^R)	diese Arbeit
<i>L. anisa</i>	Typstamm	Fields et al., 1990
<i>L. bozemanii</i>	Typstamm	ATCC 33217
<i>L. dumoffii</i>	Typstamm	ATCC 33279

Stamm	Charakteristika	Referenz/Herkunft
<i>L. erythra</i>	Typstamm	Prof. Marre, Ulm
<i>L. feelei</i>	Typstamm, SG1	ATCC 35072
<i>L. feelei</i>	Typstamm, SG2	ATCC 35849
<i>L. gormanii</i>	Typstamm	ATCC 33297
<i>L. hackeliae</i>	Typstamm, SG1	ATCC 33250
<i>L. hackeliae</i>	Typstamm, SG2	ATCC 35999
<i>L. israeliensis</i>	Typstamm	ATCC 43119
<i>L. jordanis</i>	Typstamm	ATCC 33623
<i>L. longbeachae</i>	Typstamm, SG1	ATCC 33462
<i>L. longbeachae</i>	Typstamm, SG2	ATCC 33484
<i>L. micdadei</i>	Typstamm	ATCC 33218
<i>L. oakridgensis</i>	Typstamm	ATCC 33761

Tabelle 2: Verwendete *E. coli*-Laborstämme

Stamm	Charakteristika	Referenz/Herkunft
<u>Escherichia coli</u>		
<i>E. coli</i> K 12 (DH5 α)	F ⁻ , Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15, Δ (<i>argF lac</i>), U169 <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , (<i>r_K</i> ⁻ , <i>m_K</i> ⁻), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA69</i> , <i>relA1</i> λ ⁻	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> K 12 (SM10 λ pir)	<i>thi1</i> , <i>thr1</i> , <i>leuB6</i> , <i>supE44</i> , <i>tonA21</i> , <i>lacY1</i> , <i>recA</i> ⁻ ::RP4-2-Tc:: <i>Mu</i> , <i>Km</i> ^R	Simon et al., 1983

3.1.2. Zellen und Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen und Zelllinien sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Verwendete Zellen und Zelllinien

Stamm	Charakteristika	Referenz/Herkunft
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	axenisierte frei lebende Amöbe, bildet Zysten und Trophozoiten	ATCC 33152
HL-60 Zellen	humane Myelom-Leukämie- Zelllinie, Einzelzellen in Suspension, adhärent nach Differenzierung mit PMA	DMSZ, Braunschweig, Germany
humane Blutmonozyten	mononukleäre Zellen, über Histopaque- Gradienten aus „buffy coats“ aufgereinigt, in Kultur differenziert	gesunde Spender, Transfusionsmedizin Würzburg

3.2. Plasmide

3.2.1. Verwendete Vektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Verwendete Vektoren

Vektor	Charakteristika	Referenz/Herkunft
pACYC177	Amp ^R ; Km ^R ;	BioLabs; Frankfurt
pBC KS	Cm ^R ; <i>lacZ</i> , T3- und T7-Promotor, ColE1 ori, Derivat von pUC19	Stratagene, Heidelberg
pBOC20	Cm ^R ; <i>sacB</i> , oriT, oriV	O'Connel et al., 1995
pCVD442	Amp ^R ; <i>sacB</i> , oriR6K, <i>mob</i> RP4	Donnenberg et al., 1991
pGEM ^R -TEasy	Amp ^R ; <i>lacZ</i> , T7- und SP6-Promotor, f1ori	Promega, Mannheim
pLAFR2	Tet ^R ; <i>mob</i> , <i>tra</i>	Friedman et al., 1987
pLAW344	Cm ^R ; Amp ^R ;	Wiater et al., 1994
pMMB207	Cm ^R ; oriT, oriV, <i>mob</i> A/B/C	Morales et al., 1991
pMSS704-1	Cm ^R ; Amp ^R ; oriR6K, <i>mob</i> RP4	Mahan et al., 1993
pUC18	Amp ^R ; <i>lacZ</i>	Pharmacia, Freiburg

3.2.2. Rekombinante Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten oder hergestellten Plasmide sind in Tabelle 5 aufgelistet. Zur Vermehrung aller Plasmide auf Basis der Vektoren pCVD442 sowie pMSS704-1 wurde der *E. coli* K 12 Stamm SM 10 *I pir* verwendet.

Tabelle 5: Verwendete und hergestellte rekombinante Plasmide

Bezeichnung	Vektor	Charakteristika	Referenz/Herkunft
pfla1	pUC18	Genbankplasmid, <i>flaA</i> -Gen	Heuner, 1995
pKH106H4	pUC18	Genbankplasmid,	Heuner, 1997
pKH106H4-SKI	pUC18	<i>accD</i> -Gen-Fragment, <i>flaA</i> -Gen pKH106H4 nach <i>Xba</i> I-Verdau, religiert	Heuner, 1997
pKH6	pMMB207	<i>flaA</i> -Gen (<i>Xba</i> I- <i>Kpn</i> I, 2,2 kb)	Heuner, 1997
pfli3	pUC18	<i>fliA</i> -Gen (PCR-Produkt, Primer: fliU5 und fliR5)	Heuner, 1997
pBLL1713	pLAFR2	Genbank-Cosmid, trägt <i>flaA</i> -Region	Ludwig, 1992
pBLL0223	pLAFR2	Genbank-Cosmid, trägt <i>flaA</i> -Region	Ludwig, 1992
pBLL1244	pLAFR2	Genbank-Cosmid, trägt <i>motA</i> -Region	Ludwig, 1992

pDK19	pBC KS	3,2 kb <i>EcoRI/EcoRV</i> -Fragment aus pBLL1244, trägt <i>fliA</i> , <i>motA</i> , sowie <i>ylxH</i> - und <i>motB</i> -Fragment	Kapfhammer, 1998
pRK6 (pBC(<i>gfp</i>))	pBC KS	trägt promotorloses <i>gfp</i> (Cm ^R)	Köhler, 2000
pRK10 (pBC(<i>gfp</i>)P _{mip})	pBC KS	trägt <i>gfp</i> :P _{mip} Fusion (Cm ^R)	Köhler, 2000
pBC(<i>gfp</i>)P_{flaR}	pBC KS	trägt Plasmid mit <i>gfp</i> :P _{flaR} Fusion	diese Arbeit
pBC(<i>gfp</i>)P_{orf234}	pBC KS	trägt Plasmid mit <i>gfp</i> :P _{orf234} Fusion	diese Arbeit
pCD2	pLAW344	<i>flaA</i> -Gen aus pfla1 (<i>XbaI/EcoRV</i>)	diese Arbeit
pCD5	pBOC20	<i>flaA</i> -Gen aus pfla1 (<i>SacI/SalI</i>)	diese Arbeit
pCD8	pBC KS	4,5 kb <i>XbaI/SacI</i> -Fragment aus pBLL0223, trägt <i>flaA</i> , <i>flaG</i> , <i>fliD</i> , <i>fliS</i> , sowie <i>accD</i> -Fragment	diese Arbeit
pCD10	pMSS704-1	2,2 kb <i>SacI/XbaI</i> -Fragment aus pKH106H4 (<i>flaA</i> -Gen)	diese Arbeit
pCD11	pBC KS	Kanamycin-Kassette aus pACYC177 (<i>StuI</i> verdaut) in <i>NruI</i> -site von pDK19 kloniert	diese Arbeit
pCD12	pBOC20	<i>SacI/SalI</i> -Fragment aus pCD11	diese Arbeit
pCD13	pCVD442	<i>SacI/SalI</i> -Fragment aus pCD11	diese Arbeit
pmot1	pGEM ^R -TEasy	1893 bp PCR-Fragment (<i>motA</i> und <i>motB</i>), Primer: MotA1 und MotB2	diese Arbeit
pmot2	pBC KS	<i>SacI/SacII</i> -Fragment aus pmot1	diese Arbeit
pCD16	pGEM ^R -TEasy	430 bp PCR-Fragment (<i>mip</i> Promotor), Primer: MipP1 und MipP2	diese Arbeit
pCD17	pBC KS	<i>SacI/SacII</i> -Fragment aus pCD16	diese Arbeit
pCD18	pGEM ^R -TEasy	1760 bp PCR-Fragment (<i>motAB</i>), Primer: MotKo1 und MotKo2	diese Arbeit
pCD19	pBC KS	<i>BamHI/BglII</i> -Fragment aus pCD18 in pCD17 kloniert	diese Arbeit
pCD20	pMSS704-1	<i>SalI</i> -Fragment aus pmot1 (<i>motAB</i>)	diese Arbeit
pCD25	pGEM ^R -TEasy	968 bp PCR-Fragment, Primer: <i>ylxSalI</i> und <i>fli5SpeI</i>	diese Arbeit
pCD26	pGEM ^R -TEasy	968 bp PCR-Fragment, Primer: <i>ylxSalI</i> und <i>fli5XbaI</i>	diese Arbeit
pCD28	pBC KS	<i>PstI/SalI</i> -Fragment aus pCD27	diese Arbeit
pCD29	pGEM ^R -TEasy	1kb-PCR-Fragment (Km ^R), Primer: Ka5EcoR5 und Ka3Spe1	diese Arbeit
pCD30	pGEM ^R -TEasy	854 bp PCR-Fragment, Primer: <i>fli3SpeI</i> und <i>motSphI</i>	diese Arbeit
pCD31	pBC KS	<i>SpeI/NotI</i> -Fragment aus pCD30	diese Arbeit
pCD32	pBC KS	<i>SalI/SpeI</i> -Fragment aus pCD25 in pCD31 kloniert	diese Arbeit
pCD33	pBC KS	Kanamycin-Kassette aus pCD29 in <i>NotI</i> site von pCD32	diese Arbeit
pCD35	pCVD442	<i>SphI/SalI</i> -Fragment aus pCD34	diese Arbeit

3.3. Oligonukleotid-Primer

Die verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden bei der Firma MWG Biotech, Ebersberg hergestellt und sind in Tabelle 6 aufgelistet. Sequenzierprimer (Sq) sind am 5'-Ende mit einem IRD-800 Farbstoff markiert. Die verwendete Sonde für die *in situ* Hybridisierung trägt am 5'-Ende einen FLUOS Farbstoff (5 (6)-Carboxyfluorescein-N-Hydroxysuccimidester).

Tabelle 6: Verwendete Oligonukleotid-Primer

Oligonukleotid-Primer	Sequenz 5'® 3'	Referenz
Sequenzierung: <i>flaA</i>-Region	5 IRD 500	
CD1Sq	GAT GTC TGC ATC ATG TTG CCC G	diese Arbeit
CD2Sq	CGT ATC AGA CAA CTT ATC AGC TGC	diese Arbeit
CD3Sq	GAG TAT TGA ACC TGT ACC CTC AG	diese Arbeit
CD5Sq	CAG AGT TGT CGG CGC TTG GTC	diese Arbeit
CD6Sq	CAC AGG CTT AAT CAA CGA GTT C	diese Arbeit
CD7Sq	GAG GCT TAT CTG CTA TAT CAT CCG	diese Arbeit
CD8Sq	GCA TAG AAA CAG CCT CCC CTC ATG	diese Arbeit
CD9Sq	GTC TCT TAC TTG GCA TGC AAT CGG	diese Arbeit
CD10Sq	AGC CAC GGC TGT GTT CGC ATG	diese Arbeit
CD11Sq	GCA AAT GGC GAA CAT GGT GGT G	diese Arbeit
CDacD1Sq	TTC TAG ATG AGT CAG GGC AAG	diese Arbeit
Sequenzierung: <i>motA</i>-Region	5 IRD 500	
DK19r5	CAT GGG CGG CTA TAG CCC ACC	Kapfhammer, 1998
DK19r6b	CAT CAG GAT AGT CAT CGA TGG GTC G	Kapfhammer, 1998
DK19r7Sq	GGT TTT GGA ATT GCC AAT CAT CG	diese Arbeit
DK19r8Sq	CAT AAG ACA TAA CGA TGG CAG	diese Arbeit
DK19u5	CTG TAT GCC GCC AAA GCA	Kapfhammer, 1998
DK19u6	CTC TGT TCC GGA AGC AGC	Kapfhammer, 1998
DK19u8Sq	GCT GAT GTC CCT TTC CTC CTG	diese Arbeit
DK19u9Sq	CCC AAC TTA TCA GCA CCA AAT CG	diese Arbeit
Primer für Klonierungen:		
accD1 (KHACCD)	TCC AAC CGT CGC TCC CAT GGA GCC ACC	Heuner, 1997
flaA1 (KH1)	GTA ATC AAC ACT AAT GTG GC	Heuner, 1997
flaA3(KH3)	GGT GTC AGT AAC CAA ACT GG	Heuner, 1997
flaA5 (KH5)	GTT GCA GAA TTT GTT TTT TGG TC	Heuner, 1997
fli3-1	AGG GAG ACT ATC AAT CAC TTG G	diese Arbeit
fli5-1	CGA TTA CCG CAG AGT GTA CA	diese Arbeit
fli5-2	ATC AGG GAT GCT CGG TCT G	diese Arbeit
fli3Spe1	CAC TAG TGA TTG ATA GTC TCC CTC	diese Arbeit
fli5Spe1	CAA GTC AAC TAG TTG TAC ACT C	diese Arbeit
fli5Xba1	CAA GTC ATC TAG ATG TAC ACT C	diese Arbeit
motSph1	CAG GCA TGC AAC GAC CAT TTC ATC	diese Arbeit
ylx-Sal1	AGC CAT AGC GTT ATG TCG ACT	diese Arbeit
Ka5-EcoR5	CGT GAT ATC ATC CTT CAA CTC	diese Arbeit
Ka3-Spe1	GTC TGA CTA GTC GGG AAG ATG	diese Arbeit
Karev1Sq	CTC CTT CAT TAC AGA AAC GGC	diese Arbeit
Kaumi1Sq	CAC CTG ATT GCC CGA CAT TAT C	diese Arbeit
lysCD1	ATC GTT CAC AGC CGG CAA TAA CTA	diese Arbeit
lysCD2	CTT ATG AAA GAT TGAATA AGC GGA GC	diese Arbeit
MipP1	CAA CTG TCC CGG GCG CTT TG	diese Arbeit
MipP2	AGA TCT TAC ACT TAA GTT CTG ATA C	diese Arbeit
MotA1	CCA AGT GAT TGA TAG TCT CCC TC	diese Arbeit

MotB2	CCG CAT TGA TCA GCA TAG GAT G	diese Arbeit
MotKo1	GCA ACG CAT CGC ATT AGA TCT AG	diese Arbeit
MotKo2	CGC ATG GAT CCG CAT AGG ATG ATC	diese Arbeit
motR5	CAT GGG CGG CTA TAG CCC CAC C	diese Arbeit
motU7	GAC CCA TCG ATG ACT ATC CTG ATG	diese Arbeit
reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Sambrook, 1989
uni	GTA AAA CGA CGG CCA GT	Sambrook, 1989
Oligonukleotid-Sonde für <i>in situ</i>	5' FLUOS-Farbstoff	
Hybridisierung:		
LEG705	CTG GTG TTC CTT CCG ATC	Manz et al., 1995

3.4. Medien

3.4.1. Flüssigmedien und Nährböden

Kulturmedium	Chemikalien	Mengenangabe (g/l)
LB-Flüssigmedium (<u>L</u> uria- <u>B</u> ertani Medium)	Bacto Trypton Hefe-Extrakt NaCl ad 1 Liter H ₂ O	10 g 5 g 5 g
LB-Agar	siehe LB-Flüssigmedium Agar	12 g
AYE-Flüssigmedium (<u>A</u> ces- <u>b</u> uffered <u>Y</u> east- <u>E</u> xtract-Medium)	Hefe-Extrakt ACES ad 1 Liter H ₂ O, mit 10 N KOH den pH auf 6,9 einstellen und autoklavieren.	10 g 10 g
	sterilfiltriert zugeben: Cystein in 10 ml H ₂ O Eisenpyrophosphat in 10 ml H ₂ O	0,4 g 0,25 g
BCYE-Agar (<u>B</u> uffered <u>C</u> harcoal <u>Y</u> east- <u>E</u> xtract Agar)	siehe AYE-Flüssigmedium Agar	12 g
Amöbenmedium (PYG 712) (ATCC, 1985)	Na-Citrat x 2 H ₂ O Proteose Pepton Hefe-Extrakt ad 900 ml H ₂ O 0,05 M CaCl ₂ 0,005 M Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O 0,25M KH ₂ PO ₄ 0,4 M MgSO ₄ x 7 H ₂ O 0,25 M Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	1 g 20 g 1 g 8 ml 10 ml 10 ml 10 ml 10 ml
	2 M Glucose nach dem Autoklavieren zugeben	50 ml

Amöbenpuffer	siehe PYG 712, ad 1 Liter H ₂ O ohne Proteose Pepton, Hefe-Extrakt und Glukose	
Supplementiertes RPMI-Medium 1640	RPMI-Medium 1640 Glutamin FCS, hitzeinaktiviert	1 Liter 1 % 10 %

3.4.2. Antibiotika- und andere Zusätze

Es wurden Stammlösungen der Antibiotika angesetzt wie bei Sambrook et al., 1989 beschrieben und bei -20°C gelagert.

Antibiotikum	gelöst in	eingesetzte Konzentration
Ampicillin (Amp)	H ₂ O	100 mg/l
Chloramphenicol (Cm)	EtOH	5 - 25 mg/l
Kanamycin (Km)	H ₂ O	12,5 - 25 mg/l
Tetracyclin (Tet)	EtOH	10 mg/l
weitere Zusätze		
X-Gal	2% in DMSO	2 ml/l
IPTG	100 mM in H ₂ O	1 ml/l

3.5. Chemikalien und Enzyme

3.5.1. Allgemeine Chemikalien

Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

AppliChem, Darmstadt; Bayer, Leverkusen; Becton-Dickinson, Augsburg; Boehringer Mannheim, Mannheim; Difco, Augsburg; Fluka, Deisenhofen; Gibco, Eggenstein; Merck, Darmstadt; Oxoid, Wesel; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma, Deisenhofen.

3.5.2. Enzyme und Kits

Die verwendeten Enzyme und Kits sind in Tabelle 7 angegeben.

Tabelle 7: Verwendete Enzyme und Kits

Enzyme und Kits	Herkunft
Calf-intestine Phosphatase D (CIP)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Klenow-Fragment	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Lysozym	Merck, Darmstadt
Proteinase K	Merck, Darmstadt

Restriktionsendonucleasen	BioLabs, Frankfurt; Gibco, Eggenstein; Amersham Pharmacia Biotec, Braunschweig; Stratagene, Heidelberg
RNase	Roth, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	Gibco, Eggenstein
Taq-Polymerase	Quiagen, Hilden; DAP-Goldstar, Eurogentec
ECL Kit	Amersham Pharmacia Biotec, Braunschweig
GENECLEAN®-Kit	Bio 101, Dianova, Hamburg
pGEM ^R -TEasy Kit	Promega, Mannheim
PCR-Supermix	Gibco, Eggenstein
Sequenzierkit	Amersham Pharmacia Biotec, Braunschweig
SequiTherm EXCEL TM II Long-Read TM	Biozym, Hessisch Oldenburg
PCR-Purification-Kit QIAquick	Qiagen, Hilden

3.5.3. Größenmarker (für DNA- und Proteingele)

Für die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen wurde ein 1 kb Marker von MBI Fermentas eingesetzt, für die Größenbestimmung von Proteinen in SDS-Gelen ein Rainbow-Marker von Amersham.

DNA-Größenmarker:

1 kb Leiter (MBI Fermentas)

Fragment	Größe in kb
1	10,0
2	8,0
3	6,0
4	5,0
5	4,0
6	3,5
7	3,0
8	2,5
9	2,0
10	1,5
11	1,0
12	0,75
13	0,5
14	0,25

Protein-Größenmarker:

Rainbow Marker (Amersham)

Fragment	Größe in kD
1	250
2	160
3	105
4	75
5	50
6	35
7	30
8	25
9	15
10	10

3.6. Geräte

Es wurden handelsübliche Geräte und Materialien der Firmen Beckmann, Bio-Rad, Eppendorf, Falcon, Greiner, Haereus, Nunc, Sartorius oder Sorvall benutzt. Spezielle Geräte sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Spezielle Geräte

Gerät	Firma
Analysenwaage	Chyo JL 180
Bakterienschüttler	Innova TM 4300
Brutschränke	Heraeus electronics, CO ₂ -belüftet
DNA-Sequenzierer	LI-Cor DNA-Sequencer, Modell 4000
Elektroporator	Bio-Rad, Gene Pulser Transfection Apparatus
Fluoreszenzmikroskop	ZEISS, Axiolab
Geldokumentationsanlage	Gel Doc 2000, BioRad
Geltrockner	BioRad 1125 B
Kamera	Nikon F301
Kühlzentrifuge	Beckman J2-HS
pH-Meter	Metrohm-Herisau E512
PCR-Geräte	Techne Progene; Biometra Thermocycler T3
Photometer	Zeiss Spektralphotometer PM6
Proteingel-Apparatur	Biorad Mini-Protean II Electrophoresis Cell
Speed-Vakuumzentrifuge	Univapo 150H Uniequip
Sterilwerkbank	Nunc Microflow 50726
Tischinkubatoren	Eppendorf Thermostat 5320
Tischzentrifuge	Eppendorf Zentrifuge 5412
Transmissionselektronenmikroskop	Zeiss EM 10
Ultraschallgerät	Branso Sonifier B12
Ultrazentrifuge	Sorvall OTD-75
Vakuum-Blot-System	Pharmacia LKB
Vortexer	Vortex Genie 2

3.7. DNA-Isolierung

3.7.1. Isolierung von Gesamt-DNA

Die Isolierung von Gesamt-DNA wird mit Hilfe des Boehringer Kits laut Anleitung durchgeführt. Die Anzucht der *E. coli* Bakterien erfolgt in Flüssigkultur. Legionellen werden 2 Tage auf BCYE-Platten inkubiert und mit H₂O abgeschwämmt. Anschließend werden die jeweiligen Bakterien-Suspensionen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt. Pro Säule wird je 1 ml dieser Suspension eingesetzt. Nach Elution der DNA mit 2 x 200 µl Elutionspuffer wird diese über Nacht gefällt (siehe 3.2.1.4.), in 30 µl H₂O gelöst und im Kühlschrank bei 8°C aufbewahrt.

3.7.2. Isolierung von Plasmid-DNA (kleiner Maßstab)

Die Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wird durch alkalische Lyse der Bakterien und anschließende Phenol/Chloroform-Reinigung durchgeführt (Sambrook et al., 1989). Dazu werden 3 ml einer Übernachtskultur pelletiert und in 100 µl Lösung 1 gelöst. Nach 5 min Inkubation bei RT werden auf Eis 200 µl Lösung 2 zugegeben und nach weiteren 5 min auf Eis 150 µl eiskalter Lösung 3. Zum Mischen der Lösungen sollte das Eppendorf-Gefäß je 3 mal vorsichtig invertiert werden. Während der folgenden 5-minütigen Inkubationszeit und anschließender 5-minütiger Zentrifugation dieses Ansatzes (Ansatz 1) wird das Phenol-Chloroform Gemisch vorbereitet. Dazu mischt man einen Teil Phenol mit einem Teil Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 24:1), zentrifugiert für 2 min bei 1000 g und pipettiert je 200 µl der unteren Phase in ein frisches Eppendorfgefäß. Dieses versetzt man daraufhin mit 450 µl der oberen Phase von Ansatz 1, schüttelt für 2 min und zentrifugiert wie oben. Den Überstand (400 µl) gibt man erneut in ein frisches Eppendorfgefäß und versetzt ihn mit 1 ml 100% EtOH, um die DNA aus der wässrigen Phase auszufällen. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 1000 g wird der Überstand verworfen, das Pellet in 70% EtOH gelöst, erneut für 5 min zentrifugiert und das Pellet schließlich in 40 µl H₂O gelöst und bei -20°C aufbewahrt. Um vorhandene RNA zu entfernen kann der Ansatz noch mit 1 µl Rnase versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert werden.

Lösungen:

Lösung I	Lösung II	Lösung III
50 mM Glukose 10 mM EDTA, pH 8,0 25 mM Tris HCl, pH 8,0 3 mg/ml Lysozym (frisch)	0,2 N NaOH 1 % SDS	3M Na-Acetat, pH 4,8

3.7.3. Isolierung von Plasmid- und Cosmid-DNA (großer Maßstab)

Für größere Mengen Plasmid- oder Cosmid-DNA wird eine Isolierung durch Anionen-Austausch-Chromatographie mit Hilfe des Qiagen-Kits (QIAGEN-tips 100 und 500) laut Anleitung durchgeführt. Die DNA wird abschließend in H₂O gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

3.7.4. DNA-Fällung

Die zu fällende DNA-Lösung wird mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat-Lösung und 2 Volumen absolutem EtOH versetzt und je nach Menge für 1 bis 15 Stunden bei -80°C gefällt. Danach wird für 20 min bei 1000 g abzentrifugiert, das Pellet im Speedvac-Konzentrator getrocknet und anschließend in einer geeigneten Menge H_2O gelöst.

3.7.5. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration kann mit Hilfe eines Spektralphotometers photometrisch bestimmt werden (Sambrook et al., 1989). Dazu wird ein Aliquot (1 - 5 μl) in H_2O verdünnt und in einer Quarzküvette bei 260, 280 und 230 nm gegen Wasser vermessen. Die Berechnung der DNA-Menge erfolgt über das Programm 1 des Spektralphotometers. Eine Aussage über die Reinheit der DNA gibt das Verhältnis der Extinktionskoeffizienten (E) an, dabei sollte $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$ nicht kleiner als 1,8 und $E_{260\text{nm}}/E_{230\text{nm}}$ nicht kleiner als 2,2 sein (Sambrook et al., 1989).

3.8. DNA-Linearisierung und Ligation

3.8.1. DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen

Für den Verdau chromosomaler DNA werden 2-5 μg DNA über Nacht mit dem jeweiligen Enzym und dem dazugehörigen Puffer bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Zum Überprüfen der Vollständigkeit des Verdau werden Aliquots auf ein Agarosegel aufgetragen.

Plasmid-DNA wird mit den jeweiligen Enzymen im dazugehörigen Puffer für 1-4 h bei der notwendigen Temperatur inkubiert. Für analytische Zwecke wird ein 20 μl Ansatz verwendet, für präparative Zwecke ein 50 μl Ansatz.

3.8.2. Dephosphorylierung von linearisierter Plasmid-DNA

Zur Entfernung der 5'-Phosphatgruppen linearisierter Vektor-DNA, wodurch bei der darauffolgenden Ligation die Religation des Vektors verhindert wird, inkubiert man die DNA 30 min bei 37°C mit 0,01 U/pmol 5'-Enden CIP (calf intestine alkaline phosphatase). Anschließend wird die DNA über Gelelektrophorese und Gene-Clean Behandlung gereinigt.

3.8.3. Klenow-Behandlung

Zum Auffüllen überhängender 5'-Enden nach einer Restriktionsspaltung gibt man Klenow-Fragment und einen Desoxynukleotid-Mix (20mM) zu dem Restriktionsansatz und inkubiert für 30 min bei 37°C. Danach wird die DNA über Gelelektrophorese und Gene-Clean Behandlung gereinigt.

3.8.4. Ligation mit der Gibco-T₄-Ligase

Um linearisierte „insert“-DNA mit linearisierter Vektor-DNA zu verbinden wird ein Ligationsansatz hergestellt. Für einen 20 µl Ansatz wurde ein Verhältnis von 1 µl Vektor-DNA zu 2-6 µl Insert-DNA eingesetzt (die DNA-Konzentration sollte dabei etwa 1:3 betragen). Dazu gibt man 4 µl 5 x T₄-Ligationspuffer, sowie 1 µl T₄-Ligase, der Rest wird mit Wasser aufgefüllt. Dann wird der Ansatz über Nacht bei 16°C inkubiert. Die DNA kann anschließend direkt für die Transformation eingesetzt werden.

3.8.5. Ligation mit dem pGEM^R-TEasy Kit

Zur direkten Klonierung von generierten PCR-Fragmenten wurde das pGEM^R-TEasy Kit verwendet. Laut Anleitung wird dabei 1 µl Vektor-DNA (pGEM-TEasy, bereits gespalten und dephosphoryliert) mit 3 µl PCR-Produkt, sowie 5 µl 2x Puffer und 1 µl Ligase versetzt und 1 h bei RT inkubiert. Danach kann der Ansatz für die Transformation eingesetzt werden.

3.9. Transformation von Bakterien

3.9.1. Herstellung kompetenter *E. coli* (Calciumchlorid-Methode)

50 ml LB-Medium werden morgens mit 1 ml einer *E. coli* Übernachtskultur beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,8 bei 37°C in einem Rotationsschüttler inkubiert (ca. 4 Stunden). Der Ansatz wird abzentrifugiert und auf Eis in 12 ml einer eiskalten 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation löst man das Pellet in 1,25 ml 100 mM CaCl₂-Lösung und lässt den Ansatz 1 Stunde auf Eis stehen. Abschließend gibt man 520 µl eiskalten 86 % Glycerins zu (Endkonzentration 25%), mischt und friert Aliquots zu je 150 µl bei -80°C ein, die für eine Transformation mittels Hitzeschock eingesetzt werden können. Alternativ kann anstelle der Glycerin-Zugabe auch eine

erneute Zentrifugation durchgeführt und das Pellet in 0,5 ml einer eiskalten 50mM CaCl₂-Lösung gelöst werden. Nach Inkubation auf Eis über Nacht müssen die kompetenten Zellen direkt verwendet werden.

3.9.2. Herstellung kompetenter *L. pneumophila*

Die Legionellen werden auf 3 BCYE-Agarplatten ausgestrichen und zwei Tage bei 37°C inkubiert. Anschließend werden sie mit H₂O abgeschwämmt und auf Eis in insgesamt 200 ml eiskalter 10 %iger Glycerinlösung resuspendiert. Nach Abzentrifugieren löst man das Pellet in 100 ml, zentrifugiert wieder, resuspendiert in 10 ml, zentrifugiert und resuspendiert das Pellet nachfolgend in 1,5 ml Glycerinlösung. Während der ganzen Prozedur werden die Zellen auf Eis gehalten. Abschließend werden Aliquots zu je 150 µl bei -80°C tiefgefroren. Sie können direkt für die Elektroporation verwendet werden.

3.9.3. Transformation mittels Hitzeschock (*E. coli*)

Zur Transformation kompetenter *E. coli* wird ein Hitzeschock durchgeführt. Dazu mischt man auf Eis in einem Eppendorfgefäß 50 µl kompetenter Zellen mit 2 µl (bei ungespaltenem Vektor), bzw. 10 µl (bei Ligationsansätzen) DNA und lässt den Reaktionsansatz mindestens 30 min auf Eis stehen. Anschließend führt man bei 42°C für 90 Sekunden einen Hitzeschock durch. Danach wird der Ansatz noch einmal kurz auf Eis abgekühlt, mit 1 ml LB-Medium versetzt und 2 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend plattiert man Aliquots auf Selektions-LB-Agarplatten aus und inkubiert über Nacht bei 37°C.

3.9.4. Transformation mittels Elektroporation (*L. pneumophila*)

Kompetente Legionellen werden durch Elektroporation transformiert. Dazu werden auf Eis 80 µl kompetenter Zellen in UV-sterilisierte Elektroporationsküvetten gegeben, mit 5 µl Plasmid-DNA versetzt und bei 2,2 kV, 100 Ω, 25 µFarad elektroporiert. Nach dem elektrischen Impuls werden die Zellen sofort in 1 ml LB-Medium gegeben, in ein Eppendorfgefäß überführt und für 5-6 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend werden Aliquots auf Selektions-BCYE-Agarplatten ausplattiert und für 5 Tage bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert.

3.10. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Auftrennung von DNA-Fragmenten

Bei der PCR kann mittels zweier spezifischer Oligonukleotidprimer und einer hitzestabilen Polymerase ein spezifisches DNA-Fragment in großen Mengen amplifiziert werden. Durch Wahl geeigneter Primer können dabei auch Restriktionsschnittstellen an die Enden des Fragments eingebaut werden. Als Template kann dabei chromosomale DNA oder Plasmid-DNA dienen. Anstelle von isolierter DNA können aber auch ganze Bakterien als Template eingesetzt werden. Dazu wird in einem Eppendorfgefäß etwas Bakterienmaterial in 20-50 µl H₂O suspendiert, 6 min bei 100°C aufgeköcht und schnell auf Eis abgekühlt. Von dem Lysat wird 1 µl für die PCR eingesetzt.

Folgende Schritte werden durchgeführt (Schritte 2 bis 4 werden dabei 30 x wiederholt):

Schritt	Vorgang	Temperatur	Zeitdauer
1	Denaturierung der DNA	95°C	2 min
2	Denaturierung der DNA	95°C	0,5 - 1 min, je nach Fragmentlänge
3	Annealing des Primers	T _m	0,5 - 1 min, je nach Fragmentlänge
4	Elongation der DNA	72°C	30 s pro 500 bp
5	Elongation der DNA	72°C	5 min

Die T_m (Schmelztemperatur des Primers) berechnet sich aus der Länge und dem GC-Gehalt des Oligonukleotids nach folgender Formel:

$$T_m = 69,3 + 0,4 \times (\% \text{ GC-Gehalt}) - 650 / \text{Länge des Primers in bp}$$

3.10.1. PCR mit der Supermix-Polymerase

35 µl Supermix werden in einem 0,5 ml Eppendorfgefäß mit je 1 µl der zwei Primer und 1 µl Template-DNA versetzt. Die Polymerase besitzt keine 3'→5'-Exonuclease-Aktivität und die Amplifikationszeit ist sehr schnell. Der Supermix mit Bakterien-Lysat als Template wurde standardmäßig zum Überprüfen der Klonierungen verwendet.

3.10.2. PCR mit der DAP-Goldstar-Polymerase

Die PCR wird in einem Endvolumen von 50 µl laut Protokoll durchgeführt, als Template wird isolierte DNA eingesetzt. Dabei werden die Bedingungen so lange variiert, bis ein PCR-Fragment detektiert werden kann. Standardmäßig werden 6 µl MgCl₂ zugesetzt. Die DAP-Goldstar-

Polymerase besitzt 3'→5'-Exonuclease-Aktivität und eignet sich daher sehr gut zur Klonierung von PCR-Fragmenten, da es durch das "Proof-reading" selten zum Einbau falscher Basen kommt. Allerdings arbeitet sie etwas langsamer als andere Polymerasen. Die generierten Fragmente werden anschließend im Agarosegel aufgetrennt, über Gene-Clean-Behandlung gereinigt und in den Vektor pGEM^R-TEasy kloniert (siehe 3.2.3.2.). Abschließend wird das klonierte Fragment mittels uni- und reverse-Primern sequenziert und die korrekte Basenabfolge überprüft.

3.10.3. Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten wird ein Agarosegel (1 %) verwendet. Dazu wird 1 g Agarose in 100 ml 1 x TAE-Puffer (Sambrook et al., 1989) aufgekocht. Nach Abkühlen unter Rühren auf etwa 50°C wird das Gel in einen vorher mit Klebestreifen abgedichtetem Gelschlitten mit eingesetztem Gelkamm gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wird der Kamm entfernt und das Gel in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Gelkammer gelegt.

Nun werden die Proben mit 1x Loading Buffer versetzt und in die Taschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgt bei 90 Volt für 1 h oder über Nacht bei 35 Volt für 16 h. Dabei wird die Kammer so an die Spannungsquelle angeschlossen, dass die DNA zur Anode hin wandert. Anschließend wird das Gel in einer Ethidiumbromidlösung für 15 min gefärbt und die DNA-Banden unter UV-Licht betrachtet und photographiert.

Lösungen:

50 x TAE-Puffer:	242 g Tris	
	57,1 ml Eisessig	
	100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0	ad 1 Liter H ₂ O
Loading Buffer:	MBI Fermentas	

3.10.4. Elution von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel (Gene-Clean Kit)

DNA-Fragmente werden mit Hilfe des Gene-Clean Kits aufgereinigt. Dazu werden die entsprechenden Banden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten, in Eppendorfgefäße überführt und laut Anleitung weiterbehandelt. Die DNA wird mit 15 µl H₂O eluiert und anschließend bei -20 °C aufbewahrt.

3.11. Bestimmung der DNA-Sequenz

3.11.1. PCR-Reaktion zur Sequenzbestimmung mit dem Amersham-Kit

200 ng DNA pro kb Template werden mit 1 pmol Sequenzierprimer (am 5'-Ende mit dem Farbstoff IRD800 markiert) in einem Gesamtvolumen von 13 µl Wasser aufgenommen. 3 µl dieses Prämixes werden zu je 1 µl Terminations-Mix (jeweils für die Basen A, C, G und T aus dem Sequenzierkit) in ein 0,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert. Dadurch erhält man für jede zu sequenzierende Sequenz 4 PCR-Ansätze. Jeder Ansatz wird mit einem Tropfen Paraffinöl überschichtet und nach folgendem Protokoll amplifiziert (Schritte 2 - 4 werden dabei 30 x wiederholt) :

Schritt	Vorgang	Temperatur	Zeitdauer
1	Denaturierung der DNA	95°C	2 min
2	Denaturierung der DNA	95°C	15 sec
3	Annealing des Primers	T _m + 3°C	15 sec
4	Elongation der DNA	70°C	15 sec

3.11.2. PCR-Reaktion zur Sequenzbestimmung mit dem Excel-Kit

Das SequiTherm EXCEL™ II Kit eignet sich besonders für die Cosmid-Sequenzierung, da es sensitiver ist als das Amersham-Kit. Die Sequenzieransätze werden laut Anleitung hergestellt. Im Falle von Doppellesungen, wird zusätzlich 1 µl DMSO zugegeben und die Annealing-Temperatur schrittweise erhöht. Die PCR-Reaktion wird nach folgendem Schema durchgeführt (Schritte 2 - 4 werden dabei 30 x wiederholt):

Schritt	Vorgang	Temperatur	Zeitdauer
1	Denaturierung der DNA	95°C	5 min
2	Denaturierung der DNA	95°C	30 sec
3	Annealing des Primers	50°C	15 sec
4	Elongation der DNA	70°C	1 min

3.11.3. Gelelektrophorese mit dem LICOR-Sequenzierer und Auswertung der Sequenz

Nach der durchgeführten Sequenzier-PCR werden in jedes Eppendorfgefäß 3 µl SequiTerm Gel Loading Buffer (Epicentre Technologies) zupipettiert. 1,5 µl können anschließend auf ein Acrylamid-

Sequenziergel aufgetragen werden, der Rest wird bei - 80°C gelagert. Es folgt eine gelelektrophoretische Auftrennung der unterschiedlichen Fragmente laut Angabe der Firma LICOR. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm Autoassembler 2.1. der Firma Perkin Elmer und dem Programm DNA-Strider. Homologie-Vergleiche auf Nukleotid- oder Proteinebene wurden mittels BLAST-search im Internet durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Non-redundant GenBank CDS).

3.12. Proteinchemische Methoden

3.12.1. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen durch SDS-Gelelektrophorese

Bei der gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen handelt es sich um eine diskontinuierliche Vertikalgelelektrophorese in einem SDS-Acrylamidgel. Dieses besteht aus einem 13 %igen Trenn- und einem 5 %igen Sammelgel (siehe unten). Wegen des Acrylamids (giftig) sollten alle Arbeiten mit Handschuhen durchgeführt werden. Zuerst wird das Trenngel zwischen zwei fettfreie Glasplatten gegossen bis etwa 2 cm unter den oberen Rand und sofort mit Isopropanol überschichtet, damit es nicht austrocknet. Nach dem Auspolymerisieren (ca. 1h) wird das Isopropanol mit einem Whatmanpapier entfernt, das Sammelgel darauf gegossen, und der Gelkamm eingeschoben. Nach Polymerisation wird der Gelkamm entfernt und das Gel in eine mit 1 x Elektrophorese-Puffer gefüllte Gelkammer eingespannt. Nun können die Geltaschen mit Puffer ausgespült und mit den Proben beladen werden.

Die Proben werden aus einem Gesamtzelllysat der Bakterien hergestellt. Dazu wird 1 ml einer *E. coli* ÜK abzentrifugiert, Legionellen werden von Platte abgeschwämmt und 100 µl der Suspension werden abzentrifugiert. Die Bakterienpellets werden mit H₂O gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 125 µl 1x Lämmli-Probenpuffer resuspendiert. Zur Denaturierung der Gesamtzellproteine werden die Ansätze 5 min bei 100°C inkubiert, das Lysat muss daraufhin klar werden. Nach 1 minütiger Zentrifugation werden 8 µl dieses Überstands auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

Der Elektrophoreselauf erfolgt bei kleinen Gelen stromkonstant bei 25 mA/pro Gel für eine Stunde, wobei die SDS-komplexierten Proteine negativ geladen sind und zur Anode wandern. Danach wird das Gel angefärbt, um die Proteinbanden sichtbar zu machen, oder direkt für den Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran eingesetzt.

Lösungen:

10x Elektrophorese-Puffer:	Tris-Base	30 g	
	Glycin	144,4 g	
	10% SDS	100 ml	mit H ₂ O ad 1 l
5x Lämmli-Probenpuffer:	I.	SDS	1,1 g
		EDTA	0,41 g
		NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	0,17 g
		β-Mercaptoethanol	1,1 ml
			pH auf 7,2 mit NaOH einstellen, ad 10 ml H ₂ O
	II.	0,2 % Bromphenolblau in 50% Glycerin	

Lösungen I und II zu gleichen Teilen mischen.

Acrylamidgel:	Trenngel (13%)	Sammelgel (5%)
40% Acrylamid	3,6 ml	600 µl
H ₂ O	4,6 ml	2,9 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,75 ml	---
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	---	1,2 ml
10% SDS	112 µl	50 µl
APS (100 mg/ml)	56 µl	50 µl
TEMED	3,75 µl	3 µl

3.12.2. Coomassie-Färbung

Das Proteingel wird für 1 h in eine Coomassie-Blue Lösung gelegt und geschüttelt. Das unspezifische, nicht an Protein gebundene Coomassie wird anschließend durch ca. 2-stündiges Schütteln in Entfärbelösung entfernt. Danach kann das Gel (nach Waschen in H₂O) zwischen Folie und Whatmanpapier bei 80°C auf einem Geltrockner getrocknet werden.

Lösungen:

Coomassie-Färbelösung: 0,2% Coomassie Brilliant Blue R250 in MeOH/Essigsäure/H₂O (Verhältnis 5:1:5)

Entfärbelösung: MeOH/Essigsäure/H₂O (Verhältnis 5:1:5)

3.12.3. Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran

Um Proteine aus einem Proteingel auf eine Nitrozellulose-Membran zu transferieren, wobei das Trennmuster der Proteine erhalten bleibt, wurde ein halbtrockenes Verfahren mit einer

Graphitplattenkammer verwendet. Alle benötigten Whatmanpapiere und die Nitrozellulose werden dabei auf Gelgröße zurechtgeschnitten und folgendermaßen aufgebaut:

Auf die mit H₂O angefeuchtete Graphitplatte auf der Anodenseite werden sechs mit A1-Puffer befeuchtete Whatmanpapiere gelegt. Darauf folgen drei mit A2-Puffer getränkte Whatmanpapiere und die ebenfalls in A2-Puffer geschwenkte Nitrozellulose-Membran. Direkt anschließend legt man das Gel luftblasenfrei auf und bedeckt es mit drei Lagen mit K-Puffer befeuchtetes Whatmanpapier. Zuletzt setzt man die mit H₂O befeuchtete Graphitplatte der Kathode auf und transferiert die Proteine für eine Stunde stromkonstant bei 0,8 mA/cm² Gelfläche (entspricht 40 mV bei einem kleinen Gel).

Lösungen:

Anodenpuffer 1 (A1-Puffer)	Anodenpuffer 2 (A2-Puffer)	Kathodenpuffer (K-Puffer)
0,3 M Tris-Base 20 % MeOH	25 mM Tris-Base 20 % MeOH	25 mM Tris-Base 40 mM ε-Amino-n-Capronsäure 20 % MeOH

3.12.4. Antikörperreaktion

Für einen Antikörper-Nachweis müssen zuerst freie Proteinbindungsstellen auf der Nitrozellulose-Membran durch Schwenken in einer 3 %igen BSA-Lösung abgesättigt werden. Dies erfolgt für 1 Stunde bei RT. Danach wird für eine Stunde die Inkubation mit dem ersten Antikörper durchgeführt, welcher die entsprechenden Epitope des zu untersuchenden Proteins erkennt. Im Falle des FlaA-Antikörpers (aus Kaninchenserum) wurde eine Verdünnung von 1:750 in BSA-Lösung verwendet (für kleine Gele: 13,3 µl in 10 ml). Durch anschließendes dreimaliges Waschen mit TBS für je 10 min wird nicht gebundener Antikörper entfernt. Dann wird für eine Stunde mit dem zweiten Antikörper (Anti-Kaninchen vom Schwein, 1:750 verdünnt) inkubiert, welcher den FC-Teil des ersten Antikörpers erkennt. Außerdem ist an ihn das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Danach wird wieder dreimal für je 10 min mit TBS-Lösung gewaschen und der Blot mit Entwicklerlösung inkubiert. Dabei werden durch eine von der Meerrettich-Peroxidase katalysierten Farbreaktion alle durch den ersten Antikörper erkannten Proteine markiert. Die Reaktion kann mit H₂O abgestoppt und der Blot zwischen Whatmanpapier getrocknet werden.

Lösungen:

1x TBS-Lösung	3%ige BSA-Lösung	Entwicklerlösung
50 mM Tris-HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl	3% BSA in 1x TBS gelöst darin werden auch die Antikörper verdünnt	23,5 ml TBS-Lösung 5 mg 4-Chloronaphtol in 1,5 ml 100 % MeOH 20 µl 30%iges H ₂ O ₂

3.12.5. Präadsorption der Antikörperlösung

Da bei polyklonalem Antiserum Kreuzreaktionen zu anderen Proteinen auftreten können und dies die Ergebnisse verfälscht, kann das Antiserum vor Verwendung präadsorbiert werden. Im Falle des FlaA-Antiserums wurde zur Herstellung der Adsorptionslösung die *flaA*-Mutante verwendet. Dazu wird 1 BCYE-Agarplatte abgeschwämmt und die Bakterien-Suspension viermal für 30 s mit Ultraschall behandelt, um die Zellen aufzubrechen. In diese Suspension wird dann für 30 min eine Nitrozellulose-Membran gelegt, um die vorhandenen Proteine zu binden. Anschließend wird die Membran noch mit einer 3% BSA-Lösung abgesättigt und dann mit der verdünnten Antikörperlösung für eine Stunde inkubiert. Dabei binden die unspezifisch bindenden Antikörper an die Membran und werden somit aus der Lösung entfernt. Schließlich kann die Antikörperlösung wie unter 3.12.4 beschrieben eingesetzt werden.

3.12.6. Herstellung eines konzentrierten Flagellenextrakts

Um ein neues Antiserum zu gewinnen, das gegen die Flagelle von *L. pneumophila* gerichtet ist, wurde ein gereinigter Flagellenextrakt hergestellt. Dazu werden 100 BCYE-Platten mit dem Wildtyp von *L. pneumophila* beimpft, 4 Tage inkubiert und danach mit einem Gesamtvolumen von 100 ml 1 x PBS abgeschwämmt. Die Suspension wird in zwei 50 ml Greinerröhrchen verteilt, 15 min bei 3000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 100 ml 1 x PBS resuspendiert. In einem Küchenmixer wird diese Suspension bei halber Geschwindigkeit zweimal für je 45 s durchgerührt, um die Flagelle von den Bakterien abzuscheren. Dann wird zweimal für je 15 min bei 16.000 g zentrifugiert, um die Bakterien und Membranreste zu pelletieren. Der Überstand wird anschließend in 12 ml Plastikröhrchen eingeschweißt, und in einer Ultrazentrifuge bei 40.000 g für 3 h zentrifugiert. Die Röhrchen werden aufgeschnitten, der Überstand abpipettiert und das Pellet in insgesamt 2 ml PBS resuspendiert.

Anschließend wird die Proteinmenge spektrometrisch bestimmt und ein Aliquot auf ein SDS-Gel aufgetragen. 1 ml wird für die Immunisierung der Kaninchen eingesetzt.

Lösungen:

10 x PBS-Puffer:	NaCl	8 g
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	1,25 g
	KCl	0,2 g
	KH ₂ PO ₄	0,2 g
	H ₂ O	ad 1000 ml

3.12.7. Bestimmung der Proteinmenge nach Bradford

Die Proteinmenge einer Lösung wird spektrometrisch mit einem Bio-Rad Protein Assay Kit laut Anleitung gemessen (modifiziert nach Bradford, 1976). Dazu muss zunächst bei 595 nm eine Eichkurve mit BSA erstellt (für 1,4 µg; 2,8 µg; 7,0 µg und 14 µg) und dann die Probe gegen einen Negativ-Standard vermessen werden.

3.13. Southern Hybridisierung

3.13.1. Transfer der DNA auf eine Nylon-Membran (Southernblot)

Beim Southernblot (Southern, 1975) wird das DNA-Bandenmuster eines Agarosegels auf eine Nylonmembran transferiert. Diese kann nun mit einer markierten DNA-Sonde inkubiert werden, welche nur an komplementäre Fragmente hybridisieren kann. Die erkannten Fragmente erscheinen daraufhin auf einem aufgelegten Film als schwarze Banden und lassen sich somit aus einer großen Anzahl von DNA-Fragmenten ganz spezifisch identifizieren.

Vor dem Übertragen auf die Membran muss das Agarosegel mit einem Lineal photographiert werden, um später die Bandengröße bestimmen zu können.

Es können zwei Verfahren der DNA-Übertragung angewendet werden:

- Kapillarblot

Bei dieser Form des Transfers werden die Kapillarkräfte zur Übertragung der DNA ausgenutzt. Dabei wird das Gel zunächst 15 min zur Denaturierung in Lsg. A geschüttelt, dann 15 min zur Depurinierung in Lsg. B und zur Neutralisierung schließlich 15 min in Lsg. C. Nun kann der Blot aufgebaut werden. Auf zwei Whatmanpapiere, die an ihren Enden in eine Lösung mit 20 x SSC

eintauchen, wird mit der Oberseite nach unten das Gel gelegt und mit einer Nylon-Membran gleicher Größe bedeckt (Handschuhe). Darauf legt man wieder zwei Whatmanpapiere und darauf einen ca. 10 cm hohen Stapel von auf Gelgröße zurechtgeschnittenen Zellstofftüchern. Das ganze wird von oben beschwert und über Nacht bei RT stehen gelassen. Durch die Kapillarkräfte wird das SSC bis hoch in die Zellstofftücher gesaugt und überträgt auf diese Weise die DNA auf die Membran. Am nächsten Morgen wird abgebaut und die Taschenhöhe auf der Membranunterseite (= DNA-Oberseite) markiert. Anschließend wird die DNA auf der noch feuchten Membran mittels UV-Crosslinking fixiert (Programm C3, southern damp membrane). Danach kann die Membran bei RT gelagert oder hybridisiert werden.

- Vakuumblot

Um den Transfer-Vorgang zu beschleunigen, kann eine Vakuum-Blot-Apparatur verwendet werden. Dazu wird eine zurechtgeschnittene Nylonmembran auf die zuvor angefeuchtete Apparatur gelegt und die Randbereiche mit einer ausgeschnittenen Plastikschaablone abgedeckt. Auf die Membran wird nun das Gel gelegt und überprüft, ob ein Vakuum (auf „50“ eingestellt) aufgebaut werden kann. Das Gel wird nun unter Vakuum (wobei es niemals austrocknen darf) für 15 min mit Lsg. A bedeckt, die überschüssige Lsg. wird verworfen. Danach wird es für 15 min mit Lsg. B und schließlich für 15 min mit Lsg. C bedeckt. Nun erfolgt der Transfer der DNA für 90 min mit 20x SSC. Dann wird das Vakuum abgestellt, die Geldaschen mit einem Skalpell markiert und die Membran für 30 s in 0,4 N NaOH denaturiert. Zur Neutralisierung gibt man sie für 30 s in 0,2 M Tris-HCl pH 7,5 und fixiert die DNA mit dem UV-Crosslinker (siehe oben).

Lösungen: (ad 1 Liter)

Lösung A	Lösung B	Lösung C	20x SSC
0,25 M HCl (25 ml HCl konz.)	1,5 M NaCl (87,7 g) 0,5 M NaOH (20 g)	1,5 M NaCl (87,7 g) 0,5 M Tris-HCl (60 g) pH 5,1	3 M NaCl (175,3 g) 0,3 M NaCitrat (88,2 g) pH 7,2

3.13.2. Screening einer Cosmid-Genbank mittels „Colony-blot“

Etwas anders sieht das Verfahren aus, wenn man ohne gelelektrophoretische Auftrennung direkt Bakterien-Gesamt-DNA auf einer Membran fixieren will, um beispielsweise eine große Anzahl von

Klonen auf das Vorkommen eines bestimmten DNA-Abschnitts zu untersuchen. Dazu wird die Nylonmembran auf eine vorher getrocknete Agarplatte gelegt und die Bakterien werden direkt darauf ausgestrichen oder aufgestempelt. Nach Inkubation bei 37°C ÜN wird der Filter mit den Bakterienkolonien entfernt und für 5 min auf ein in Lsg. B getränktes Whatmanpapier gelegt. Danach wird der Filter für 5 min auf ein Whatmanpapier mit Lsg. C transferiert. Anschließend wird die DNA für 1 h durch Backen bei 80°C fixiert. Die fertigen Filter können bei RT gelagert werden. Um unspezifische Hintergrundsignale zu vermeiden, müssen vor der Hybridisierung eventuelle Zellreste über Nacht durch Schütteln bei 37°C in Lsg. D entfernt werden. Danach wird 1 min in 2 x SSC gewaschen und wie folgt hybridisiert.

Lösungen :

Lösung D (digestion solution) 50 mM Tris/HCl (pH 7,6)
0,1 % SDS
50 mM NaCl
100 µg/ml Proteinase K (frisch)

3.13.3. Markierung der DNA-Sonde

Während der Vorhybridisierung des Blots wird jeweils die zu untersuchende Sonde (PCR-Produkt oder Spaltfragment) nach Anleitung des ECL-Kits markiert. Dazu denaturiert man 200 ng DNA in 10 µl H₂O für 10 min bei 100°C, kühlt sofort auf Eis ab, versetzt mit 10 µl „labeling reagent“, vortext, gibt 10 µl Glutaraldehyd zu, vortext und inkubiert für 10 min bei 37°C. Die Sonde kann bis zur Verwendung auf Eis aufbewahrt werden (höchstens 15 min).

3.13.4. Vorhybridisieren, Hybridisieren und Waschen des Blots

Die Hybridisierlösung wird nach Anleitung des ECL-Kits angesetzt und bei -20°C aliquotiert gelagert. Für eine Hybridisierung wird die Lösung auf 42°C vorgewärmt und der Blot mit 10 ml in einem Hybridisierungs-Röhrchen mindestens 1 h bei 42°C vorhybridisiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Danach wird die Hälfte der Hybridisierlösung abgegossen, mit der Sonde vermischt, wieder zurückgegossen und über Nacht mit der Membran bei 42°C unter kontinuierlichem Drehen inkubiert. Am nächsten Morgen wird die Lösung abgekippt und der Blot für 5 min bei 42°C mit 50 ml 5x SSC gewaschen. Danach wird mit je 50 ml auf 42°C vorgewärmter

Waschlösung I für 20, 10 und 10 min bei 42°C gewaschen. Anschließend wird noch zweimal für 5 min bei RT mit Waschlösung II gewaschen.

Lösungen:

Waschlösung I (low stringency):	100 ml 20x SSC 40 ml 10%iges SDS 360 g Harnstoff	ad 1 Liter H ₂ O
Waschlösung II:	100 ml 20x SSC	ad 1 Liter H ₂ O

3.13.5. Entwickeln des Blots mit dem ECL-Kit

Die gewaschene Membran wird mit der DNA-Seite nach oben in eine Schale gelegt und für 1 min mit den unmittelbar zuvor gemischten ECL-Detektionslösungen I und II (Verhältnis 1:1) bedeckt. Danach wird die Lösung entfernt, die Membran mit Haushaltsfolie umwickelt und mit der DNA-Seite nach oben in eine Exponierkassette gelegt. In einer Dunkelkammer wird anschließend ein Film (HyperfilmTM ECLTM, Amersham) aufgelegt und nach 10 min entwickelt. Je nach Stärke der Signale kann eine längere oder kürzere Exponierung mit einem neuen Film erfolgen. Die Membran kann anschließend in der gebrauchten Detektionslösung eingeschweißt und bei 8°C gelagert werden. Nach 48 h kann eine erneute Hybridisierung durchgeführt werden, ohne dass der Blot „gestrippt“ werden muss.

3.14. Anzucht der Legionellen für Infektionsversuche

Da Legionellen durch häufige Agar-Passage leicht avirulent werden können, sollten von allen Stämmen Glycerinkulturen angelegt werden. Dazu wird 1 BCYE-Agarplatte mit den Bakterien ausgestrichen, nach 3 Tagen Inkubation mit sterilem H₂O abgeschwämmt und mit Glycerin versetzt (Endkonzentration 30%). Diese Kultur kann dann bei -80°C gelagert werden und wird zum Ausstreichen von Platten verwendet. Außerdem werden Aliquots ohne Glycerin bei -80°C eingefroren (Infektionsaliquots).

Für einen Infektionsversuch werden aus diesen Infektionsaliquots AYE-Übernachtskulturen angeimpft. Dazu werden 10 ml AYE-Medium in 50 ml Kölbchen mit einer entsprechenden Bakterienmenge versetzt, sodass die OD₆₀₀ ungefähr bei 0,3 liegt. Nach Inkubation bei 37°C über

Nacht wird am nächsten Tag wieder die OD gemessen und die Legionellen bis zum Beginn der stationären Phase angezogen (ca. OD von 3,3). Diese Kultur wird dann auf die gewünschte Konzentration verdünnt und für die Infektionsversuche frisch eingesetzt. Durch Ausplattieren einer geeigneten Verdünnung wird außerdem jeweils die Lebendzellzahl bestimmt.

3.15. Experimente mit *Acanthamoeba castellanii*

3.15.1. Kultivierung von *Acanthamoeba castellanii*

Axenische Kulturen von *A. castellanii* werden in 250 ml Zellkulturflaschen bei RT gehalten. Dabei liegen die Amöben zum Teil adhäriert und zum Teil in Suspension vor. Die adhärennten Zellen kann man durch Inkubation auf Eis und Klopfen ablösen. Alle 7 Tage wird ein Aliquot (0,5 - 1 ml) entnommen und in frisches PYG Medium überimpft. Zur Konservierung wird eine dicht gewachsene Amöbensuspension mit Glycerin versetzt (Endkonzentration 50 %) und bei -80°C gelagert.

Für eine Infektion mit Legionellen wird die Zellzahl einer 4 Tage alte Amöbenkultur mit einer Fuchs-Rosenthal-Kammer (8 Kleinquadrate = Faktor 10^4) unter dem Lichtmikroskop bestimmt und mit PYG-Medium auf eine Dichte von 2×10^5 Zellen/ml eingestellt. Pro Napf einer 24 well Platte wird 1 ml dieser Suspension ausgesät. Nach 24 h wird das Medium gegen Amöbenpuffer ausgetauscht. Nach weiteren 24 h kann die Infektion durchgeführt werden.

3.15.2. Adhärenzassays

Um während des Versuchs die Phagozytoserate der Amöben möglichst gering zu halten, werden sie 2 h mit Inhibitoren vorinkubiert. Dazu wird gleichzeitig Cycloheximid (Endkonzentration 100 µg/ml) und Cytochalasin D (Endkonzentration 5 µg/ml) verwendet. Diese Inhibitoren sollten auch während des restlichen Versuchs präsent sein. Dann werden die Legionellen in einer MOI von 10 (entspricht 2×10^6 Bakterien/ml) zu den Amöben gegeben und für 5 min auf die Zellen zentrifugiert, um einen direkten Kontakt zu ermöglichen. Dafür wurden je nach Versuch zwei verschiedene Geschwindigkeiten verwendet, 200 g und 1000 g. Nach weiteren 20 min werden die nicht adhärennten Bakterien durch dreimaliges Waschen entfernt und die Amöben mit den adhärennten Legionellen mit eiskaltem H₂O lysiert und auf BCYE-Platten ausplattiert.

3.15.3. Phagozytoseassays

Zur Bestimmung der phagozytierten intrazellulären Bakterien gleich zu Beginn der Infektion werden die Amöben mit einer MOI von 10 infiziert und nach einem definierten Inkubationszeitraum von 15, 30, 60, 120 oder 180 min einer einstündigen Gentamicin-Behandlung (80 µg/ml) unterzogen. Dabei werden alle noch nicht phagozytierten extrazellulären Bakterien abgetötet. Anschließend werden die Amöben mit eiskaltem Wasser lysiert, und die Bakterien auf BCYE-Platten ausplattiert. Dieser Versuch kann ohne und mit Aufzentrifugieren der Bakterien (8 min bei 200g) durchgeführt werden.

3.15.4. Intrazelluläre Wachstumsassays

Zur Bestimmung der intrazellulären Wachstumsrate der Legionellen in den Wirtszellen werden zwei Wachstumsassays mit unterschiedlicher MOI durchgeführt.

Zunächst werden die Bakterien in einer MOI von 0,01 zugegeben (entspricht 2×10^3 Bakterien/ml) und bei 37°C, 5% CO₂, mit den Wirtszellen inkubiert. Nach 0, 24, 48 und 72 h werden Aliquots der Wirtszellen mit eiskaltem Wasser lysiert und in Verdünnungen auf BCYE-Platten ausplattiert. Da sich die Bakterien nicht extrazellulär im Medium vermehren können, entspricht die Zunahme an Legionellen der intrazellulären Wachstumsrate.

Ebenfalls wird ein Wachstumsassay mit einer MOI von 10 durchgeführt. Hier werden die Legionellen 2 h mit ihren Wirtszellen inkubiert und anschließend die extrazellulären Bakterien mit einer einstündigen Gentamicin-Behandlung abgetötet. Dann wird der t=0 Wert durch Ausplattieren bestimmt. Weiterhin werden Aliquots nach 24, 48 und 72 h ausplattiert.

3.15.5. Zytotoxizitätsassays

Um den Einfluss einer Legionelleninfektion auf die Zytotoxizitätsrate zu bestimmen, werden die Amöben mit einer MOI von 10 - 100 infiziert. Parallel wird eine uninfizierte Kontrolle in Amöbenpuffer mitgeführt. Nach 24 oder 48 h werden die Amöben fotografiert, auf Eis gestellt und durch Pipettieren vom Boden abgelöst. Ein Aliquot wird mit Trypan-Blau versetzt und in eine Fuchs-Rosenthal-Kammer pipettiert. Der Farbstoff dringt nur in tote Zellen ein. So werden die noch intakten farblosen Amöben ausgezählt und ins prozentuale Verhältnis zur uninfizierten Kontrolle gesetzt.

3.16. Experimente mit HL-60 Zellen und humanen Blut-Monozyten

3.16.1. Kultivierung und Differenzierung von HL-60 Zellen

Die humane Leukämie-Zelllinie HL-60 liegt im teilungsfähigen, nicht differenzierten Zustand ausschließlich in Suspension vor. Sie wird in 250 ml Gewebekulturflaschen im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ in supplementiertem RPMI-Medium kultiviert. Die Subkultivierung erfolgt alle 3-4 Tage mit vorgewärmten RPMI-Medium, wobei die Zellen höchstens auf eine Konzentration von 2×10^5 Zellen/ml verdünnt werden dürfen. Bei geringerer Zelldichte können sich die Zellen nicht mehr vermehren.

Zur Konservierung wird eine Suspension von 5×10^6 Zellen/ml mit 20 % FCS und 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid, zutropfen!) versetzt und nach stufenweiser Abkühlung in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Da die Zellen durch häufiges Passagieren ihre Eigenschaften ändern können, sollte nach 30 Passagen ein frisches tiefgefrorenes Aliquot reaktiviert werden. Dazu wird die tiefgefrorene Kultur bei 37°C aufgetaut (Wasserbad), vorsichtig zu 9 ml RPMI getropft und 10 min bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und das Pellet erneut in RPMI-Medium resuspendiert, um das zellschädigende DMSO zu entfernen. Nach erneuter Zentrifugation wird die Lebendzellzahl bestimmt und die Zellen in einer Konzentration von 5×10^5 in einer kleinen Zellkulturflasche herangezogen. Ab einer Konzentration von 2×10^6 kann die Kultur normal gesplittet werden.

Für eine Infektion werden die HL-60 Zellen auf eine Dichte von 2×10^6 /ml eingestellt, mit PMA in einer Endkonzentration von 10^{-8} Mol versetzt und in 24-well-Platten ausgesät. Nach 48 h haben sich die Zellen zu adhärennten Makrophagen ausdifferenziert und können nach zweimaligem Waschen mit RPMI infiziert werden.

3.16.2. Adhärenzassays

Die Adhärenztests werden wie unter 3.15.2 beschrieben durchgeführt. Allerdings wird als Phagozytoseinhibitor nur Cytochalasin D (Endkonzentration $1 \mu\text{g/ml}$) verwendet und 1 h bei 37°C vorinkubiert.

3.16.3. Phagozytoseassays

Die Bestimmung der intrazellulären Bakterien zu Beginn der Infektion wird wie unter 3.15.3. beschrieben durchgeführt.

3.16.4. Intrazelluläre Wachstumsassays

Die Wachstumsassays werden wie unter 3.15.4. beschrieben durchgeführt.

3.16.5. Zytotoxizitätstest (MTT-Assay)

Zur Bestimmung der Zytotoxizität der Legionellen-Stämme wird ein MTT-Assay durchgeführt. Dabei wird der zunächst gelbe, in H₂O löslicher Farbstoff MTT durch mitochondriale Enzyme lebender Zellen in einen blauen, in H₂O unlöslichen Farbstoff umgewandelt. Die Intensität der Blaufärbung ist somit ein Maß für das Vorkommen lebender Zellen. Da auch die bakteriellen Enzyme den Farbstoff umwandeln können, müssen die Bakterien durch Absaugen entfernt werden. Dazu werden 100 µl HL-60 Zellen (2×10^6 Zellen/ml) in 96-well-Platten ausgesät und differenziert. Nach 2 Tagen werden die Zellen gewaschen und mit verschiedenen Legionellen-Konzentrationen angeimpft, nämlich MOI 0; 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1; und 10 (pro Konzentration je 6 Näpfe). Nach 72 h werden in jeden Napf 20 µl einer MTT-Stammlösung (5 mg/ml in PBS) zupipettiert, nochmals 4 h inkubiert, der Überstand mit den Bakterien durch eine Vakuumpumpe abgesaugt und die entstandenen Farbkristalle mit 100 µl/Napf saurem Isopropanol (100 ml Isopropanol + 10 ml 10% SDS + 0,33 ml konz. HCl) gelöst. Dann wird die Farbintensität der Lösungen mit einem ELISA-Reader gemessen.

3.16.6. Isolierung humaner Blut-Monozyten

Da es sich bei humanen peripheren Monozyten um Primärzellen handelt, die sich nicht mehr weiter teilen können, müssen diese immer frisch isoliert werden. Dazu wird Spenderblut (in Form sogenannter „buffy coats“) aus der Transfusionsmedizin verwendet. Die Monozyten können anschließend bis zu 3 Wochen in supplementiertem RPMI Medium bei 37°C, 5% CO₂ in Kultur gehalten werden.

Zuerst werden mit Hilfe einer diskontinuierlichen Dichtegradientenzentrifugation die Erythrozyten und die polymorphkernigen Leukozyten abgetrennt. Dazu werden 9 ml Histopaque 1119 in einem 50 ml Röhrchen mit 9 ml Histopaque 1077 überschichtet. Auf diesen Gradienten gibt man nun vorsichtig 18 ml Blut, ohne dass sich die drei Phasen mischen, und zentrifugiert bei 700 g für 30 min (zum Beenden des Zentrifugierens darf keine Bremse eingeschaltet werden). Die Erythrozyten werden

dabei pelletiert. Die gewünschten Monozyten befinden sich in der weißen Bande unterhalb des Serums (siehe Anleitung).

Zuerst wird das Serum abpipettiert und verworfen, dann werden die Zellen vorsichtig abpipettiert und in ein neues Röhrchen mit 30 ml RPMI-Medium gegeben. Nach Zentrifugation für 10 min bei 200 g werden die Zellen noch einmal mit 30 ml Medium gewaschen, um die Anzahl der noch vorhandenen Blutplättchen zu reduzieren, und schließlich in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml/Napf in einer 24-well-Platte ausgesät. Am folgenden und am vierten Tag werden die Zellen mit RPMI-Medium gewaschen, um die nicht adhärenen Monozyten und T-Zellen zu entfernen. Am fünften Tag können sie infiziert werden.

3.16.7. Infektionen humaner Blut-Monozyten

Die Infektionen werden so durchgeführt wie für HL-60 Zellen beschrieben (Kapitel 3.16.2. bis 3.16.5.).

3.17. *In situ* rRNA-Hybridisierung

3.17.1. Fixierung der Zellen und Bakterien

Für die *in situ* Hybridisierung (Amann et al., 1990) werden die Zellen zunächst in einem 8-Kammer-Objektträger (NUNC chamber slides, LabTec II) ausgesät und dann mit Legionellen infiziert. Nach den gewünschten Inkubationszeiten müssen anschließend die Zellen und Bakterien fixiert werden. Dazu pipettiert man den Überstand ab und trocknet an der Luft (Thermostat bei 37 °C). 20 µl 4%ige PFA-Lösung werden pro Kammer aufgetropft und in einer feuchten Petrischale (mit einem in H₂O getränkten Zellstoff) 1 h bei RT fixiert. Das Fixans wird abgezogen und mit 1x PBS gewaschen. Die Entwässerung erfolgt über eine EtOH-Reihe für je 3 min mit 50 %, 80 % und 96 % EtOH (je 20 µl auftropfen und nach 3 min wieder abziehen). Der luftgetrocknete Objektträger kann anschließend nach Abtrennen der Kammer-Seitenteile bei 4 °C ÜN aufbewahrt werden.

Lösungen:

PFA-Lösung:

Unter dem Abzug werden 100 ml H₂O auf dem Magnetrührer auf 60 – 65 °C erhitzt. Anschließend werden 6 – 9 g Paraformaldehyd (PFA) zugegeben und unter Rühren gelöst (Rührfisch). Die Lösung

wird tropfenweise mit 1 M NaOH bis zur Klärung versetzt. Danach werden 50 ml 3 x PBS zugegeben und die Lösung auf 20 °C abgekühlt. Mit HCl wird der pH auf 7,2 – 7,4 eingestellt. Die Lösung wird sterilfiltriert (0,2 µm-Filter) und in geeigneten Aliquots bei –20 °C eingefroren.

3.17.2. Hybridisierung mit der Sonde

Die Sonde LEG705-FLUOS bindet spezifisch an die 16S rRNA der Legionellaceae. Je 50 ng Sonde in Hybridisierungs-Puffer (ad 20 µl) mit der gewünschten Stringenz werden auf die fixierten, trockenen Proben aufgetropft und in einer feucht gehaltenen Kammer für 1,5 h bei 46 °C inkubiert. Der Hybridisierungs-Mix wird abgezogen und zweimal mit vorgewärmtem Waschpuffer (46 °C) gewaschen. Dazu werden 20 µl Waschpuffer aufgetropft und in einer feucht gehaltenen Kammer 15 - 20 min bei 46 °C inkubiert. Danach wird mit H₂O vorsichtig abgespült, im Dunkeln luftgetrocknet und mit Citifluor AF2 (Citifluor Ltd., London) eingedeckelt. Zur Aufbewahrung werden die trockenen Präparate ohne Citifluor (mit H₂O abspülen) bei -20 °C eingefroren.

Lösungen:

Reagenzien	Hybridisierungspuffer	Waschpuffer
5 M NaCl	360 µl	1490 µl
1 M Tris/HCl, pH 8,0	40 µl	1 ml
Formamid	500 µl	---
10 % (w/v) SDS	2 µl	50 µl
0,5 M EDTA, pH 8,0	---	500 µl
H ₂ O	ad 2 ml	ad 50 ml

3.18. Mikroskopische Untersuchungen

3.18.1. Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Um das Schwimmverhalten der Legionellen zu testen, werden die zu untersuchenden Bakterien in 96-well-Näpfe pipettiert und unter einem inversen Mikroskop bei einer Vergrößerung von 40 x beobachtet.

Die Expression des GFP mit Hilfe der Promotorgen-Konstruktion wird mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskop mit einem geeigneten Filter bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm

überprüft. Bilder werden auf ZIP-Diskette gespeichert. Ebenso wird im Falle der *in situ* Hybridisierungen verfahren.

3.2.15.2. Elektronenmikroskopie

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen werden die Legionellen in AYE-Medium bis zum Beginn der stationären Phase angezogen, 1:10 in sterilem H₂O verdünnt und direkt auf mit Formvar®-beschichtete Kupferdrahtnetzchen (grids) aufgetropft. Alternativ können die Bakterien auch von Agarplatten abgeschwämmt und aufgetropft werden. Nach Sedimentation der Bakterien werden diese mit einer 2 % Uranylacetat-Lösung als Kontrastmittel versetzt und nach Abziehen der überschüssigen Flüssigkeit mit einem Zeiss 10 A Transmissions-elektronenmikroskop bei 60 kV mikroskopiert und fotografiert.

4. Ergebnisse

4.1. Isolierung und Sequenzbestimmung eines die *flaA*-Region tragenden Cosmids

4.1.1. Screening einer Cosmid-Genbank mit einer *flaA*-spezifischen Sonde

Ausgangspunkt des ersten Teils der Arbeit war die Identifizierung des *flaA*-Gens von *L. pneumophila*. Dieses kodiert für das 48 kD große Flagellin, das die Hauptuntereinheit des Flagellenfilaments darstellt (Heuner et al., 1995). Um weitere Flagellengene zu finden und den völlig unbekanntem 3'-Bereich der *flaA*-Region zu charakterisieren, sollten die an *flaA* angrenzenden Gene sequenziert werden. Dazu war es zunächst nötig, aus einer *Legionella* Cosmid-Genbank entsprechende Klone zu isolieren, welche die gesamte genetische Region abdecken.

Die von Birgit Ludwig hergestellte Cosmid-Genbank trägt auf dem Vektor pLAFR2 in der *Bam*HI Schnittstelle 20 - 30 kb große Fragmente genomischer DNA, die durch *Sau*IIIa Partial-Verdau des Stammes *L. pneumophila* Philadelphia I generiert wurden, und ist im *E. coli* Stamm HB101 angelegt (Ludwig, 1992). Es wurden insgesamt 45 Microtiter-Platten dieser Genbank mit jeweils 49 Klonen auf Nylon-Membranen aufgestempelt, die auf Selektions-Agarplatten aufgelegt wurden. Nach Inkubation über Nacht wurde die jeweilige DNA nach Aufschluss der Bakterien und Denaturierung mittels „UV-Crosslinking“ auf der Membran fixiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einer Sonde (1760 bp), die aus dem Plasmid pfla1 durch *Sac*I/*Xba*I Verdau generiert wurde und die das komplette *flaA*-Gen abdeckt. Bei diesem ersten „Kolonie-Blot-Screening“ zeigten acht Klone ein positives Signal. Daraufhin wurde die jeweilige Cosmid-DNA isoliert und einer Restriktionsspaltung mit dem Enzym *Eco*RI unterzogen. Nach Auftrennung der DNA auf einem Agarosegel wurde das entsprechende Gel auf eine Nylon-Membran transferiert und wiederum mit der *flaA*-Sonde hybridisiert (Abb. 4 A). Hierbei reagierten nur noch die Cosmide 2/23, 2/24, 17/12 und 17/13 deutlich positiv mit einer Bande bei 2,2 kb, wobei die ersten beiden Cosmidklone das gleiche Spaltungsmuster aufwiesen, also vermutlich identisch waren. Ein weiterer Blot mit *Bg*III behandelter DNA (Abb. 4 B) ergab ein ähnliches Hybridisierungsmuster. Daher wurden im folgenden die Cosmide 2/23 und 17/13 für die Bestimmung der Nukleotidsequenz herangezogen.

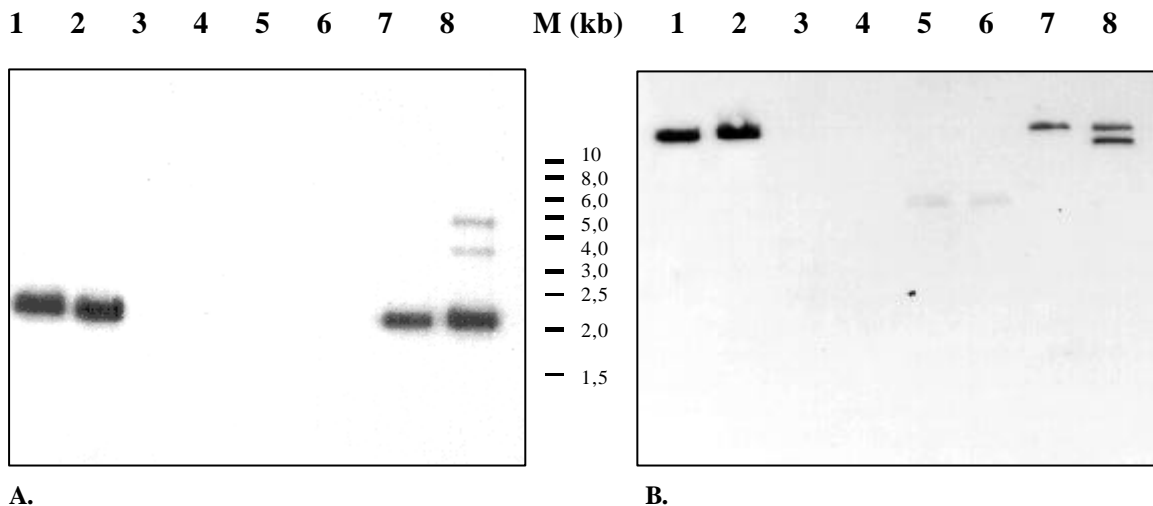


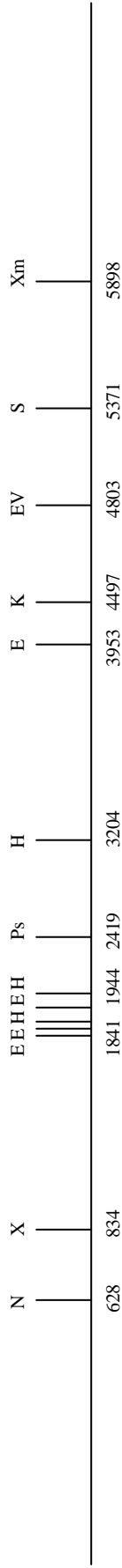
Abb. 4: Southernblot-Analyse von 8 Klonen der Cosmid-Genbank mit einer *flaA*-spezifischen Sonde. Die Cosmid-DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* (A.) und *BglII* (B.) behandelt und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Spuren: 1 (Cosmid 2/23); 2 (2/24); 3 (5/13); 4 (5/35); 5 (8/47); 6 (8/48); 7 (17/12); 8 (17/13); M (Marker).

4.1.2. Ermittlung der Basenabfolge der Cosmide 2/23 und 17/13

Zur Bestimmung der Nukleotidsequenz der an *flaA* angrenzenden Gene wurde die Technik des sogenannten „Primer-Walkings“ angewendet. Dabei wurde für die erste Sequenzierungs-PCR-Reaktion ein Oligonukleotid-Primer verwendet, der an bereits bekannte Basensequenzen im *flaA*-Gen binden und womit dann in unbekannte Bereiche weitergelesen werden konnte. Für jeden weiteren Sequenzierlauf wurden jeweils am Ende der Sequenz neue Primer ausgewählt und auf diese Weise die Basenabfolge der gesamten Region bestimmt. Um fehlerhafte Lesungen zu vermeiden, wurde jede Sequenzierreaktion mindestens in drei unabhängigen PCR-Ansätzen durchgeführt. Eine Restriktionsgenkarte ist in Abbildung 5 A, eine Übersicht über die identifizierten offenen Leseraster (ORFs) ist in Abbildung 5 B dargestellt. Ein Teil der Sequenz ist im Anhang (7.2) aufgeführt. Die Homologien beziehen sich immer auf einen Vergleich auf Proteinebene (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

411 bp „upstream“ vom *flaA*-Startcodon beginnt ein offenes Leseraster (ORF) in entgegengesetzter Richtung zu *flaA* mit Homologien zu *accD* von *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli*. Das Protein ACCD bildet die β -Untereinheit der Acetyl-CoenzymA-Carboxylase, welche als biotinabhängiger Multienzymkomplex den ersten Schritt der Fettsäuresynthese, nämlich die Umsetzung von Acetyl-CoenzymA zu Malonyl-CoenzymA katalysiert. Ein Teil dieses Gens wurde bereits von Klaus Heuner in seiner Doktorarbeit sequenziert. Direkt anschließend, ebenfalls auf dem

A. Restriktions-Genkarte (insgesamt 6990 bp)



B. Die flaA -Region

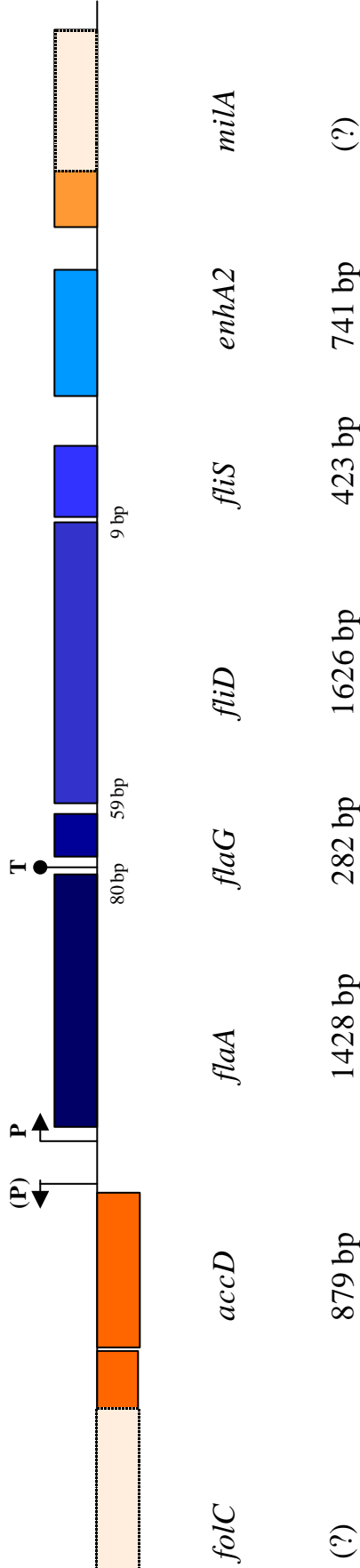


Abb. 5: Restriktionsgenkarte (A) und Übersicht über die *flaA*-Region (B) von *L. pneumophila* Philadelphia I

Identifizierte Gene sowie deren Länge in Nukleotiden sind angegeben. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Programme DNA-Strider und BLASTX-search. Abkürzungen: E (*EcoRI*), EV (*EcoRV*), H (*HindIII*), K (*KpnI*), N (*NcoI*), Ps (*PstI*), S (*SacI*), X (*XbaI*), Xm (*XmaI*), P (Promotor), T (Terminator)

■ ORF auf dem Hauptstrang ■ ORF auf dem Gegenstrang ■ Sequenz nicht vollständig bestimmt

Gegenstrang, folgt ein weiterer ORF, der nicht vollständig sequenziert wurde, mit Ähnlichkeit zu *folC* von *E. coli* und *P. aeruginosa*. Auch dieses Gen spielt eine Rolle für den Fettsäurestoffwechsel. Da es sich bei beiden Genen nicht um Flagellengene handelte, sondern um Gene, die für den Stoffwechsel der Bakterien von Bedeutung sind, wurde in dieser Richtung nicht weiter sequenziert.

80 bp „downstream“ von *flaA* konnte ein ORF von 282 bp identifiziert werden (*flaG*), welcher Homologien zu einem putativen *flaG* genannten Flagellen-Gen von *P. aeruginosa* aufweist. 59 bp im Anschluss an diesen Abschnitt liegt das Startcodon für ein weiteres Gen von 1626 bp Länge, das Ähnlichkeit zu dem *fliD*-Gen von *P. aeruginosa*, *V. parahaemolyticus* und *E. coli* zeigt. Dort codiert das *fliD* für das Flagellen-Spitzen-Protein, auch „hook-associated“ Protein II (HAP2) genannt, und ist essentiell für den Zusammenbau der einzelnen Flagellinmoleküle zu einer polymeren Filamentstruktur. Auch bei *P. aeruginosa* befindet sich vor *fliD* ein kurzer ORF mit noch unbekannter Funktion. Im Anschluss an *fliD* folgt bei *P. aeruginosa* das *fliS*-Gen. Dieses konnte mit einer Länge von 423 bp direkt „downstream“ von *fliD* auch bei *L. pneumophila* gefunden werden. Wahrscheinlich ist das entsprechende Genprodukt für die Länge der Flagelle verantwortlich. Noch weiter „downstream“ folgt ein weiteres offenes Leseraster mit Homologien zu dem erst kürzlich bei *L. pneumophila* beschriebenen Gen *enhA* (Cirillo et al., 2000). Daran anschließend wurde der Beginn eines ORFs mit großer Ähnlichkeit zu dem ebenfalls vor kurzem beschriebenen *milA* von *L. pneumophila* sequenziert (Harb et al., 2000).

4.1.3. Zusammenfassung

Durch das „Screening“ einer Cosmid-Genbank unter Verwendung einer *flaA*-spezifischen Sonde konnten die Cosmid-Klone 2/23 und 17/13 identifiziert werden, welche beide die komplette *flaA*-Region auf ihrem Insert enthalten. Mittels „Primer-Walking“ wurde ihre Nukleotidsequenz bestimmt. Im 5'-Bereich von *flaA* liegen auf dem Gegenstrang zwei offene Leseraster (ORFs) mit Homologien zu den Stoffwechselgenen *accD* und *folC*. Im „downstream“-Bereich von *flaA* konnten in gleicher Leserichtung ORFs mit Ähnlichkeiten zu weiteren Flagellengenen, nämlich den Genen *flaG*, *fliD* und *fliS*, gefunden werden. Daran schließen sich zwei offene Leseraster mit Homologien zu *enhA* von *L. pneumophila* sowie *milA* von *L. pneumophila* an.

4.2. Komplementation und Virulenzeigenschaften *flaA*-negativer Mutanten

Anhand von *flaA*-negativen Mutanten des Stammes *L. pneumophila* Corby, die von Klaus Heuner (Universität Würzburg) im Rahmen seiner Doktorarbeit hergestellt worden waren, sollte die Funktion der Flagelle im Infektionsmodell näher untersucht werden. Bei den Mutanten KH1, KH2 und KH3 war durch homologe Rekombination ein 109 bp großer Genabschnitt aus der Mitte des *flaA*-Gens deletiert und durch das Einbringen einer Kanamycin^R-Kassette von 1,8 kb ersetzt worden. Dadurch ist das *flaA*-Gen nicht mehr funktionell. Außerdem wurden drei Einzelcrossover-Mutanten erhalten, die neben dem intakten *flaA*-Gen auch das durch die Km^R-Kassette unterbrochene *flaA*-Gen in ihr Chromosom integriert hatten (Heuner, 1997).

Es ergab sich für vorliegende Arbeit die Aufgabenstellung, diese *flaA*-negativen Mutanten wieder zu komplementieren und phänotypisch zu charakterisieren.

4.2.1. Komplementation der *flaA*-Mutante KH3

4.2.1.1. *In trans* Komplementation mit dem intakten *flaA*-Gen

In ersten Versuchen zur Komplementation war von Klaus Heuner das Plasmid pKH6 konstruiert worden, welches das *flaA*-Gen auf dem Vektor pMMB207 trägt. Mit diesem Plasmid komplementierte *flaA*-Mutanten zeigten jedoch bei einer Westernblot-Analyse nur eine sehr schwache Flagellinbande und es wurden keine intakten Flagellen aufgebaut (Heuner, 1997).

Um auszuschließen, dass die unzureichende Komplementation auf den verwendeten Vektor zurückzuführen war, wurde das *flaA*-Gen aus dem Genbank-Plasmid pfla1 *XbaI/SmaI* ausgeschnitten und in den Vektor pLAW344 (*XbaI/EcoRV* behandelt) kloniert (Plasmid pCD2). Außerdem wurde es mit den Enzymen *SalI/SacI* ausgeschnitten und in den Vektor pBOC20 kloniert (Plasmid pCD5). Auch mit diesen beiden Plasmiden wurde jedoch nur eine sehr schwache Flagellin-Expression bei der Mutante erreicht. Die Ausbildung von Flagellen konnte ebenso nicht beobachtet werden.

4.2.1.2. *In trans* Komplementation mit den Genen *flaA*, *flaG*, *fliD* und *fliS*

Wie durch Northernblot-Analysen von Klaus Heuner gezeigt werden konnte, wird das *flaA*-Gen monocistronisch als ein Transkript mit einer Größe von ca. 1600 bp transkribiert (Heuner et al., 1995). Da jedoch trotz putativer Terminator-Strukturen im Anschluss an das *flaA*-Gen Effekte der Kanamycin-Kassette auf die „downstream“ liegenden Gene nicht völlig ausgeschlossen werden konnten und das FliD Protein bei anderen Bakterien für den Aufbau einer intakten Flagelle essentiell ist, sollte zur Komplementation ein Plasmid konstruiert werden, auf welchem neben dem intakten *flaA*-Gen zusätzlich die drei folgenden Gene *flaG*, *fliD* und *fliS* liegen.

Zur Klonierung eines entsprechenden Konstrukts wurde die DNA des Cosmids 2/23 mit den Restriktionsenzymen *XbaI/SacI* behandelt (vgl. Abb. 5 A). Das resultierende Fragment von 4537 bp wurde nach Überprüfung durch Southern-Hybridisierung in den Vektor pBC kloniert. Somit entstand Plasmid pCD8. Durch Elektroporation wurde dieses Konstrukt in die *flaA*-Mutanten eingebracht und diese auf Chloramphenicol-haltigen Selektionsagarplatten ausplattiert. Bei einigen Cm-resistenten Klonen wurde über PCR das Vorhandensein des Plasmids bestätigt. Westernblots mit den entsprechenden Klonen (Abb. 6) zeigten aber im Vergleich zum Wildtyp (erste Spur) höchstens eine schwache Flagellinbande (vgl. Spuren 2, 5 und 9). Damit übereinstimmend konnte auch in elektronenmikroskopischen Untersuchungen nur sehr vereinzelt das Vorhandensein einer intakten Flagelle beobachtet werden.

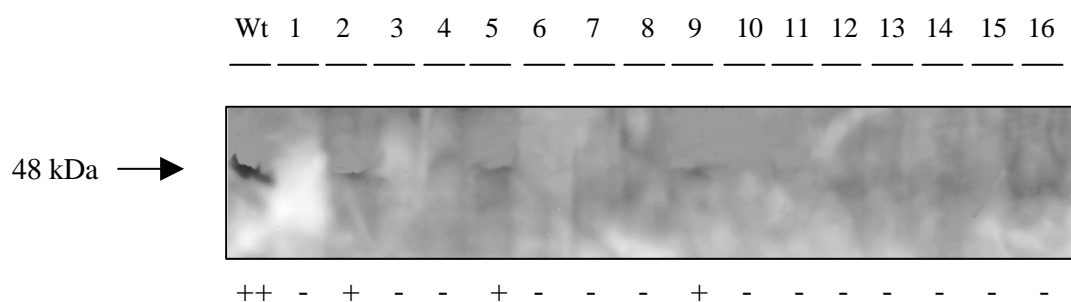


Abb. 6: Westernblot-Analyse von *L. pneumophila* Corby Wildtyp (Wt) und potentiellen Klonen 1-16 (*flaA*-Mutante [pCD8]) mit Anti-Flagellin-Antiserum. Es wurden Gesamtzelllysate von Bakterien aus der stationären Phase aufgetragen.

4.2.1.3. Komplementation durch chromosomale Integration des intakten *flaA*-Gens

Da eine *in trans* Komplementation nicht den gewünschten Erfolg gebracht hatte, sollte als nächstes versucht werden, das intakte *flaA*-Gen durch homologe Rekombination wieder in das Chromosom des Stammes KH3 zu integrieren (Abb. 7).

Dazu wurde aus dem Vektor pKH106 mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Sac*I ein Fragment ausgeschnitten, auf dem ein Teil des *accD*-Gens sowie das komplette *flaA*-Gen liegt und in den „Suicide“-Vektor pMSS704 kloniert. Der Vektor pMSS704 ist ein Derivat des Vektors pGP704, in dessen *Hind*III Schnittstelle über Partialverdau eine Cm^{R} -Kassette eingebaut wurde. Wie dieser ist er λ pir-abhängig und kann sich daher nicht selbständig in Legionellen replizieren. Das entstandene Konstrukt wurde pCD10 genannt. Nach Elektroporation in den Stamm KH3 wurde eine Selektion auf Cm-haltigen BCYE-Platten durchgeführt und resistente Klone durch PCR-Analyse mit den Primern *fla1* und *fla5* auf das Vorhandensein des intakten *flaA*-Gens überprüft.

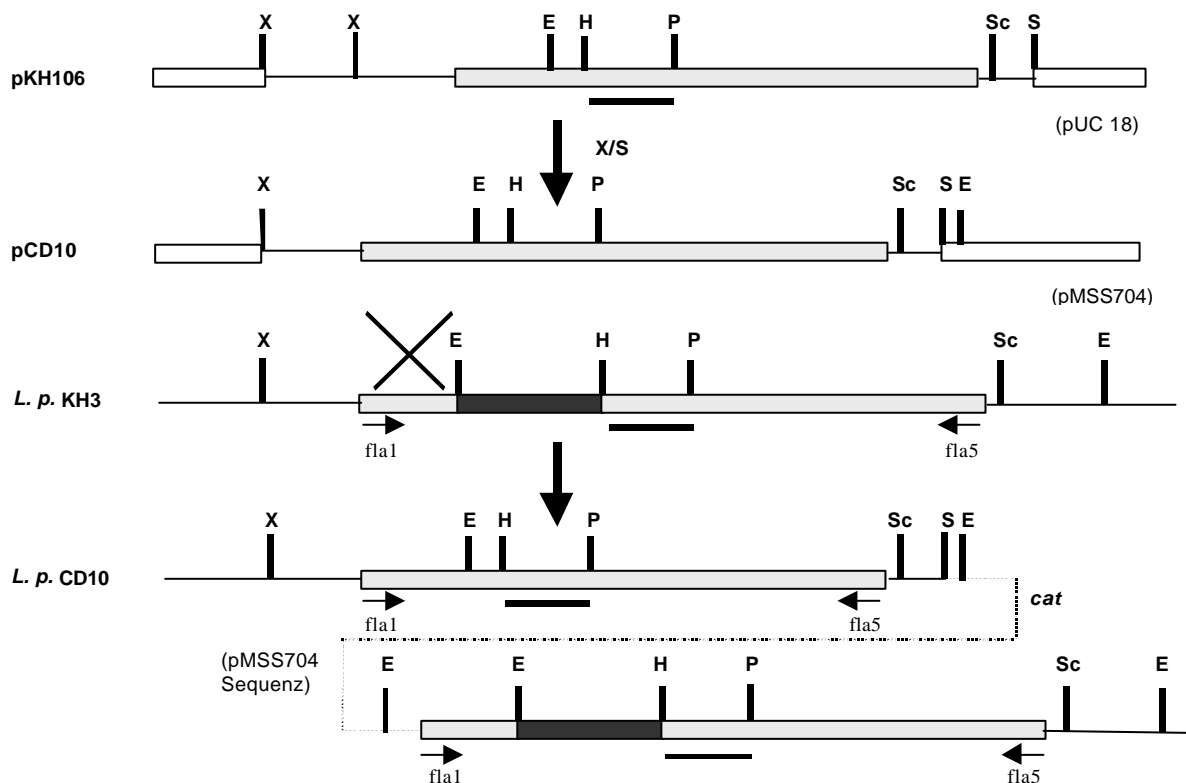


Abb. 7: Schema für die Konstruktion einer chromosomalen *flaA*-Komplementante. Gezeigt ist der Aufbau des Vektors pCD10 und dessen Integration in das Chromosom des Stammes KH3, sowie die Bindungsstellen der Primer *fla1* und *fla5* (Pfeile) und der verwendeten *flaA*-Sonde (schwarze Linie). Legende: graue Balken = *flaA*-Sequenz; weiße Balken = Vektorsequenz; schwarze Balken = Kanamycin^R-Kassette; Kreuz = Rekombinationsereignis; *cat* (Chloramphenicol^R-Gen). Restriktionsenzyme: E (*Eco*RI), H (*Hind*III), P (*Pst*I), S (*Sac*I), Sc (*Sac*II), X (*Xba*I).

Dabei konnte der Klon CD10 isoliert werden (Abb. 8). Als PCR-Produkt erhält man bei diesem Klon (Spur 3) ebenso wie beim Wildtyp (Spur 4) eine *flaA* Bande von 1300 bp, im Gegensatz zu der durch Integration der Km^R -Kassette vergrößerten Bande von 3,0 kb bei den *flaA*-Mutanten KH1 (Spur 1) und KH3 (Spur 2). Der neue Stamm CD10 muss also bei dem gewünschten Ereignis der homologen Rekombination das intakte *flaA*-Gen wieder in sein Chromosom integriert haben. Im Idealfall sollte gleichzeitig auch die durch die integrierte Kassette um 1700 bp größere Bande amplifiziert werden. Da sich das größere PCR-Fragment jedoch schwerer amplifizieren lässt, ist das Signal vermutlich zu schwach, um detektiert zu werden.

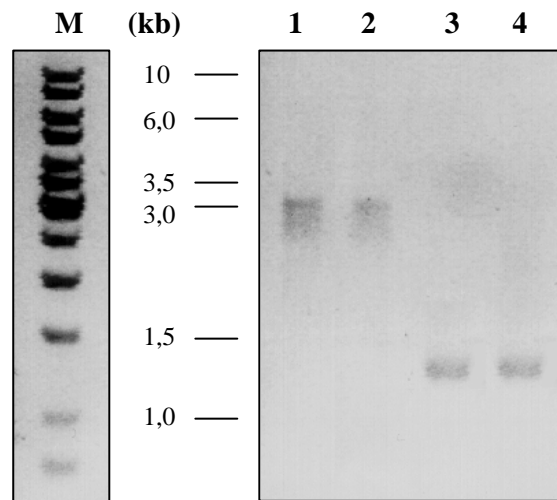


Abb. 8: PCR-Analyse des *flaA*-Lokus mit den Primern *fla1* und *fla5*. Eingesetzt wurde chromosomale DNA verschiedener *Legionella*-Stämme. Spuren: M (Marker); 1 (KH1); 2 (KH3); 3 (CD10); 4 (Wildtyp *L. pneumophila* Corby).

Um zu bestätigen, dass der Vektor tatsächlich in das Chromosom des Stammes KH3 integriert wurde, und um zu bestimmen, an welcher Stelle die Integration erfolgt war, wurde ein Southernblot durchgeführt. Dazu wurde chromosomale DNA isoliert, mit dem Enzym *EcoRI* behandelt, auf ein Gel aufgetragen und nach der Elektrophorese auf eine Membran geblottet. Als erstes wurde der Blot mit einer Km^R -spezifischen Sonde (*KpnI/HindIII* verdaut) hybridisiert (Abb. 9 A). Während der Wildtyp (Spur 1) nicht hybridisiert, zeigen sowohl die *flaA*-Mutante (Spur 3), als auch die Komplementante (Spur 2) eine Bande bei 3,9 kb. Diese Bande hybridisiert auch mit einer *flaA*-spezifischen Sonde (*HindIII/PstI* aus dem Vektor *pfla1* geschnitten) und ist durch die integrierte Kassette um 1700 bp größer als die entsprechende Bande des Wildtyps bei 2,2 kb (Abb. 9 B). Die Komplementante zeigt außerdem ein zusätzliches Signal bei 1,1 kb, was eine Integration des intakten *flaA*-Gens im 5'-Bereich des mutagenisierten *flaA*-Gens beweist (vgl. Lage der Restriktionsenzyme in Abb. 7).

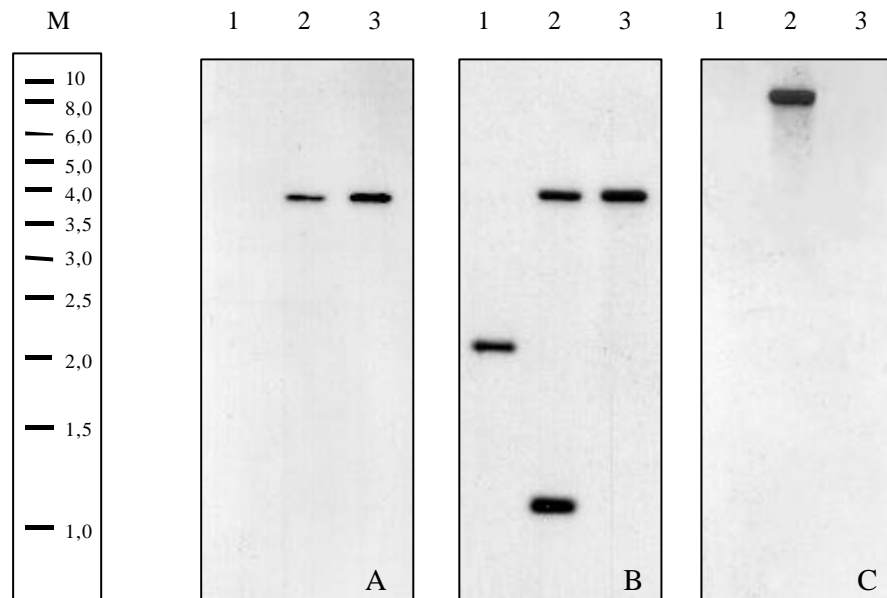


Abb. 9: Southern-Hybridisierung der Stämme *L. pneumophila* Corby Wildtyp (1), KH3 (2) und CD10 (3). Die chromosomale DNA wurde mit dem Enzym *EcoRI* verdaut und mit einer Km^R -spezifischen (A), einer *flaA*-spezifischen (B) und einer pMSS-spezifischen (C) Sonde hybridisiert.

Wäre das intakte Gen im „downstream“-Bereich integriert, so wäre eine wildtypische Bande von 2,2 kb zu erwarten gewesen. Die Hybridisierung mit einer 700 bp großen Sonde aus dem Vektor pMSS (*PstI* verdaut), die nur mit der Komplementante CD10 reagiert, bestätigt, dass der komplette Vektor in das Chromosom der Mutante KH3 integriert wurde (Abb. 9 C).

4.2.2. Phänotypische Charakterisierung der Stämme KH3 und CD10

4.2.2.1. Westernblot-Analyse

Zur näheren Charakterisierung sollten die *flaA*-Mutante KH3 und die Komplementante CD10 hinsichtlich ihres Phänotyps untersucht werden. Um nachzuweisen, dass der Stamm CD10 im Gegensatz zur *flaA*-Mutante wieder in der Lage ist, das Protein FlaA zu bilden, wurde zunächst eine Westernblot-Analyse durchgeführt. Nach Anzucht in AYE-Medium bis zur stationären Phase wurden Gesamtzelllysate der zu untersuchenden Bakterienstämme hergestellt und gleiche Proteinmengen auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach dem Elektrophoreselauf wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und anschließend mit einem polyklonalen Anti-Flagellin-Antiserum entwickelt.

Der Blot ist in Abbildung 10 dargestellt. Als Referenz (Spur 1) diente aufgereinigter Flagellenextrakt, deutlich zu sehen ist eine Bande bei 48 kD. Der *L. pneumophila* Corby Wildtyp (Spur 2) zeigt auf dieser Höhe ebenfalls eine Flagellinbande. In der gleichen Stärke wie beim Wildtyp wird das *flaA*-Gen auch von der Komplementante exprimiert (Spur 3). Hingegen kann bei der *flaA*-Mutante (Spur 4) keinerlei Bande mit dem Antikörper detektiert werden. Gesamtzelllysate von Bakterien aus der exponentiellen Phase zeigten jeweils keine Flagellinbande (Daten nicht gezeigt).

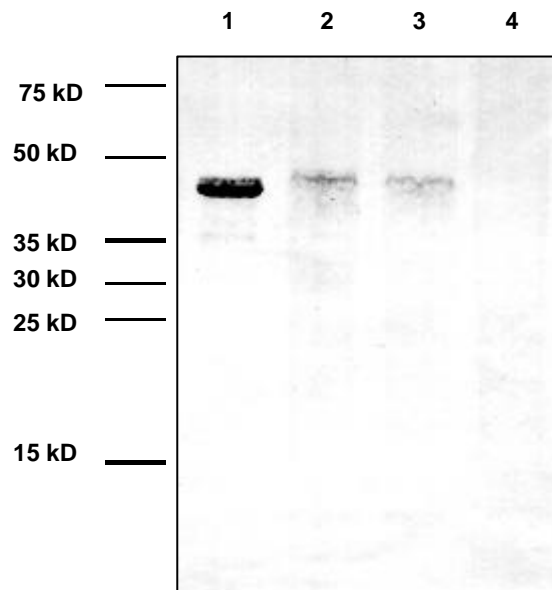


Abb. 10: Westernblot-Analyse verschiedener *Legionella*-Stämme mit Anti-Flagellin-Antiserum. Aufgetragen wurde gereinigter Flagellen-Extrakt als Positivkontrolle (Spur 1), sowie Gesamtzelllysate der stationären Phase von *L. pneumophila* Corby Wildtyp (Spur 2), CD10 (Spur 3) und KH3 (Spur 4).

4.2.2.2. Elektronenmikroskopische Untersuchung

Um sicherzustellen, dass das von der *flaA*-Komplementante CD10 exprimierte Flagellin auch tatsächlich zu einer intakten Flagelle aufpolymerisiert werden kann, wurden licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurden die Bakterien wiederum in AYE-Medium bis zur stationären Phase angezogen.

Bereits bei Betrachtung im Lichtmikroskop zeigte sich, dass die wildtypischen und die komplementierten Bakterien hochmotil waren, während bei der *flaA*-Mutante keine gerichtete Bewegung beobachtet werden konnte. Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen der Stämme konnte die erfolgreiche Komplementation bestätigt werden. In Abbildung 11 sieht man die flagellierten Bakterien des Wildtyps (Bild A) und des Stammes CD10 (Bild C), sowie die nicht flagellierten Bakterien des Stammes KH3 (Bild B).

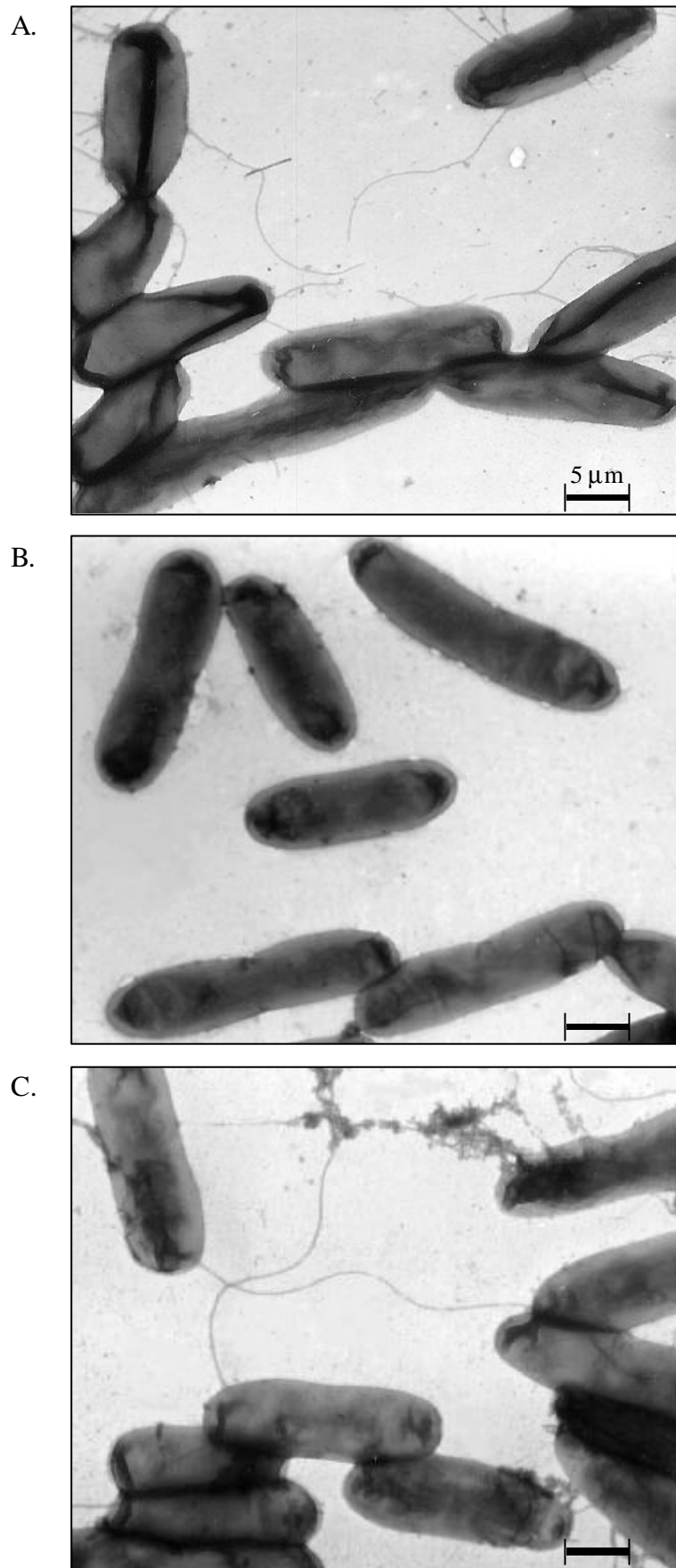


Abb. 11: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der *L. pneumophila* Corby-Stämme Wildtyp (A), der *flaA*-Mutante KH3 (B), und der *flaA*-Komplementante CD10 (C). Die Bakterien wurden bis zur stationären Phase angezogen, auf EM-Grids aufgebracht und mit 2 % Uranylacetat kontrastiert.

4.2.3. Verhalten der Stämme KH3 und CD10 in Zellkulturexperimenten

Anhand der *flaA*-Mutante und der Komplementante sollte im folgenden der Einfluss der Flagelle auf die verschiedenen Stadien der Infektion von Wirtszellen durch *L. pneumophila* untersucht werden. Für die Infektionsassays wurden sowohl der natürliche Wirt in der Umwelt, *Acanthamoeba castellanii*, verwendet, als auch die humane Leukämie-Zelllinie HL-60, welche durch Stimulation mit PMA zu Makrophagen-ähnlichen Zellen umgewandelt werden kann. Außerdem wurden, um die Ergebnisse mit der Zelllinie zu bestätigen, teilweise frisch isolierte Blutmonozyten als Primärzellen eingesetzt.

4.2.3.1. Stabilität der chromosomalen Mutationen

Zur Überprüfung, ob die in die Mutante integrierte Kanamycin^R-Kassette sowie das zur Komplementation integrierte Plasmid während einer Tage andauernden Infektion unter den auftretenden selektiven Bedingungen stabil im Chromosom vorliegen, wurden die Stämme KH3 und CD10 durch Amöben passagiert und nach 72 h auf BCYE-Agar ausplattiert. Es wurden zufällig je vier unabhängige Kolonien der Stämme gepickt und chromosomale DNA daraus isoliert. Nach Verdau mit dem Enzym *EcoRI* und Auftrennung durch Gelelektrophorese wurde die DNA geblottet und mit einer Km^R-spezifischen (Abb. 12 A) sowie einer pMSS-spezifischen (Abb. 12 B) Sonde hybridisiert.

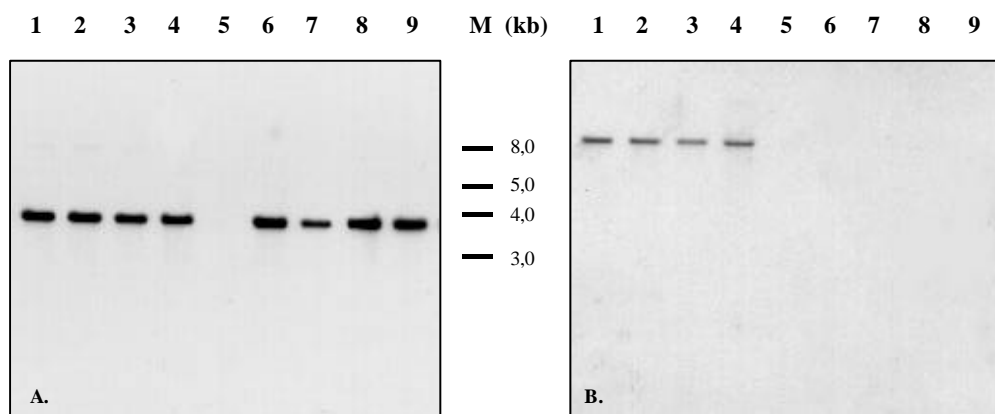


Abb. 12: Überprüfung der Stabilität der chromosomalen Insertionen. Die chromosomale DNA von jeweils 4 unabhängig gepickten Kolonien der *flaA*-Mutante KH3 und *flaA*-Komplementante CD10 sowie einer Wildtyp-Kolonie wurde mit *EcoRI* verdaut und mit einer Km^R-spezifischen (A) und einer pMSS-spezifischen Sonde (B) hybridisiert. Spuren: 1 (CD10, Kolonie 1); 2 (CD10, Kolonie 2); 3 (CD10, Kolonie 3); 4 (CD10, Kolonie 4); 5 (Wildtyp); 6 (KH3, Kolonie 1); 7 (KH3, Kolonie 2); 8 (KH3, Kolonie 3); 9 (KH3, Kolonie 4); M (Marker).

Zum Vergleich wurde auch der Wildtyp aufgetragen (Spur 5). Es zeigten jeweils alle 4 Klone das entsprechende erwartete Bandenmuster der Mutante (Spuren 1 bis 4), bzw. der Komplementante (Spuren 6 bis 9). Die Stämme konnten also für die Infektionsassays verwendet werden.

4.2.3.2. Adhärenz an Wirtszellen

Vor der Aufnahme durch die Wirtszellen müssen die Bakterien zunächst in Kontakt mit den Zellen treten und an sie adhären. Um zu überprüfen, ob die Flagelle dabei für die Legionellen eine wichtige Rolle spielt, wurden Adhärenzassays durchgeführt. Für die Versuche wurden Bakterien aus Übernachtskulturen der frühen stationären Phase verwendet und auf eine Zellzahl von 2×10^6 Bakterien/ml eingestellt, was einer MOI (multiplicity of infection) von 10 Bakterien pro Wirtszelle entspricht.

Gibt man von den Stämmen Wildtyp, KH3, und CD10 die gleiche Anzahl an Bakterien ohne Aufzentrifugation zu der Wirtszelle *A. castellanii*, so beobachtet man nach einer definierten Inkubationszeit von 30 Minuten, nach der nicht adhären Bakterien durch dreimaliges Waschen entfernt werden, dass je nach Stamm unterschiedlich viele Bakterien mit den Amöben assoziiert sind (Abb. 13).

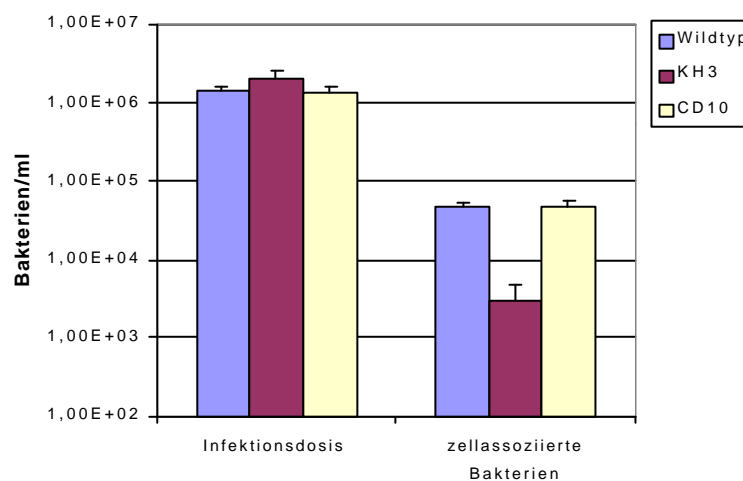
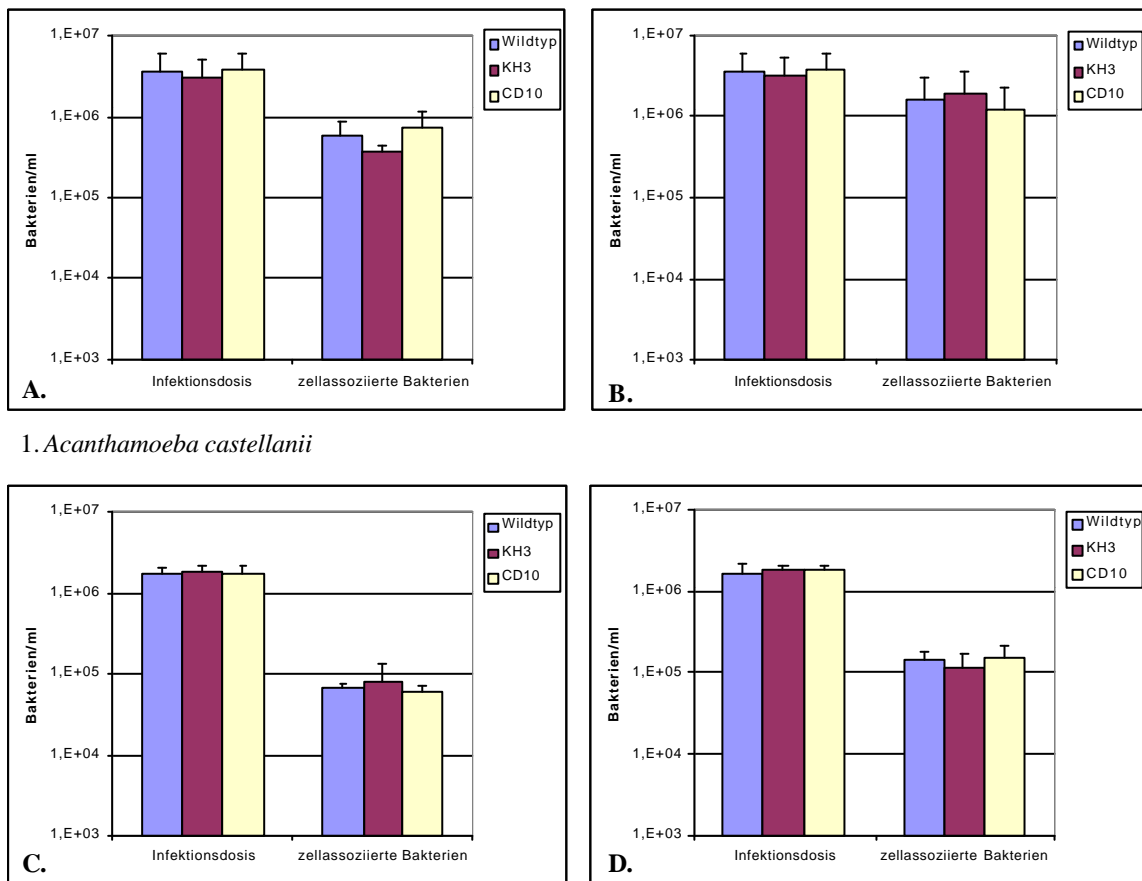


Abb. 13: Adhärenzassay mit Acanthamoeben ohne Zentrifugation. Ermittelt wurde die Anzahl an zellassozierten Bakterien von Wildtyp, KH3 und CD10 nach 30 minütiger Inkubation mit den Wirtszellen und anschließendem dreimaligen Waschen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung.

Während in Bezug auf das Inoculum ca. 3,2 % des Wildtyps und der Komplementante an die Wirtszellen adhären hatten, so lagen bei der Mutante weniger als 0,15 % der Bakterien zellassoziert vor. Innerhalb des gegebenen Zeitraums gelang es also den Mutanten um den Faktor 20 schlechter,

an die Wirtszellen zu adhären. Allerdings konnte bei diesem Versuch nicht unterschieden werden, ob diese Beeinträchtigung durch die Notwendigkeit der Flagelle als Rezeptor für die Adhärenz zustande kam, oder durch die fehlende Motilität der Mutanten, wodurch diese schlechter zu den Wirtszellen gelangen konnten.

Um den Einfluss der Motilität auf die Versuche künstlich auszuschalten wurden die Bakterien in einem zweiten Versuchsansatz durch Zentrifugation direkt mit den Wirtszellen in Kontakt gebracht. Es wurden zwei verschiedene Zentrifugationsgeschwindigkeiten verwendet: - 1000 g, wobei alle Bakterien sedimentiert werden, sie jedoch aufgrund der großen Zentrifugalkraft möglicherweise auf den Wirtszellen regelrecht fixiert werden könnten, und 200 g, wobei nur ein Teil der Bakterien sedimentiert wird und es nicht zu einer artifiziellen Beeinflussung des Adhärenzvorgangs kommen sollte.



1. *Acanthamoeba castellanii*

2. HL-60 Zellen

Abb. 14: Adhärenzassay mit Aufzentrifugieren der Bakterien bei 200 g (A+C) und 1000 g (B+D). Dargestellt ist die Anzahl der zellosoziierten Bakterien von Wildtyp, KH3 und CD10 nach 15 minütiger Inkubation mit *A. castellanii* (1) und HL-60 Zellen (2) und anschließendem dreimaligen Waschen. Abgebildet sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung.

Hier zeigen die Versuche mit *A. castellanii* (Abb. 14 A und B), unabhängig von der Zentrifugationsgeschwindigkeit, dass das in Kontakt bringen der Bakterien mit den Wirtszellen ausreicht, um für alle Stämme eine vergleichbare Adhärenzrate zu erzielen. Diese Daten konnten auch durch Versuche mit HL-60 Zellen bestätigt werden (Abb. 14 C und D). Auch durch eine Erhöhung der Infektionsdosis auf eine MOI von 500 konnten keine Unterschiede zwischen flagellierten und nicht flagellierten Stämmen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Die Flagelle ist also unter den gewählten Versuchsbedingungen für die Fähigkeit der Bakterien an Zellen zu adhären nicht von Bedeutung. Die beobachteten Unterschiede zwischen Mutante und Wildtyp in Abbildung 13 sind somit vermutlich auf die verminderte Motilität und das folglich langsamere Erreichen der Wirtszellen zurückzuführen.

4.2.3.3. Invasion der Wirtszellen

Es sollte auch untersucht werden, inwieweit die Flagelle an dem Invasionsprozess der Bakterien beteiligt ist. Dazu wurden die Wirtszellen *A. castellanii* und differenzierte HL60-Zellen für verschiedene Zeitintervalle (15, 30, 60 und 120 Minuten) mit den Bakterien inkubiert (MOI 10), anschließend die extrazellulären Bakterien durch eine einstündige Gentamicin-Behandlung abgetötet und die nicht abgetöteten intrazellulären Bakterien ausplattiert.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 15 dargestellt. Deutlich zu sehen ist, dass die nicht flagellierten Bakterien zu einem geringeren Anteil und auch zu einem späteren Zeitpunkt in den Wirtszellen vorliegen. Während nach 30 Minuten die Zahl der intrazellulären Bakterien in Amöben (Abb. 15 A) um den Faktor 10 geringer ist als beim Wildtyp und der Komplementante, so ist zum gleichen Zeitpunkt dieser Unterschied bei HL-60 Zellen (Abb. 15 B) noch viel stärker ausgeprägt. Hier kann eine um den Faktor 150 verringerte intrazelluläre Bakterienkonzentration gemessen werden. Auch nach zwei Stunden sind immerhin noch etwa 5 mal weniger mutagenisierte Bakterien in den Amöben zu finden, in HL-60 Zellen sind es sogar 130 mal weniger. Experimente mit humanen Blutmonozyten bestätigen die Ergebnisse mit den HL-60 Zellen (Daten nicht gezeigt).

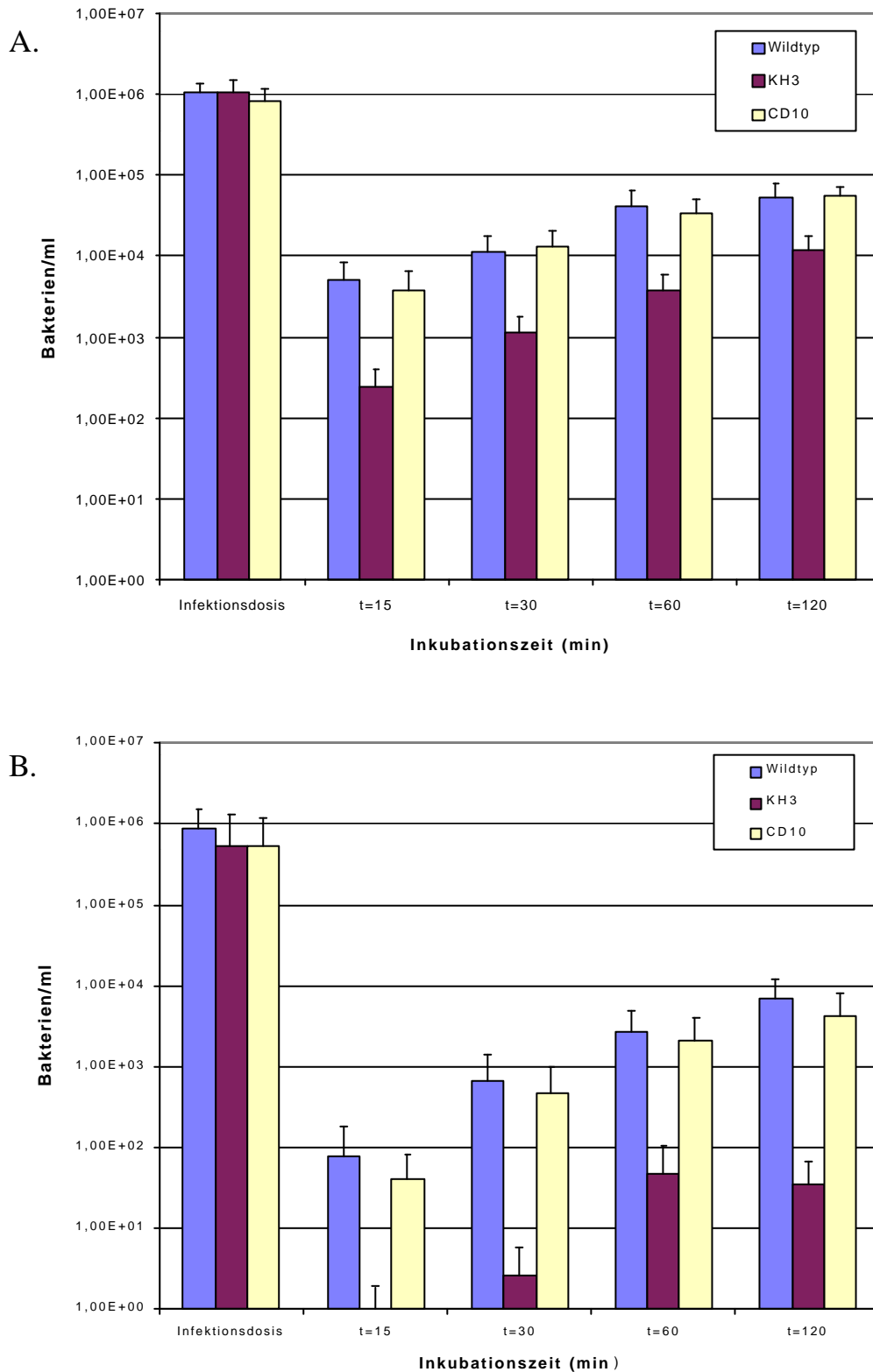


Abb. 15: Invasionsassay mit *A. castellanii* (A) und HL60-Zellen (B). Dargestellt ist die Anzahl intrazellulärer Bakterien nach einer Inkubationszeit von 15, 30, 60 und 120 Minuten und anschließender einstündiger Gentamicin-Behandlung zum Abtöten der extrazellulär vorliegenden Bakterien. Abgebildet sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung.

Es wurde außerdem versucht, die unterschiedliche Aufnahmerate durch Zugabe von gereinigtem Flagellenextrakt zu den *flaA*-negativen Mutanten während der Infektion zu beeinflussen. Es ließ sich jedoch durch die alleinige Zugabe der Flagellen keine Steigerung der Aufnahme beobachten. Auch konnte die Invasionsrate der wildtypischen Bakterien durch Zugabe des Flagellenextrakts zur Blockierung möglicher Bindungspartner nicht signifikant vermindert werden. Die Unterschiede in der Aufnahme beruhen also vermutlich nicht auf dem Vorhandensein der Flagelle als Struktur, sondern vielmehr auf der von ihr vermittelten Funktion der Motilität.

Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Stämmen lassen sich auch im Mikroskop beobachten, indem man die Bakterien, anstelle sie auszuplattieren, nach der Inkubation mit Gentamicin durch *in situ* Hybridisierung in den Zellen sichtbar macht. Dabei werden die Wirtszellen und die Bakterien nach der entsprechenden Inkubationszeit und anschließenden Gentamicin-Behandlung auf einem Objektträger fixiert und die Zellmembranen durch Behandlung mit Paraformaldehyd und Ethanol permeabilisiert. Daraufhin werden die Bakterien durch die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Oligonukleotid-Sonde LEG705 (Manz et al., 1995), welche an einen bestimmten Abschnitt der rRNA der Bakterien komplementär bindet, markiert und unter einem Fluoreszenzmikroskop mikroskopiert. Eventuell noch vorhandene tote extrazelluläre Bakterien zeigen mit dieser Methode nur ein sehr schwaches Signal, da hier die vorhandene rRNA-Menge vermutlich nicht mehr für eine deutliche Anfärbung ausreicht. In Abbildung 16 sind die entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen nach 15 min, 60 min und 120 min dargestellt, jeweils für den Wildtyp (erste Spalte) und die *flaA*-Mutante (zweite Spalte). Klar erkennbar ist die deutlich geringere intrazelluläre Anzahl an *flaA*-Mutanten im Vergleich zum Wildstamm.

Diese Experimente belegen zum ersten Mal bei *L. pneumophila* einen deutlichen Zusammenhang zwischen Flagellierung und der Fähigkeit zur Invasion von Wirtszellen.

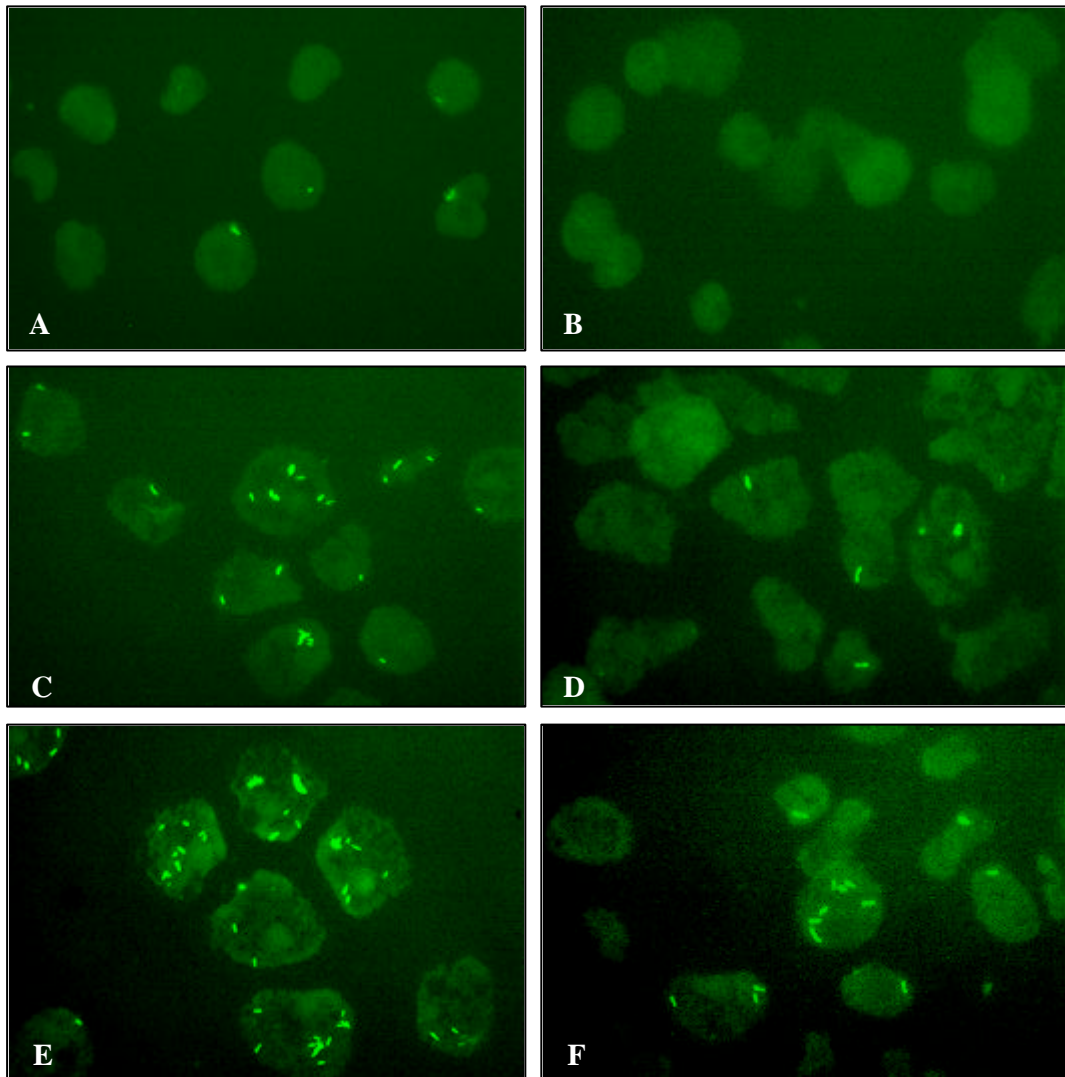


Abb. 16: *In situ* Hybridisierung der intrazellulären wildtypischen (A, C, E) und *flaA*-mutagenisierten (B, D, F) Legionellen mit der Sonde LEG705 zu Beginn der Infektion. 15 min (A+B), 60 min (C+D) und 120 min (E+F) nach Inkubation mit *A. castellanii* wurde eine einstündige Gentamicin-Behandlung mit anschließender Fixierung und Hybridisierung durchgeführt und die Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet und fotografiert.

4.2.3.4. Intrazelluläres Wachstum

Außerdem sollte auch der mögliche Einfluss der Flagelle auf die Vermehrung der Legionellen bestimmt werden. Zunächst wurde daher von allen drei Stämmen in AYE-Flüssigmedium eine Wachstumskurve erstellt. Dabei zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich der Vermehrungsrate *in vitro*. Nun sollte auch die Fähigkeit zur intrazellulären Vermehrung der drei Stämme getestet werden. Als Wirtsorganismen wurden wiederum *A. castellanii* und differenzierte HL-60 Zellen verwendet.

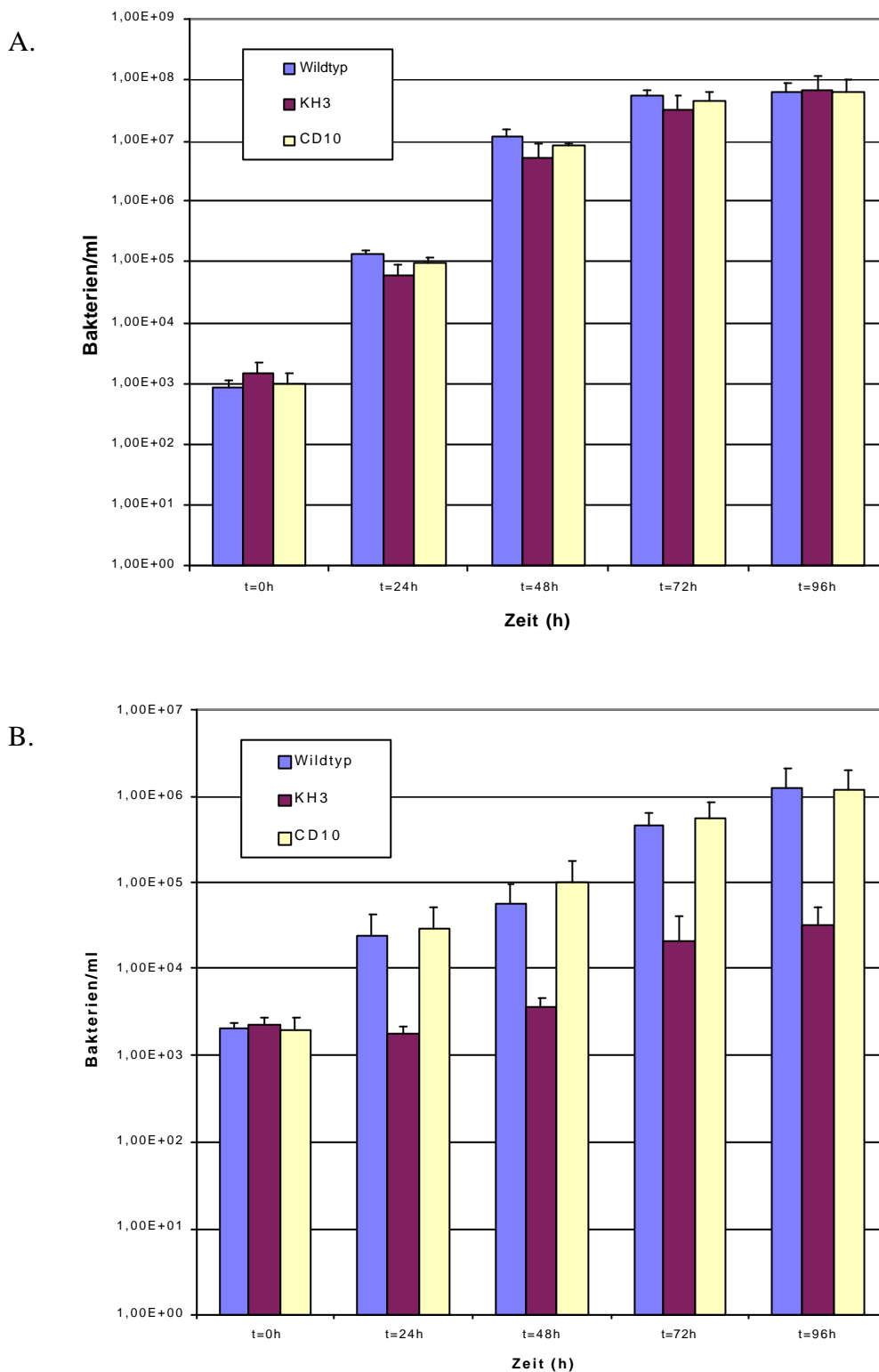


Abb. 17: Wachstumsassay in *A. castellanii* (A) und HL-60 Zellen (B). Die Wirtszellen wurden mit einer MOI von 0,01 infiziert. Alle 24 h wurden Aliquots lysiert und zweifach ausplattiert zur Bestimmung der Anzahl an vorliegenden Legionellen. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung.

Die Bakterien wurden über Nacht bis zum Beginn der stationären Phase angezogen und auf eine Zellzahl von 2×10^3 Bakterien/ml eingestellt, was einer MOI von 0,01 Bakterien pro Wirtszelle entspricht. Jeden Tag wurden nun über einen Zeitraum von 4 Tagen entsprechende Aliquots der Wirtszellen lysiert und die vorhandenen Bakterien auf BCYE-Platten ausplattiert. Da sich die Legionellen nicht im Medium vermehren können, entspricht die Zunahme an Bakterien der intrazellulären Wachstumsrate.

Abbildung 17 A zeigt das Wachstum der Stämme (Wildtyp, KH3 und CD10) in Acanthamoeben. Nach 4 Tagen haben sich alle drei Stämme um einen Faktor von 50.000 - 70.000 vermehrt. Es lässt sich kein signifikanter Unterschied der *flaA*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp feststellen. Die Flagelle hat also auf die Vermehrung in Amöben keinen Einfluss.

Betrachtet man die Vermehrung in HL-60 Zellen, so sieht das Bild jedoch ganz anders aus (Abb. 17 B). Während sich der Wildtyp und die Komplementante nach vier Tagen jeweils um einen Faktor von 600 vermehrt haben, so zeigt der Stamm KH3 in dem gleichen Zeitraum nur eine 14-fache Zunahme der Bakterienanzahl. Auch in humanen Blutmonozyten vermehrt sich die *flaA*-Mutante deutlich langsamer als der Wildtyp (Daten nicht gezeigt). In diesen Wirtszellsystemen scheint die Flagellierung also einen deutlichen Vorteil mit sich zu bringen, allerdings konnte bei diesen Versuchen nicht unterschieden werden, ob die beobachtete Reduktion der Vermehrungsrate mit einer tatsächlich verminderten intrazellulären Replikationsfähigkeit zusammenhängt oder ob sich die geringere Invasionsrate (vgl. Abb. 15) der *flaA*-Mutanten gegenüber den humanen Zellen in einer Art Verlangsamung der Ausbreitungsgeschwindigkeit äußern könnte.

Um diese Frage zu klären wurde ein weiterer Assay durchgeführt. Diesmal allerdings wurden die Wirtszellen mit einer deutlich größeren Anzahl von Bakterien, nämlich 2×10^6 Bakterien/ml inkubiert, das entspricht einer MOI von 10. Nach zwei Stunden Inkubationszeit wurden die extrazellulären Bakterien mit einer einstündigen Gentamicin-Behandlung abgetötet, und der t_{0h} -Wert durch Ausplattieren der Bakterien bestimmt. Nach 24 h wurden weitere Aliquots entnommen und ausplattiert.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt. Bei diesen Versuchsbedingungen sieht man, dass die Mutante, im Hinblick auf die anfänglich bei t_{0h} geringere Zahl an intrazellulär vorliegenden Bakterien,

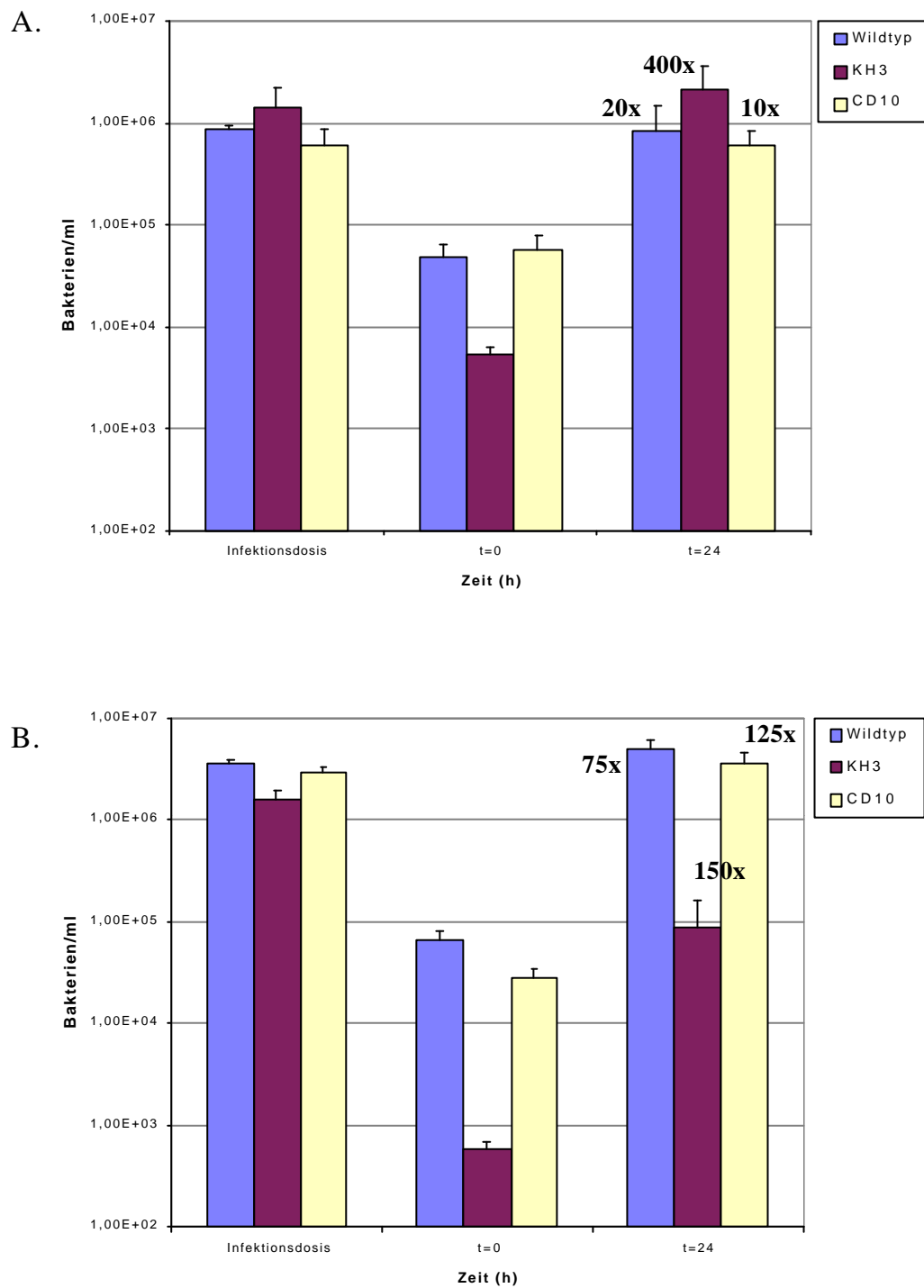


Abb. 18: Wachstumsassay in *A. castellanii* (A) und HL-60 Zellen (B). Die Wirtszellen wurden mit einer MOI von 10 infiziert und 2 h inkubiert. Anschliessend wurden die extrazellulären Bakterien durch eine einstündige Gentamicin-Behandlung abgetötet. Danach wurde der t_h Wert durch Ausplattieren der intrazellulären Bakterien bestimmt, auf dieselbe Weise auch der t_{4h} Wert. Die Zahlen in der Graphik geben die Wachstumsrate innerhalb von 24 h für die drei Stämme an. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung.

nach 24 h sogar eine deutlich höhere Multiplikationsrate in Amöben (Abb. 18 A) erreicht als der Wildtyp und die Komplementante (Faktor 400 im Vergleich zu Faktor 20, bzw. 10). Auch in HL-60 Zellen (Abb. 18 B) weist der Stamm KH3 eine leicht höhere Replikationsrate als die beiden flagellierten Stämme auf (Faktor 150 im Vergleich zu 75, bzw. 125). Die Absolutzahl bleibt hier jedoch entsprechend der anfänglich geringeren Anzahl unter dem Niveau des Wildtyps. Damit bestätigte sich die Vermutung, dass die Flagelle auf die intrazelluläre Vermehrungsfähigkeit der Bakterien an sich keinen Einfluss hat, sondern eher eine Rolle für die Aufnahme und Verbreitung der Bakterien spielt, was im Laufe von mehreren Infektionszyklen zu einem insgesamt verlangsamten Wachstum der nicht flagellierten Bakterien in Makrophagen-ähnlichen Zellen führen kann.

4.2.4. Untersuchungen zur Zytotoxizität der Mutanten KH1 und KH3

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen mit der *flaA*-Mutante fiel auf, dass zwischen Infektionen, die mit den beiden Stämmen KH3 und KH1 durchgeführt wurden, ein grundlegender Unterschied bestand. Infiziert man beispielsweise Acanthamöben mit dem Wildtyp oder dem Stamm KH3 (MOI 10), so kann man schon nach 4 h beobachten, dass die Amöben beginnen sich abzurunden. Nach 24 h ist bereits ein großer Teil der Wirtszellen lysiert, der Rest der Zellen ist deutlich geschädigt. Infiziert man jedoch mit dem Stamm KH1, so ist selbst nach 48 h keine sichtbare äußerliche Schädigung der Zellen aufgetreten und die Zellmembran bleibt intakt, obwohl sich insgesamt die gleiche Anzahl von Legionellen in dem Infektionsansatz befindet.

Dieses Phänomen wurde in Abbildung 19 unter dem Mikroskop fotografiert. Bild A zeigt eine Aufnahme von nichtinfizierten Amöben nach 24 h in Amöbenpuffer (Negativkontrolle). Bild B zeigt Amöben, die mit dem Wildtyp infiziert wurden, Bild C Amöben, die mit dem Stamm KH3 infiziert wurden. In beiden Fällen sind die Amöben deutlich abgerundet und teilweise schon lysiert. In Bild D sind Amöben abgebildet, die mit Bakterien des Stammes KH1 infiziert wurden. Es ist kein Unterschied zur Negativkontrolle zu sehen. Um sicherzugehen, dass die gleiche Anzahl an Bakterien in den Ansätzen vorlag, wurden jeweils Aliquots auf BCYE-Platten ausplattiert.

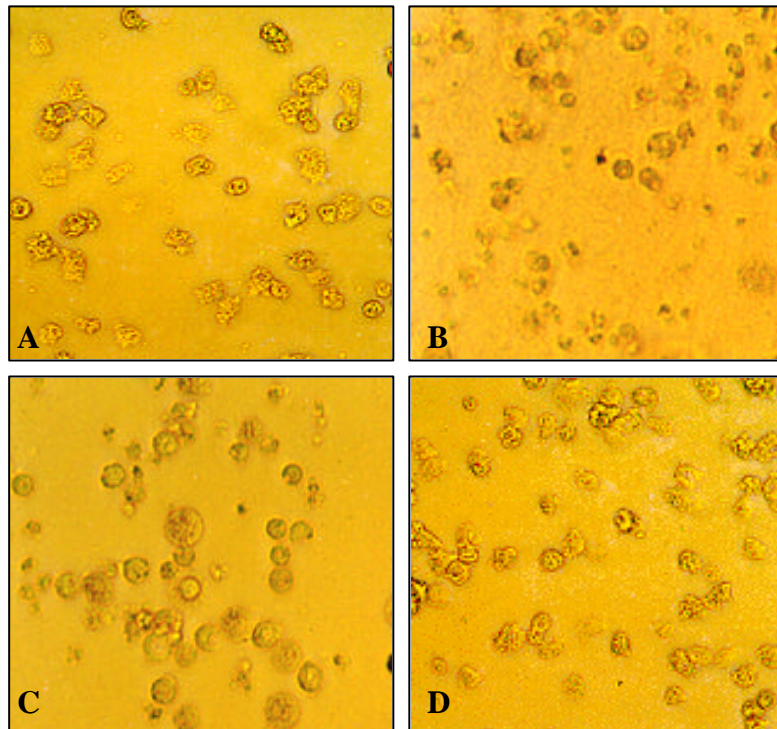


Abb. 19: Morphologie von *A. castellanii* nach 24 h in Amöbenpuffer. Dargestellt ist die uninfizierte Kontrolle (Bild A), sowie Amöben, welche mit dem Stamm KH1 (Bild D) infiziert wurden. Hier lässt sich kein Unterschied in der Morphologie zur Kontrolle beobachten. Amöben, die mit dem Wildtyp (Bild B) oder dem Stamm KH3 (Bild C) infiziert wurden, zeigen hingegen bereits eine deutliche Schädigung.

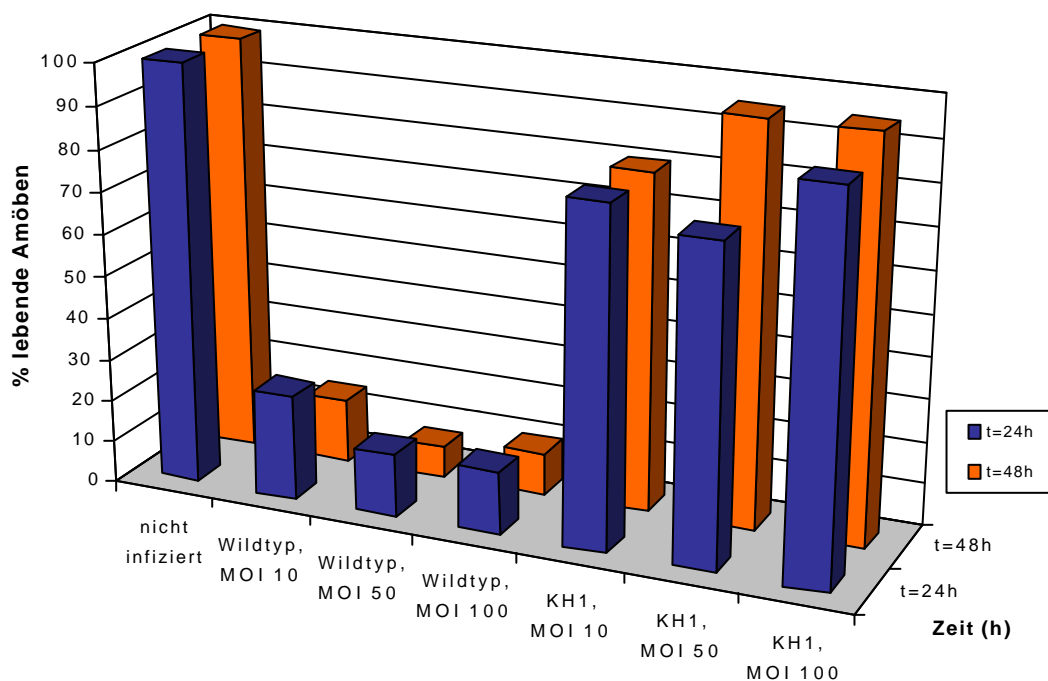


Abb. 20: Zytotoxizitätsassay mit *A. castellanii*. Die Amöben wurden mit drei verschiedenen MOIs (10, 50, und 100) mit dem Wildtyp und dem Stamm KH1 infiziert. Nach 24 h (Reihe 1) und 48 h (Reihe 2) wurde mikroskopisch mittels Trypan-Blau-Färbung die Anzahl der noch intakten Amöben bestimmt und in das prozentuale Verhältnis zur uninfizierten Kontrolle gesetzt.

Dieser Effekt ist in Abbildung 20 noch einmal quantitativ für den Wildtyp und den Stamm KH1 dargestellt. In diesem Experiment wurden 24 h und 48 h nach Infektionsbeginn die noch intakten Amöben unter dem Mikroskop ausgezählt und in das prozentuale Verhältnis zur uninfizierten Negativkontrolle gesetzt. Dabei sieht man, dass bei einer MOI von 10 im Gegensatz zum Wildtyp, wo bereits nach 24 h fast 80 % der Amöben lysiert sind, noch 80 % der mit dem Stamm KH1 infizierten Amöben intakt vorliegen. Das gleiche Zahlenverhältnis ist auch noch nach 48 h zu beobachten.

Das Phänomen der Zytotoxizität wurde auch bei humanen Blutmonozyten untersucht. Diese wurden nach ihrer Isolierung in 96-well-Platten ausgesät und anschließend mit sechs verschiedenen Bakterienkonzentrationen (MOI von 0,001 bis 10) beimpft. Nach einer Inkubationszeit von 72 h wurde der gelbe Farbstoff MTT zupipettiert, der von den mitochondrialen Enzymen lebender Zellen zu einer blauen Verbindung umgewandelt wird, welche aus der wässrigen Lösung auskristallisiert. Da die bakteriellen Enzyme auch eine Umwandlung des Farbstoffs bewirken, müssen sie vor dem Lösen der Kristalle in Isopropanol

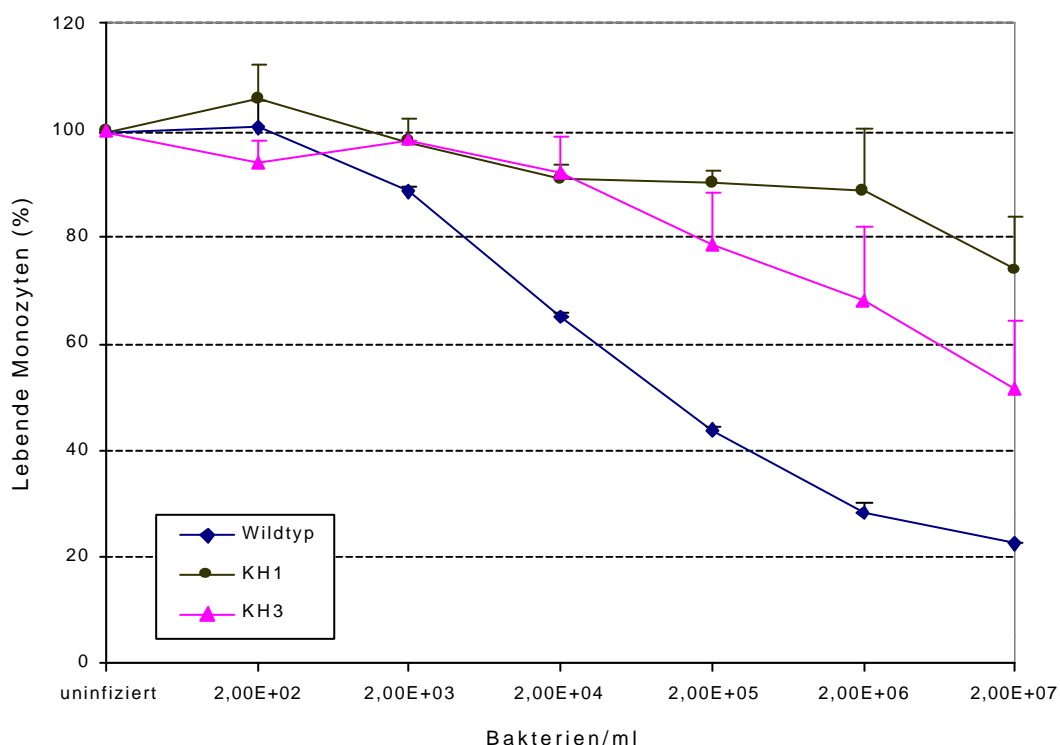


Abb. 21: Zytotoxischer Effekt verschiedener Bakterienkonzentrationen (MOI 0,01 bis 10) von Wildtyp *L. pneumophila* Corby, KH1 und KH3 auf humane Blutmonozyten, gemessen mittels MTT-Assay im ELISA-Reader. Die Absorption der uninfizierten Kontrolle wurde gleich 100 % festgelegt und alle anderen Werte darauf bezogen. Dargestellt ist das Mittel aus zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils sieben gemessenen Einzelwerten und die Standardabweichung.

durch Absaugen entfernt werden. Die anschließende im ELISA-Reader gemessene Intensität der Blaufärbung korreliert somit mit dem Vorhandensein von lebenden Zellen.

Dieses Experiment ist in Abbildung 21 graphisch dargestellt. Abhängig vom Inoculum kann hier beim Wildtyp eine entsprechende Abnahme der überlebenden Wirtszellen festgestellt werden. Bei einer Infektion mit dem Stamm KH3 überleben ca. 30 - 40 % mehr Zellen. Hier muss allerdings beachtet werden, dass aufgrund der verlangsamten Vermehrungsrate der *flaA*-Mutante in diesem System die verminderte Zytotoxizität vermutlich auf der im Vergleich zum Wildtyp geringeren Endkonzentration an mutagenisierten Bakterien beruht. Die Absterberate der Monozyten nach Infektion durch den Stamm KH1 ist jedoch auch in diesem Fall noch einmal deutlich geringer als beim Stamm KH3.

Es wurde außerdem durch Ausstreichen auf Blutagarplatten überprüft, ob der Stamm KH1 möglicherweise seine Fähigkeit zur Hämolyse verloren hatte. Es wurde jedoch für alle Stämme (Wildtyp, KH1, KH3 und CD10) eine vergleichbare hämolytische Aktivität beobachtet. In einer Kooperation mit Sonja Hägele konnte von ihr außerdem gezeigt werden, dass die Mutante KH1 weiterhin in der Lage war, ebenso wie der Wildtyp bei den Monozyten Apoptose zu induzieren.

4.2.5. Zusammenfassung

Die *flaA*-negative Mutante *L. pneumophila* Corby KH3 konnte durch chromosomale Insertion des intakten *flaA*-Gens komplementiert werden. Westernblot-Analyse und Elektronen-mikroskopie bestätigten für die Komplementante CD10 die wildtypische Expression des Flagellins sowie dessen Polymerisation zu einer intakten Flagelle. Versuche mit den Wirtszellen *A. castellanii* und HL-60 Zellen zeigten, dass die Flagellierung eine wichtige Rolle für das Aufsuchen der Wirtszellen und deren Invasion spielt. Für die Adhärenz ist sie dagegen nicht von Bedeutung. Die intrazelluläre Vermehrungsfähigkeit ist sowohl in Amöben als auch in HL-60 Zellen unabhängig von der Flagellierung. Im Makrophagen-System zeigte sich jedoch eine deutlich langsamere Ausbreitungsgeschwindigkeit, was mit einer Reduktion der Absolutzahlen an nicht flagellierten Bakterien einherging.

Es wurde außerdem eine Mutante beschrieben (KH1), welche eine im Vergleich zum Wildtyp deutlich geringere Zytotoxizität gegenüber ihren Wirtszellen aufweist, die unabhängig von der Wachstumsrate der Bakterien ist.

4.3. Charakterisierung der *motA*-Region

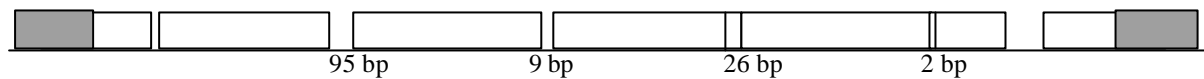
4.3.1. Bestimmung der Nukleotidsequenz des Cosmids 12/44

Die genetische Region mit den Genen *fliA* und *motA* sollte in dieser Arbeit ebenfalls näher charakterisiert werden. Zum Sequenzieren der benachbarten Bereiche wurde das Cosmid 12/44 aus der Cosmid-Genbank (Ludwig, 1992) verwendet, welches Dagmar Kapfhammer (Würzburg) in ihrer Diplomarbeit identifiziert hatte. Bekannt war bereits, dass die Gene *fliA* und *motA* auf diesem Cosmid vorhanden waren.

Im „downstream“-Bereich von *motA* liegt um 26 bp überlappend ein offenes Leseraster mit Homologien zu *motB*, dessen Sequenz nur zum Teil bekannt war. In dieser Arbeit konnte die Nukleotidsequenz von 801 bp vervollständigt werden. Um 2 bp überlappend schließt sich ein weiterer ORF (*orfZ*) von 402 bp an, der Homologien zu putativen Genen von *V. cholerae* und *P. aeruginosa* aufweist. Weiter „downstream“ wurden keine Flagellengene mehr gefunden, es folgt ein ORF mit Ähnlichkeiten zu einem „peptide chain release factor“ (*prfB*) von *S. typhimurium* und *E. coli*.

Im 5'-Bereich von *fliA* liegt ein Gen, das Homologien zu *motR* von *P. putida*, *fleN* von *P. aeruginosa* sowie *ylxH* von *B. burgdorferi* zeigt. Auch diese Gene gehören zum Flagellenregulon. Sie besitzen eine ATP-Bindungsdomäne und sind vermutlich für die Anzahl der Flagellen pro Bakterium wichtig. Direkt davor wurde ein weiteres Flagellengen mit Ähnlichkeiten zu *flhF* von *V. parahaemolyticus* und *P. putida* identifiziert. Bei *Pseudomonas* ist das Gen, das eine GTP-Bindedomäne besitzt, entscheidend für die polare Positionierung der Flagelle. Außerdem beeinflusst es das Phänomen der Hunger-induzierten generellen Stressresistenz. An dieser Stelle wurde die Sequenzierung nicht weiter fortgeführt. Eine Übersicht über die ORFs der Region ist in Abbildung 22 dargestellt, die Sequenz der Gene *motA*, *motB* und *orfZ* findet sich im Anhang (7.2.).

Schematischer Aufbau der *motA*-Region



<i>flhF</i>	<i>motR</i>	<i>fliA</i>	<i>motA</i>	<i>motB</i>	<i>orfz</i>	<i>prfB</i>
GTP-bindendes Protein, Flagellen-lokalisierung	ATP-bindendes Protein, Flagellenanzahl	σ^{28} -Faktor, reguliert Klasse II Gene in der Flagellenhierarchie	Protonenkanal des Motors, Membran	Verankerung des Motors, Membran	?	Protein-translation
?	840 bp	714 bp	771 bp	801 bp	402 bp	?

Abb. 22: Übersicht über die *motA*-Region (insgesamt 5600 bp) von *L. pneumophila* Philadelphia I. Die identifizierten Gene sind als Balken dargestellt, nicht komplett sequenzierte Gene wurden schraffiert. Darunter ist die Funktion und die jeweilige Länge in Nukleotiden angegeben. Die Leserichtung verläuft bei allen Genen von links nach rechts.

4.3.2 Analyse zum Vorkommen *motA*-homologer Gene bei der Gattung *Legionella*

Um zu untersuchen, ob *motA*-homologe Gene auch bei anderen *Legionella*-Stämmen vorhanden sind, wurden Southernblot-Analysen durchgeführt. Dazu wurde die chromosomale DNA der entsprechenden Stämme mit dem Enzym *PstI* behandelt und anschließend der DNA-Blot mit einer *motA*-spezifischen Sonde (900 bp Fragment, generiert mit den Primern MotA1 und motU7) bei geringer Stringenz hybridisiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt.

Bei allen 10 getesteten *L. pneumophila* Stämmen konnte mit dieser Sonde ein *motA*-homologes Gen nachgewiesen werden. In allen Fällen lag das Hybridisierungssignal auf der gleichen Höhe wie bei *L. pneumophila* Corby bei 3,6 kb. Lediglich bei dem Stamm *L. pneumophila* Los Angeles war das Signal bei 3,6 kb sehr schwach und es trat zusätzlich eine Bande bei 2,1 kb auf. Da bei den anderen *L. pneumophila* Stämmen ansonsten immer nur ein Hybridisierungssignal detektiert werden konnte, ist davon auszugehen, dass das *motA*-Gen nur in einer einzigen Kopie im Chromosom vorliegt.

Bei den nicht-*pneumophila* Stämmen war das Bild nicht so einheitlich. Es hybridisierten bei den gewählten Bedingungen nur die Stämme *L. gormanii* und *L. jordanis* mit der Sonde. Die Signale waren schwächer als bei den *L. pneumophila* Stämmen und auch die Bandengröße variierte. Die Stämme *L. israeliensis*, *L. oakridgensis* und *L. longbeachae* (SG1), von denen bekannt ist, dass sie kein *flaA*-homologes Gen besitzen (Heuner et al., 1995), zeigten auch kein Signal mit der *motA*-Sonde. Desweiteren hybridisierte bei *L. bozemanii* eine schwache Bande bei 9,0 kb und bei *L. feelei* (SG1) ebenfalls schwach eine vermutlich unspezifische Bande bei ca. 15 kb. Bei diesen zwei Stämmen konnte zwar unter niedrigen Stringenz-Bedingungen ein Signal mit der *flaA*-Sonde detektiert werden, sie bilden aber dennoch keine intakte Flagelle aus, wie elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten (Heuner, 1997).

Tabelle 9: Southernblot-Analyse verschiedener *Legionella*-Stämme. Die chromosomale DNA wurde mit dem Enzym *PstI* verdaut und mit einer *motA*-spezifischen Sonde bei niedriger Stringenz hybridisiert.

Stamm	Sero- gruppe	Signal- stärke*	Fragment- größe (kb)
<i>Legionella pneumophila</i> -Stämme			
<i>L. pneumophila</i> AA100	1	++	3,6
<i>L. pneumophila</i> Corby	1	++	3,6
<i>L. pneumophila</i> Bloomington	3	++	3,6
<i>L. pneumophila</i> Chicago 2	6	++	3,6
<i>L. pneumophila</i> Los Angeles	4	++	3,6;2,0
<i>L. pneumophila</i> Philadelphia	1	++	3,6
<i>L. pneumophila</i> 640	5	++	3,6
<i>L. pneumophila</i> 664	6	++	3,6
<i>L. pneumophila</i> U21	6	++	3,6
<i>L. pneumophila</i> U22	3	++	3,6
<i>L. pneumophila</i> U40	1	++	3,6
Nicht- <i>pneumophila</i> -Stämme			
<i>Legionella anisa</i>		-	-
<i>Legionella bozemanii</i>		(+)	9,2
<i>Legionella erythra</i>		-	-
<i>Legionella feelei</i>	1	-	-
<i>Legionella feelei</i>	2	(+)?	15,0
<i>Legionella gormanii</i>		+	3,4
<i>Legionella israeliensis</i>		-	-
<i>Legionella jordanis</i>		+	2,9
<i>Legionella longbeachae</i>	1	-	-
<i>Legionella oakridgensis</i>		-	-

* ++ starkes Signal; + Signal; (+) schwaches Signal; - kein Signal

4.3.3. Zusammenfassung

Bei der Bestimmung der Nukleotidsequenz des Genbank-Cosmids 12/44 konnte im 3'-Bereich von *motA* die komplette Sequenz des *motB*-Gens ermittelt werden. Anschließend folgt ein kurzer ORF ohne nennenswerte Homologien. Außerdem wurde noch ein ORF (*prfB*) identifiziert, dessen Genprodukt Ähnlichkeiten mit einem „peptide chain release factor“ hat. „Upstream“ von *motA* konnte das bereits sequenzierte *fliA*, sowie die putativen Flagellenregulationsgene *motR* und *flhF* gefunden werden.

Eine Southernblot-Analyse zum Vorkommen von *motA* bei verschiedenen *Legionella*-Stämmen ergab, dass das *motA*-Gen nur in einer einzigen Kopie im Chromosom vorliegt. Es zeigte sich ein sehr einheitliches Bild für die *L. pneumophila* Stämme mit einem jeweils gleich großen Hybridisierungssignal. Bei den nicht-*pneumophila* Stämmen konnte hingegen nicht überall ein Signal detektiert werden, außerdem variierte die Größe stärker.

4.4. Konstruktion und Charakterisierung einer *motA*-negativen Mutante

4.4.1. Herstellung *motA*-negativer Mutanten von *L. pneumophila* Corby

Für die Herstellung *motA*-negativer Mutanten sollte im Chromosom von *L. pneumophila* Corby das *motA*-Gen spezifisch durch ein *motA*::Km^R-Kassetten Konstrukt ausgetauscht werden. Das entsprechende Klonierungsschema ist in Abbildung 23 (I.) dargestellt. Zuerst wurde das Plasmid pDK19, welches von Dagmar Kapfhammer (Würzburg) während ihrer Diplomarbeit hergestellt worden war, mit dem Restriktionsenzym *NruI* behandelt. Dieses Enzym schneidet in dem Vektor einmal, nämlich 503 bp nach dem Beginn des *motA*-Startcodons, und hinterlässt eine Schnittstelle mit glatten Enden. Daraufhin wurde eine durch Behandlung mit dem Restriktionsenzym *StuI* (erzeugt ebenfalls glatte Enden) generierte Kanamycin^R-Kassette aus dem Vektor pACYC (auf Anzuchtbedingungen achten!) in die entsprechende Stelle des *motA*-Gens ligiert (Konstrukt pCD11). Dadurch wird das *motA*-Gen um 1300 bp länger und ist nicht mehr funktionell. Durch Umklonieren nach Verdau mit *SacI/SacII* in die „Suicide“-Vektoren pBOC20 und pCVD442, welche beide ein Gen für eine Levansucrase (*sacB*) sowie für eine Chloramphenicol-Resistenz (*cat*) tragen, entstanden die für die Transformation verwendeten Plasmide pCD12 und pCD13.

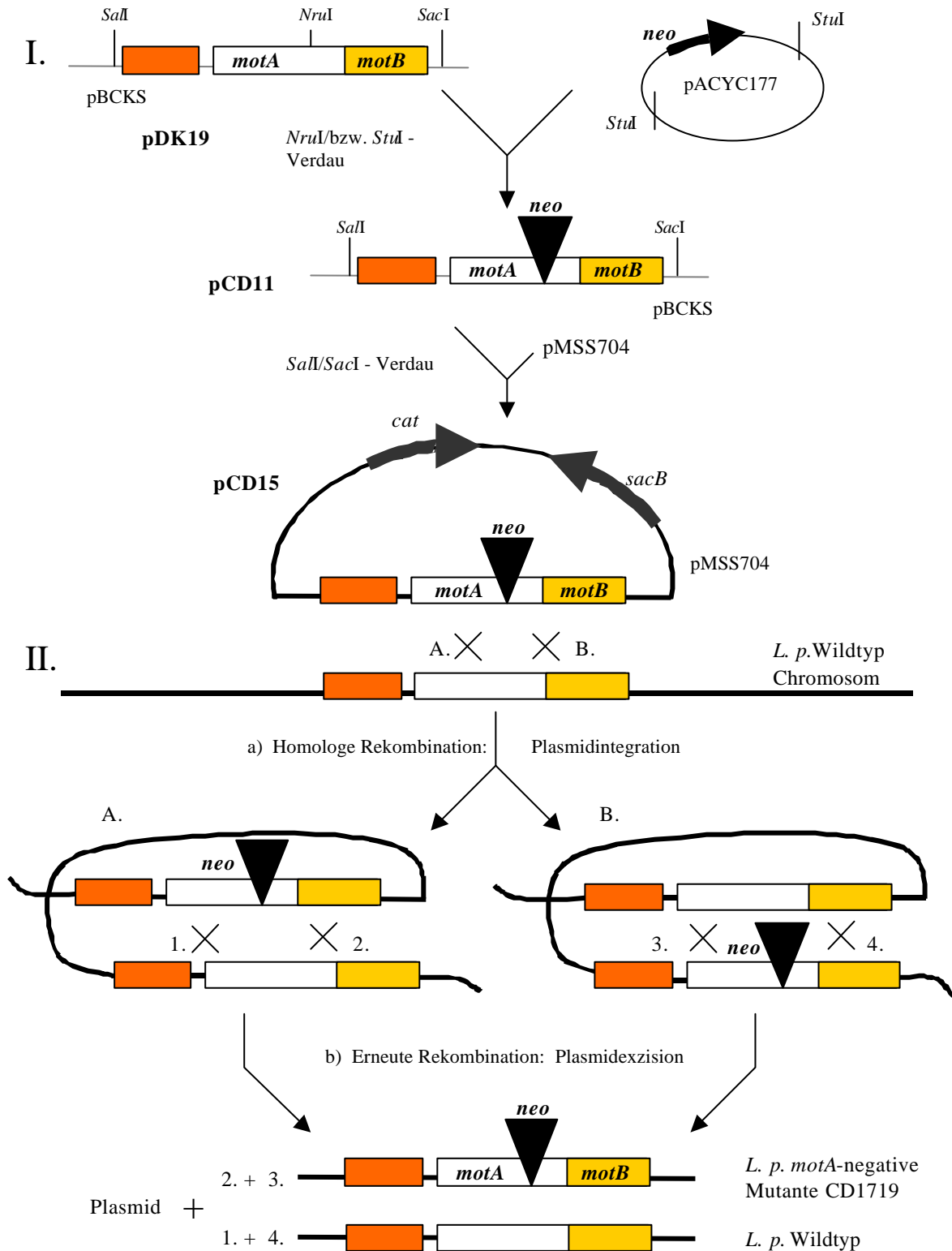


Abb.23: Konstruktion spezifischer *motA*-negativer Mutanten von *L. pneumophila* Corby.

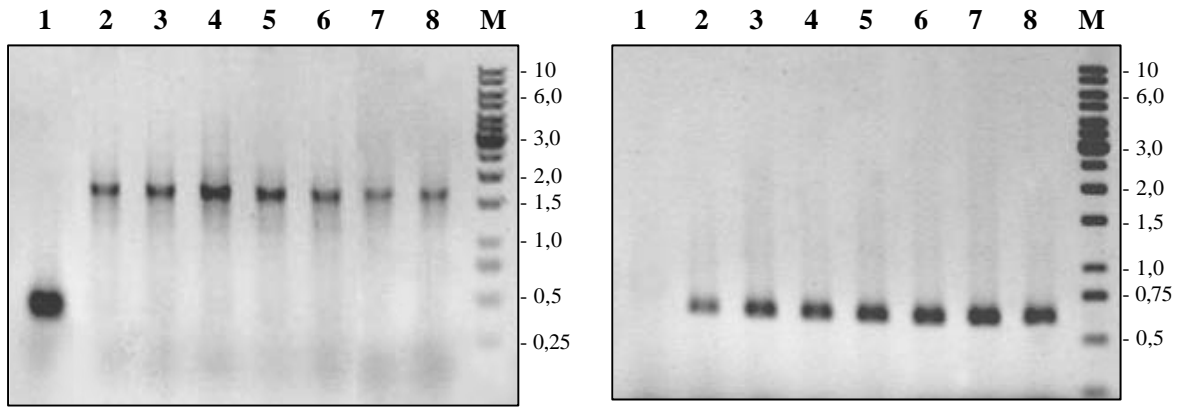
I. Klonierungsschema des Plasmids (pCD15) für den Allelaustausch des *motA*-Gens.

II. Chromosomale Integration der Kanamycin-Kassette durch zweifache homologe Rekombination (Doppelcrossover). Zuerst wird in einem ersten Rekombinationsereignis (a) das Plasmid integriert (Möglichkeiten A. und B.). Dann wird in einem zweiten Rekombinationsschritt (b) das Plasmid wieder exzidiert (Möglichkeiten 1. bis 4.), wobei entweder der wildtypische Zustand oder die gewünschte Mutation in *motA* erhalten wird.

Um dieses *motA::Km^R* Konstrukt gegen das intakte *motA*-Gen auszutauschen und so eine stabile *motA*-negative Mutante zu erhalten, sollte im folgenden das Ereignis der homologen Rekombination ausgenutzt werden. Es wurden beide Plasmide zur Transformation von *L. pneumophila* Corby verwendet. Der Vektor pBOC20 kann sich im Gegensatz zu dem Vektor pCVD442 selbständig in den Legionellen replizieren. Durch Selektion auf Kanamycin-haltigen BCYE-Agarplatten gelang es nur nach Elektroporation des Plasmids pCD12 (Derivat des pBOC20 Vektors), Klone anzuzüchten, welche den Vektor besaßen. Die entsprechenden Klone waren durch die Chloramphenicol-Resistenz außerdem auch gegen dieses Antibiotikum resistent, sowie durch das *sacB*-Gen Sucrose-sensitiv. In einem zweiten Schritt wurde nun durch Anzucht des plasmidhaltigen Stamms CD17 ohne Selektionsmedium versucht, das gewünschte Doppelcrossover-Ereignis zu erzielen (siehe Abb. 23, II.). Nach 12 h Wachstum bei Raumtemperatur und anschließendem 12-stündigem Schütteln bei 37°C in AYE-Medium hatten die meisten Bakterien das Plasmid wieder verloren. Durch Ausplattieren auf Km- und Sucrose-haltigen BCYE-Agarplatten wurden jedoch 16 resistente Klone selektioniert, die im folgenden auf ihren Genotyp hin untersucht wurden.

4.4.2. Genotypische Überprüfung der potentiellen *motA*-Mutanten

Die erhaltenen Klone wurden zunächst mittels PCR-Analyse auf das Vorhandensein des mutagenisierten *motA::Km^R*-Konstrukts überprüft. Dazu wurden die Primerpaare *motR5* und *motU7*, sowie *Kauni1Sq* und *motU7* verwendet. Mit dem ersten Primerpaar, welches jeweils „upstream“ und „downstream“ von der *NruI*-Schnittstelle bindet, wird beim Wildtyp eine Bande von 340 kb amplifiziert, wie in Abbildung 24 A, Spur 1 zu sehen. Bei den potentiellen Mutanten wird diese Bande jedoch durch die integrierte Kanamycin-Kassette von 1300 bp auf eine Höhe von 1640 bp verschoben (Spuren 2-10). Zum Nachweis, dass das größere Fragment auch tatsächlich durch den Einbau der Kassette zustande kommt, wurde in einer zweiten PCR der Primer *motU7* mit dem Primer *Kauni1Sq* kombiniert, der in der Kanamycin^R-Kassette bindet. Wie zu erwarten, wird beim Wildtyp (Abb. 24 B, Spur 1) überhaupt kein Fragment amplifiziert, wohingegen bei den putativen *motA*-Mutanten eine deutliche Bande bei 600 bp zu sehen ist.

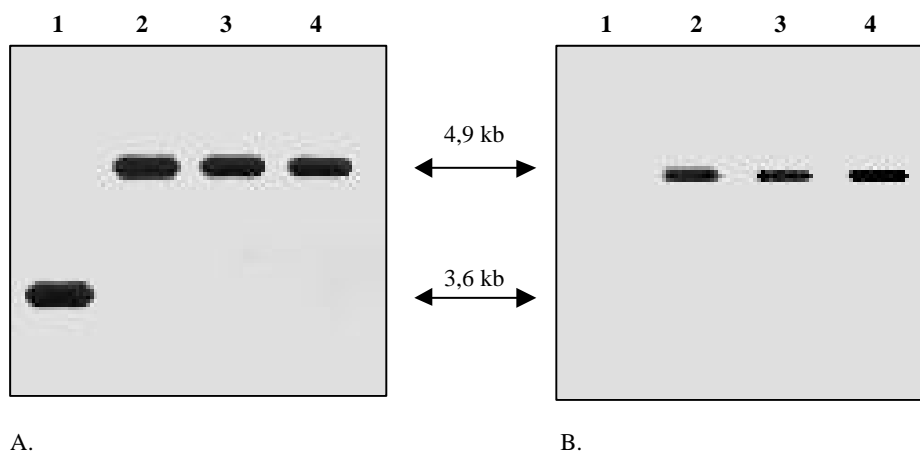


A.

B.

Abb. 24: PCR-Analyse einiger potentieller Klone zur Überprüfung des Allelaustauschs mit den Primern motU7/motR5 (A.) und motU7/Kauni1Sq (B.). Spuren: 1 (Wildtyp); 2 (Klon 11); 3 (Klon 12); 4 (Klon 16); 5 (Klon 17); 6 (Klon 18); 7 (Klon 19); 8 (Klon 20).

Für die anschließende Southernblot-Analyse wurden die drei Mutanten 17/11, 17/16 und 17/19 ausgewählt, um diese weiter zu charakterisieren. Nach Isolierung der chromosomalen DNA wurde diese über Nacht mit dem Restriktionsenzym *Pst*I gespalten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Der Blot wurde sowohl mit einer *motA*-spezifischen Sonde (900 bp Fragment, amplifiziert mit den Primern motU7 und MotA1, danach *Pst*I verdaut) als auch einer Km^R -spezifischen Sonde (1300 bp Fragment, mit *Stu*I aus dem Vektor pACYC geschnitten) inkubiert. Hybridisiert man mit der *motA*-Sonde, so erhält man beim Wildtyp (Abb. 25 A, Spur 1) eine Bande von 3,6 kb, wohingegen bei den drei Mutanten (Spuren 2 - 4) die Bande durch die Integration der Kassetten um 1300 bp größer ist. Das gleiche Signal auf einer Höhe von 4,9 kb bekommt man auch nach Hybridisierung mit der Km^R -Sonde wohingegen dann beim Wildtyp kein Signal zu detektieren ist (Abb. 25 B).



A.

B.

Abb. 25: Southernblot-Analyse des Wildtyps von *L. pneumophila* Corby und drei potentieller *motA*-Mutanten. Die chromosomale DNA wurde mit dem Enzym *Pst*I behandelt und mit einer *motA*-Sonde (A.) und einer Km^R -spezifischen Sonde (B.) hybridisiert. Spuren: 1 (Wildtyp); 2 (Klon 1719); 3 (Klon 1716); 4 (Klon 1711).

4.4.3. Bestimmung des Phänotyps

4.4.3.1. Lichtmikroskopie

Mit Hilfe der Lichtmikroskopie wurde die Fähigkeit der *motA*-Mutanten 17/11 und 17/19 überprüft, gerichtete Strecken zurückzulegen. Dazu wurden als Positivkontrolle der Wildtyp sowie die *flaA*-Komplementante CD10 verwendet, als Negativkontrolle die *flaA*-Mutante KH3. Von allen Stämmen wurden Übernachtskulturen in AYE-Medium mit der gleichen OD₆₀₀ angelegt, und nach Eintritt in die stationäre Phase wurde lichtmikroskopisch bei einer Vergrößerung von 40 x im inversen Mikroskop das „Schwimmverhalten“ untersucht.

Während beim Wildtyp und dem Stamm CD10 über 50 % aller beobachteten Bakterien ein schnelles und gerichtetes Schwimmen zeigten, vermochten dies bei den beiden Mutanten höchstens noch 1 %. Die *flaA*-Mutante zeigte überhaupt keine Fähigkeit mehr, sich gerichtet fortzubewegen.

4.4.3.2. Untersuchungen zum Flagellenaufbau

Um auszuschließen, dass die Unfähigkeit zur Fortbewegung der *motA*-Mutanten daher rührt, dass aufgrund einer gestörten Regulationskaskade keine Flagelle mehr gebildet werden kann, wurde untersucht, ob es in diesen Stämmen noch zu einer Expression des *flaA*-Gens kommt. Dazu wurden nach Anzucht der *Legionella*-Stämme in AYE-Medium bis zur frühen stationären Phase gleiche Mengen an Bakteriengesamtlysat auf ein SDS-Gel aufgetragen, anschließend auf eine Membran transferiert und mit einem Anti-Flagellin-Antiserum entwickelt.

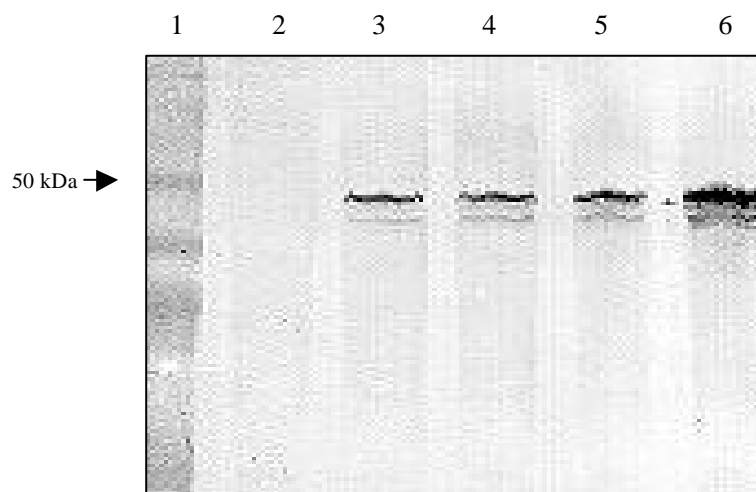


Abb. 26: Westernblot-Analyse verschiedener *L. pneumophila* Stämme mit einem Anti-Flagellin-Antiserum. Es wurden Gesamtzelllysate von Bakterien aus der frühen stationären Phase aufgetragen. Spuren: 1 (Marker); 2 (KH3); 3 (CD1711); 4 (CD1716); 5 (CD1719); 6 (Wildtyp).

In Abbildung 26 ist zu sehen, dass es bei den drei *motA*-Mutanten 17/11, 17/16 und 17/19 (Spuren 3-5) weiterhin, jedoch in geringfügig schwächerer Ausprägung als beim Wildtyp (Spur 6), zur Bildung des FlaA-Proteins kommt, wohingegen bei der *flaA*-Mutante (Spur 1) als Negativkontrolle überhaupt keine Bande detektiert wird.

Außerdem wurde auch mittels Elektronenmikroskopie das Vermögen der Mutanten untersucht, eine intakte Flagelle zu bilden. Es konnte eine normale Flagellierung beobachtet werden (Abb. 27), allerdings verglichen mit dem Wildtyp nur etwa bei der Hälfte der Bakterien.

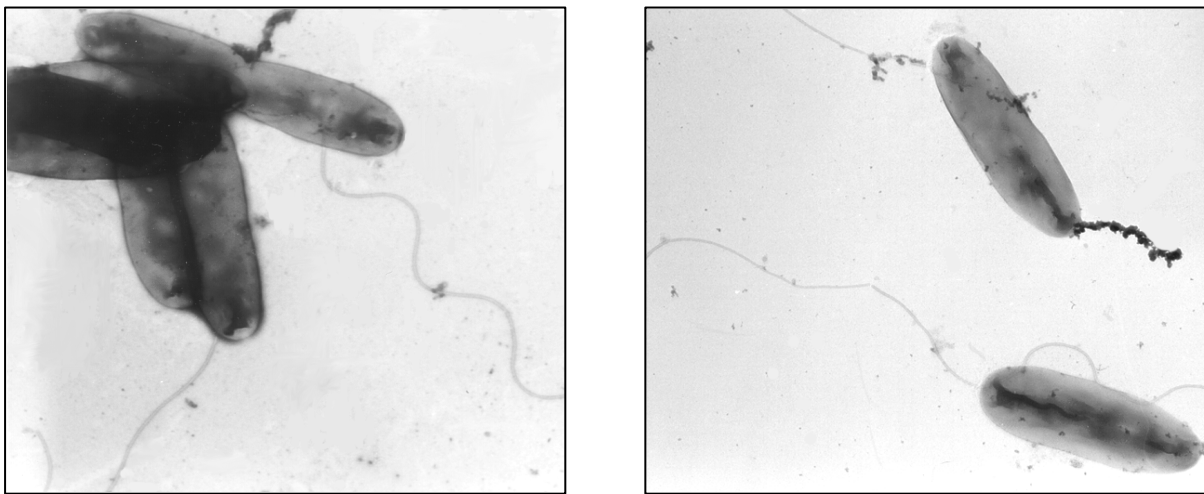


Abb. 27: Elektronenmikroskopische Aufnahmen *motA*-negativer Mutanten. Die Bakterien wurden in AYE-Medium bis zur frühen stationären Phase angezogen, auf EM-Grids aufgebracht, mit 2 % Uranylacetat kontrastiert und im EM10 betrachtet und fotografiert.

4.4.3.3. Verhalten der *motA*-Mutante in Zellkulturassays

Auch die *motA*-Mutante wurde hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Adhärenz, Invasion und intrazellulären Vermehrung im Zellkultursystem im Vergleich zum Wildtyp getestet. Abbildung 28 zeigt das Adhärenzverhalten der beiden Stämme an *Acanthamoeba castellanii*. Ähnlich wie bei der *flaA*-Mutante wurde ohne Zentrifugation der Bakterien für die *motA*-Mutante eine geringere Anzahl (Faktor 5-10) zellassoziierter Bakterien beobachtet als für den Wildtyp (Abb. 28 A). Der Unterschied zwischen den beiden Stämmen verschwindet jedoch völlig, wenn man den Motilitätsdefekt der Mutanten durch Aufzentrifugieren künstlich aufhebt (Abb. 28 B).

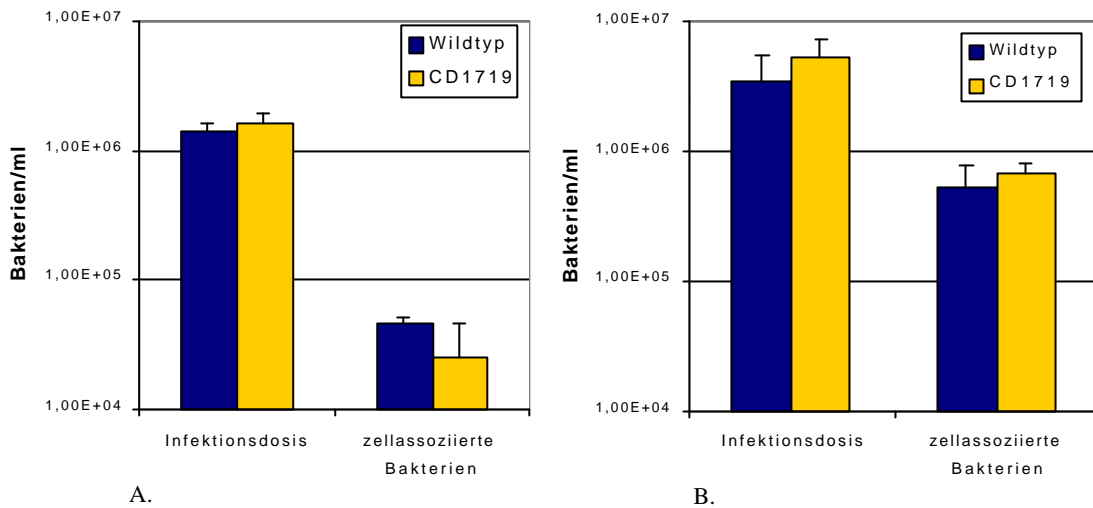


Abb. 28: Adhärenzassays mit *A. castellanii*. Dargestellt ist die Infektionsdosis, sowie die Zahl an zellassozierten Bakterien (Wildtyp und *motA*-Mutante CD1719) ohne (A.) und mit Aufzentrifugieren bei 800 g (B.) nach 20 minütiger Inkubation und anschließendem dreimaligen Waschen. Abgebildet sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung.

Als nächstes wurde untersucht, inwieweit die *motA*-Mutante in der Lage ist, ihre Wirtszellen zu invadieren (Abb. 29). Zu Beginn der Infektion findet man im Vergleich deutlich weniger nicht-motile Bakterien in den Zellen. Bei Amöben ist dieses Phänomen weniger ausgeprägt als bei den Makrophagen-ähnlichen Zellen. Nach 120 min sind hier beispielsweise ca. fünf mal weniger intrazelluläre Bakterien nachzuweisen (Abb. 29 A), im Vergleich zu einer etwa 30-fach geringeren Anzahl *motA*-negativer Mutanten in den HL-60 Zellen (Abb. 29 B). Es zeigte sich also ein ähnliches Verhalten wie bei der *flaA*-Mutante, allerdings lagen die Zahlen an intrazellulären Bakterien insgesamt etwas höher.

Außerdem wurde die Fähigkeit der *motA*-Mutante zur intrazellulären Vermehrung in den beiden Wirtszellsystemen untersucht. Dazu wurden die Zellen mit einer MOI von 0,01 Bakterien/Wirtszelle infiziert und über vier Tage hinweg die Anzahl der vorhandenen Legionellen durch Ausplattieren bestimmt. In *A. castellanii* ist die Vermehrungsrate der *motA*-Mutante vergleichbar mit der des Wildtyps. Für beide Stämme findet man eine Multiplikationsrate von etwa 60 - 70.000 nach 96 h (Abb. 30 A). In HL-60 Zellen (Abb. 30 B) jedoch ist die Gesamt-Vermehrungsrate der *motA*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp nach vier Tagen fast um den Faktor 10 reduziert. Während der Wildtyp seine Bakterienanzahl um das 620-fache gesteigert hat, konnte das die *motA*-Mutante nur um das 70-fache. Die Motilität scheint also einen deutlichen Einfluss auf die Infektionsrate und Ausbreitung der Legionellen in diesem Wirtszellsystem zu haben, auch wenn die Attenuierung wiederum nicht ganz so stark ausfällt wie bei der *flaA*-Mutante.

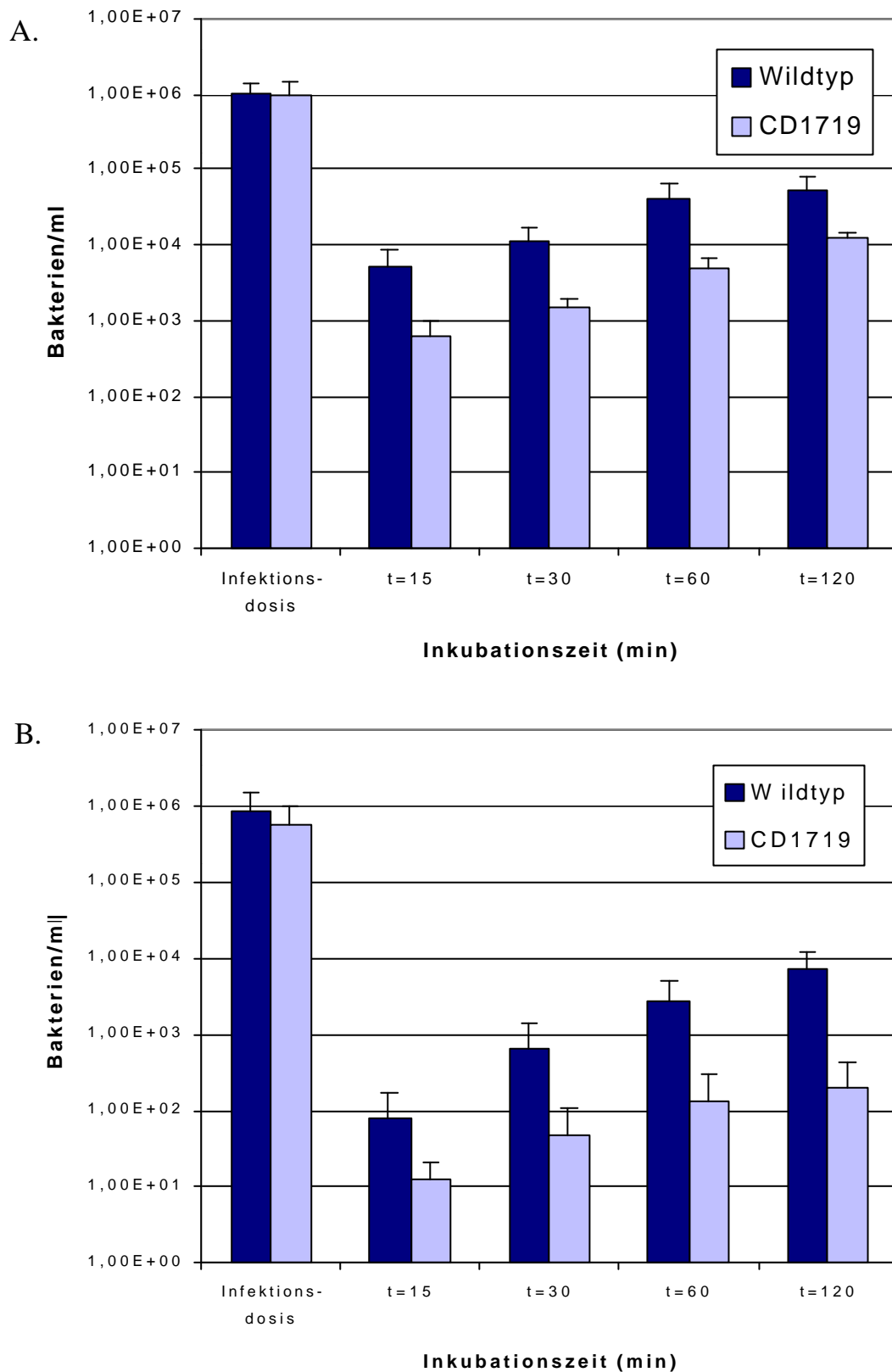


Abb. 29: Invasionseffizienz von Wildtyp und *motA*-Mutante zu Beginn einer Infektion in *A. castellanii* (A.) und HL-60 Zellen (B.). Dargestellt ist die Anzahl intrazellulärer Bakterien nach einer Inkubationszeit von 15, 30, 60 und 120 min mit anschließender einstündiger Gentamicin-Behandlung. Abgebildet sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung.

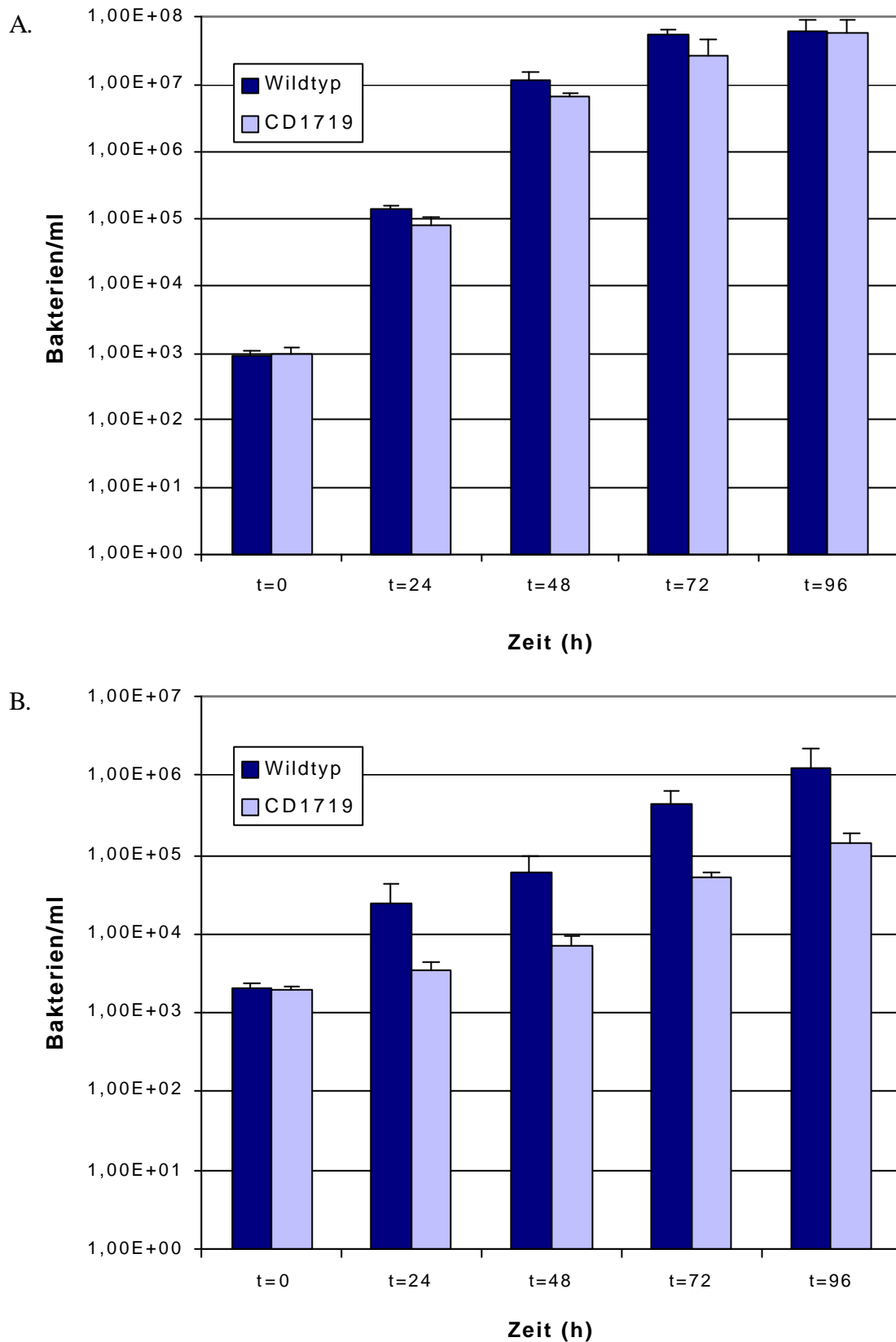


Abb. 30: Wachstumsassay in *A. castellanii* (A.) und HL-60 Zellen (B.). Die Wirtszellen wurden mit einer MOI von 0,01 infiziert. Alle 24 h wurden Aliquots lysiert und zweifach ausplattiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung.

Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich der Zytotoxizität der beiden *flaA*-Mutanten KH1 und KH3 wurde auch für die *motA*-Mutante die Zytotoxizität gegenüber Amöben untersucht. (Abb. 31). Es konnte nur nach 24 h eine leicht erhöhte Anzahl an intakten Amöben beobachtet werden, nach 48 h war bereits kein Unterschied zum Wildtyp mehr zu sehen, womit gezeigt werden konnte, dass entgegen der ersten vorläufigen Annahme die Motilität auf die Wirtszelllyse keinen großen Einfluss hat.

Im Makrophagen-System beobachtet man ebenso wie bei der Mutante KH3 eine leichte Verringerung der Zytotoxizität, welche höchstwahrscheinlich auf die verminderte Wachstumsrate der *motA*-Mutante in HL-60 Zellen oder Monozyten zurückzuführen ist (Daten nicht gezeigt).

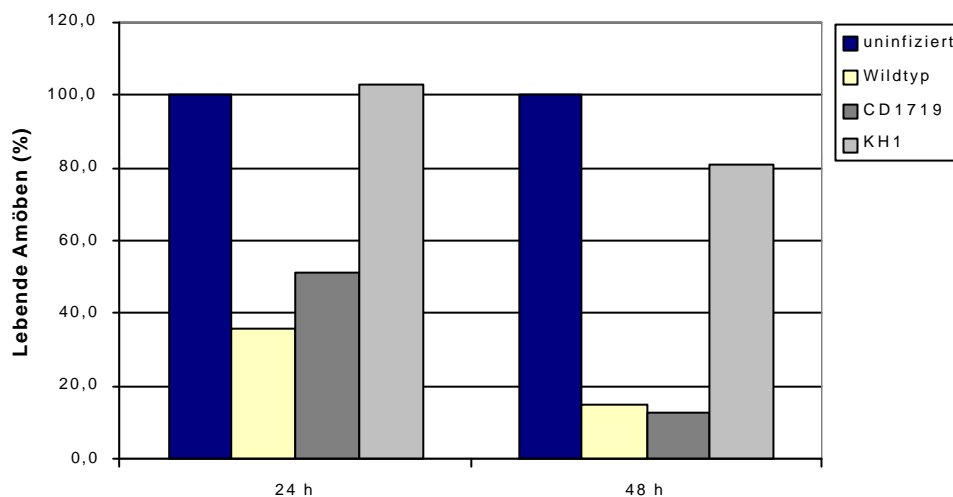


Abb. 31: Zytotoxizitätsassay mit *A. castellanii*. Die Amöben wurden mit einer MOI von 1 infiziert. Nach 24 h und nach 48 h wurde die Anzahl der noch intakten Amöben mittels Trypan-Blau Färbung im Mikroskop bestimmt und ins prozentuale Verhältnis zur uninfizierten Kontrolle gesetzt.

4.4.4. Komplementationsstrategien

4.4.4.1. *In trans* Komplementation mit den Genen *motA/motB*

Die Komplementation der *motA*-Mutante wurde zunächst *in trans* versucht. Dazu wurden die Gene *motA* und *motB* mit den Primern MotA1 und MotB2 (Primerbindungsstellen vgl. Abb. 32) aus chromosomaler DNA von *L. pneumophila* Corby mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pGEM-TEasy kloniert (pmot1). Umklonieren des Fragments nach Verdau mit *SacI/SacII* in den Vektor pBC ergab Vektor pmot2. Dieser Vektor wurde durch Elektroporation in die Mutanten eingebracht und das Vorhandensein mittels PCR überprüft. Entsprechende Klone wurden in

Übernachtskulturen bis zur stationären Phase angezogen und lichtmikroskopisch auf das Vorhandensein von motilen Bakterien überprüft. Als Positivkontrolle diente der Wildtyp, als Negativkontrolle die Mutante ohne Plasmid. Es konnte in keinem der Fälle eine Komplementation beobachtet werden.

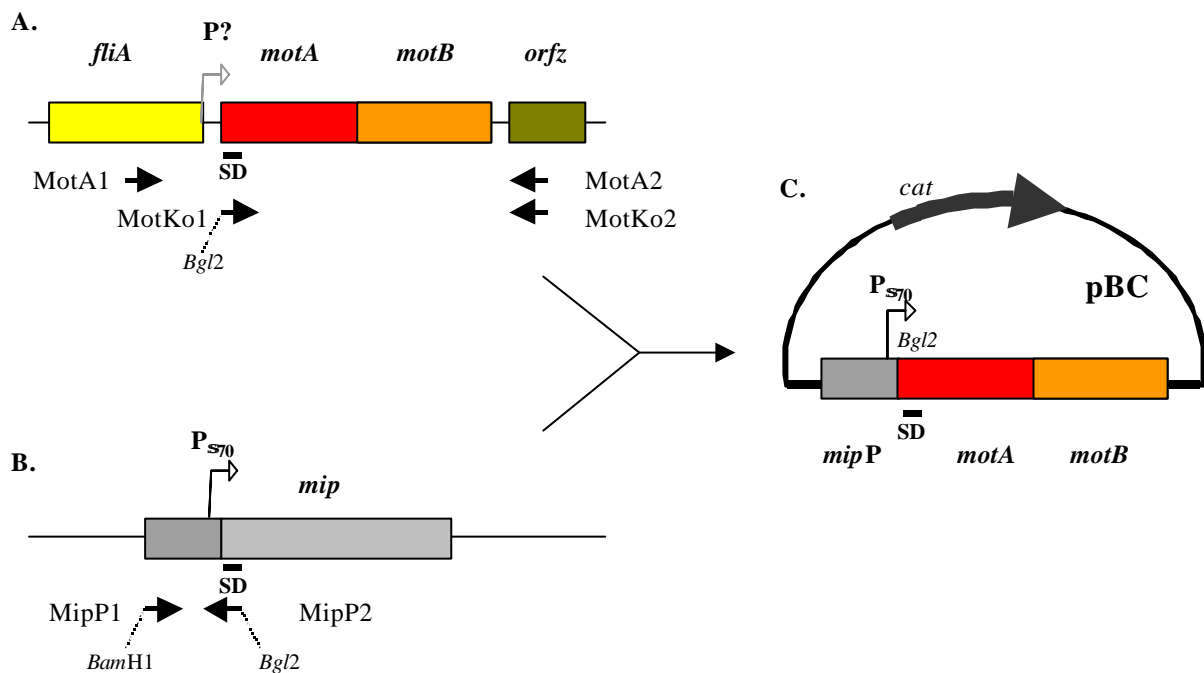


Abb. 32: Schema für die Klonierung von Konstrukten zur Komplementation der *motA*-Mutante. Dargestellt sind die Primerbindungsstellen (Pfeile) zur Amplifikation der Gene *motA* und *motB* (A.), zur Amplifikation des *mip*-Promotorbereichs (B.), sowie das fertige Konstrukt pCD19 (C.). Abkürzungen: SD (Shine-Dalgarno-Sequenz); P (Promotor); ? (putativ); cat (Chloramphenicol-Resistenzgen).

4.4.4.2. *In trans* Komplementation durch Fusion des *mip*-Promotors vor die Gene *motA/motB*

Da nicht bekannt ist, ob die vermutete σ^{70} -ähnliche Promotorsequenz vor dem *motA*-Gen auch tatsächlich funktionell ist (Kapfhammer, 1998) und die nicht geglückte Komplementation womöglich auf die fehlende Transkription des *motAB* Operons zurückzuführen war, sollte ein konstitutiver *Legionella*-Promotor vor die beiden Gene kloniert werden. Rolf Köhler (Würzburg) konnte in seiner Doktorarbeit durch Fusion mit dem Reporter-gen „green fluorescent protein“ (*gfp*) zeigen, dass der Promotor des *mip*-Gens diese Anforderung erfüllt. Daher wurden mit den Primern MipP1 und MipP2 aus chromosomaler DNA von *L. pneumophila* Corby der *mip*-Promotor (408 bp) mit

passenden Schnittstellen amplifiziert, in pGEM-TEasy kloniert (pCD16) und dann durch *SacI/SacII* Verdau in den Vektor pBC umkloniert (pCD17). Auch die Gene *motA* und *motB* wurden wiederum durch PCR mit den entsprechenden Schnittstellen (Primer MotKo1 und MotKo2) amplifiziert und kloniert (pCD18). Als letzter Schritt wurden aus diesem Konstrukt das *motAB*-Fragment durch Behandlung mit den Restriktionsenzymen *BamHI/BglIII* ausgeschnitten und in den ebenso behandelten Vektor pCD17 kloniert. Dadurch wurde die Shine-Dalgarno-Sequenz des *motA*-Gens direkt hinter den *mip*-Promotor kloniert (Konstrukt pCD19). Für das Klonierungsschema und die verwendeten Primer vgl. Abbildung 32. Jedoch war nach Transformation in die Mutanten auch mit diesem Plasmid keine funktionelle Komplementation möglich. Da keine Anti-MotA-Antikörper vorhanden waren, konnte dabei nicht überprüft werden, ob es wenigstens zu einer Expression des *motA*-Proteins kam und nur der anschließende Einbau in den Flagellen-Apparat gestört war, oder ob überhaupt kein MotA-Protein gebildet wurde.

4.4.4.3. Komplementation durch chromosomale Integration

Da durch *in trans* Klonierung keine Komplementation der *motA*-Mutanten gelungen war, sollte versucht werden, den intakten *motA/B*-Lokus durch homologe Rekombination wieder in das Genom zu integrieren. Dazu wurden die Gene *motA* und *motB* aus dem Plasmid p $mot1$ durch Restriktionsspaltung mit dem Enzym *SalI* in den „Suicide“-Vektor pMSS704 kloniert, der bereits für die Komplementation der *flaA*-Mutante verwendet worden war (Plasmid pCD20). Insgesamt wurde das Plasmid pCD20 in acht unabhängigen Ansätzen in die *motA*-Mutante elektroporiert. Dabei konnten 208 Chloramphenicol-resistente Klone gepickt werden. Diese hatten jedoch in keinem Fall den kompletten *motA/B*-Lokus integriert. Zum Teil handelte es sich um spontan resistent gewordene Klone, bei vielen konnte ein verkürztes Gen durch PCR nachgewiesen werden. Auch ein Southern Blot mit 4 resistenten Mutanten zeigte, dass trotz Rearrangement des Chromosoms nicht das gewünschte Ereignis eingetreten war (Daten nicht gezeigt).

4.4.5. Zusammenfassung

Durch Insertion einer Kanamycin^R-Kassette in das *motA*-Gen von *L. pneumophila* Corby mittels homologer Rekombination gelang es, definierte *motA*-negative Mutanten herzustellen. Diese Mutanten sind unter dem Lichtmikroskop betrachtet nicht mehr motil. Sie exprimieren jedoch noch

Flagellin und bauen dieses zu einer intakten Flagelle zusammen, wie mittels Westernblot-Analyse und Elektronenmikroskopie gezeigt wurde. Jedoch gelang es nicht, die Mutanten durch Einbringen der Gene *motA* und *motB* auf einem Plasmid zu komplementieren. Experimente mit den Wirtszellen *A. castellanii* und HL-60 Zellen zeigten hinsichtlich Adhärenz, Invasion, Vermehrung und Zytotoxizität für die *motA*-Mutante CD1719 ein ähnliches Verhalten wie für die *flaA*-Mutante KH3.

4.5. Untersuchungen zu Flagellen-Regulationsgenen

4.5.1. Klonierung eines Konstrukts zur Mutagenisierung von *fliA*

Um den Einfluss des σ^{28} -Faktors *fliA* auf die Flagellenbildung, sowie möglicherweise auch auf andere unbekannte Virulenzgene besser untersuchen zu können, wäre es von Vorteil, eine chromosomale *fliA*-Mutante herzustellen. Dazu sollte ein Konstrukt kloniert werden, welches für die Mutagenisierung eingesetzt werden kann. Die einzelnen Klonierungsschritte sind in Abbildung 33 dargestellt.

Zuerst wurde mittels PCR der „upstream“-Bereich und der Beginn des *fliA*-Gens mit den Primern ylxSal1 und fli5Spe3, sowie die Endsequenz von *fliA* und der „downstream“-Bereich mit den Primern fli3SpeI und motSph1 amplifiziert und in den Vektor pGEM-TEasy kloniert. (Konstrukte pCD25, bzw. pCD30). Durch Verdau mit *SpeI/NotI* wurde das Fragment aus pCD30 („downstream“-Bereich) in den Vektor pBC umklont (pCD31) und daraufhin wurde in dieses Konstrukt über *Sall/SpeI* Verdau auch der „upstream“-Bereich aus pCD25 kloniert. Dies ergab den Vektor pCD32. Aus dem Vektor pACYC177 wurde über entsprechende Primer (KaEcoRV und KaSpeI) die Kanamycin^R-Kassette amplifiziert und ebenfalls in den Vektor pGEM-TEasy kloniert (pCD29). Hieraus konnte das Kanamycin-Resistenzgen mit den Enzymen *EcoRV* und *SpeI* ausgeschnitten werden. Die entstandenen überhängenden Basen wurden durch Behandlung mit Klenow-Enzym aufgefüllt. Auch mit dem Plasmid pCD32 wurde nach der Spaltung mit *SpeI* eine Klenow-Reaktion durchgeführt. Somit konnte in die Schnittstelle von Plasmid pCD32 die Kanamycin-Kassette inkloniert werden (Plasmid pCD33). Durch Umklontieren mit *Sall/SphI* in den Vektor pCVD442 wurde schließlich das Konstrukt pCD35 hergestellt. Es entstand also eine *fliA::Km^R* Genfusion, bei der 430 bp aus dem wildtypischen *fliA* deletiert und durch eine Km^R-Kassette ersetzt wurden.

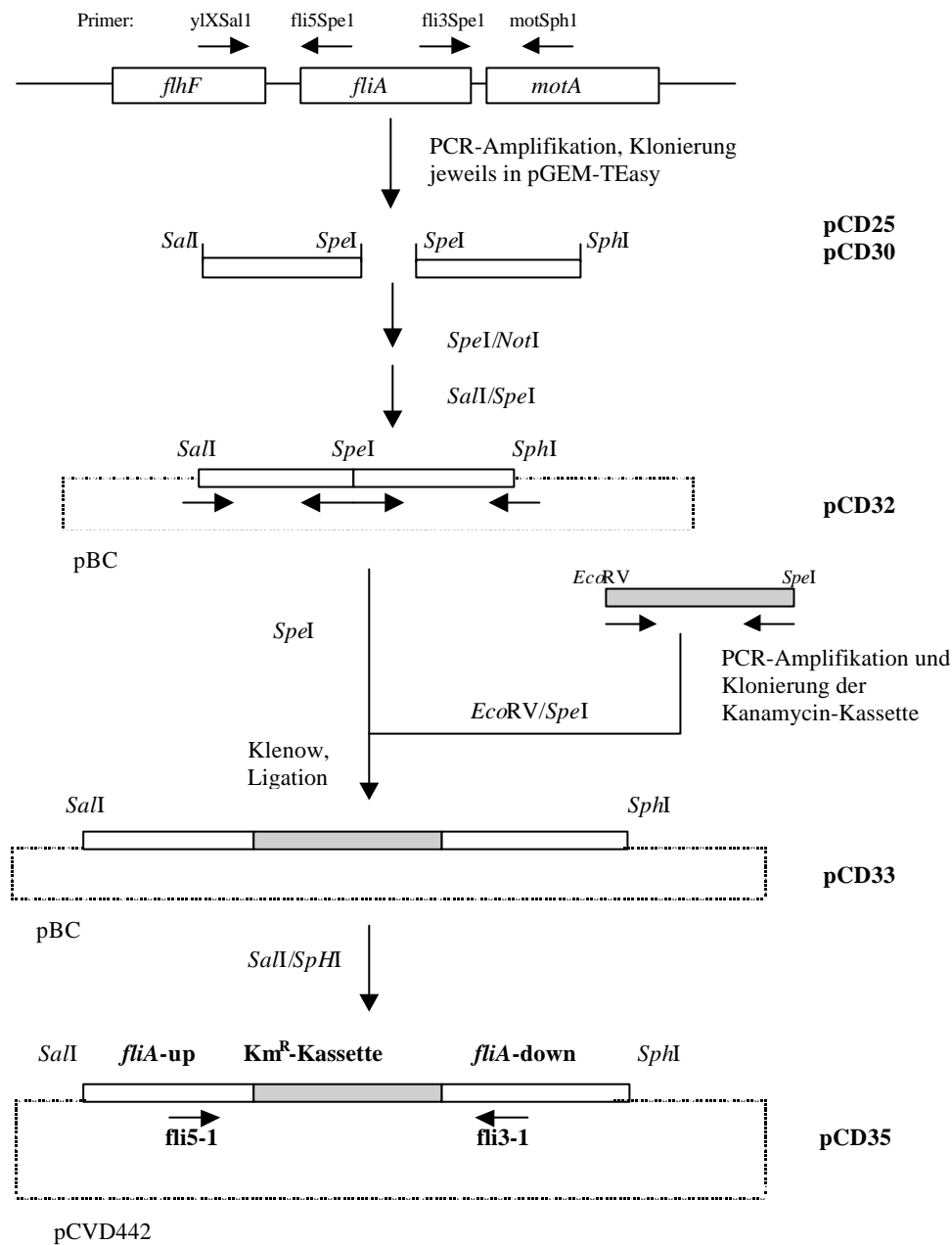


Abb. 33: Schema für die Klonierung eines Konstrukts zur Herstellung einer *fliA*-Mutante. Dargestellt sind die Primerbindungsstellen (Pfeile), die klonierten Genfragmente (weiße Balken), die Km^R-Kassette (schraffierter Balken) sowie die eingebauten Restriktionsenzym-Schnittstellen.

Dieses Konstrukt kann nun für die Mutagenisierung von *L. pneumophila* Corby mittels Elektroporation oder Konjugation eingesetzt werden. Eine Überprüfung der Klone ist möglich durch Einsatz der Primer *fli5-1* und *fli3-1*, die up- und downstream von der Kassette binden, oder durch Verwendung des Primers *fli5-2* (in Kombination mit *fli3-1*), welcher nur in dem deletierten Bereich binden kann.

Möglicherweise ist jedoch eine völlige Deletion des *fliA*-Gens eine zu starke Beeinträchtigung der Überlebensfähigkeit der Legionellen und somit eventuell letal. Das muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

4.5.2. Verbreitung des Transkriptionsregulators *flaR* in der Gattung *Legionella*

Klaus Heuner hatte in seiner Doktorarbeit bei der Suche nach Faktoren, die die Expression einer *flaA*-Promotor-*luxAB*-Fusion reduzieren, ein Gen identifiziert, welches Homologien zu der Familie der *lysR*-Transkriptionsregulatorgenen (LTTR-Familie) aufwies. In folgenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass das Genprodukt von 302 AS ein DNA-Bindeprotein ist, welches an seinen eigenen Promotor und in etwas schwächerem Maß auch an den *flaA*-Promotor binden kann (Heuner et al., 2000).

Wegen der Bedeutung, die dieser Transkriptionsregulator auf die *flaA*-Expression und möglicherweise auch noch auf andere virulenzrelevante Gene haben könnte, sollte ein „Screening“ verschiedener *Legionella*-Stämme auf das Vorkommen von *flaR* durchgeführt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Ein *flaR*-homologes Gen konnte bei allen 14 *L. pneumophila* Stämmen gefunden werden, nicht jedoch bei den 12 getesteten nicht-*pneumophila* Stämmen. Es handelt sich also vermutlich bei FlaR um einen *L. pneumophila* spezifischen Faktor.

„Upstream“ von *flaR* wurde auf dem Gegenstrang noch ein weiterer ORF (ORF234) identifiziert, welcher für ein 234 AS großes Protein kodiert, der keine nennenswerten Homologien zu bereits bekannten Sequenzen zeigt. Der Promotorbereich dieses ORFs überlappt vermutlich mit dem des *flaR*-Gens (Heuner et al., 2000). Bei Hybridisierung der Blots mit einer ORF234-spezifischen Sonde ergibt sich exakt das gleiche Bandenmuster wie bei Hybridisierung mit der *flaR*-Sonde (Abb. 34 A und B), was dafür spricht, dass diese beiden Gene bei allen *L. pneumophila* Stämmen direkt hintereinander liegen. Bei den nicht-*pneumophila* Stämmen konnte auch mit der ORF234-spezifischen Sonde kein Hybridisierungssignal erhalten werden.

Tabelle 10: Southernblot-Analyse verschiedener *Legionella*-Stämme. Die chromosomale DNA wurde mit dem Enzym *PstI* behandelt und mit einer *flaR*-spezifischen Sonde hybridisiert.

Stamm	Sero- gruppe	Signal	Fragment- größe (kb)
<i>Legionella pneumophila</i> Stämme			
<i>L. pneumophila</i> AA100	1	+	4,1
<i>L. pneumophila</i> Corby	1	+	4,1
<i>L. pneumophila</i> Bloomington	3	+	4,1
<i>L. pneumophila</i> Chicago 2	6	+	4,1
<i>L. pneumophila</i> Los Angeles	4	+	4,1
<i>L. pneumophila</i> Philadelphia I	1	+	4,1
<i>L. pneumophila</i> 640	5	+	4,1

Stamm	Sero- gruppe	Signal	Fragment- größe (kb)
<i>L. pneumophila</i> 664	6	+	4,0
<i>L. pneumophila</i> U21	6	+	4,1
<i>L. pneumophila</i> U22	3	+	4,1
<i>L. pneumophila</i> U40	1	+	4,1
<i>L. pneumophila</i> 33/52		+	4,0
Nicht- <i>pneumophila</i> Stämme			
<i>Legionella anisa</i>		-	-
<i>Legionella bozemanii</i>		-	-
<i>Legionella dumoffii</i>		-	-
<i>Legionella erythra</i>		-	-
<i>Legionella feelei</i>	1	-	-
<i>Legionella feelei</i>	2	-	-
<i>Legionella gormanii</i>		-	-
<i>Legionella hackeliae</i>	1	-	-
<i>Legionella hackeliae</i>	2	-	-
<i>Legionella israeliensis</i>		-	-
<i>Legionella jordanis</i>		-	-
<i>Legionella longbeachae</i>	1	-	-
<i>Legionella micdadei</i>		-	-
<i>Legionella oakridgensis</i>		-	-

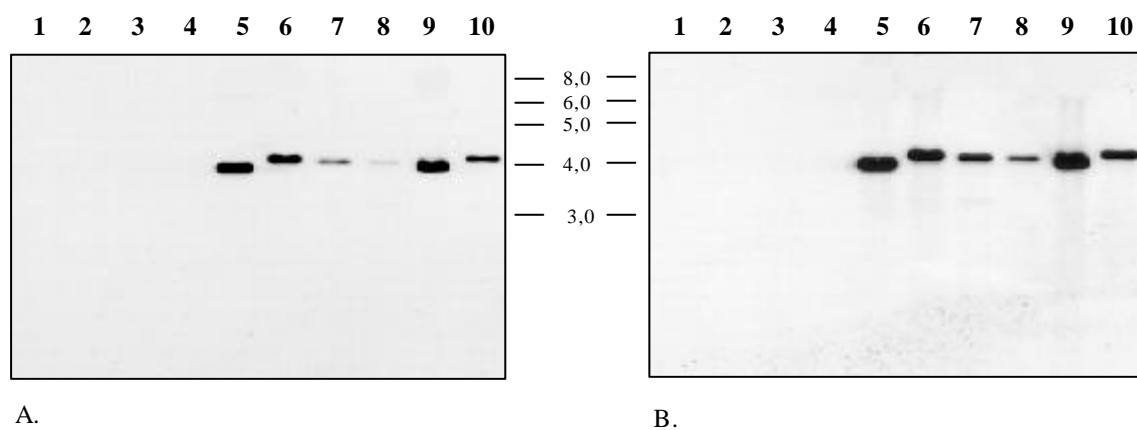


Abb. 34: Southernblot-Analyse verschiedener *Legionella*-Stämme mit einer *flaR*-spezifischen (A.) und einer ORF234-spezifischen (B.) Sonde. Die chromosomale DNA wurde mit dem Enzym *Pst*I gespalten. Spuren: 1 (*L. longbeachae*, SG 1); 2 (*L. oakridgensis*); 3 (*L. hackeliae*, SG 1); 4 (*L. israeliensis*); 5 (*L. pneumophila* 33/52); 6 (*L. pneumophila* Bloomington); 7 (*L. pneumophila* U1, SG1); 8 (*L. pneumophila* 667, SG4); 9 (*L. pneumophila* 664, SG6); (*L. pneumophila* Corby, SG1).

4.5.3. Untersuchungen zur Funktionalität der *flaR* und ORF234 Promotoren

Es sollte außerdem untersucht werden, ob der Promotor des *flaR*-Gens in *Legionella* überhaupt aktiv ist, bei welchen Wachstumsbedingungen möglicherweise eine Regulation erfolgt und ob er eventuell im intrazellulären Milieu hoch- oder runterreguliert wird.

Dazu wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Klaus Heuner Plasmide in *L. pneumophila* Corby eingebracht mit einer Fusion des *flaR*-Promotorbereichs (pBC(*gfp*)P_{*flaR*}) sowie des ORF234-Promotorbereichs (pBC(*gfp*)P_{*orf234*}) mit einem promotorlosen *gfp*-Gen. Von Rolf Köhler wurde als Negativkontrolle ein Konstrukt mit promotorlosem *gfp*, pRK6(pBC(*gfp*)), sowie als Positivkontrolle eine Fusion aus promotorlosem *gfp* mit dem *mip*-Promotorbereich, pRK10(pBC(*gfp*)P_{*mip*}) zur Verfügung gestellt (Köhler, 2000). Die Aktivität der Promotoren wurde dann bei verschiedenen Wachstumsbedingungen im Fluoreszenzmikroskop überprüft.

Zuerst wurde die GFP-Expression bei 30 und 37°C untersucht. Die Bakterien wurden dafür sowohl in Flüssigkultur als auch auf Agarplatten angezogen. Hinsichtlich der Anzucht auf Agarplatten oder in Flüssigkultur konnte kein Unterschied beobachtet werden, jedoch ist die Expression der beiden Gene bei 37°C im Vergleich zu 30°C deutlich erhöht (Abb. 35). Während bei 30°C nur sehr vereinzelt ein GFP exprimierendes Bakterium zu sehen war, so war die Anzahl an grünfluoreszierenden Bakterien bei 37°C deutlich höher. Auch die Fluoreszenz-Intensität war etwas stärker. Bei der Kontrolle pRK10(pBC(*gfp*)P_{*mip*}) konnte dieser Unterschied nicht beobachtet werden. Die Aktivität des *flaR*-Promotors war bei allen Versuchsbedingungen deutlich stärker als die des ORF234-Promotors. Eine Quantifizierung erwies sich jedoch generell als schwierig, da wie auch bei der Kontrolle mit dem *mip*-Promotor nie alle Bakterien leuchteten. Die elongierten Formen leuchteten außerdem häufig stärker als die normalwüchsigen Bakterien.

Intrazellulär in Amöben werden die beiden Gene auch aktiviert, da man nach 48 h Amöben beobachten konnte, die mit leuchtenden Bakterien angefüllt waren (Abb. 36), was zu Anfang der Infektion nicht der Fall war. Auch in diesem System war die Aktivität des ORF234-Promotors wieder deutlich geringer. Ob die Gene zu einem bestimmten Zeitpunkt wieder abgeschaltet werden, konnte nicht ermittelt werden, da das gebildete GFP über mehrere Tage hinweg stabil ist.

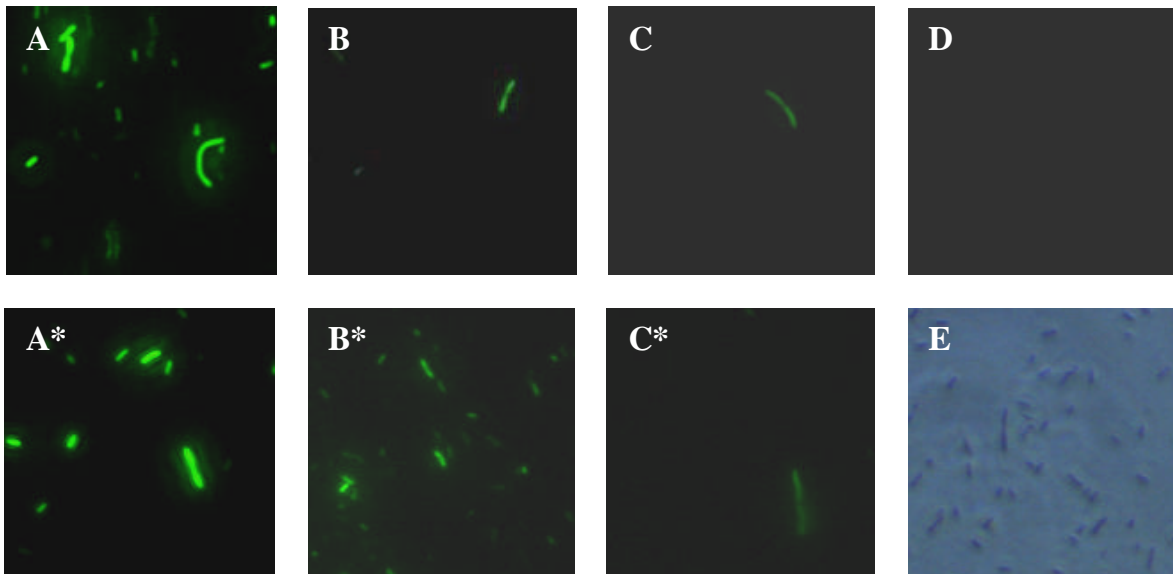


Abb. 35: Phasenkontrastaufnahme (E) und Fluoreszenzaufnahmen von Legionellen, die auf Agarplatten bei 30°C, bzw. (*) 37°C angezogen wurden und die *gfp* auf einem Plasmid tragen. Plasmide: (A) pRK10(pBC(*gfp*)P_{mip}), (B) pBC(*gfp*)P_{flaR}, (C) pBC(*gfp*)P_{orf234}, (D) pRK6(pBC(*gfp*)).

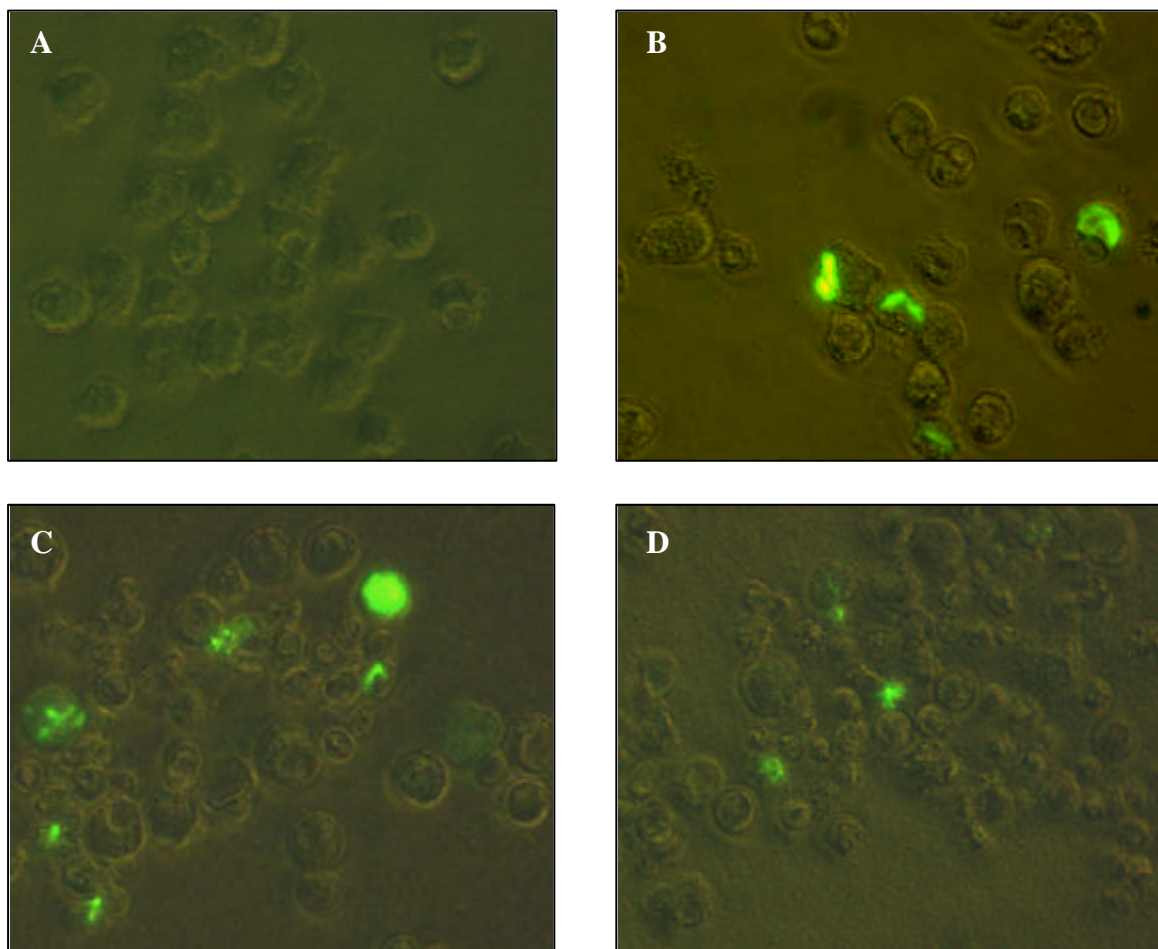


Abb. 36: Fluoreszenzaufnahmen von Infektionsassays bei 37°C mit *A. castellanii* nach 48 h. Infiziert wurde mit Legionellen, welche *gfp* auf einem Plasmid tragen. Plasmide: (A) pRK6(pBC(*gfp*)) (B) pRK10(pBC(*gfp*)P_{mip}), (C) pBC(*gfp*)P_{flaR}, (D) pBC(*gfp*)P_{orf234}.

4.5.4. Zusammenfassung

In diesem Abschnitt wurde die Klonierung eines „Suicide“-Vektors für die Konstruktion einer *fliA*-negativen Mutante beschrieben, auf welchem 430 bp des *fliA*-Gens deletiert und durch eine Kanamycin^R-Kassette ersetzt wurden. Außerdem wurde der Transkriptionsregulator *flaR* untersucht. Eine Southernblot-Analyse verschiedener *Legionella*-Stämme ergab, dass es sich bei diesem Gen um einen *L. pneumophila* spezifischen Faktor handelt. GFP-Reportergenfusionen mit den Promotoren von *flaR* sowie dem „upstream“ auf dem Gegenstrang liegenden ORF234 bestätigten, dass beide Promotoren in *Legionella* aktiv sind, wobei der *flaR*-Promotor eine stärkere Aktivität zeigte. Außerdem konnte eine temperatur-abhängige Regulation mit einer stärkeren GFP-Expression bei 37°C im Gegensatz zu 30°C beobachtet werden. Versuche mit Amöben belegten, dass beide Promotoren auch intrazellulär aktiviert werden.

5. Diskussion

5.1. Organisation und Vorkommen von Flagellen-assoziierten Genen bei Legionellen

Die Flagelle und die durch sie vermittelte Motilität ermöglichen den Bakterien auf verschiedenste Reize ihrer Umwelt zu reagieren und so die bestmöglichen Bedingungen für das Überleben aufzusuchen. Jedoch stellt der Aufbau eines solchen Fortbewegungsorgans aufgrund der komplexen Struktur, wofür die Expression von bis zu 50 verschiedenen Genprodukten nötig ist, auch eine hohe energetischen Belastung dar. Um sicherzustellen, dass alle dafür erforderlichen Gene zum richtigen Zeitpunkt und in der richtigen Reihenfolge aktiviert werden, liegen diese häufig in enger Nachbarschaft im Genom der Bakterien vor.

In dieser Arbeit wurde daher auch bei *L. pneumophila*, ausgehend von den drei bereits bekannten Flagellengen *flaA*, *fliA* und *motA* nach weiteren Genen in deren unmittelbaren Umgebung gesucht. Bei dem „Screening“ einer Cosmid-Genbank von *L. pneumophila* Philadelphia I mit den entsprechenden Gensonden wurden positive Klone mit den jeweiligen Genregionen identifiziert und diese ansequenziert. Dabei zeigte sich, dass auch bei *L. pneumophila* einige Flagellengene geclustert angeordnet sind.

5.1.1. Charakterisierung der *flaA*-Region

Eine Übersicht über die identifizierten Gene der *flaA*-Region von *L. pneumophila* zusammen mit einer Darstellung zu Vorkommen und Anordnung dieser Gene bei anderen Bakterien ist in Abbildung 37 dargestellt. Im 5'-Bereich des *flaA*-Gens wurden, in entgegengesetzter Leserichtung, keine Flagellengene, sondern zwei Stoffwechselgene identifiziert. Dabei handelt es sich um ein bei *E. coli* essentielles Gen (*accD*) mit Homologien zu der β -Untereinheit der Acetyl-CoenzymA-Carboxylase-Carboxyltransferase [67 % Identität / 76 % Homologie zu *accD* von *P. aeruginosa*; 63 % Identität / 75 % Homologie zu *accD* von *E. coli*]. Diese Carboxyltransferase ist bei *E. coli* als ein Multienzymkomplex aufgebaut, welcher insgesamt aus vier Untereinheiten besteht und die Synthese von Malonyl-CoA aus Acetyl-CoA, den ersten Schritt in der Fettsäuresynthese, katalysiert (Li et al., 1993). Es wurden bereits zwei weitere Untereinheiten dieser Carboxylase bei *L. pneumophila*

identifiziert, nämlich das Gen für die ACCB-Untereinheit (Biotin-Carboxyl-Carrier Protein), *accB* und ein Teil des *accC*-Gens (Biotin-Carboxylase-Untereinheit) (Jain et al., 1996). Auch bei *E. coli* liegen die vier Gene nicht in einem *acc*-Cluster. Im 3'-Bereich von *accD* wurde, ebenfalls genau wie bei *E. coli*, der Beginn eines ORF mit Homologien zu *folC* gefunden [50 % Identität der ersten 185 bp zu *folC* von *P. aeruginosa*]. Dieses Gen kodiert für eine Folyl-Polyglutamat-Synthetase-Dihydrofolat-Synthetase (Bognar et al., 1987). Bei *E. coli* wird die Expression von *folC* durch den *accD*-Promotor reguliert. Es wird aber, vermutlich durch ein Transkriptions-Terminationssignal im intergenischen Bereich, zu einem geringeren Prozentsatz transkribiert als *accD*. Die Expression der beiden Gene korreliert bei *E. coli* mit der Wachstumsrate und ist demnach entgegengesetzt zu *flaA* reguliert, das in *Legionella* erst beim Übergang in die stationäre Phase exprimiert wird (Heuner et al., 1999).

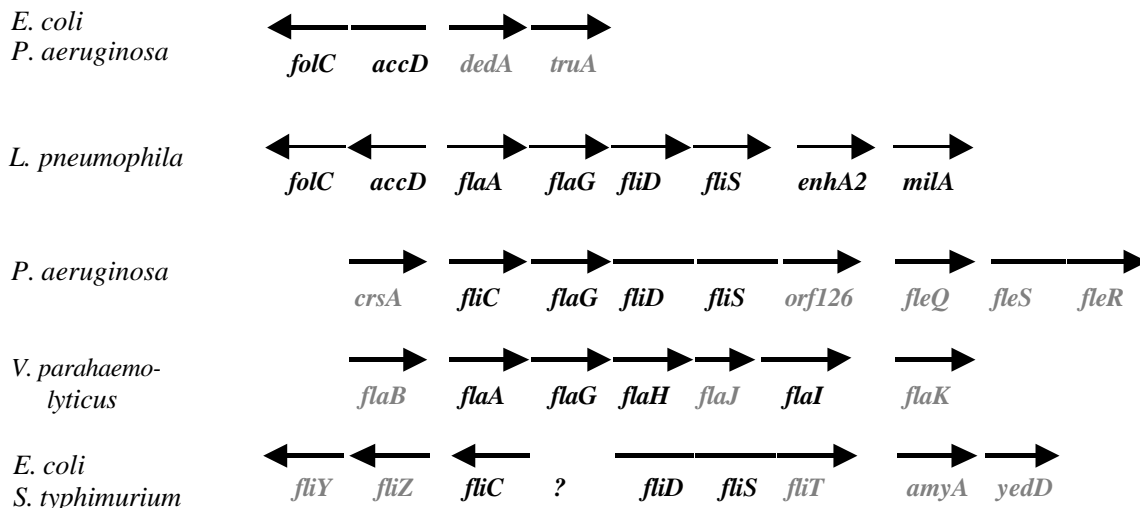


Abb. 37: Schematische Anordnung der Gene der *flaA*-Region von *L. pneumophila* im Vergleich mit dem Vorkommen dieser Gene bei anderen Bakterien. Die Auswertung erfolgte über <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/Genome>. Die Orientierung der Leserichtung ist durch Pfeile dargestellt. Operons, sofern sie bekannt sind, wurden als durchgehende Pfeile angegeben. Mit *Legionella* übereinstimmende Gene sind in Fettdruck markiert.

Im Anschluss an das *flaA*-Gen konnten drei weitere Flagellen-assoziierte Gene identifiziert werden, welche die gleiche Anordnung zeigen, wie z. B. bei *P. aeruginosa*, *E. coli* oder *Vibrio parahaemolyticus* (Macnab, 1996; Stewart et al., 1996). Direkt „downstream“ von *flaA*, mit einem Abstand von 80 bp, liegt ein kurzer ORF (282 bp) mit Homologien zu *flaG* [33 % Identität / 68 % Homologie zu *flaG* von *P. aeruginosa*]. Abgesehen davon, dass dieses Gen aufgrund seiner Lage eventuell für den Aufbau der Flagelle eine Rolle spielen könnte, ist nichts weiteres über seine Funktion bekannt.

Sowohl bei *P. aeruginosa*, als auch bei *V. parahaemolyticus* liegt dieser ORF zwischen dem Flagellin-Gen und dem danach folgenden „Flagellen-capping“ Protein (FliD). Ein ORF mit Homologien zu *fliD* konnte auch bei *Legionella* identifiziert werden [28 % Identität / 44 % Homologie zu *fliD* von *E. coli*; 27 % Identität / 42 % Homologie zu *fliD* von *P. aeruginosa*; 24 % Identität / 47 % Homologie zu *fliD* von *V. parahaemolyticus*]. Dieses Flagellen-Spitzen Protein, wegen seines gleichzeitigen Vorkommens in der Übergangsregion zwischen Haken und Filament auch „hook-associated“-Protein II (HAP II) genannt, hat eine wichtige Aufgabe für den Zusammenbau der einzelnen Flagellinmoleküle. Es konnte gezeigt werden, dass sich das Protein bei der Polymerisation des Flagellins als bipolares Pentamer an der Spitze des wachsenden Filaments befindet und ähnlich wie ein Katalysator den Einbau neuer sekretierter Flagellinmoleküle in die bereits existierende polymere Struktur ermöglicht (Imada et al., 1998). Mutationen dieses Gens bei *S. typhimurium* oder *Helicobacter pylori* resultieren in aflagellierten, nicht-motilen Mutanten, bei denen keine Polymerisation des Flagellins mehr erfolgt, sondern dieses in das Medium sekretiert wird (Kim et al., 1999). Externe Zugabe von FliD in das Medium führt jedoch wieder zum Aufbau intakter Flagellen (Ikeda et al., 1996).

Bei *E. coli* und *S. typhimurium* liegt das Gen *fliD* in einem Operon zusammen mit den Genen *fliS* und *fliT* vor (Kawagishi et al., 1992; Macnab, 1996). Bei *S. typhimurium* konnte auch gezeigt werden, dass das *fliD*-Operon innerhalb der Flagellen-Regulationskaskade sowohl durch Promotoren der „Ebene II“ (*flhDC*) als auch durch Promotoren der „Ebene III“ (*fliA*) transkribiert wird (Kutsukake et al., 1995). Bei *Legionella* konnte hingegen nur ein ORF mit Homologien zu *fliS* identifiziert werden, *fliT* ist nicht vorhanden. Dies ist in Übereinstimmung mit dem Genarrangement bei *P. aeruginosa*, *H. pylori* und *V. parahaemolyticus*. Auch bei diesen Organismen konnte kein *fliT*-ähnliches Gen gefunden werden. Zur Funktion von *fliS* gibt es unterschiedliche Angaben. Während Mutationsanalyse bei *E. coli* zeigte, dass es anscheinend essentiell für den funktionellen Aufbau einer intakten Flagelle ist (Kawagishi et al., 1992), so waren *fliS*-Mutanten von *S. typhimurium* noch flagelliert. Allerdings waren die Filamente etwas kürzer als beim Wildtyp, sodass FliS vermutlich für die Elongation wichtig ist. Außerdem wurde von den Mutanten weniger Flagellin gebildet (Yokoseki et al., 1995). Bei *V. parahaemolyticus* wurde für das *fliS* Homolog *flaJ* ebenfalls eine stimulierende Wirkung auf die Flagellinproduktion (FliC) nachgewiesen (Stewart et al., 1996). Ebenso scheint *fliT* bei *E. coli* eine gewisse Rolle zu spielen (Kawagishi et al., 1992), wohingegen eine *S. typhimurium fliT*-Mutante überhaupt keinen Phänotyp zeigte (Yokoseki et al.,

1995). Ob *Legionella* ein *fliT*-homologes Gen in einer anderen chromosomalen Region besitzt, ist nicht bekannt.

Anstelle von *fliT* findet man weiter „downstream“ einen ORF (*enhA2*) mit Homologien [54 % Identität / 68 % Homologie] zu dem kürzlich beschriebenen *enhA* von *L. pneumophila* (Cirillo et al., 2000). Dieses Gen wurde im Rahmen eines „Screening“ auf Faktoren gefunden, die *Legionella* eine höhere Invasivität verleihen. Bekannt ist daher bisher nur, dass *enhA* zusammen mit den darauffolgenden Genen *enhB* und *enhC* einen Einfluss auf die Invasionsrate von *L. pneumophila* gegenüber Epithelzellen und Monozyten hat. *EnhC*-negative Mutanten zeigen eine Reduktion der Invasivität um den Faktor zwei bis vier. Da bei der Sequenzierung der *flaA*-Region nur Homologien zu *enhA* und nicht zu den übrigen *enh*-Genen gefunden wurden, handelt es sich vermutlich bei dem Leseraster nicht um *enhA* selbst, sondern um ein Gen, welches strukturell verwandt ist. Es wäre daher möglich, dass auch das Gen *enhA2* einen Einfluss auf die Invasivität der Legionellen haben könnte. Dieser Frage könnte durch eine Mutationsanalyse nachgegangen werden.

Abschließend konnte in diesem Bereich noch der Beginn eines Gens sequenziert werden, welches 67 % Homologien [50 % Identität] zu den ersten 180 bp des ebenfalls erst kürzlich bei *L. pneumophila* beschriebenen Gen *milA* besitzt (Harb et al., 2000). Wie dieses zeigt es ebenfalls Homologien zu Transporter-Proteinen anderer Bakterien [37 % Identität / 57 % Homologie zu einem putativen Transporter Protein von *Mycobacterium smegmatis*; 25 % Identität / 52 % Homologie zu einem Transporter-Protein von *P. aeruginosa*]. Eine *milA*-negative *Legionella*-Mutante zeigte während der ersten 48 h ein deutlich verringertes Wachstum in U937 Zellen, welches durch die geringere Bakterienzahl auch mit einer verminderten Zytotoxizität einherging, wohingegen das Wachstum in Amöben nicht beeinträchtigt war. Interessanterweise konnte nach 72 h in U937 Zellen kein Unterschied mehr zwischen Wildtyp und Mutante beobachtet werden, was dafür spricht, dass es sich nur um ein verlangsamtes Wachstum handelte, nicht um einen tatsächlichen Wachstumsdefekt. Dieser Phänotyp scheint also dem der *flaA*-Mutante sehr ähnlich zu sein. Falls es sich bei dem sequenzierten ORF tatsächlich um *milA* handelt, und nicht nur um ein strukturell verwandtes Gen, so könnte die Lage in der Nähe der Flagellengene dafür sprechen, dass dieses Gen möglicherweise einen Einfluss auf die Flagellierung und auch auf die Invasionsrate haben könnte.

5.1.2. Charakterisierung der *motA*-Region

Angrenzend an die *fliA/motA*-Region wurden durch Sequenzieren des Cosmids 12/44 ebenfalls einige bei *Legionella* noch nicht bekannte Gene identifiziert. Eine Übersicht über die identifizierten

Leseraster im Vergleich zu Vorkommen und Abfolge homologer Gene bei anderen Bakterien ist in Abbildung 38 dargestellt. Im 5'-Bereich des *fliA*-Gens wurde ein ORF sequenziert mit großen Ähnlichkeiten zu *motR* von *P. putida* [53 % Identität / 78 % Homologie], zu *fleN* von *P. aeruginosa* [52 % Identität / 77 % Homologie], zu *flhG* von *V. parahaemolyticus* [52 % Identität / 74 % Homologie] sowie zu *ylxH* von *B. burgdorferi* [38 % Identität / 62 % Homologie]. Allen diesen Genen ist gemeinsam, dass sie in einem Flagellenoperon vorkommen, häufig flankiert von den Genen *fliA* und *flhF*.

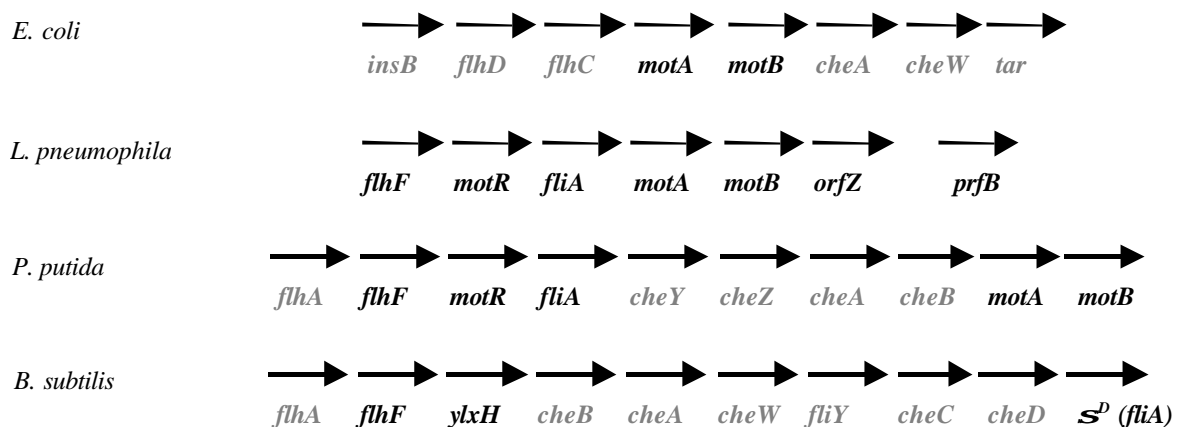


Abb. 38: Schematische Anordnung der Gene der *motA*-Region von *L. pneumophila* im Vergleich mit dem Vorkommen dieser Gene bei anderen Bakterien. Die Auswertung erfolgte über <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/Genome>. Die Orientierung der Leserichtung ist durch Pfeile dargestellt. Mit *Legionella* übereinstimmende Gene sind in Fettdruck markiert.

Auch bei *Legionella* konnte in der „upstream“-Region das Ende eines Gens mit Homologien zu *flhF* [42% Identität / 63 % Homologie zu *flhF* von *V. parahaemolyticus*, 41 % Identität / 65 % Homologie zu *flhF* von *V. cholerae*, sowie 38 % Identität / 55 % Homologie zu *flhF* von *P. putida*] identifiziert werden. Die beiden Gene *motR/fleN* sowie *flhF* sind höchstwahrscheinlich Regulatorgene, wobei MotR, bzw. FleN eine ATP-Bindedomäne besitzen und bei den Pseudomonaden die Flagellenanzahl pro Bakterium beeinflussen (Campos-Garcia et al., 2000; Dasgupta et al., 2000). Durch Mutationsanalyse konnte gezeigt werden, dass *fleN* mindestens sechs Flagellenoperons negativ reguliert, unter anderem *fliDSorf126* und *fliC* (Flagellin) sowie die Flagellenregulatoren *fleSR*. Auch eine Wirkung auf den NtrC-ähnlichen Transkriptionsregulator FleQ wird vermutet (Arora et al., 1997). FlhF wiederum ist ein GTP-bindendes Protein mit Ähnlichkeiten zu Proteinen der „signal recognition particle pathway family of proteins“ und in *P. putida* für die polare Lokalisation der Flagelle entscheidend. Außerdem beeinflusst es das Phänomen der Hunger-induzierten generellen Stressantwort und die Synthese verschiedener exponentieller und stationärer

Proteine (Pandza et al., 2000). Das Gen *fliA* war bereits sequenziert (Heuner et al., 1997a), ebenso wie das darauffolgende Gen *motA* (Kapfhammer, 1998). Mit 26 bp Überlappung war „downstream“ von *motA* außerdem der Beginn eines ORFs mit Homologien zu *motB* identifiziert worden. In dieser Arbeit wurde die Sequenz vervollständigt. Demnach kodiert das *motB*-Gen bei *Legionella* für ein 267 AS großes Protein, das 39 % Identität / 57 % Homologie zu *motB* von *P. putida* und 33 % Identität / 50 % Homologie zu *motB* von *B. subtilis* zeigt. Wie bereits in Kapitel 2.4.1. beschrieben bildet MotA bei *E. coli* und *S. typhimurium* vermutlich den Protonenkanal des Motors aus, wohingegen MotB für die Verankerung des Motors sorgt. Mutationsanalysen zeigten, dass beide Gene essentiell für die Bewegung der Flagelle und somit die Motilität der Bakterien sind (Macnab, 1992).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch Insertion einer Kanamycin^R-Kassette eine *motA*-negative Mutante von *L. pneumophila* Corby konstruiert. Diese Mutante exprimiert noch Flagellin und baute dies zu einer intakten Flagelle zusammen, wenn auch zu einem etwas geringeren Prozentsatz als der Wildtyp. Trotz der vorhandenen Flagelle waren die Bakterien in der stationären Phase nicht motil, wie im Lichtmikroskop beobachtet. *MotA* scheint also auch bei *Legionella* für den Flagellenmotor essentiell zu sein. Eine Southernblot-Analyse bei verschiedenen *Legionella*-Spezies ergab, dass *motA* bei allen *L. pneumophila* Stämmen in einer Kopie vorhanden war. Die flagellierten Stämme *L. gormanii*, *L. jordanis* und *L. bozemanii* zeigten ebenfalls ein Signal mit der *motA*-Sonde, im Gegensatz zu den nicht flagellierten *Legionella*-Stämmen (Heuner, 1997b). Da die hybridisierenden Banden bei den *L. pneumophila*-Stämmen die gleiche Größe hatten, ist davon auszugehen, dass die Anordnung der Gene bei all diesen Stämmen der von *L. pneumophila* Philadelphia I entspricht. Eine PCR-Analyse mit verschiedenen Primern bestätigte eine identische Anordnung der Gene bei *L. pneumophila* Corby. Bei einem Vergleich der Sequenz des *fliA*-Gens von *L. pneumophila* Corby und *L. pneumophila* Philadelphia zeigte sich, dass von den insgesamt 238 Aminosäuren nur vier ausgetauscht waren, davon zwei mit einer homologen Aminosäure. So kann davon ausgegangen werden, dass auch bei den anderen Genen eine sehr große Übereinstimmung zwischen den beiden *Legionella*-Stämmen besteht. Im „downstream“-Bereich von *motB* wurde noch ein weiterer kurzer ORF sequenziert. Dieser zeigt Homologien zu anderen hypothetischen Proteinen verschiedener Bakterienarten. Abschließend folgt ein Gen mit Homologien zu dem „peptide-chain-release“ Faktor II (*prfB*) von *S. typhimurium* und *E. coli*, dort wichtig für die prokaryotische Proteintranslation (Kawakami et al., 1990).

5.2. Flagelle und Motilität als Virulenzfaktoren von *Legionella pneumophila*

Die bakterielle Flagelle kann für eine Reihe von virulenzassoziierten Vorgängen eine Rolle spielen. Dabei ist zu unterscheiden zwischen der Funktion der Flagelle als Fortbewegungsorgan, was beispielsweise für das Aufsuchen eines geeigneten Infektionsortes eine Rolle spielt, und der Flagelle als Struktur. Diese Struktur kann z.B. Adhärenz an oder Phagozytose durch mögliche Zielzellen vermitteln sowie eine Immunantwort auslösen. Interessant sind außerdem die koordinierte Regulation von Virulenz und Motilität und die mögliche Funktion des Flagellensekretionssystems zur Ausschleusung möglicher Virulenzfaktoren.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Flagelle und der durch sie vermittelten Motilität auf die Virulenz von *L. pneumophila* hinsichtlich der Faktoren Aufsuchen eines geeigneten Wirts, Adhärenzvermögen, Invasionsrate, intrazelluläre Vermehrungsfähigkeit und Lyse der Wirtszellen untersucht.

5.2.1. Funktion als Kolonisations- und Invasionsfaktoren

Als erstes wurde die Frage gestellt, ob nicht-motile *Legionella*-Mutanten ebenso wie der motile, wildtypische Ausgangsstamm *L. pneumophila* Corby in der Lage sind, entsprechende potentielle Wirtszellen aufzusuchen und mit ihnen zu assoziieren. Dabei zeigte sich, dass die *flaA*- oder *motA*-negativen Mutanten die Wirtszellen zu einem deutlich geringeren Prozentsatz (nur zu etwa 10 %) erreichten als der Wildtyp. Durch mikroskopische Beobachtung kann außerdem davon ausgegangen werden, dass in dem verwendeten Versuchsaufbau aufgrund der natürlichen Schwerkraft vermutlich bereits ein Teil der Bakterien sedimentiert war, was den Kontakt mit den als Monolayer vorliegenden Wirtszellen für die Mutanten erleichtert haben könnte. In der Natur bei weitaus geringeren Infektionsdosen und einem im Vergleich stark limitierten Wirtsangebot, dürfte der Einfluss der Motilität als Selektionsvorteil daher noch deutlich größer sein.

Ein vergleichbarer Zusammenhang zwischen Motilität und Kolonisationsvermögen ist auch bei einer Reihe von anderen Bakterien bereits nachgewiesen worden. Nicht-motile *Vibrio anguillarum flA*-Mutanten sind beispielsweise nicht mehr in der Lage, marine Fische, ihre natürlichen Wirte, zu infizieren, wenn sie in Wasser suspendiert werden. Die LD₅₀ erhöhte sich dann um den Faktor 10²-10⁴. Hingegen sind sie nach intraperitonealer Injektion ebenso virulent wie der Wildtyp (Milton et al.,

1996). Ähnliche Ergebnisse sind auch für Chemotaxis-Mutanten beschrieben worden (O'Toole et al., 1996). Nicht-motile Mutanten von *Bordetella avium* können sich ebenfalls deutlich schlechter in einer Vogelmehrheit ausbreiten (Temple et al., 1998). Auch bei dem Pflanzenpathogen *Agrobacterium tumefaciens* konnte beobachtet werden, dass die Motilität nur dann keine Rolle spielt, wenn die Bakterien direkt auf die Pflanze appliziert werden, wohingegen nicht-motile oder Chemotaxis-defiziente Mutanten im Boden nicht in der Lage sind, die Wurzeln zu erreichen und die Pflanze zu kolonisieren (Hawes et al., 1989; Chesnokova et al., 1997). Übereinstimmende Ergebnisse liegen auch für *Azospirillum brasilense* vor. Nicht flagellierte Mutanten zeigten hier ein deutlich reduziertes Kolonisationsvermögen gegenüber Pflanzenwurzeln (Vande Broek et al., 1998). Die Motilität ist also in diesem Zusammenhang von entscheidender Bedeutung für das Aufsuchen und die anschließende Infektion geeigneter Wirte.

Um die Beteiligung der Flagelle an möglichen Adhärenzvorgängen zu untersuchen, wurden die Bakterien auf die Zellen aufzentrifugiert. Damit sollte sichergestellt werden, dass die Mutanten zu Beginn des Versuchs trotz ihres eben beschriebenen Motilitätsdefekt in gleicher Anzahl wie der Wildtyp mit den Wirtszellen in Kontakt treten konnten. Mit diesem Versuchsaufbau wurde für die *flaA*- und *motA*-negativen Mutanten von *Legionella* eine dem Wildtyp vergleichbare Adhärenzrate beobachtet. Die Flagelle stellt also für die Legionellen vermutlich keinen spezifischen Adhärenzfaktor dar. Dies muss allerdings noch durch weitere Experimente bestätigt werden, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass durch das Zentrifugieren mögliche Adhärenzeffekte überdeckt werden könnten. Bei nicht-motilen Mutanten von *Y. enterocolitica*, die aufgrund ihres Motilitätsdefekts weniger adhärenz und invasiv waren, konnte aber ebenfalls beobachtet werden, dass diese Attenuierung aufgehoben wurde, wenn man die Bakterien durch Zentrifugation künstlich in Kontakt mit den Wirtszellen brachte (Young et al., 2000). Ein ähnliches Verhalten wurde auch bei *flaA*-negativen Mutanten von *S. typhimurium* beschrieben (Jones et al., 1992). Im Gegensatz zu diesen Studien wurde jedoch in vorliegender Arbeit bei den *Legionella*-Mutanten trotz einer vergleichbaren Adhärenzrate ein schlechteres Invasionsvermögen der nicht-motilen Stämme beobachtet. Die Invasivität der *flaA*-negativen Mutante gegenüber humanen HL-60 Zellen war beispielsweise nach 2 h Inkubation um einen Faktor von 130 erniedrigt. Auch bei der *motA*-Mutante konnte eine Reduktion um den Faktor 30 beobachtet werden. Dies alles spricht dafür, dass die Flagelle bei *Legionella* zwar vermutlich keinen direkten Adhärenzfaktor darstellt, sie aber zu einer motilitätsabhängigen Aufnahme der Bakterien beiträgt.

Dieser Einfluss der Flagellierung und der Motilität auf die Invasionsrate ohne Unterschiede auf das Adhärenzvermögen, wurde auch für einige andere Bakterien beschrieben. Beispielsweise war eine *motY*-negative Mutante von *V. anguillarum*, welche zwar wildtypische Flagellen besitzt, diese aber nicht bewegen kann, genauso adhärent wie der Wildtyp, wohingegen die Invasionsrate gegenüber verschiedenen Zelllinien drastisch reduziert war (Ormonde et al., 2000). Auch eine Flagellin-negative Mutante von *S. enterica* zeigte eine um den Faktor 50 verringerte Invasivität gegenüber Caco-2 Zellen, trotz nahezu unveränderter Adhärenzrate (Fons et al., 2000). Ebenso konnte bei nicht flagellierten Mutanten von *Proteus mirabilis* eine um den Faktor 100 reduzierte Invasionsrate in Epithelzellen beobachtet werden, welche durch Zentrifugation nur ca. um den Faktor 20 erhöht werden konnte (Mobley et al., 1996). Bei *C. jejuni* wurde Flagellin als sekundäres Adhäsion beschrieben, da nicht flagellierte Mutanten nicht mehr zu adhären vermögen und somit auch nicht mehr invasiv sind. Allerdings ist auch hier der Einfluss der Motilität auf den weiteren Infektionsverlauf ebenso entscheidend, da Motilitäts-Mutanten mit paralysierter Flagelle (defekter Motor) zwar noch adhären konnten, jedoch keine Invasion mehr zeigten. Die Invasion ist somit also genau wie bei *Legionella* von der Adhärenz abgekoppelt und motilitätsabhängig (Yao et al., 1994).

Die Erkenntnis, dass Bakterien in der Natur selten als Einzellebewesen, sondern vielmehr häufig in Gemeinschaften mit anderen Organismen in sogenannten Biofilmen vorkommen (Costerton et al., 1995), ist auch für deren Virulenz von Bedeutung. Können sich Bakterien in einem Biofilm behaupten, so führt das zu einer weiteren Verbreitung. Als ubiquitäres Wasserbakterium könnte dies auch für *Legionella* von Vorteil sein. Besonders bei der Besiedelung von technischen Wassersystemen wird eine Beteiligung von Biofilmen vermutet (Lück, 1997; Keevil, 2000). Aufgrund der eben beschriebenen Zusammenhänge zwischen Motilität und Kolonisation ist es daher von Interesse herauszufinden, ob diese Faktoren für *Legionella* auch dafür eine Rolle spielen. Bei *E. coli* scheint beispielsweise die Motilität eine Voraussetzung für die Biofilmbildung zu sein, indem sie die initiale Adhärenz an eine Oberfläche vermittelt. Motilitätsnegative Mutanten zeigten trotz vorhandener Flagelle nur ein sehr eingeschränktes Vermögen an PVC zu adhären und es waren nur lokal sehr begrenzte Mikrokolonien zu beobachten (Pratt et al., 1998). Bei *Pseudomonas aeruginosa* ist die Flagellierung, bzw. Motilität sogar von noch größerer Bedeutung. In einer entsprechenden Studie waren nicht flagellierte Mutanten überhaupt nicht mehr in der Lage, an PVC-Oberflächen zu adhären und einen Biofilm auszubilden (O'Toole et al., 1998). Für *Vibrio alginolyticus*, *alcaligenes* und *alteromonas* sp. konnte auch ein motilitätsabhängiges

Adhärenzverhalten an Glasoberflächen gezeigt werden (Morisaki et al., 1999). Dies begründen die Autoren damit, dass mögliche elektrostatische Abstoßungskräfte der Oberflächen durch die kinetische Energie der Bakterien überwunden werden müssen. Da bisher über das Vorkommen in Biofilmen und die nötigen Kolonisationsfaktoren von *Legionella* kaum etwas bekannt ist, wäre es daher in diesem Zusammenhang eine interessante Fragestellung das Verhalten der beiden konstruierten *flaA*- und *motA*-negativen *Legionella*-Mutanten in einem entsprechenden Biofilm-Modell zu untersuchen.

5.2.2. Einfluss auf die intrazelluläre Vermehrung und die Virulenz im Tiermodell

In Bezug auf die Vermehrungsfähigkeit und Virulenz nicht flagellierter *Legionella*-Mutanten gibt es in der Literatur bisher widersprüchliche Angaben. Chandler et al. (1980) konnte bei Legionellen, die aus humanen Alveolarbläschen isoliert wurden, eine Flagellierung nachweisen, Elliot (1982) detektierte bei einer intraperitonealen Infektion von Meerschweinchen mit *L. pneumophila* Bakterien, die nicht flagelliert waren. Durch Transposon-Mutagenese und anschließendes „Screening“ der Mutanten mittels Anti-Flagellin-Antiserum konnten zehn Insertionsmutanten identifiziert werden, welche nicht mehr in der Lage waren, eine Flagelle auszubilden (Pruckler et al., 1995). Diese Stämme wurden dann auf ihre Fähigkeit untersucht, sich in U937 Zellen (humane Makrophagen-ähnliche Zelllinie) sowie *Hartmannella vermiformis* zu vermehren. Dabei zeigte sich, dass in dem Makrophagen-Modell nach drei Tagen bei keinem der Stämme eine signifikante Vermehrung zu detektieren war. Erst nach sieben Tagen zeigten drei der zehn Stämme eine Zunahme der Bakterienzahl, ohne jedoch das wildtypische Niveau zu erreichen. Die restlichen sieben nicht flagellierten Stämme konnten sich überhaupt nicht mehr vermehren. In dem Amöben-Modell war der Effekt nicht ganz so deutlich. Die drei Stämme, die in der Lage waren, sich wenngleich verlangsamt in U937 Zellen zu vermehren, replizierten sich in Hartmannellen bereits nach drei Tagen so wie der Wildtyp. Hier war eine Flagellierung also nicht unbedingt notwendig. Bei weiteren drei Stämmen konnte eine mit dem Wildtyp vergleichbare Zahl erst nach sieben Tagen erreicht werden, die restlichen vier Stämme waren auch im Amöbenmodell deutlich in ihrer Vermehrungsfähigkeit reduziert. Diese sieben attenuierten Mutanten tragen höchstwahrscheinlich Insertionen in Genen, welche neben dem Flagellenaufbau auch noch andere für die Vermehrung wichtige Faktoren beeinflussen oder regulieren. Leider fanden sich beim Sequenzieren der betroffenen Gene keine

signifikanten Homologien, welche Rückschlüsse über mögliche Funktionen geben könnten (Pruckler, persönliche Mitteilungen).

Diese Beobachtungen stimmen gut mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen überein. Für die nicht motile *motA*-, sowie die nicht flagellierte *flaA*-Mutante, konnten in dem gewählten Amöbenmodell *A. castellanii* keine Unterschiede hinsichtlich der intrazellulären Vermehrungsrate beobachtet werden. Daraus lässt sich ebenfalls folgern, dass eine Flagellierung keine Notwendigkeit für die Replikation in Amöben darstellt. Dies korreliert auch mit dem Befund, dass während des exponentiellen intrazellulären Wachstums eine Flagellierung der Bakterien nicht nachgewiesen werden kann (Byrne et al., 1997).

In HL-60 Zellen konnte jedoch bei der *flaA*-Mutante eine um den Faktor 14 verminderte Multiplikationsrate gegenüber dem Wildtyp nach einen Zeitraum von vier Tagen beobachtet werden. Infektionsstudien mit einer hohen Infektionsdosis, bei der sichergestellt ist, dass bereits ein großer Teil der Zellen zu Beginn infiziert ist, zeigten hingegen nach 24 h eine dem Wildtyp entsprechende Vermehrungsrate (ca. Faktor 100), obwohl die initiale Aufnahme der Mutanten geringer war. Daraus lässt sich folgern, dass die Fähigkeit zur intrazellulären Vermehrung auch in HL-60 Zellen nicht abhängig von der Flagellierung ist, sich jedoch bei geringer MOI durch die schlechtere Invasivität der Mutanten ein Retardierungseffekt im Laufe von mehreren Infektionszyklen bemerkbar macht. Auch bei den nicht flagellierten Mutanten von Pruckler et al. (1995) war bei allen Mutanten ein verlangsamtes oder völlig unterbundenenes Wachstum in HL-60 Zellen beschrieben worden.

Im Widerspruch zu eben beschriebenen Studien, ergab die chromosomale Integration einer Chloramphenicol-Kassette in das *fliI*-Gen (homolog zu ATPasen der Flagellen Typ III Sekretionssysteme) von *Legionella* ein gegenteiliges Ergebnis. Mittels Westernblot-Analyse ließ sich bei dieser Mutante keine Flagellin-Bande mehr detektieren, was die Annahme bestätigte, dass es sich bei *fliI* um ein für den Flagellenassembly essentielles Gen handelt. In U937 Zellen zeigte die Mutante jedoch im Vergleich zum Wildtyp keine Verminderung des Wachstums. Es stellt sich also die Frage, weshalb es im Falle dieser nicht flagellierten Mutante nicht zu dem beobachteten Effekt eines verlangsamten Wachstums kam. Eine mögliche Erklärung wäre ein unterschiedlicher Aktivierungsgrad der verwendeten U937 Zellen im Vergleich zu den HL-60 Zellen, der immer auch abhängig von den jeweiligen Laborbedingungen ist. Dadurch könnten sich eventuell restriktivere Bedingungen für die Mutanten ergeben. Die Autoren haben auch nicht untersucht, ob es bei der *fliI*-Mutante zu einer ebenso deutlich verminderten Invasionsrate kommt, was möglicherweise

stammspezifisch sein könnte. Außerdem wurde eine um den Faktor 10 höhere MOI, sowie Bakterien aus der exponentiellen Phase (d. h. auch der Wildtyp ist nicht flagelliert) für die Infektion verwendet, wodurch möglicherweise die Effekte minimiert werden. Denkbar wäre, dass es beispielsweise im Tiermodell trotzdem zu einer Attenuierung des *fliI*-negativen Stammes kommen könnte.

Da bei einer Infektion der Lunge neben der initialen Besiedlung auch eine stete Neuinfektion von Makrophagen stattfinden muss, wäre das Testen der *flaA*-Mutanten im Meerschweinchenmodell zur Klärung dieser Frage von Interesse. Es wurde beispielsweise für Flagellin-negative Mutanten von *P. aeruginosa* gezeigt, dass diese Mutanten nur in 25 % der Fälle eine Pneumonie hervorriefen, im Gegensatz zu 80 % Pneumonie-Fälle beim Wildtyp. Histopathologische Untersuchungen bestätigten außerdem, dass die *fliC*-Mutanten nur lokal begrenzte Entzündungen verursachten und nicht in der Lage waren, sich in der Lunge auszubreiten (Feldman et al., 1998).

Weitere allgemeine Einflüsse der Flagelle auf die Virulenz im Tiermodell sind auch bei *Helicobacter felis* und *Serpulina hyodysenteriae* beschrieben worden (Josenhans et al., 1999; Rosey et al., 1996). Dabei waren in beiden Fällen Flagellin-negative Mutanten nicht in der Lage die Mukosa des gastrointestinalen Trakts im Mausmodell zu kolonisieren. Der gleiche Phänotyp wurde auch für eine nicht flagellierte *fliD*-Mutante von *H. pylori* beobachtet (Kim et al., 1999). Nicht immer führt jedoch eine *in vitro* beobachtete Attenuierung auch tatsächlich zu einer reduzierten Virulenz *in vivo*. Trotz einer nachgewiesenen Reduktion der Invasion von Henle Zellen bei nicht-motilen oder nicht-flagellierten Mutanten von *S. typhimurium* beispielsweise, waren die Stämme bei intraperitonealer Infektion genauso virulent wie der Wildtyp. Auch eine orale Infektion erhöhte die LD₅₀-Dosis nur um einen (statistisch nicht signifikanten) Wert von 5 (Lockman et al., 1990).

Die Flagelle als Struktur kann ebenfalls für den Infektionsverlauf eine Rolle spielen. Als wichtige antigene Determinante stellt sie einen idealen Angriffspunkt für das Immunsystem dar. Daher wurden bei vielen pathogenen Bakterien wie *C. jejuni*, *S. typhimurium* oder *V. fischeri* Phasenvariationen des Flagellins gefunden (Harshey et al., 1996). Da *L. pneumophila* bei Southern-Hybridisierung der chromosomalen DNA jeweils nur eine einzige Bande zeigt, die mit einer Flagellin-spezifischen Sonde reagiert (Heuner, 1997; eigene Ergebnisse), ist nicht davon auszugehen, dass es während einer Infektion zur Phasenvariation des Flagellins kommt. Dafür findet jedoch im Verlauf der Infektion

während der Replikationsphase der Legionellen gar keine Expression des Flagellins statt, sodass Flagellen-spezifische Antikörper immer nur einen Teil der Bakterienpopulation erkennen können. Für *S. typhimurium* wurde außerdem beobachtet, dass das Flagellin (FliC) TNF α und andere Zytokine in einer promonozytischen Zelllinie stimuliert (Ciacci-Woolwine et al., 1998). Bei *Legionella* wurde die Flagelle ebenfalls als antigene Determinante beschrieben. Durch Applikation gereinigten Flagellenextrakts gelang es im Maus-Modell, die Tiere vor einer anschließenden Infektion mit einer normalerweise letalen Infektionsdosis zu schützen (Ricci et al., 2000).

5.2.3. Bedeutung für die Lyse der Wirtszelle und die Sekretion

Ein interessantes Phänomen war die bei der Mutante KH1 beobachtete verringerte Zytotoxizität gegenüber Amöben und humanen Zellen. Bisher wurde eine verminderte Zytotoxizität immer nur in Verbindung mit einem ebenfalls verminderten Zellwachstum beobachtet (Shuman et al., 1998). Mutationen, die das Zellwachstum nicht beeinträchtigen, bei denen jedoch trotz erfolgter Vermehrung keine Lyse der Wirtszelle eintritt, stellen somit eine gute Möglichkeit dar, spezifisch Faktoren zu identifizieren, welche für diesen letzten Schritt einer Infektion notwendig sind. Es wäre eine naheliegende Hypothese, dass die Flagelle, bzw. die Motilität allein dafür verantwortlich sein könnte, da die Bakterien kurz bevor die Zelle aufplatzt motil werden und dann heftig in der Zelle rotieren (Rowbotham, 1986; eigene Beobachtungen). Allerdings zeigten die Flagellenmutante KH3 sowie die *motA*-Mutante höchstens eine leicht reduzierte Zytotoxizität. Somit kann die Motilität nur zu einem untergeordneten Maß eine Rolle bei der Wirtszellyse spielen.

Auf der Suche nach einem Zytotoxin wurde bei *Legionella* eine hämolytische Aktivität festgestellt, die teilweise auf einen Faktor namens Legiolysin zurückgeführt werden konnte (Wintermeyer et al., 1991). Untersuchungen auf Blutagarplatten belegten allerdings, dass der Stamm KH1 weiterhin einen hämolytischen Phänotyp besitzt. Wie einige andere Bakterien, z. B. Shigellen, Yersinien oder Neisserien (Zychlinsky et al., 1992; Monack et al., 1997; Müller et al., 1999), sind auch Legionellen in der Lage, bei humanen Zellen, nicht aber bei Amöben, Apoptose zu induzieren (Müller et al., 1996; Hägele et al., 1998). Dies geschieht durch Aktivierung des Caspase 3-Systems (Gao et al., 1999a,b). Deswegen wurde auch die Mutante KH1 auf ihre Fähigkeit zur Induktion von Apoptose untersucht. Es konnte jedoch kein Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden (Hägele, persönliche Mitteilungen). Es ist daher wahrscheinlicher, dass der Stamm durch eine unspezifische Mutation

keine Nekrose der Zellen mehr hervorruft. Kirby et al. (1998 a,b) beobachteten bei Legionelleninfektionen mit hohen Infektionsdosen durch Insertion einer Pore in die Wirtsmembran eine osmotische Lyse der Wirtszellen. Während beim Wildtyp von *L. pneumophila* Corby bei einer MOI von 10 ebenfalls bereits nach wenigen Stunden ein Anschwellen der Zellen zu beobachten war, so unterblieb dies bei Infektion mit dem Stamm KH1. Nähere Aufschlüsse über die möglichen Ursachen dieses Phänotyps könnten beispielsweise Versuche zur Komplementierung mit Hilfe einer *Legionella*-Genbank liefern.

Interessant ist auch die hohe Homologie zwischen den Proteinen des Flagellenexportsystems (Fli/Flh-Proteine) und anderen virulenzassoziierten Typ III Exportsystemen, wie beispielsweise zu den *Yersinia* Typ III Sekretions-Proteinen (Ysc/Lcr-Proteine), welche die „*Yersinia* secreted proteins“ (Yops) ausschleusen oder den Exportsystemen von *Shigella* (Mxi/Spa-Proteine). Bei einigen Bakterien sind die dazugehörigen Gene auf sogenannten Pathogenitätsinseln lokalisiert, wie bei *S. typhimurium* (SP1) oder *E. coli* (LEE) (Lee, 1997). Möglicherweise wurde im Laufe der Evolution der bereits existierende Flagellenexportapparat von einigen Bakterien für die Sekretierung von Virulenzfaktoren umgewandelt (Macnab, 1996). Kürzlich konnte für *Yersinia enterocolitica* gezeigt werden, dass das Flagellenexportsystem selber zum Ausschleusen von Virulenzfaktoren genutzt wird, wie beispielsweise für die Sekretion der virulenzassoziierte Phospholipase YpIA (Young et al., 1999).

Diese Möglichkeit ist bei *Legionella* noch nicht genauer untersucht. Es wurde bislang lediglich ein Gen (*fliI*) identifiziert und mutiert, das 59% Identität auf Proteinebene zu FliI von *E. coli*, sowie 40% Identität zu Spa47 of *S. flexneri* aufweist. Dieses besitzt also Ähnlichkeiten zu Proteinen der F₀F₁-ATPase-Familie, welche Bestandteile des Flagellen Typ III Sekretionssystems sind und vermutlich über Hydrolyse von Nukleotiden den Translokationsprozess energetisch ermöglichen (Merriam et al., 1997). Allerdings wurde noch nicht untersucht, ob eine *fliI*-negative Mutante tatsächlich, abgesehen von Flagellen-Proteinen, einen Unterschied im Muster der sekretierten Proteine aufweist.

Zusammenfassend ist in Tabelle 11 die Bedeutung der Flagelle und der Motilität für verschiedene virulenzrelevante Vorgänge, die in dieser Arbeit untersucht wurden, jeweils für die Wirtszellen *A. castellanii* und HL-60 Zellen, dargestellt.

Tabelle 11: Funktion der Flagelle, bzw. der Motilität von *Legionella* für virulenzrelevante Vorgänge*

Vorgang	<i>A. castellanii</i>	HL-60 Zellen
Auffinden der Zellen	+	+
Adhärenz	-	-
Invasion	+	++
Vermehrung, hohe MOI	-	-
Vermehrung, niedrige MOI	-	+
Lyse der Zellen	-	-

*Attenuierung einer *flaA*- bzw. *motA*-negativen Mutante um den Faktor:

- weniger als fünf
- + zwischen fünf und 20
- ++ zwischen 25 und 150

5.3. Untersuchungen zur Regulation der Flagellengene

Es konnte bereits gezeigt werden, dass das *flaA*-Gen durch eine Reihe von Umweltfaktoren reguliert wird. Dazu gehören beispielsweise die Temperatur (Ott et al., 1991b), die Osmolarität, die Viskosität und der pH-Wert des Mediums (Heuner et al., 1999). Außerdem verhindert das Vorhandensein von Aminosäuren als Energiequelle die Expression des Flagellins. Dieser Mechanismus der Katabolit-Repression wird auch für die Verhinderung des Übergangs der Legionellen in den virulenten Phänotyp, die sogenannte „mature form“ (Hoffman, 1997), verantwortlich gemacht, welcher erst beim Eintritt in die stationäre Phase hervorgerufen wird. Gibt man zu Bakterien einer stationären Kultur wieder Aminosäuren, wie z. B. Serin oder Threonin, so wird die Konversion zum virulenten und flagellierten Stadium verhindert (Byrne et al., 1997). Auch in dieser Arbeit konnte diese wachstumsabhängige Regulation beobachtet werden. Im Gegensatz zu Legionellen aus der stationären Phase konnte bei Bakterien aus der exponentiellen Phase keine oder nur eine sehr schwache Flagellinbande mittels Westernblot-Analyse detektiert werden. Auch waren die Bakterien lichtmikroskopisch betrachtet nicht motil, sondern wurden dies erst zu Beginn der stationären Phase. Daher wurden für die Infektionsassays nur Legionellen aus der frühen stationären Phase mit lichtmikroskopisch nachgewiesener Motilität verwendet. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch während der Infektion von Protozoen oder Makrophagen, wobei die intrazellulären Bakterien erst zu Ende der Infektion motil wurden, um dann sofort nach Aufplatzen der Zelle loschwimmen und einen

neuen Wirt suchen zu können. Parallel kam es zu einer morphologischen Veränderung der Legionellen, wobei die intrazellulär gewachsenen Bakterien deutlich kürzer wurden und eine verdickte Zellwand aufwiesen, wie elektronenmikroskopisch überprüft.

5.3.1. Der Faktor FlaR und andere Regulatorgene

Bei der Suche nach Regulationsgenen, die für dieses Phänomene verantwortlich sein könnten, gelang es Klaus Heuner, ein *Legionella*-Gen zu identifizieren, das große Homologien zu DNA-bindenden Genen der LysR-Familie aufwies (Heuner, 1997). Im folgenden konnte durch Bandshift-Experimente gezeigt werden, dass dieses Gen *flaR* tatsächlich DNA-Bindeeigenschaften hat, und sowohl an seinen eigenen Promotor, wie auch zu einem geringeren Prozentsatz an den Flagellinpromotor binden kann (Heuner et al, 2000). Daher liegt die Vermutung nahe, dass *flaR* die Regulation der Flagelle beeinflussen könnte.

Um zu untersuchen, inwieweit der Promotor dieses Regulators tatsächlich in *Legionella* aktiv ist, oder ob beispielsweise eine Induktion im intrazellulären Milieu stattfindet, wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Klaus Heuner Promotorgenfusionen der Gene *flaR* und des im 5'-Bereich liegenden ORF234 mit dem „green fluorescent protein“ (GFP) unter verschiedenen Bedingungen im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Als Negativkontrolle diente ein promotorloses GFP-Konstrukt, als Positivkontrolle eine Fusion des GFP mit dem konstitutiv transkribierten *mip*-Promotor (Köhler, 2000). Dabei konnte festgestellt werden, dass der *flaR*-Promotor, sowie zu einer etwas schwächeren Ausprägung auch der ORF234-Promotor, tatsächlich in *Legionella* aktiv ist. Es leuchtete jedoch, ebenso wie bei dem *gfp:P_{mip}*-Konstrukt, immer nur ein Teil der Bakterien. Am stärksten war die Fluoreszenz bei den elongierten Formen. Eine Erklärung hierfür liegt möglicherweise in einer gestörten Regulation dieser Zellen, bei der es zu einer verstärkten Aktivierung des FlaR-Faktors kommen könnte. Es wurde kein Unterschied zwischen Legionellen, die auf Agarplatten oder in Flüssigmedium gewachsen waren, festgestellt, jedoch war eine Temperaturabhängigkeit zu beobachten. Die Expression beider Gene war bei 37°C deutlich höher als bei 30°C. Diese Regulation verläuft also genau entgegengesetzt zur Regulation von *flaA*, welches bei 30°C stärker exprimiert wird als bei 37°C (Ott et al., 1991). Bei Experimenten im Amöbensystem war der *flaR*-Promotor, und in geringerem Maß der ORF234-Promotor, auch intrazellulär aktiv. Dies wurde an der Zunahme der intrazellulär leuchtenden Bakterien nach 24 h deutlich. Da eine Quantifizierung der GFP-Lichtemission im Fluoreszenz-Mikroskop nur sehr

schlecht möglich ist, konnten keine genauen Aussagen über eine wachstumsphasenabhängige Regulation gemacht werden. Besser wäre hier eine Fusion des Promotors mit den Reportergenen *luxAB* oder *lacZ* und anschließende Quantifizierung im Luminometer oder ELISA-Reader. Eine intrazellulär stärkere Aktivierung des Promotors konnte jedoch nicht beobachtet werden. Ob es möglicherweise wachstumsphasenabhängig wieder zu einem Abschalten des Promotors kommt, könnte auch durch Fusionen mit einem instabilen GFP untersucht werden. Da das verwendete GFP_{mut2}-Protein eine Halbwertszeit von über 24 h besitzt, würde eine eventuelle nachträgliche Reprimierung durch das noch vorhandene leuchtende GFP überdeckt (Cormack et al., 1996).

Um zu untersuchen, inwieweit das Vorkommen des Regulators FlaR ein allgemeines Phänomen innerhalb der Gattung *Legionella* darstellt, wurde die DNA von 12 *L. pneumophila*-Stämmen, sowie von 14 weiteren *Legionella*-Spezies mittels Southern Hybridisierung auf das Vorhandensein eines homologen Gens untersucht. Dabei zeigten alle *L. pneumophila*-Stämme ein einheitliches Bild und hybridisierten sowohl unter niedrigen als auch hohen Stringenzbedingungen mit einer *flaR*-spezifischen Sonde. Bei den nicht-*pneumophila* Stämmen konnte auch unter niedrigen Stringenzbedingungen kein Signal erhalten werden, wodurch der Schluss naheliegt, dass es sich hierbei um ein *L. pneumophila*-spezifisches Regulationssystem handelt. Es wäre natürlich auch möglich, dass die Homologie des Gens innerhalb der einzelnen Stämme so gering ist, dass die entsprechenden DNA-Abschnitte bei den gewählten Bedingungen nicht hybridisierten. Da *L. pneumophila* jedoch als häufigster Verursacher einer Legionellose auftritt und höchstwahrscheinlich das größte Virulenzpotential der verschiedenen *Legionella*-Spezies aufweist (Lück, 1997; Fields, 1996), liegt die Vermutung nahe, dass diese Spezies im Laufe der Evolution verschiedene Eigenschaften erworben haben muss, welche sie von den anderen unterscheidet. Durch die Sequenzierung benachbarter Gene könnte beispielsweise geklärt werden, ob der Faktor FlaR eventuell auf einer Art Pathogenitätsinsel zusammen mit noch weiteren benachbarten *L. pneumophila*-spezifischen virulenzrelevanten Genen vorkommt. Bei vielen anderen Bakterien, wie z. B. *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Helicobacter pylori* oder *S. typhimurium* sind bereits Pathogenitätsinseln beschrieben worden (Blum et al., 1994; Carniel et al., 1996; Censini et al., 1996; Mills et al., 1995). Erst kürzlich konnte eine Genregion bei *L. pneumophila* identifiziert werden, auf der Gene für ein Konjugationssystem lokalisiert sind (*lvr*-Gene), die einen vom Restgenom abweichenden GC-Gehalt (44 % statt 39 %) aufweisen, also möglicherweise über horizontalen Gentransfer von anderen Organismen übernommen wurden (Segal et al., 1999c).

Es konnte ebenfalls ein weiteres regulatorisches Gen (*ligA*) identifiziert werden, das spezifisch nur bei *L. pneumophila*-Stämmen vorkommt und verschiedene Virulenzeigenschaften reguliert (Fettes et al., 2000). Deletionsmutanten zeigen eine verminderte zytotoxische und hämolytische Aktivität und eine nahezu komplette Reduktion der intrazellulären Vermehrung in dem Protozoenwirt *A. castellanii*. Inwieweit der Regulationsfaktor *flaR* einen Einfluss auf die Virulenz von *L. pneumophila* hat, muss durch entsprechende knock-out Mutanten noch gezeigt werden.

Ein weiterer Faktor, welcher eine Reihe von Flagellengenen reguliert ist der σ^{28} -Faktor FliA. Dieser wurde durch Komplementation einer *Bacillus subtilis* *fliA*-Mutante aus *L. pneumophila* kloniert (Heuner et al., 1997). Außerdem wurde gezeigt, dass der *flaA*-Promotor von *L. pneumophila* *fliA*-abhängig transkribiert wird. Da bekannt ist, dass *fliA* bei anderen Bakterien neben *flaA* eine Reihe von weiteren Flagellengenen der „Stufe III“ reguliert (Macnab 1996) und möglicherweise noch weitere unbekannte Funktionen haben könnte, wurde in dieser Arbeit ein Konstrukt zur Herstellung einer *fliA*-negativen Mutante kloniert, auf dem 403 Basen des *fliA* Gens deletiert und durch Integration einer Kanamycin^R-Kassette ersetzt wurden. Dieses Konstrukt kann nun mittels eines „Suicide“-Vektors in das Genom von *Legionella* eingebracht werden. Allerdings ist hierbei die Möglichkeit zu berücksichtigen, dass es sich bei *fliA* auch um ein für *Legionella* essentielles Gen handeln könnte (Heuner, pers. Mitteilung).

Da an der Spitze der Flagellen-Regulationshierarchie (vgl. Kapitel 2.4.2.) bei vielen Bakterien die Master-Regulatorproteine FlhD/C stehen (Macnab, 1996), wäre es ebenfalls interessant, auch bei *Legionella* die entsprechenden Masterregulator-Gene zu identifizieren und zu mutagenisieren. Bei *E. coli* wurde gezeigt, dass das FlhD-Protein nicht nur für den Aufbau der Flagelle verantwortlich ist, sondern dass über dieses Protein ebenso die Zellteilungsrate abhängig von der Wachstumsphase gesteuert wird (Prüß et al., 1996). Auch bei *P. mirabilis* beobachtet man bei Reduktion der *flhD/C*-Transkription neben der verringerten Expression der Flagellengene eine reduzierte Elongation der Zellen. (Furness et al., 1997). Für Yersinien besteht ein Zusammenhang zwischen Motilität und Expression eines Invasins durch koordinierte Regulation durch *flhD/C* (Badger et al., 1998). Bei *Serratia liquefaciens* wurde eine *flhD*-abhängige Regulation der sekretierten Phospholipase beobachtet (Givskov et al., 1995). Young et al., 1999 konnten zeigen, dass *flhD*-negative Mutanten von *Y. enterocolitica* neben dem Defekt in der Flagellierung auch einen Defekt in der Expression und der Sekretion bestimmter Virulenzfaktoren (wie z. B. der virulenzassoziierten Phospholipase YplA) aufweisen. Ihre Arbeit bewies neben der Tatsache, dass die *yplA*-Expression ebenfalls über

den Flagellen-Masterregulator FlhD reguliert wird, dass das Flagellen Typ III Exportsystem nicht nur zur Sekretion der Flagellen-assoziierten Proteine verwendet wird, sondern auch zum Export verschiedenster Enzyme. Dies ist auch ein Hinweis darauf, dass sich die virulenzassoziierten Typ III Sekretionssysteme, welche innerhalb der für die Sekretion verantwortlichen Gene zum Teil hohe Homologien zu Genen des Flagellenexportapparats aufweisen (wie z. B. die Spa-Proteine von *Shigella* oder die YsC-Proteine von *Yersinia*), im Laufe der Evolution aus den bereits vorhandenen Flagellen-Exportsystemen entwickelt haben könnten (Harshey et al., 1996). Mittlerweile konnte auch bei *Xenorhabdus nematophilus* diese koordinierte Regulation von Motilität, Enzymaktivität und Virulenz nachgewiesen werden. *FlhD*-negative Mutanten zeigten neben der Reduktion der Flagellinproduktion auch eine Reduktion der extrazellulären lipolytischen und hämolytischen Aktivität (Givaudan et al., 2000).

5.3.2. Komplementation der *flaA*- und *motA*-negativen Mutanten

Während der Komplementation der Mutante KH3, bei der das *flaA*-Gen durch eine integrierte Kanamycin-Kassette unterbrochen worden war, zeigte sich, dass eine Komplementation durch Einbringen des kompletten *flaA*-Gens auf einem high-copy oder low-copy Plasmid nicht möglich war. Obwohl durch Northernblot-Analyse gezeigt werden konnte, dass das *flaA*-Gen ausgehend vom *flaA*-Promotor monocistronisch mit einem Transkript von 1600 bp abgelesen wird und sich hinter dem Gen Terminatorstrukturen befinden (Heuner et al., 1995), erfolgte bei den komplementierten Stämmen nur eine sehr schwache Expression des Flagellins. Auch der Aufbau von Flagellen wurde nicht beobachtet. Es konnte also die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass die eingebaute Kanamycin-Kassette vielleicht einen „downstream“-Effekt auf die nachfolgenden Gene *flaG*, *fliD* und *fliS* ausüben könnte, wodurch die Polymerisation des Flagellins verhindert würde. Daher wurde für die Komplementation auch ein Plasmid konstruiert, auf dem diese drei Gene zusammen mit dem *flaA*-Gen lokalisiert waren. Auch diese Methode war nicht erfolgreich. Schließlich gelang die Komplementation durch Insertion des intakten *flaA*-Gens direkt im 5'-Bereich des von der Kassette unterbrochenen *flaA*. Dies deutet daraufhin, dass es durch die inserierte Kassette nicht zu einer Beeinträchtigung der Expression der nachfolgenden Gene gekommen war, denn dann müsste der Effekt auch bei der Komplementante CD10 weiterhin zu beobachten sein. Es handelt sich also vermutlich um eine Frage der Kopienzahl des *flaA*-Gens, das möglicherweise auf

einem Plasmid die komplexe Regulation der Flagellengene gestört und zu einer negativen Rückkopplung geführt hat. Die Präsentation des *flaA*-Gens als Einzelkopie im Chromosom erzielte dann die gewünschte Komplementation. Auch bei anderen Bakterien sind Fälle aufgetreten, bei denen eine Komplementation von mutierten Flagellengen nur schwer oder nur zum Teil zu erreichen war. Beispielsweise konnte eine *fliI*-Mutante von *L. pneumophila*, bei der das Gen für ein Protein des Flagellen Typ III Sekretionssystem durch eine Kanamycin-Kassette unterbrochen worden war, nur durch Einbringen eines Cosmids mit der gesamten Region von 30 kb teilweise komplementiert werden. Es waren dabei trotzdem nur 50 % der Bakterien im Vergleich zum Wildtyp flagelliert (Merriam et al., 1997). Bei *Helicobacter pylori* war die Komplementation einer Mutation des Flagellings *flaA* nur durch Komplementation von *flaA* in Kombination mit einem zweiten Flagelligen *flaB* möglich, da es auf das stöchiometrische Verhältnis der beiden Flagelline zueinander ankam. Auch bei Flagellin-Mutanten von *Rhizobium meliloti* wurde die Beobachtung gemacht, dass plasmidkomplementierte Mutanten nur 20 – 30 % der Beweglichkeit des Wildtyps besaßen und die Flagellen insgesamt weniger und kürzer waren, was ebenfalls auf eine Deregulation des Flagellen-Regulons durch das Einbringen zusätzlicher *flaA*-Kopien hindeutet (Pleier et al., 1989).

Bei der Komplementation der *motA*-Mutante von *L. pneumophila* ergab sich in dieser Arbeit ebenfalls die Schwierigkeit, dass durch Plasmid-kodiertes Einbringen der Gene *motA* und *motB*, die aufgrund der Überlappung von 26 bp vermutlich als Operon transkribiert werden, keine Komplementation erreicht wurde. Die genaue Regulation von *motA* bei *Legionella* ist bisher noch nicht aufgeklärt. Zwischen dem *motA*-Gen und dem „upstream“ liegenden *fliA* befinden sich nur 11 bp, sodass ein putativer Promotor mit dem *fliA*-Gen überlappen würde. 29 bp vor dem *motA*-Startcodon findet man bei *L. pneumophila* Philadelphia I tatsächlich Promotor-ähnliche Sequenzen (TTCACA-N₂₄-TATTA), die auf einen σ^{70} -Promotor hindeuten. Eine Primer-Extensionsanalyse zeigte jedoch multiple Kettenabbrüche, sodass ein Transkriptionsstartpunkt nicht festgelegt werden konnte (Kapfhammer, 1998). Sequenzierung der Region bei *L. pneumophila* Corby ergibt an dieser Stelle die Sequenz TTCACA-N₂₄-CATTA, die noch mehr von der *E. coli* σ^{70} -Konsensus-Sequenz von TTGACA-N₁₇-TATAAT abweicht (Helmann et al., 1988). Daher ist die Wahrscheinlichkeit größer, dass der eigentliche Promotor im „upstream“-Bereich vor einem anderen Flagelligen liegt, wie das auch schon beispielsweise bei *B. burgdorferi* beschrieben wurde (Ge et al, 1997a und b). Eine Northernblot-Analyse könnte hierüber Klarheit bringen. Es wurde daher zur Komplementation auch ein Plasmid konstruiert, bei welchem die beiden Gene unter der Kontrolle des konstitutiv

transkribierten *mip*-Promotors standen (Köhler et al., 2000). Leider konnte nicht überprüft werden, ob es bei den damit komplementierten *motA*-Mutanten tatsächlich zu einer Expression der Proteine kam, da kein *mot*-spezifischer Antikörper als Nachweis der Proteine zur Verfügung stand. Möglich wäre beispielsweise, dass zwar die Transkription der Gene stattfand, es jedoch ähnlich wie bei der *flaA*-Mutante durch die plasmidbedingte höhere Kopienzahl zu einer Art Deregulation der Flagellen-Regulationskaskade kam und somit keine funktionelle Flagelle aufgebaut werden konnte. Der konstitutive *mip*-Promotor birgt auch die Gefahr, dass die Gene zu einem falschen Zeitpunkt transkribiert werden. Bei *E. coli* und *B. subtilis* wird die Transkription des *motAB*-Operons nämlich durch *fliA* (σ^{28} -Faktor) gesteuert, womit es zu den Genen der „Stufe III“ des Flagellenregulons gehört (Mirel et al., 1992). Hingegen wird das Flagellen/Motilitätsoperon von *B. burgdorferi* von einem σ^{70} -ähnlichen Promotor aktiviert (Ge et al., 1997b). Bei *Rhodobacter sphaeroides* wurde ein σ^{54} -abhängiger Promotor beschrieben (Shah et al., 1995). Es spricht daher vieles dafür, dass die Komplementation eher durch Integration des intakten *motAB*-Lokus zurück ins Chromosom erreicht werden kann, um einem Eingriff in die Regulationskaskade vorzubeugen. Auch eine Transposon-Mutation im *flhF*-Gen von *P. putida*, welches in einer Flagellenregion zusammen mit *fliA* und *motA* liegt, konnte nur durch das erneute Einbringen der 9,5 kb Region als Einzelkopie in das Chromosom komplementiert werden, obwohl durch RT-PCR gezeigt worden war, dass die „downstream“-liegenden Gene unabhängig von der Insertion des Transposons weiterhin exprimiert wurden. Einbringen des *flhF*-Gens auf einem Plasmid (5-8 Kopien pro Zelle) unter der Kontrolle des *tac*-Promotors bewirkte eine Überexpression des Gens. Daraus resultierte eine Verdreifachung der Flagellenanzahl pro Bakterium im Vergleich zum Wildtyp, wobei jedoch der Schwärmdedefekt der Mutante weiter bestehen blieb (Pandza et al., 2000).

Die Flagellenregulation verläuft bei *Legionella* also ähnlich wie bei anderen Bakterien, doch lassen sich aufgrund der schon beschriebenen Kopplung der Motilität mit dem virulenten Phänotyp auch Besonderheiten feststellen (Abb. 39). Im Unterschied zu den Bakterien *E. coli* und *S. typhimurium* erfolgt bei *Legionella* die Flagellenbildung ausschließlich während des Übergangs in die stationäre Phase, wobei vermutlich durch Aminosäure-Mangel die sogenannte „stringent response“ ausgelöst wird (Swanson et al., 2000; Cashel et al., 1996). Der dabei beobachtete Anstieg an ppGpp setzt dann einerseits möglicherweise über die Regulatoren FlhD/C die Flagellen-Kaskade in Gang, andererseits wird gleichzeitig über noch unbekannte Mechanismen auch die Expression weiterer Virulenzfaktoren getriggert.

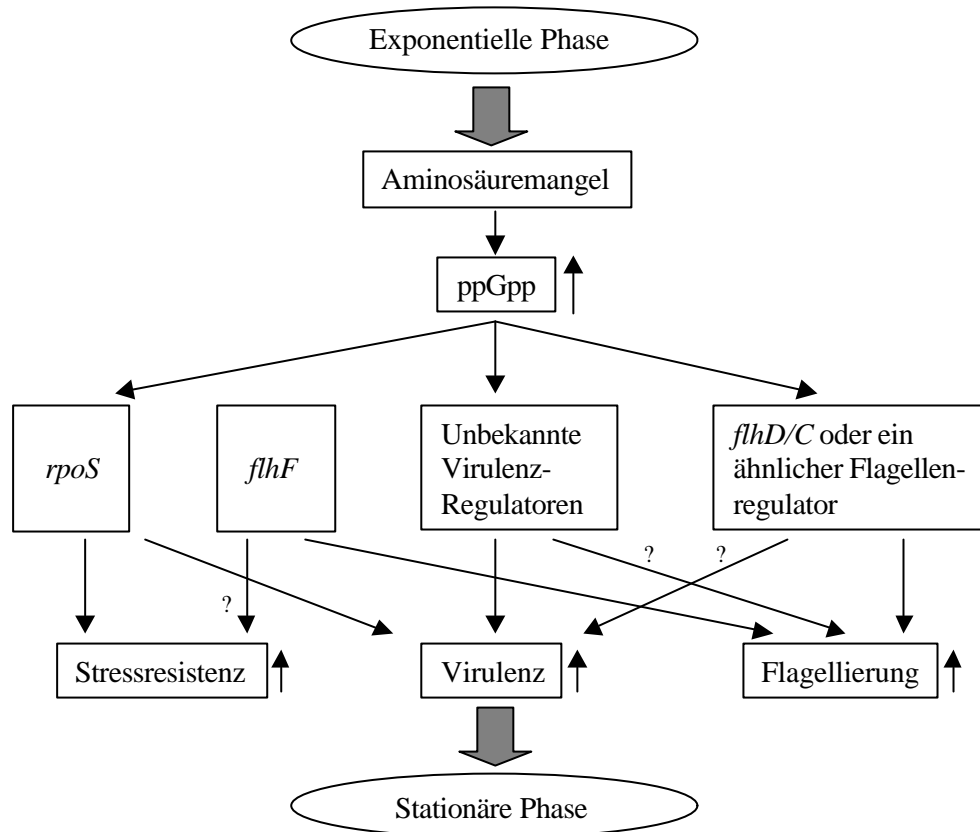


Abb. 39: Schematische Darstellung der Kopplung von Virulenz und Flagellierung bei *Legionella* (modifiziert nach Swanson et al., 2000). Die Konversion zum virulenten Phänotyp erfolgt vermutlich über einen durch Nahrungsdepletion verursachten Anstieg der intrazellulären ppGpp-Konzentration gegen Ende der exponentiellen Phase. Dies setzt verschiedene Regulationsmechanismen in Gang, welche schließlich zu einer koordinierten Expression von Virulenzeigenschaften, Stressresistenz und Motilität führen.

Bei *S. typhimurium* konnte im Gegensatz dazu über *fliA* sowie den anti- σ^{28} -Faktor *flgM* eine gegenläufige Regulierung der virulenzassoziierten Gene und der Flagellierung gezeigt werden (Schmidt et al., 1994). Auch hat im Gegensatz zu *E. coli* RpoS auf die Virulenz der Legionellen vermutlich keinen so großen Einfluss, da eine *Legionella rpoS*-Mutante gegenüber humanen HL-60 Zellen einen wildtypischen Phänotyp hatte und nur in Amöben kein Wachstum zeigte (Hales et al., 1999). Eventuell spielt der in dieser Arbeit untersuchte FlaR-Faktor eine Rolle für die koordinierte Regulation oder die in dieser Arbeit sequenzierten putativen Flagellen-Regulatoren FlhF oder MotR. Bei *P. putida* beeinflusst FlhF wie bereits erwähnt neben der Flagellierung auch die Hungerinduzierte generelle Stressantwort, wodurch es zu einer erhöhten Resistenz gegenüber äußeren Einflüssen sowie einer erhöhten Virulenz kommt (Pandza et al., 2000). Auch kann die Möglichkeit einer Regulation von Motilität und Virulenz über „Quorum sensing“ nicht ausgeschlossen werden, wengleich bisher noch kein solches System für Legionellen beschrieben wurde. Weiterführende Untersuchungen der Flagellenregulation bei *Legionella* bieten also die vielversprechende Möglichkeit weitere „globale“ Virulenz-Regulatoren zu identifizieren.

6. Literaturverzeichnis

Abu Kwaik, Y. A., B. I. Eisenstein, N. C. Engleberg (1993): Phenotypic modulation by *Legionella pneumophila* upon infection of macrophages. *Infect. Immun.* 61: 1320-29

Abu Kwaik, Y., N. C. Engleberg (1994): Cloning and molecular characterization of a *Legionella pneumophila* gene induced by intracellular infection and by various *in vitro* stress conditions. *Mol. Microbiol.* 13: 243-251.

Abu Kwaik, Y., L. L. Pederson (1996): The use of differential display-PCR to isolate and characterize a *Legionella pneumophila* locus induced during the intracellular infection of macrophages. *Mol. Microbiol.* 21: 543-556.

Abu Kwaik, Y. A., L. Y. Gao, O. S. Harb, B. J. Stone (1997): Transcriptional regulation of the macrophage-induced gene (*gspA*) of *Legionella pneumophila* and phenotypic characterization of a null mutant. *Mol. Microbiol.* 24: 629-42

Abu Kwaik, Y. A., (1998): Induced expression of the *Legionella pneumophila* gene encoding a 20-kilodalton protein during intracellular infection. *Infect. Immun.* 66: 203-212

Abu Kwaik, Y. A., (1998b): Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3127-33

Adeleke, A., J. Pruckler, R. Benson, T. Rowbotham, M. Halablab, B. Fields (1996): *Legionella*-like amebal pathogens - phylogenetic status and possible role in respiratory disease. *Emerg. Inf. Dis.* 2: 225-230.

Amann, R. I., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux, D. A. Stahl (1990): Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1919-1925.

Andrews, H., J. P. Vogel, R. R. Isberg (1998): Identification of linked *Legionella pneumophila* genes essential for intracellular growth and evasion of the endocytic pathway. *Inf. Immun.* 66: 950-58

Arora, S. K., B. W. Ritchings, E. C. Almira, S. Lory, R. Ramphal (1997): A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. *J. Bacteriol.* 179(17): 5574-81

ATCC (1985): American Type Culture Collection. Catalogue of Protists - Algae and Protozoa. 16th edition. Supplement: Media formulations.

Badger, J. L., V. L. Miller (1998): Expression of invasins and motility are coordinately regulated in *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* 180: 739-800

Baine, W. B. (1988): A phospholipase C from the Dallas 1E strain of *Legionella pneumophila* serogroup 5: purification and characterization of conditions for optimal activity with an artificial substrate. *J. Gen. Microbiol.* 134: 489-498

Bangsborg J. M., P. Gerner-Smidt, H. Colding, N. Fiehn, B. Brunn, N. Hioby (1995): Restriction fragment length polymorphism of rRNA genes for molecular typing of members of the family Legionellaceae. *J. Clin. Microbiol.* 33: 402-6

- Bellinger-Kawahara, C., M. A. Horwitz** (1990): Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane proteine (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. *J. Exp. Med.* 172: 1201-10
- Bender, L., M. Ott, R. Marre, J. Hacker** (1990): Genome analysis of *Legionella* sp. by orthogonal field alternation gel electrophoresis (OFAGE). *FEMS Microbiol. Lett.* 72: 253-258
- Bender, L., M. Ott, A. Debes, U. Rdest, J. Heesemann, J. Hacker** (1991): Distribution, expression and long-range-mapping of legiolysin gene (*lly*-)specific DNA sequences in legionellae. *Infect. Immun.* 59: 3333-3336.
- Berger, K. H., R. R. Isberg** (1993): Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* 7: 7-19
- Berger, K. H., J. J. Merriam, R. R. Isberg** (1994): Altered intracellular targeting properties associated with mutations in the *Legionella pneumophila dotA* gene. *Mol. Microbio.* 14: 809-822
- Beyersbergen, A., A. D. Dulk-Ras, R. A. Schilperoort, P. J. J. Hooykaas** (1992): Conjugative transfer by the virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Science* 256: 1324-1327
- Black, W. J., F. D. Quinn, L. S. Tompkins** (1990): *Legionella pneumophila* zinc metalloprotease is structurally and functionally homologous to *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J. Bacteriol.* 172: 2608-13
- Blair, D. F., H. C. Berg** (1990): The MotA protein of *E. coli* is a proton-conducting component of the flagellar motor. *Cell* 60: 439-449
- Blair, D. F.** (1995): How bacteria sense and swim. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 489-522
- Blander, S. J., L. Szeto, H. A. Shuman, M. A. Horwitz** (1990): An immunoprotective molecule, the major secretory protein of *Legionella pneumophila*, is not a virulence factor in a guinea pig model of legionnaires´disease. *J. Clin. Invest.* 86: 817-24
- Blander, S. J., M. A. Horwitz** (1989): Vaccination with the major secretory protein of *Legionella pneumophila* induces cell-mediated and protective immunity in a guinea pig model of legionnaires´disease. *J. Exp. Med.* 169: 691-705
- Blum, G., M. Ott, A. Lischewski, A. Ritter, H. Imrich, H. Tschape, J. Hacker** (1994): Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infect. Immun.* 62: 606-614
- Bognar, A. L., C. Osborne, B. Shane** (1987): Primary structure of the *Escherichia coli folC* gene and its folylpolyglutamate synthetase-dihydrofolate synthetase product and regulation of expression by an upstream gene. *J. Biol. Chem.* 262: 12337-43
- Bollin, G. E., J. F. Plouffe, M. F. Para, B. Hackman** (1985): Aerosols containing *Legionella pneumophila* generated by shower heads and hot-water faucets. *Appl. Env. Microbiol.* 50: 1128-31
- Bosshardt, S. C., R. F. Benson, B. S. Fields** (1997): Flagella are a positive predictor for virulence in *Legionella*. *Microbial Pathogenesis* 23: 107-112
- Boyer, H. W., D. Roulland-Dussoix** (1969): A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41: 459-472.

- Bozue, J. A., W. Johnson** (1996): Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infect. Immun.* 64: 668-673.
- Brand, B. C., A. B. Sadosky, H. A. Shuman** (1994): The *Legionella pneumophila icm* locus: a set of genes required for intracellular multiplication in human macrophages. *Mol. Microbiol.* 14: 797-808.
- Brand, B. C., J. Hacker** (1997): The biology of *Legionella* infection. In: Kaufmann, S. H. E. (ed.): Host response to intracellular pathogens. R. G. Landes Company, Austin: 291-312.
- Brenner, D. J., A. F. Steigerwalt, J. E. McDade** (1979): Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. *Ann. Intern. Med.* 90: 656-658
- Brieland, J., M. McClain, L. Heath, C. Chrisp, G. Huffnagle, M. LeGendre, M. Hurley, J. Fantone, C. Engleberg** (1996): Coinoculation with *Hartmannella vermiformis* enhances replicative *Legionella pneumophila* lung infection in a murine model of Legionnaires' disease. *Infect. Immun.* 64: 2449-2456.
- Brouqui, P., D. Raoult** (1993): Proteinase K-sensitive and filterable phagosome-lysosome fusion inhibiting factor in *Afipia felis*. *Microb. Pathog.* 15(3): 187-95.
- Butler, C. H., P. S. Hoffman** (1990): Characterization of a major 31 kilodalton peptido-glycan-bound protein of *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.* 172: 2401-07
- Byrne, B., M. S. Swanson** (1998): Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. *Infect. Immun.* 66: 3029-34
- Campos-Garcia, J., R. Najera, L. Camarena, G. Soberon-Chavez** (2000): The *Pseudomonas aeruginosa motR* gene involved in regulation of bacterial motility. *FEMS* 184: 57-62
- Carniel, E., I. Guilvout, M. Prentice** (1996): Characterization of a large chromosomal „high-pathogenicity island“ in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* 178: 6743-51
- Cashel, M., D. R. Gentry, V. J. Hernandez, C. Vinella** (1996): The stringent response. in Neidhardt, F. C., R. Curtiss, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, M. Riley (eds), *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2nd edition, ASM Press, Washington, 1458-96
- Catrenich, C. E., W. Johnson** (1989): Characterization of the selective inhibition of growth of virulent *Legionella pneumophila* by supplemented Mueller-Hinton medium. *Infect. Immun.* 57: 1862-64
- Censini, S., C. Lange, Z. Xiang, J. E. Crabtree, P. Ghiara, M. Borodovsky, R. Rappuoli, A. Covacci** (1996): Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 14648-53
- Chadsey, M. S., J. E. Karlinsey, K. T. Hughes** (1998): The flagellar anti- σ factor FlgM actively dissociates *Salmonella typhimurium* σ^{28} RNA polymerase holoenzyme. *Genes Development* 12: 3123-36
- Chandler, F. W., I. L. Roth, J. L. Callaway, B. M. Thomason, R. E. Weaver** (1980): Flagella on Legionnaires' disease bacteria. *Ann. Intern. Med.* 93: 711-714.
- Chesnokova, O., J. B. Coutinho, I. H. Kahn, M. S. Mikhail, C. I. Kado** (1997): Characterization of flagella genes of *Agrobacterium tumefaciens*, and the effect of a bald strain on virulence. *Mol. Microbiol.* 23: 579-90

- Chun, S. Y., J. S. Parkinson** (1988): Bacterial motility: Membrane topology of the *Escherichia coli* MotB protein. *Science* 239: 276-78
- Ciacchi-Woolwine, F., I. C. Blomfield, S. H. Richardson, S. B. Mizel** (1998): *Salmonella* flagellin induces tumor necrosis factor alpha in a human promonocytic cell line. *Infect. Immun.* 66: 1127-34
- Cianciotto, N. P., B. I. Eisenstein, C. H. Mody, G. B. Toews, N. C. Engleberg** (1989): A *Legionella pneumophila* gene encoding a species-specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection. *Infect. Immun.* 57: 1255-62
- Cianciotto, N. P., B. S. Fields** (1992): *Legionella pneumophila mip* gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5188-5191
- Cirillo, J. D., S. Falkow, L. S. Tompkins** (1994): Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Inf. Immun.* 62: 3254-61
- Cirillo, S. L. G., J. Lum, J. D. Cirillo** (2000): Identification of novel loci involved in entry by *Legionella pneumophila*. *Microbiology* 146: 1345-59
- Clemens, D. L., M. A. Horwitz** (1993): Hypoexpression of major histocompatibility complex molecules on *Legionella pneumophila* phagosomes and lysophagosomes. *Infect. Immun.* 61: 2803-12
- Clemens, D. L., M. A. Horwitz** (1995): Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J. Exp. Med.* 191: 257-270
- Colbourne, J. S., P. J. Dennis, J. V. Lee, M. R. Bailey** (1987): Legionnaires' disease: reduction in risks associated with foaming in evaporative cooling towers. *Lancet.* 1(8534):684
- Cormack, B. P., R. H. Valdivia, S. Falkow** (1996): FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173: 33-38.
- Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, H. M. Lappin-Scott** (1995): Microbial biofilms. In *Annual Review of Microbiology*, Vol. 49, Ornston, L. N., A. Ballows, E. P. Greenberg (eds.), Palo Alto, CA, Annu. Rev. Inc. 711-45
- Crowle, A., R. Dahl, E. Ross, M. May** (1991): Evidence that vesicles containing living virulent *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium avium* in cultured human macrophages are not acidic. *Infect Immun.* 59: 1823-31
- Dasgupta N, S. K. Arora, R. Ramphal** (2000): *fleN*, a gene that regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 182(2): 357-64.
- Desjardins, M., A. Descoteaux** (1997): Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* 185: 2061-68
- Donnenberg, M. S., J. B. Kuper** (1991): Construction of an *iae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect. Immun.* 59: 4310-17
- Dowling, J. N., A. K. Saha, R. H. Glew** (1992): Virulence factors of the family *Legionellaceae*. *Microbiol. Rev.* 56: 32-60.
- Dreyfus, L. A** (1987): Virulence associated ingestion of *Legionella pneumophila*. *Microb. Pathogen.* 3: 45-52

- Edelstein, P. H., M. A. C. Edelstein, F. Higa, S. Falkow** (1999): Discovery of virulence genes of *Legionella pneumophila* by using signature tagged mutagenesis in a guinea pig pneumonia model. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 8190-8195.
- Edelstein, P. H.** (2000): Therapy of Legionnaires' disease with newer macrolides and fluoroquinolones. 5th International Conference on *Legionella*, September 26-29, 2000, Ulm/Germany
- Elliot, J. A., W. Johnson** (1981): Immunological and biochemical relationships among flagella isolated from *Legionella pneumophila* serogroups 1, 2, and 3. Infect. Immun. 33: 602-610
- Elliot, J. A., W. C. Winn** (1986): Treatment of alveolar macrophages with Cytochalsin D inhibits uptake and subsequent growth of *Legionella pneumophila*. Infect. Immun. 51: 31-36
- Engleberg, N. C., C. Carter, D. R. Weber, N. P. Cianciotto, B. I. Eisenstein** (1989): DNA sequence of *mip*, a *Legionella pneumophila* gene associated with macrophage infectivity. Infect. Immun. 57: 1263-1270.
- Feldman, M., R. Bryan, S. Rajan, L. Scheffler, S. Brunnert, H. Tang, A. Prince** (1998): Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. Infect. Immun. 66: 43-51
- Fernandez, R. C., S. M. Logan, S. H. S. Lee, P. S. Hoffmann** (1996): Elevated levels of *Legionella pneumophila* stress protein Hsp60 early in infection of human monocytes and L929 cells correlate with virulence. Infect. Immun. 64: 1968-76
- Fettes, P. S., M. Susa, J. Hacker, R. Marre** (2000): Characterization of the *Legionella pneumophila* gene *ligA*. Int. J. Med. Microbiol. 290: 239-50
- Fields, B. S., J. M. Barbaree, G. N. Sanden, W. E. Morrill** (1990): Virulence of a *Legionella anisa* strain associated with Pontiac fever: an evaluation using protozoan, cell culture, and guinea pig models. Infect. Immun. 58: 3139-42
- Fields, B. S.** (1993): *Legionella* and protozoa: interaction of a pathogen and its natural host. In: Barbaree, J. M., R. F. Breimann, A. P. Dufour (eds.): *Legionella: current status and emerging perspectives*. ASM, Washington DC: 129-136.
- Fields, B. S.** (1996): The molecular ecology of legionellae. Trends Microbiol. 4: 286-290.
- Fischer, G., H. Hang, B. Ludwig, K. H. Mann, J. Hacker** (1992): Mip protein of *Legionella pneumophila* exhibits peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase (PPIase) activity. Mol. Microbiol. 6: 1375-1383
- Flieger, A., S. Gongab, M. Faigle, H. A. Mayer, U. Kehrer, J. Mussotter, P. Bartmann, B. Neumeister** (2000): Phospholipase A secreted by *Legionella pneumophila* destroys alveolar surfactant phospholipids. FEMS Microbiol. Lett. 188: 129-33
- Fliermans, C. B., W. B. Cherry, L. H. Orrison, S. J. Smith, D. L. Tison, D. H. Pope** (1981): Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. Appl. Environ. Microbiol. 41: 9-16.
- Fraser, D. W., T. R. Tsai, W. Orenstein, W. E. Parkin, H. J. Beecham, R. G. Sharrar, J. Harris, G. F. Mallison, S. M. Martin, J. E. McDade, C. C. Shepard, P. S. Brachman, and the Field Investigation Team** (1977): Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. N. Engl. J. Med. 297: 1189-1197.
- Friedman, A. M., S. R. Long, S. E. Brown, W. J. Buikuna, F. M. Ausubel** (1987): Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of mutants. Gene 18: 289-296

- Friedman, R. L., B. H. Iglewski, R. D. Miller** (1980): Identification of a cytotoxin produced by *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 29: 271-74
- Friedman, R. L., J. E. Lochner, R. H. Bigley, B. H. Iglewski** (1982): The effects of *Legionella pneumophila* toxin on oxidative processes and bacterial killing of human polymorphonuclear leukocytes. *J. Infect. Dis.* 146: 328-34
- Furness, R. B., G. M. Fraser, N. A. Hay, C. Hughes** (1997): Negative feedback from a *Proteus* class II flagellum export defect to the *flhDC* master operon controlling cell division and flagellum assembly. *J. Bacteriol.* 179: 5585-88
- Gabay, J. E., M. Blake, W. D. Niles, M. A. Horwitz** (1985): Purification of *Legionella pneumophila* major outer protein and demonstration that it is a porin. *J. Bacteriol.* 162: 85-91
- Gao, L.-Y., O. S. Harb und Y. Abu Kwaik** (1997): Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa. *Infect. Immun.* 65: 4738-4746.
- Gao, L.-Y., O. S. Harb und Y. Abu Kwaik** (1998): Identification of macrophage-specific infectivity loci (*mil*) of *Legionella pneumophila* that are not required for infectivity of protozoa. *Infect. Immun.* 66: 883-892.
- Gao, L.-Y., Y. Abu Kwaik** (1999a): Apoptosis in macrophages and alveolar epithelial cells during early stages of infection by *Legionella pneumophila* and its role in cytopathogenicity. *Infect. Immun.* 67: 862-870.
- Gao, L.-Y., Y. Abu Kwaik** (1999b): Activation of Caspase 3 during *Legionella pneumophila*-induced apoptosis. *Infect. Immun.* 67: 4886-94
- Garduño, R. A., E. Garduño und P. S. Hoffman** (1998b): Surface-associated Hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model. *Infect. Immun.* 66: 4602-4610.
- Garduño, R. A., F. D. Quinn und P. S. Hoffman** (1998a): HeLa cells as a model to study the invasiveness and biology of *Legionella pneumophila*. *Can. J. Microbiol.* 44: 430-440.
- Ge, Y., N. W. Charon** (1997a): Identification of a large motility operon in *Borrelia burgdorferi* by semirandom PCR chromosome walking. *Gene* 189: 195-201
- Ge, Y., I. G. Old, I. Saint Girons, N. W. Charon** (1997b): Molecular characterization of a large *Borrelia burgdorferi* motility operon which is initiated by a consensus sigma70 promoter. *J. Bacteriol.* 179: 2289-99
- Gibson, F. C., A. O. Tzianabos, F. G. Rodgers** (1994): Adherence of *Legionella pneumophila* to U-937 cells, guinea pig alveolar macrophages, and MRC-5 cells by a novel, complement-independent binding mechanism. *Can. J. Microbiol.* 40: 865-872
- Givaudan, A., A. Lanois** (2000): FlhDC, the flagellar master operon of *Xenorhabdus nematophilus*: requirement for motility, lipolysis, extracellular hemolysis, and full virulence in insects. *J. Bacteriol.* 182: 107-15
- Givskov, M., L. Eberl, G. Christiansen, M. J. Benedik, S. Molin** (1995): Induction of phospholipase- and flagellar synthesis in *Serratia liquefaciens* is controlled by expression of the flagellar master operon *flhD*. *Mol. Microbiol.* 15: 445-54

- Glagolev, A. N., V. P. Skulachev** (1978): The proton pump is a molecular engine of motile bacteria. *Nature* 272: 280-282
- Gregory, S. T., H. S. Steinman** (1996): Periplasmic copper-zinc superoxide dismutase of *Legionella pneumophila*: role in stationary phase survival. *J. Bacteriol.* 178: 1578-84
- Grimm, D., H. Merkert, W. Ludwig, K.-H. Schleifer, J. Hacker, B. C. Brand** (1998): Specific detection of *Legionella pneumophila*: construction of a new 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2686-2690.
- Hacker, J., G. Fischer** (1993): Immunophilins: structure-function relationship and possible role in microbial pathogenicity. *Mol. Microbiol.* 10: 445-456
- Hacker, J.** (2000): *Legionella pneumophila*. In: Hacker, J. und J. Heesemann (Hrsg.): Molekulare Infektionsbiologie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin: 231-235.
- Hägele, S.** (1998): Studien zur Induktion der *Legionella pneumophila*-spezifischen Apoptose in eukaryontischen Wirtszellen. Diplomarbeit Universität Würzburg.
- Hägele, S., J. Hacker, B. C. Brand** (1998): *Legionella pneumophila* kills human phagocytes but not protozoan host cells by inducing apoptotic cell death. *FEMS Microbiol. Lett.* 169: 51-58.
- Hägele, S., R. Köhler, H. Merkert, M. Schleicher, J. Hacker, M. Steinert** (2000): *Dictyostelium discoideum*: a new host model system for intracellular pathogens of the genus *Legionella*. *Cell. Microbiol.* 2: 165-171.
- Hales, L. M., H. A. Shuman** (1999a): The *Legionella pneumophila rpoS* gene is required for growth within *Acanthamoeba castellanii*. *J. Bacteriol.* 181: 4879-4889.
- Hales, L. M., H. A. Shuman** (1999b): *Legionella pneumophila* contains a type II general secretion pathway required for growth in amoebae as well as for secretion of the Msp protease. *Infect. Immun.* 67: 3662-3666.
- Hammer, B. K., M. S. Swanson** (1999): Co-ordination for *Legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp. *Mol. Microbiol.* 33: 721-31
- Hanahan, D.** (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Harb, O. S., C. Venkataraman, B. J. Haack, L. Gao, Y. Abu Kwaik** (1998): Heterogeneity in the attachment and uptake mechanisms of the Legionnaires' disease bacterium, *Legionella pneumophila*, by protozoan hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 126-132
- Harb, O. S., Y. Abu Kwaik** (2000): Characterization of a macrophage-specific infectivity locus (*milA*) of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 68: 368-76
- Harshey, R. M., A. Toguchi** (1996): Spinning tails: homologies among bacterial flagellar systems. *T. Microbiol.* 4 (6): 226-231
- Hawes, M. C., L. Y. Smith** (1989): Requirement for chemotaxis in pathogenicity of *Agrobacterium tumefaciens* on roots of soil-grown pea plants. *J. Bacteriol.* 171: 5668-71
- Helbig, J. H., C. Krönert, P. C. Lück, N. P. Cianciotto** (2000): Virulence-associated function of *Legionella pneumophila* lipopolysaccharide demonstrated by host cell invasion assays. *Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.*, 100th, Los Angeles, CA, USA

- Helmann, J. D., M. J. Chamberlin** (1988): Structure and function of bacterial sigma factors. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 839-72
- Helmann, J. D.** (1991): Alternative sigma factors and the regulation of flagellar gene expression. *Mol. Microbiol.* 5: 2875-82
- Heuner, K., L. Bender-Beck, B. C. Brand, P. C. Lück, K.-H. Mann, R. Marre, M. Ott, J. Hacker** (1995): Cloning and genetic characterization of the flagellum subunit gene (*flaA*) of *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Infect. Immun.* 63: 2499-2507.
- Heuner, K.** (1997): Molekularbiologische Untersuchungen zur Funktion und Expression der Flagelle von *Legionella pneumophila*. Dissertation, Universität Würzburg
- Heuner, K., J. Hacker, B. C. Brand** (1997): The alternative sigma factor σ^{28} of *Legionella pneumophila* restores flagellation and motility to an *Escherichia coli fliA* mutant. *J. Bacteriol.* 179: 17-23
- Heuner, K., B. C. Brand, J. Hacker** (1999): The expression of the flagellum of *Legionella pneumophila* is modulated by different environmental factors. *FEMS* 175: 69-77
- Heuner, K., C. Dietrich, M. Steinert, U. B. Göbel, J. Hacker** (2000): Cloning and characterization of a *Legionella pneumophila*-specific gene encoding a member of the LysR family of transcriptional regulators. *Mol. Gen. Genet.* 264: 204-11
- Hickey, E. K., N. P. Cianciotto** (1994): Cloning and sequencing of the *Legionella pneumophila fur* gene. *Gene* 143: 117-121
- Hickey, E. K., N. P. Cianciotto** (1997): An iron- and *fur*-repressed *Legionella pneumophila* gene that promotes intracellular infection and encodes a protein with similarity to the *Escherichia coli* aerobactin synthetases. *Infect. Immun.* 65: 133-143.
- Hoffman, P. S., C. Butler, F. D. Quinn** (1989): Cloning and temperature-dependent expression in *E. coli* of a *Legionella pneumophila* gene coding for a genus common 60 kilodalton antigen. *Infect. Immun.* 57: 1731-1739
- Hoffman, P. S., L. Houston, C. A. Butler** (1990): *Legionella pneumophila htpAB* heat shock operon: nucleotide sequence and expression of the 60-kilodalton antigen in *Legionella pneumophila*-infected HeLa cells. *Infect. Immun.* 58: 3380-3387
- Hoffman, P. S., J. H. Seyer, C. A. Butler** (1992a): Molecular characterization of the 28- and 31-kilodalton subunits of the *Legionella pneumophila* major outer membrane protein. *J. Bacteriol.* 174: 908-913.
- Hoffman, P. S., M. Ripley, R. Weeratna** (1992b): Cloning and nucleotide sequence of a gene (*ompS*) encoding the major outer membrane protein of *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.* 174: 914-920.
- Hoffman, P. S.** (1997): Invasion of eukaryotic cells by *Legionella pneumophila*: a common strategy for all hosts? *Can. J. Infect. Dis.* 8: 139-146.
- Homma, M., H. Fujita, S. Yamatuchi, T. Iino** (1984): Excretion of unassembled flagellin by *Salmonella typhimurium* mutants deficient in hook-associated proteins. *J. Bacteriol.* 159: 1056-59
- Horwitz, M. A., S. C. Silverstein** (1981): Interaction of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) with human phagocytes. II. Antibody promotes binding of *L. pneumophila* to monocytes but does not inhibit intracellular multiplication. *J. Exp. Med.* 153: 398-406

- Horwitz, M. A.** (1983a): Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *J. Exp. Med.* 158: 1319-31
- Horwitz, M. A.** (1983b): The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J. Exp. Med.* 158 2108-2126
- Horwitz, M. A.** (1984): Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. *Cell* 36: 27-33.
- Horwitz M. A., F. R. Maxfield** (1984): *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *J. Cell. Biol.* 99: 1936-1943
- Hussong, D., R. R. Colwell, M. O'Brien, E. Weiss, A. D. Pearson, R. M. Weiner, W. D. Burge** (1987): Viable *Legionella pneumophila* not detectable by culture on agar media. *Biotechnology* 5: 947-950.
- Ikeda, T., S. Asakura, R. Kamiya** (1985): Cap on the tip of *Salmonella* flagella. *J. Mol. Biol.* 184: 735-37
- Ikeda, T., K. Oosawa, H. Hotani** (1996): Self-assembly of the filament capping protein, FliD, of bacterial flagella into an annular structure. *J. Mol. Biol.* 259 (4): 679-86
- Imada, K, F. Vonderviszt, Y. Furukawa, K. Oosawa, K. Namba** (1998): Assembly characteristics of flagellar cap protein HAP2 of *Salmonella*: decamer and pentamer in the pH-sensitive equilibrium. *J. Mol. Biol.* 277 (4): 883-91
- Imae, Y.** (1991): Use of Na⁺ as an alternative to H⁺ in energy transduction. *In* New Era of Bioenergetics. Mukohata, Y. (ed.). Tokyo: Academic Press, pp. 197-221
- Jain, B., B. C. Brand, P. C. Lück, B. di Berardino, J. Hacker** (1996): An oxalocacetate decarboxylase homologue influences the intracellular survival of *Legionella pneumophila* FEMS 145: 273-9
- Jepras, R. I., R. B. Fitzgeorge, A. Baskerville** (1985): A comparison of virulence of two strains of *Legionella pneumophila* based on experimental aerosol infection of guinea pigs. *J. Hyg.* 95: 29-38.
- Jones, B. D., C. A. Lee, S. Falkow** (1992): Invasion by *Salmonella typhimurium* is affected by the direction of flagellar rotation. *Infect. Immun.* 60: 2475-80
- Josenhans, C., R. L. Ferrero, A. Labigne, S. Suerbaum** (1999): Cloning and allelic exchange mutagenesis of two flagellin genes of *Helicobacter felis*. *Mol. Microbiol.* 33: 350-362
- Kapfhammer, D.** (1998): Identifizierung und Charakterisierung von Motilitäts-assoziierten Genen in *Legionella pneumophila*. Diplomarbeit Universität Würzburg.
- Kawagishi, I., V. Muller, A. W. Williams, V. M. Irikura** (1992): Subdivision of flagellar region III of the *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* chromosomes and identification of two additional flagellar genes. *J. Gen. Microbiol.* 138: 1051-65
- Kawakami, K., Y. Nakamura** (1990): Autogenous suppression of an opal mutation in the gene encoding peptide chain release factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 8432-36
- Keevil, C. W.** (2000): Biofilms and *Legionella*. 5th International Conference on *Legionella*, September 26-29, 2000, Ulm/Germany

- Kilvington, S., J. Price**, (1990): Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *J. Appl. Bacteriol.* 68: 519-525
- Kim, J. S., J. H. Chang, S. I. Chung, J. S. Yum** (1999): Molecular cloning and characterization of the *Helicobacter pylori fliD* gene, an essential factor in flagellar structure and motility. *J. Bacteriol.* 181: 6969-76
- King, C. H., B. S. Fields, E. B. Shotts, E. H. White** (1991): Effects of Cytochalasin D and Methylamin on intracellular growth of *Legionella pneumophila* in amoeba and human monocyte-like cells. *Infect. Immun.* 59: 758-63
- Kirby, J. E., R. R. Isberg** (1998a): Legionnaires' disease: the pore macrophage and the legion of terror within. *Trends Microbiol.* 6: 256-258.
- Kirby, J. E., J. P. Vogel, H. L. Andrews, R. R. Isberg** (1998b): Evidence for pore-forming ability by *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* 27: 323-336
- Klose, K. E., J. J. Mekalanos** (1998): Differential regulation of multiple flagellins in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 180: 303-316
- Köhler, R.** (2000): Entwicklung eines GFP-Reportersystems in *Legionella* und molekularbiologische Funktionsanalyse des *Legionella* Mip-Proteins. Dissertation Universität Würzburg.
- Köhler, R., A. Bubert, W. Goebel, M. Steinert, J. Hacker, B. Bubert** (2000): Expression and use of the green fluorescent protein as a reporter system in *Legionella pneumophila*. *Mol. Gen. Genet.* 262: 1060-1069.
- Kuchta, J. M., J. S. Navratil, M. E. Shepherd, R. M. Wadowsky, J. N. Dowling, S. J. States** (1993): Impact of chlorine and heat on the survival of *Hartmannella vermiformis* and subsequent growth of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4096-4100
- Kuchta, J. M., S. J. States, A. M. McNamara, R. M. Wadowsky, R. B. Yee** (1983): Susceptibility of *Legionella pneumophila* to chlorine in tap water. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 1134-39
- Kutsukake, K., T. Iino.** (1994): Role of the FliA-FlgM regulatory system on the transcriptional control of the flagellar regulon and flagellar formation in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 12: 3598-3605
- Kutsukake, K., N. Ide** (1995): Transcriptional analysis of the *flgK* and *fliD* operons of *Salmonella typhimurium* which encode flagellar hook-associated proteins. *Mol. Gen. Genet.* 247: 275-81
- Lee, C. A.** (1997): Type III secretion systems: machines to deliver bacterial proteins into eukaryotic cells? *T. Microbiol.* 5: 148-156
- Lee, J. V., A. A. West** (1991): Survival and growth of *Legionella* species in the environment. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 70: 121S-129S.
- Li, S. J., J. E. Cronan** (1993): Growth rate regulation of *Escherichia coli* acetyl coenzyme A carboxylase, which catalyzes the first committed step of lipid biosynthesis. *J. Bacteriol.* 175: 332-40
- Liles, M. R., P. H. Edelstein, N. P. Cianciotto** (1999): The prepilin peptidase is required for protein secretion by and the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* 31: 959-970.
- Liles, M. R., T. A. Scheel, N. P. Cianciotto** (2000): Discovery of a nonclassical siderophore, legiobactin, produced by strains of *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.* 182: 749-757.

- Liu, X., P. Matsumura** (1994): The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. *J. Bacteriol.* 176: 7345-51
- Lockman, H. A., R. Curtiss** (1990): *Salmonella typhimurium* mutants lacking flagella or motility remain virulent in BALB/c mice. *Infect. Immun.* 58: 137-43
- Lück, P. C., J. H. Helbig** (1997): Legionellaceae. *In*: Tiller, F. W. (Hrsg.): Diagnostische Bibliothek 46: 1-12.
- Ludwig, B.** (1992): Molekulare Untersuchungen zur Struktur und Funktion von *Legionella*-spezifischen Membranproteinen. Dissertation, Universität Würzburg
- Lüneberg, E., U. Zähringer, Y. A. Knirel, D. Steinmann, M. Hartmann, I. Steinmetz, M. Rohde, J. Köhl, M. Frosch** (1998): Phase-variable expression of lipopolysaccharide contributes to the virulence of *Legionella pneumophila*. *J. Exp. Med.* 188: 49-60
- Lüneberg, E.** (2000): Phase variation of lipopolysaccharide and other virulence determinants in *Legionella pneumophila*. 5th International Conference on *Legionella*, September 26-29, 2000, Ulm/Germany
- Macnab, R. M.** (1992): Genetics and biogenesis of bacterial flagella. *Annu. Rev. Genet.* 26: 131-158
- Macnab, R. M.** (1996): Flagella and Motility. p. 123-145. *In* F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.) *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2nd ed., vol. 1. ASM Press, Washington, D. C.
- Manz, W., R. Amann, R. Szewzyk, U. Szewzyk, T.-A. Stenström, P. Hutzler, K.-H. Schleifer** (1995): *In situ* identification of *Legionellaceae* using 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal laser scanning microscopy. *Microbiology* 141: 29-39.
- Marra, A., H. A. Shuman** (1989): Isolation of a *Legionella pneumophila* restriction mutant with increased ability to act as a recipient in heterospecific matings. *J. Bacteriol.* 171: 2238-40
- Marra, A., H. A. Shuman** (1990): The HL60 model for the interaction of human macrophages with Legionnaires' disease bacterium. *J. Immun.* 144: 2738-44
- Marra, A., S. J. Blander, M. A. Horwitz, H. A. Shuman** (1992): Identification of a *Legionella pneumophila* locus required for intracellular multiplication in human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 9607-11
- Marston, B. J., H. B. Lipman, R. F. Breiman** (1994): Surveillance for legionnaires' disease: risk factors for morbidity and mortality. *Arch. Intern. Med.* 154: 2417-22
- Maurin, M. A., A. M. Benoliel, P. Bongrand, D. Raoult** (1992): Phagolysosomes of *Coxiella burnetii*-infected cell lines maintain an acidic pH during persistent infection. *Infect Immun.* 60: 5013-16
- McDade, J. E., C. C. Shepard, D. W. Fraser, T. R. Tsai, M. A. Redus, W. R. Dowdle, and the Laboratory Investigation Team.** (1977): Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N. Engl. J. Med.* 297: 1197-1203.
- Mengaud, J. M., M. A. Horwitz** (1993): The major iron-containing protein of *Legionella pneumophila* is an aconitase homologous with the human iron-responsive element-binding protein. *J. Bacteriol.* 175: 5666-5676.

- Miller, R. D., J. M. Hammel** (1985): Biochemistry and physiology of *Legionella*. p. 83-107, in S. M. Katz (ed.) Legionellosis, vol. 1, CRC Press, Boca Raton, Florida
- Mills, D. M., V. Bajaj, C. A. Lee** (1995): A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella typhimurium* invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. Mol. Microbiol. 15: 749-759
- Milton, D. L., R. O'Toole, P. Hörstedt, H. Wolf-Watz** (1996): Flagellin A is essential for the virulence of *Vibrio anguillarum*. J. Bacteriol. 178: 1310-19
- Mirel, D. B., V. M. Lustre, M. J. Chamberlin** (1992): An operon of *Bacillus subtilis* motility genes transcribed by the σ^D form of RNA polymerase. J. Bacteriol. 174: 4197-4204
- Mobley, H. L. T., R. Belas, V. Lockett, G. Chippendale, A. L. Trifillis, D. E. Johnson, J. W. Warren** (1996): Construction of a flagellum-negative mutant of *Proteus mirabilis*: effect on internalization by human renal epithelial cells and virulence in a mouse model of ascending urinary tract infection. Infect. Immun. 64: 5332-40
- Mody, C. H., R. Paine, M. S. Shahrabadi** (1993): *Legionella pneumophila* replicates within rat alveolar epithelial cells. J. Infect. Dis. 167: 1138-45
- Moffat, J. F., P. H. Edelstein, D. P. Regula, J. D. Cirillo, L. S. Thompkins** (1994): Effects of an isogenic Zn-metalloprotease-deficient mutant of *Legionella pneumophila* in a guinea-pig pneumonia model. Mol. Microbiol. 12: 693-705
- Monack, D. M., J. Mecsas, N. Chori, S. Falkow** (1997): *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. Proc. Nat. Acad. Sci. 94(19): 10385-90
- Morales, V. M.** (1991): A series of wide-host-range low copy number vectors that allow direct screening of recombinants. Gene. 97: 39-47
- Morisaki, H., S. Nagai, H. Ohshima, E. Ikemoto, K. Kogure** (1999): The effect of motility and cell-surface polymers on bacterial attachment. Microbiology 145: 2797-2802
- Müller, A., D. Günther, F. Düx, M. Naumann, T. F. Meyer, T. Rudel** (1999): Neisserial porin (PorB) causes rapid calcium influx in target cells and induces apoptosis by the activation of cysteine proteases. EMBO J. 18: 339-352
- Müller, A., J. Hacker, B. Brand** (1996): Evidence for apoptosis of human macrophage-like HL-60 cells by *Legionella pneumophila*. Infect. Immun. 64: 1973-80
- O'Connell, W. A., E. K. Hickey, N. P. Cianciotto** (1996): A *Legionella pneumophila* gene that promotes hemin binding. Infect. Immun. 64: 842-48
- O'Toole, R., D. L. Milton, H. Wolf-Watz** (1996): Chemotactic motility is required for invasion of the host by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. Mol. Microbiol. 19: 625-637
- O'Toole, F. A., R. Kolter** (1998): Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Mol. Microbiol. 30: 295-304
- Ohnishi, K., K. Kutsukake, H. Suzuki, T. Iino** (1990): Gene *fliA* encodes an alternative sigma factor specific for the flagellar operons in *Salmonella typhimurium*. Mol. Gen. Genet. 221: 139-47
- Ormonde, P., P. Hörstedt, R. O'Toole, D. L. Milton** (2000): Role of motility in adherence to and invasion of a fish cell line by *Vibrio anguillarum*. J. Bacteriol. 182: 2326-28

- Ortiz-Roque, C. M., T. C. Hazen** (1987): Abundance and distribution of Legionellaceae in Puerto Rican waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2231-2236.
- Ott, M., L. Bender, R. Marre, J. Hacker** (1991a): Pulsed field electrophoresis of genomic restriction fragments for the detection of nosocomial *Legionella pneumophila* in hospital water supplies. *J. Clin. Microbiol.* 29: 813-815
- Ott, M., P. Messner, J. Heesemann, R. Marre, J. Hacker** (1991b): Temperature-dependent expression of flagella in *Legionella*. *J. Biol. Chem.* 267: 16460-66
- Pandza, S., M. Baetens, C. H. Park, T. Au, M. Keyhan, A. Matin** (2000): The G-protein FlhF has a role in polar flagellar placement and general stress response induction in *Pseudomonas putida*. *Mol. Microbiol.* 36: 414-23
- Pearlman, E., A. H. Jiwa, N. C. Engleberg, B. I. Eisenstein** (1988): Growth of *Legionella pneumophila* in a human macrophage like cell line. *Microb. Pathog.* 5: 87-95
- Pine, L., P. Nash** (1985): Culture media. p. 1051-1092, *In*: Lennette, E. H., A. Balows, W. J. Hausler, H. J. Shadomy (eds.) *Manual of clinical microbiology*, 4th ed., American Society for Microbiology, Washington D. C.
- Pleier, E., R. Schmitt** (1989): Identification and sequence analysis of two related flagellin genes in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 171: 1467-75
- Pratt, L. A., R. Kolter** (1998): Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* 30: 285-93
- Pruckler, J. M., R. F. Benson, M. Moyenuddin, W. E. Martin, B. I. Fields** (1995): Association of flagellum expression and intracellular growth of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 63: 4928-32
- Prüß, B. M., P. Matsumura** (1996): A regulator of the flagellar regulon of *Escherichia coli*, *flhD* also affects cell division. *J. Bacteriol.* 178: 668-74
- Purcell, M., H. A. Shuman** (1998): The *Legionella pneumophila icmGCDJBF* genes are required for killing of human macrophages. *Infect. Immun.* 66: 2245-55
- Ricci, M. L., A. Torosantucci, P. Chiani, A. Pinto, M. Castellani-Pastoris** (2000): Protection against lethal challenge by *Legionella pneumophila* in A/J mice following immunization with flagella. 5th International Conference on *Legionella*, September 26-29, 2000, Ulm/Germany
- Rittig, M. G., A. Krause, T. Haupl, U. E. Schaible, M. Modolell, M. D. Kramer, E. Lutjen-Drecoll, M. M. Simon, G. R. Burmester** (1992): Coiling phagocytosis is the preferential phagocytic mechanism for *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun.* 60(10): 4205-12.
- Rittig, M. G., G. R. Burmester, A. Krause** (1998): Coiling phagocytosis: when the zipper jams, the cup is deformed. *Trends Microbiol.* 6: 384-388
- Rodgers, F. G., F. C. Gibson** (1993): Oponin-independent adherence and intracellular development of *Legionella pneumophila* within U-937 cells. *Can. J. Microbiol.* 39: 718-722
- Rodgers, F. G., P. W. Greaves, A. D. Macrae, M. J. Lewis** (1980): Electron microscopic evidence of flagella and pili on *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Pathol.* 33: 1184-1188

- Rosey, E. L., M. J. Kennedy, R. J. Yancey Jr.** (1996): Dual *flaA1 flaB1* mutant of *Serpulina hyodysenteriae* expressing periplasmic flagella is severely attenuated in a murine model of swine dysentery. *Infect. Immun.* 64: 4154-62
- Rowbotham, T. J.** (1986): Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man. *Isr. J. Med. Sci.* 22: 678-689
- Roy, C. R., K. H. Berger, R. R. Isberg** (1998): *Legionella pneumophila* DotA protein is required for early phagosome trafficking decisions that occur within minutes of bacterial uptake. *Mol. Microbiol.* 28: 663-74
- Roy, C. R.** (1999): Trafficking of the *Legionella pneumophila* phagosome. *ASM News* 65: 416-421
- Russo, J., X. Qu, I. Morozova, M. Chien, G. Segal, P. Zhang, H. Shuman** (2000): Sequence and analysis of the *Legionella pneumophila* genome. 5th International Conference on *Legionella*, September 26-29, 2000, Ulm/Germany
- Sadosky, A. B., J. W. Wilson, H. M. Steinman, H. A. Shuman** (1994): The iron superoxide dismutase of *Legionella pneumophila* is essential for viability. *J. Bacteriol.* 176: 3790-3799.
- Saha, A. I., J. N. Dowling, K. L. LaMarco, S. Das, A. T. Remaley, N. Olomu, M. T. Pope, R. H. Glew** (1985): Properties of an acid phosphatase from *Legionella micdadei* which blocks superoxide anion production by human neutrophils. *Arch. Biochem. Biophys.* 243: 150-160
- Saha, A. I., J. N. Dowling, N. K. Mukhopadhyay, R. H. Glew** (1988): Demonstration of two protein kinases in extracts of *Legionella micdadei*. *J. Gen. Microbiol.* 134: 1275-81
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis** (1989): *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schlesinger, L. S., C. G. Bellinger-Kawahara, N. R. Payne, M. A. Horwitz** (1990): Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J. Immunol.* 144: 2771-2780
- Schmitt, C. K., S. C. Darnell, V. L. Tesh, B. A. Stocker, A. D. O'Brien** (1994) Mutation of *flgM* attenuates virulence of *Salmonella typhimurium*, and mutation of *fliA* represses the attenuated phenotype. *J. Bacteriol.* 176(2): 368-77
- Segal, G., H. A. Shuman** (1997): Characterization of a new region required for macrophage killing by *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 65: 5057-5066.
- Segal, G., M. Purcell, H. A. Shuman** (1998): Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1669-1674.
- Segal, G., H. A. Shuman** (1998b): How is the intracellular fate of the *Legionella pneumophila* phagosome determined? *Trends Microbiol.* 6: 253-255.
- Segal, G., H. A. Shuman** (1999a): Possible origin of the *Legionella pneumophila* virulence genes and their relation to *Coxiella burnetii*. *Mol. Microbiol.* 33: 669-670
- Segal, G., H. A. Shuman** (1999b): *Legionella pneumophila* utilizes the same genes to multiply within *Acanthamoeba castellanii* and human macrophages. *Inf. Immun.* 67: 2117-24

- Segal, G., J. Russo, H. A. Shuman** (1999c): Relationships between a new type IV secretion system and the *icm/dot* virulence system of *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* 34: 799-809
- Seidel, K.**, (1990): Maßnahmen zur Verhütung und Bekämpfung von Legionellose. *Bundesgesundh.-bl.* 33: 59-63
- Shah, D. S. H., R. E. Sockett** (1995): Analysis of the *motA* flagellar motor gene from *Rhodobacter sphaeroides*, a bacterium with a unidirectional, stop-start flagellum. *Mol. Microbiol.* 17: 961-69
- Shuman, H. A., M. Purcell, G. Segal, L. Hales, L. A. Wiater** (1998): Intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*: human pathogen or accidental tourist? *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 225: 99-112.
- Sibley, L. D., E. Weidner, J. L. Krahenbuhl** (1985): Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature* 315: 416-419
- Simon, R., U. Priefer, A. Pühler** (1983): A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio-Technologie* 1: 784-791
- Solomon, J. M., A. Rupper, J. A. Cardelli, R. R. Isberg** (2000): Intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*, a system for genetic analysis of host-pathogen interactions. *Infect. Immun.* 68 (5): 2939-47
- Steinert, M., H. Engelhard, M. Flügel, E. Wintermeyer, J. Hacker** (1995): The Lly protein protects *Legionella pneumophila* from light but does not directly influence its intracellular survival in *Hartmannella vermiformis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2428-2430.
- Steinert, M., J. Hacker** (1996): *Legionella pneumophila*: Umweltbakterium und Erreger der Legionärskrankheit. *Biologie in unserer Zeit* 26: 8-15.
- Steinert, M., L. Emödy, R. Amann, J. Hacker** (1997): Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2256-2261.
- Steinman, H. M.** (1992): Construction of an *Escherichia coli* K-12 strain deleted for manganese and iron superoxide genes and its use in cloning the iron superoxide dismutase gene of *Legionella pneumophila*. *J. Mol. Gen. Genet.* 232: 427-30
- Stewart, B. J., L. L. McCarter** (1996): *Vibrio parahaemolyticus* FlaJ, a homologue of FliS, is required for production of a flagellin. *Mol. Microbiol.* 20: 137-149
- Stone, B. J., Y. Abu Kwaik** (1998): Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infect. Immun.* 66: 1768-75
- Sturgill-Koszycki, S., M. S. Swanson** (2000): *Legionella pneumophila* replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. *J. Exp. Med.* 192(9): 1261-72.
- Surman, D. B., L. H. G. Morton, C. W. Keevil, R. B. Fitzgeorge, A. Skinner** (2000): *Legionella pneumophila* proliferation is not dependent on intracellular replication. 5th International Conference on *Legionella*, September 26-29, 2000, Ulm/Germany
- Susa, M., J. Hacker, R. Marre** (1996): *De novo* synthesis of *Legionella pneumophila* antigens during intracellular growth in phagocytic cells. *Infect. Immun.* 64: 1679-1684.

- Susa, M., J. Helbig, R. Marre** (1999): Shedding of the *Legionella pneumophila* lipopolysaccharide during intracellular multiplication to vesicles of the host cells. *Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.*, 99th, Chicago, IL, USA
- Swanson, M. S., R. R. Isberg** (1991): Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic reticulum. *Infect. Immun.* 63: 3609-20
- Swanson, M. S., B. K. Hammer** (2000): *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 567-613
- Tang, P. W., C. Krishnan** (1993): *Legionella* antigenuria: Six-year study of broad spectrum enzyme-linked immunosorbent assay as a routine diagnostic test. In: „*Legionella* - current status and emerging perspectives“. J. M. Barbaree, R. F. Breiman, A. P. Dufour (eds.), American Society for Microbiology, 12-13
- Temple, L. M., A. A. Weiss, K. E. Walker, J. H. Barnes, V. L. Christensen, D. M. Miyamoto, C. B. Shelton, P. E. Orndorff** (1998): *Bordetella avium* virulence measured *in vivo* and *in vitro*. *Infect. Immun.* 66: 5244-51
- Thorpe, T. C., R. D. Miller** (1981): Extracellular enzymes of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 33: 632-35
- Tully, M., S. A. Sharpe, S. Asworth** (1992): Transposon mutagenesis in *Legionella pneumophila*. I.- Persistence of suicide and broad host-range plasmids. *Res. Microbiol.* 143: 471-79
- Van Asten, F., H. Hendriks, J. Koninkx, B. Van der Zeijst, W. Gaastra** (2000): Inactivation of the flagellin gene of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis strongly reduces invasion into differentiated Caco-2 cells. *FEMS*, 185: 175-9
- Vande Broek, A., V. Lambrecht, J. Vanderleyden** (1998): Bacterial chemotactic motility is important for the initiation of wheat root colonization by *Azospirillum brasiliense*. *Microbiology* 144: 2599-2606
- Venkataraman, C., B. J. Haack, S. Bondada, Y. Abu Kwaik** (1997): Identification of a Gal/GalNAc lectin in the protozoan *Hartmannella vermiformis* as a potential receptor for attachment and invasion by the Legionnaires' disease bacterium *Legionella pneumophila*. *J. Exp. Med.* 186: 537-547.
- Venkataraman, C., L.-Y. Gao, S. Bondada, Y. Abu Kwaik** (1998): Identification of putative cytoskeletal protein homologues in the protozoan host *Hartmannella vermiformis* as substrates for induced tyrosine phosphatase activity upon attachment to the Legionnaires' disease bacterium, *Legionella pneumophila*. *J. Exp. Med.* 188: 505-514.
- Vogel, J. P., H. L. Andrews, S. K. Wong, R. R. Isberg** (1998): Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science* 279: 873-876.
- Vogel, J. P., R. R. Isberg** (1999): Cell biology of *Legionella pneumophila*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 30-34.
- Weiss, E., M. G. Peacock, C. Williams** (1990): Glucose and glutamate metabolism of *Legionella pneumophila*. *Curr. Microbiol.* 4: 1-6
- Wiater, L. A., A. B. Sadosky, A. B. Shuman** (1994): Mutagenesis of *Legionella pneumophila* using Tn903dIIIacZ: identification of a growth-phase regulated pigmentation gene. *Mol. Microbiol.* 11: 641-53
- Williams, A., A. Baskerville, A. B. Dowsett, J. E. Conlan** (1987): Immunocytochemical demonstration of the association between *Legionella pneumophila*, its tissue-destructive protease, and pulmonary lesions in experimental Legionnaires' disease. *J. Pathol.* 153: 157-164

- Williams, J. G. K., K. J. Kubelick, J. A. Livak, J. A. Rafalski, S. V. Tingey** (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucleic. Acid. Res.* 18: 6531-6535
- Winn, W. C.** (1988): Legionnaires' disease: historical perspective. *Clin. Microbiol. Rev.* 1: 60-81.
- Wintermeyer, E., U. Rdest, B. Ludwig, A. Debes, J. Hacker** (1991): Characterization of legiolysin (Lly), responsible for haemolytic activity, color production and fluorescence of *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* 5: 1135-43
- Wintermeyer, E., M. Flügel, M. Steinert, K. H. Mann, J. Hacker** (1994): Sequence determination and mutational analysis of the *lly* locus of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 61: 1109-17
- Wintermeyer, E., B. Ludwig, M. Steinert, B. Schmidt, G. Fischer, J. Hacker** (1995): Influence of site specifically altered Mip proteins on intracellular survival of *Legionella pneumophila* in eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 63: 4576-4583.
- Wu, J., A. Newton** (1997): Regulation of the *Caulobacter* flagellar gene hierarchy; not just for motility. *Mol. Microbiol.* 24: 233-39
- Yamaguchi, S., H. Fujita, A. Ishihara, S. I. Aizawa, R. M. Macnab** (1986): Subdivision of flagellar genes of *Salmonella typhimurium* into regions responsible for assembly, rotation, and switching. *J. Bacteriol.* 166: 187-193
- Yao, R., D. H. Burr, P. Doig, T. J. Trust, H. Niu, P. Guerry** (1994): Isolation of motile and non-motile insertional mutants of *Campylobacter jejuni*: the role of motility in adherence and invasion of eukaryotic cells. *Mol. Microbiol.* 14: 883-93
- Yokoseki, T., K. Kutsukake, K. Ohnishi, T. Iino** (1995): Functional analysis of the flagellar genes in the *fliD* operon of *Salmonella typhimurium*. *Microbiology* 141: 1715-22
- Young, G. M., D. H. Schmiel, V. L. Miller** (1999): A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 6456-61
- Young, G. M., J. L. Badger, V. L. Miller** (2000): Motility is required to initiate host cell invasion by *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 68: 4323-26
- Yu, V. L., J. Zuravleff, L. Gavlik, M. H. Magnussen** (1983): Lack of evidence for person to person transmission of Legionnaires' disease. *J. Inf. Dis.* 147: 362
- Zähringer, U., Y. A. Knirel, B. Lindner, J. H. Helbig, A. Sonesson, R. Marre, E. T. Rietschel** (1995): The lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1 (strain Philadelphia 1): chemical structure and biological significance. *Prog. Clin. Biol. Res.* 392: 113-139
- Zhou, J., R. T. Fazio, D. F. Blair** (1995): Membrane topology of the MotA protein of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 251: 237-242
- Zuckman, D. M., J. B. Hung, C. R. Roy** (1999): Pore-forming activity is not sufficient for *Legionella pneumophila* phagosome trafficking and intracellular growth. *Mol. Microbiol.* 32: 990-1001
- Zychlinsky, A., M. C. Prevost, P. J. Sansonetti** (1992): *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* 358: 167-9

7. Anhang

7.1. Abkürzungen und chemische Formeln

Abb.	Abbildung
ACES	N-(2-Acetamido)-2-Aminoethansulfonsäure
A	Ampère
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
APS	Adenosinphosphosulfat
ATCC	“American Type Culture Collection”
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CDC	“Centers for disease control”
CFU	“colony forming units”
Cm/Cm ^R	Chloramphenicol/Chloramphenicol-Resistenz
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	“enzyme-linked immunosorbent assay”
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH, MeOH	Ethanol, Methanol
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactosid
k	kilo
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
Km/Km ^R	Kanamycin/Kanamycin-Resistenz
l	Liter
LD	Letale Dosis
<i>L. (p.)</i>	<i>Legionella (pneumophila)</i>
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
M	Mol
m	milli; bzw. Meter
μ	micro
min	Minuten
MOI	“multiplicity of infection”
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

N	diphenyl-Tetrazoliumbromid normal
n	nano
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NaOH	Natronlauge
Ω	Ohm
p	piko
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster (“open reading frame”)
PCR	“polymerase chain reaction”
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	Tetraethylmethyldiamin
Tet ^R	Tetracyclin-Resistenz
Tris (Base)	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	“Units”
ÜK	Übernachtskultur
ÜN	über Nacht (ca. 12 h)
UV	ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
XGal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β-D-Galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel

7.2. Sequenzen

Die kodierenden Sequenzen sind in Fettdruck dargestellt, überlappende Leserahmen sind unterstrichen. Anfang und Ende der Gene sind jeweils angegeben. Nicht eindeutig bestimmbare Basen werden durch Kleinbuchstaben repräsentiert.

Sequenz der *flaA*-Region (3'-Bereich von *flaA*):

ATGCTGATTACGCTGCTGAAATGGCTAGTTTGACCAAAAACCAAATCTGCAACAAGCAG
GTACAGCGATGTTGGCACAAGCTAATAGCCTACCGCAATCTGTATTATCTTTGTTAGGTC
GATAGGATGTCGCAATCGAAGTGCAGCAACAACCTGCACTTCGATTTCTTTATACTCGGT *STOP flaA*
TGATGGGTATAAAAAGGAGTAAGAAAAATGAGTATTGAACCTGTATCTTCAGTTAATAAG
START flaG
GCAGCCAAACAGATCAAATAAAAATAGTTGAGGAAGTCTCTAAGCCAGAAATTA AAAAT
ATGTTTTATGATTCCGCTTTGGATGCCGAAACAAAACAGGCGCTGGATAAAGCAACAGGT
TTGCTTCAAACATAATAACAGAGAAAATATCCGATAAAGTATTACGTAAAATGCCTTCT
GATGAGTATTTGCAATTACTAAGCTTGCTTGATGATATTATTAGTGGTTCTATAGACAAG
STOP flaG
CACGTTTAATAATTTGAAATATTT
ATTA AAAATTTGACTAGAACATAACAACATAGAAAAGGGATACTCTATGGAACCTCTCTT
START fliD
CACCAGGCGTAGGGTCAGGACTTGATGTAAAAAACTTGGTCGATGCGATAGTCACGGCAG
AAATAACTCCATCGCAAGTGCCTCATGATAAACAGTTAAACAGTGTCAATACAGAGTTGT
CGGCGCTTGGTCAATTA AAAAGCTATTTAACTAACTTGCAAACCTTCCTTAGCCAAGCTCT
CCAGTCTTAGCCAATTCTACACTATGAAATCAACCATTAGTGATCCGAATTACTTTTCCG
CTACTCTGGGGACTGGCGGACTAAAAATACTTATCAAATTGAAATACAAAAACTGGCGC
AACAACACAGTCTGGCAAGCTCTTACATGACTAATACTGGAAGCGGAACAATAACCATAG
ATTTTGGAACCTATAACAGTGATAAAACCACTTTTACACCGAATCCTTCCGCTACGTCAG
TCAACATAACCATTACGCCTGGCAACGaTAGCCTTGTTGCGGTACGAGATGcCATT AATA
ATACTAATTCAGGAATAACAGCCAGCATAGTTCAAGATAGCCAGGGCTCCAGGCTAACTA
TCACTTCGTCAAAAACCGGCGAAAATTATGCCATGAAAATTAGTGGTGGAGTTGCCTCAT
TGAATTATGATCCTACTATGGGAGTGAATTCATTA ACTGAAACAGTAGCAGCACAAAACA
GTA CTGTTAAAATTAACGGATTA ACTTTGGTTCAAAGTTCTAATCAATTGAATGAGGCAA
TAACTGGTGTACCATTGATCTAAAGAAAGCAGAGATTGGGgAAAATTGTCACCTTAACTG
TTGATGATAATAAAGATCAGCTCACAGGCTTAATCAACGAGTTCATAAAACAATAACAATG
ACACCATGACTTTTTTTAAACCAACTTAACTGGTTATAATAATGAAACCAAACAAGGAGGAG
TATTT CAGGGCGACCCTCAATTT CGCAATTTAAA ACTCAATTTAAACAAGTGGGCAACTA

CCCCTTTGGCTAACCAGG**a**AGG**a**CCAATCCGCTCATTAGCCGATTTGGGAATCATCACCA
 ATAAACAAGGTTTACTGGAAATCAAACAAGACAAGTTTAAAAGTGCCTCGATAATCACT
 ATAAAGAAATAGGAGCATTGTTTGCAAAAACAGCCAAGGCTAATGATACTGGCATAAACG
 TCAAATCCATTAATTCAACTGTCAAATCAGGTACCTATGATGTGGTGTGACTGAATTTA
 CTCCTGGAGTCAGCATGTCTGGAACAATAGGAGGCTTATCTGCTATATCATCCGATGGCA
 TTACATTGACAGGAAGTGCTGATTTGAGTGGTCTGTTCGATTAATGTATTTTCGGGGTCTG
 CCGGCTCCCGTGGACAAATAACTGTTACAGACGGTATTGCAGTCCAATTAAGTTCCTTGC
 TGGATGCTTACATTGAAATTAAGGCGATTTGGAGCAGAG**a**AAAGATCAACTCAATAATC
 AAGTCAAGCAATTGAATAAAATACAAAACGAAATTGATATCAGGCGCAAATCAATTGAAA
 CTCGCTATTTAAAACAATTCAGTCTCTGGACACTCTACTCAGCCAATTACAAAGCACTA
 GTGTTTTTCTATCCCAGCAATTAGCCAATTTACCCCAATTAATAATTGAAATAATAGGAGG
 TAATGAG**a**ATGAAAAACCTATATTCACAAATTTCCAGCCAATACAAAGCCATAGAGCTAC
 AAACCCGCATAGAAACAGCCTCCCTCATGAACTTATAGATTTATTACTTCAAGGAGCCC
 GATCTCACATTGCTACTGCTCAGGGTAATATACAGCGTAACCAAATTAAGAAAAAGGAG
 AACATATTGGCAAAG**c**CATTAGCATCATTGAAGGTTTAAAAATGAGTCTCAATCATGATA
 AAGGTGGCGAAATTGCCGAAAATTTACTCCAGTTATATGATTATGTTCAACAAATACTAC
 TTAAAGCCAATTTAAAAAATGATGAAGATTTATTAGCTCAGTCCAATATGTTATTAGCTG
 AAGTGCATCAAGCCTGGCAAGCGATTAAGTCTAATGCTGGTAATGAACTTTAATATTTGC
 AATGAGCTCCCATGATTGAGCATTGCTTTTTTACAGCTTTTATAGCAACCAAAAATAAGAGT
 TTTCTTGATTTGGCAATTATTAACCCAGTCCATCTATTTTTATTTTCCCAATGCAAATA
 GTTTAAGGCTTCTAAATATCAATAAGATATGAGG**a**ATTGTCTGGAAGTCTTGTTAGTTATC
 GAAATTTTTGTACATTTtGGTAATCAAGAATAGGATTAT**a**ATTTTgGCAAATTTGTATAG
 ATTTATCGAATTGGAATATAAAGTtTTTCCATTATTTGCCGCAAAACAGTTAGGATGAA
 TAAATTAATTTCAATTATGAATACATTTAAATCATCACTGGCATTGTAATTTGTCTCTTA
 CTTGGCATGCAATCGGCACAGGCGCAAATGCGATATGGAGAACTCTCTGCAACTTGCCA
 GAaTATTTTTGCATGAAAATAAAA**a**GCGGGGACACTTGGGATAGGCTTTTCCCTAACATC
 GAAGAGCAAGATATTGTCAGACGCATTAACCGAATGAATATCAGGCTCAAACCCGGGATG
 ATTATTGCTGTTCCCAAAA**a**TATAGAGCGTTTAACCATCTATGA**c**GTCTCGCCTTTTCCA
 AGATATATT

Sequenz der *motA*-Region (Gene *motA*, *motB*, *orfZ*):

AAAATAAGTATGGATACTTTGACTTTAATAGGATTGTTGACAGGTTTTCTCGCCATTATC
 STOP *fliA* START *motA*
 GTAGGCCAAATTTTTGAGGGGGGAGATTTAAATTCCTTACTTAATTTTCCGGCCTTACTG
 ATTGTCATGGGTGGAACATTAGGGGCTGTTATGGTGCAAACCTCTTTAACCACTTTTAAA

AGGGCGTTTAGAATATTGCCTTGGGTAGTGAAACCTCCTCATCATAATTTTGAAGAATGC
 AGAACGACTCTCATAGAGTTATCTAGAAAAGCTCGCCAACCTTGGCCTTCTCTCCCTAGAA
 GATCGTTTGGATGTCGAAACCAATCCTTTAATTTATAAGGGGTTGGAATTACTGGTTACA
 GGAGTGGACAAGCTTACCTTACGACAAGTTTTTGAAGCAGAAATAGATCGAACGGAGCAT
 CAGGATTTGCGTGCTGCGCATGTCTTTGAAAGCATGGGCGGCTATAGCCCCACCATAGGA
 ATTTTAGGTGCGGTGTTGGGTTTAATCAAGTCATGAGGAATCTCGCTGATCCCAGTCAA
 TTAGGTTTAGGCATTGCGGTTGCTTTTGTGCAACTATTTATGGTGTGGGTTGCGGAAT
 CTGTTTTTTTTTACCTGTTGCTAATAAATTAAAAAGTTGTATTTCTCATAAGGTGCATTTT
 GATGAAATGGTCGTTGAAGGCCTGGTCGCCATGGCGAGTGGTGAGAGTCCCAATATGCTG
 CAGTTAAAGTTAAACAACCTATGGGCAACACAAGCAAGATGAAATCAAAACAAAAGAAAAC
TGAAGAACATCAGGATAGTCATCGATGGGTCGTATCTTATGCTGATTTTCAATTACCTTATT
 ATTTGCTTTTTTTTGTGATGTATGCTATTTCTTCAGTAAATGTATCAAAATATAAATC
 START *motB* STOP *motA*
 TCTTTCTGAAGGAATGAAGTCGGCATTAAATCAAAAGGATCAAAATAAAGCGACTCAATC
 GACAGATAACCTTAAAGATGGTCCTGAAGAAAAGAAGACCAAGGGAACTTTTAAAGATGG
 TTTGGATGAACTGAATAAATCACTATCTGAACTTGAAGATGGTGATTTCAAATTAACAG
 ACAAGAGGGATGGGTTGAGATAGATATAAAAGCAGGCTCATTATTTGATTCTGGTAGTGC
 TGATATTAACCAGAAGCATTGATTAAACTAATGAAGCTGGCGGAGAAAATTAAGAATCT
 ACCTTTTACAGTGGTTGTTGAGGGATACACTGATAATGTGCCTATTGAAACGCCCAATA
 CCTTCAAATTGGGAATTATCAGCTGCAAGAGCAGCTACTGTTGGTCGCATTTTAAATGG
 TTTTGAATTGCCAATCATCGTATTTTGGTTACAGGATATGGTGATCAATACCCAATAAC
 GGACAATTACACTGaAGCTGGAAGAAGCCAGAATCGAAGAGTGAATATTCTTATCACTAA
 AAATAGAAAAGTGGACAGAATTCTCAATCCAGATTTAAGTAGAGTCCATTTTAGTGTTAT
 AAGTAATACAAATTCArTAGAGTTTAATAAAAAGGATACTAAAATTAAGGATAAAAAATG
ACACATATCTTTCTGTATTTGCATGCGATAATTTTTTTTACTCTTGGGTAATTATTTATTA
 AATCAACGwAAAAACATCAATAAATTACAGAACAAAATAGATTCTTTGGwAAAAATTGGCT
 START *orfZ* STOP *motB*
 ACTCAAGTAGTAAAAGATCATCCTATGCTGATCAATGCGGrTTTATTATTTGCGAAACAA
 CTTAATGAAATTAATCAGCAATTAATTAGTATTGAGACTCAATTGCAAGnATTGAAAAC
 ATAAGACATAACGATGGCAGTTATCAACATGCCTTGAGaATCCTGGrAATGgGTGGCACT
 CGtGAGGAAATTATCAGtAGTTGTCATTtATCAAATGCTGAAGCAGAGTTACTAATGAAT
 CTTCAGGCGTATAGAACCgCATTAAaACATCAGAATTAGTATAGATAGAATCTTACTTTC
 GCTGTAAA
 STOP *orfZ*

7.3. Publikationen

1. **Heuner, K., C. Dietrich, M. Steinert, U. B. Göbel, J. Hacker** (2000): Cloning and characterization of a *Legionella pneumophila*-specific gene encoding a member of the LysR family of transcriptional regulators. *Mol. Gen. Genet.* 264: 204-11
2. **Dietrich, C., K. Heuner, B. C. Brand, J. Hacker, M. Steinert** (2001): Flagellum of *Legionella pneumophila* positively affects the early phase of infection of eukaryotic host cells. *Infect. Immun.* 69, 4 (im Druck)
3. **Heuner, K., M. Steinert, C. Dietrich, G. Fischer, R. Köhler, J. Hacker** (2000): Function and expression of *Legionella pneumophila* surface factors. In: *Legionella* - proceedings of the 5th international symposium, ASM press, Washington D.C. (im Druck)

7.4. Beiträge zu Tagungen

Vorträge:

1. **Dietrich, C., K. Heuner, B. C. Brand, J. Hacker** (1997): Studies on the function of the flagellum and the regulation of the *flaA*-gene in *Legionella pneumophila*. Workshop on „The Pathogenicity of Legionellae“, Wittenberg, Deutschland, November 1997
2. **Dietrich, C., K. Heuner, J. Hacker, B. C. Brand** (1998): The flagellum of *Legionella pneumophila* may enhance invasion and killing of host cells. 50th annual meeting of the German association of Hygiene and Microbiology (DGHM), Berlin, Deutschland, November 1998
3. **Dietrich, C., K. Heuner, B. C. Brand, M. Steinert, J. Hacker** (1998): Functional analysis of a *flaA*-negative mutant of *Legionella pneumophila* strain Corby. Workshop „From biochemics to medicin“, Kloster Banz, Deutschland, 1998
4. **Dietrich, C., K. Heuner, J. Hacker, B. C. Brand** (1998): Die Flagelle von *Legionella pneumophila* - ein potentieller Virulenzfaktor? Statusseminar der Graduiertenkollegs „Infektion und

Immunität“ der Universität München und „Infektiologie“ der Universität Würzburg, Herrsching, Deutschland, Dezember 1998

5. **Dietrich, C., K. Heuner, M. Steinert, J. Hacker** (1999): Bedeutung der Motilität für die Virulenz von *Legionella pneumophila*. Abschlusstreffen der Graduiertenkollegs „Infektion und Immunität“ der Universität München und „Infektiologie“ der Universität Würzburg, Kloster Banz, Deutschland, Oktober 1999
6. **Heuner, K., C. Dietrich, U. B. Göbel, J. Hacker** (2000): Cloning of a *Legionella pneumophila* specific gene encoding a member of the LysR family of transcriptional regulators. 5th International Conference on *Legionella*, Ulm, Deutschland, September 2000

Poster-Präsentationen:

1. **Heuner, K., B. C. Brand, C. Dietrich, J. Hacker** (1997): The flagellum of *Legionella pneumophila* is required for the infection of eucaryotic host cells. 97th General Meeting, ASM, Miami Beach, Florida, USA, Mai 1997
2. **Steinert, M., C. Dietrich, D. Grimm, R. Köhler, B. Fields, F. Quinn, J. Hacker** (1999): Survival of *Mycobacterium avium* and *Legionella pneumophila* within Acanthamoebae: evaluation of *in situ* and *in vivo* monitoring techniques. European Conference Perspectives on Infectious Disease Research, Dresden, Deutschland, Februar 1999
3. **Dietrich, C., K. Heuner, M. Steinert, J. Hacker, B. C. Brand** (1999): A *flaA*-negative mutant strain of *Legionella pneumophila* shows reduced efficiency of invasion and cytotoxicity. 99th General Meeting of the American Society of Microbiology, Chicago, IL, USA, Mai 1999
4. **Steinert, M., C. Dietrich, D. Grimm, R. Köhler, J. Hacker** (1999): Ecology of *Legionella pneumophila* and other environmental pathogens of protozoa. 14th Meeting of the European Working Group of *Legionella* Infections (EWGLI), Dresden, Germany, Juni 1999
5. **Dietrich, C., K. Heuner, B. C. Brand, M. Steinert, J. Hacker** (2000): Importance of flagella and motility for the pathogenesis of *Legionella pneumophila*. 5th International Conference on *Legionella*, Ulm, Deutschland, September 2000

7.5. Lebenslauf

Name: Claudia Sabine Dietrich

Geburtsdatum: 01.08.1972

Geburtsort: Ludwigshafen/Rh.

Familienstand: ledig

Ausbildung:

1978 - 1982 Schillerschule Oggersheim, Ludwigshafen/Rh.

1982 - 1991 Theodor-Heuss-Gymnasium, Ludwigshafen/Rh.

Abitur im Mai 1991

1991 - 1992 Studium der Chemie/Diplom

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

1992 - 1994 Studium der Lebensmittelchemie, Universität Würzburg

1994 - 1995 Auslandsstudium an der „University of Texas at Austin“

1995 - 1996 Studium der Lebensmittelchemie, Universität Würzburg

1. Staatsexamen für Lebensmittelchemiker im Juni 1996

1996 - 1997 Industriepraktikum im Rahmen einer EU-Kooperation im „Centre de la

Recherche“ der Firma Pernod-Ricard in Paris

1997 - 2000 Dissertation am Institut für Molekulare Infektionsbiologie,

Universität Würzburg

Stipendien: 1994 - 1995 DAAD-Teilstipendium für die „University of Texas at Austin“

1997 - 2000 Doktorandenstipendium des Graduiertenkollegs „Infektiologie“, Deutsche Forschungsgemeinschaft