

Inhaltsverzeichnis

I. a.	Summary	i
I.	Zusammenfassung	1
II.	Einleitung	
1.	<i>Legionella pneumophila</i>	4
1.1	Biologie der Legionellen.....	4
1.2.	Überlebensstrategien von <i>L. pneumophila</i> in der Umwelt	6
1.3.	Intrazelluläre Vermehrung in Protozoen.....	6
1.4.	Infektion des Menschen durch <i>Legionella</i>	8
1.5.	Intrazelluläre Vermehrung in Makrophagen und Monozyten.....	9
1.6.	Zelluläre Abwehr durch den Wirt.....	11
1.7.	Modellsysteme zur Ermittlung des Virulenzpotentials.....	11
1.8.	Virulenzfaktoren von <i>L. pneumophila</i>	12
1.9.	Legiolysin: Umweltfaktor mit pathogenem Potential?.....	19
2.	Zielsetzung.....	21
III.	Material und Methoden	22
1.	Bakterienstämme und Zellen.....	22
1.1.	Bakterienstämme.....	22
1.2.	Zellen.....	23
2.	Plasmide.....	24
3.	Geräte.....	25
4.	DNA-Größenmarker.....	26
5.	Chemikalien.....	26
6.	Oligonukleotide.....	27
7.	Medien und Nährböden.....	28
7.1.	Medium für die Flüssiganzucht von Legionellen.....	28
7.2.	Nährboden für die Anzucht von Legionellen.....	28
7.3.	Nährlösung für die Anzucht von <i>E. coli</i>	28

7. 4.	Nährlösung für die Anzucht von <i>Acanthamoeba castellanii</i>	29
	(ATCC Suppl., 1985)	
7. 5.	Nährlösung für die Anzucht von <i>Fischerella</i> sp.....	29
7. 6.	Warendeklaration von Blumenerde (Dehner).....	30
8.	Antibiotikazusätze in Medien, Agarplatten und Zellkulturen.....	30
9.	Methoden.....	31
9. 1.	Anzucht von Legionellen in Flüssigkultur.....	31
9. 2.	Anzucht von Legionellen auf BCYE-Agar-Platten.....	31
9. 3.	Anzucht von <i>Acanthamoeba castellanii</i>	31
9. 4.	Anzucht von <i>Fischerella</i> sp.....	31
9. 5.	Extraktion chromosomaler DNA.....	31
9. 6.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> durch alkalische Lyse.....	32
9. 6. 1.	Normalansatz (Miniprep).....	32
9. 6. 2.	Großansatz (Maxiprep).....	33
9. 7.	Phenol-Extraktion.....	33
9. 8.	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	34
9. 9.	Amplifizierung von DNA-Fragmenten durch PCR	34
9. 9. 1.	Amplifizierung von <i>mip</i>	35
9. 10.	Spaltung von Plasmid-DNA durch Restriktionsendonukleasen vom Typ II.....	35
9. 11.	Größentrennung von Biopolymeren durch Gelelektrophorese.....	36
9. 11. 1.	Elektrophorese von Nukleinsäuren.....	37
9. 11. 2.	Elektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE).....	37
9. 12.	Gewinnung von Gesamtzellsaten für die SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese.....	39
9. 13.	Westernblot- (Immunoblot-) Analyse.....	40
9. 13. 1.	Proteintransfer auf Nitrozellulose.....	41
9. 13. 2.	Blocken des Nitrozellulosefilters.....	41
9. 13. 3.	Färben des Markers.....	41
9. 13. 4.	Antikörper-Inkubation.....	41
9. 13. 5.	Farbreaktion.....	42
9. 14.	DNA-Elution aus Agarosegelen.....	42
9. 15.	Herstellung kompetenter Zellen.....	42
9. 16.	Ligation von DNA-Fragmenten.....	43

9. 17.	Transformation.....	43
9. 18.	Radioaktive Markierung von DNA durch Random-Priming.....	43
9. 19.	Didesoxy-Sequenzierung mit dem "T ⁷ Sequencing™ Kit" (Pharmacia).....	44
9. 20.	Extraktion von Gesamt-RNA aus Legionellen.....	46
9. 21.	Messung von RNA-Konzentrationen.....	48
9. 22.	RNA-Analyse durch Northern-Hybridisierung.....	48
9. 22. 1.	Herstellung des Agarose-Formaldehyd-Gels.....	48
9. 22. 2.	RNA-Gelelektrophorese.....	49
9. 22. 3.	RNA-Transfer auf Nitrozellulose durch Northern-Blotting.....	49
9. 22. 4.	Northern-Hybridisierung.....	50
9. 23.	Nachweis der bakteriellen Lebensfähigkeit.....	51
9. 24.	Rasterelektronenmikroskopie von <i>Fischerella</i> sp.....	52
9. 25.	Infektion von <i>Acanthamoeba castellanii</i> mit <i>Legionella pneumophila</i>	52
9. 26.	Fluoreszenz-Markierung von Oligonukleotid-DNA-Sonden.....	53
9. 27.	<i>In situ</i> -Hybridisierung von <i>L. pneumophila</i> mit fluoreszenz-markierter Oligonukleotid-DNA-Sonde.....	54
9. 28.	Proteintrennung durch HPLC (High Performance Liquid Chromatography): Nachweis von Homogentisat (HGA).....	55
IV.	Ergebnisse	57
1.	Genetische Studien zur Pathogenität und Ökologie von <i>L. pneumophila</i>	57
1.1.	Genotypische Charakterisierung der <i>lly</i> -Region.....	57
1.1.1.	Sequenzhomologien der <i>lly</i> -Region.....	57
1.1.2.	Vergleich der Aminosäure-Sequenzen verschiedener HPPD-like Proteine.....	57
1.2.	Subklonierung der <i>lly</i> -Region.....	62
1.3.	Sequenzierung und Analyse der <i>lly</i> -Region.....	63
1.4.	Nachweis von <i>lly</i> auf Transkriptionsebene.....	65
1.4.	Nachweis von Homogentisat durch High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	66
1.5.	Chromosomale Integration von <i>lly</i> in die λ att-site von <i>E. coli</i> WM 2269.....	69
1.5.1.	Prinzip der Integration.....	69
1.5.2.	Mutagenese von <i>E. coli</i> WM 2269: chromosomale Integration von <i>lly</i>	71
1.5.3.	Nachweis der chromosomalen Integration von <i>lly</i>	72

1.6.	Chromosomale Integration von <i>mip</i> in das <i>E. coli</i> K-12 - Genom durch homologe Rekombination.....	74
1.6.1.	Amplifizierung von <i>mip</i>	76
1.6.2.	Klonierung von <i>mip</i> in pPILVV ₃	76
1.6.3.	Sequenzierung von <i>mip</i>	79
1.6.4.	Westernblotanalyse von Mip.....	79
1.6.5.	Mutagenese von <i>E. coli</i> AAEC 160: chromosomale Integration von <i>mip</i>	79
1.6.6.	Nachweis der Expression von chromosomal integriertem <i>mip</i> durch Westernblot.....	83
1.6.7.	Nachweis der chromosomalen Integration von <i>mip</i> in das <i>E. coli</i> K-12 - Genom.....	84
2.	Ökologische Studien zur Persistenz von <i>L. pneumophila</i> und <i>E. coli</i> in der Umwelt.....	86
2.1.	Einfluß von <i>lly</i> und <i>mip</i> auf die Persistenz von <i>L. pneumophila</i> und <i>E. coli</i> K-12 unter Lichtstreß.....	86
2.2.	Assoziation von <i>L. pneumophila</i> mit <i>Fischerella</i> sp.....	89
2.3.	Studien zur Persistenz von <i>L. pneumophila</i> und <i>E. coli</i> in Boden-Mikrokosmen.....	100
2.3.1.	Persistenz von <i>L. pneumophila</i> in Boden-Mikrokosmen.....	100
2.3.2.	Persistenz von <i>E. coli</i> in Boden-Mikrokosmen.....	101
2.4.	Persistenzstudien von <i>L. pneumophila</i> und <i>E. coli</i> in Wasser-Mikrokosmen.....	102
2.4.1.	Persistenz von <i>L. pneumophila</i> in sterilem Leitungswasser.....	102
2.4.2.	Persistenz von <i>L. pneumophila</i> im Umweltmedium Mainwasser.....	107
2.4.3.	Identifizierung von <i>L. pneumophila</i> VBNC-Stadien durch <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	109
2.4.4.	Persistenz von <i>E. coli</i> in PBS.....	114
2.4.5.	Persistenz von <i>E. coli</i> in Mainwasser-Mikrokosmen.....	116
2.5.	Reaktivierung von <i>L. pneumophila</i> aus dem VBNC-Stadium.....	119
V.	Diskussion	121
1.	Molekularbiologische Studien zur Pathogenität und Ökologie von <i>Legionella pneumophila</i>	121
2.	Ökologische Studien zur Persistenz von <i>L. pneumophila</i> in der Umwelt.....	127

VI.	Literaturverzeichnis	140
VII.	Anhang	161
1.	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....	161
2.	Nukleotidsequenz von pEWL1.....	163
3.	Publikationen.....	166
4.	Curriculum vitae.....	167