

1. Zusammenfassung

Das fakultativ intrazelluläre Bakterium *Legionella pneumophila* wurde erstmals 1977 als Erreger der Legionellose, einer schweren atypisch verlaufenden Pneumonie identifiziert. Es besitzt ein duales Wirtssystem und kann sich sowohl in aquatischen Habitaten in Protozoen als auch in phagozytierenden Humanzellen als Pathogen vermehren.

Zur Analyse der komplexen Interaktion zwischen Pathogen und Wirtszelle wurde in dieser Arbeit ein GFP (Green Fluorescent Protein)-Reportersystem etabliert und erfolgreich eingesetzt. Es erlaubt ein *in vivo* Monitoring von *Legionella* Infektionen und ermöglicht die schnelle Quantifizierung bakterieller Invasion in Wirtszellen in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren. Zur Etablierung der GFP-vermittelten Fluoreszenz wurde eine transkriptionelle Fusion des *gfpmut2*-Gens mit dem *Legionella* spezifischen *mip* („*m*acrophage *i*nfectivity *p*otentiator“-)-Promoter (P_{mip}) konstruiert. Zusätzlich wurde ein Vektor mit dem von *Listeria* stammenden *sod* („*s*uper *o*xid *d*ismutase“-)-Promoter eingesetzt. Mit diesen Vektoren transformierte *Legionella*-Stämme zeigten nach entsprechender Anregung eine starke Grünfluoreszenz und belegen somit erstmals die Funktionalität von GFP in *Legionella*. Durch den Einsatz von Fluoreszenzmikroskopie, Spektrofluorimetrie und Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) wurden die Stämme hinsichtlich der Unterschiede in der Virulenz und der intrazellulären Vermehrung untersucht. Ergebnisse, die durch die zeitaufwendige Bestimmung von CFU-Werten ermittelt wurden, konnten verifiziert und damit die Validität des GFP-Reportersystems in *Legionella* bestätigt werden. Quantitative Analysen der *mip*-Promoteraktivität belegen die konstitutive Expression und zeigen, dass Unterschiede in der Virulenz nicht auf variierende *mip*-Promoteraktivität zurückzuführen sind. Darüber hinaus konnte der Einfluss verschiedener Phagozytose-Inhibitoren auf die Aufnahme von Legionellen in die Protozoenwirte *Acanthamoeba castellanii* und *Hartmannella vermiformis* mittels des GFP-Reportersystems quantifiziert und qualitativ bewertet werden. Durch die Verwendung des Inhibitors Cytochalasin D konnte ein Einfluss Mikrofilament-abhängiger Phagozytose auf die Aufnahme in *H. vermiformis* und *A. castellanii* ausgeschlossen werden. Wie in Inhibitionsstudien mit Cycloheximid und Methylamin bestätigt werden konnte, erfolgt die Phagozytose in *H. vermiformis* wahrscheinlich vorwiegend über Rezeptor-vermittelte-Endozytose. Dem Protozoenwirt *A. castellanii* stehen dagegen zusätzliche Möglichkeiten der bakteriellen Internalisierung zur Verfügung. Diese Ergebnisse bestätigen die postulierte Heterogenität der Aufnahme-Mechanismen innerhalb verschiedener Protozoenwirte.

Nach erfolgter Phagozytose von *L. pneumophila* wird der endosomale Weg der Phagolysosom-Reifung blockiert, hierfür wird die Sekretion bislang unbekannter Effektoren verantwortlich gemacht. Durch die Konstruktion von C-terminalen Mip::GFP-Fusionsproteinen sollte die Detektion einer eventuellen Translokation des Mip-Proteins als Virulenzfaktor innerhalb der Wirtszelle ermöglicht werden. Die erzeugten Fusionsproteine waren wahrscheinlich aufgrund der homodimeren Mip-Struktur instabil und wurden nicht über die Cytoplasmamembran hinweg transportiert. Sie erwiesen sich daher als nicht geeignet, dieser Fragestellung weiter nachzugehen.

Da die *in vivo* Funktion von PPIasen (Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen) wie dem Mip-Protein in Prokaryoten bis heute weitgehend unbekannt ist, sollte im zweiten Teil dieser Arbeit versucht werden, einen Interaktionspartner zu identifizieren und den Einfluss der Dimerisierung und der PPIase-Aktivität des Mip-Proteins auf die Virulenz von *L. pneumophila* zu untersuchen. Durch Quervernetzung-Experimente konnte ein putativer, prokaryotischer Interaktionspartner des *Legionella* Mip-Proteins detektiert werden. Die N-terminale Aminosäure-Sequenzierung ergab jedoch keinerlei Homologie zu bereits bekannten *Legionella*- oder anderen Proteinen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine N-terminale Blockierung die Aufklärung der Sequenz ursächlich verhindert. Wie in früheren Arbeiten gezeigt wurde, ist die PPIase-Aktivität des *Legionella* Mip-Proteins für die Invasion und das intrazelluläre Überleben in Protozoen, Monozyten und der Makrophagen-ähnlichen Zelllinie U937 nicht notwendig. Ein weiteres Charakteristikum des Proteins ist seine homodimere Struktur und die Assoziation mit der äußeren Membran. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Fischer in Halle konnte durch Deletion der N-terminalen Domäne (AS 4-79) ein verkürztes Dimer-defizientes *Legionella* Mip-Protein (*L.p.*FKBP_{-20-3, 80-213}) erzeugt und biochemisch charakterisiert werden. Durch site-spezifische Mutagenese N-terminal lokalisierter Aminosäuren (K¹¹A/D³²A, Y¹⁶A/D³²A und M^{88,42}E) konnte deren Beteiligung an der Dimerisierung nachgewiesen werden. Zur Analyse des Einflusses der dimeren Quartärstruktur auf die Pathogenität wurde ein *mip*-negativer Stamm mit dem nur noch als Monomer vorliegenden Mip-Protein (*L.p.*FKBP_{-20-3, 80-213}) in *cis* komplementiert und die Expression sowie Integration in *L. pneumophila* PhilI JR32-2.4 verifiziert. Ergebnisse aus Infektionsstudien zeigten deutlich, dass die Dimerisierung des *Legionella* Mip-Proteins und nicht die Isomerase-Aktivität für die Infektion von monozellulären Systemen entscheidend ist. Im Gegensatz dazu konnte in Tierexperimenten (Meerschweinchen) die Beteiligung der Isomerase-Aktivität an der Pathogenität von *L. pneumophila* nachgewiesen werden. Der Verlust der Isomerase-Aktivität wirkt sich, verglichen mit dem monozellulären

System (*A. castellanii*), im Tiermodell wesentlich dramatischer auf das intrazelluläre Überleben aus. Mit site-spezifisch verändertem Mip-Protein komplementierte *Legionella*-Stämme zeigten eine intrazelluläre Vermehrung in Abhängigkeit der gemessenen *in vitro* Isomerase-Restaktivität. Durch den Einsatz der dimerisierungsdefizienten Mip-Komplementante, *L. pneumophila* PhilI JR32-2.4, wurde die Notwendigkeit der Dimerisierung des Mip-Proteins auch im Tiermodell bestätigt. Durch die vorliegende Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Funktion der Isomerase-Aktivität für die Infektion monozellulärer Systeme und höherer Organismen unterschiedlich ist.

1.1 Summary

The facultative intracellular bacterium *Legionella pneumophila* was first identified in 1977 as the etiologic agent of legionellosis, a severe and atypical pneumonia. It possesses a dual host system which allows the bacteria to replicate in protozoa in aquatic habitats as well as a pathogen in human phagocytic cells.

In order to analyze the complex interaction of the bacterial pathogen and its host cells, in this thesis a new GFP reporter system was established and successfully evaluated. It is now possible to monitor a *Legionella* infection *in vivo* and to quantify bacterial invasion influenced by different factors in a more convenient way. To analyze GFP expression in *Legionella* a transcriptional fusion of the *gfpmut2* gene with the *Legionella*-specific *mip* (macrophage infectivity potentiator) promoter was constructed. In addition, a vector harbouring the *sod* (super oxid dimutase) promoter derived from *Listeria monocytogenes* was used. Following transformation into *Legionella* strains strong GFP-mediated fluorescence was detected confirming the functionality of GFP in *Legionella* for the first time. Using fluorescence microscopy, spectrofluorimetry and flow cytometry (FACS-analysis) the strains were examined regarding differences in virulence and intracellular replication. Re-confirming results from earlier studies obtained by using enumeration of CFU values showed the validity of the method. Quantification of the *mip* promoter activity revealed a constitutive expression, this indicates that differences in *Legionella* virulence are not due to variations in *mip* promoter activity. Moreover, the influence of different phagocytosis inhibitors on *Legionella* uptake into the protozoan hosts *Acanthamoeba castellanii* and *Hartmannella vermiformis* using the GFP reporter system was examined. Application of cytochalasin D had no influence on bacterial uptake in *A. castellanii* and *H. vermiformis* suggesting a microfilament-independent mechanism. Phagocytosis in *H. vermiformis* is mainly accomplished using receptor-mediated phagocytosis as it was evident from inhibition studies with cycloheximide and methylamine. In contrast, phagocytosis in *A. castellanii* is mediated by other receptors or additional mechanisms are available. These results confirm the proposed heterogeneity of uptake mechanisms by different protozoan hosts.

After *L. pneumophila* is phagocytosed the endosomal pathway of phagosome maturation is blocked, by means of secreted but as yet unidentified effector molecules. To study a putative protein translocation C-terminal Mip::GFP fusion proteins were constructed. The stability of the proteins was rather weak which is likely due to the dimeric conformational state of the Mip

protein. In addition, transport over the cytoplasmic membrane was not accomplished. Therefore the fusion proteins proved not to be useful for examining translocational events.

Because of the unknown *in vivo* function of bacterial PPIases the focus in the second part of this work was to identify a putative interaction partner of the Mip protein and to elucidate the influence of dimerization and PPIase activity on *Legionella's* virulence. Using cross-linking experiments a putative interaction partner could be detected. N-terminal sequencing revealed no homology to already known *Legionella* or other proteins. N-terminal blockade of the putative partner molecule may be the cause that hampered sequence identification.

It has been shown that the isomerase activity of the *Legionella* Mip protein is not necessary for invasion and intracellular survival in protozoan, monocytes and U937 macrophages. Additional features of the protein are its homodimeric conformational state and the association with the outer membrane. In cooperation with the group of Prof. Dr. G. Fischer in Halle a N-terminal truncated (aa 4-79) dimerization-deficient Mip protein (*L.p.*FKBP25_{-20-3, 80-213}) was constructed and biochemically characterized. Using site-specific mutagenesis participation of the N-terminal located amino acids (K¹¹A/D³²A, Y¹⁶A/D³²A and M^{38,42}E) in the dimerization of the Mip protein was confirmed. To analyze the influence on pathogenicity of the dimeric state of the Mip protein a *mip* negative strain was complemented by providing the gene encoding the monomeric Mip (*L.p.*FKBP25_{-20-3, 80-213}) *in cis*. The proper integration and protein expression was confirmed. The results demonstrate that the isomerase activity is dispensable for intracellular growth in protozoan hosts. Moreover, the results clearly demonstrated that dimerization and not the isomerase activity are essential for virulence of *Legionella* in a monocellular system.

In contrast, it could be shown that the isomerase activity is necessary for full virulence in the animal model (guinea pigs). The loss of the isomerase activity has a more dramatic impact on the intracellular survival of *Legionella* compared to the monocellular system (*A. castellanii*). Moreover, *Legionella* strains replicated intracellularly dependent on their remaining *in vitro* isomerase activity. Using the monomeric Mip-expressing strain *L.p.*JR32-2.4 it could be demonstrated that dimerization also plays a role in the animal model. This work provides evidence for a different role of the isomerase activity of the Mip protein in monocellular systems and during the infection of higher organisms.