

**Aus dem Institut für Biochemie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Dr. h.c. Rolf Hilgenfeld**

**Identifizierung und Charakterisierung von potentiellen
Virulenzfaktoren in *Legionella pneumophila* durch
differentielle Proteomik**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
– Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät –

vorgelegt von
Mirko Hoffmann
aus Arnsberg (Sauerland)
Lübeck 2010

1. Berichtstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. Rolf Hilgenfeld

2. Berichtstatter: Prof. Dr. Werner Solbach

Tag der mündlichen Prüfung: 08. Dezember 2010

I	ZUSAMMENFASSUNG	1
II	EINLEITUNG	3
2.1	Das Bakterium <i>Legionella pneumophila</i> – eine biologische, taxonomische und historische Übersicht	3
2.1.1	Vorkommen, Diagnostik und Therapie von <i>Legionella</i> -Infektionen	5
2.2	Legionellen und ihre Infektiosität	7
2.2.1	Der intrazelluläre Lebenszyklus in Protozoen und Metazoen – und die dabei bedeutsamen Virulenzfaktoren	8
2.2.2	Die Mutanten <i>Legionella pneumophila</i> Corby flaR ⁻ , fliA ⁻ und der Stamm <i>Legionella hackeliae</i>	15
2.3	TypIV-Pili pathogener, Gram-negativer Bakterien	17
2.3.1	Die Rolle des Pilus als putativer Virulenzfaktor in <i>L. pneumophila</i> und das am Aufbau beteiligte PilN-Protein	19
2.3.2	Das Phänomen “twitching motility” in <i>L. pneumophila</i>	22
2.4	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	23
III	MATERIAL	26
3.1	Chemikalien, Verbrauchsmaterial, Enzyme, Plasmide, Geräte und Bakterienstämme	26
3.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	26
3.1.2	Enzyme, Enzymkits und Aufreinigungskits.....	26
3.1.3	Oligonukleotide (Primer)	26
3.1.4	Plasmide.....	27
3.1.5	Großgeräte, Laborapparaturen und Websoftware	27
3.1.6	Bakterienstämme.....	28
3.2	Nährmedien	28
3.2.1	Medien, Zusätze und Antibiotika für <i>Legionella</i> -Stämme	28
3.2.2	Medien und Antibiotika für <i>Escherichia coli</i> -Stämme	29
3.3	Lösungen und Puffer	29
3.3.1	Lösungen für den Zellaufschluss	29
3.3.2	Lösungen und Puffer für die ein- und zweidimensionale SDS-PAGE sowie für die Agarose-Gelelektrophorese	30
3.3.3	Lösungen und Puffer für die PF-2D-Anlage	30

3.3.4	Lösungen für MALDI-TOF-Massenspektrometrie	31
3.3.5	Lösungen für Protein-Färbungen	31
3.3.6	Lösungen und Puffer für Westernblot und Immunodetektion.....	31
3.3.7	Lösungen und Puffer für die PCR und die RT-PCR	32
3.3.8	Puffer für die Aufreinigung rekombinanter Proteine an einer FPLC	32
IV	METHODEN	34
4.1	Bakterienkultivierung und –anzucht	34
4.1.1	Anzucht von bakteriellen Stämmen und deren Konservierung.....	34
4.1.2	„Twitching motility“-Tests bei <i>Legionella pneumophila</i> Corby.....	34
4.2	Zellaufschluss und Gesamt- bzw. Rekombinantproteinisolierung	35
4.2.1	Zellaufschluss und Gesamtproteinisolierung von <i>Legionella</i> -Stämmen	35
4.2.2	Zellaufschluss und Isolierung von rekombinanten Fusionsproteinen bei <i>E. coli</i>	35
4.3	Ein- und zweidimensionale Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE.....	35
4.3.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	37
4.3.2	Erste Dimension, Isoelektrische Fokussierung	37
4.3.3	Zweite Dimension, Auftrennung nach Molekulargewicht	38
4.3.4	Färben und Entfärben der Proteine mit Coomassie Blue	39
4.4	Proteinfraktionierung in der HPLC PF-2D.....	39
4.4.1	Erste Dimension, Proteintrennung nach IEP.....	40
4.4.2	Zweite Dimension, Auftrennung durch Reversphasen-Chromatographie	40
4.5	Proteinidentifizierung mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie-Analyse	41
4.5.1	Tryptischer Verdau	42
4.5.2	Beladung und Bedienung des MALDI-TOF-Massenspektrometers	43
4.5.3	Massenspektren-Analysen via Software	43
4.6	PCR- und genetische Klonierungsarbeiten.....	44
4.6.1	Amplifikation und Klonierung von <i>Legionella</i> -Genen	45
4.6.2	Ligation mittels des pGEM-T Easy Vektors.....	45
4.6.3	Plasmid-DNA-Isolierung	46
4.6.4	Transformation der <i>E. coli</i> -Stämme durch Hitzeschock	47
4.6.5	Restriktionsenzymbehandlung und Ligation in die Expressionsvektoren pQE und pGEX	47
4.6.6	Real-Time-PCR.....	48
4.7	Semi-Trocken-Elektroblotting (Westernblot)	49
4.7.1	Proteintransfer auf eine Nitrocellulose-Membran.....	49
4.7.2	Immunodetektion mit primärem und sekundärem Antikörper.....	50

4.8	Aufreinigung rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i>-Stämmen	51
4.8.1	Aufreinigung und Isolierung von Fusionsproteinen über HisTrap FF- und GSTrap FF-Säulen an einer FPLC-Anlage	51
4.8.2	Behandlung der rekombinanten Proteine mit „PreScission-Protease“	52
4.8.3	Proteinaufreinigung mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie.....	52
4.9	Kristallisationsexperimente	53
4.9.1	Ansetzen der Kristallisationsplatten.....	53
4.9.2	Optimierung von Kristallisationsbedingungen.....	54
4.9.3	Datenaufnahme am Synchrotronring in Berlin (BESSY)	55
V	ERGEBNISSE	56
5.1	Übersicht über die zweidimensionale Gesamtprotein-Auftrennung mittels der SDS-PAGE	56
5.1.1	Unterschiede der Protein-Muster des Wildtyps im Vergleich zu den Mutanten <i>flaR</i> ⁻ und <i>fliA</i> ⁻ sowie der Spezies <i>L. hackeliae</i>	56
5.1.2	Identifizierte Proteine, die im Vergleich zum Wildtyp herunterreguliert oder nicht detektierbar erscheinen	64
5.2	Übersicht der zweidimensionalen Auftrennung in der HPCF (PF-2D)	66
5.2.1	Expressionsunterschiede der <i>flaR</i> ⁻ - und <i>fliA</i> ⁻ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp.....	66
5.3	Rekombinante Herstellung des PilN-Proteins	74
5.3.1	Überprüfung der molekulargenetischen Arbeiten an PilN	74
5.3.2	Aufreinigung, Protease-Behandlung und Reinheitsanalyse des rekombinanten PilN-Proteins.....	77
5.4	Kristallisation und Diffraktion des rekombinanten und verkürzten Proteins PilN	79
5.4.1	Kristallisationsbedingungen.....	80
5.4.2	Übersicht der Röntgenbeugungsdaten.....	81
5.5	Real-Time-PCR-Analyse	83
5.5.1	PilN-Genexpression vom Wildtyp <i>Legionella pneumophila</i> und der <i>flaR</i> ⁻ -Mutante	83
5.6	Oberflächenmotilität, „Twitching motility“	85
5.6.1	Oberflächenmotilität von <i>Legionella pneumophila</i> Corby und dessen Mutante <i>flaR</i> ⁻	85
VI	DISKUSSION	87
6.1	Beurteilung und Vergleich der beiden zweidimensionalen Protein-Auftrennungsmethoden zur Identifizierung neuer putativer Virulenzfaktoren von <i>Legionella pneumophila</i> Corby	87

6.2	Analyse der identifizierten und putativen Virulenzfaktoren	91
6.2.1	Bewertung der Identifizierung durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie	91
6.2.2	Analyse der identifizierten Proteine	93
6.2.3	Fokus der weiteren Bearbeitung auf das PilN-Protein	97
6.2.4	FlaR als Regulatorprotein und die mögliche Verbindung zum TypIV-Pilus Aufbau	98
6.3	Auswertung der RT-PCR- und „Twitching motility“-Ergebnisse	100
6.3.1	Bewertung der RT-PCR-Untersuchung von pilN im Verhältnis zu gyrA	100
6.3.2	Beurteilung der „Twitching motility“-Tests	101
6.4	Diffraktionsdatensammlung vom PilN-Kristall	102
6.4.1	Vorläufige kristallographische Charakterisierung	102
6.5	Ausblick	104
VII	ANHANG	106
7.1	Abkürzungen	106
7.2	Danksagung	108
7.3	Literaturangaben	110

I Zusammenfassung

Legionella pneumophila, Gram-negativ und fakultativ intrazellulär, ist von den insgesamt bis heute 51 beschriebenen Legionellaceae mit über 90% die hauptverantwortliche Erregerart der Legionellen-Pneumonie, auch Legionärskrankheit genannt. Die Ursache dieser im Vergleich zu den anderen Arten erhöhten Virulenz liegt sehr wahrscheinlich in den verschiedenen Virulenzdeterminanten und/oder an deren effizienterer Regulation.

Ziel dieser Arbeit war es, Proteom-Profile vom in der transmissiven Phase befindlichen *Legionella pneumophila* Corby Wildtyp-Stamm, von verschiedenen Mutanten und von dem weniger virulenten Umweltstamm *Legionella hackeliae* miteinander zu vergleichen und dabei potentielle neue Virulenzfaktoren ausfindig zu machen, um möglicherweise einen weiteren Beitrag zum Verständnis und Regulationszusammenspiel der Pathogenitätsfaktoren und somit der Infektiosität von *L. pneumophila* zu liefern.

Die zwei hier eingesetzten Mutanten (flaR⁻,fliA⁻) sind beide regulationsdeletierte *Legionella pneumophila* Corby-Stämme, deren ausgeschaltete Regulationsproteine ursprünglich in noch nicht gänzlich verstandener Weise die Expression hauptsächlich von virulenten Motilitätsapparaturen – namentlich der Pili und der Flagellen – steuern, und die möglicherweise auch noch genetisch mit weiteren Virulenzfaktoren im Phänotyp verlinkt sind.

Zusätzliche Experimente zur Verifizierung der Proteom-Ergebnisse als auch zur Aufklärung der durch die Ergebnisse aufgestellten Regulationswege wurden angeschlossen. Auch sollten die vielversprechendsten dabei entdeckten putativen, im virulenten Phänotyp eingebundenen Proteine (in diesem Fall das Protein PilN) bis zur strukturellen Aufklärung gebracht werden, um den Weg der Neuentdeckung von Virulenzfaktoren bis zur Beschreibung der molekularen dreidimensionalen Struktur abzuschließen.

Für die zweidimensionale Auftrennung des cytosolischen Proteoms der Legionellen standen zwei verschiedene technische Methoden zur Verfügung, die etabliert, miteinander verglichen, bewertet und beurteilt wurden. Zum einen kam die bekannte zweidimensionale Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie Blue-Färbung zum Einsatz. Und zum anderen erfolgte die Auftrennung über eine neuartige hochdruckchromatographische Anlage, die PF-2D-Einheit. Die Identifizierung aller Proteine ist in beiden Fällen massenspektrometrisch mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie vollzogen worden. Dabei konnten insgesamt zwischen Wildtyp und Mutanten 14 unterschiedlich stark ausgeprägte

Proteine identifiziert werden, manche davon mit klarem Bezug zur Virulenz (z.B. PilN, FliC, HtpB, s. Kap.2.2.1).

Als effizienter in der Handhabung und sensitiver/spezifischer im Datenvergleich der Trennungsbilder wurde abschließend die 2D-Gelelektrophorese bewertet; insbesondere dann, wenn man die zur Verfügung stehenden neuesten Applikationen zur Nutzung mit heranzieht.

Die markanteste Protein-Entdeckung war das komplette Ausbleiben des als PilN identifizierten Proteins der *flaR*⁻-Mutante in einer PF-2D-Fraktion. PilN stellt eine essentielle Komponente der Biosynthese des als Virulenzfaktor eingestuften TypIV-Pilus der Oberfläche von *L. pneumophila* dar.

Mit der RT-PCR und einem Test zur sog. „twitching motility“ (eine TypIV-Pili vermittelte Ausbreitungsform) galt es, diesen Proteom-Befund weiter zu analysieren. Die Untersuchungen zur Expression von *pilN* in der *flaR*⁻-Mutante auf Transkriptom-Ebene konnten einen Ausfall der mRNA von *pilN*, wie das Fehlen vom PilN-Protein auf der *flaR*⁻-Mutantenseite vermuten ließ, weder in der stationären noch der exponentiellen Wachstumsphase bestätigen. Eine direkte, zuvor postulierte Regulation der Pilus-Gene einzig durch den deletierten LTT-Regulator FlaR konnte mittels der RT-PCR demzufolge nicht bestätigt werden. Allerdings hat der Nachweis der „twitching motility“ ergeben, dass die *flaR*⁻-Mutante deutlich in ihrer flagellenunabhängigen Motilität durch die TypIV-Pili im Vergleich zum Wildtyp limitiert ist. Genauso kann das in der Mutante übermäßig vorhandene HtpB-Protein mit seiner für *L. pneumophila* beschriebenen Verbindung zur Adhärenz an eukaryontischen Zellen als Oberflächenprotein (ähnlich einer weiteren Funktion der TypIV-Pili) als Hinweis gewertet werden, dass diese Überexpression als Kompensation der eingeschränkten oder fehlenden Pili zu verstehen ist. Damit wurde neben dem „twitching motility“-Test auch mit diesem Versuch eine womöglich indirekte Regulation von PilN und eventuell von weiteren Bestandteilen des TypIV-Pilus durch FlaR als plausibel erachtet.

Parallel dazu wurde PilN – auch wegen seiner unbekanntenen Funktion – rekombinant für die Überexpression in *E. coli* hergestellt und mittels verschiedener Fusionsproteinvarianten affinitätschromatographisch aufgereinigt. Mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie konnte PilN bezüglich seiner molekularen quartären Organisation weiter charakterisiert werden.

Über die Dampf-Diffusionskristallisation konnten Kristalle erzeugt und optimiert werden, die am Synchrotronring Röntgenbeugungsdaten bis zu einer Auflösungsgrenze von 3,2 Å lieferten und somit zu einer vorläufigen kristallographischen Charakterisierung der PilN-Kristalle geführt haben.

II Einleitung

2.1 Das Bakterium *Legionella pneumophila* – eine biologische, taxonomische und historische Übersicht

Legionella pneumophila – diesen ungewöhnlich klingenden Namen für ein Bakterium prägten im Jahre 1979 die Autoren Brenner, Steigerwalt und McDade [Brenner et al., 1979]. Bereits zwei Jahre zuvor wurde das Bakterium erstmalig isoliert und als Krankheitserreger der sog. Legionärskrankheit identifiziert [Fraser et al., 1977; McDade et al., 1977]. Dabei verdanken der Erreger und die Krankheit ihren eigentümlichen Namen folgendem Umstand:



Abb. II.1 Bellevue-Stratford Hotel, Philadelphia, PA, 1976 (Bilddatei entnommen aus der Library of Congress, American Memory)

Im Juli 1976 wurde im Bellevue-Stratford Hotel (Abb. II.1) in Philadelphia der 58. jährliche Kongress der Veteranen der American Legion Pennsylvania abgehalten. Einige Tage nach Beginn dieses Kolloquiums zeigten mehrere Teilnehmer Symptome einer typischen Lungenentzündung, ohne jedoch auf die damals gängige Behandlungsmethode anzusprechen. Neunundzwanzig der insgesamt 182 Erkrankten verstarben an dem zu dieser Zeit noch unbekanntem Mikroorganismus [Fraser et al., 1977], ehe er etwa sechs Monate später von Forschern des „Center for Disease Control and Prevention“ identifiziert werden konnte [Swanson & Hammer, 2000; McDade et al., 1977]. In Gedenken an die verstorbenen Veteranen der American Legion und des pneumonieartigen Krankheitsverlaufes wegen wurde dem Bakterium der Name *Legionella (L.) pneumophila* und der Krankheit der Name

Legionärskrankheit zugewiesen. Retrospektiv ist bereits schon im Jahre 1947 *L. pneumophila* isoliert worden, wie serologische und Antigen-Untersuchungen, bzw. das Verhältnis des DNA-Verwandschaftsgrades gezeigt haben [McDade et al., 1979]. Inzwischen, mehr als 30 Jahre später, ist die Spezies *Legionella* ungleich genauer untersucht und es ist folgendes bekannt:

Bei *Legionella pneumophila* (s. Abb. II.2) handelt es sich um einen Gram-negativen, fakultativ intrazellulären, stäbchenförmigen, obligat aeroben und nicht sporenformenden Prokaryonten, der der Gamma(γ)-Gruppe der Proteobakterien angehört [Albert-

Weissenberger et al., 2007; de Buck et al., 2007] und zur Gattung der Legionellae bzw. zur Familie der Legionellaceae gehört [Benson & Fields, 1998]. Das Bakterium kann als Oberflächen-Strukturen eine polare Flagelle ausbilden und zusätzlich mit TypIV-Pili ausgestattet sein [Cianciotto, 2001; Rodgers, 1979]. Im Jahr 2007 wurde die Sequenzierung des Gesamtgenoms von *Legionella pneumophila* Corby abgeschlossen [Steinert et al., 2007]. Zusammen mit drei weiteren *Legionella pneumophila*-Stämmen (Lens, Paris, Philadelphia) zeigen alle einen GC-Gehalt im Genom von 38% und eine durchschnittliche Chromosomengröße von 3,5 Mbp, mit etwa 3000 Protein-kodierenden Genen. Nur zwei der Isolate tragen ein Plasmid [Jules & Buchrieser, 2007].

Legionellen existieren in der Natur ubiquitär in Oberflächengewässern und Grundwassern.

Dort vermehren sie sich fast ausschließlich intrazellulär in den einzelligen Amöben und Protozoen, wie *Hartmanella* oder *Acanthamoeba* [Borella et al., 2005; Fields et al., 1993; Lee & West, 1991], die sie auch vor Umwelteinflüssen

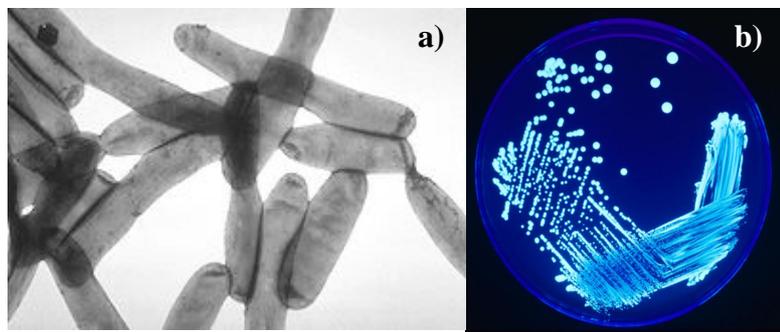


Abb. II.2 *Legionella pneumophila* (a) und *Legionella sp.* (b) als Kolonie auf Nährboden unter UV-Illumination (Bilddateien entnommen aus der Public Health ImageLibrary, PHIL)

oder menschlichen Dekontaminationseingriffen mit bspw. Chlor schützen [Kilvington & Price, 1990]. Als freie Organismen sind Legionellen außerdem imstande, über längere Perioden hinweg in Biofilmen zu überleben [Borella et al., 2005].

In den letzten Jahrzehnten hat *Legionella* immer besser Einzug in den menschlichen Lebensraum gefunden: bei Wassertemperaturen von 25°C-40°C sind Legionellen aus Schwimmbädern, Rückkühlanlagen, Wasserleitungen und selten auch Beatmungs- und Inhalationsmaschinen und Eismaschinen im Krankenhaus isoliert worden. Letztlich können alle wassertragenden Anlagen mit Legionellen kontaminiert sein [Lück & Steinert, 2006].

Von den inzwischen 51 bekannten *Legionella*-Spezies mit ihren 73 Serogruppen macht *L. pneumophila* den Hauptanteil aller aus Patienten und Umweltproben isolierten Stämme aus [Borchardt et al., 2008].

2.1.1 Vorkommen, Diagnostik und Therapie von *Legionella*-Infektionen

Im Allgemeinen wird die Legionärskrankheit als eine atypische Pneumonie und *Legionella* spp. sowie beispielsweise *Chlamydia pneumoniae* und *Mycoplasma pneumoniae*, als atypische respiratorische Pathogene bezeichnet. Der Begriff atypische Pneumonie ist allerdings ursprünglich aufgekomen, um die virale Pneumonie mit ihrem klinisch und radiologisch andersartigen Darstellungsbild von der bakteriellen Pneumonie zu unterscheiden. Inzwischen bezeichnet man derartige Pneumonien wie SARS oder die Vogelgrippe aber einfach als virale Pneumonien. Der Begriff atypische Pneumonie wird hingegen zu weitläufig und nicht klar begrenzt benutzt: so findet er Verwendung im mikrobiologischen, klinischen und radiologischen Sinn. Doch nicht in allen Feldern verhalten sich Legionellen gleich. So ist *Legionella* spp. im mikrobiologischen Sinn als atypisch zu verstehen, weil es sich hierbei um einen intrazellulären Erreger handelt, im Gegensatz zu den typischen Pneumonie-Erregern wie *Streptococcus pneumoniae* oder *Haemophilus influenza* [Cunha, 2008]. Klinisch und auf dem Röntgenfilm lassen sich kaum Unterschiede zu den typischen respiratorischen Pathogenen erkennen, was die Diagnose der atypischen und im Speziellen von Legionellen zu einem schwierigen Unterfangen macht [Godet et al., 2007]. Erst bei genauer und gewissenhafter Betrachtung können auf klinischer Ebene Differenzen ausgemacht werden. So zeigt *Legionella* spp. Vorlieben für zusätzliche extrapulmonare Organe. Bei ausnahmslos allen Patienten findet man folgende klinische Befunde: ZNS-Abnormitäten wie Kopfschmerz, Verwirrtheit oder Lethargie, gastrointestinale Abnormitäten wie Diarrhö und Bauchschmerz oder leicht erhöhte leberspezifische Transaminase-Werte. Des Weiteren wird oftmals eine sog. Bradykardie diagnostiziert, also ein langsamer Herzschlag unter 50 Schlägen/Minute. Alle diese Symptome sprechen für eine *Legionella*-Infektion bzw. für die Legionärskrankheit. Das auch von Legionellen ausgelöste Pontiac-Fieber verläuft hingegen relativ harmlos, ist von Fieber, Muskelschmerzen und Husten begleitet, klingt aber bereits nach wenigen Tagen wieder ab.

Die typischen Lungenkrankheitserreger hingegen verursachen eine systemische Infektion, die nur auf die Lungen-Komponenten limitiert ist [Cunha, 2006].

Um schließlich eine sichere labordiagnostische Bestätigung der *Legionella*-Infektion zu erhalten, greift man auf verschiedene mikrobiologische Diagnostiken zurück. Die sicherste, aber leider auch schwierige Diagnostik ist die kulturelle Anzucht der Legionellen auf Spezialagar. Das Erregerisolat stammt dabei entweder aus dem Sputum, respiratorischen Sekreten, Pleuralflüssigkeit oder dem Lungengewebe. Aufgrund der ungewöhnlichen Ansprüche von *Legionella* spp. an die Kultivierbedingungen und das für den Patienten nicht

ungefährliche Isolieren von Erregermaterial gestaltet sich diese Methode daher als nicht einfach, zumal die Kultur in nur 20-70% der Fälle gelingt [Lindsay et al., 2004]. Da Legionellen noch nie aus dem Nasen-Rachen-Raum isoliert wurden, gilt der kulturelle Nachweis über anderes Patientenmaterial daher als bestätigte Infektion [Lück & Steinert, 2006].

Darüber hinaus wird der Antigennachweis – Hauptkomponente ist das Lipopolysaccharid (LPS) oder ein 29 kDa großes, nicht näher beschriebenes Membranprotein [Gosting et al., 1984] – im Urin oder Sputum des Patienten über die DFA- („direct fluorescent antibody“) oder ELISA- („Enzyme-linked immunosorbent assay“) Methoden angewandt. Dabei korrelieren die Ergebnisse des Urin-Antigentest mit der Schwere der Krankheit: der Antigentiter ist höher in ernsthaften Fällen [von Baum et al., 2008]. Der Antigentest weist allerdings nur *L. pneumophila* nach und ist für anderweitige Stämme nicht kommerziell verfügbar.

Antikörper im Urin, die man am besten mit einer Vielzahl von Serovarianten verschiedener Stämme nachweist, lassen sich nur bei 70% der Infizierten detektieren. Ein Ausbleiben kann also nicht zwangsläufig eine Legionella-Infektion ausschließen [Lück & Steinert, 2006].

Als letzte gängige Diagnose-Methode dient der Nachweis von Nukleinsäuren über PCR („polymerase chain reaction“) [Cloud et al., 2000]. Die Sensitivität ist enorm hoch und ein Nachweis ist somit auch hier ein meldepflichtiger positiver Befund einer Legionellose. Sorgfalt ist hier indes bei der Vorbereitung geboten, um eine Kontamination der Proben durch Legionellen-haltiges Wasser zu verhindern.

Die Therapie der Legionärskrankheit beschränkt sich wegen der β -Laktam-Ineffizienz bei intrazellulären Bakterien auf Makrolide, Tetracycline und Fluorchinolone. Makrolide wie Erythromycin oder neuerdings Doxycyclin haben ihre Effektivität gegen atypische Pneumonie-Erreger jahrelang unter Beweis gestellt und sind auch weiterhin erste Antimikrobiotika-Wahl [Blasi, 2004; Jung et al., 2002]. In letzter Zeit zeigen aber respiratorische Chinolone, die auch gegen typische Erreger sehr gute Wirkung zeigen, bessere Erfolge [Cunha, 2006]. Die Therapiedauer sollte zwischen zwei und sechs Wochen liegen. Wegen der schwierigen Nachweisbarkeit können keine genauen Aussagen über die Verteilung der atypischen Pneumonien gegeben werden. Man nimmt jedoch an, dass in Europa ca. 25 % der Lungenerkrankungen auf atypische Pathogene zurückgehen. In Deutschland vermutet das Kompetenznetzwerk für ambulante Pneumonien (CAPNETZ) 15000-30000 Legionellosen pro Jahr, wengleich im Jahr 2006 nur 483 Fälle von Legionärskrankheit an das Robert Koch-

Institut (RKI) übermittelt wurden. Legionellen werden in ambulanten und hospitalisierten Patienten, die an Pneumonie leiden, gleichermaßen vorgefunden. Es besteht also keine erhöhte nosokomiale Infektionsrate. In weniger als 10% der Fälle sind nicht-*L. pneumophila* Spezies die Erregerursache [von Baum et al., 2008].

2.2 Legionellen und ihre Infektiosität

Konfrontiert mit den ständigen Attacken von Amöben/Protozoen und Nematoden, haben einige Bakterien in ihrer Co-Evolution mit diesen Phagozyten ausgeklügelte Mechanismen entwickelt, um der lysosomalen Verdauung zu entkommen; darüber hinaus ist es sogar einigen Spezies gelungen, die Phagozyten zur intrazellulären Vermehrung zu benutzen [Hilbi et al., 2007].

Die Virulenz und virulenzassoziierte Gene, die mindestens zu einem Punkt in der Transmission und/oder dem Infektionsprozess in den nicht-Mammalia-Zellwirten beitragen, sind auch für die Infektion von Säugetierzellen vonnöten. Als Beispiel seien hier Makrophagen – die viele Merkmale mit den Proto- und Metazoen teilen – genannt [Hilbi et al., 2007; Albert-Weissenberger et al., 2007; Kazmierczak et al., 2005; Abu Kwaik, 1998]. Dabei wird in der Fachwelt viel darüber diskutiert, ob die Fähigkeit zum Befall menschlicher alveolarer Makrophagen oder Monocyten nicht eher ein evolutiver Nebeneffekt ist [Albert-Weissenberger et al., 2007; Swanson & Hammer, 2000].

Legionella zeigt sich wie viele andere pathogene Bakterien auch ausgesprochen angepasst an seine lokale Umgebung bzw. Wirte. Grob gefasst lässt sich der Lebenszyklus – im normalen parasitären Umfeld – in einen biphasischen Zyklus einteilen: und zwar in die intrazelluläre replikative und die infektiöse transmissive Phase [Shi et al., 2006].

Phänotypisch betrachtet, sind die Bakterien während der replikativen Phase natriumsalz-resistent, aber sensitiv gegenüber Umwelteinflüssen wie saurem pH; zusätzlich zeigen sie reduzierte Cytotoxizität. Umgekehrt zeigt sich das phänotypische Bild in der transmissiven Phase: hier sind die Mikroorganismen resistent gegen Biozide und Antibiotika, weitaus invasiver und virulenter, sensitiv gegen Natriumsalze und sie vermögen die Phagosom-Lysosom-Fusion der Wirtszelle zu inhibieren [Hammer et al., 2002; Hammer & Swanson, 1999; Barker et al., 1992].

2.2.1 Der intrazelluläre Lebenszyklus in Protozoen und Metazoen – und die dabei bedeutsamen Virulenzfaktoren

Zunächst muss *L. pneumophila* von den Amöben/Protozoen/Makrophagen aufgenommen werden (s. Abb. II.3 (1)). Dies geschieht entweder über pathogengesteuerte konventionelle Phagozytose [Halablab et al., 1990] oder über die ungewöhnliche sog. „coiling“-Phagozytose [Venkataraman et al., 1998; Horwitz, 1984], bei der sich ein ‚einarmiges‘ Pseudopodium um das Bakterium stülpt und es am Ende umschließt. Der erste Kontakt, die Adhäsion und die ersten Sekretionsabläufe in die Wirtszelle werden dabei von *L. pneumophila* mit wichtigen dafür zuständigen Virulenzproteinen vorgenommen, wovon einige inzwischen bestens charakterisiert und beschrieben sind.

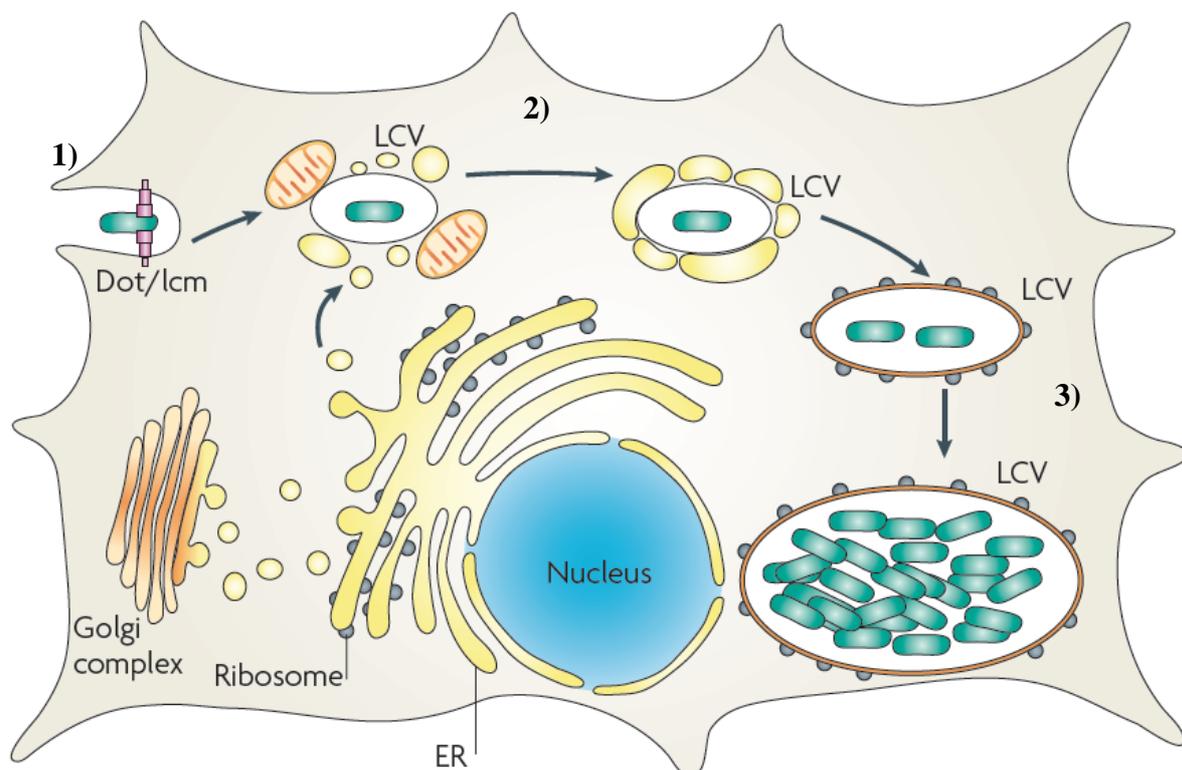


Abb. II.3 (entnommen aus Isberg et al., 2009) Schematische Darstellung des intrazellulären Lebensablaufs von *L. pneumophila* im Makrophagen. (1) Adhärenz und Eintritt in die eukaryontische Wirtszelle. (2) Unterbindung des Transports der LCV („*Legionella*-containing vacuole“) in das lysosomale Netzwerk der Wirtszelle und Rekrutierung von endoplasmatischem Retikulum (ER) und Mitochondrien nahe der LCV. Die Vesikel, die die LCV umgeben, entwickeln sich hin zu einer Art rauem ER, ähnlich dem des Wirts. (3) Im ER-ähnlichem Zellkompartiment repliziert das Bakterium und lysiert darauf die Wirtszelle, um austreten zu können.

An der Membranoberfläche von *L. pneumophila* befinden sich fünf verschiedene Virulenzfaktoren: das „major outer membrane proteine (MOMP), die Flagelle, die TypIV-Pili, das 24 kDa große Mip („*macrophage infectivity potentiator*“) und das Hitzeschock-Protein Hsp60 („*heat shock protein*“).

MOMP bindet den Komplement-Komponenten C3 von Monocyten und Makrophagen, die von den Komplement-Rezeptoren CR1 und CR3 der Säugetierzelle erkannt und gebunden werden [Krinos et al., 1999; Bellinger-Kawahara & Horwitz, 1990; Payne & Horwitz, 1987]; diese Bindung leitet die coiling-Phagozytose ein. Essentiell für den Eintritt ist diese Opsonierung jedoch nicht [Lück & Steinert, 2006; Steinert et al., 1994].

Die Flagelle ist für *L. pneumophila* von zweierlei Bedeutung: einerseits bietet sie den Mikroorganismen Motilität zum Auffinden und Anheften von Wirtszellen [Dietrich et al., 2001]. Andererseits ist der flagellare Phänotyp genetisch mit der Expression weiterer transmissiver und damit virulenter Merkmale verknüpft. Mutanten mit defekter Flagellen-Expression zeigen daher ein reduziertes Infektions- und Eindringvermögen bzw. nach der Replikation eine verringerte Cytotoxizität [Heuner et al., 2002].

Neben der Flagelle findet man bei Legionellen zwei weitere Oberflächenproteine: die TypIV-Pili unterscheiden sich dabei lediglich in ihrer Länge voneinander [Stone & Abu Kwaik, 1998]. TypIV-Pili sind flagellenunabhängige Fortsätze, die zur Oberflächenmotilität genutzt werden können und bei Gram-negativen Bakterien, vornehmlich bei Proteobakterien der β -, γ - und δ -Klasse, weit verbreitet sind [Coil & Anne, 2009; Burrows, 2005]. Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle bei der Adhärenz der Bakterienzelle an die Wirtszelle, nicht nur bei *Legionella*, sondern z.B. auch bei *Pseudomonas aeruginosa* [Hahn, 1997].

Ebenfalls involviert in die Adhärenz zur Wirtszelle ist das auf Stressantworten spezialisierte und bekannte 60 kDa große Hsp60-Protein, ein Mitglied der GroEL-Familie der Chaperone. Hsp60 ist dabei normalerweise im Cytoplasma zu finden. *L. pneumophila* scheint das Protein aber aktiv an die Oberfläche zu transportieren, wo es von spezifischen Rezeptoren der Wirtszelle erkannt wird [Garduno et al., 1998]. Darüber hinaus wird Hsp60 auch eine Funktion als Invasin, welches die frühe Organellen-Verteilung und die phagolysosomale Fusion mit verändert, zugesprochen [Hoffman & Garduno, 1999].

Der letzte bekannte, wichtige zelloberflächenassoziierte Faktor von *L. pneumophila* ist das Mip. Hierbei handelt es sich um ein 24 kDa großes Prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Protein (zugehörig zur Klasse der FK506-Bindeproteine), das für maximale Virulenz des Bakteriums vonnöten ist, besonders für die ersten Schritte der Adhärenz und Invasion, weniger für die intrazelluläre Replikation [Shi et al., 2006; Riboldi-Tunnicliffe et al., 2001]. Zudem bindet Mip an das extrazelluläre Matrix-Protein Kollagen (Typ I-VI). In einer konzertierten Aktion mit einer noch unbekanntem Serin-Protease könnten diese extrazellulären Barrieren in der Lunge entfernt und somit eine Weiterverbreitung des Pathogens begünstigt werden [Wagner et al., 2007].

Auch die äußerste Schicht der Legionellen, das Lipopolysaccharid (LPS), trägt zur Virulenz der Erreger bei. *Legionella* kann die Zusammensetzung des LPS variieren und so etwa das Lipid A aus langkettigen Fettsäuren synthetisieren und damit die Pyrogenität heruntersetzen [Lüneberg et al., 1998].

Nach der Aufnahme (s. Abb. II.3 (2)) oder schon möglicherweise während des „engulfment“-Vorgangs der coiling-Phagozytose inhibiert *L. pneumophila* die Vakuolenansäuerung und die Fusion des Phagosoms mit dem Lysosom. Stattdessen formt sich eine spezielle legionellahaltige Vakuole (LCV), die keiner eukaryontischen Verdauung mehr unterworfen ist, obwohl sich durchaus zu einem späteren Zeitpunkt lysosomale Marker wie das LAMP1 („Lysosome-associated membrane protein“) an der Membran der LCV ermitteln lassen [Sturgill-Koszycki & Swanson, 2000].

Diese hochkomplexen Vorgänge werden vornehmlich von einem aus 27 Genen kodierten TypIV-Sekretionssystem (TypIVSS) übernommen: dem Dot/Icm („defective for organelle trafficking/intracellular multiplication“). Dieser Apparat [Review s. Segal et al., 2005] injiziert eine Vielzahl an Proteinen mit unterschiedlichsten Aufgaben und Merkmalen in die eukaryontische Zelle [Ensminger & Isberg, 2009]. Als zwei maßgebliche Effektorproteine seien hier zunächst das RalF-Protein („recruitment of Arf to *Legionella* phagosome“) und die Vip (A-F)-Proteine („VPS inhibiting protein“) erwähnt. Ersteres rekrutiert das eukaryontische Protein Arf („ADP-ribosylation factor“) und trägt damit zur Etablierung der replikativen Organelle bei [Nagai et al., 2002]. Die verschiedenen Vips lassen zumindest in Hefeorganismen erkennen, dass sie den lysosomalen Protein-Verkehr stark hemmen [Shohdy et al., 2005].

Fehlen der Nukleotid-Austausch-Faktor RalF oder alle anderen per Dot/Icm sekretierten Effektorproteine (bei Dot/Icm-defekten Mutanten), kommt es zum normalen Ablauf der Fusion von Endosomen und Lysosomen – die Bakterien werden verdaut [Roy et al., 1998]. Neben der Fusionsinhibierung bewirken andere Effektorproteine wie SidM („substrate of Icm/Dot“) und LepB („effector protein B“) die Rekrutierung und Anlagerung des endoplasmatischen Retikulums (ER) an die Legionellen-Vakuole [Ingmundson et al., 2007; Machner & Isberg, 2006]. Die Anlagerung könnte von *L. pneumophila* dazu genutzt werden, um Nährstoffe, die im ER synthetisiert werden, für sich selbst zu verwerten [Swanson & Hammer, 2000]. Obligatorisch für die Vermehrung ist diese Rekrutierung aber nicht: so kommt es bei *Legionella micdadei* zu keiner Verflechtung mit dem eukaryontischen ER [Gao et al., 1999; Joshi & Swanson, 1999].

Inzwischen sind über 80 dieser Effektoren – mit zum Teil eukaryontenähnlichen Sequenzmotiven – identifiziert worden, die über eine noch unbekannte Signalsequenz vom Dot/Icm-Apparat transportiert werden [Ensminger & Isberg, 2009; de Felipe et al., 2008]. Die genaue Funktion vieler dieser translozierten Effektorproteine ist noch unbekannt, zumal die zugehörigen Deletionsmutanten oftmals ohne starken Phänotyp einhergehen.

Das TypIVSS Dot/Icm spielt zugleich noch eine wichtige Rolle bei der pathogeninduzierten Phagocytose [Hilbi et al., 2001], der Porenbildung für den Austritt und bei der Lyse bzw. dem Zelltod des Wirtes [Kirby et al., 1998] – es zeichnet somit als eine Hauptkomponente für den gesamten Ablauf des intrazellulären Lebenszyklus von *L. pneumophila* verantwortlich [Berger et al., 1994; Marra et al., 1992].

Ein weiteres TypIVSS ist Lvh („*Legionella vir* homologue“), welches jedoch für das intrazelluläre Wachstum in Amöben und Makrophagen entbehrlich ist [Segal et al., 1999].

Da Proteine zu den wichtigsten Makromolekülen gehören, die in die Wirtszelle transferiert werden [Nagai et al., 2002], ist es wenig verwunderlich, dass weitere Sekretionssysteme und ihre zugehörigen Virulenzfaktoren in die Aufrechterhaltung des intrazellulären Zyklus von *L. pneumophila* involviert sind. Neben dem TypIVSS findet man noch ein Typ1SS, das LSS (*Legionella* Sekretionssystem) und ein Typ2SS, das Lsp (*Legionella* Sekretionsprotein). Vor allem letzteres ist bekannt für die Sekretion von Pathogenitätsfaktoren wie Proteasen, Phospholipasen, Aminopeptidasen und RNasen. Auch hier zeigt sich verringerte Virulenz bei entsprechend rekombinanten Lsp-Mutanten [Rossier et al., 2008; DebRoy et al., 2006; Aragon et al., 2002; Rossier & Cianciotto, 2001; Flieger et al., 2000, 2001]. Das Ausscheiden dieser Effektorproteine dient dem Pathogen allerdings überwiegend zur Akquirierung von Nahrungsbestandteilen und weniger der Rekrutierung oder Fusionsinhibierung des Schrittes 2 in Abb. II.3.

Der Ablauf des intrazellulären Lebenszyklus von *L. pneumophila* führt im dritten Punkt zur Vermehrung (s. Abb. II.3 (3)). Innerhalb des gebildeten Zellkompartiments, das einem rauen, von Ribosomen umlagerten ER gleicht, kann nun die Synthesemaschinerie starten und das Bakterium bei ausreichendem Nährstoffangebot zu replizieren beginnen (ca. vier Stunden nach Infektion). Hat sich der Mikroorganismus bis zu diesem Zeitpunkt noch in der transmissiven und virulenten Phase befunden (s. Kap. 2.2), tritt er nun über in die zweite, replikative Phase seines biphasischen Lebenszyklus.

Über die Regulation oder die Auslöser dieser Umstellung ist erstaunlich wenig bekannt. Der Fokus der wissenschaftlichen Arbeiten liegt meist auf der Umstrukturierung/dem Wandel der replikativen zur transmissiven Phasen. Somit sind bis dato nur Details und Elemente von

Regulatoren bekannt geworden, die das Bakterium in der Multiplikations-Phase arretieren – aber nichts über solche, die es in eben diese Phase überführen. Möglicherweise spielt hier das Nahrungsüberangebot eine mitentscheidende Rolle.

Der bekannteste Faktor, der *L. pneumophila* in der replikativen, nicht-virulenten Phase hält, ist das CsrA-Protein („carbon storage regulator“). Dieses Regulatorprotein findet man in einer Vielfalt von Gram-negativen Bakterien, wo es stets die Expression virulenzassoziierter Merkmale unterdrückt [Forsbach-Birk et al., 2004]. Das Csr-System besteht neben dem bereits genannten Protein noch aus der CsrB-Komponente, einem nicht kodierenden RNA-Molekül [Liu & Romeo, 1997; Liu et al., 1997]. Zusammen inhibieren sie auf posttranskriptionalem Weg mRNA-Moleküle der postexponentiellen Wachstumsphase und von transmissiven Faktoren. Dabei blockieren sie entweder die ribosomale Bindestelle oder – gebunden an die mRNA – sie geben ein direktes Substrat für Endonukleasen ab und werden samt mRNA gespalten [Molofsky & Swanson, 2003; Romeo, 1998].

Elementar für die Vermehrung und das Wachstum ist die Eisenaufnahme. Eisen dient als Cofaktor in Enzymen und zumindest in natürlicher Umgebung noch zur Bildung des Pyomelanins. Dieses Pigment stellt einmal einen UV-Schutz dar, zeigt aber auch Eisen-Reduktase-Aktivität, vom dreiwertigen Fe^{3+} zum zweiwertigen Fe^{2+} [Chatfield & Cianciotto, 2007]. *Legionella* sekretiert daher ein Siderophorprotein, das Legiobactin [Liles et al., 2000]. Dieses Protein wird auch intrazellulär exprimiert, aber es ist nicht relevant für das Überleben in Makrophagen und Amöben [Allard et al., 2006]. Daher kommen neben dem Legiobactin noch vermutlich andere Siderophore und gesichert Eisen (Fe^{2+})-Aufnahme-Transporter zum Tragen, z. B. das feoAB-System [Petermann et al., 2010; Robey & Cianciotto, 2002], die das in eukaryontischen Zellen vorhandene Fe^{2+} in die Bakterienzelle aufnehmen [für Details s. Cianciotto, 2007] und auch im Gegensatz zum Legiobactin für das intrazelluläre Wachstum von Bedeutung sind.

Hat sich *L. pneumophila* so stark vermehrt, dass es sogar die komplette Wirtszelle ausfüllen kann (s. Abb. II.4), kommt es wieder zum anfänglichen Status und Phänotyp der transmissiven, virulenten Merkmale, damit die Bakterienzellen ausbrechen können und in der Lage sind, direkt neue Wirte zu befallen. Doch wie wird dieser Übergang von der replikativen zur virulenten Phase ausgelöst und gesteuert? Der Übergang ist an mindestens zwei Auslösemomente gekoppelt: einmal wird das Vorhandensein von Nahrungsbestandteilen gemessen. Das zweite Kriterium, welches von *L. pneumophila* überwacht wird, ist das Zellwachstum, die Zell-Zell-Kommunikation untereinander. Dieses auch als Quorum Sensing bezeichnete System [Fuqua et al., 1994] produziert und sekretiert kleine membran-permeable

Moleküle (sog. Autoinducer), die konzentrationsabhängig die Genexpression – direkt oder über Signalkaskaden geleitet – regulieren [von Bodman et al., 2008; Keller & Surette, 2006]. In *L. pneumophila* besteht dieses System aus den folgenden bisher entdeckten Proteinen: der Autoinducer-Synthase, LqsA („*Legionella* quorum sensing“), der Sensor-Kinase LqsS und dem Regulator-Protein LqsR [Spirig et al., 2008]. Dabei agiert LqsR vor allem als Regulator vom transmissiven Merkmal Phagozytose und anderen virulenzassoziierten Attributen [Tiaden et al., 2007, 2008]. Die Aktivierung von LqsR ist aber noch unbekannt, wenn auch das Autoinducer-Molekül (α -Hydroxyketon: 3-Hydroxypentadecan-4-one) selbst ein oder die Sensor-Kinase wegen ihrer gemeinsamen Gen-Cluster-Anordnung die wahrscheinlichsten Auslöser darstellen.

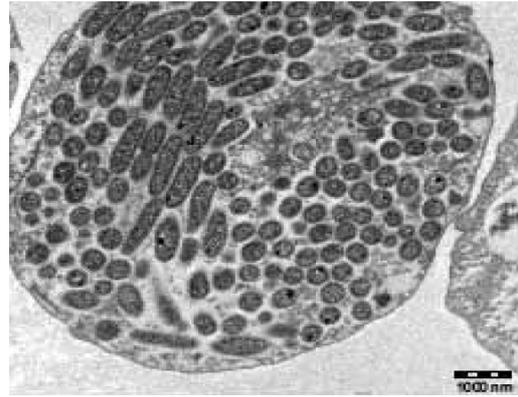


Abb. II.4 Elektronenmikroskopische Aufnahme einer mit *L. pneumophila* ausgefüllten Amöbe. (entnommen aus dem Epidemiologischen Bulletin 50/07 des RKI)

Neben dem Quorum Sensing-Netzwerk kommt die eingangs erwähnte Nährstoffüberwachung als Schalter für die Transition von der replikativen in die transmissive Phase zum Einsatz. Zu geringes Nährstoffaufkommen wie fehlende Aminosäuren, Kohlenstoffmangel, Eisen-Absenz oder Inhibierung der Fettsäure-Biosynthese wird vor allem über die *Legionella* Proteine RelA (relaxierter Phänotyp, registriert unbeladene tRNA) und SpoT („spotless“ Phänotyp) [Dalebroux et al., 2009; Hogg et al., 2004] wahrgenommen. Bei Mangel synthetisieren beide das Alarmon (p)ppGpp (Guanosin-5’-(tri)diphosphat-3’-diphosphat), welches vom Zwei-Komponenten-System LetA/S („*Legionella* transmission Activator/Sensor“) erkannt wird [Hammer et al., 2002]. Nach Aktivierung des Autophosphorylierungssystems induziert LetA die Expression zweier nichtkodierender RNA Moleküle: RsmY („repressor of secondary metabolites“) und RsmZ, die antagonistisch auf das CsrA-Molekül wirken und somit die Repression der transmissiven Expression durch CsrA/B aufheben [Sahr et al., 2009]. Möglicherweise durch ppGpp direkt aktiviert werden die Sigma-Faktoren RpoS sowie der Regulator RpoN [Molofsky & Swanson, 2004].

Dass diese regulatorische Kaskade nur teilweise aufgeklärt und verstanden ist und erheblich komplexer mit zusätzlichen Regulatoren und Signal-Effektoren – als in Abb. II.5 dargestellt – verläuft, zeigen unter anderem auch die Arbeiten von Rasis [Rasis & Segal, 2009] und McNealy [McNealy et al., 2005].

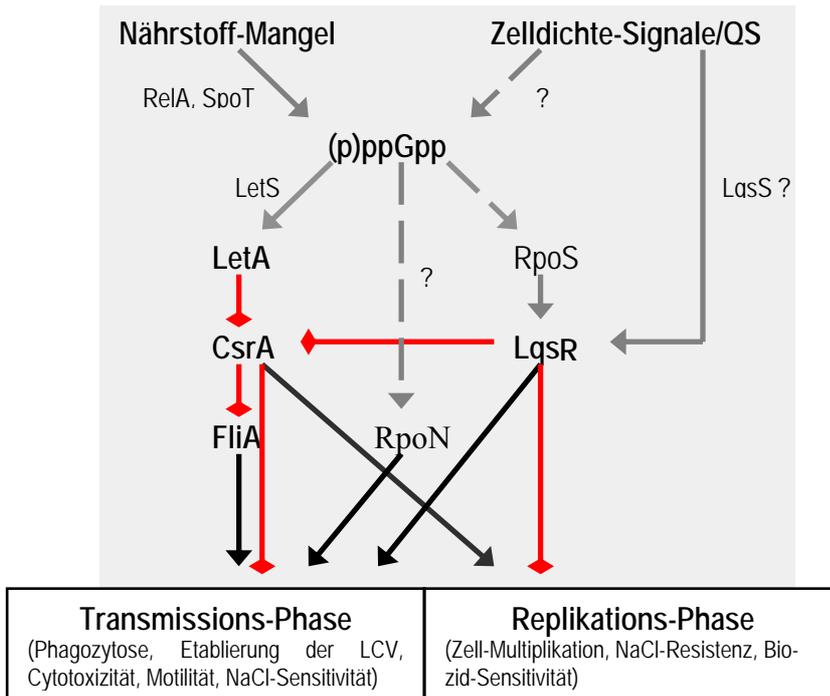


Abb. II.5 Vereinfachte Darstellung der regulatorischen Kaskade, die den biphasischen Lebenszyklus von *L. pneumophila* bestimmt. Graue Pfeile deuten Aktivierung oder Signaltransduktion an. Vermutete und noch nicht vollständig geklärte Regulationspfade sind durch gestrichelte Pfeile angedeutet. Rote Rautenpfeile symbolisieren eine Inhibition oder Repression. Die schwarzen Pfeile zeigen die Aktivierung einer der beiden Phasen von *L. pneumophila* an.

In der letzten Phase des intrazellulären Lebenszyklus versucht *L. pneumophila*, dem nährstoffarmen Raum zu entkommen, und es kommt zum Ausbruch aus der Wirtszelle. *Legionella* nutzt dazu mehrere Cytotoxine, also Proteine, die die Zelle schädigen bzw. abtöten. Beschrieben ist zunächst das Legiolysin, ein 39 kDa großes Enzym, welches hämolytische Aktivität aufweist. Da eine deletierte *Legionella*-Mutante auch weiterhin hämolytisch und replikativ bleibt, ist anzunehmen, dass *L. pneumophila* noch weitere Proteine mit redundanter Funktion bereithält [Swanson & Hammer, 2000; Wintermeyer et al., 1994]. Dazu zählen grundsätzlich auch sekretierte Phospholipasen, die ebenfalls lytische Aktivität an der Phagosomen-Membran und der Wirtszelle aufzeigen [Plotkowski & Meirelles, 1997]. Hier sollte vor allem die zellassoziierte Phospholipase A (plaB) erwähnt werden [Banerji et al., 2008; Flieger et al., 2004].

Ein weiteres Cytotoxin ist die Metalloprotease ProA. Ihre Eigenschaften der Proteolyse und auch Hämolyse machen dieses Protein zu einem Cytotoxizität-induzierenden Faktor [Keen & Hoffman, 1989]. Da alle Cytotoxine zur transmissiven Phase des Zyklus zu zählen sind, werden auch sie, wie in Abb. II.5 gezeigt, während des Übergangs von der Replikation zur Transmission aktiviert. Die Hauptaufgabe der Sekretion übernimmt auch wieder das TypIVSS Dot/Icm.

Neben der Funktion des Entrinnens aus der Wirtszelle haben all diese sekretierten Cytotoxine im Makrophagen natürlich auch schadhafte Auswirkungen auf das umgebende pulmonale Gewebe und erklären dabei auch das Krankheitsbild.

Abweichend von der durch *L. pneumophila* verursachten Cytotoxizität kann es ebenfalls zum Caspase-(„cysteine dependent aspartate-specific protease“) induzierten Zelltod, der Apoptose, kommen [Gao & Abu Kwaik, 1999b]. Dabei wird die wirtseigene Caspase-3, die zur Apoptose-auslösenden Klasse der Caspasen gehört [Fink & Cookson, 2005], kurz nach Infektion der Wirtszelle durch noch unbekannte Faktoren induziert [Gao & Abu Kwaik, 1999a]; die Apoptose wird aber bis zur spät logarithmischen Wachstumsphase verzögert [Santic et al., 2007].

Ob auch Flagellin-aktivierte Caspase-1 vermittelte Apoptose eine Rolle im humanen Makrophagen spielt, ist noch nicht abschließend geklärt.

Die Apoptose-Einleitung wird zusätzlich durch porenformende Toxine, wie bspw. das RtxA-Protein („repeats in structural toxin“), verstärkt [Cirillo et al., 2002; Kirby et al., 1998].

Mit dem Austritt aus der Wirtszelle endet der Zyklus, findet für *L. pneumophila* aber seinen erneuten Ablauf beim Aufsuchen einer neuen Wirtszelle.

2.2.2 Die Mutanten *Legionella pneumophila* Corby *flaR*⁻, *fliA*⁻ und der Stamm *Legionella hackeliae*

Sowohl die *Legionella pneumophila* Corby *flaR*⁻ als auch die *fliA*⁻-Mutante sind in ihren entsprechenden Genen durch das Einfügen einer für Kanamycin-Resistenz (Kanamycin^r) kodierenden Kasette inaktiviert. Erreicht wurde dies durch die zuvor per PCR („Polymerase chain-reaction“) und entsprechenden Primern amplifizierte Gene, die mittels Restriktionsenzym geschnitten und dann mit der Kanamycin^r-Kasette ligiert wurden. Mit dem so vorliegenden Vektor wurde daraufhin über eine Crossover-Reaktion das jeweilige Gen im *Legionella pneumophila* Corby-Genom ausgetauscht [Heuner et al., 2002].

Das Gen *flaR*, welches nur im Genom der Spezies *L. pneumophila* Corby zu finden ist, kodiert für ein 304 Aminosäurereste (34,5 kDa) umfassendes Transkriptions-Regulator-Protein der LTTR-Familie („Lysine rich-type transcriptional regulator“) [Heuner et al., 2000]. Mitglieder dieser Familie weisen folgende Gemeinsamkeiten auf [Schell, 1993]:

(1) Die Proteingröße variiert im Bereich von 276-324 Aminosäureresten, die DNA-Bindedomäne („helix-turn-helix“-Motiv) befindet sich im N-terminalen Bereich. (2) Alle Proteine weisen eine Coinducer-Bindedomäne auf, die die Expression bei Vorhandensein des Coinducers um das 20-100-fache steigert; (3) LTTR können aber auch immer an die target-DNA ohne Inducer binden und dann die Expression herunterregulieren.

FlaR wurde von Heuner et al. [2000] entdeckt, als man nach neuen Transkriptions-Faktoren suchte, die in der Lage waren, die luxAB-Genexpression, die rekombinant unter der Kontrolle des *Legionella* Flagellin-Promotors steht, zu reduzieren. LuxAB kodiert dabei für ein Luciferase Protein [Meighen, 1993]. Dezimierte Luciferase-Aktivität zeigte dann die negative luxAB-Expression. FlaR bindet demnach an den Flagellin-Promotor des flaA-Gens und, wie weitere Untersuchungen ergeben haben, auch mindestens an die Promotorregion zweier unbekannter ORFs („open reading frame“) [Heuner et al., 2000]. Die Rolle von FlaR in der flaA-Expression und sein Einfluss auf die gesamte Genexpression, also die Regulation, in *L. pneumophila* Corby muss noch genauer untersucht werden.

FliA kodiert in *L. pneumophila* Corby für einen alternativen Sigma-Faktor, σ^{28} [Heuner et al., 1995, 1997]. Die Sigma-28-Klasse ist eine Unterfamilie der bekannten Standard-Sigma-70-Familie [Kazmierczak et al., 2005], wobei die Zahl die ungefähre Molmasse des Proteins angibt. Sigma-Faktoren sind eine Klasse von Proteinen, die an RNA-Polymerasen binden und damit deren Promotorsequenzen-Bindungsaffinität erhöhen. Alternative Sigma-Faktoren ersetzen dabei die Standard-Faktoren und geleiten die RNA-Polymerase zu Promotorsequenzen, die für sie normalerweise unzugänglich sind. Die regulatorische Hauptaufgabe der σ^{28} -Faktoren, die sich in zahlreichen Gram-negativen bzw. Gram-positiven Bakteriengattungen finden, liegt in der Transkriptionskontrolle von Flagellen-Synthese-Genen bzw. insgesamt der Gene der bakteriellen Motilität [Kazmierczak et al., 2005]. Die fliA⁻-Mutante von *L. pneumophila* Corby bleibt daher flagellenlos und exprimiert kein Flagellin. Entsprechend weniger effizient repliziert die fliA⁻-Mutante in Co-Kultur mit Amöben [Heuner et al., 2002] und zeigt sich somit minder virulent; ähnlich der flaR⁻-Mutante, die eine geringere Multiplikation in *Dictyostelium discoideum* aufweist (nicht publizierte Daten, mündliche Mitteilung von Heuner, Würzburg).

Grundsätzlich ist man heute der Auffassung, dass die Expression des virulenten bakteriellen Phänotyps genetisch mit der Expression der Flagelle verlinkt ist [Molofsky et al., 2005; Heuner & Steinert, 2003; Dietrich et al., 2001]. Beide Mutanten sind also ursprünglich mit Hinblick auf die Untersuchung der Regulation der Flagellen-Synthese bzw. der damit verbundenen Regulation weiterer virulenter, transmissiver Merkmale hergestellt worden.

Von der Bakterienart *Legionella hackeliae* wird in der Literatur erstmalig im Jahre 1985 gesprochen [Brenner et al., 1985]. Im Jahre 1981 ist dieser Stamm von M. Hackel in Michigan aus dem Bronchialgewebe eines an Pneumonie erkrankten Patienten isoliert worden. Insgesamt wurden bisher zwei Serotypen von *L. hackeliae* separiert [Wilkinson et al., 1985]. Fälle einer Erkrankung am sog. Pontiac-Fieber sind nicht bekannt, obwohl *L. hackeliae*

Erreger der Legionärskrankheit ist [Lück & Steinert, 2006]. Er gilt allerdings als nicht so sehr virulent wie *L. pneumophila* [Shevchuk et al., 2009]; letzt genannte Autoren zeigen auch, dass der Unterschied auf Proteom-Ebene in isolierten Phagosomen zu *L. pneumophila* Corby immens erscheint. Das Gleiche gilt für die Transkriptom-Ebene im Infektionszustand beim Wirt *Dictyostelium discoideum* [Farbrother et al., 2006]. Zumindest die Differenzen im Proteom von *L. hackeliae* zu *L. pneumophila* können in dieser Arbeit bestätigt werden (s. Ergebnisse Kap.5.1.1).

2.3 TypIV-Pili pathogener, Gram-negativer Bakterien

TypIV-Transporter sind eine von sechs großen Transporter-Hauptfamilien, die Makromoleküle über eine Membran hinweg exportieren können [Juhas et al., 2008]. TypIV-Transporter haben alle eine gewisse Struktur-Ähnlichkeit, auch wenn die transferierten Substrate bei Gram-negativen Bakterien wie *Agrobacterium tumefaciens*, *Helicobacter pylori*, *Bordetella pertussis* oder *L. pneumophila* stark differieren. Evolutionsbiologisch stammen alle TypIV-SS von Konjugations-Systemen, also dem DNA-Transfer von Bakterium zu Bakterium, ab [Lawley et al., 2003; Burns, 2003]. Das bekannteste und am besten untersuchte TypIV-System ist das VirB-System von *Agrobacterium tumefaciens*, welches noch relativ ursprünglich Einzelstrang-DNA in Pflanzenzellen exportiert. Die Mehrzahl der heute beschriebenen TypIV-Familien von pathogenen Bakterien transportiert Protein-Virulenzfaktoren, wie z. B. das Ptl-System von *Bordetella pertussis*, dem Erreger des Keuchhustens, welches unter anderem das Pertussis-Toxin sekretiert [Verma & Burns, 2007].

Unter Pili versteht man flexible, filamentöse Strukturen mit einem Durchmesser von 6-9 nm und mehreren Mikrometer Länge, die membrandurchspannend auf der Oberfläche von zahlreichen Gram-negativen und -positiven Bakterien auszumachen sind [Pelicic, 2008]. Laut Proft & Baker [2009] sind sie erstmalig im Jahre 1949 beschrieben worden.

TypIV-Pili könnte man demnach als verlängerte TypIV-SS bezeichnen, die erstaunlicherweise mit einer Vielzahl von Funktionen aufwarten können, wie Adhäsion, DNA-Transfer, „twitching motility“, Biofilm-Formierung und Phagen- und Signaltransduktion [Craig & Li, 2008]. Ottow hat im Jahre 1975 die Pili in sechs verschiedene Gruppen eingeteilt, die bis heute immer noch gebräuchlich sind. Die Gruppe vier (TypIV) Pili werden dabei von Ottow mit Adhäsion und „twitching motility“ assoziiert, wenngleich die

eigentlichen Sekretionssysteme, die zwangsläufig mit den Pili verbunden sind, vom Autor nicht berücksichtigt wurden [Ottow, 1975].

Die Biogenese dieser Multifunktionswerkzeuge benötigt mehr als ein Dutzend Proteine, wovon unter den divergenten Bakterienspezies viele konservierte Sequenzbereiche bestehen geblieben sind.

Das sog. Pilin (meist PilA oder PilE) homopolymerisiert zum eigentlichen Pilusstrang, während die anderen Proteine, die sog. Pseudopiline (gewöhnlich bezeichnet als PilC-PilE, PilV-X und FimT-U) am noch wenig verstandenen Aufbau des Pilus beteiligt sind [Hazes & Frost, 2008]. Pilin wird immer als Vorstufe, Präpilin, cytoplasmatisch synthetisiert. Die dabei vorhandene hydrophobe Signalsequenz, die stets mit einem konservierten und essentiellen Glycin-Rest endet, wird von einer spezifischen Präpilin-Peptidase (meist als PilD bezeichnet) erkannt und geschnitten. Ferner findet man bei allen TypIV-Pili eine ATPase, die den Pilus-Zusammenbau katalysiert, ein membranintegrales Protein, welches die ATPase rekrutiert, und ein Außenmembran-Sekretin Protein [Craig & Li, 2008].

TypIV-Pili werden in die Klassen A und B unterteilt: die Klasse A zeigt in ihren Präpilin-Proteinen kurze Signalsequenzen (<10 Aminosäurereste, AR) und eine charakteristische Länge von 150-160 AR. TypIV-B Pilin hingegen zeigen lange Leader-Sequenzen (15-30 AR) und entweder auch lange Pili (180-200 AR) oder extrem kurze (40-50 AR). Möglicherweise ist *L. pneumophila* mit beiden Pili-Klassen versehen, finden sich doch auf seiner Oberfläche multiple Pili unterschiedlicher Länge [Stone & Abu Kwaik, 1998]. Eine klare Einteilung ist in der Literatur aber nicht beschrieben.

Beide Pili-Klassen zeigen aber in ihrer 3D-Struktur konservierte Architektur, bestehend aus einer N-terminalen α -Helix, einer Disulfidbrücke zwischen C-terminalem Abschnitt und einem β -Faltblatt sowie einem globulären Kopf [Pelicic, 2008; Craig & Li, 2008].

Wie die Pili-Untereinheiten letztlich genau durch die innere Membran ins Periplasma und von dort durch die Peptidoglykanschicht transloziert werden und sich im Extrazellulärraum zusammenlagern, ist nicht bekannt. Daran beteiligt sind die sog. Sekretine, die von der inneren Membran den Transport über die gewöhnliche Sec-Maschinerie („secretory“) übernehmen [Craig & Li, 2008; Review zum Sec-Transport s. Rusch & Kendall, 2007]. TypIV-Sekretine gehören einer Sekretin-Superfamilie an, die auch in Typ2- und Typ3-SS zu finden sind. Es sind Homooligomere, integrale Membranproteine, mit einer konservierten C-terminalen membrandurchspannenden Region, die für die Oligomerisierung verantwortlich zeichnet [Bayan et al., 2006].

Virulenzfaktoren in hochkomplexe Pathogenitätspfadwege eingebunden und verstrickt sind. Das Fehlen dieser Proteine muss demgemäß nicht immer in einem eindeutigen Phänotyp enden [Falkow, 2004].

Oberflächen-Pili an Legionellaceae wurden erstmals von Rodgers im Jahre 1979 [Rodgers, 1979], kurz nach Entdecken der Spezies, beobachtet – wie auch schon in Kap. 2.2.1 beschrieben. Eine limitierte Rolle spielt der TypIV-Pilus-Apparat von *L. pneumophila* in der Biofilm-Kolonisierung und Überdauerung. Die Autoren Lucas et al. deuten in ihrer Arbeit darauf hin, dass die pililose Mutante zwar nicht in der Lage ist, sich auf einem vorgefertigten Biofilm-Ansatz zu etablieren und abzusetzen; allerdings zeigt sich dieser Phänotyp nicht mehr, wenn man den ganzen Sekretionsapparat durch Mutation der Präpilin-Peptidase PilD (s. Kap. 2.3) ausschaltet. Hier wird vermutet, dass durch den Wegfall des ganzen Apparates eine Überexpression eines unbekanntes PilD-unabhängigen Adhäsins gestartet und folglich der Ausfall kompensiert wird [Lucas et al., 2006].

L. pneumophila besitzt dank seiner TypIV-Pili eine natürliche Kompetenz in der DNA-Konjugation, entweder von chromosomaler oder Plasmid-DNA. Die Fähigkeit der DNA-Transformation korreliert dabei mit der Expression von langen (0,8-1,5 µm) Pili, die sich im Gegensatz zu den kurzen Pili (0,1-0,6 µm) eher selten auf der Oberfläche finden lassen [Stone & Abu Kwaik, 1998]. Durch Deletion des *pilE*-Gens verliert *L. pneumophila* nicht nur die langen TypIV-Pili, sondern auch die natürliche Fähigkeit zum DNA-Austausch mit *Legionella*-verwandten Spezies.

Natürliche DNA-Konjugation lässt sich nach Kochs Postulat allerdings nicht als Pathogenitätsfaktor bezeichnen, da virulente *Legionella*-Bakterien auch ohne diese Kompetenz in keinem maßgeblichen pathogenen Ablauf behindert sind. Allerdings kann ein solches System die Virulenz von Bakterien steigern, wenn z. B. Plasmid-DNA, im Falle von *L. pneumophila* kombiniert mit chromosomaler DNA, transferiert und auch beibehalten, bzw. repliziert wird; sofern die genetische Kodierung auf dem transferierten extrachromosomalen Abschnitt die Virulenz, die Pathogenität des Bakteriums steigern kann.

Die TypIV-Pili von *L. pneumophila* zeigen neben den beiden erwähnten Attributen ein weiteres Charakteristikum: sie unterstützen den Adhärenz-Vorgang durch das Binden an eine Vielzahl von Rezeptoren auf den Oberflächen von Epithel- und Makrophagen-Zellen [Strom & Lory, 1993] und demzufolge auch die Initiation der Infektion dieser Zellen. Meistens erfolgt dieses Anbinden über Lektin-ähnliche Adhäsine, die die Oligosaccharide von Glykoproteinen-, rezeptoren erkennen und meist auf der Spitze des Pilus-Schaftes oder anderen Fimbrien zu finden sind [Proft & Baker, 2009].

Eine *Legionella*-Pilin (pilE)-Mutante zeigt eine 50%ige Minderung in der Anheftung an Epithel- und Makrophagen-Zellen [Stone & Abu Kwaik, 1998]. Der Pilus verleiht *L. pneumophila* demnach einen Vorteil im Anfangsstadium der Infektion eukaryontischer Zellen, wenngleich – ähnlich der Biofilm-Anheftung – noch andere Adhäsine eine Rolle spielen können, wie es auch von weiteren pathogenen Bakterien bekannt ist [Strom & Lory, 1993].

Dass der *Legionella*-Pilus neben seiner Fähigkeit zum DNA-Transfer auch die beschriebene Attachment-Funktion besitzt, hat ihm die Bezeichnung CAP („competence- and adherence-associated pili“) eingebracht [Stone & Abu Kwaik, 1999].

Wie im sonstigen Gram-negativen Bakterien-Reich üblich, sind auch am Aufbau des *Legionella*-Pilus bis zu einem Dutzend Gene beteiligt (s. Kap. 2.3). Eines dieser Gene, pilN, ist in der vorliegenden Arbeit während der Suche nach neuen potentiellen Virulenzfaktoren mittels vergleichender Proteomik (s. Ergebnisse Kap.5.2.1) aufgedeckt worden. PilN ist ein 21,2 kDa großes, 182 Aminosäurereste umfassendes Protein mit bis dato unbekannter Funktion. Eine computergestützte Vorhersage der Sekundärstruktur und Transmembran-Abschnitte hat einen putativen membrandurchspannenden Teil ab dem 21. Aminosäurerest ergeben. Der hydrophobe Membran-Durchtritt umfasst insgesamt 23 Aminosäurereste mit anschließenden 182 Aminosäureresten bis zum C-Terminus. Beim hydrophoben Teil könnte es sich evtl. auch um einen Membran-Anker handeln, lassen sich doch keine typischen Sekretionssignale beim nahe verwandten PilN von *Pseudomonas aeruginosa* feststellen [Mattick et al., 1996].

Sequenz-Vergleiche weisen auf eine 41%ige Aminosäurereste-Übereinstimmung mit dem Protein PilN des Bakteriums *Pseudomonas (P.) aeruginosa* und anderen Pseudomonadaceae hin (s. Abb. II.7).



Abb. II.7 Vergleich der Aminosäure-Sequenzen der PilN-Proteine aus *L. pneumophila* (obere Reihe – pilN_LP) und *Pseudomonas aeruginosa* (untere Reihe – pilN_PA). Das *Legionella* PilN zeigt zum *Pseudomonas*-Protein die größte Sequenz-Identität (41%). Identische Aminosäurereste sind im Bild unterlegt. Die blau umrandeten Aminosäurereste geben ähnliche Reste an, die beide mehr als 70% gemeinsame physikochemische Eigenschaften besitzen - errechnet mit Hilfe der sog. Risler-Matrix [Risler et al., 1988].

Allerdings ist auch die Funktion in *P. aeruginosa* unbekannt. PilN ist dort in einem Fünf-Gen-Cluster (pilM-pilQ) an zweiter Stelle orientiert, genau wie bei *L. pneumophila*. Immerhin konnte in *P. aeruginosa* gezeigt werden, dass PilN essentiell am Aufbau des TypIV-Pilus beteiligt ist. Eine deletierte pilN-Mutante verliert Sensitivität gegenüber dem PO4-Phagen, der das Bakterium nur spezifisch über die TypIV-Fimbrien befällt [Bradley, 1973]. Phagen-Sensitivität kann wieder hergestellt werden, sobald pilN komplementär exprimiert wird [Martin et al., 1995]. Das Gleiche gilt für die „twitching motility“, eine Flagellen-unabhängige Form der Oberflächen-Fortbewegung (s. Kap. 2.3.2) der TypIV-Fimbrien.

Grundsätzlich stellt Hahn [1997] fest, dass der TypIV-Pilus von *P. aeruginosa* die Hauptkomponente der virulenzassoziierten Adhäsine darstellt. Mit PilN als notwendigem Bestandteil der TypIV-Pilus-Biogenese hätte sich somit ein weiterer Virulenzfaktor gefunden, wengleich seine Funktion auch trotz verschiedener Sequenz-Datenbankvergleiche unklar bleibt.

2.3.2 Das Phänomen “twitching motility” in *L. pneumophila*

Unter “twitching motility” versteht man eine spezielle durch TypIV-Pili vermittelte Form der bakteriellen Fortbewegung, die Flagellen unabhängig funktioniert. Der Begriff taucht erstmals im Jahre 1962 auf [Lautrop, 1962] und beschreibt eine zittrige, ruckartige Bewegungsweise. Bakterien nutzen diese Art *in vivo* dazu, schnell neue, feuchte Oberflächen mit hohem Nahrungsaufkommen zu besiedeln [Mattick, 2002]. Sie sind aber grundsätzlich in der Lage, Oberflächen auch anorganischer Beschaffenheit zu bewandern. Voraussetzung für die Fortbewegung mittels TypIV-Pili ist die Retraktion des Pilus-Schaftes, der Pili-Untereinheiten [Merz et al., 2000]. Diese Depolymerisation wird vornehmlich vom cytoplasmatischen PilT-Protein übernommen; die Pili-Spitze bleibt während der Depolymerisation in Kontakt zur Oberfläche; die Retraktion findet also durch die bakterielle Zellwand hindurch statt. Das Ganze geschieht mit einer Geschwindigkeit von ca. 1500 Pilin-Untereinheiten/Sekunde, die polymerisiert/depolymerisiert werden. PilT ist eine nukleotidbindende Hydrolase, die Homologien zum PilB-Protein aufweist, welches aber die Assemblierung der Pilin-Untereinheiten übernimmt [Burrows, 2005] und daher konträr zum PilT arbeitet. Beide Proteine sind für die Bewegung unerlässlich.

Eine Bewegung über die Oberfläche von Wirtszellen vermittelt einen engen Kontakt und stellt somit auch eine erste Anhaftung der Bakterien sicher [Pujol et al., 1999]. In natürlicher Umgebung tritt “twitching motility” nur in Kolonien auf, erfordert also einen gewissen Zell-Zell-Kontakt [Mattick, 2002]. “Twitching motility” kann Zellen ferner zu Kolonien in

komplexen Strukturen, wie etwa Biofilmen zusammenbringen, aber auch ein schnelles Ausbreiten über Oberflächen hinweg während der exponentiellen Wachstumsphase gewährleisten [O'Toole & Kolter, 1998]. Rezeptoren, die für eine solche kontaktabhängige Fortbewegung an der Oberfläche der Bakterien vonnöten sein müssten, sind bisher noch nicht entdeckt worden.

“Twitching motility” wirkt sich zumindest bei *P. aeruginosa* auch auf die Virulenz aus. So konnten Commoli und Coautoren zeigen [Comolli et al., 1999], dass piliierte, aber „twitching“-unfähige Mutanten die Lunge der Maus zwar kolonisieren, nicht aber auf andere Organe ausstreuen konnten.

Für Legionellaceae ist erstmalig im Jahr 2009 überhaupt diese Art der Fortbewegung beschrieben worden [Coil & Anne, 2009]. Phänotypisch lässt sich “twitching motility” auf Agarplatten bei *L. pneumophila* als eine sog. twitching-Zone beschreiben, die den Inokulierungsring nach bereits 24 Stunden (Std.) umgibt. Morphologisch lässt sich zwar kein Unterschied zu den restlichen Zellen ausmachen, allerdings sind in der twitching-Zone niemals Flagellen-tragende Bakterien beobachtet worden. “Twitching motility” wird gehemmt, sobald in unmittelbarer Nähe der Ausbreitungszone andere Bakterien oder Hefen auftauchen. Auch durch einige chemische Zusätze, wie 0,01 % Tween-20 oder 0,1 % BSA („bovine serum albumine“) im *in vitro*-Versuch kann die Ausbreitung durch “twitching motility” verhindert werden [Coil & Anne, 2009]. Coil und Anne konnten ebenfalls zeigen, dass eine pilE-Mutante, die keine Pilus-Untereinheit mehr exprimiert, auch ihre “twitching motility“-Fähigkeit verliert. Überraschenderweise gilt dies aber nicht bei niedrig temperierter Umgebung (27°C). Hier ist es möglich, dass die grundsätzlich temperaturgesteuerte TypIV-Pili-Expression [Liles et al., 1998] vermehrt kurze Pili synthetisiert, die von der Deletion nicht betroffen sind und zur verminderten “twitching motility” beitragen könnten.

Der TypIV-Pilus kann in Einklang mit Falkows [1988] Aussagen als Virulenzfaktor bezeichnet werden.

2.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

L. pneumophila ist für ca. 90 % aller *Legionella*-Infektionen verantwortlich, deren Vorkommen in Deutschland auf bis zu 30.000 pro Jahr geschätzt wird. Davon verlaufen etwa 10 % tödlich. Dass *L. pneumophila* in der Lage ist, humane alveolare Makrophagen zu befallen, liegt an vielen charakteristischen Gemeinsamkeiten, die die phagozytotisch wirkenden

Humanzellen mit den natürlichen Wirten der Legionellen, den Protozoen bzw. Amöben, teilen. Pathogenität wird durch die vielen Virulenzfaktoren vermittelt, die *L. pneumophila* im Genom kodiert hat. Doch bis auf sehr wenige bis jetzt bekannte Ausnahmen (z. B. das FlaR-Protein) tragen alle Pneumonieerreger oder Pontiac-Fieber verursachende Legionellen diese in Kap. 2.2.1 beschriebenen Pathogenitätsfaktoren. Wieso ist gerade *L. pneumophila* so virulent? Ursachen könnten entweder noch nicht entdeckte, spezifische *pneumophila*-Virulenzfaktoren sein oder aber eine effizienter gesteuerte Regulation der Pathogenitäts-faktoren.

Um diese Frage zu beleuchten, sollen der Wildtyp-Stamm *Legionella pneumophila* Corby, ein Patientenisolat aus dem Jahre 1985, zwei Regulationsmutanten (Sigma-Faktor 28, *fliA*⁻; Transkriptions-Regulator, *flaR*⁻) und der Stamm *L. hackeliae* auf Proteom-Ebene miteinander verglichen werden. Ziel dieser vergleichenden Analyse mittels zweidimensionaler Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) und zweidimensionaler Hochdruck-Chromatofokussierung (PF-2D) ist es, im Muster der cytosolischen Proteome Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutanten bzw. dem weniger virulenten Stamm *L. hackeliae* zu detektieren. Diese beiden verschiedenen Methodik-Ansätze sollten dabei miteinander verglichen und bewertet werden, um abschließend ein Urteil über die Wirksamkeit der beiden Anwendungen zur Entdeckung neuer putativer Virulenzfaktoren abgeben zu können.

Per MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifizierte Proteine, die beim Wildtyp *Legionella pneumophila* Corby im Vergleich zu den Mutanten entweder hoch- oder herunterreguliert erscheinen, könnten ausschlaggebend für den Infektionserfolg des Wildtyps sein und daher potentielle, putative Virulenzfaktoren darstellen. Diese putativen Pathogenitätsfaktoren sollten der Protein-Kristallisation unterzogen werden, um die dreidimensionale Struktur röntgenkristallographisch aufzuklären; könnten sich doch manche als antibakterielle Ziele für die Inhibitor-Synthese qualifizieren, was eine Strukturaufklärung unverzichtbar macht.

Neben dem Hauptaugenmerk der komparativen Proteom-Analyse sollten alle entdeckten putativen Virulenzfaktoren weiter mikrobiologisch und biochemisch charakterisiert werden. Somit können einmal die Differenzen der Proteom-Ebene auch auf anderem Weg verifiziert werden und zweitens können bei unbekannter Funktion erste Aussagen über Funktionalität, Klasseneinteilung o.ä. getroffen werden. Gerade zur Verifizierung der Proteom-Unterschiede sollte noch die Untersuchung der identifizierten Proteine auf Transkriptom-Ebene mit Hilfe der Real-Time-PCR vollzogen werden, um die Differenz auch innerhalb der Gen-Expression bestätigt zu sehen.

Hier noch ein Hinweis zur Orthographie:

Diese Arbeit wurde auf Grundlage der neuen amtlichen deutschen Rechtschreibregeln vom 1. August 2006, die vom Rat für deutsche Rechtschreibung vorgeschlagen und von der Kultusministerkonferenz bestätigt wurden, verfasst. Für die Textverarbeitung wurden die allgemeinen Richtlinien des Dudens oder die Empfehlungen der DIN 5008 berücksichtigt.

III Material

3.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterial, Enzyme, Plasmide, Geräte und Bakterienstämme

3.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Alle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien sind in pro analysis (p.a.)-Form, sofern nicht anders erwähnt, von den Firmen Sigma, Merck, Fluka, Serva und Roth erworben worden. Für die Hochdruck-Chromatographie-Anlage PF-2D sind Acetonitril und Trifluoressigsäure (TFA) im HPLC-Reinheitsgrad von den Firmen Labscan und Roth verwendet worden. Wasser ist stets in doppelt destillierter Form nachträglich durch Ionenaustauscher und reverser Osmose in einer Millipore-Anlage zu sog. ddH₂O gereinigt worden.

3.1.2 Enzyme, Enzymkits und Aufreinigungskits

Name	Hersteller/Bezugsquelle
DNase I	Roche
Expand High fidelity PCR System (DNA-Polymerasen-Mix)	Roche
Fast SYBR green Master Mix	Applied Biosystems
High capacity cDNA Reverse Kit	Applied Biosystems
High Pure RNA Isolation Kit	Roche
Rapid DNA-Ligation Kit	Fermentas
Restriktionsendonukleasen	Fermentas
Sequencing Grade Modified Trypsin	Promega
Wizard [®] SV Gel und PCR Clean-Up System	Promega

3.1.3 Oligonukleotide (Primer)

Gen	Vorwärtsprimer (5'-3')	Rückwärtsprimer (5'-3')
Primer inkl. Endonukleasen-Schnittstelle (unterstrichen) für PCR		
pilN	GCGGGATCCACTGAAATTAATTTATT	GCGGTCGACCTAATATTTTCGGTTTAAGCA
	GCCATGGCGTGAAC	CAAAGCTTAATTTAAA
pilN -TMH	GCGAGATCTCATTTAATAAGTAATCA	GCGGTCGACCTAATATTTTCGGTTTAAGCA
	AACGAACCGAAATC	CAAAGCTTAATTTAAA
Primer für RT-PCR		
gyrA	AAAGAAGTCTTACCAGTCAAC	GTGAGGATGGTATTTACCGA
pilN	GCGT GAACAAAAAC GTGAG	ATTTGTTTTAATGCTTTAATTTCTTG

Alle Primer sind zur Synthese der Firma Eurofins MWG in Auftrag gegeben worden.

3.1.4 Plasmide

Zum Einsatz gekommen sind folgende Vektoren:

- pGEM[®]-T Easy von Promega zum Klonieren von PCR-Produkten über T/A-Basen-Überhänge.
- pQE-30-Vektoren von Qiagen und deren Derivate, vornehmlich als Expressionsvektor genutzt.
- pGEX-6P-1 Vektor von GE Healthcare, vornehmlich als Expressionsvektor genutzt.

3.1.5 Großgeräte, Laborapparaturen und Websoftware

Gerätebezeichnung (Hersteller)

Bakterienzellwachstum, -zentrifugation, -arbeiten

Brutschrank Binder CB 150 (Binder)

Kühlzentrifuge Sigma 3-18 K (Sigma)

Sterilbank Nuaire Nu-425-600 (Nuaire)

Thermoschüttler Nuova 4230 (New Brunswick Scientific)

Ultraschallanlage Branson (Branson)

Protein-Aufreinigung, -Analyse, -Konzentrierung, -Trennung

Affinitätschromatographische und größenausschlusschromatographische Säulen (GE Healthcare)

Äkta FPLC (GE Healthcare)

Ettan Dalt *six* 2D-Elektrophoreseeinheit, 220 V (GE Healthcare)

Fokussierungsanlage Multiphor II Elektrophoresesystem (GE Healthcare)

Hochdruck-Chromatografie-Anlage ProteomLab[™] PF-2D (Beckman Coulter)

Konzentrierungseinheit Amicon[®] Ultra-Serie (Millipore)

Massenspektrometer MALDI-TOF Biflex II (Bruker Daltonics)

Ultrazentrifuge Optima[™]-Serie (Beckman Coulter)

Molekularbiologische, genetische Arbeiten

PCR-Gerät, Thermocycler T Gradient (Biometra)

RT-PCR-Thermocycler StepOne[™] (Applied Biosystems)

UV-Spektralphotometer Cary 50 UV-Vis (Varian)

Wasser-Reinigungssystem Millipore Simplicity 185 (Millipore)

Vorhersage von Protein-Sekundärstrukturen mit Hilfe des Programms SOSUI [Hirokawa et al., 1998]

Protein-Sequenzvergleiche unter Zuhilfenahme von NCBI Sequenz-alignment-Programms BLAST [Altschul et al., 1990]

Grafische Darstellung von Sequenz-alignments mittels ESPript [Gouet et al., 1999]

Kristallographie

Analytische Waage Sartorius BP 210 D (Sartorius)
 pH-Meter TR 156 Schott (Schott)
 Plattenroboter Phoenix (Art Robbins Instrument)
 Röntgendiffraktometer Xcalibur™ PX Ultra (Oxford Diffraction)
 Stereomikroskop Olympus SZX12 (Olympus)
 Tischwaage Mettler PB3002 (Mettler Toledo)

3.1.6 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz/Ursprung
<u>Legionella Stämme</u>		
<i>Legionella pneumophila</i> Corby	Wildtyp, Patientenisolat	[Jepras et al., 1985]
<i>L. pneumophila</i> Corby flaA ⁻	flaA-Deletionsmutante, Km ^r	Dr. K. Heuner, Würzburg
<i>L. pneumophila</i> Corby flaR ⁻	flaR-Deletionsmutante, Km ^r	Dr. K. Heuner, Würzburg
<i>L. pneumophila</i> Corby fliA ⁻	fliA ⁻ -Deletionsmutante, Km ^r	[Heuner et al., 2002]
<i>Legionella hackeliae</i>	Wildtyp, Patientenisolat	[Brenner et al., 1985]
<u>Escherichia Coli Stämme</u>		
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> B F ⁻ dcm ompT hsdS (rB ⁻ mB ⁻) gal λ (DE3)	Novagen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLys	<i>E. coli</i> B F ⁻ dcm ompT hsdS (rB ⁻ mB ⁻) gal λ (DE3) (pLysS Cam ^r)	Novagen
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , deoR, endA1, gyrA96, hsdR17 (rk ⁻ , mk ⁺), recA1, relA1, supE44, thi-1, del (lacZYA ⁻ , argF) U169, (Phi80lacZdelM15)	Stratagene
<i>E. coli</i> M15	Thi ⁻ , Lac ⁻ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺	Qiagen
<i>E. coli</i> Tuner (DE3)	F ⁻ , lacZY ⁻ , lon ⁻ , ompT ⁻ , dcm ⁻ , gal λ (DE3)	Novagen
<i>E. coli</i> XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac (F ['] proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tet ^r))	Stratagene

3.2 Nährmedien

3.2.1 Medien, Zusätze und Antibiotika für *Legionella*-Stämme

Alle Medien werden durch Autoklavieren (121 °C, 3 bar, 20 min) sterilisiert.

- Hefeextrakt Vollmedium: 5 g Hefeextrakt in 450 ml ddH₂O.

- *Legionella*-Supplement Medium: 2,5 g ACES, 250 mg α -Ketogluarat, 100 mg L-Cystein, 60 mg Eisenpyrophosphat, pH 6,9; bei 40 °C langsam rühren, schrittweise mit 5 M KOH den pH-Wert einstellen und auf 50 ml Endvolumen mit ddH₂O auffüllen; sterilisieren durch 0,2 μ m Filtration.

Auf 450 ml Vollmedium kommen 50 ml Supplement Medium.

- Hefe-Agarplatten: 12 g CYE (Charcoal yeast extract) Agar vom Hersteller Oxoid in 450 ml ddH₂O lösen und autoklavieren. Dann auf ca. 60°C abkühlen und mit 50 ml Supplement Medium versetzen und auf Petriplatten verteilen.
- Antibiotika-Zusätze: (nur bei Kanamycin-Resistenzen der Mutanten *flaR*⁻, *fliA*⁻, und *flaA*⁻)
Kanamycin: 5 μ g/ml in Flüssigkultur; 12,5 μ g/ml auf Agarplatten.

3.2.2 Medien und Antibiotika für *Escherichia coli*-Stämme

- LB (Luria Bertani) Medium: 10 g Bacto[®] Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, pH 7,0 mit NaOH einstellen, in 1000 ml mit ddH₂O lösen.
- Doppel-TY (Trypton, Yeast) Medium: 20 g Bacto[®] Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, gelöst in 1000 ml doppelt destilliertem Wasser.
- SOC Medium: 2 g Bacto[®] Trypton, 0,5 g Bacto[®] Hefeextrakt, 1 ml 1 M NaCl, 0,25 ml 1 M KCl, 1 ml 2 M Mg²⁺, filtersterilisiert, 1 ml 2 M Glucose, filtersterilisiert. In 100 ml ddH₂O lösen.
- Agarplatten: auf 1000 ml LB oder TY Medium 15 g Agar geben und nach Abkühlen auf ca. 60°C Platten gießen.
- X-Gal-Platten: wie LB-Agarplatten, nur zusätzlich mit Ampicilin, 0,5 mM IPTG und 80 μ g/ml X-Gal.
- Antibiotika-Zusätze: Ampicillin: 100 μ g/ml; Carbenicillin: 50 μ g/ml; Chloramphenicol: 34 μ g/ml; Kanamycin: 50 μ g/ml.

3.3 Lösungen und Puffer

3.3.1 Lösungen für den Zellaufschluss

- Zellwaschpuffer: 50 mM Tris, gelöst in ddH₂O, pH 7,0.

- Lysepuffer: 6 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 10% Glycerin, 50 mM Tris/HCl (pH 7,8-8,2), 2% n-Octylglycosid, 1 mM Protease Inhibitor.
- Rehydrierungspuffer der 2D-PAGE: 8,5 M Harnstoff, 4% CHAPS, mit BPB anfärben.

3.3.2 Lösungen und Puffer für die ein- und zweidimensionale SDS-PAGE sowie für die Agarose-Gelelektrophorese

- 10-fach Elektrophoresepuffer: 250 mM Tris, 1,9 M Glycin, 1% SDS, pH 8,2 – 8,4.
- TAE-Agarose-Elektrophoresepuffer: 40 mM Tris-Acetat, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7,4.
- 12% Trenngel der 1D-SDS-PAGE: 4 ml Rotiphorese[®] Gel 30, 3,35 ml H₂O 2,5 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8, 50 µl SDS 20%, 50 µl APS 10%, 5 µl TEMED 0,05%.
- Sammelgel: 0,65 ml Rotiphorese[®] Gel 30, 3 ml H₂O, 1,25 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8, 25 µl SDS 20%, 32,5 µl APS 10%, 6,25 µl TEMED 0,05%.
- Protein-Ladepuffer: 100 mM Tris, 20% Glycerin, 4% SDS, 2% DTT, pH 6,9.
- Rehydrierungspuffer: 8 M Harnstoff, 2% CHAPS, BPB.
- Equilibrierungspuffer für die 2D-SDS-PAGE: 50 mM Tris, pH 8,8, 6 M Harnstoff, 30% (v/v) Glycerin, 2% (w/v) SDS. Zu Equilibrierungspuffer A gibt man zusätzlich 2% (w/v) DTT und zu Equilibrierungspuffer B kommen 2,5% (w/v) Iodacetamid.
- Agarosegel: 1,5% (w/v) Agarose in 40 ml TAE-Puffer; wird solange erhitzt, bis sich die Agarose gelöst hat. Dann ca. 5 µl 1%ige Ethidiumbromid-Lösung dazugeben und in die Gelkammer zum Erstarren gießen.

3.3.3 Lösungen und Puffer für die PF-2D-Anlage

- Start Puffer A (Beckman Coulter): proprietäre Mischung aus Harnstoff, n-Octylglukosid, Triethanolamin, pH 8,8 mit gesättigter Iminodiessigsäure eingestellt.
- Eluent Puffer B (Beckman Coulter): proprietäre Mischung aus Harnstoff, n-Octylglukosid und Ampholyten, pH 4,0.
- Waschpuffer: 1 M NaCl in 30% n-Propanol und 70% Wasser.
- Puffer A (zweite Dimension): ddH₂O mit 0,1% TFA.
- Puffer B (zweite Dimension): Acetonitril mit 0,08% TFA.

3.3.4 Lösungen für MALDI-TOF-Massenspektrometrie

- Waschlösung A: 50 % (v/v) Acetonitril, 50 % ddH₂O.
- Waschlösung B: 50 % (v/v) Acetonitril, 50 mM Ammoniumcarbonat in ddH₂O.
- Waschlösung C: 50 % (v/v) Acetonitril, 10 mM Ammoniumcarbonat in ddH₂O.
- Waschlösung D: 10 mM Ammoniumcarbonat, in ddH₂O.
- Trypsinlösung: 20 µg Trypsin werden aktiviert in 100 ml 1 mM HCl und 900 ml 10 mM Ammoniumcarbonat.
- Matrixträgerlösung: 33 % Acetonitril, 0,1 % Trifluoressigsäure, 67 % ddH₂O.
- Matrix: α-Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure, gesättigt in Matrixträgerlösung.

3.3.5 Lösungen für Protein-Färbungen

- Coomassie Blue-Färbung: 42,5 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 5 % (v/v) Methanol, 2 g/l Coomassie Brilliant Blue G 250, 0,5 g/l Coomassie Brilliant Blue R 250, in ddH₂O gelöst.
- Ponceau-Rot-Färbung: 0,25 % (w/v) Ponceau S, 3 % Essigsäure in ddH₂O lösen.
- Entfärber-/Fixierlösung: 10 % Essigsäure, 30 % Ethanol, in ddH₂O vermengen.

3.3.6 Lösungen und Puffer für Westernblot und Immunodetektion

- Anodenpuffer 1: 0,3 M Tris, 20 % Methanol.
- Anodenpuffer 2: 25 mM Tris, 20 % Methanol.
- Kathodenpuffer: 20 mM 6-Aminocapronsäure, 10 mM Tris, 10 % Methanol.
- Waschpuffer: 20 mM Tris/HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,2 % Tween 20.
- Blockpuffer: 5 % BSA in Waschpuffer.
- Primärantikörper (Anti-His oder Anti-GST): 1:10000 oder 1:5000 Verdünnung in Waschpuffer mit 1 % BSA.
- Sekundärantikörper (mit alkalischer Phosphatase): 1:10000 Verdünnung in Waschpuffer mit 1 % BSA.
- Alkalischer Phosphatasepuffer: 100 mM Tris/HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂.
- Färbelösung: 44 µl NBT (7,5 % NBT in 70 % Dimethylformamid), 33 µl BCIP (5 % BCIP in 100 % Dimethylformamid) in 10 ml alkalischen Phosphatasepuffer.

3.3.7 Lösungen und Puffer für die PCR und die RT-PCR

- 20 µl Ansatz:

PCR-Reagenzien	Menge
10-fach Puffer + 25 mM MgCl ₂	2 µl (2,5 mM MgCl ₂ final)
DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl (0,5 U final)
dNTP-Mix (2 mM)	2 µl (0,2 mM final)
ddH ₂ O	abhängig von der DNA-Konzentration
Primer, rückwärts (3 pmol/µl)	2 µl (0,3 µM final)
Primer, vorwärts (3 pmol/µl)	2 µl (0,3 µM final)
DNA-Vorlage	konzentrationsabhängig; Ziel: 50-100 ng/20 µl

- 20 µl Ansatz:

RT-PCR-Reagenzien	Menge
ddH ₂ O	abhängig von der cDNA-Konzentration
2x Fast SYBR [®] Green Master Mix	10 µl
Primer, vorwärts (3 pmol/µl)	2 µl (0,3 µM final)
Primer, rückwärts (3 pmol/µl)	2 µl (0,3 µM final)
cDNA-Vorlage	konzentrationsabhängig; Ziel: 20-50 ng/20 µl

3.3.8 Puffer für die Aufreinigung rekombinanter Proteine an einer FPLC

- Lysepuffer Histidin-Fusionsproteine: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 1 mg/ml Lysozym, Protease-Inhibitor, pH 7,5.
- Waschpuffer Histidin-Fusionsproteine: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 7,5.
- Elutionspuffer Histidin-Fusionsproteine: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7,5.
- Lysepuffer GST-Fusionsproteine: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,0 (1-fach PBS).
- Waschpuffer GST-Fusionsproteine: 1-fach PBS.
- Elutionspuffer GST-Fusionsproteine: 50 mM Tris/HCl, 10 mM reduziertes Glutathion, pH 7,5.
- PreScission-Proteasepuffer: 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,0.

- **Proteinpuffer:** A: 20 mM HEPES, 200 mM NaCl, pH 6,5
B: 20 mM HEPES, 200 mM NaCl, pH 7,0
C: 20 mM MES, 200 mM NaCl, pH 6,5
D: 20 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7,5

IV Methoden

4.1 Bakterienkultivierung und –anzucht

4.1.1 Anzucht von bakteriellen Stämmen und deren Konservierung

L. pneumophila Corby, die Mutanten *flaR*⁻ und *fliA*⁻ und *L. hackeliae* werden auf festen Kohle-Hefeextrakt-Agarplatten (s. Kap. 3.2.1) und den jeweiligen Antibiotika bei 37°C für vier Tage angezogen. Bewachsen sind diese Platten bei 4°C etwa 7-10 Tage haltbar. Von diesen Platten können die Bakterien in ca. 200 ml Vollmedium mit Supplement überimpft werden (s. Kap. 3.2.1). Die Umgebungstemperatur liegt bei der Anzucht der Flüssigkultur bei 30°C oder 37°C und es wird mit ca. 90 U/min leicht geschüttelt. Im Thermoschüttler wachsen die Zellen dann bis zur stationären Wachstumsphase, einer optischen Dichte (OD) von ca. 3,7. Ermittelt wird dieser Bakterientiter anhand photometrischer Bestimmung bei einer Wellenlänge von 565 nm. Als Referenz dient das reine Anzuchtmedium.

Dauerkulturen werden von Einzelkolonien in ein Flüssig-Hefevollmedium mit entsprechenden Antibiotika überimpft und nach Erreichen der stationären Phase mit 70 µl DMSO pro ml Kultur bei -70°C eingefroren.

E. coli-Zellen werden auf LB-Agarplatten und adäquaten Antibiotika-Zusätzen bei 37°C zu sichtbaren Einzelkolonien angewachsen. Auch hier gilt eine Haltbarkeit von 7 Tagen bei 4°C. Dauerkulturen werden analog dem Ablauf bei Legionellen angelegt.

Zur rekombinanten Genexpression werden ü/N-Kulturen in 1:50 Verdünnung in drei Liter LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika überimpft. Bei 37°C und etwa 120 U/min wachsen die Zellen bis zur OD₆₀₀ von 0,5-0,7. Danach wird mit einer IPTG-Endkonzentration von 0,2-1 mM die Expression des rekombinanten Gens eingeleitet. Nach drei Stunden bei 30°C und ca. 100 U/min im Thermoschüttler werden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und bei -70°C aufbewahrt.

4.1.2 „Twitching motility“-Tests bei *Legionella pneumophila* Corby

Die Versuche sind gemäß Coil & Anne [2009] auszuführen: von einer ü/N-Kultur im Vollmedium werden auf Kohle-Agarplatten mit den passenden Antibiotika 20 µl/Kolonie auf die Platten aufgetropft. Der Flüssigkeitsfilm muss verdunsten, bevor die Legionellen im

Brutschrank bei 37 °C für ca. 92 Stunden anwachsen und sich die Kolonie-Verbreitung per „Twitching motility“ vom Inokulierungsring aus feststellen und vergleichen lässt.

4.2 Zellaufschluss und Gesamt- bzw. Rekombinantproteinisolierung

4.2.1 Zellaufschluss und Gesamtproteinisolierung von *Legionella*-Stämmen

Für die Zellernte wird 15 min bei 4500 U/min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, mit 5 ml eiskaltem Zellwaschpuffer (s. Kap. 3.3.1) resuspendiert und in ein 50 ml Röhrchen zusammengeführt. Erneut 15 min lang zentrifugieren und den Überstand abgießen und pro 0,5 ml Zellpellet 2 ml Lysepuffer zugeben und langsam per Pipette durchmischen. Danach zum Aufschluss per Ultraschall die Bakterien 3 mal 30 Sekunden mit maximaler Amplitude (pulsierend) behandeln, dazwischen je 1 min auf Eis. Die so bearbeiteten Zellen in Zentrifugenröhrchen geben und per Ultrazentrifuge auf ca. 35000 U/min (etwa 120000 g) für 1 Stunde bei 18 °C abzentrifugieren. Den Überstand zu 1 ml- oder 2 ml-Fractionen in Eppendorfgefäße verteilen und bei -70 °C bis zur Auftrennung einfrieren.

4.2.2 Zellaufschluss und Isolierung von rekombinanten Fusionsproteinen bei *E. coli*

Die eingefrorenen Zellpellets werden schonend auf Eis aufgetaut und mit einer Kanüle und dem passenden Lysepuffer (s. Kap. 3.3.8) je nach verwendetem Vektor resuspendiert. Pro mg Pellet werden 2-5 ml Lysepuffer genutzt. Die Zellsuspension wird genau wie bei den Legionellen auf Eis mit Ultraschall mit maximaler Amplitude für 30 s (pulsierend) aufgebrochen. Das Ganze wird 3-mal wiederholt, mit je einminütigen Pausen dazwischen auf Eis. Danach wird die Suspension bei 120000 g für 1,5 Std. bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand wird nach 0,45 µm-Filtration langsam (0,5 ml/min) entweder auf eine HisTrap oder GSTrap-Säule gegeben. Zur weiteren Bearbeitung der rekombinanten Proteine s. Kap. 4.8.1.

4.3 Ein- und zweidimensionale Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE

Unter einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese versteht man die Bewegung elektrisch geladener Teilchen im nicht-leitenden Polyacrylamidgel unter dem Einfluss elektrischer

Spannung. Unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten aufgrund der unterschiedlichen Molekülgrößen der Proteine und deren Wechselwirkung mit dem Acrylamidgel führen zu dem erzielten Trennungsbild.

N,N'-Methylbisacrylamid lässt zusammen mit Acrylamid, initiiert durch den Radikalstarter APS und den Radikalstabilisator TEMED, ein dreidimensionales Netzwerk entstehen, dessen Porengröße abhängig vom Verhältnis zwischen Acrylamid und N,N'-Methylbisacrylamid ist. Dabei verringert sich die Porengröße mit zunehmendem N,N'-Methylbisacrylamid-Anteil. Durch die unterschiedliche Porengröße kann die elektrophoretische Mobilität der Proteine verändert werden. Beispielsweise lassen sich kleine Proteinmoleküle besser im Gel auftrennen, wenn die Konzentration beider Acrylamid-Moleküle im Gesamtvolumen höher ist (> 12%) und das Verhältnis zwischen Acrylamid:N,N'-Methylbisacrylamid bei etwa 19:1 oder kleiner ist.

Durch die Behandlung der Proteine mit SDS werden die Proteine denaturiert, d.h. sie verlieren ihre Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur. Außerdem binden die meisten Proteine SDS in einem konstanten Masse:Ladungsverhältnis – ca. 1,4 g SDS pro g Protein –, so dass alle Proteine entsprechend ihrer Masse gleich stark negativ geladen sind [Birdi & Steinhardt, 1978; Weber & Osborn, 1969].

Der DTT- oder β -Mercaptoethanol-Zusatz öffnet bzw. reduziert die Disulfid-Bindungen, die innerhalb eines Proteins auftreten können. Iodacetamid, welches oft während der isoelektrischen Fokussierung der Proteine hinzugegeben wird, acetyliert die Sulfhydrylgruppen, so dass es zu keiner erneuten Disulfidbindung kommen kann. Damit sollten alle Proteine nur noch in ihrer Primärstruktur vorliegen und keine unterschiedlichen Konformationen den Trennlauf beeinflussen können. Die Elektrophorese der Proteine wird dadurch nur größenabhängig.

Um scharf erscheinende Proteinbanden zu erhalten, teilt man das Polyacrylamidgel in 2 Teile: dem grobporigen, pH-niedrigen Sammelgel und dem feinmaschigen Trenngel. Die Bandenschärfung wird mit der Anwesenheit von Folge- und Leitonen begründet [Gallagher, 2007; Michov, 1989].

Alle in der vorliegenden Arbeit benutzten SDS-PAGE sind nach Laemmli [1970] durchgeführt worden.

4.3.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zusammensetzung für zwei SDS-PAGE-Gele nach Laemmli:

12 % Trenngel	Sammelgel
3,3 ml Acrylamid (10 % T; 2,6 % C ¹)	0,65 ml Acrylamid (10 % T; 2,6 % C)
4,0 ml ddH ₂ O	3 ml ddH ₂ O
2,5 ml Tris/HCl 1,5 M pH 8,8	25 µl SDS 20 %
50 µl SDS 20 %	1,25 ml Tris/HCl 0,5 M pH 6,8
50 µl APS 10 %	32,5 µl APS 10 %, BPB
5 µl TEMED 0,05 %	6,25 µl TEMED 0,05 %

Probenvorbereitung:

Die Probe wird in Protein-Ladepuffer (s. Kap. 3.3.2) zu etwa 10 mg/ml Protein aufgenommen und 4 min bei 95 °C gekocht. Bei Ganzzell-Lysaten vor dem Auftragen 20 min bei 30000 g zentrifugieren, um DNA-Bestandteile abzusenken. Je nach verwendetem Kamm werden 2-10 µl Probenvolumen aufgetragen und das Gel gestartet. Erreicht die BPB-Lauffront das Gelende, wird gestoppt.

Programmlauf: 10 min 15 mA, 50 min 20 mA

4.3.2 Erste Dimension, Isoelektrische Fokussierung

In der ersten Dimension trennen sich die Proteine im Proteingemisch entsprechend ihres isoelektrischen Punktes (IEP) auf. Dazu ist im Gel der hier verwendeten Fokussierungsstreifen (GE Healthcare) ein linearer, immobilisierter pH-Gradient eingebettet [Görg, 1993]. Dieser Gradient kann sich über variable pH-Bereiche erstrecken; in vorliegender Arbeit sind pH-Bereiche von 4-7 oder 3-10 genutzt worden. Legt man an die Enden der Streifen eine Spannung an, so wandern die auf dem Gel aufgebrauchten Proteine gemäß ihrer Nettoladung in Richtung Anode oder Kathode. Während dieser Auftrennungstrecke werden die Proteine von den Ampholyten des pH-Gradienten in der Matrix in Richtung Anode protoniert, in Richtung der Kathode deprotoniert.

Ist der saure oder basische Wert während des Proteinlaufes im Gel so hoch, dass er die Nettoladung des Proteins gleich Null setzt, wandert das Protein auch nicht mehr im Stromfluss; es hat seinen IEP erreicht.

¹ C=Acryl-, Bisacrylamid (g/100g); T=Bisacrylamid/Acrylamid (g/g)

Mit Vorliegen des Gesamtproteinisolates verfährt man weiter wie folgt:

- Methanol-Chloroform-Fällung und anschließende Aufnahme des getrockneten Gesamtproteins in Rehydrierungspuffer (s. Kap. 3.3.2).
- Etwa 1,5 mg Gesamtprotein – nach Bradford [1976] bestimmt – in einem Rehydrierungspuffer-Volumen von ca. 350 ml (versetzt mit 15-30 mM DTT oder TBP und 0,8 % Servalyl, Serva) wird 30 min bei 100000 g und 18°C zentrifugiert und der Überstand gleichmäßig im sog. „Reswelling tray“ (GE Healthcare) aufgetragen. Der Fokussierungstreifen wird mit der Gelseite luftblasenfrei auf die Proteinlösung aufgelegt und mit Paraffinöl überlagert. Die Probe wird zum Einwandern in den Acrylamidstreifen für etwa 8 Stunden bei RT inkubiert.
- Der Fokussierungstreifen wird mit ddH₂O vom Paraffinöl gereinigt und in korrekter Ausrichtung (niedriger pH-Wert zur Anode) auf die Fokussierungs-Flachbettkammer eingelegt; die Gelenen werden mit befeuchtetem ddH₂O-Blotpapier und den aufliegenden Elektroden an die Kammer angeschlossen.
- Spannungsgradienten: 1 Std. 100 V, 30 min 500V, 8 Std. 3500 V, 3 Std. 6000V.
- Streifen nach einer Gesamtleistung von etwa 46 kWh in Petrischalen einrollen und bei –70°C einfrieren oder direkt zur 2. Dimension nutzen.

4.3.3 Zweite Dimension, Auftrennung nach Molekulargewicht

- Die bei –70°C aufbewahrten Fokussierungstreifen auftauen.
- 15 min lang die Streifen in je ca. 5 ml Equilibrierungspuffer A (s. Kap. 3.3.2) bewegen, das gleiche mit Equilibrierungslösung B durchführen.
- Fokussierungstreifen zwischen die Glasplatten führen und mit einer 3%igen Agarose-Kontaktlösung Streifen und Acrylamidgel luftblasenfrei miteinander verbinden.
- Gele in die mit Elektrophoresepuffer gefüllte Laufkammer setzen und wassergekühlt 30 min mit 5 W/Gel den Lauf starten, danach auf 17 W/Gel erhöhen, bis das BPB das Gelende erreicht hat.
- Glasplatten vorsichtig öffnen und Proteine mit Coomassie Blue kolorieren.

4.3.4 Färben und Entfärben der Proteine mit Coomassie Blue

Coomassie Brilliant Blue besteht aus 45 Kohlenstoffatomen (Molare Masse von Coomassie Blue R-250: 825,97 g/mol) und ist ein synthetischer, heterocyclischer, organischer Farbstoff – ein Diammonium-Salz. Coomassie Blue geht hydrophobe Wechselwirkungen mit denaturierten Proteinen ein, lagert sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an und färbt das Protein blau.

- Gele für 45 min in Fixierlösung bewegen.
- Coomassie Blue-Färbelösung (s. Kap. 3.3.5) für ca. 1 Std. oder ü/N einwirken lassen.
- Mit Entfärberlösung und ggf. 7%iger Essigsäure für 2-3 Std. entfärben.
- In ddH₂O bewegen lassen, bis der Gelhintergrund völlig entfärbt ist.

4.4 Proteinfractionierung in der HPLC PF-2D

Die ProteomeLabTM PF-2D Einheit trennt in der ersten Dimension mittels einer HPCF-Säule, die als Ionenaustauscher arbeitet, die Proteine ebenfalls nach isoelektrischem Punkt. Innerhalb der Säule bleiben am anfänglich herrschenden pH-Wert von ca. 8,8 des Startpuffers A negativ geladene Proteine an der positiv geladenen stationären Phase hängen. Positiv geladene hingegen werden abgestoßen. Der einfließende Eluentpuffer B etabliert über einen festgelegten Zeitraum einen pH-Gradienten bis hin zum pH-Wert 4,0. Während des Gradientenaufbaus bewegen sich alle Proteine innerhalb der Säule entsprechend ihrer vom Gradienten angenommenen Ladung und fließen gemäß ihres IEP ungeladen oder positiv geladen aus der Säule.

Zur Verdeutlichung:

Ist der pH-Wert im Umgebungsmilieu der Säule größer als der IEP des Proteins, ist die Protein-Nettoladung negativ – das Protein bindet an die polare Säulenmatrix.

Ist der pH-Wert im Umgebungsmilieu der Säule gleich dem IEP des Proteins, ist die Protein-Nettoladung null – das Protein liegt in der Lösung vor.

Zeigt sich der pH-Wert im Umgebungsmilieu der Säule kleiner als der IEP des Proteins, wird die Protein-Nettoladung positiv – das Protein wird von der polaren Säulenmatrix abgestoßen.

Der an die HPCF-Säule angeschlossene Fraktionskollektor sammelt die eluierten Proteine in einer 96er-Mikrotiterplatte in pH-Schritten von jeweils 0,3 pH-Werten.

Die zweite Dimension wird mit Hilfe einer Reversphasen-Chromatographie-Säule vollzogen. Die stationäre Phase der Säule ist hierbei nicht polar, die polare flüssige enthält ein „ion-suppressing“-Agens (tri-Fluoroessigsäure, TFA) und variiert in der Konzentration der organischen Lösung. Dieser ebenfalls über einen Gradienten ansteigende organische Lösungsmittelanteil, hier Acetonitril, desorbiert die Proteine von der Säule. Je höher dabei die Anteile von nicht-polaren Aminosäuren im Protein sind, desto größer muss der Anteil von organischem Lösungsmittel sein, um das Protein von der hydrophoben Seite der Säule zu lösen. Ein ebenfalls angeschlossener Fraktionskollektor sammelt die entsprechenden Proteinfraktionen.

4.4.1 Erste Dimension, Proteintrennung nach IEP

Mit Vorliegen des Gesamtproteinisolates verfährt man weiter wie folgt:

- Das Proteinisolat wird über eine vorab mit Startpuffer A (s. Kap. 3.3.3) equilibrierte PD-10 Säule (Beckman Coulter) entsalzt.
- Konzentration auf ca. 3,5 mg Protein/2,5 ml Volumen mit Startpuffer A einstellen².
- An der PF-2D-Anlage pH-Meter und UV-Lampen kalibrieren, alle Puffer anschließen und spülen, Säulen equilibrieren und vorbereiten.
- Den Software-betriebenen Methodenablauf kontrollieren, starten und 2,5 ml des Proteinisolates per Spritze über den Loop-Injektor (2,5 ml Fassungsvermögen) unter Fluss (0,2 ml/min) injizieren.
- Nach 130 min die gesammelten Proteinfractionen in der Mikrotiterplatte entweder bei -70 °C lagern oder vorzugsweise direkt die 2. Dimension anschließen.

4.4.2 Zweite Dimension, Auftrennung durch Reversphasen-Chromatographie

Im normalen Betrieb ist für die Auftrennung in der zweiten Dimension ein linearer Acetonitril-Gradient über eine Zeit von 45 min bei einem Fluss von 0,75 ml/min vorgesehen. Das hier genutzte Verfahren ist eine modifizierte Methode von Zheng et al. [2003].

² Zur Feststellung der Konzentration wird die Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen; als Referenz dient der Startpuffer A. Nach Pace et al. [1995] lässt sich mit dem Durchschnittswert von 0,769 mg/ml multipliziert mit dem Absorptionswert₂₈₀ die Konzentration errechnen, ohne auf die üblichen kolorimetrischen Verfahren zurückgreifen zu müssen.

Der Gradient erstreckt sich dabei folgendermaßen:

Zeit (in min)	Gradient (in %)	Dauer (in min)
5	5	0,1
5,1	25	0,5
5,6	55	18
23,6	70	3
26,6	100	

Erst mit diesem Gradienten ist es zu einem optimalen Trennungsbild der Proteine gekommen. Meist wurde vor dem präparativen (500 µl Injektionsvolumen) Lauf ein analytischer (50 µl-100 µl) Lauf aller Fraktionen durchgeführt, um ggf. die Proteinunterschiede zweier verschiedener Läufe besser eingrenzen zu können. In der präparativen Auftrennung sind die separierten Proteine von einem Fraktionskollektor aufgefangen worden, um sie später per MALDI-TOF-Massenspektrometrie-Analyse identifizieren zu können.

- UV-Lampe der zweiten Dimension kalibrieren, Puffer einstellen, die RP-Säule mit den Puffern A und B equilibrieren und in den Heizblock (50 °C) einspannen.
- Methodik und Leergradienten starten, ausgewählte Fraktionen der 1. Dimension einfügen und per Injektor der 2. Dimension zuführen.
- Gesammelte Fraktionen für den tryptischen Verdau vorbereiten und danach bei -70 °C einfrieren.

4.5 Proteinidentifizierung mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie-Analyse

Proteine, entweder von der PF-2D oder über 2D-PAGE aufgetrennt, lässt man tryptisch verdauen; die Protease Trypsin spaltet das Protein nur nach den Aminosäureresten Lysin und Arginin (ausgenommen, es folgt Prolin), wodurch ein für jedes Protein spezielles Verdauungsmuster entsteht. Mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie können die einzelnen Massenspektren der so gespaltenen Peptide aufgenommen werden.

Dieser gewonnene, sog. „peptide mass fingerprint“ (PMF), also die detektierten Massen in Dalton, können mittels diverser Software per Proteindatenbankvergleich zur Identifizierung des Proteins genutzt werden.

Das MALDI-System nutzt einen pulsierenden Laserstrahl, der zur Desorption der Peptidprobe und der sie umgebenden Matrix führt. Das bedeutet, dass die Peptidmoleküle durch die

Laserenergie vom festen in den gasförmigen Zustand übergehen. Die Matrix protoniert dabei die Peptide, die, meist einfach positiv geladen, in die feldfreie Vakuum-Flugröhre eintreten. Die Matrix unterstützt die Probe also in ihrer Desorption und Ionisation. Das Verhältnis von Analyt zu Matrix sollte etwa bei $1: 10^3$ - 10^5 liegen.

Innerhalb der Flugröhre werden die Ionen durch deren Masse-/Ladungsverhältnis getrennt; die schweren Ionen haben eine langsamere Beschleunigung als die leichten. Die leichten Peptide erreichen den Detektor somit eher als die schweren. Dort werden die Peptide nacheinander registriert und deren Massen anhand der Flugzeit berechnet und dargestellt. Massen, die größer als 4000 Da sind, können durch die gewählten Einstellungen und die geringer werdende Auflösung nicht mehr isotope- und daltongenau aufgelöst werden.

4.5.1 Tryptischer Verdau

Proteinspots aus SDS-Gelen werden ausgestochen und dann folgendem Protokoll unterzogen:

- Das Gelstück mitsamt dem Protein in einer Mikrotiterplatte oder einem Eppendorfgefäß 5 min in 150 µl Waschlösung A (s. Kap. 3.3.4) bei RT waschen.
- Lösung A verwerfen und durch 150 µl Waschlösung B ersetzen; 30 min schwenken.
- Lösung B durch 150 µl Waschlösung C ersetzen und ebenfalls 30 min lang schütteln.
- Waschlösung C abziehen und Gelstücke bei 37 °C ca. 10 min lang trocknen.
- 10 µl Trypsinlösung und 10 µl Waschlösung D addieren; 1 Std. bei 4-8 °C diffundieren lassen.
- Mit weiteren 10 µl Waschlösung D versetzen.
- Ca. 24 Stunden bei 37 °C inkubieren lassen, danach ggf. im Ultraschallbad behandeln, um die Peptide aus dem Gelstück „herauszudrücken“.

Für gesammelte Fraktionen aus der PF-2D ergibt sich eine andere Herangehensweise:

- Probe über die Vakuumzentrifuge eindampfen.
- 15 µl 6 M Harnstoff/333 mM Tris hinzugeben.
- 4 µl 10 mM DTT hinzugeben und für etwa 1 Std. bei 45 °C inkubieren.
- 41 µl 50 mM Ammoniumbicarbonat und die entsprechende Trypsinmenge³ aus einer 125 µg/ml Konzentration dazugeben.

³ Die Trypsinmenge berechnet sich aus der Peakfläche des entsprechend zu verdauenden Proteins. Mittels der 32 Karat Software (Beckman Coulter) lassen sich Peakflächen errechnen und angeben: liegt dieser vom Programm dimensionslos angegebene Flächenwert unterhalb von 0,7, gibt man 1,5 µl der Trypsinlösung dazu. Steigt der Wert auf über 7,0, erhöht man die Menge auf 5-10 µl Trypsinlösung.

- 12 Std. oder ü/N bei 37°C inkubieren und danach 8 µl 10 % TFA beimengen und bei -70°C einfrieren.

4.5.2 Beladung und Bedienung des MALDI-TOF-Massenspektrometers

- Tryptische Verdauere werden über 2 µm C-18 Zip-Tips (Millipore) entsalzt und aufkonzentriert und mit 10 µl 60 % Acetonitril/0,1 % TFA eluiert.
- 1 µl der gesättigten Matrixlösung (s. Kap. 3.3.4), die hier mit drei internen Kalibrierpeptiden (Angiotensin I, II und ACTH 1-17) versehen ist, auf dem Massenspektrometer-Probenteller mit 1 µl der verdauten Proteinspotlösung vermischen und eintrocknen lassen.
- Wiederum 1 µl derselben Probenlösung auf die konforme Position addieren und trocknen lassen.
- Nach Abtrocknen aller Proben den Probenteller in das Massenspektrometer einsetzen.

Bedienung des MALDI-TOF-Massenspektrometers:

Der Probenteller wird eingezogen und das Vakuum im Flugrohr und der Probenkammer erstellt. Die entsprechende Bediensoftware wird geladen, alle Parameter adäquat eingestellt, (Detektierspannweite: 800 Da-4000 Da) und man beginnt nach Einschalten der Hochspannung mit dem Laserbeschuss der Proben. Die Kalibrierung des Gerätes wird über die Anpassung an die internen Markerpeptide in jeder Probe und nach jedem neuen Beschuss vorgenommen. Alle erfolgreichen PMF werden aufgezeichnet und mit der geräteeigenen Software Xtof weiter bearbeitet, d.h. Peptidmassen werden manuell kontrolliert, ggf. annotiert und Isotopmassen werden gestrichen oder neu zugeordnet.

4.5.3 Massenspektren-Analysen via Software

Die gewonnenen Massenspektren der Proteine, der sog. PMF, werden mit computergenerierten Trypsin-verdauten Proteinmassen und den daraus resultierendem PMF verglichen. Die intern benutzte Software PeptideSearch stellt also die Trypsin-verdauten Fragmente bekannter *Legionella pneumophila* Corby-Proteine, die in der hauseigenen Datenbank abgelegt sind, den tatsächlich ermittelten gegenüber. Die eventuell dabei erzielte Übereinstimmung der Anzahl der Peptidmassen wird angezeigt. Die Massengenauigkeit und die Sequenzabdeckung werden dabei berücksichtigt. Durchschnittlich kann man von einer signifikanten Deckungsgleichheit und einer Identifizierung sprechen, wenn die

Sequenzabdeckung größer als 25% ist. Zur genaueren Überprüfung sollten allerdings noch der theoretisch berechnete IEP und das Molekulargewicht mit den tatsächlichen Werten verglichen werden.

Gibt es auch hier nur geringe Abweichungen, kann das Protein und dessen Funktion, falls sie bekannt und zum untersuchten Protein passt, beschrieben werden.

Die Software-Anwendung BioTools von Bruker Daltonics[®] benutzt bereits das prozessierte Massenspektrum eines untersuchten Proteins vom MALDI-TOF-Massenspektrometer. Mit diesem Massenspektrum (Peak-Liste) kann erneut ein Proteinabgleich mit dem bereits beim PeptideSearch identifizierten Protein vollzogen werden. Die Aminosäuresequenz des Proteins kann jetzt, wie vorab auch schon geschehen, virtuell mit Trypsin verdaut werden. Die so entstandenen Fragmente können mit BioTools noch mit proteinchemischen Modifikationen – in diesem Fall mit N-terminaler Carbamylierung und optionaler Methionin-Oxidation – belegt werden. Dadurch lässt sich oftmals die Anzahl detektierter Massenpeaks erhöhen und die sich vorab ergebenden Sequenzübereinstimmungen nochmals besser verifizieren. Die komplette Aminosäuresequenz des identifizierten Proteins sowie die in der Masse übereinstimmenden, detektierten Sequenzabschnitte der Trypsin-verdauten Proben werden hierbei grafisch angezeigt. So können sich bspw. bei der Methionin-Oxidation zwei annotierte Massenpeaks mit einem Gewichtsunterschied von ca. 16 Da bei einem einfach vorkommenden Methionin-Sulfoxid innerhalb dieser detektierten Peptidsequenz finden lassen. Weitere benutzte Parameter sind: ein erlaubter fehlender Trypsinschnitt und eine Peptid- und Fragment-Massentoleranz von 0,1 Da.

4.6 PCR- und genetische Klonierungsarbeiten

Mit Hilfe der PCR lassen sich selektive DNA-Fragmente mittels hitzestabiler DNA-Polymerase sowie zweier Oligonukleotide (sog. Primer, die durch komplementäre Basenabschnitte Anfang und Ende der zu amplifizierenden DNA-Region flankieren) und zyklisch ablaufenden schnellen Temperaturveränderungen enorm vervielfältigen [Mullis et al., 1992]. Durch die anfänglich hohe Temperatur wird der DNA-Matrizenstrang thermisch denaturiert. Nach Abkühlen lagern sich die kurzen, synthetisch hergestellten Oligonukleotide an die DNA-Einzelstränge; die DNA-Polymerase sorgt schließlich für die Elongation, den Komplementärbau des Matrizenstranges. Die Wiederholung dieses Zyklus von

Denaturierung, Anlagerung und Elongation führt zur hohen Anzahl des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes.

4.6.1 Amplifikation und Klonierung von *Legionella*-Genen

Die manuell erstellten Primersequenzen (s. Kap. 3.1.3) sind nach der Synthese durch die beauftragte Firma zusammen mit der vorab isolierten Gesamt-DNA von *Legionella pneumophila* Corby zur Amplifikation der konformen Gensequenz eingesetzt worden. Die Isolierung der chromosomalen DNA ist nach Vorschrift des QIAmp DNA Mini Kits (Qiagen) durchgeführt worden.

Für die Amplifikation von PCR-Produkten, die weiter kloniert werden, ist stets eine DNA-Polymerase mit 3'-5'-Exonuklease-Funktion (Roche, s. Kap. 3.1.2), sog. „proofreading“-Aktivität, benutzt worden, um die Fehlerquote während der Elongation zu verringern. Für die analytische PCR zur Überprüfung positiver Klone reicht die Taq-Polymerase (Fermentas) hingegen aus.

Die Reagenzien-Zusammensetzung eines typischen PCR-Laufs findet sich in Kap. 3.3.7. Programm für die PCR: Deckelheizung 104 °C; Wiederholungen von Schritt 2 bis 4: 25-30.

Schritt	Ablauf	Temperatur	Dauer
1	Denaturierung der DNA	94 °C	2 min
2	Denaturierung der DNA	94 °C	20 s
3	Primer-Anlagerung/Annealing	2 °C x (A+T) + 4 °C x (G+C)	30 s
4	Elongation der DNA	72 °C	30-300 s je nach Fragmentgröße
5	Elongation der DNA	72 °C	7-15 min

Die Schmelztemperatur der Primer berechnet sich aus deren Zusammensetzung von A/T und G/C- Basen nach folgender Formel: $2\text{ °C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4\text{ °C} \times (\text{G}+\text{C})$.

Zur Überprüfung positiver Klone werden statt der isolierten genomischen DNA Bakterienzellen für 5 min bei 95 °C gekocht, abzentrifugiert und der Überstand als DNA-Matrize genutzt.

4.6.2 Ligation mittels des pGEM-T Easy Vektors

Um die Klonierung von PCR-Amplifikaten zu vereinfachen, geht man den Weg über einen T/A-Klonierungsvektor, anstatt direkt die Expressionvektoren zu nutzen. Die zusätzlich in den Primern eingefügten Restriktionsenzym-Erkennungsschnittstellen würden zwar einen

direkten Einbau ermöglichen, die vorherige obligate Restriktionsbehandlung der Amplifikate gestaltet sich wegen der kurzen Basensequenz vor den Restriktionsschnittstellen aber oftmals als schwierig.

DNA-Polymerasen ohne 3'-5'-Exonukleasefunktion addieren nach Ende der Elongation an das 3'-Ende das Nukleotidmolekül Adenin (A), so etwa auch die hier verwendete Taq-Polymerase. Der Vektor pGEM-T Easy liegt nicht zirkular vor, sondern trägt an den 5'-Enden Thymin (T)-Überhänge. Über Komplementarität lassen sich also PCR-Amplifikat und Vektor einfach verbinden und mit einer Ligase kovalent verknüpfen. Da sich die T-Überhänge inmitten der Gensequenz der β -Galaktosidase (*lacZ*) befinden, lässt sich der Vektor zusätzlich noch – mit einem *lacZ*-deletierten Bakterienstamm – über eine Blau-Weiß-Selektion zur Identifizierung positiver Klone benutzen.

Protokoll der Ligation:	2-fach Ligationspuffer	5 μ l
	pGEM-T Easy Vektor	0,8 μ l
	PCR-Produkt	1-3 μ l
	ddH ₂ O	auf 10 μ l Endvolumen

	Inkubation 4 Std. bei RT oder ü/N bei 4 °C	

4.6.3 Plasmid-DNA-Isolierung

Das Prinzip der Nukleinsäure-Isolierung über das GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) beruht auf einer alkalischen Lyse der Bakterien und der selektiven Adsorption der Plasmid-DNA an eine Silicagel-Matrix unter Hochsalzbedingungen. Daraufhin wird noch gewaschen und abschließend die Plasmid-DNA in ddH₂O eluiert und bei -20 °C aufbewahrt. Die Isolierung ist stets nach Herstellervorgaben durchgeführt worden, die Plasmid-DNA immer in zwei Schritten von der Säule eluiert worden.

Plasmide mit einem Replikationsursprung, der nur eine geringe Anzahl von Plasmiden/Zelle erlaubt (z. B. ColE1), werden über ein Midiprep-Kit und einem größeren Bakterienvolumen als den üblichen 5 ml bei Miniprep-Aufreinigungen isoliert.

Zur Konzentrationsbestimmung am Ende der Isolierung wird ein UV-Spektralphotometer benutzt. Die DNA wird in ddH₂O verdünnt und in einer Quarzküvette bei 260 nm und 280 nm vermessen. Die ermittelten OD-Werte sollten dabei zwischen 0,05 und 0,8 liegen. Die Konzentration errechnet sich dabei wie folgt:

$OD \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{Multiplikationsfaktor (50/40/33)} = \mu\text{g/ml}$. Die unterschiedlichen Multiplikationsfaktoren stehen dabei für doppelsträngige und einzelsträngige DNA und RNA. Eine Aussage über die Verschmutzung der DNA mit zumeist Proteinbestandteilen gibt das

Verhältnis der Absorption der bei 260 und 280 nm gemessenen Werte an: Dieses sollte nicht kleiner als 1,8 sein. [Sambrook & Russell, 2001].

4.6.4 Transformation der *E. coli*-Stämme durch Hitzeschock

Hitzekompetente Zellen sind zuvor nach der modifizierten Methode von Chung et al. [1989] hergestellt worden. Je nach erforderlichem Genotyp wird der kompetente *E. coli*-Stamm gewählt (s. Kap. 3.1.6). Der Ablauf der Transformation gestaltet sich dabei immer nahezu gleich:

Etwa 120 µl kompetente Zellen werden auf Eis aufgetaut, mit 50-100 ng Plasmid-DNA vermengt und für 20 min auf Eis gelassen. Danach werden die Zellen für 45 s auf 42°C erhitzt, daraufhin mit 1 ml SOC-Medium gemischt und für ca. 1 Std. bei 37°C im Thermoschüttler inkubiert. Um schließlich Einzelkolonien zu generieren, werden die Zellen (50 µl und Gesamtresuspendat) auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Selektionsmarkern ausplattiert und ü/N bei 37°C angezogen. Darauf gewachsene Kolonien sind oftmals schon als positive Klone einzustufen (bei X-Gal-Platten weiße Kolonien), sollten aber immer noch per PCR-Analyse überprüft werden.

Wenn von positiven Kolonien eine Dauerkultur bei -70°C angelegt wird, sollte immer von dieser Kolonie per Drei-Strich-Verfahren eine Verdünnung ausplattiert werden, um echte Einzelklone zu garantieren.

4.6.5 Restriktionsenzymbehandlung und Ligation in die Expressionsvektoren pQE und pGEX

Die zunächst in den pGEM-T Easy Vektor klonierten Gensequenzen werden mit passenden Restriktionsenzymen herausgeschnitten und dann in die in der Überschrift genannten Expressionsvektoren ligiert. Dazu werden beide Vektoren mit denselben Enzymen behandelt: 30-50 µl Plasmid-DNA + 3-4 µl Restriktionsenzym + 4-6 µl 10-fach Enzypuffer.

Aufgefüllt mit ddH₂O auf das entsprechende Endvolumen, wird der Ansatz für ca. 2 Std. bei 37°C aufbewahrt und danach in einem präparativen 1,5%igen Agarosegel bei 55 V für 2-3 Std. aufgetrennt. Mit einem Gelaufreinigungskit wird die Bande der geschnittenen Gensequenzen aus dem Agarosegel isoliert und für die Ligation in die Expressionsvektoren genutzt. Eine vorherige Dephosphorylierung der Schnittenden ist hier nicht vonnöten, da immer zwei verschiedene Restriktionsenzyme genutzt wurden und es daher nur schwerlich wieder zu einer Zirkulation des linearisierten DNA-Fragments kommen kann. Die

anschließende Ligation verläuft hier wie schon in Kap. 4.5.3 beschrieben. Zur Überprüfung wird immer eine nachfolgende Enzymbehandlung mit anschließender Gelreinigung durchgeführt. Zeigt sich das Ergebnis des Gelbildes positiv, wird der Ligationsansatz für die Transformation (s. Kap. 4.5.3) in einen *recA1*- und *endA1*-negativen Stamm genutzt (s. Kap. 3.1.6), um eine Dauerkultur anlegen und eine Plasmid-DNA Isolierung durchführen zu können.

Nach der Plasmid-Isolierung wird der Vektor zur Sequenzierung verschickt, um Rasterfehler, Nukleotidaustausch und korrekte Leserichtung kontrollieren zu können. Im letzten Schritt wird der neu ligierte Vektor in einen bakteriellen Expressionsstamm transformiert und die Testexpression des rekombinanten Proteins gestartet.

4.6.6 Real-Time-PCR

Die Nukleinsäure-Vervielfältigung durch Real-Time-PCR (RT-PCR) beruht auf dem gleichen Prinzip wie dem der herkömmlichen Polymerasen-Ketten-Reaktion. Die RT-PCR bietet aber zusätzlich die Möglichkeit, Aussagen über die Quantifizierung oder vergleichende Analysen zweier untersuchter Gene zu treffen und dank der Fluoreszenzfarbstoffe auch in Echtzeit und nicht erst am Ende des Laufes. Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional mit der Menge an Amplifikat zu, wodurch die Quantifizierung oder Semiquantifizierung möglich wird.

In der vorliegenden Arbeit sind zwei verschiedene Gene (*gyrA*, *pilN*) untersucht und deren mRNA-Ausgangsmaterial zueinander und in verschiedenen Stämmen in Relation gesetzt worden. Es wurde der *Legionella*-Wildtyp und die *flaR*⁻-Mutante untersucht. Dazu ist die Gesamt-RNA des Wildtyps und der Mutante isoliert worden. Die mRNA der beiden Gene *gyrA* und *pilN* ist in beiden Stämmen in sog. cDNA umgewandelt und als DNA-Matrize für die Vervielfältigung benutzt worden. Anhand der Fluoreszenzwerte können dann Rückschlüsse auf das mRNA-Expressionslevel der beiden Gene in den Stämmen gezogen werden.

Als Fluoreszenzfarbstoff ist SYBR[®] Green zum Einsatz gekommen. Er lagert sich in die kleine Furche doppelsträngiger DNA und beginnt erst dann zu fluoreszieren.

Die Isolierung der RNA ist nach Herstellerangaben des High Pure RNA Isolation Kit durchgeführt worden. Aufbewahrt wird die Gesamt-RNA bei -70 °C.

Synthese der cDNA:

- Ca. 800 ng Gesamt-RNA, 1,5 µl Rückwärtsprimer (3 pmol/µl) sowie 2 µl Randomprimer mit 2 µl 10-fach Puffer zusammengeben.

- 0,8 µl dNTP-Mix (100 mM) und 1 µl Reverse Transkriptase (50 u/µl) addieren und auf 20 µl Endvolumen mit ddH₂O auffüllen, danach folgendes Programm starten:

Schritt	1	2	3	4
Temperatur	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Zeit	10 min	120 min	10 min	dauerhaft

- cDNA bei -20 °C aufbewahren.

Zur Weiterverarbeitung der cDNA und die Reagenzien, die für die thermischen Zyklen notwendig sind, siehe Kap. 3.3.7. Ein Richtwert für die Menge an cDNA, die sich photometrisch oder im Agarosegel nicht richtig bestimmen lässt, liegt bei 0,5-1 µl der für die Umschreibung/Synthese der cDNA benutzten Reaktionsvolumina (s.o.). Am Ende jeder RT-PCR-Läufe sollte stets eine Schmelzkurvenanalyse gestartet werden, um die Spezifität des SYBR[®] Green Farbstoffes zu überprüfen.

4.7 Semi-Trocken-Elektroblotting (Westernblot)

Unter dem Begriff Blotting versteht man den elektrophoretischen Transfer von zuvor im Polyacrylamid- oder Agarosegel aufgetrennten Makromolekülen auf eine Membran [Renart et al., 1979]. Handelt es sich bei den Makromolekülen um Proteine, spricht man vom Westernblot. Mit den so auf der Membran exponierten Proteinen lassen sich z.B. Immunodetektionen, d.h. Interaktionen mit spezifischen Antikörpern bewerkstelligen.

Der Elektrotransfer in der hier vorliegenden Arbeit ist nach der Methode von Kyhse-Anderson [1984] in einer Halbtrockenkammer durchgeführt. Ziel der Blotting-Methode ist es, die Histidin- oder GST-Tags der Fusionsproteine nachzuweisen (s. Kap. 4.7).

4.7.1 Proteintransfer auf eine Nitrocellulose-Membran

- 2 Blotpapiere in Größe des SDS-Geles werden mit Anodenpuffer 1 (s. Kap. 3.3.6) getränkt, 1 Blotpapier wird in Anodenpuffer 2 und 3 Blotpapiere in Kathodenpuffer gelegt; die Nitrocellulose-Membran (Schleicher & Schüll) wird in Anodenpuffer 1 eingelegt.

- Das Gel wird kurz im Kathodenpuffer inkubiert und die Blotpapiere aus dem Anodenpuffer auf die Anode der Blotapparatur gelegt, die Transfer-Membran liegt oben luftblasenfrei auf.
- Auf die Membran wird ohne Lufteinschlüsse das Gel passend aufgelegt und mit den 3 Blotpapieren des Kathodenpuffers abgedeckt.
- Mit leichtem Druck wird mit einer Glaspipette der Aufbau zusammengerollt, die Kathodenseite eingehängt und angeschlossen und die Elektrophorese mit 42 mA/Gel für 50 min gestartet.
- Nach Ende des Transfers wird die Membran reversibel mit Ponceau-Rot gefärbt, um den Transfer begutachten und dokumentieren zu können; mit Waschpuffer entfärben.

4.7.2 Immunodetektion mit primärem und sekundärem Antikörper

Der sekundäre Antikörper ist mit dem Enzym alkalische Phosphatase konjugiert. Das Enzym katalysiert eine Vielzahl an Phosphatesterne unter basischen Bedingungen. Um die Reaktion sichtbar zu machen und damit den sekundären Antikörper lokalisieren zu können, kommen etliche Farbstoffe zum Einsatz. Die Detektion der Phosphatase verläuft über die Reduktion des Tetrazoliumsalses (NBT) hin zum Diformazan; als Elektronenüberträger dient dabei das von der Phosphatase umgesetzte Indoxylphosphat (BCIP) hin zum Dimer Indigoblau. Beide Stoffe sind umgesetzt als Farbstoffe sichtbar; die Methode ist abgeleitet von Blake et al. [1984].

- Die Nitrocellulose-Membran 1 Std. in Blockpuffer schütteln, danach 3-mal 10 min mit Waschpuffer waschen.
- Primärer Antikörper (entweder Anti-Histidin oder Anti-GST) in entsprechender Verdünnung (s. Kap. 3.3.6) in Waschpuffer für 1,5 Std. aufbringen und schütteln lassen, danach mit Waschpuffer 3 mal 10 min waschen.
- Den sekundären Antikörper (entweder Anti-Kaninchen oder Anti-Maus) in 1:10000 Verdünnung in Waschpuffer für 1 Std. einwirken lassen, danach die Membran erneut waschen.
- Die Transfer-Membran für 5 min im alkalischen Phosphatasepuffer inkubieren lassen.
- Färbelösung auf die Membran bringen und solange einwirken lassen, bis die Proteinbanden optimal zur Geltung kommen.

4.8 Aufreinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli*-Stämmen

Um einzelne Proteine aus dem Proteom einer *E. coli*-Zelle zu isolieren, werden diese Proteine mit sog. Tags während der zellulären Expression fusioniert. In diesem Fall sind das ein 6-fach Histidin-Tag und ein GST (Glutathion S-Transferase)-Tag. Beide lassen sich affinitätschromatographisch aufreinigen.

Im Falle der Histidin-Fusion geschieht das über die komplexbildende Iminodiessigsäure (IDA), die kovalent an die Säulenmatrix gebunden ist [Porath et al., 1975]. Die chelatierenden Seiten der IDA werden mit Ni^{2+} -Metallionen beladen, die affinitätschromatographisch an mehrere der sechs Histidinreste im Fusionsprotein binden, während alle anderen Proteine (bei stringenten Waschkonditionen) im Durchlauf der Säule zu finden sind. Eluiert wird mit hohen Konzentrationen eines Konkurrenz-moleküls, dem Imidazol.

Fusionsproteine, die mit der kompletten Proteinsequenz der GST verbunden sind, werden ebenfalls über die immobilisierte Chromatographie aufgereinigt; und zwar mit Hilfe von Glutathion, welches an Säulenmatrix gebunden vorliegt [Methode nach Smith & Johnson, 1988]. Das Tri-Peptid Glutathion ist das natürliche Substrat der GST, die das Glutathion meist für Entgiftungsreaktion an andere Moleküle konjugiert. Das GST-Fusionsprotein wird somit beim langsamen Vorbeifließen an der beladenen Matrix angereichert. Eluiert wird durch reduziertes Glutathion.

4.8.1 Aufreinigung und Isolierung von Fusionsproteinen über HisTrap FF- und GSTrap FF-Säulen an einer FPLC-Anlage

Nach dem Zellaufschluss (beschrieben in Kap. 4.2.2) und dem Aufbringen der Proteidlösung auf die Säulen wird mit den geeigneten Waschpuffern (s. Kap. 3.3.8) unter einem Fluss von 2 ml/min an einer ÄKTA FPLC Chromatographie-Anlage (GE Healthcare) solange gewaschen und unspezifische Proteine aus der Säule gelöst, bis die angeschlossene UV-Überwachung bei 280 nm keinen Ausschlag mehr zeigt.

- Daraufhin entweder mit dem Elutionspuffer den Imidazol-Gradienten auf 100 % über 30 min bei einer Flussrate von 2 ml/min bringen oder mit dem GST-Elutionspuffer das Fusionsprotein direkt eluieren.
- Die gesammelten Fraktionen werden durch SDS-PAGE und Westernblot auf Verunreinigung und Identität des Fusionsproteins untersucht.

- Bei genügender Reinheit wird das Volumen der Eluate über Ultrafiltrationszellen oder Zentrifugalfilter eingengt, um das Protein für Folgeversuche in höheren Konzentrationen vorliegen zu haben.
- Oder die aufkonzentrierten Proteine werden weiteren Reinigungsverfahren (z.B. der Gelfiltration) unterzogen.

4.8.2 Behandlung der rekombinanten Proteine mit „PreScission-Protease“

Fusionsproteine, die in Vektoren kloniert wurden, welche hinter dem Fusions-Tag eine Basenerkennungssequenz für Proteasen aufweisen, sind nach der Expression infolgedessen mit einer Aminosäuresequenz versehen, die im Fall der hier verwendeten Vektoren von der viralen 3C-Protease „PreScission-Protein“ erkannt und geschnitten werden kann. Damit kann man den jeweiligen Histidin- oder GST-Tag eines Fusionsproteins nach der Aufreinigung entfernen und somit bis auf wenige Aminosäurereste die Sequenz des rekombinant aufgereinigten Proteins der Sequenz des im original vorkommenden Organismus angleichen.

- Histidin-Fusionsproteine vor der PreScission-Behandlung von der Säule eluieren, die Fraktionen sammeln (bis 20 ml) und im Eluatpuffer etwa 600 µg Protease einsetzen und ü/N bei 4 °C aufbewahren.
- GST-Fusionsproteine auf der Säule gebunden belassen und etwa 400 µg Protease in 5 ml Proteasepuffer (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, pH 7,0) und per Spritze langsam in die Säule injizieren; ü/N bei 4 °C inkubieren.
- Um den geschnittenen His-Tag sowie die PreScission-Protease vom Zielprotein zu trennen, wird das Eluat nach der Inkubation über eine HisTrap FF- und GSTrap FF-Säule gegeben; der fraktionierte Durchlauf wird gesammelt und aufkonzentriert; stets SDS-PAGE zur Kontrolle durchführen, danach Konzentrat weiterbearbeiten.
- Der geschnittene GST-Tag und die PreScission-Protease verbleiben gebunden an der Säule, der Durchlauf mit Proteinpuffer wird wie im His-Tag Fall aufgefangen und entsprechend weiterverarbeitet.

4.8.3 Proteinaufreinigung mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie oder auch Gelfiltration ist eine Anwendung, die die Proteine oder Moleküle nach deren Größe auftrennt. Das Säulenmaterial besteht dabei aus einer porösen Matrix, in die die Proteine eindiffundieren können. Kleine Proteine, die in die Verwindungen eindringen und im Gegensatz zu den großen nicht ungehindert mit der

Flussgeschwindigkeit durchlaufen, verlieren sich dabei tiefer in die Matrixbestandteile als große. Im Elutionsprofil finden sich daher die großen Proteine zuerst, während die kleineren Proteine als letzte aus der Säule gespült werden.

- Konzentrierte Proteinprobe zuvor zentrifugieren (20000 g für 10 min) oder filtrieren (0,22 µm-0,45 µm).
- 0,1-1,0% des Bettvolumens der Säule als Proteinprobe auf zuvor mit Proteinpuffer äquilibrierte Gelfiltrationssäule (meist Superdex™ 75, GE Healthcare) bringen.
- Bei Flussgeschwindigkeiten von 1 ml-2 ml/min das Protein eluieren und fraktioniert sammeln, danach die gewünschten Fraktionen zusammengeben und aufkonzentrieren.
- Reinheit mittels SDS-PAGE und/oder DLS überprüfen.
- Proteinlösung entweder für 1-2 Monate bei -70 °C oder 2-4 Wochen bei 4 °C lagern.

4.9 Kristallisationsexperimente

Um die dreidimensionale Struktur von Proteinen aufzuklären, wird auf die Röntgenstrukturanalyse zurückgegriffen. Hierzu wird der Kristall mit Hilfe der Röntgenstrahlung beschossen und das entstehende Diffraktionsmusters bestimmt. Anhand dieser zweidimensionalen Daten kann mathematisch/softwaremäßig eine dreidimensionale Elektronendichtekarte erstellt werden, in die daraufhin die bekannte Aminosäuresequenz des Proteins eingepasst wird. Auf diese Weise kann die dreidimensionale Struktur dargestellt werden. Die dafür nötige reguläre, symmetrische Anordnung von Atomen wird durch das Wachstum des Proteins in Kristallform gewährleistet.

Um diese Kristalle zu generieren, muss nach passenden Kristallisationsbedingungen des Proteins gesucht werden. Die hier meistbenutzte Methode dazu ist die sog. „sitting drop“-Methode. Wenige Mikroliter Proteinlösung und Reservoirlösung werden dazu miteinander vermischt, in eine Vertiefung der Kristallisationsplatte gegeben und gegen die Reservoirlösung äquilibriert. Zum Schutz vor Verdunstung überklebt man den Kristallisationsansatz mit Folie und lagert ihn anschließend bei 4 °C, bei 19 °C und bei 25 °C.

4.9.1 Ansetzen der Kristallisationsplatten

Um erste Hinweise auf erfolversprechende Kristallisationsbedingungen zu erhalten, wird zunächst ein robotergesteuertes Vorab-Screening durchgeführt. Die kommerziell erworbenen

Kristallisationsscreens werden zusammen mit Proteinlösung vom Roboter auf eine 96er-Mikrotiterplatte (Intelliplate, Art-Robbins Instrument) beladen. Hunderte verschiedene Bedingungen können somit relativ schnell getestet werden, bevor vielversprechende Konditionen manuell weiter hinsichtlich der Kristallqualität und -größe optimiert werden.

Die Screening-Versuche und die ersten manuell angesetzten Platten haben folgende Kristallisationsbedingungen für die Reservoirlösung hervorgebracht:

0,1-0,2 M Natriumcitrat, 18-22 % Isopropanol, pH-Wert von 6,5-10,0.

Es konnte keine klare Konstellation ermittelt werden, vielmehr ließen sich Kristalle unter folgendem Ablauf und oben genannten Kristallisationsbedingungen nach etwa 2-3 Tagen Lagerung reproduzieren:

- 1 ml der entsprechenden Reservoirlösung in die Kristallisationsplatten vorpipettieren.
- 1-2 μ l der Proteinlösung in die Platten-Vertiefung für zwei komplette Reihen vorlegen.
- 1-2 μ l aus der Reservoirlösung auf die Proteinlösung geben, ohne zu vermischen.
- Mit Abdeckfolie die Platte abkleben und bei RT aufbewahren.

4.9.2 Optimierung von Kristallisationsbedingungen

Da das Volumen der Kristalle anfangs nur zwischen $0,05 \times 0,04 \times 0,04 \text{ mm}^3$ und maximal $0,1 \times 0,04 \times 0,04 \text{ mm}^3$ lag, wurde versucht, die Bedingungen für die Kristallisation zu optimieren. Ferner ist experimentiert worden, den Präzipitanten Isopropanol zu tauschen, um schnelles Verdampfen beim Öffnen der Reservoirs zu vermeiden.

Verschiedenste Methoden, wie z. B. Überschichten der Reservoirlösung mit Öl, Überimpfen von Kristallkeimen, Temperaturreduzierung, Additivzugabe etc. wurden angewandt, blieben aber meist erfolglos. Lediglich die Zugabe von 1-2 % (v/v) Glycerin in die Kristallisationslösung ließ Kristalle bis zu einem maximalen Volumen von $0,4 \times 0,05 \times 0,05 \text{ mm}^3$ wachsen.

4.9.3 Datenaufnahme am Synchrotronring in Berlin (BESSY)

Vor der eigentlichen Datenaufnahme am Synchrotronring sind alle Kristalle in kryogene Umgebung gebracht worden. Dazu wird der Kristall mit einem Nylon-Loop passender Größe aus dem Kristallisationstropfen gefischt und für etwa 30 s in die Reservoirbedingungen überführt, die zusätzlich noch 20-30 % (v/v) Glycerin oder MPD enthalten. Danach ist der so behandelte Kristall sofort mit flüssigem Stickstoff schockgekühlt und wird bis zur Datenaufnahme darin aufbewahrt worden.

Experimentelles Setup:

Beamline:	BESSY-MX BL14.1
Wellenlänge:	0,091841 nm
Detektor Distanz:	354,444 mm
Phi-Zunahme:	0,5°
Rotationsweite:	0,0° bis 50,0°
2-Theta:	0,0
Kappa:	0,0

V Ergebnisse

5.1 Übersicht über die zweidimensionale Gesamtprotein-Auftrennung mittels der SDS-PAGE

Mit der zweidimensionalen SDS-PAGE soll der Wildtyp *Legionella pneumophila* Corby auf Proteom-Ebene mit den Mutanten *flaR*⁻ und *fliA*⁻ sowie dem Umweltstamm *Legionella hackeliae* verglichen werden. Beide Mutanten sind Regulationsmutanten, die möglicherweise die Expression der Flagellation oder anderer damit verbundener Virulenzfaktoren steuern. *L. hackeliae* gehört zu den Spezies, die zwar noch die Legionärskrankheit auslösen können, aber im Gegensatz zur *pneumophila*-Art – die in über 90% aller Legionellosen als Verursacher identifiziert wird – nur in sehr wenigen Fällen als Auslöser der Lungenkrankheit festgestellt wird. Da die Unterschiede, die die stärkere Virulenz von *L. pneumophila* zu anderen Spezies ausmachen, entweder nur sehr gering oder bisher gar nicht bekannt sind und keine vergleichenden Proteomprofile von *L. hackeliae* und *L. pneumophila* beschrieben sind, ist die Spezies *L. hackeliae* miteinbezogen worden.

Alle Stämme werden in der spätstationären Wachstumsphase geerntet, in dem Stadium, in dem die Bakterien in die virulente, transmissive Phase übergehen [Byrne & Swanson, 1998]. Neben der zweidimensionalen Auftrennung mittels Gelelektrophorese kommt noch das Verfahren der zweidimensionalen Hochdruckchromatographie, das PF-2D-System, zum Einsatz. Beide Methoden sollen später bewertet werden, um Aussagen über das Auffinden neuer oder bereits beschriebener Virulenzfaktoren treffen zu können.

5.1.1 Unterschiede der Protein-Muster des Wildtyps im Vergleich zu den Mutanten *flaR*⁻ und *fliA*⁻ sowie der Spezies *L. hackeliae*

Die ersten isoelektrischen Fokussierungen des cytosolischen Gesamtproteins sind im Bereich von pH 3-10 durchgeführt worden (Daten nicht gezeigt). Basische Proteine und auch integrale oder periphere Membranproteine sind aber aufgrund ihrer Beschaffenheit nur sehr schwer in die erste oder zweite Dimension zu bringen und fehlen daher meist auf dem Gelbild [Pasquali et al., 1997]. Der Bereich im pH von 8-10 bleibt infolgedessen meist ohne sichtbare Proteine, weswegen auf die pH-Streifen 4-7 umgeschwenkt wurde – auch um die Auflösung der Trennung, der in diesem Bereich vermehrt sichtbaren Proteine zu verbessern.

Um keine Wachstumsphasen-spezifische Differenzen bei der Expression und schließlich der Proteinauftrennung vorzufinden, wurden alle Stämme bei einer OD von 3,8-4,0 und einer Temperatur von entweder 37°C oder 30°C geerntet. Jeweils 1,5 mg Protein ist für die Fokussierung genutzt worden, um für alle Vergleiche eine stets gleiche Proteinmenge zu gewährleisten, damit Proteinspot-Unterschiede tatsächlich als Expressionsdifferenzen angesehen werden können.

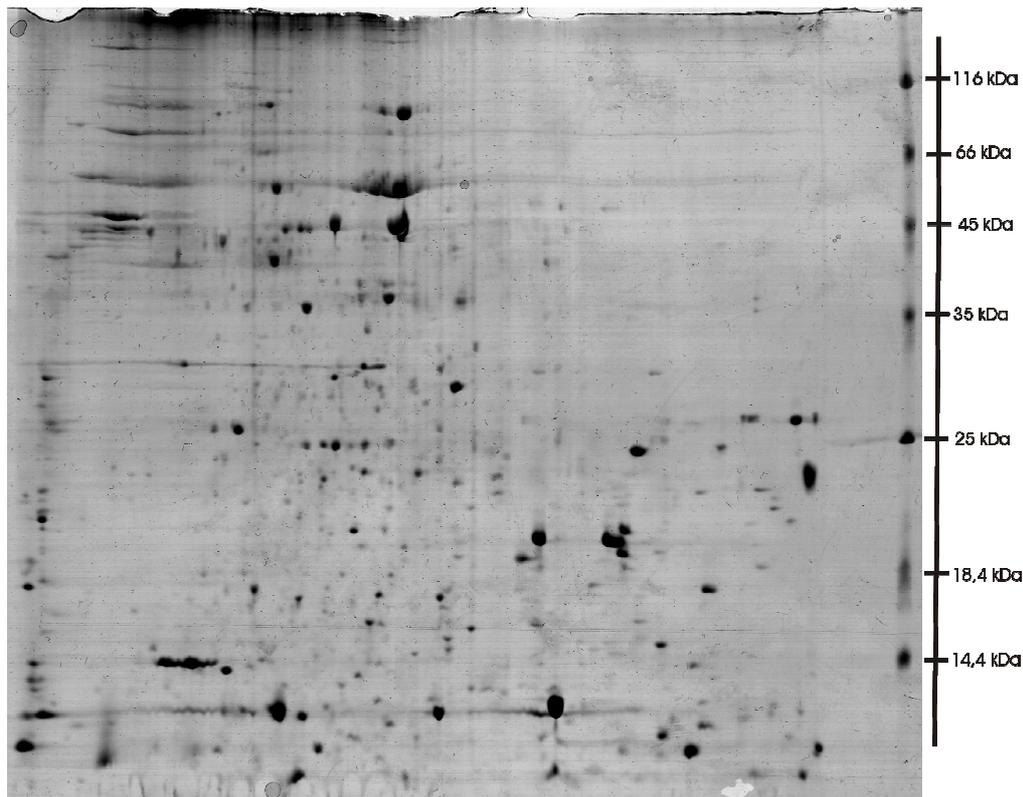


Abb. V.1 Durch Coomassie Blue koloriertes Gesamtprotein vom Wildtyp *Legionella pneumophila* Corby. Der pH-Bereich erstreckt sich von 4,0 (links) bis 7,0 (rechts).

Der in Abb. V.1 zu sehende Protein-Marker (rechts außen) ist außerhalb des immobilisierten pH-Gradienten aufgetrennt. Das ist auch bei allen folgenden zweidimensionalen Gel-Abbildungen der Fall. Schmiereffekte, wie sie im oberen linken Bereich des Gelbildes zu sehen sind, kommen wahrscheinlich durch Salze zustande.

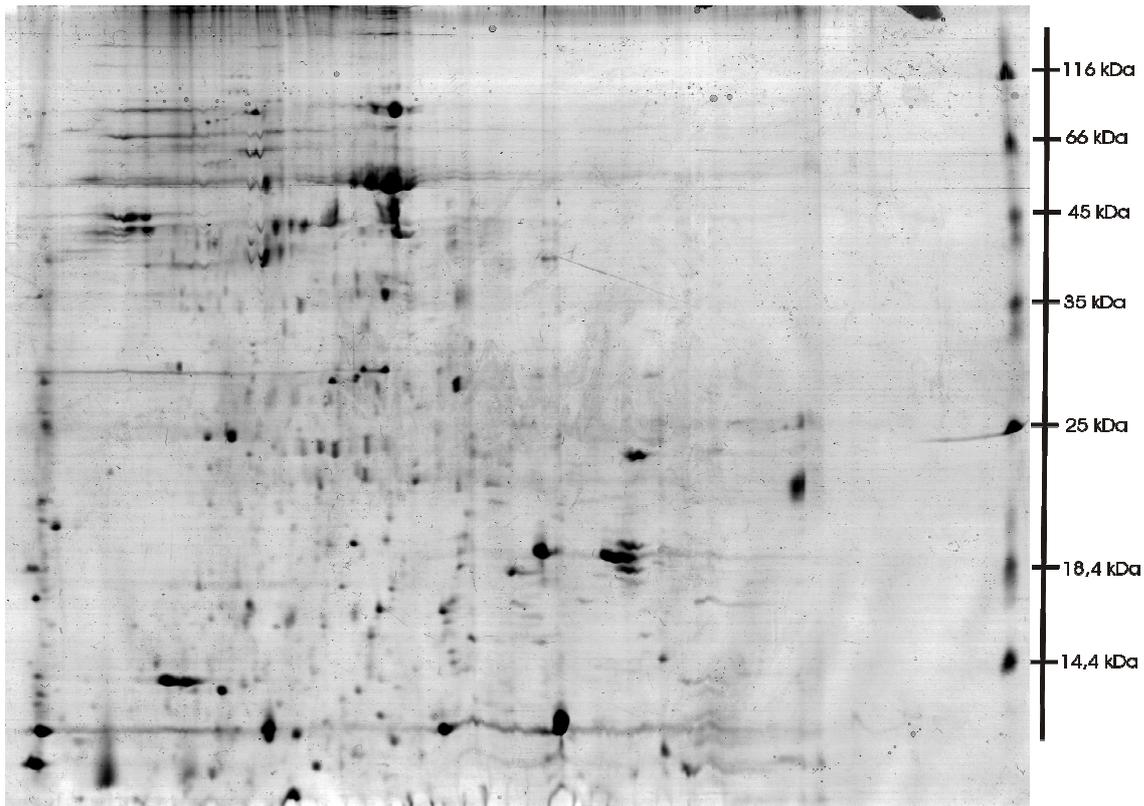


Abb. V.2 Mit Coomassie Blue angefärbte Proteine der *L. pneumophila* Corby *flaR*⁻-Mutante. Der pH-Bereich erstreckt sich genau wie beim Wildtyp von 4,0 bis 7,0. Auch hier sind horizontale Schmiereffekte, vermutlich durch Salze ausgelöst, zu erkennen.

Die *flaR*⁻-Mutante ist in dem Transkriptionsregulator-Protein FlaR deletiert. Das Regulatorprotein selbst ist in der *flaA*-Expression und möglichen anderen Regulationen involviert [Heuner et al., 2000]; über seinen genauen Einfluss auf die Genexpression in *L. pneumophila* Corby ist aber noch nicht viel bekannt. Vergleicht man also die beiden Gesamtproteome vom Wildtyp und der Mutante können sich erste Hinweise darauf ergeben, auf die Expression welcher Gene, FlaR einen Einfluss hat. Die entsprechenden Proteine erscheinen dann im Gelbild der Mutante entweder höher reguliert, sind gar nicht vorhanden oder deutlich niedriger exprimiert als beim Wildtyp.

Auf einem Leuchttisch wurden beide Gele – in Folien eingebracht – übereinander gelegt, um mögliche Unterschiede aufdecken zu können. In Abb. V.3 sind dabei die aufgetretenen Differenzen im Expressionsmuster angezeigt.

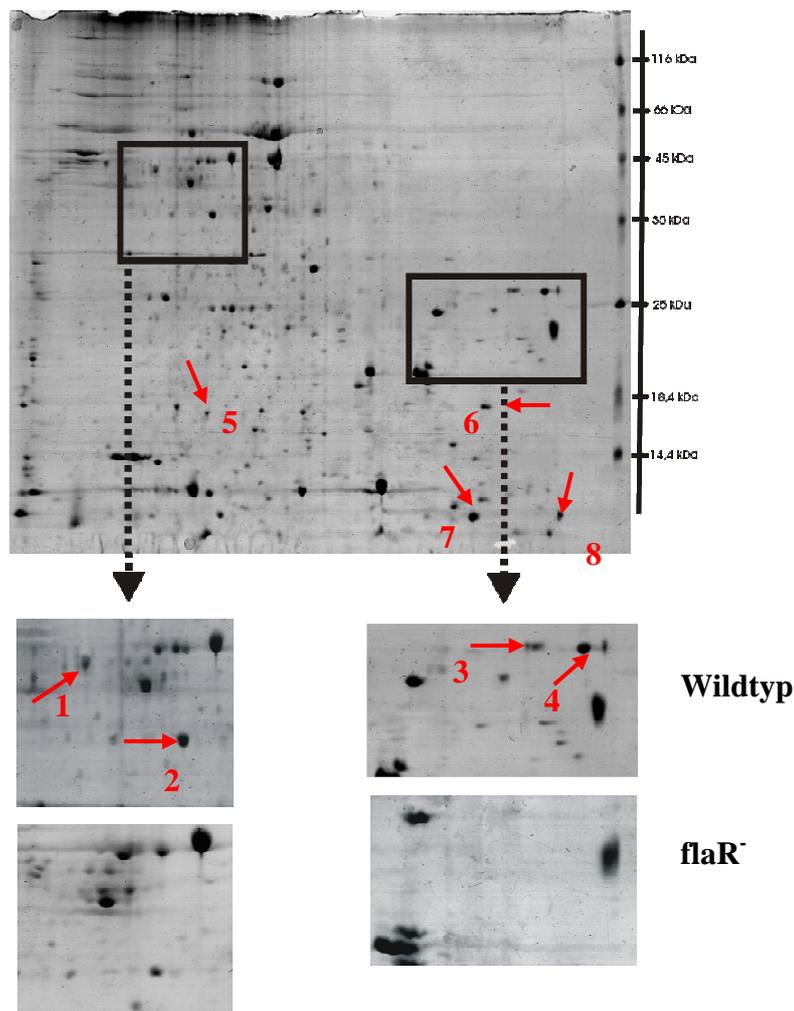


Abb. V.3 Unterschiede des Proteinmusters vom Wildtyp und der Mutante *flaR*⁻. Das komplette Gel zeigt die Auftrennung des Wildtyps, zwei Ausschnitte sind herausgezoomt; die unteren Zoomausschnitte dokumentieren das Trennbild der *flaR*⁻-Mutante. Insgesamt sind 8 Differenzen in den beiden Proteinmustern gefunden worden. Die dabei identifizierten Proteine sind in der Tab. V.1 aufgelistet.

Die unterschiedlichen Proteine sind ausgestochen und, wie in Kap. 4.5 beschrieben, für die MALDI-TOF-Massenspektrometrie-Analyse vorbereitet worden. Dabei sind, wie in Abb. V.3 bei Nummer 2 zu sehen, nicht nur die Proteine ausgewählt worden, die bei der *flaR*⁻-Mutante überhaupt nicht erscheinen (wie Nr. 3 und 4), sondern auch die, welche schwächer exprimiert auftreten. Die Liste der identifizierten Proteine findet sich in Tab. V.1.

Ähnliche Differenzen sind auch im Vergleich mit der *fliA*⁻-Mutante aufgedeckt worden, deren zweidimensionales Trennbild in Abb. V.4 zu sehen ist. Von *fliA* ist bekannt, dass der resultierende alternative Sigma-Faktor die Expression der Flagelle steuert. Die Annahme der genetischen Verlinkung des virulenten Phänotyps mit der Expression der Flagelle [Molofsky et al., 2005; Heuner & Steinert, 2003] könnte vermuten lassen, dass bei der *fliA*⁻-Mutante auch noch weitere putative Virulenzfaktoren nicht in Erscheinung treten

und daher auf dem angefärbten Abbild des cytosolischen Proteoms fehlen oder zumindest geringer exprimiert erscheinen.

Die Unterschiede zum Wildtyp sind auch in einer gezoomten Einstellung in Abb. V.5 prägnanter hervorgehoben und markiert. Die so aufgefundenen Diskrepanzen sind ebenfalls aus dem Wildtyp-Gel isoliert und dann tryptisch verdaut worden, um daraufhin per MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert zu werden.

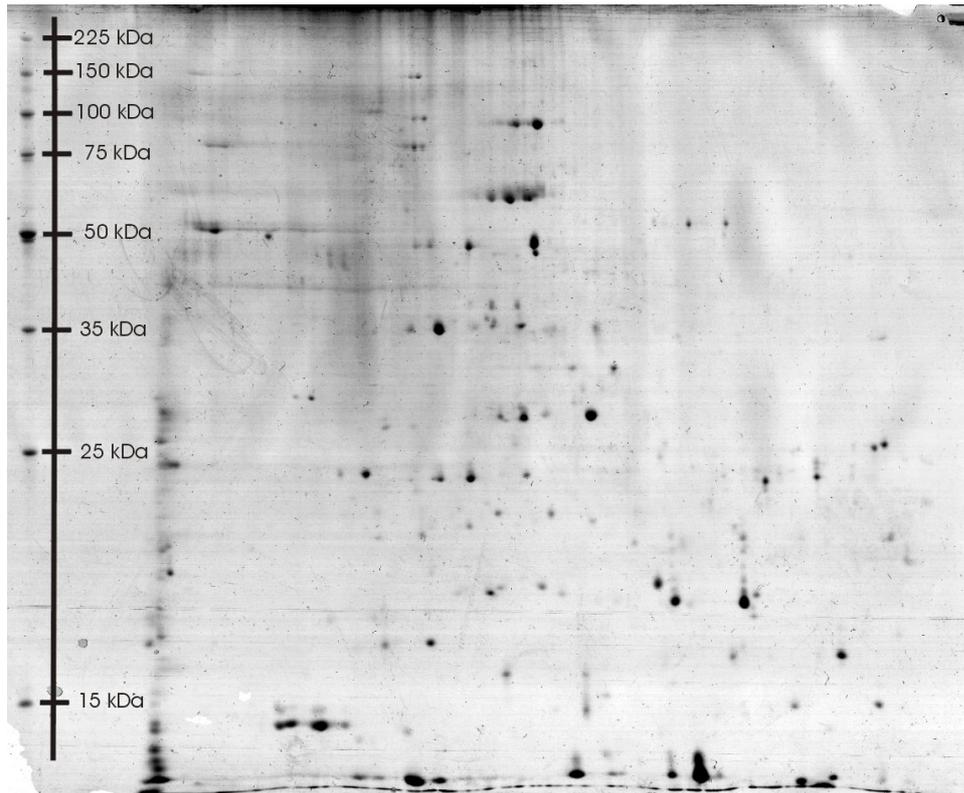


Abb. V.4 Zweidimensionale Auftrennung des cytosolischen Proteoms der *L. pneumophila* Corby Mutante fliA. Gefärbt wurde mit Coomassie Blue. Der pH-Bereich erstreckt sich wie bei allen anderen gezeigten Geltrennungen von 4,0 bis 7,0.

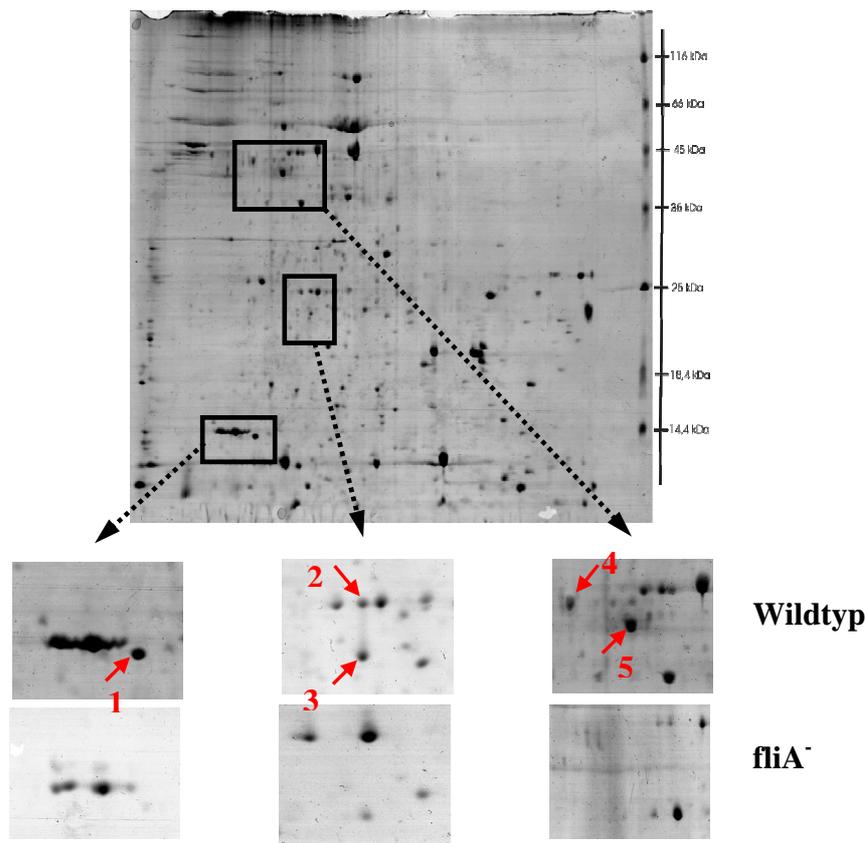


Abb. V.5 Abweichungen vom Proteinmuster des Wildtyps im Vergleich zur *fliA*⁻-Mutante. Das obere vollständig abgelichtete zweidimensionale Gel zeigt den Wildtyp, genau wie die oberen herausgezoomten Bereiche. Im Vergleich dazu ist der gleiche Gelbereich aus der Trennung der *fliA*⁻-Mutante gegenübergestellt und die Unterschiede sind durch Pfeile und Ziffern markiert.

Die in Abb. V.5 markierten Proteine finden sich, sofern sie identifiziert wurden, in der Tab. V.1 wieder.

Im letzten dargestellten Gelbild (Abb. V.6) ist die zweidimensionale Auftrennung des *L. hackeliae*-Proteoms visualisiert. Wie bereits in der Einleitung beschrieben (s. Kap. 2.2.2), gab es zu Beginn der Arbeit – soweit bekannt – keinerlei Vergleiche auf Proteomebene zwischen verschiedenen *Legionella*-Stämmen, insbesondere nicht zwischen *L. pneumophila* und *L. hackeliae*. Shevchuk und Kollegen haben im Jahr 2009 gezeigt, dass das Proteomprofil aus den *Legionella*-enthaltenden Phagosomen zwischen diesen beiden Stämmen unverwechselbare Muster offenbart. In der vorliegenden Arbeit kann das gleiche für den Vergleich von den beiden in Nährmedien gewachsenen Stämmen gesagt werden. Die Diskrepanz der abgebildeten Gesamtproteine im zweidimensionalen Gel ist enorm.

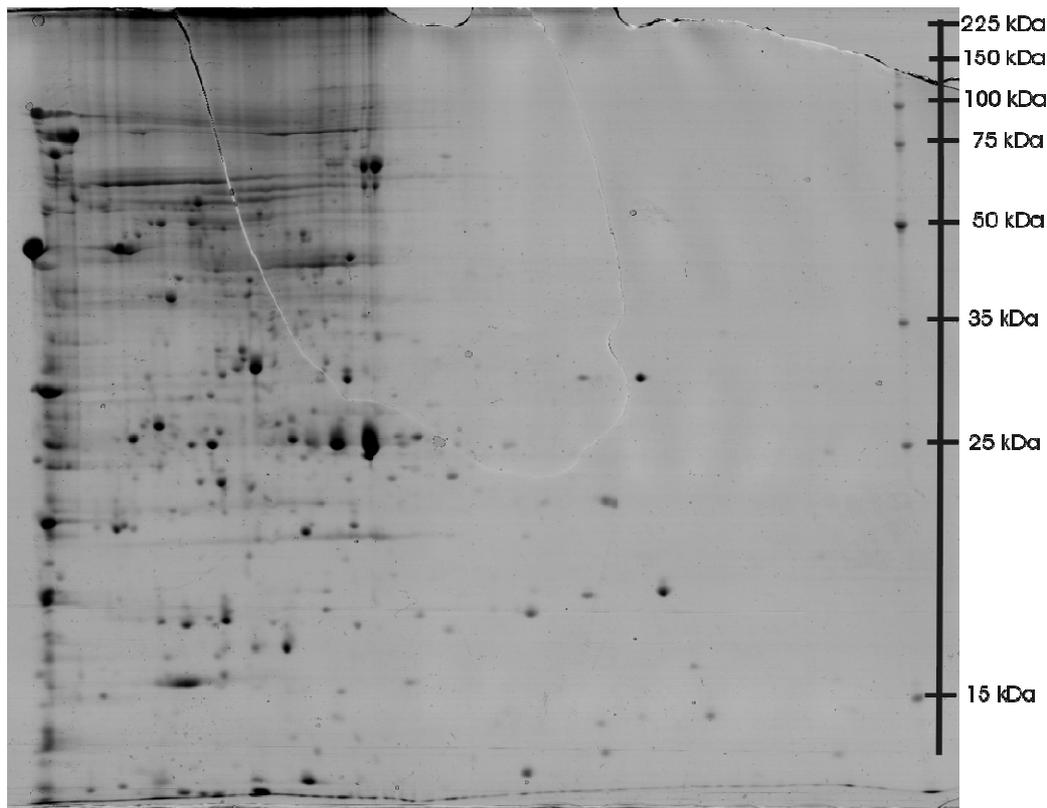


Abb. V.6 Das mit Coomassie Blue gefärbte cytosolische Gesamtprotein von *L. hackeliae* zeigt über den pH-Bereich von 4,0 bis 7,0 markante Unterschiede zu dem von *L. pneumophila* Corby. Ab dem Bereich der Mitte (ca. pH 5,5) zeigt sich in Richtung weiter steigenden pH-Werts auffällig wenig Protein.

Vereinzelte Unterschiede, wie bei den Mutanten *flaR*⁻ und *fliA*⁻, sind bei *L. hackeliae* im Vergleich zu *L. pneumophila* Corby nicht auszumachen. Vielmehr zeigt sich das Proteom beider Stämme, wie bereits erwähnt, zu divergent, um einzelne Proteine auszustechen und zu identifizieren. Eine Veröffentlichung des *L. hackeliae* Genoms wäre in diesem Fall zudem von Vorteil, weil damit schon erste Schlüsse über die Vergleichbarkeit beider Stämme gezogen werden könnten.

Neben den vergleichenden Experimenten zwischen *L. pneumophila*-Mutanten und Wildtyp sowie dem Umweltstamm *L. hackeliae* sind in Zusammenarbeit mit Dr. Jörg Deiwick Vergleiche zwischen in Mausemakrophagen intrazellulär gewachsenen Legionellen und den später mit Coomassie Blue gefärbten und im Nährmedium gewachsenen Bakterien durchgeführt worden. Dazu sind die Bakterien ca. 1,5 Stunden vor der spätstationären Ernte mit radioaktiv markiertem Methionin/Cystein (³⁵S) behandelt worden (etwa 200 µCi/ml Zellvolumen). Zur Hemmung der eukaryontischen Proteinbiosynthese ist Cycloheximid (150 µg/ml) eingesetzt worden. Aufgelöst worden sind die Makrophagen mit 1% Triton 100, die Legionellen chemisch mit 0,3% SDS-Lysepuffer in 5 mM Tris und 1% DTT. Über das

aufgetrennte Gel ist dann in einer Filmkassette ü/N eine Röntgenplatte gelegt worden, die im Phosphoimager ausgewertet werden kann. Das Auftrennungsbild des intrazellulär gewachsenen Wildtyps (Abb. V.7) ist dann mit den durch Coomassie Blue gefärbten Gelen des im Nährmedium gewachsenen verglichen worden.

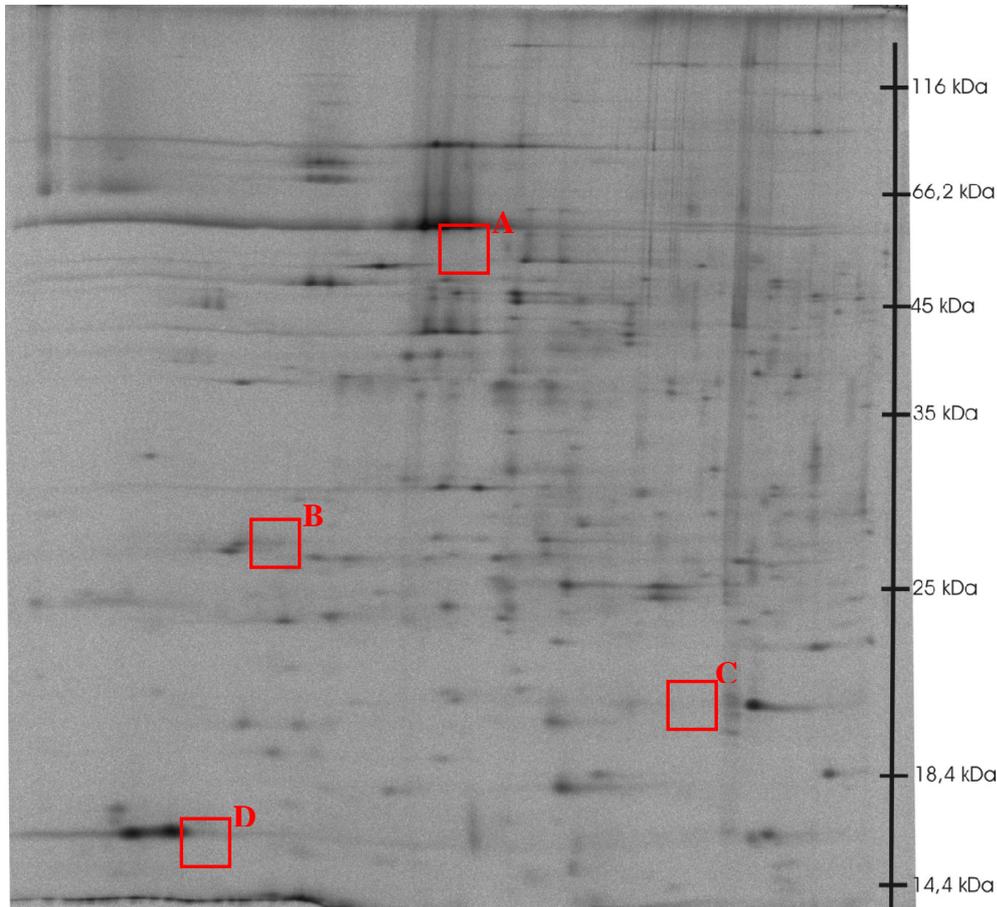


Abb. V.7 Zweidimensionale Auftrennung des *Legionella*-Proteoms vom im Mausmakrophagen intrazellulär gewachsenen Bakterium. Radioaktiv markierter Schwefel (^{35}S) im Methionin/Cystein-Gemisch ist einige Stunden vor der Isolation der Proteine hinzugegeben worden. Die Röntgenplatte ist zur Exposition auf dem Gel ü/N in einer Filmkassette gelagert worden und am Phosphoimager ausgewertet worden. Der Fokussierungsbereich erstreckt sich auch hier von pH 4,0 bis 7,0. Markiert sind die Proteinstellen, die sich im Vergleich zum im Nährmedium gewachsenen Wildtyp als nicht detektierbar präsentieren.

Als diffizil erwies sich die Zuordnung der radioaktiv markierten Proteine zu den Proteinen, die mit Coomassie Blue gefärbt sind. Der gravierende Sensitivitätsunterschied erschwerte somit die Orientierung im Coomassie Blue Gel. Nur wenige Proteinspots konnten daher zugeordnet werden. Eine differenzierte, akkurate Auswertung unterschiedlich stark exprimierter Gene ist problematisch. Dies ist bei verschiedenen Färbemethoden immer wieder der Fall. Oftmals lassen sich dann nur Proteinspots detektieren, die bei einer von zwei zu gegenüberzustellenden, zweidimensionalen Auftrennungen gänzlich fehlen.

Ein weiteres Problem bei den radioaktiv markierten Proteinen ist, dass Proteine, die bei den im Nährmedium gewachsenen Bakterien nicht vorkommen bzw. nicht sichtbar sind, auch nicht zu identifizieren sind, da immer nur die Coomassie Blue-gefärbten Proteinspots zur Identifizierung herangezogen werden können. Für intrazellulär gewachsene Zellen reicht die Coomassie Blue-Färbung aber bei weitem nicht aus.

5.1.2 Identifizierte Proteine, die im Vergleich zum Wildtyp herunterreguliert oder nicht detektierbar erscheinen

In den verglichenen Fällen der Mutanten sind keine Proteinspots beobachtet worden, die im Vergleich zum Wildtyp heraufreguliert, also voluminöser, größer erscheinen. Ebenso sind keine Proteine detektiert worden, die lediglich in einer der Mutanten auftreten, aber im Wildtyp fehlen.

Im Falle der intrazellulär gewachsenen Legionellen konnten nur die Proteine per MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert werden, die sich aus den Coomassie Blue-Gelen herauschneiden ließen; meist waren das die Proteine, die intrazellulär nicht festzustellen waren.

Leider konnten trotz mehrfacher Versuche nicht alle Proteine identifiziert werden. Neben den Proteinen, die wegen ihrer Expressionsunterschiede ausgeschnitten wurden, sind auch noch einige weitere Proteine, die markant und besonders dick, also stark exprimiert, erschienen, untersucht worden (nicht gezeigt).

Die genauen Software-Einstellungen zur Proteinidentifikation sind in Kap. 4.5.3 angegeben.

Pfeilnummer im Gelbild/Name	Molekulargewicht im Gel/theor.	IEP im Gel/theor.	Beschreibung/Funktion	Sequenz-abdeckung	identifizierte Peptide
-----------------------------	--------------------------------	-------------------	-----------------------	-------------------	------------------------

Wildtyp - *flaR* (s. Abb. V.3)

1 - FliC	47 kDa/47,8 kDa	4,6/4,7	C-Terminus der Flagellin-Untereinheit	28,2%	9
2 - TpR	35 kDa/41 kDa	4,9/5,1	in Bakterien als Aspartyl-Phosphat-Phosphatase aktiv	49,1%	20
3 - EtfB	27 kDa/27,3 kDa	6,7/6,3	β -Untereinheit des Elektronen-Transferproteins	40,2%	10
4 - ComI	27 kDa/28,5 kDa	6,8/7,7	„outer membrane protein“	41,8%	9
5 - hypoth. Protein	17 kDa/16,2 kDa	5,0/5,4		54,3%	6
6 - RplI	18 kDa/16,5 kDa	6,4/6,1	ribosomales Protein L9; bindet an die 23S-rRNA	41,6%	6

Pfeilenummer im Gelbild/Name	Molekulargewicht im Gel/theor.	IEP im Gel/theor.	Beschreibung/Funktion	Sequenz-abdeckung	identifizierte Peptide
------------------------------	--------------------------------	-------------------	-----------------------	-------------------	------------------------

Wildtyp - fliA⁻ (s. Abb. V.5)

4 - FliC	47 kDa/47,8 kDa	4,6/4,7	C-Terminus der Flagellin-Untereinheit	28,2%	9
----------	-----------------	---------	---------------------------------------	-------	---

Wildtyp intrazellulär - Wildtyp Nährmedium (s. Abb. V.7)

A - IcmX	48 kDa/51,6 kDa	5,8/6,4	Intrazelluläres Multiplikationsprotein	23,2%	9
C - GspA	20 kDa/18,9 kDa	6,1/5,9	Globales Stressprotein	25,3%	5

Tab. V.1 Identifizierte Proteine und deren Beschreibung. Die meisten Proteine sind aus den Wildtyp-Gelen und teilweise den Mutanten-Auftrennungen ausgeschnitten und für die Identifizierung vorbereitet und eingesetzt worden. Die Molekulargewichte sind mit Hilfe des Proteinmarkers beurteilt, die IEP der Proteine anhand der immobilisierten Fokussierungstreifen bestimmt worden. Alle theoretischen Werte sind anhand der Proteinsequenzen errechnet worden. Die Sequenzabdeckung gibt die Prozentmenge der mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie detektierten Peptide an, die zur Gesamtsequenz des identifizierten Proteins passen. Die Anzahl der tatsächlich gefundenen Peptide findet sich in der letzten Spalte.

Da die hier benutzte Software keinen sog. score-Wert, der die Wahrscheinlichkeit der Übereinstimmung von detektierten Peptidmassen und zugeordnetem Protein unter Berücksichtigung diverser Parameter berechnet, ausgeben kann, sind nur Proteine als identifiziert annotiert worden, deren Molekulargewicht und IEP mit den Beobachtungen im Gel gut übereinstimmen. Ferner sollte die Sequenzabdeckung über 25% liegen und es sollten mindestens fünf Peptidmassen zugewiesen werden können.

Kein Protein zeigt starke Abweichungen von observierten und theoretisch ermittelten Charakteristiken. Ledig IcmX zeigt eine leicht geringere Sequenzabdeckung als 25%.

Sowohl in der *flaR⁻*- als auch der *fliA⁻*-Mutante erscheint das *fliC*-Gen im Vergleich zum Wildtyp herunterreguliert. Da beide Mutanten in Genen deletiert sind, die in die Regulation der Flagelle involviert sind, ist dieser Fund zunächst nicht ungewöhnlich. Die meisten herunterregulierten Proteine der *flaR⁻*-Mutante scheinen auf den ersten Blick keine klare Verbindung zum deletierten Transkriptionsregulator aufzuweisen und nicht als Virulenzfaktoren zu gelten. Bei der *fliA⁻*-Mutante konnte nur das FliC identifiziert werden, die vier weiteren Proteine, die geringer exprimiert oder auf dem Gelbild gar nicht auszumachen sind, konnten keinem bekannten Protein zugeordnet werden.

Unerklärlicherweise fehlt vermutlich beim Wildtyp, der intrazellulär gewachsen ist, das bei den im Nährmedium gewachsenen Zellen stark vorhandene IcmX-Protein, welches in Verbindung mit zahlreichen anderen Untereinheiten einen essentiellen Bestandteil des Dot/Icm-Apparates ausmacht [Matthews & Roy, 2000].

5.2 Übersicht der zweidimensionalen Auftrennung in der HPCF (PF-2D)

Neben der Technik der 2D-Gelelektrophorese zur Auftrennung und Identifikation putativer Virulenzfaktoren ist noch die Hochdruckchromatographie zum Einsatz gekommen. Das Proteinfractionierungssystem 2D (PF-2D) trennt in der ersten Dimension mittels einer „High Pressure Chromatofocusing“- (HPCF) Säule, die als Ionenaustauscher arbeitet, die Proteine – wie bei der 2D-Gelelektrophorese – nach ihrem isoelektrischen Punkt. Die direkt an die erste Dimension angeschlossene zweite Dimension wird mit Hilfe einer Reversphasen-Chromatographiesäule vollzogen und trennt unter Hochdruck die Proteine nach Hydrophobizität. Nicht die stationäre Phase der Säule ist hierbei polar (im Gegensatz zur ersten Dimension), sondern die mobile, organische Phase. Daher stammt der Name der Reversphasen-Chromatographie. Beide Dimensionen trennen das injizierte Gesamtzellprotein über einen jeweiligen Flüssiggradienten auf. Dieses Arbeiten in der Flüssigphase mit allen Proteinen, das Auftrennungsprinzip der zweiten Dimension und die Detektion der Proteine über UV-Absorption unterscheidet das PF-2D-System von der 2D-Gelelektrophorese.

Proteomanalysen durch die PF-2D wurden vom Wildtyp und den *flaR*⁻- und *fliA*⁻-Mutanten durchgeführt. *L. hackeliae* wurde wegen seiner immensen Differenzen im Proteinstreifenmuster in diesem Fall nicht zur Untersuchung herangezogen.

Anzucht (Kap. 4.1.1) und Zellaufschluss (Kap. 4.2.1) der Legionellen werden wie dokumentiert gehandhabt. Der Ablauf der Proteinisolierung verläuft genau wie bei der Isolierung zur 2D-PAGE. Lediglich kurz vor dem Start der Fokussierung unterscheiden sich die zu benutzenden Puffersysteme. Injiziert werden in die Injektor-Aufnahme der ersten Dimension ca. 3,5 mg Gesamtprotein in einem Volumen von 2,5 ml.

5.2.1 Expressionsunterschiede der *flaR*⁻- und *fliA*⁻-Mutante im Vergleich zum Wildtyp

Wenngleich auch die erste Dimension per UV-Absorption bei 280 nm überwacht wird, sind hier selten relevante, große Unterschiede in den verschiedenen Profilen auszumachen (s. Abb. V.8). Das liegt einerseits an der Aufnahme bei 280 nm (in der zweiten Dimension wird bei 214 nm detektiert), andererseits auch am System selbst: so zeigt sich kein Lauf wirklich redundant; die Fraktionen, die nach pH-Werten zusammengestellt werden, sind stets leicht verschieden, von Lauf zu Lauf sind also immer kleine Abweichungen in der ersten Dimension mit einzukalkulieren.

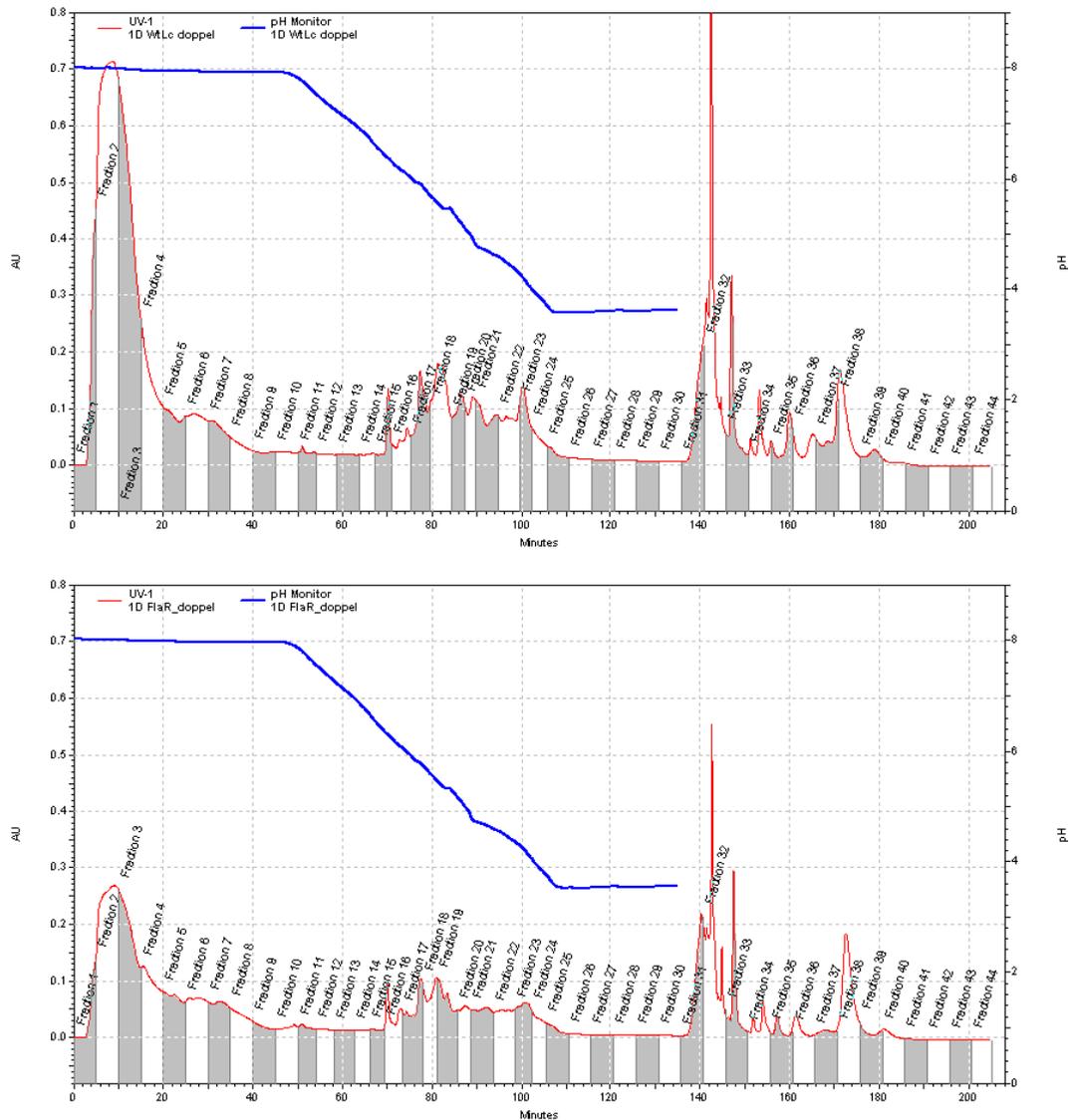


Abb. V.8 Fraktionsprofil der ersten Dimension vom Wildtyp (oben) und flaR-Mutante (unten). Die rote Linie zeigt die UV-Spur, die blaue den gemessenen pH-Wert. Maximal 1 ml-Fraktionen werden gesammelt oder pH-Schritte von 0,3, woraus die unterschiedlichen Fraktionsstärken (graue/weiße Balken) resultieren. Beide Profile erscheinen trotz kleinerer Unterschiede für die erste Dimension als gut getrennt, genauere Aussagen lassen sich immer erst nach Auftrennung in der reversen Phase machen.

Von den insgesamt über 40 Fraktionen, die nach der ersten Dimension zur Verfügung stehen, sind die Fraktionen 4-30 in der zweiten Dimension aufgetrennt worden. Die ersten, sehr basischen Fraktionen und diejenigen, die nach dem Salzwash von der Säule gespült werden (ca. ab Fraktion 30), haben oftmals die Reversphasensäule verstopft und konnten somit nicht genauer untersucht werden. Letztlich hat sich auch hier eine Einschränkung des pH-Bereichs von etwa 3,5 bis 8,5 ergeben, obwohl sowohl die basischen als auch die saureren Proteine im Gegensatz zur 2D-PAGE – wengleich auch nicht aufgetrennt – in wenigen Fraktionen zur Verfügung stehen. In Kombination mit der zweiten Dimension der

Hochdruckchromatographie konnten sie aber wegen des angesprochenen Problems nicht aufgetrennt werden.

Im Folgenden werden einige Auftrennungen der Reversphase präsentiert, die Ungleichheiten im Auftrennungsbild des Wildtyps im Vergleich zu der jeweiligen Mutante offenbaren. Im Gegensatz zur zweidimensionalen Gelelektrophorese ist es hier auch vorgekommen, dass im Chromatogramm der Mutanten Peaks bzw. Proteine im Vergleich zum Wildtyp erhöht und somit deren Genexpression heraufreguliert erscheinen (s. auch Abb. V.9).

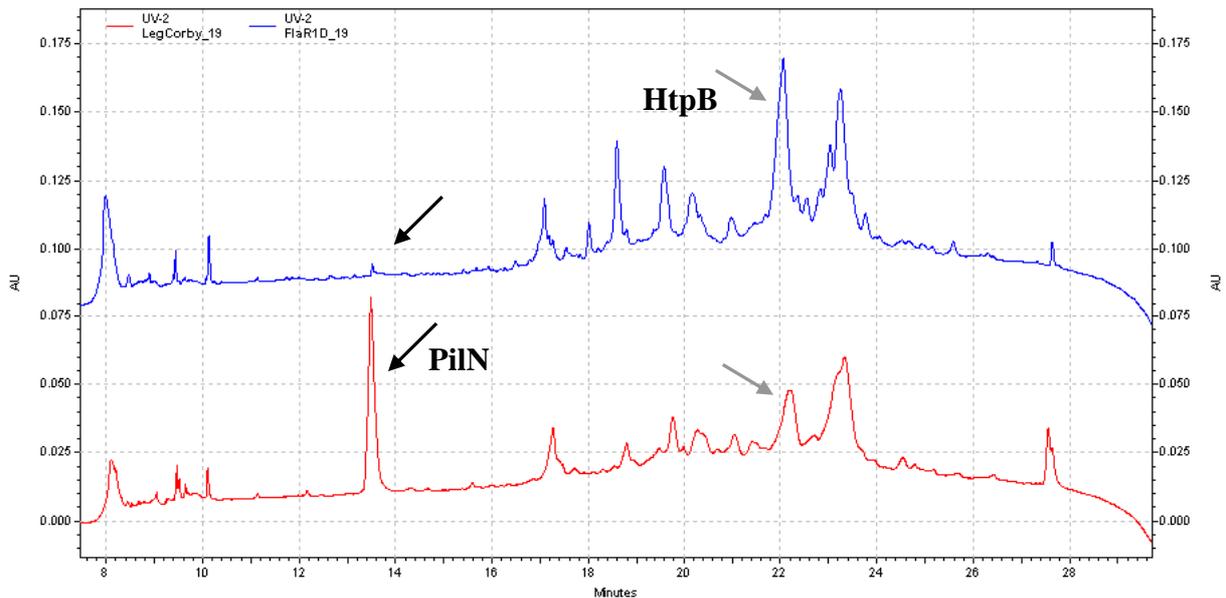


Abb. V.9 Chromatogramme der zweiten Dimension vom Wildtyp (rot) und der *flaR*-Mutante (blau). Beide Fraktionen entstammen der gleichen Fraktionsnummer und können auch einen gemeinsamen IEP der darin enthaltenen Proteine von etwa 5,1 bis 5,5 aufweisen. Der schwarze Pfeil deutet die Überexpression im Wildtyp an, die als *pilN* identifiziert werden konnte, welches im Chromatogramm der *flaR*-Mutante fast völlig fehlt. Die grauen Pfeile bezeigen einen weiteren möglichen Expressionsunterschied: in der Mutante scheint das als *HtpB* identifizierte Protein erhöht zu sein.

Die UV-Absorption bei 214 nm der zweiten Dimension der HPRP ist für die Proteindetektion insgesamt sensitiver, da bei dieser Wellenlänge nicht nur die Aminosäuren mit aromatischem Ring absorbieren (wie bei 280 nm der ersten Dimension), sondern der mesomere Effekt der Peptidbindung aller verknüpften Aminosäuren Ursache der Absorption ist [Woods & O'Bar, 1970]. Von den durch die PF-2D so detektierten und im Chromatogramm als Peaks aufgezeichneten Proteinen lassen sich softwareintern (nach Abzug der UV-Linie eines reinen Pufferlaufes, der auch immer absorbiert) integrativ die Peakflächen dimensionslos angeben. Bei einem Vergleich zweier Chromatogramme kann man von einem signifikanten Unterschied – also einer Proteinexpressionsdifferenz – sprechen, wenn die Peakflächen voneinander um mindestens 40% abweichen [Linke et al., 2006]. In Abb. V.9 ist dies für die

beiden markierten Peaks und den identifizierten Proteinen PilN (21,2 kDa) und HtpB (58,2 kDa) der Fall. Zur Veranschaulichung sind in Abb. V.10 zwei Chromatogramme der Fraktion

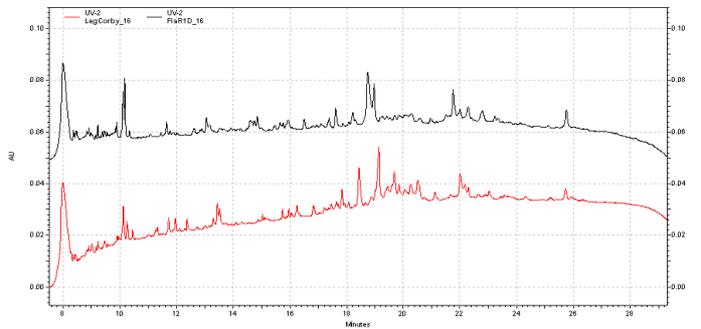


Abb. V.10 Durch UV-Detektion aufgezeichnete Chromatogramme der zweiten Dimension. Die beiden injizierten Fraktionen der ersten Dimension mit nahezu identischem IEP vom Wildtyp (rot) und der *flaR*⁻-Mutante (schwarz) zeigen keine signifikante Divergenz im Expressionsmuster.

16 vom Wildtyp und der *flaR*⁻-Mutante gegenübergestellt, die, von normalen Schwankungen im Auftrennungsmuster abgesehen, nahezu keine Unterschiede aufzeigen.

Trotz der zweidimensionalen Auftrennung kommt es vor, dass sich „innerhalb“ eines Peaks (vor allem bei großen Peakflächen) mehrere Proteine befinden können.

Daher bietet es sich an, die gesammelten Fraktionen der jeweiligen Peaks noch nachträglich auf einem SDS-Gel eindimensional zu separieren und mit Coomassie Blue anzufärben. Bei mehreren gleich verteilten Proteinbanden kann man zur Identifizierung dann die ausgeschnittenen Banden aus dem Gel tryptisch verdauen. Es kann allerdings auch vorkommen, dass die Nachweisgrenze des Coomassie Blue unterschritten wird und so auf dem Acrylamidgel keine Proteinbanden zu sehen sind.

So ist auch mit den Fraktionen der darin identifizierten Proteine PilN und HtpB verfahren worden. Beide gesammelten Peaks wurden in einem späteren Versuch in einer Vakuumzentrifuge eingetrocknet, um dann mit Probenpuffer vermengt auf einem SDS-Gel

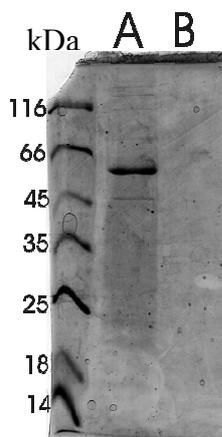


Abb. V.11 SDS-PAGE der vom Wildtyp und der *flaR*⁻-Mutante gesammelten Fraktionen mit den Proteinen HtpB (A) und PilN (B). Unter A ist deutlich zu erkennen, dass die ausgeprägteste Bande bei ca. 60 kDa vorliegt und somit auch dem Molekulargewicht von 58,2 kDa des HtpB entspricht. Bei genauerer Sichtung sind zwar noch andere, schwächere Banden zu erkennen, doch der Hauptbestandteil des Peaks besteht aus dem erwähnten Protein. PilN ist auf diesem Gel nicht zu erkennen. Möglicherweise liegt die Proteinkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze vom Farbstoff Coomassie Blue.

aufgetrennt zu werden (s. Abb. V.11). Das dient zur Überprüfung des Molekulargewichtes und möglicher anderer Proteine, die sich innerhalb dieser Fraktion befinden können – so zu finden auch in der Fraktion vom detektierten HtpB-Protein. Allerdings sind die restlichen Banden hier so schwach, dass der Hauptbestandteil des detektierten Peaks vom HtpB ausgefüllt wird (s. Abb. V.11). PilN konnte bei dieser Gelaufreinigung nicht nachgewiesen werden; das Molekulargewicht von ca.

21 kDa ist aber in einer späteren Auftrennung einer Fraktion im Gel bestätigt worden (Daten nicht gezeigt). Dabei wurden auch keine weiteren Proteinbanden sichtbar.

Neben den beiden Proteinen PilN und HtpB sind zwischen dem Wildtyp und der *flaR*⁻-Mutante noch weitere potentielle Expressionsunterschiede ermittelt worden. Alle identifizierten Proteine sind in der Tab. V.2 aufgelistet. Gezeigt sind in der Abb. V.12 zwei weitere Chromatogramme, die Differenzen in der UV-Absorption offenbaren. In der oberen der beiden Abbildungen erscheint dabei im Wildtyp das Protein Trigger Factor vermehrt exprimiert. Gegenteiliges findet sich im Chromatogramm darunter: der Proteinbestandteil

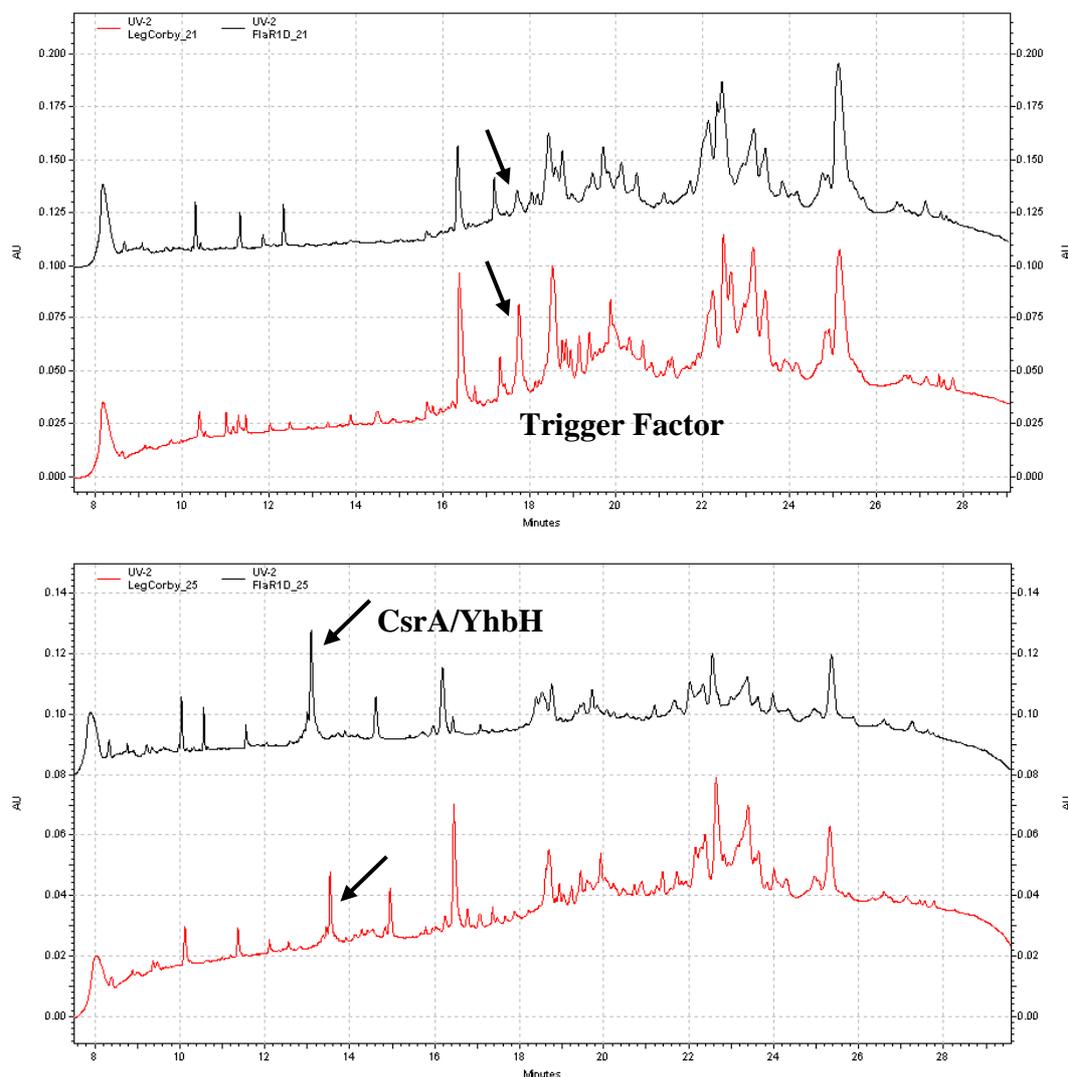


Abb. V.12 UV-Absorption der Reversphase der PF-2D. In rot präsentiert ist die Auftrennung des Wildtyps, in schwarz die der *flaR*⁻-Mutante. Die obere Gegenüberstellung zeigt den im Wildtyp vermehrt erscheinenden Trigger Factor. Im unteren komparativen Ansatz der beiden gleichen Fraktionen erkennt man, dass der als CsrA oder YhbH identifizierte Proteinpeak in der *flaR*⁻-Mutante größer erscheint als der vergleichbare in der Auftrennung des Wildtyps. Stellt man die jeweiligen Peakflächen gegenüber, so ist auch hier eine Abweichung von mehr als 40% festzustellen, ab der man von einem Expressionsunterschied sprechen kann [Linke et al., 2006].

vom CsrA oder das YhbH σ^{54} -Protein kommen in der *flaR*⁻-Mutante erkennbar vermehrt vor, als dies im Wildtyp der Fall ist. Es konnte dabei nicht abschließend geklärt werden, welches Protein im Peak dominiert. Beim ersten Versuch wurde direkt die flüssige Fraktion zur Identifizierung herangezogen und das CsrA identifiziert. Im zweiten Ansatz ist die Fraktion zunächst auf ein SDS-Gel aufgetragen worden. Dabei konnte die Bande des nur 7 kDa großen CsrA-Proteins nicht ermittelt werden, stattdessen eine Bande der Größenordnung von etwa 22 kDa, die sich als das Modulatorprotein YhbH Sigma 54 herausstellte.

Beim Vergleich der in der zweiten Dimension nach Hydrophobizität aufgetrennten Proteine vom Wildtyp und der *fliA*⁻-Mutante ist im Gegensatz zur *flaR*⁻-Mutante kein eindeutiges, klares Auftrennungsbild herausgekommen. Insgesamt ist nur eine Fraktion entdeckt worden, bei der ein charakteristischer Unterschied zu Tage getreten ist (s. Abb. V.13). Oftmals sind die Auftrennungsläufe in ihrem optischen Erscheinungsbild trotz gleicher Fraktionen zu unterschiedlich. Dabei ist schon berücksichtigt, dass es auch in der zweiten Dimension, ähnlich der ersten, zu normalen Abweichungen, etwa in den Retentionszeiten gleicher Proteine, kommen kann. In gewissem Maße lassen sich solche Chromatogramme dennoch miteinander vergleichen, da sie sich programmintern durch eine „Stretchfunktion“ in Annäherung bringen lassen. Diese Funktion ist auch bei nahezu allen Vergleichen zwischen *fliA*⁻ und Wildtyp angewandt worden.

Der markante Unterschied, der in der Abb. V.13 zu sehen ist, konnte nicht identifiziert

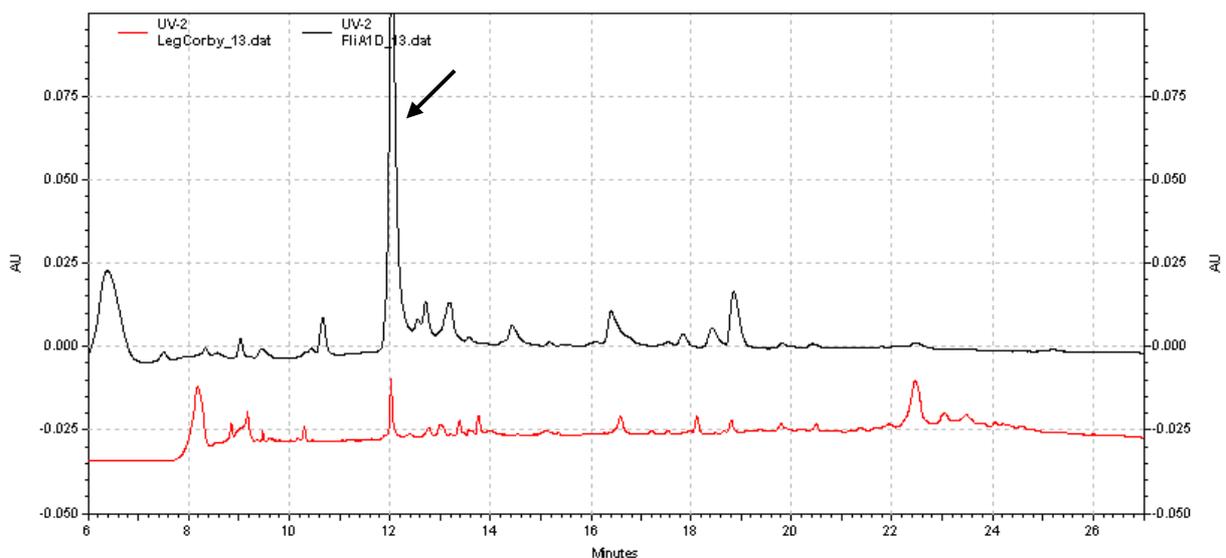


Abb. V.13 Vergleich der Auftrennungen vom Wildtyp (rot) und der *fliA*⁻-Mutante (schwarz) der Fraktion 13, IEP 6,9-7,2. Der markierte Peak der *fliA*⁻-Mutante wurde im Fraktionskollektor gesammelt und nachträglich im SDS-Gel aufgetrennt. Die dort sichtbare Proteinbande konnte allerdings im MALDI-TOF-Massenspektrometer nicht identifiziert werden. Die Chromatogramme sind wegen ungleicher Retentionszeiten im machbaren Verhältnis zueinander gestreckt.

werden. Zwar zeigte sich im SDS-Gel aufgetrennt innerhalb dieser gesammelten Fraktion der *fliA*⁻-Mutante nur eine einzelne Proteinbande mit einer Größe von ca. 17 kDa; zu wenige Peptidmassen waren aber bestimmbar, um eine eindeutige Identifizierung durchführen zu können.

In Abb. V.14 sind zwei Chromatogramme präsentiert, die trotz gleicher Fraktionen nicht vergleichbar sind. Ähnlich inkomparabel haben sich andere *fliA*⁻-Auftrennungen gezeigt. Das lag unter anderem an der schlechter werdenden Auflösung in der reversen Phase, wodurch

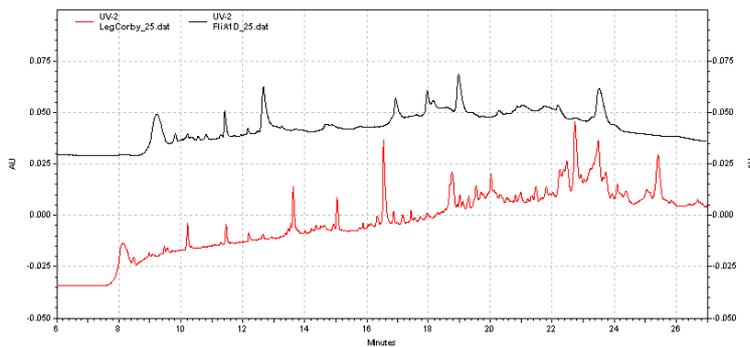


Abb. V.14 Auftrennung der Fraktion Nr. 25 der *fliA*⁻-Mutante (schwarz) und des Wildtyps (rot). Zu erkennen ist, dass die Auftrennung im Fall der *fliA*⁻-Mutante gerade in der letzten Hälfte der Retentionszeiten im Vergleich zum Wildtyp nicht aufgelöst genug erscheint. Eine comparative Auswertung ist somit nur eingeschränkt möglich.

einzelne Peaks und damit Proteine nicht aufgetrennt wurden und unter einem viel zu breiten Peak bzw. einer Anhebung verschwanden, wie auch in der Abb. V.14 zu erkennen ist. Einzelne Peaks waren somit nicht mehr sichtbar und auch nicht mehr einzeln im Fraktionskollektor aufzutrennen. Die Ursachen dafür konnten nicht geklärt und das Phänomen nicht behoben werden.

Der dominanteste Unterschied, das fehlende PilN-Protein in der *flaR*⁻-Mutante (s. Abb. V.9), ist in der Auftrennung der *fliA*⁻-Mutante nicht ausgeblieben, sondern als nahezu gleichwertiger Peak im Vergleich zum Wildtyp sichtbar (s. Abb. V.15).

Insgesamt konnten bei den Untersuchungen der Mutanten und des Wildtyps auch hier, ähnlich wie im Fall der 2D-Gelelektrophorese, nicht alle potentiell differenziert exprimierten Gene per MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert werden. Meistens lag die Ursache in einer zu geringen Anzahl an detektierbaren Peptidmassen, die möglicherweise auf einen unvollständigen Trypsin-Verdau, eine zu geringe Proteinmenge oder nicht ionisierbare Peptidfragmente zurückzuführen ist.

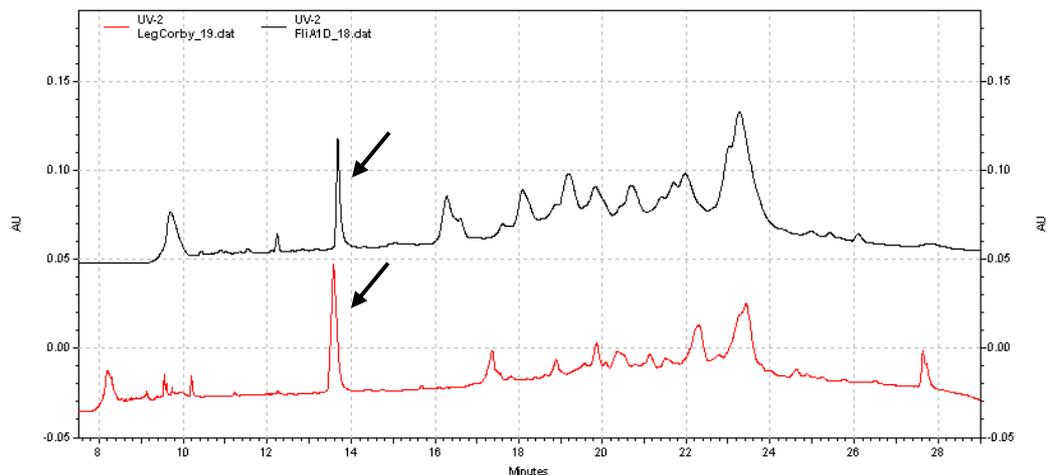


Abb. V.15 Auftrennung in der Reversphase der Fraktion 19, IEP 5,1-5,4, der *fliA*⁻-Mutante (schwarz) und des Wildtyps (rot). Der fehlende Peak in der Separation der *flaR*⁻-Mutante (s. Abb. V.9), der sich als PilN-Protein herausgestellt hat, ist in der *fliA*⁻-Mutante (s. Pfeil) vorhanden. Lediglich der letzte Peak der *fliA*⁻-Auftrennung in dieser Fraktion zeigt eine größere Flächen als der des Wildtyps, ist aber wegen des zu großen Proteingemisches nicht genauer untersucht worden.

In der Tabelle V.2 sind alle identifizierten Proteine, die sich im Vergleich zwischen Wildtyp und *flaR*⁻-Mutante als unterschiedlich exprimiert im Auftrennungsbild der zweiten Dimension der PF-2D erwiesen haben, aufgelistet.

Beim Studieren der Tabelle fällt auf, dass einige Proteine stark von ihrem theoretisch ermittelten IEP abweichen, obwohl die Sequenzabdeckung und die Überprüfung des Molekulargewichtes im SDS-Gel die jeweilige Identifizierung stützen.

Proteinname und Abb.-Nr.	Molekulargewicht	IEP in der PF2D/theor.	Beschreibung/Funktion	Sequenzabdeckung	identifizierte Peptide/Faktor der Peakflächenerhöhung
--------------------------	------------------	------------------------	-----------------------	------------------	---

Proteine, die in der flaR⁻-Mutante im Vergleich zum Wildtyp erhöht erschienen

CsrA oder auch YhbH; s. Abb. V.12	CsrA: 7,2 kDa YhbH: 21,2 kDa	3,6-3,8/ CsrA:4,9 YhbH:9,1	CsrA: reguliert Übergang zur transmissiven Phase; YhbH: ein σ^{54} -Modulationsprotein	CsrA:64,8% YhbH:28,9%	CsrA:4/2,0 YhbH:5/2,0
HtpB (Synonym: GroEL); s. Abb. V.9	58,2 kDa	5,3-5,5/5,3	Chaperon-Funktion, aber auch involviert in Zell-Zell-Kontakte	23,9%	6/4,1
RpsN 30S-ribosomales Protein; keine Abb.	11,8 kDa	6,4-6,7/10,7	ribosomales Protein der kleinen Untereinheit	36,0%	5/3,1

Proteinname und Abb.-Nr.	Molekulargewicht	IEP in der PF2D/theor.	Beschreibung/Funktion	Sequenzabdeckung	identifizierte Peptide/Faktor der Peakflächenerhöhung
--------------------------	------------------	------------------------	-----------------------	------------------	---

Proteine, die im Wildtyp im Vergleich zur flaR-Mutante erhöht erschienen

PilN; s. Abb. V.9	21,2 kDa	5,1-5,4/9,5	PilN ist mit unbekannter Funktion involviert in die Biosynthese des TypIV-Pilus	31,3%	6/ in der Mutante nicht detektierbar
Trigger factor; s. Abb. V.12	52,5 kDa	4,7-5,0/5,1	Eine Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase, auch in den Protein-Export involviert	46,8%	22/2,0

Tab. V.2 Identifizierte Proteine aus der PF-2D-Untersuchung und deren Beschreibung. Der Faktor der Peakflächenerhöhung bezieht sich immer auf den entsprechenden Peak entweder der Mutante oder des Wildtyps. Eine Erhöhung um den Faktor 2,0 veranschaulicht, dass die dimensionslos angegebene Fläche dieses Peaks 2-mal so groß ist wie die des entsprechenden Peaks in der Mutanten- oder Wildtyp-Auftrennung.

5.3 Rekombinante Herstellung des PilN-Proteins

PilN, als der dominanteste aufgedeckte Unterschied in der zweidimensionalen Auftrennung der Hochdruckchromatographie, ist als Protein an der Biosynthese des TypIV-Pilus beteiligt. Nach Kochs Postulat [Falkow, 1988] wären die TypIV-Pili der Legionellen durchaus als Virulenzfaktoren anzusehen, PilN als essentieller Bestandteil (s. Kap.2.3.1) des Pilus damit ein interessantes Untersuchungsobjekt, zumal keine genaue Funktion in der Literatur beschrieben ist. Aus diesen Gründen wurde pilN aus dem *Legionella*-Genom amplifiziert und für die rekombinante Herstellung in *E. coli*-Zellen in verschiedene Vektoren umklontiert. Mit dem daraufhin überexprimierten und aufgereinigten Protein wurden Kristallisationsexperimente durchgeführt, um dann über die Röntgenkristallographie die dreidimensionale Struktur des Proteins aufzuklären.

5.3.1 Überprüfung der molekulargenetischen Arbeiten an PilN

Insgesamt sind für PilN mehrere Konstrukte erstellt worden. Die Gesamtsequenz ist im Vektor pQE-30 (6-fach Histidin-Fusion, N-terminal) eingebracht worden. Wie aber bereits erwähnt (s. Kap. 2.3.1), ist mit Hilfe des Programms SOSUI eine potentielle Transmembran- bzw. Membrananker-Region vorhergesagt worden (s. Abb. V.16), die die Löslichkeit und die Kristallisation des Proteins enorm erschweren kann. Das konnte auch mit Löslichkeitstests bestätigt werden, da das komplette PilN-Protein trotz mehrerer Detergentien nur in sehr

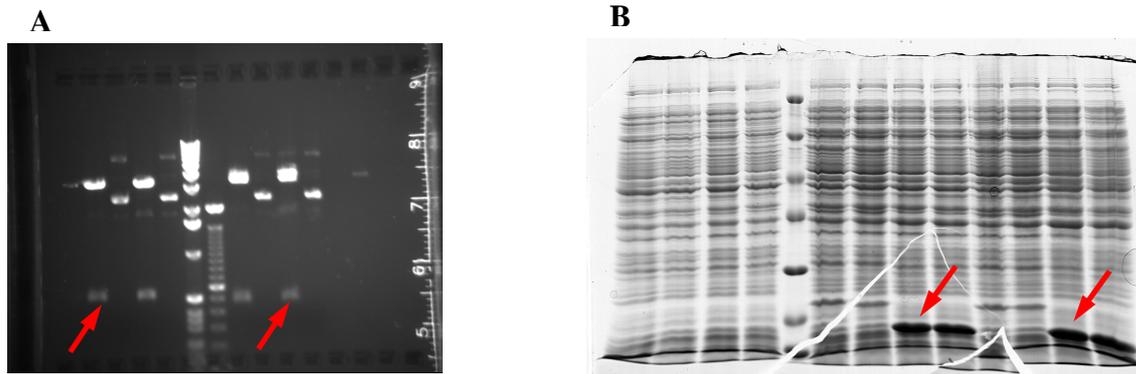


Abb. V.17 A: Restriktionsanalyse des pQE-30 Vektors mit integrierter Gesamtsequenz von pilN (links neben den beiden Markern) und der geschnittenen pilN-Version (rechts neben den Markern). Die roten Pfeile zeigen die zuvor aus dem Vektor mit den Restriktionsenzymen BamH1/SalI (ca. 580 bp, links) bzw. EcoRI/SalI (ca. 450 bp, rechts) herausgeschnittenen klonierten PCR-Produkte.

B: Testexpression mit *E. coli* M15-Zellen, induziert mit 0,5 mM IPTG und 3 Std. 25 °C Expression. Die roten Pfeile indizieren das überexprimierte, lösliche PilN ohne den Membranteil. Links neben dem Marker sind die Testexpressionen mit dem kompletten PilN. Hier ist im löslichen Überstand kaum eine Zunahme im Vergleich zum nicht induzierten Kontrollstamm zu sehen.

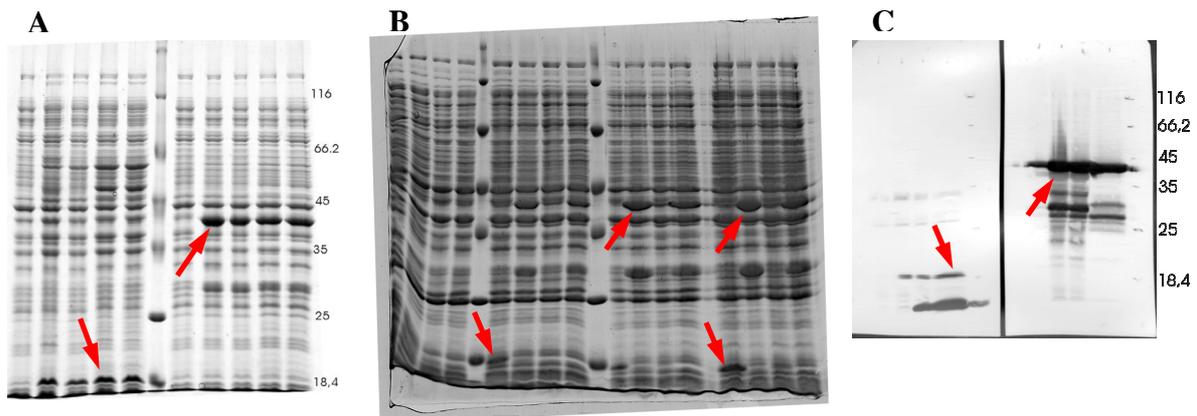


Abb. V.18 A und B: SDS-Gele von Testexpressionen der pQE-30 PreScission/pGEX-Konstrukte mit *E. coli* M15- (A), tuner- (B) und BL21- (B) Zellen. Die roten Pfeile zeigen das überexprimierte PilN (ohne Membranteil) entweder 6-fach Histidin fusioniert (ca. 18,5 kDa) oder als GST-Tag (ca. 42 kDa) an.

C: Westernblot der gleichen Konstrukte wie in A und B. Markerangaben sind in kDa. In der linken Hälfte ist ein Anti-Histidin-Antikörper benutzt worden, in der rechten Hälfte ein Antikörper, der gegen GST gerichtet ist. Neben den eigtl. Proteinbanden sind jeweils noch andere unspezifische Banden zu sehen, die entweder aus dem Stoffwechsel der benutzten *E. coli*-Zellen stammen oder abgelöstes GST-Protein darstellen. In der linken Hälfte zeigen sich unspezifische Banden, die möglicherweise Aggregate oder Zerfallsprodukte darstellen.

Nachdem die Richtigkeit der genetischen Konstrukte festgestellt und die besten Expressionsbedingungen ausgewählt wurden, wurde die Expression von PilN im großen Maßstab (meist 6 Liter) gestartet. Dafür sind alle Konstrukte mit der gestutzten pilN-Gensequenz, die die putative Membranregion am N-terminalen Ende auslässt, genutzt worden.

Vektor/insert	<i>E. coli</i> - Expressionsstamm	IPTG- Konzentration	Temperatur, Expressions- dauer, Löslichkeit
pQE-30/pilN	M15 pREP4	0,5 mM	25 °C, 3 Std., nicht löslich
pQE-30/pilN-TMH	M15 pREP4	0,5 mM	25 °C, 3 Std., löslich
pQE-30_PreS/pilN-TMH	BL21 (DE3) pLys/M15	0,5-1,0 mM	30 °C, 3 Std., löslich
pGEX-6P-1/pilN-TMH	tuner (DE3)	0,2-0,5 mM	30 °C, 3 Std., löslich

Tab. V.3 Expressionsbedingungen der erstellten rekombinanten pilN-Konstrukte. Für den reinen pQE-Vektor, der ohne den lacI^q-Repressor ausgestattet ist, sind zur Expression die M15-Zellen mit dem Plasmid pREP4 vonnöten. pQE-30_PreS ist zusätzlich mit einer Erkennungssequenz für die Protease PreScission vor der Multiklonierungsstelle und der lacI^q-Repressor kodierenden Einheit versehen. Da alle Vektoren entweder einen tac- oder einen T5-Promotor tragen, hätte auch auf die DE3-Zusätze der *E. coli*-Stämme verzichtet werden können. Das komplette PilN zeigt sich, wie bereits erwähnt, trotz verschiedener Löslichkeitstests in allen Bedingungen so unlöslich, dass bevorzugt die anderen Konstrukte bearbeitet wurden.

5.3.2 Aufreinigung, Protease-Behandlung und Reinheitsanalyse des rekombinanten PilN-Proteins

Für den Zellaufschluss per Ultraschall sind Zellpellets aus 4-6 Litern Kulturvolumen genutzt worden. Nach der Ultrazentrifugation wurde der Proteinüberstand stets affinitätschromatographisch aufgereinigt und das rekombinante Protein auf der Säule ausgiebig gewaschen. Im Falle des nicht abspaltbaren Histidin-Tags aus dem pQE-30 Vektor wurde das Protein danach aufkonzentriert und über eine Gelfiltrationssäule in einem zweiten Schritt von unspezifischen Proteinen getrennt. Zur Überprüfung der einzelnen Teilschritte dient hier die SDS-PAGE. Trägt das Protein noch eine PreScission-Erkennungssequenz zwischen Fusionsschwanz und Proteinsequenz, wird es entweder auf der Affinitätssäule selber oder im eluierten Zustand mit der Protease behandelt. Ein weiterer Lauf über die GSTrap FF-Säulen schließt sich an, um die ebenfalls GST-fusionierte PreScission Protease aus dem PilN-Pool zu entfernen, bevor auch hier sich die Größenausschlusschromatographie einreihet. Zum genaueren Methodenablauf siehe auch Kap. 4.8.

In der Abb. V.19 ist das Ergebnis der Chromatographie im Falle des PilN mit 6-facher Histidin-Fusion illustriert. Das Protein zeigt sich nach allen Anwendungen in sehr reiner Form und konnte in Proteinpuffer D (s. Kap. 3.3.8) in einer Konzentration von etwa 10 mg/ml über Tage bei 4 °C und Wochen bei -72 °C gelagert werden. Dabei wurde die Stabilität des Proteins nach mehreren Tagen der Lagerung mittels einer analytischen Gelfiltrationssäule kontrolliert und mit dem Auftrennungsbild und den Retentionszeiten von „frischem“ Protein verglichen. Änderungen waren nicht festzustellen (Daten nicht gezeigt).

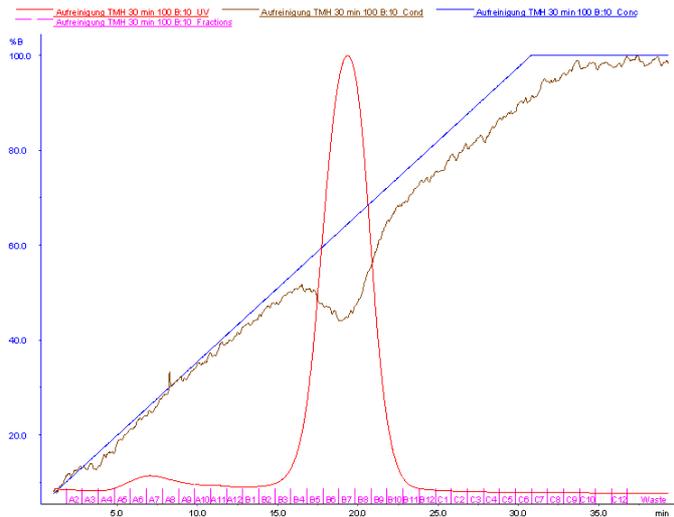


Abb. V.19 Elutionsprofil von PilN ohne die putative TMH an einer FPLC-Anlage. Die rote Spur zeigt die UV-Linie bei 280 nm, die blaue den Gradienten, die braune die Konduktivität.

oder Zentrifugalfilter eingeeignet und für die anschließende Gelfiltration vorbereitet. Dort zeigte sich ein ähnlich sauberes Elutionsprofil wie bereits bei der Elution aus der HiTrap-FF-Säule. Um auch noch bezüglich der Partikelverschmutzung und der Verteilung von Partikelgrößenklassen Aussagen treffen zu können, ist die konzentrierte Proteinprobe nach Zentrifugation mittels der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) untersucht worden. Die Messungen ergaben für das PilN-Protein ohne TMH einen monodispersen Peak (s. Abb. V.20). Das bedeutet, dass das Protein in nur einer Größenordnung (z.B. Monomer, Di-, Tri-, oder Oligomer) vorliegt. Dabei lassen der hydrodynamische Radius von ca. 6 nm und der Vergleich mit anderen Proteinen gleichen Partikeldurchmessers, deren quartäre Organisationsebene bekannt ist, und die in ähnlicher Pufferviskosität vorliegen, die

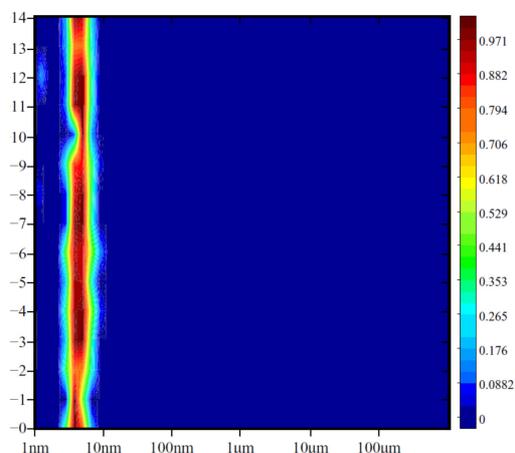


Abb. V.20 DLS-Spektrum vom PilN-Protein ohne dessen putative TMH. Über 14 Messungen hinweg zeigt sich ein stabiler, unimodularer hydrodynamischer Radius von ca. 6 nm.

In Abb. V.19 verläuft der Imidazol-Gradient von 7% ansteigend auf 100% in 30 min. Nur ein einzelner großer Peak ist zu erkennen, in dem sich überwiegend das rekombinante PilN ohne die potentielle Transmembran-Helix (TMH) befindet. Das wurde auch erneut durch einen Westernblot der aufgesammelten Fraktionen bestätigt. Das Volumen der zusammengelegten Fraktionen wurde über Ultrafiltrationszellen

oder Zentrifugalfilter eingeeignet und für die anschließende Gelfiltration vorbereitet. Dort zeigte sich ein ähnlich sauberes Elutionsprofil wie bereits bei der Elution aus der HiTrap-FF-Säule. Um auch noch bezüglich der Partikelverschmutzung und der Verteilung von Partikelgrößenklassen Aussagen treffen zu können, ist die konzentrierte Proteinprobe nach Zentrifugation mittels der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) untersucht worden. Die Messungen ergaben für das PilN-Protein ohne TMH einen monodispersen Peak (s. Abb. V.20). Das bedeutet, dass das Protein in nur einer Größenordnung (z.B. Monomer, Di-, Tri-, oder Oligomer) vorliegt. Dabei lassen der hydrodynamische Radius von ca. 6 nm und der Vergleich mit anderen Proteinen gleichen Partikeldurchmessers, deren quartäre Organisationsebene bekannt ist, und die in ähnlicher Pufferviskosität vorliegen, die

$$K_{av} = (V_R - V_0) / (V_C - V_0)$$

V_0 bezieht das Totvolumen der Säule.

V_C bezeichnet das Bettvolumen der Säule.

V_R bezieht das Elutionsvolumen des Proteins.

Alle Angaben werden in ml gegeben. Dabei ist

ein Durchschnittswert für PilN von 27,5 kDa ermittelt worden. Dieser Wert tendiert dabei eher zum PilN-Dimer (34,8 kDa) als zum Monomer, wengleich die rechnerisch ermittelte Molekularmasse nicht mit der tatsächlichen übereinstimmt. Das Gleiche gilt allerdings auch für die benutzten Kalibrierproteine oder -peptide, deren Werte auch oftmals voneinander abweichen.

Für die PilN-Proteine, die kodiert in den Vektoren mit Protease-Spaltsequenz vorgelegen haben, ergab sich in allen Aufreinigungsschritten ein ähnlich reines Bild; wengleich die Ausbeute in der Proteingewinnung hier deutlich geringer ausgefallen ist. Damit einhergehend ist es zu einer geringeren Konzentration für PilN mit dem abgespaltenen Histidin-Fusionsrest (s. Abb. V.21) von etwa 5 mg/ml gekommen. PilN, welches fusioniert mit dem Protein GST vorgelegen hat, konnte trotz mehrfacher Versuche mit verschiedenartigen Puffern sowohl auf der Säule als auch im eluierten Zustand nicht vom GST-Tag getrennt werden. Dabei haben die in Auftrag gegebenen Sequenzierungen der fertig gestellten Expressionsvektoren die Schnittstelle für die PreScission-Protease bestätigt. Möglicherweise kommt es hier zu einer sterischen Hinderung durch Wechselwirkung vom GST-Tag mit dem PilN-Protein, so dass die Protease die Schnittsequenz nicht mehr erreicht/erkennt.

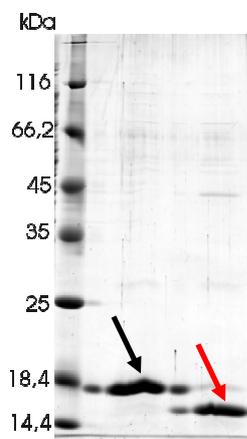


Abb. V.21 SDS-PAGE vom PilN-Protein ohne vorhergesagte TMH-Region. Der schwarze Pfeil markiert das Protein mit Histidin-Fusionsrest (18,6 kDa), der rote Pfeil deutet auf PilN ohne die Histidinreste nach der PreScission-Behandlung (16,5 kDa). Proteinfärbemittel ist auch hier Coomassie Blue.

5.4 Kristallisation und Diffraktion des rekombinanten und verkürzten Proteins PilN

Für die Kristallisation sind lediglich die verkürzten PilN-Proteine, ohne die computergestützt vorhergesagte TMH- oder Membrananker-Region genutzt worden. Dazu wurden hier zum

einen das Histidin-Fusionsprotein und zum anderen das Protein mit gespaltenem 6-fach-Histidin-Tag, welches lediglich N-terminal drei zusätzliche Aminosäurereste trägt, verwendet.

5.4.1 Kristallisationsbedingungen

Mit beiden Proteinvarianten ist in unterschiedlichen Konzentrationen (5-10 mg/ml) zunächst mit Hilfe des Kristallisationsroboters eine Übersicht verschiedener kommerzieller und selbst erstellter Kristallisationsbedingungen angelegt worden. Dabei sind zwei Bedingungen ermittelt worden, die kleine Kristalle hervorgebracht haben (s. auch Kap. 4.9.1):

0,2 M Natriumcitrat, 0,1 M HEPES pH 7,5, 20% Isopropanol (1) und

0,2 M Magnesiumchlorid, 0,1 M HEPES pH 7,5, 30% Isopropanol (2).

Manuell reproduzieren in sog. „sitting drop“-Platten ließen sich allerdings nur Kristalle zusammen mit Natriumcitrat. Die pH-Wert-Bedingungen waren dabei nicht allzu stringent, sondern konnten sich über den Bereich von 7,0 bis hin zu 10,0 erstrecken. Isopropanol musste in einer Konzentration von mindestens 18%(v/v) bis maximal 24%(v/v) zugegen sein, um Kristallwachstum zu generieren. Alle Versuche, diesen Präzipitanten gegen einen weniger oder gar nicht flüchtigen Stoff wie etwa Polyethylenglykol, Methylpentandiol, tert-Butanol, Ethylen etc. auszutauschen, schlugen fehl. Die anfänglich kleinen Kristalle (max. $0,05 \times 0,04 \times 0,04 \text{ mm}^3$, s. Abb. V.22) konnten letztlich nach diversen Optimierungsversuchen durch den Zusatz von Glycerin (1-2% v/v) auf eine Länge von etwa 0,25-0,4 mm gebracht werden (s. Abb. V.23).



Abb. V.22 PilN mit 6-fach Histidin-Tag in kristalliner Form. Die Kristalle haben eine fast hexagonale Form, meist jedoch mit abgeflachter Unterseite, mit der sie am Boden haften. Kristallisationsbedingungen: 0,2 M Natriumcitrat, 0,1 M Tris, pH 8,5, 22 %(v/v) Isopropanol, gelagert für 3-5 Tage bei RT. Die Kristalle zeigen ein Ausmaß von maximal $0,05 \times 0,04 \times 0,04 \text{ mm}^3$.

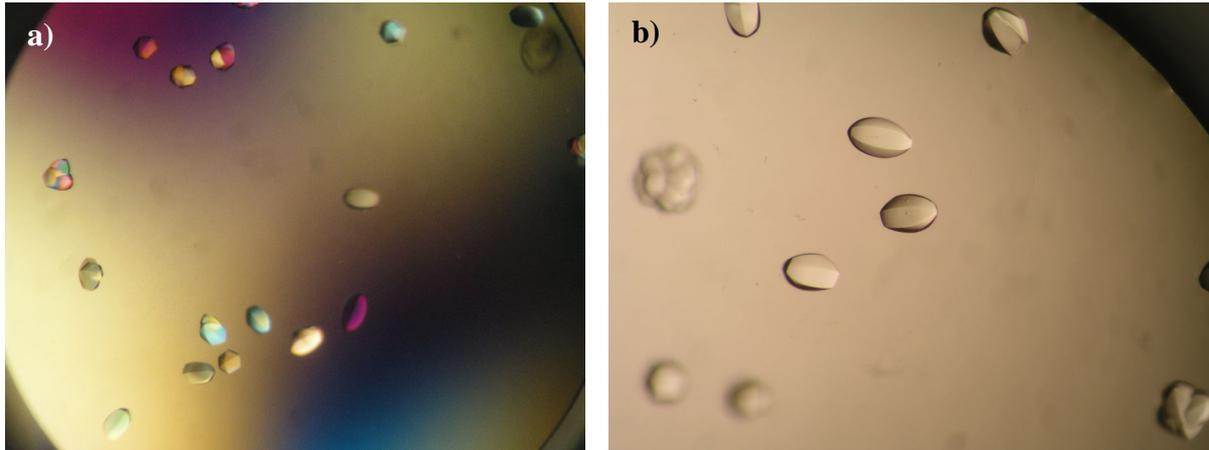


Abb. V.23 Optimierte Kristalle, durch Polarisationsfilter betrachtet (a) und ohne Filter (b). Die Grund-Konditionen ähneln denen der kleinen Kristalle mit 0,1 M Natriumcitrat, 0,1 M Tris pH 8,0, 20%(v/v) Isopropanol. Zusätzlich wurden hier 1,5%(v/v) Glycerin genutzt. Die Kristallisationsplatten wurden bei RT für ca. 2-3 Monate gelagert. Vorgelegt wurden 2 μ l Protein (9 mg/ml), dann mit 2 μ l Puffer vermengt. Die Kristalle zeigen die gleiche Morphologie wie in Abb. V.22, sind aber bis zu 0,4 mm lang.

Alle hier gezeigten Kristallbilder sind Kristalle vom PilN-Protein inklusive Histidin-Tag. Vom Histidin-Tag freien PilN konnten zwar ebenfalls Kristalle produziert werden (ca. $0,1 \times 0,04 \times 0,04 \text{ mm}^3$ groß), jedoch waren diese derart instabil, dass sie bereits kurz nach Öffnen der Kristallisationskammer zerfielen und somit nicht für eine Untersuchung am Röntgendiffraktometer genutzt werden konnten.

5.4.2 Übersicht der Röntgenbeugungsdaten

Kristalle von der Länge 0,2-0,4 mm (vergleiche Abb. V.23) sind in kryogene Bedingungen (s. Kap.4.9.3) transferiert worden, bevor sie am BESSY in Berlin von Dipl.-Biochem. Robert Wrase zur Datenaufnahme benutzt wurden. Dabei konnten Diffraktionsdaten bis zu einer Auflösungsgrenze von 3,2 Å erhalten werden (s. Abb. V.24). Auch andere Kristalle aus annähernd gleichen Kristallisationsbedingungen generierten Datensätze von ähnlicher Qualität.

Die Datenbilder sind mit den Programmen MOSFLM (v7.04) und SCALA (v3.3.15) aus der Programmsammlung CCP4 (v6.12) autoindiziert, integriert und skaliert worden [CCP4, 1994; Leslie, 1992].

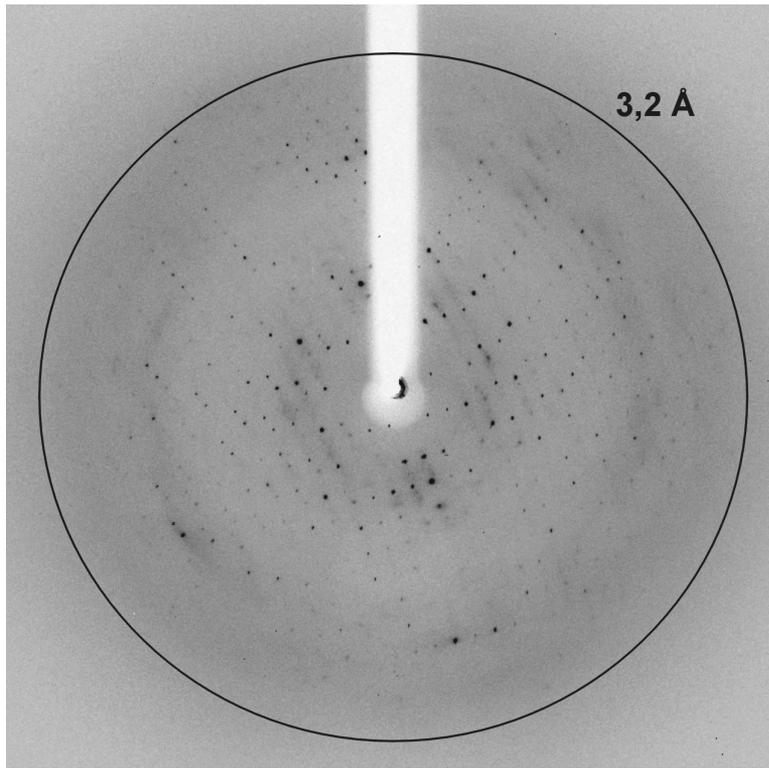


Abb. V.24 Diffraktionsmuster eines PiIn-Kristalles, aufgenommen am Berliner Elektronen-Speicherring. Der Kreis zeigt die 3,2 Å-Grenze an.

Übersicht der Röntgenbeugungsdaten zum PiIn-Kristall:

Kristalldaten und Datenstatistiken	Werte
Wellenlänge (Å)	0,91841
Raumgruppe	<i>P</i> 622
Einheitszellen-Parameter	
<i>a</i> = <i>b</i> (Å)	85,96
<i>c</i> (Å)	85,67
α = β (°)	90
γ (°)	120
Temperatur (K)	100
Niedrigste Auflösung (Å)	34,14
Höchste Auflösung (Å)	3,20 (3,37-3,20)
Gesamtzahl der beobachteten Reflexe	22827 (3346)
Gesamtzahl der einzigartigen Reflexe	3239 (460)
Multiplizität	7,0 (7,3)
Vollständigkeit (%)	97,1 (98,2)
$R_{\text{merge}}^{\dagger}$ (%)	6,3 (44,6)
Mittelwert $I/\sigma(I)$	13,9 (4,0)

Alle Angaben in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsstufe.

$R_{\text{merge}}^{\dagger} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I(hkl)_i - \{I(hkl)\}|}{\sum_{hkl} \sum_i I(hkl)_i}$, wobei $I(hkl)_i$ die Intensität der Reflexe hkl und $\{I(hkl)\}$ die Durchschnittsintensität aller Reflexionen wiedergeben.

5.5 Real-Time-PCR-Analyse

Um zu überprüfen, ob das entdeckte Fehlen des PilN-Proteins auf Proteom-Ebene in der *flaR*⁻-Mutante ebenso für das mRNA-Produkt von *pilN* gilt, wurde das Transkriptom der Mutante mit dem Wildtyp verglichen. Dazu ist die Gesamt-RNA beider Bakterien zum Zeitpunkt der stationären Wachstumsphase (genau wie beim Isolieren des Gesamtproteins) isoliert worden. Die dabei auch vorliegende gesamte mRNA des Organismus wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und speziellen Primern in cDNA umgeschrieben, wobei die mRNA beim komplementären Synthesevorgang verdaut wurde, die cDNA also ein genaues Mengenabbild der mRNA darstellt. Die cDNA wurde daraufhin als DNA-Matrize in der sich anschließenden PCR eingesetzt. Amplifiziert durch entsprechende Beigabe von Primern wurden nur die Gene *pilN* und *gyrA*. *GyrA* ist hierbei ein sog. Haushaltsgen, welches zu jedem Zeitpunkt der Wachstumsphase bei *Legionella* gleich stark vorliegen sollte und somit zur Abschätzung der Expressionsstärke von *pilN* herangezogen werden kann. Zugegen ist noch ein Fluoreszenzfarbstoff, der proportional mit der Menge des Amplifikates zunimmt und daher die Bestimmung des CT-Wertes („threshold cycle“), also des Zyklus, ab dem sich die emittierte Wellenlänge des Fluoreszenzfarbstoffes erstmalig signifikant vom Hintergrundrauschen abhebt, zulässt. Obwohl eine tatsächliche quantitative Analyse der mRNA zum Zeitpunkt der Entnahme möglich wäre, interessiert hier nur der Vergleich, also die relative Analyse zwischen Wildtyp- und *flaR*⁻-Menge an *pilN*-cDNA.

5.5.1 PilN-Genexpression vom Wildtyp *Legionella pneumophila* und der *flaR*⁻-Mutante

Um eine Kontamination mit genomischer DNA (gDNA) ausschließen zu können, ist von jedem RNA-Isolat, welches zum Umschreiben in cDNA genutzt wurde, eine PCR mit anschließender Geltrennung getätigt worden. Ist es dabei zur Amplifikatbildung gekommen, ist die Probe nachträglich mit DNase I behandelt und erneut überprüft worden, oder sie wurde direkt verworfen (Daten nicht gezeigt).

Wie bereits erwähnt, ist das Transkriptom beider Stämme gegen Ende der stationären Phase isoliert worden, weil anzunehmen ist, dass es vor allem während dieser transmissiven Phase zur Expression des *pilN*-Gens als Bestandteil des Pilus und somit eines Virulenzfaktors kommen würde. Zum Vergleich dazu ist die Gesamt-RNA von Legionellen auch in der exponentiellen Wachstumsphase isoliert worden. Überraschenderweise zeigte sich dabei kein signifikanter Unterschied in der Expressionsstärke des *pilN*-Gens, auch nicht im Verhältnis zum *gyrA*-Gen. Darüber hinaus konnten nicht jedes Mal die gleichen CT-Werte erreicht

werden – die Verhältnismäßigkeit zum *gyrA*-Gen zeigt sich aber immerzu identisch und fast gleich, d.h. die CT-Werte beider Gene liegen in jedem Lauf auf etwa gleichem Niveau und unterscheiden sich nicht mehr als in maximal einem Zyklus.

Folgende Ergebnisse sind zwischen Wildtyp und Mutante in der spätstationären Phase erzielt worden:

Stamm	CT-Werte der stationären Phase									
	<i>gyrA</i>					<i>pilN</i>				
Wildtyp	23,5	23,6	23,8	24,3	Ø 23,8	22,8	22,7	22,7	22,7	Ø 22,7
<i>flaR</i> ⁻ -Mutante	22,8	22,9	23,1	23,2	Ø 23,0	22,4	22,4	22,4	22,3	Ø 22,4

Dabei hat die abschließende Schmelzkurven-Analyse gezeigt, dass es bei der Amplifikatbildung kaum zu Nebenprodukten oder Kreuzreaktionen der Primer gekommen ist (s. Abb. V.25), die dann ebenfalls zu einer Wellenlängenemission beigetragen und den CT-Wert hätten verfälschen können.

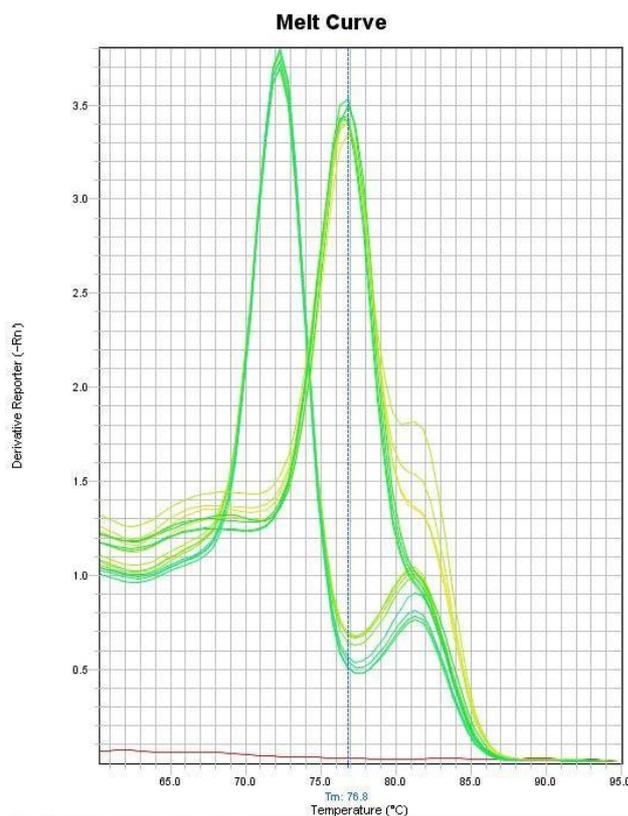


Abb. V.25 Schmelzkurven nach Abschluss der Amplifikation. Zu sehen ist die Reporterfarbstoff-Emission bei unterschiedlichen Temperaturen. Über einen Zeitraum von 30 min wird von 60 °C auf 95 °C hochgeregt und alle 0,5 °C die abnehmende Fluoreszenz gemessen. Präsentiert wird die Übersicht aber in derivatisierter Form, um ein anschauliches Diagramm zu erhalten. Die zwei Schmelzkurven geben den Zerfall der zwei gebildeten Amplifikate (*pilN* und *gyrA*) wieder. Somit ist es zu keinen anderen Nebenprodukten oder Dimerbildungen der Primer gekommen, die fälschlicherweise für einen Anstieg an Lichtemission gesorgt hätten. Die Schmelzkurven-Analyse dient also als Nachweis der Spezifität des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR[®] green.

Die Unterschiede zwischen Wildtyp und *flaR*⁻ in der *pilN*-Expression sind demnach zu marginal. Das hier gezeigte Ergebnis offenbarte sich aber nicht bei allen Versuchen, doch haben sich die einzelnen Versuche zu unbeständig gezeigt, als dass von einer tatsächlichen Verminderung der *pilN*-Expression in der *flaR*⁻-Mutante gesprochen werden könnte.

Hauptursache für die Schwankung der CT-Werte innerhalb der verschiedenen Versuche ist wohl die RNA-Isolierung.

In der exponentiellen Phase haben sich die CT-Werte folgendermaßen dargestellt:

Stamm	CT-Werte der exponentiellen Phase					
	gyrA			pilN		
Wildtyp	26,9	26,3	Ø 26,6	25,8	25,9	Ø 25,9
flaR ⁻ -Mutante	26,9	26,9	Ø 26,9	26,9	26,7	Ø 26,8

Dabei ist zu beachten, dass hier die cDNA um den Faktor 10 verdünnt wurde. Vorabtests mit gDNA und mehreren Verdünnungsreihen haben ergeben, dass sich der CT-Wert bei einer 10-fachen-Verdünnung um etwa 4-4,5 Zyklen erhöht. Damit nähern sich die CT-Werte der exponentiellen Phase von pilN denen der stationären an (s.o.).

5.6 Oberflächenmotilität, „Twitching motility“

Wegen des Fehlens von pilN, einem essentiellen Bestandteil des TypIV-Pilus von *Legionella pneumophila*, in der flaR⁻-Mutante soll mit diesem Versuch überprüft werden, ob die Mutante tatsächlich nicht piliert ist. „Twitching motility“ bezeichnet eine spezielle, durch TypIV-Pili vermittelte Form der bakteriellen Fortbewegung, die flagellenunabhängig fungiert (s. auch Kap. 2.3.2). Die Ausbreitung der Kolonie kann auf festen Agarplatten nachvollzogen und zwischen Wildtyp und Mutante verglichen werden. Der methodische Ablauf dieses Versuches findet sich in Kap. 4.1.2 wieder und folgt grundsätzlich den Angaben von Coil & Anne [2009].

5.6.1 Oberflächenmotilität von *Legionella pneumophila* Corby und dessen Mutante flaR⁻

Aufgebracht auf die Kohle-Agarplatten (Kap. 3.2.1) wurden 20 µl von ü/N-Kulturen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Nach ca. 92 Std. hat sich dann folgendes Bild (s. Abb. V.26) ergeben: der Wildtyp hat sich vom Inokulierungsring aus ca. 2,3 mm ausgebreitet, die flaR⁻-Mutante nur etwa 1,4 mm. Vergleiche mit den Versuchen der Arbeit von Coil & Anne [2009] offenbaren hier eine geringere Verbreitung des Wildtyps als in der Publikation beschrieben. Die Werte nähern sich eher dem Typ *Legionella pneumophila* Philadelphia an (2,5 mm) als dem Corby-Stamm (3,8 mm). Die Ausbreitung des Corby-

Stamms hier entspricht in etwa der in der Veröffentlichung beschriebenen Ausbreitung bei 27°C. Der Unterschied zwischen *flaR*⁻-Mutante und Wildtyp ist allerdings im vorliegenden Fall klar ausgeprägt.

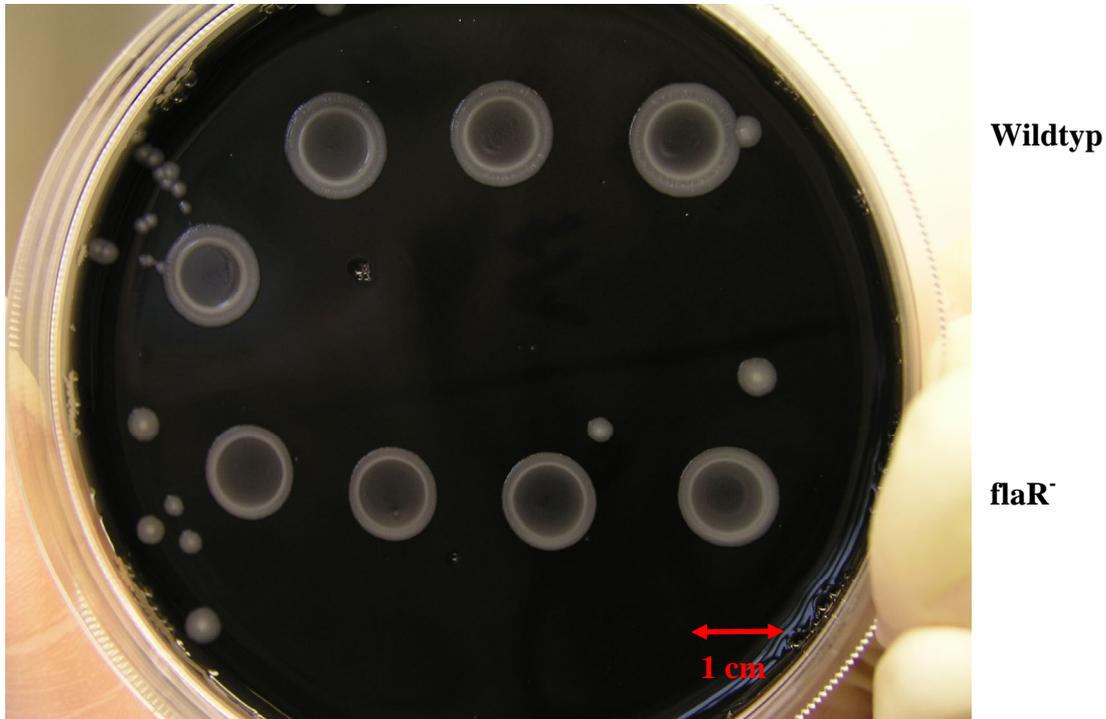


Abb. V.26 „Twitching motility“ von *L. pneumophila* auf einer Kohle-Agarplatte. Die oberen Kolonien sind die des Wildtyps, die unteren zeigen die flagellenunabhängige Verbreitung der *flaR*⁻-Mutante, die vermutlich pililos ist. Vom sog. Inokulierungsring aus sieht man die weiße Ausbreitung der Legionellen. Der Wildtyp hat sich nach 92 Std. bei 37°C um ca. 2,3 mm, die Mutante um 1,4 mm ausgebreitet.

Wenngleich es bei der *flaR*⁻-Mutante zwar zu einer geringen Ausbreitung kommt, so scheint sie doch nicht gänzlich ohne Pili ausgestattet zu sein. Entweder kommt hier nur ein Typ der zwei in *L. pneumophila* vorkommenden Pili vor oder einige noch nicht genau bestimmte Komponenten ersetzen den nicht funktionsfähigen Pilusstrang.

VI Diskussion

Legionella pneumophila ist der Hauptverursacher der Legionellen-Pneumonie, der sog. Legionärskrankheit. Mehr als 90% der aus Patienten isolierten Legionellaceae fallen auf diese Erregerart zurück. Warum gerade *pneumophila* im Vergleich zu den anderen 51 bisher entdeckten *Legionella*-Arten so virulent wirkt, ist nicht geklärt. Vermutet werden entweder noch nicht ausgemachte artspezifische Virulenzfaktoren oder eine effizientere Regulation der bereits bekannten Pathogenitätsfaktoren. An dieser Stelle setzt die vorliegende Arbeit an. Der Wildtyp *Legionella pneumophila* Corby und zwei Regulationsmutanten (*flaR*⁻, *fliA*⁻, s. Kap. 2.2.2), deren Verknüpfung mit der Regulation von Virulenzfaktoren bekannt, aber nicht gänzlich aufgeklärt ist, wurden auf Proteom-Ebene miteinander verglichen. Dazu wurde die altbekannte zweidimensionale Gelelektrophorese und eine relativ neuartige zweidimensionale Hochdruckflüssigkeitschromatographie (PF-2D) [Lubman et al., 2002] zur Auftrennung des cytosolischen Gesamtproteins eingesetzt. Aufgedeckte Expressionsunterschiede könnten dabei zum Verständnis der erhöhten Virulenz beitragen, die Regulation besser verständlich machen oder neue potentielle Virulenzfaktoren aufdecken.

Die so detektierten Unterschiede (s. Tab. V.1 und V.2) sollten ebenfalls bewertet und weiter molekularbiologisch analysiert werden. RT-PCR, mikrobiologische Tests und Protein-Kristallisation sind somit hier ebenfalls zum Einsatz gekommen. Die verschiedenen Techniken sollten dabei einerseits die Ergebnisse der Protein-Untersuchung unterstützen und andererseits versuchen, das in dieser Arbeit identifizierte, im TypIV-Pilus-Aufbau involvierte Protein PilN strukturell aufzuklären.

6.1 Beurteilung und Vergleich der beiden zweidimensionalen Protein-Auftrennungsmethoden zur Identifizierung neuer putativer Virulenzfaktoren von *Legionella pneumophila* Corby

Zunächst richtet sich das Augenmerk auf die Handhabung und den Zeitaufwand beider Techniken. Der Ablauf bis hin zum Vorliegen des Gesamtproteins ist bei der Gelelektrophorese und bei der Flüssigchromatographie gleich. Die isoelektrische Fokussierung der zweidimensionalen Elektrophorese ist im Vergleich zur Chromatographie wesentlich zeitaufwendiger. Das liegt unter anderem an der hier verwendeten Flachbettmultiphorese, die mit dem externen zur Verfügung stehenden Spannungsgeber nur

Spannungsspitzen von 6000 V zulässt. Neuere Fokussierungsanlagen mit integriertem Spannungsgeber können durch höhere Spannung die Fokussierungszeit verkürzen und außerdem nahtlos von der Diffusions- zur Fokussierungsphase in einem Schritt übergehen. Aber selbst hierbei nimmt die eigtl. Fokussierung noch mindestens 12 Stunden in Anspruch. Hingegen ist die erste Dimension der PF-2D innerhalb von 5 Stunden komplett abgeschlossen.

Die Auflösungs- bzw. die Fokussiergrenze ist bei der PF-2D und der Gelelektrophorese gleichermaßen hoch, wenngleich die pH-Grenze im basischen Bereich bei der Chromatographie bei maximal pH 9,0 liegt, die isoelektrische Fokussierung der Gelelektrophorese technisch bis pH 10,0 einsetzbar ist. Einige Versuche zeigen aber, dass mit entsprechenden Puffern bei der PF-2D durchaus in noch höhere basische Bereiche bis hin zu Werten von 11,3 vorgestoßen werden kann [Shin et al., 2006]. Das ist beim Fokussieren der zweidimensionalen Gelelektrophorese auch möglich [Görg et al., 2009], aber basische Proteine sind meist schwerer in die Streifen zu bringen oder schlecht aufzutrennen [Pennington et al., 2004]. Allerdings ist mit der flüssigbasierten Säulenchromatographie keine Auftrennung von stark sauren Proteinen möglich, wenngleich sie aber als Durchfluss gesammelt werden können. Das gilt auch für die basischen Proteine außerhalb der pH-Grenze. Dennoch konnten die Proteine hier nicht in der zweiten Dimension aufgetrennt werden, weil dies stets zur nahezu irreparablen Verstopfung der Reversphasensäule geführt hat. Ursächlich dafür könnten möglicherweise membranäre Bestandteile, stark hydrophobe Proteine oder auch aggregierte Proteine sein.

Der Aspekt des Zeitaufwands in der zweiten Dimension spricht hingegen für die Gelelektrophorese. Auch wenn die Auftrennung, der Gellauf, etwa genauso lange braucht wie die Auftrennung der meisten Fraktionen in der PF-2D, lassen sich in der Laufkammer bis zu sechs Gele parallel bearbeiten. Genauso spricht die Handhabung der einzelnen Expressionsunterschiede für die Elektrophorese. Denn selbst wenn man auf den analytischen Vorablauf in der PF-2D zur Eingrenzung der Unterschiede verzichtet, lässt sich zwar der gesamte Ablauf inklusive Fraktionssammlung automatisieren, aber dennoch gilt es, mehrere Dutzend verschiedene gesammelte Fraktionen pro Auftrennung zu handhaben. Die Handhabung bei der Gelelektrophorese ist dagegen auf ein Gel pro Organismus reduziert.

Die Vorbereitung der einzelnen Proteine für die MALDI-TOF-Massenspektrometrie-Analyse ist insgesamt gleich zu bewerten, der Zeitaufwand ähnlich. Ein direktes Anschließen der PF-2D an das im Labor später zur Verfügung gestandene Nano-HPLC-ESI-Massenspektrometer hätte diesen Ablauf sicherlich vereinfacht und beschleunigt.

Die Auswertung der Massenspektren, also die Überprüfung der identifizierten Proteine, lässt sich mit der Gelelektrophorese einfacher gestalten als bei der PF-2D. Der IEP der Proteine steht bei beiden Techniken zur Verfügung, aber das Molekulargewicht, welches ebenfalls zur Verifizierung der identifizierten Proteine herangezogen werden sollte, kann bei der Elektrophorese genutzt werden. Bei der Hochdruckchromatographie muss wegen des Trennprinzips der Hydrophobizität noch eine eindimensionale SDS-PAGE zur Klärung des Molekulargewichts gefahren werden, da die Hydrophobizität nicht mit der Größe des Proteins korreliert. Doch auch nach der Gelauf trennung kann es vorkommen, dass (wie im Kap. 5.2.1 beschrieben) das geringkonzentrierte Protein wegen der geringen Nachweisgrenze des Coomassie Blue nicht detektiert werden kann (s. Abb. V.11). Hier müsste dann auf andere Färbemittel, wie z.B. Silbernitrat, ausgewichen werden, welches allerdings die Desorption/Ionisation bei der MALDI-TOF-Massenspektrometrie erschweren kann [Lopez et al., 2000].

Die Sensitivität soll auch als ein weiteres Kriterium beider Trennmethoden dienen. Und sie spricht in beiden Dimensionen für die PF-2D. In der ersten Dimension lassen sich einfach pH-Schritte von 0,3 einstellen, die Fraktionen werden entsprechend gesammelt. Und die zweite Dimension zeigt bei 214 nm kleinste Proteinkonzentrationen im tiefen ng-Bereich an. Der Sensitivitätsvorteil der PF-2D gilt aber nur im vorliegenden Fall, mit Coomassie Blue als Färbemittel für die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine. Die Detektionsgrenze von Coomassie Blue liegt laut Berggren et al. [2000] bei 8-16 ng Protein. Allerdings ist Coomassie Blue immer noch ein sehr einfach zu handhabendes, ungiftiges und preisgünstiges Färbemittel, was es trotz seiner geringeren Sensitivität zu einem in allen Laboren eingesetzten Kolorierungsmittel für Proteinnachweis macht. Zusätzlich erweist es sich als gut kompatibel zur massenspektrometrischen Analyse am MALDI-TOF-Massenspektrometer.

Vor zehn Jahren erstmalig aufgekommen ist das DIGE („Difference Gel Electrophoresis“)-Verfahren, welches mit Fluoreszenzfarbstoffen arbeitet [Bergh, 2009; Timms & Cramer, 2008], die mit der primären Aminogruppe und Lysinen der Proteine reagieren. Diese Fluoreszenzfarbstoffe weisen ein relativ niedriges Detektionslimit von etwa 1 ng Protein auf, welches selbst Silber oder die SyproRuby-Färbung übertrifft. Mit diesem Verfahren lassen sich bis zu drei verschiedene Gesamtproteine auf einem Gel verarbeiten, wenn sie nacheinander von einem entsprechenden Scanner aufgenommen werden. Zudem kann eine weitere Unzulänglichkeit der Gelelektrophorese ausgemerzt werden: die Gel-Variabilität. Denn selbst bei parallel gelaufenen Gelen verhalten sich die Proteintrennungen

nie zu 100% deckungsgleich, wodurch es immer schwierig ist, die Proteine untereinander komplett zuzuordnen.

Wegen dieser Gel-Variabilität leidet auch die Reproduzierbarkeit der Gelelektrophorese, ein weiteres Kriterium in dieser Übersicht. Allerdings zeigt sich auch der Fokussierungsschritt innerhalb der Elektrophorese nicht unanfällig. Oftmals konnte während der Diffusionsphase nur wenig Protein in die immobilisierten Acrylamidgelstreifen gebracht werden, so dass wenig bis gar kein Protein auf den anschließenden Gelen zu beobachten war.

Anders präsentiert sich die erste Dimension der Säulenchromatographie; das Elutionsprofil zeigte sich stets gut reproduzierbar und konstant (s. Abb. V.8), Abweichungen bezüglich der nach pH gesammelten Fraktionen waren gering und lagen innerhalb der zu erwartenden Spanne. Die zweite Dimension hingegen war ebenfalls schlecht reproduzierbar. Mehrfach hat die Auftrennung in der reversen Phase stark abgenommen (s. auch Abb. V.14), einzelne Proteine/Peaks sind zu einem großen Peak zusammengewachsen. Proteinfractionen der ersten Dimension sollten außerdem so schnell wie möglich in der zweiten weiterbearbeitet werden, weil auch hier die Reproduzierbarkeit selbst bei -70°C eingefrorenen Proben stark nachließ. Die fokussierten Acrylamidstreifen der Gelelektrophorese hingegen konnten gut weggefroren und später genutzt werden, wenngleich auch hier die sofortige Weiterbearbeitung vorzuziehen ist.

Zuletzt soll ein Blick auf den Kostenfaktor geworfen werden. Neben den Anschaffungskosten der Pumpeneinheiten der PF-2D tragen vor allem die Ionenaustauschersäule und die Reversphasensäule, denen beiden vom Hersteller nur eine Laufgarantie von fünf Auftrennungsläufen bescheinigt wird, zum Anstieg der Wartungskosten bei. Mit verbesserten Reinigungsmethoden [Barre & Solioz, 2006] konnte zumindest die Laufzeit der Fokussierungssäule erhöht werden. Insgesamt zeigt sich aber auch unter Berücksichtigung anderer Verbrauchsmaterialien die zweidimensionale Gelelektrophorese deutlich kostengünstiger als die zweidimensionale Proteinfractionierung an der Chromatographieanlage.

Als Fazit bleibt, dass sich zur Virulenzfaktorsuche oder einfach zur Proteomdifferenz-Aufklärung zwischen Wildtyp und Mutante oder behandelten und unbehandelten Zellen die zweidimensionale Gelelektrophorese besser eignet. Vor allem dann, wenn man auf die neuartigen Fluoreszenzfarbstoffe der DIGE ausweicht und man so vor allem die geringe Sensitivität bei Coomassie Blue als auch die Vergleichbarkeit mehrerer Proteome nochmals erhöhen kann. Allerdings wird die Proteinidentifizierung, also das Ausschneiden der jeweiligen Proteinspots, nicht unkompliziert zu gestalten sein. Neben der Anfertigung und

Färbung der Proteine wird die bioinformatische Auswertung der Gele auch immer komplexer, sensitiver und ausgereifter, aber besonders bei Hochdurchsatz nahezu unverzichtbar [für eine Übersicht s. Berth et al., 2007]. Insgesamt aber zeigt sich die Gelelektrophorese nach Jahrzehnten der Anwendung deutlich ausgereifter, anwendungsfreundlicher und dank verschiedenster Protokolle auch meist in der Problemlösung einfacher zu handhaben als die neuartige PF-2D. Anzumerken bleibt noch, dass Beckman Coulter den Vertrieb und damit auch die Weiterentwicklung der PF-2D Anfang 2009 eingestellt hat.

Grundsätzlich sollten alle per vergleichender Proteom-Analyse detektierten Unterschiede auch immer mittels anderer Techniken auf weitere Hinweise der Expressionsdifferenz hin untersucht und verifiziert werden, so z.B. über die RT-PCR.

6.2 Analyse der identifizierten und putativen Virulenzfaktoren

6.2.1 Bewertung der Identifizierung durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Insgesamt konnten 14 Proteine (s. Tab. V.1 und 2) identifiziert werden, obwohl mehrere Unterschiede aufgedeckt und auch Proteine isoliert wurden. Dass diese Proteine nicht identifiziert, bzw. keine Massen am Detektor des Massenspektrometers registriert wurden, kann mehrere Ursachen haben. Es kann an einer zu geringen Proteinkonzentration gelegen haben, so dass die vom Trypsin zerlegten Peptide im Hintergrundrauschen der Matrix und anderer Bestandteile untergegangen sind. Die Protease Trypsin selber kann auch gerade bei der in-Gel-Verdauung in Verbindung mit schwach konzentriertem Protein zu wenig Peptide generiert haben, wenn bspw. nach den Aminosäureresten Arginin und Lysin saure Aminosäuren folgen [Thiede et al., 2000]. Möglicherweise konnte das Protein auch unvollständig verdaut werden, weil Trypsin schlecht in die Gelstücke diffundiert ist oder die wenigen Peptide nicht genug aus den Gelstücken in die Lösung extrahiert worden sind. Bei stark Coomassie Blue-gefärbten Proteinen kann es trotz der Waschvorgänge noch vorkommen, dass übriggebliebener Farbstoff die Ionisation beim Laserbeschuss gehemmt und somit den Übergang des Peptides in die Flugröhre verhindert oder gestört hat [Lauber et al., 2001].

Es kann auch vorkommen, dass trotz vieler detektierter Massen diese in der Summe keinem Protein zugeordnet werden können – möglicherweise weil hier mehrere Proteine in einem Spot oder einer Fraktion zusammen vorliegen und nicht mehr auseinandergehalten werden können. Ein weiterer Grund wäre auch, dass posttranslationale Modifikationen, wie

Glykosylierung oder Phosphorylierung, das Molekulargewicht der Peptidfragmente erhöhen und dann fälschlicherweise, wenn diese Modifikationen in der Annotierung nicht berücksichtigt sind, diese Massen einer anderen Aminosäuresequenz zugeordnet werden.

Wenn Modifikationen, wie z.B. die Methionin-Oxidation, dann auch als solche erkannt werden, erhöhen sie die Wahrscheinlichkeit der Aminosäuresequenz-Zuordnung der detektierten Massen.

Um die Validität zugeordneter Peptide im identifizierten Protein weiter zu verstärken, kann man das C-terminale Ende überprüfen. Krause et al. [1999] haben festgestellt, dass die basische Aminosäure Arginin meist eine bessere Ionisation in der Gas-Phase verspricht und somit in den größten Peaks gegenüber der Aminosäure Lysin beim Trypsin-Verdau dominiert. So findet man beim größten annotierten Peak (also kein Marker oder Verschmutzung) vom CsrA, TpR, EtfB oder HtpB ein endständiges Arginin (s. Abb. VI.1). Das trifft aber nicht in jedem Fall zu, oft (z.B. im Fall des identifizierten Trigger Factors) sind die endständigen Aminosäurereste Arginin und Lysin in den Peaks gleich verteilt.

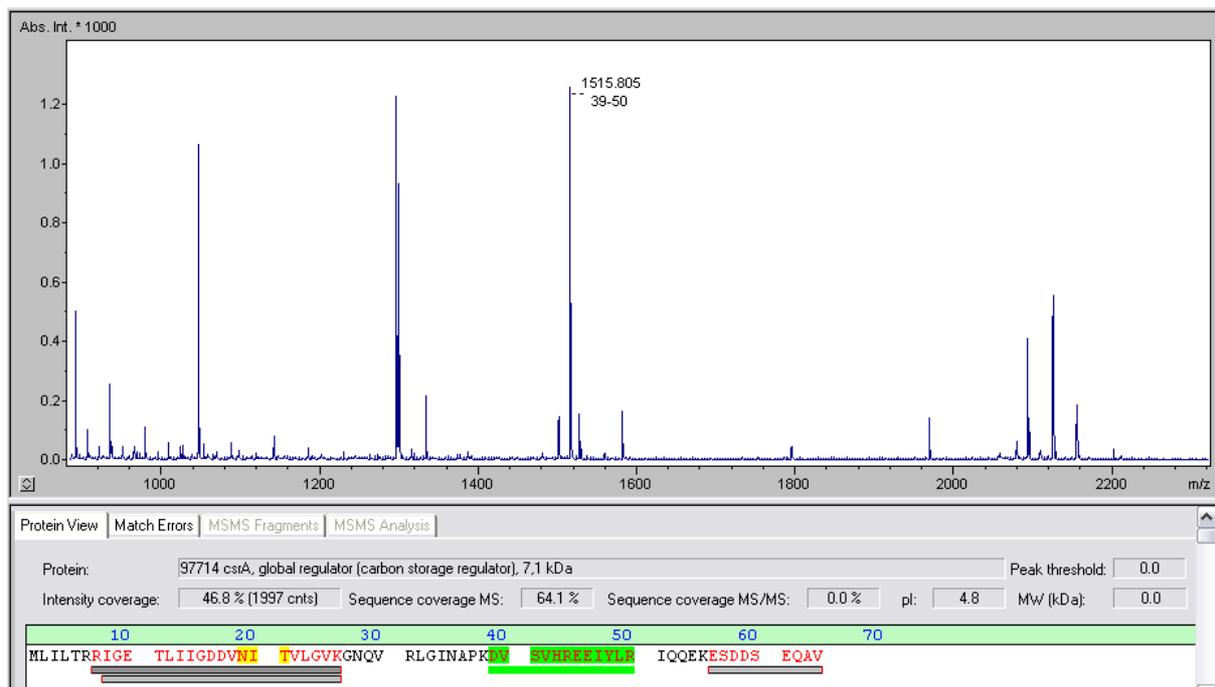


Abb. VI.1 Massenspektrum mit annotierter Peptidzugehörigkeit vom identifizierten CsrA-Protein. Der höchste und mit der Masse 1515,805 Da belegte Peak zeigt am C-terminalen Ende einen Argininrest (grün hervorgehoben). Wie oben schon angeführt, kann das als zusätzliche Verifizierung der zugeordneten Peptidmasse im Protein CsrA angesehen werden. Die beiden links vom beschriebenen Peak zu sehenden großen Peaks sind Marker Massen und somit nicht in der Proteinsequenz zu finden.

Auffallend in der Tabelle V.2 ist die Diskrepanz des theoretischen IEP zum experimentellen IEP einiger Proteine, wie PilN, YhbH oder RpsN. Es wird in einigen

Publikationen zwar über die Abweichung von theoretischen und ermittelten Werten auch beim Molekulargewicht berichtet [Rodriguez-Pineiro et al., 2005; Wilkins & Williams, 1997]. Aber Einheiten von 3-4 IEP erscheinen zu groß. Es kann nicht abschließend geklärt werden, womit dieser Unterschied zu begründen ist. Denn die Sequenzabdeckung liegt bei den Proteinen über oder nahe 30%. Und auch das Molekulargewicht zeigt sich in allen Fällen mit dem Trennbild im SDS-Gel übereinstimmend. Interessant ist auch hier, dass es nur bei der Identifizierung von Proteinen aus der PF-2D und den davon abgeleiteten pH-Werten zu solch einer Differenz gekommen ist. Möglich sind noch posttranslationale Modifikationen oder ein Anbinden von Membranbestandteilen an hydrophobe Aminosäurereste, wie z.B. den vermuteten Membrananker von PilN, die den IEP verändern können.

6.2.2 Analyse der identifizierten Proteine

Von den neun Proteinen, die mittels der Gelelektrophorese identifiziert wurden (s. Tab. V.1), findet sich nur FliC bei den beiden Mutanten *fliA*⁻ und *flaR*⁻ wieder; ansonsten kommt es zu keiner weiteren Schnittmenge. FliC ist ein 47,8 kDa großer C-terminaler Bestandteil des Flagellin von *Legionella pneumophila* Corby. FliA reguliert die Transkriptionskontrolle von Flagellen-Synthese-Genen bzw. insgesamt den Genen der bakteriellen Motilität [Kazmierczak et al., 2005], und auch FlaR zeigt zumindest Binde-Affinität zum *flaA*-Promotor [Heuner et al., 2000]. Dass FliC dann in den Mutanten weniger stark erscheint als im Wildtyp, bestätigt also die Regulation der Flagellen-Synthese. Allerdings ist es verwunderlich, dass FlaA, als Hauptkomponente der Flagelle, nicht als Differenz detektiert wurde. Zieht man die Publikation von Lebeau et al. [2005] heran, so erscheint der FlaA-Spot dort extrem klein und kaum sichtbar. Selbst bei hier bei 30°C gewachsenen Legionellen, wo es im Vergleich zu bei 37°C gewachsenen vermehrt zur Flagellenbildung kommen sollte [Heuner et al., 1999], tritt das FlaA Protein so dezent in Erscheinung, dass es kaum zu erkennen und ein möglicher Unterschied zwischen Wildtyp und Mutanten nicht auszumachen ist.

Das in der *flaR*⁻-Mutante als herunterreguliert gefundene TpR-Protein zeigt eine in allen Organismen hoch konservierte Superhelikalstruktur, den „tetratricopeptide repeat“. In Bakterien findet man diese Struktur oft in Aspartyl-Phosphat-Phosphatasen wieder [D'Andrea & Regan, 2003; Andrade et al., 2001]. Die genaue Funktion des TpR hier im vorliegenden Fall kann nicht geklärt werden, lediglich eine „Bindefunktion“ wird dem Protein zugeschrieben, was aber bei der superhelikalen Struktur nicht verwundert.

EtfB ist die β -Untereinheit eines Elektronen-Transferproteins [Chen & Swenson, 1994], welches für den Elektronentransport von Dehydrogenasen verantwortlich ist.

Das ribosomale Protein L9 RplI [Adamski et al., 1996] interagiert mit der 23S-rRNA und ist somit Bestandteil der Ribosomen und des Translationsapparates.

Alle bisher aufgeführten Proteine, die in der *flaR*⁻-Mutante im Vergleich zum Wildtyp weniger stark in Erscheinung getreten sind, zeigen keinen klaren Bezug zum Transkriptions-Regulatorprotein FlaR. Vielmehr sind zumindest einige der Proteine in den Syntheseablauf, den Anabolismus involviert. Möglicherweise liegen die Ursachen für die Runterregulierung im experimentellen Ablauf.

Com1 („*Coxiella* outer membrane protein“) ist sensitiv gegenüber Proteinase K und lässt sich an der Oberfläche der Zellen mit ¹²⁵I anfärben. Das und die Immunreaktivität hat Hendrix et al. [1993] dazu bewogen, Com1 als Außenmembranprotein zu beschreiben. Sequenzhomologien zeigen sich zwischen Com1 und Disulfidoxidoreduktasen. Allerdings bleibt die Rolle eines solchen Proteins in der Pathogenese noch unverstanden. Da *Coxiellaceae* ebenfalls wie Legionellen in Phagolysosomen replizieren, könnte Com1 das Redoxpotenzial durch Disulfidbrückenbindung, -spaltung o.ä. verändern. Warum das Protein hier aber im Vergleich zum Wildtyp herunterreguliert erscheint und welche direkte Verbindung dabei zum *flaR*⁻-Protein besteht, bleibt unverstanden.

Die beiden identifizierten Proteine IcmX und GspA, die den intrazellulär gewachsenen Legionellen im Vergleich zu den im Nährmedium gewachsenen zu fehlen scheinen, sind möglicherweise falschen Proteinspots im Coomassie Blue gefärbten Gel zugeordnet worden. Wie bereits erwähnt (s. Kap. 5.1.1), ist die Zuordnung der radioaktiv markierten Proteine zu den Proteinen, die mit Coomassie Blue gefärbt sind, wegen der unterschiedlichen Sensitivität und Gelbild-Auswertung äußerst schwierig.

Von beiden Proteinen ist beschrieben, dass sie in intrazellulär replizierenden Legionellen zu finden sind. GspA ist demnach ein Makrophagen-induziertes Protein, welches vor allem als Stressantwort zu verstehen ist. Allerdings ist es kein essentieller Bestandteil der intrazellulären Multiplikation, gibt es doch keinen Unterschied zwischen *gspA*-Mutanten und Wildtyp in Hinblick auf Zytopathogenität oder Replikation [Abu Kwaik et al., 1997].

IcmX, das im Periplasma zu finden ist, ist laut Matthews & Roy [2000] ein essentieller Bestandteil für die intrazelluläre Replikation; genauer gesagt, spielt IcmX eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion zur Wirtszelle, die die Phagosomen-Biogenese remoduliert. Möglicherweise spielt dieses Gen aber nur eine Rolle während der Replikationsphase, wird aber in der transmissiven Phase wie hier, kurz vor Austritt aus der Wirtszelle, nicht exprimiert.

Mit der PF-2D konnten zwei Proteine, die im Wildtyp im Vergleich zu der *flaR*⁻-Mutante erhöht erschienen, identifiziert werden: PilN und der sog. Trigger Factor (s. Tab. V.2).

PilN ist – zumindest als Homolog in *P. aeruginosa* – ein essentieller Bestandteil des TypIV-Pilus [Martin et al., 1995] und ist im *Legionella*-Genom in einem Fünf-Gen-Cluster (*pilM-pilQ*) untergebracht (s. auch Kap. 2.3.1). In der Hochdruckchromatographie ist es als einziges Protein der *flaR*⁻-Mutante detektiert worden, welches offenbar im Vergleich zum Wildtyp gänzlich fehlt. Die Funktion des Proteins bleibt aber noch unaufgeklärt, lediglich Strukturvorhersagen kommen zur der Annahme, dass das Protein eine Transmembranregion (s. auch Kap. 5.3.1) oder einen Membrananker trägt, wie im Falle des PilN aus *P. aeruginosa* vermutet wird. Womöglich steuert FlaR direkt oder indirekt Teile der Pilus-Biosynthese und somit auch dieses Fünf-Gen-Cluster mit. Weitere Untersuchungen von PilN durch Größenausschlusschromatographie und DLS-Messungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass es in dimerer Quartärstruktur vorliegt (s. Kap. 5.3.2).

Der Trigger Factor, welcher in der Fraktion mit den IEP 4,7-5,0 entdeckt wurde, gehört zur sog. FKBP (FK506-Bindeprotein)-Familie [Ludlam et al., 2004; Stoller et al., 1995] und besitzt Peptidyl-Prolyl-*cis-trans* Isomerase (PPIase) Aktivität. In *Legionella* ist der bekannteste Vertreter der FKBP-Familie das Protein Mip [Riboldi-Tunnicliffe et al., 2001], ein Pathogenitätsfaktor, welcher für die maximale Virulenz des Bakteriums vonnöten ist (s. Kap. 2.2.1). Die Autoren um Ludlam und Rahfeld beschreiben den Trigger Factor allerdings nicht als Virulenzfaktor, sondern als ein Chaperon, welches in allen Eubakterien vertreten ist. Dort bindet es an die 50S-ribosomale Untereinheit und interagiert dabei als erstes Protein mit der sich im Aufbau befindenden Polypeptidkette. Ob der Trigger Factor hier ebenfalls nur als Chaperon tätig ist oder ähnlich wie Mip auch als PPIase für die bakterielle Verbreitung mit verantwortlich zeichnet [Wagner et al., 2007] und als solcher Virulenzfaktor von FlaR mitreguliert wird, sollte genauer untersucht werden. Eine ähnliche „Doppelrolle“ ist ja auch z. B. von HtpB bekannt.

Die Proteine, die in der *flaR*⁻-Mutante im Vergleich zum Wildtyp erhöht erscheinen (s. Tab. V.2), können womöglich als Antwort auf den fehlenden LTT-Regulator bzw. dessen ausgebliebene Folgeprodukte zu verstehen sein.

Durch das Fehlen von PilN und möglicherweise weiteren Proteinen aus dem Gen-Cluster wäre die *flaR*⁻-Mutante entweder pililos oder zumindest in den Pili-Funktionen nicht funktionstüchtig. Nicht piliierte Pathogene zeigen reduzierte Virulenz, obwohl alternative Infektionsmechanismen bestehen bleiben [Hazlett et al., 1991]. Wie bereits in Kap. 2.3 beschrieben, sind TypIV-Pili unter anderem auch an dem Adhärenz-Vorgang der Legionellen

– durch Binden an eine Vielzahl von Rezeptoren auf den Oberflächen von Epithel- und Makrophagenzellen – beteiligt [Strom & Lory, 1993]. Dass HtpB erhöht erscheint, kann also als Kompensation der verloren gegangenen Adhärenz-Unterstützung durch die fehlenden Pili gewertet werden. Das knapp 60 kDa große HtpB (Synonym Hsp60, GroEL) ist eigentlich als intrazelluläres Chaperon bekannt (s. auch Kap. 2.2.1). *L. pneumophila* scheint das Protein aber auch aktiv an die Oberfläche zu transportieren, wo es von spezifischen Rezeptoren der Wirtszelle erkannt wird und dort die Adhärenz und die Invasion mit vermittelt [Garduno et al., 1998]. Dass HtpB bei der Zell-Adhärenz mitwirkt, ist auch für andere pathogene Eubakterien, wie Clostridien und Salmonellen, beschrieben [Hennequin et al., 2001; Ensgraber & Loos, 1992]. Unterstützend dabei sind auch die Ergebnisse von Retzlaff und Kollegen, die aufzeigen, dass HtpB beim Makrophagen eine Immunantwort (Expression von Interleukin-1 β) auslöst [Retzlaff et al., 1996].

Welche Aufgabe das σ^{54} -Modulationsprotein YhbH in *Legionella pneumophila* übernimmt, kann nicht präzise beantwortet werden. σ^{54} -Faktoren regulieren eine große Bandbreite von Genen, können also nicht wie z.B. bei der Klasse der σ^{28} -Faktoren einer bestimmten regulativen Rolle zugeordnet werden. Allerdings ist bei *Pseudomonas aeruginosa*, mit dem *Legionella* bspw. die größte Sequenzübereinstimmung bei PilN zeigt, die σ^{54} -Klasse in die Steuerung von Pathogenitätsfaktoren wie Flagellen und auch Pili involviert [Kazmierczak et al., 2005]. Möglicherweise ist auch hier wieder das fehlende FlaR mit seiner postulierten Verwicklung in die TypIV-Pili-Regulation Grund für das erhöhte Vorhandensein des σ^{54} -Modulationsproteins; nämlich ähnlich wie im Falle des HtpB, um das Fehlen der Pili oder zumindest daran beteiligter Proteine durch vermehrte Expression anderer Virulenzfaktoren, die in Adhärenz involviert sind, zu kompensieren.

Ebenfalls als Virulenzfaktor eingestuft wird YhbH von Carlson et al. [2007]. Allerdings beschreiben die Autoren hier die Funktion von YhbH, wie sie aus *E. coli* bekannt ist: als Ribosomen-Bindeprotein während der Dimerisierung von zwei 70S-Ribosomen, die somit besser gegen Degradation geschützt sind [Ueta et al., 2005]. Durch diese Stabilisierung könnte eine länger anhaltende Translation auch anderer Virulenzfaktoren gewährleistet werden.

Es könnten aber auch lediglich Hinweise auf eine experimentell bedingte Nahrungsknappheit sein, da sich die Bakterien allesamt in der spätstationären Phase befanden. Dafür spricht auch das in der *flaR*⁻-Mutante hochregulierte ribosomale Protein RpsN, ähnlich dem Protein RplI, welches in der Gelelektrophorese beim Wildtyp identifiziert wurde (s. Tab. V.1). Das

Überleben der Mikroorganismen könnte durch verlängerte Ribosomenerhaltung begünstigt werden.

Neben dem YhbH ist in der gleichen Fraktion auch noch CsrA identifiziert worden (s. Kap. 5.2.1). Es kann aber nicht abschließend geklärt werden, ob nicht auch CsrA als das erhöht erscheinende Protein in der Fraktion erachtet werden muss, bzw. welches der beiden Proteine im Vergleich zum Wildtyp tatsächlich hochreguliert ist. Es spricht aber mehr für YhbH als für CsrA, da letzteres – wie in Kap. 2.2.1 geschildert – *L. pneumophila* in der replikativen, avirulenten Phase hält. Dass CsrA in der spätstationären Phase dann hier dennoch identifiziert wurde, ist nicht ungewöhnlich, da es von zwei nichtkodierenden RNA-Molekülen auf Proteinebene und nicht auf Transkriptom-Ebene inhibiert wird [Sahr et al., 2009].

6.2.3 Fokus der weiteren Bearbeitung auf das PilN-Protein

PilN ist das einzige Protein, welches in einer der *L. pneumophila*-Mutanten (im vorliegenden Fall: *flaR*⁻-Mutante, s. Tab. V.2) im Vergleich zum Wildtyp gänzlich gefehlt hat. Auch wenn es nicht mit beiden Protein-Auftrennungsmethoden detektiert werden konnte, so zeigten sich alle anderen identifizierten Proteine nur in unterschiedlicher, wenngleich signifikanter Expressionsstärke. Aber auch in der Arbeit von Lebeau und Kollegen [2005] ist PilN in der zweidimensionalen gelelektrophoretischen Proteom-Analyse bei insgesamt 150 identifizierten Proteinen nicht aufgedeckt worden.

Da PilN Bestandteil des TypIV-Pilus von *Legionella pneumophila* Corby ist und der TypIV-Pilus nach dem Koch-Postulat und diversen Literaturangaben durchaus als Virulenzfaktor angesehen werden kann (s. auch Kap. 2.3 und 2.3.1), bietet sich hier gerade für die röntgenkristallographische Strukturaufklärung ein sehr interessantes Ziel. Das gilt verstärkt auch für eine eventuell darauf aufbauende, entsprechende Synthese eines niedermolekularen Inhibitors, da PilN – zumindest bei *Pseudomonas aeruginosa* – einen essentiellen Bestandteil des Pilus darstellt und insofern ein potentielles Therapeutikum-Ziel, mindestens jedoch für *in-vitro*-Versuche, darstellt. Ferner könnte die Strukturaufklärung einen Hinweis auf die noch unbekannte Funktion von PilN und dessen Zusammenspiel und Aufgabe im Pilusaufbau liefern.

Dass die *flaR*⁻-Mutante womöglich tatsächlich pililos ist oder zumindest in der Pilierung eingeschränkt erscheint, zeigen auch die Ergebnisse der „twitching motility“-Tests (Kap. 5.6.1). So hat sich die Mutante nach 92 Std. auf dem Kohleagar nur um ca. 1,4 mm, der Wildtyp hingegen um 2,3 mm ausgebreitet. Dass sich die *flaR*⁻-Mutante allerdings bei 37°C trotzdem noch ausbreitet und nicht wie eine *pilE*-Mutante bei dieser Temperatur ihre

„twitching motility“-Fähigkeiten verliert [Coil & Anne, 2009], kann darauf hindeuten, dass es hier eventuell zu einer Expression eines unbekanntes Gens gekommen ist, welches den möglichen Wegfall teilweise kompensiert. Ähnliches wird von pillosen Mutanten in der Biofilm-Anheftung berichtet. Durch den Wegfall bestimmter Pilusbestandteile kommt es zu einer Überexpression unbekannter Faktoren, wodurch auch hier der Ausfall wieder aufgehoben wird [Lucas et al., 2006]. Möglich ist aber auch, dass lediglich eine der beiden an der Oberfläche von *L. pneumophila* zu findenden Pili [Stone & Abu Kwaik, 1998] vom Ausfall oder einer Beeinträchtigung betroffen ist; wahrscheinlich sind das eher die kurzen Pili (0,1-0,6 μm), da beim Fehlen der langen die Ausbreitung durch „twitching motility“ zumindest bei 37 °C nach Coil & Anne [2009] gänzlich unterbleibt.

Alle diese Aspekte (Fehlen in der *flaR*⁻-Mutante, Synthese-Beteiligung am Virulenzfaktor TypIV-Pilus mit unbekannter Funktion und Struktur, sowie die verringerte Ausbreitung der *flaR*⁻-Mutante beim „twitching motility“-Test) haben PilN zum interessantesten und vielversprechendsten Kandidaten für die Weiterbearbeitung gemacht.

6.2.4 FlaR als Regulatorprotein und die mögliche Verbindung zum TypIV-Pilus Aufbau

FlaR gehört zur Familie der „LysR-type transcriptional regulators“ (LTTR), die in nahezu allen Bakteriengattungen vorkommen und dort die Transkription von Operons, Regulons und Promotoren aktivieren oder reprimieren, die in vielfältigen zellulären Funktionen impliziert sind [Zaim & Kierzek, 2003; Schell, 1993]. Positive Regulation wird von LTTR aus *E. coli* oder *Erwinia* spp. berichtet, die die Expression von Genen, notwendig für die Flagellierung, Motilität und Chemotaxis, kontrollieren [Maddocks & Oyston, 2008]. Neben dieser positiven Regulation durch die LTTR kommt es auch noch zu einer negativen Regulation anderer Transkriptionsregulatoren, die alle in einem komplexen Regulationsnetzwerk eingebunden sind.

Maddocks & Oyston beschreiben die klassische LTTR-Box, also die Nukleotid-Abfolge, die von den Regulatoren erkannt und gebunden wird, als TTA-N_{7/8}-TAA. Weniger stringent wird auch oftmals die Sequenz T-N₁₁-A als Erkennungsmotiv angegeben, die aber auch noch in Basenkomposition und -länge variieren kann. Die regulatorische Bindestelle befindet sich dabei gewöhnlich ca. -35 oder -65 Bp stromaufwärts relativ zum Transkriptionsbeginn des jeweiligen Gens bzw. Operons. Allerdings finden sich auch Bindestellen bis hin zu -218 Bp und interne Bindestellen bis +350 Bp von der Promotorregion entfernt [Viswanathan et al., 2007; Wilson et al., 1995], unter anderem nachgewiesen durch DNase I-Protektionsversuche.

Im *Legionella pneumophila* Corby-Genom zeichnen sich vor dem pil-Operon (pilM-pilQ) sowohl die stringente Sequenz als auch die weniger stringente ab. Die weniger stringente liegt dabei genau -35 Bp vor Beginn (s. Abb. VI.2), die LTTR-Box TTA-N_{7/8}-TAA befindet sich knappe -120 Bp vor Transkriptionsbeginn von pilM. Ob eine der beiden regulationskompatiblen DNA-Abschnitte tatsächlich auch von FlaR erkannt wird, ist experimentell nur bedingt überprüft worden. Computersoftware-gestützte Vorhersagen zur



Abb. VI.2 Ausschnitt vom *Legionella pneumophila* Corby Genom im Bereich des pil-Operons und der davorliegenden putativen LTTR-Box. Die Box mit der Nukleotidsequenz AACGTCGGGTTTT ist gelb hinterlegt und liegt genau -35 Bp vor dem Translationsbeginn von pilM, welches links der LTTR-Box in hellblau illustriert ist. Neben der hier veranschaulichten Box findet sich noch eine weitere (nicht gezeigte) potentielle LTTR-Erkennungssequenz am Ende des Gens LPC_2364, ca. -120 Bp vor Beginn von pilM mit der Reihenfolge TTACTTTGGGTTAA.

bakteriellen Promotor- oder Regulator-Identifizierung sind wegen der geringen Konservierung dieser DNA-Regionen alleine noch nicht sehr aussagekräftig [Towsey et al., 2007; Benos et al., 2002]. Neben Computervorhersagen sollten auch immer praktische Experimente, wie Gel-shift Assays oder Real-Time PCR, zur Auswertung herangezogen werden. Allerdings sprechen die Ergebnisse der hier durchgeführten RT-PCR (s. Kap. 5.5.1) gegen eine direkte Regulation des pil-Operons bzw. von pilN durch FlaR. Details dazu s. Kap.6.3.

6.3 Auswertung der RT-PCR- und „Twitching motility“-Ergebnisse

6.3.1 Bewertung der RT-PCR-Untersuchung von pilN im Verhältnis zu gyrA

Wie den CT-Werten in Kap. 5.5.1 zu entnehmen ist, zeigt sich die pilN-cDNA im Vergleich zur gyrA-cDNA sowohl im Wildtyp als auch in der flaR-Mutante stets auf nahezu gleichem Niveau der Ausgangskonzentration. Maximal wird ein CT-Unterschied von einem Zyklus erreicht (beim Wildtyp in der stationären Phase), was einer doppelten Ausgangsmenge an cDNA des pilN-Gens (CT-Wert: 22,7) im Vergleich zum gyrA Gen (CT-Wert: 23,8) entspricht. In der stationären Phase ist dieser Befund auch nicht weiter verwunderlich, da der Pilus als beschriebener Virulenzfaktor erst in der transmissiven Phase, also der stationären, zur Expression kommt – wie auch von Brüggemann et al. [2006] postuliert. Daher geht die Annäherung der Transkriptomwerte bzw. der Expressionsstärke der pilN-mRNA an die Werte des Haushaltsgens gyrA in dieser Wachstumsphase konform mit den bisher bekannten Annahmen zum Zeitpunkt der Expression des TypIV-Pilus in *Legionella pneumophila* Corby. Auch Liles Untersuchungen von mRNA-Produkten eines anderen an der Biosynthese des TypIV-Pilus beteiligten Operons sind in der stationären Phase (nach 72 Std. Wachstum) ausgearbeitet worden [Liles et al., 1998].

Demgegenüber stehen allerdings die Ergebnisse der RT-PCR aus der exponentiellen Wachstumsphase beider Legionellen-Stämme. Auch in dieser Phase sind die CT-Werte und damit die Ausgangskonzentration der mRNA von pilN und gyrA annähernd gleich (s. Kap. 5.5.1). Das könnte einerseits bedeuten, dass zumindest das pilN-Gen (damit einhergehend wohl aber auch das gesamte pil-Operon) nicht erst in der virulenten Phase exprimiert wird, sondern bereits in der exponentiellen Phase die gleichen Expressionswerte erlangt wie das Haushaltsgen gyrA und auch zur stationären so gut wie keinen Unterschied zeigt. Andererseits könnte es auch sein, dass ein unspezifisches Produkt amplifiziert wurde, wengleich die Amplifikate nach der RT-PCR auf einem Agarosegel zumindest die korrekte Größe des zu amplifizierenden pilN (ca. 225 Bp) zeigen. Der Farbstoff SYBR[®] Green würde aber auch in dem Fall der unspezifischen Amplifikation an die so gebildete doppelsträngige DNA binden.

Womöglich ist das gyrA-Gen in *L. pneumophila* für die relative Quantifizierung auch nicht besonders geeignet, ähnlich wie Eleaume und Jabbouri [2004] vom gyrA aus *Staphylococcus aureus* berichten. Es könnte also sein, dass die Expression von pilN insgesamt als sehr gering anzusehen wäre, weil auch das gyrA-Gen nur auf sehr niedrigem Niveau exprimiert wird. Das

würde die Expression des eigentlich erst in der stationären Phase aktiv werdenden pilN-Gens in der exponentiellen Phase etwas relativieren.

Wird davon ausgegangen, dass pilN korrekterweise vervielfältigt wurde und es zu keiner Kreuzreaktion mit einem anderen Ziel-Produkt aus der isolierten Gesamt-RNA gekommen ist, dann ist keine Abweichung von pilN in der flaR⁻-Mutante im Vergleich zum Wildtyp auszumachen. Das wiederum würde bedeuten, dass der LTT-Regulator FlaR zumindest nicht alleinig auf genetischer Ebene eine direkte positive Regulation auf das pil-Operon (pilM-pilQ) hat. Möglich wäre entweder ein weiteres unbekanntes Regulatorprotein oder eine post-transkriptionale Regulation, ähnlich wie beim CsrA und LetA/S-System [Rasis & Segal, 2009], mit noch unentdeckten weiteren Faktoren und Regulationsproteinen.

6.3.2 Beurteilung der „Twitching motility“-Tests

Wie bereits in Kap. 6.2.3 angeführt, lässt die flaR⁻-Mutante eine verringerte flagellenunabhängige Fortbewegung über die Kohle-Agarplatten erkennen (s. auch Kap. 5.6.1). Unter dieser als „twitching motility“ bezeichneten Motilität versteht man eine spezielle TypIV-Pili-vermittelte Form der bakteriellen Fortbewegung, die eine zittrige, ruckartige Bewegungsweise beschreibt. *In vivo* nutzen Bakterien diese Art für gewöhnlich dazu, neue Oberflächen mit hohem Nahrungsaufkommen zu besiedeln [Mattick, 2002].

Um die mögliche Pililosigkeit zusätzlich zur Proteom-Analyse, die bei der flaR⁻-Mutante ein PilN-Fehlen offenbart hat, in einem weiteren Experiment zu überprüfen, bietet sich der „twitching motility“-Test an. PilN ist zumindest bei *P. aeruginosa* ein essentieller Bestandteil der bei *L. pneumophila* unter anderem für die Fortbewegung mitverantwortlichen TypIV-Pili. Denn ohne PilN lassen sich die so mutierten Gram-negativen Pseudomonaden nicht mehr vom PO4-Phagen, die die Bakterien einzig über die Pili infizieren, befallen [Martin et al., 1995]; s. dazu auch Kap. 2.3.1.

Dass die flaR⁻-Mutante hier nun verringerte „twitching motility“ erkennen lässt, kann mehrere, in Kap. 6.2.3 aufgezählte Gründe haben. Insgesamt bestätigt dieser Versuch den durch Proteom-Analyse in der *L. pneumophila* Corby flaR⁻-Mutante aufgedeckten Mangel an PilN-Protein bzw. dessen Involvierung in die TypIV-Pili-Biogenese. Das Ergebnis deutet ebenso an, dass das FlaR-Regulationsprotein der LTTR-Familie in die Regulation einer der beiden bei Legionellen aufzufindenden Pili-Arten an der Zelloberfläche in noch nicht gänzlich verstandener Art und Weise involviert erscheint und genauer untersucht werden sollte.

6.4 Diffraktionsdatensammlung vom PilN-Kristall

Der am besten streuende Kristall ist im sog. „sitting drop“-Verfahren mit 0,1 M Natriumcitrat, 0,1 M Tris pH 8,0, 20 % (v/v) Isopropanol und 1,5 % (v/v) Glycerin als Reservoirlösung erzeugt worden. Bis zum Erreichen des maximalen Volumens von $0,4 \times 0,05 \times 0,05 \text{ mm}^3$ des hier verwendeten Kristalls vergingen etwa 2-3 Monate. Für jedes Diffraktionsbild wurde der Kristall am Synchrotron (kryogene Bedingungen s. Kap. 4.9.3) bei einer Expositionszeit von 30 Sekunden um $0,5^\circ$ gedreht. Dabei sind im Ganzen 100 Beugungsbilder aufgenommen worden.

6.4.1 Vorläufige kristallographische Charakterisierung

Die detektierten Reflexe wurden mit dem Programm MOSFLM prozessiert, skaliert worden ist mit der Software SCALA, welches im Softwarepaket CCP4 integriert ist. Die ermittelten Datenstatistiken sind in Kap. 5.4.2 tabelliert. Insgesamt sind 22827 Intensitäten gemessen worden, die 3239 einzigartige Reflexe mit einem R_{merge} -Faktor von 6,2 % ergeben haben. Beim Zusammenfügen aller Datenbilder hat sich eine Vollständigkeit von ca. 97% ergeben. Die Analyse der erhaltenen Diffraktionsdaten führte zur Einordnung in das hexagonale Kristallsystem mit den Einheitszellparametern $a = b = 85,96 \text{ \AA}$ und $c = 85,67 \text{ \AA}$. Die Auswertung mit dem Programm POINTLESS (v1.3.9) [Evans, 2006] deutete auf die Raumgruppe $P622$ hin.

Die anschließende Berechnung des Matthews-Koeffizienten [Matthews, 1968], der das Volumen des kristallisierten Proteins (samt Solvens) pro Dalton in der asymmetrischen Zelle angibt, ergab für ein Proteinmolekül pro asymmetrischer Einheit einen V_M -Wert von $2,62 \text{ \AA}^3/\text{Da}$. Das würde einem Wassergehalt von 53,1 % entsprechen. Berechnungen für zwei Proteinmoleküle lieferten einen weniger wahrscheinlichen V_M -Wert von $1,31 \text{ \AA}^3/\text{Da}$. Aus der Häufigkeitsverteilung aller in der Proteindatenbank (PDB) bis November 2002 hinterlegten Proteinkristalle lässt sich schlussfolgern, dass vermutlich nur ein Proteinmolekül pro asymmetrischer Zelle vorliegt [Kantardjiev & Rupp, 2003]. Ein Widerspruch zu den Ergebnissen der Gelfiltration, die einen Oligomerisierungsgrad von zwei homologen Proteinmolekülen vermuten ließen (s. auch Kap. 5.3.2), ergibt sich hieraus nicht notwendigerweise. Denn womöglich kann in der finalen Kristallstruktur eine Homodimerisierung durch eine der kristallographischen Zweifachachsen beobachtet werden.

Potentielle Suchmodelle zur Phasierung mittels molekularen Ersatzes (MR) wurden mit Hilfe des Programms PHYRE [Kelley & Sternberg, 2009] analysiert, welches basierend

auf der Vorhersage der Sekundärstrukturelemente nach Strukturhomologen in der Proteindatenbank PDB sucht. Dabei ist mit dem Protein PilO von *Pseudomonas aeruginosa* (PDB-Code: 2rjz) eine zu erwartende Übereinstimmung der Sekundärstrukturelemente von 95 % ermittelt worden. Dieses Protein ist zwar darüber hinaus ebenfalls an der Synthese des TypIV-Pilus beteiligt und zeigt somit möglicherweise eine biologische Funktionsähnlichkeit zu PilN; die Aminosäuresequenzidentität liegt allerdings nur bei geringen 8 %. Versuche, die Struktur über molekularen Ersatz (MR) zu lösen, sind aus Zeitgründen nicht durchgeführt worden.

Wie bereits in Kap. 2.3.1 erwähnt, ergab die Analyse mittels des Sequenzalignment-Programms BLAST eine 41%ige Aminosäuresequenz-Übereinstimmung zum gleichnamigen Protein PilN aus *P. aeruginosa*. Allerdings liegt auch hier, wie bei allen anderen ausgemachten Proteinen mit einem BLAST score-Wert über 130, keine Struktur vor.

Es bleibt daher vorerst zur Strukturaufklärung nur der Weg über die experimentelle Phasenbestimmung. Aufgrund der hohen Raumgruppensymmetrie und da sich unter den insgesamt 150 Aminosäureresten fünf Methionine in der Primärstruktur von PilN befinden, bietet sich die sog. „Multi-wavelength anomalous dispersion“ (MAD) an. Dabei werden die bakteriellen Expressionsstämme in einem möglichst methioninfreien Medium, welches mit Selenomethionin versetzt ist, angezogen [Stols et al., 2004]. Diese Selenomethionine werden dann statt des Methionins in das rekombinante Protein eingebaut und führen zu veränderten Strukturfaktoramplituden, die zur Phasierung ausgenutzt werden können.

6.5 Ausblick

Um den vollen Nutzen gerade auch der Neuentdeckung von Virulenzfaktoren aus der 2D-Gelelektrophorese ziehen zu können, ist sicherlich ein Umstieg auf die DIGE-Methodik mit Fluoreszenzfarbstoffen angeraten. Neben computergestützter Auswertesoftware der Gelbilder lässt sich damit ein weitaus differenzierteres, spezifischeres und genaueres Ergebnis erzielen, als dies allein mit Coomassie Blue-Proteinfärbungen möglich ist.

Nicht nur für die Analyse der Proteom-Ebene gilt, dass neben dem Vergleich von Wildtyp und den entsprechenden Mutanten auch sog. Komplementanten genutzt werden sollten. Das sind die entsprechenden Mutanten mit einem zusätzlichen Plasmid, welches steuerbar das eigentlich deletierte Gen transkribiert und somit das Fehlen und die daraus folgenden Ausfälle komplementieren würde. Im Falle der *flaR*⁻-Mutante beispielsweise bedeutet das, dass die komplementären Stämme auf Proteom-Ebene ebenfalls untersucht werden sollten, um Ursachen der Protein-Differenzen aufgrund des Fehlens von FlaR bzw. im Falle der *fliA*⁻-Mutante von FliA bestätigt zu sehen. Das Gleiche gilt auch für die chromatographische Auftrennung mit der PF-2D.

Um den Zusammenhang zwischen FlaR und der Pilierung von *L. pneumophila* Corby genauer auszuleuchten, könnten elektronenmikroskopische Aufnahmen des Wildtyps und der *flaR*⁻-Mutante ebenfalls hilfreich sein. Mit der gleichen Methodik und entsprechender Anfärbung könnte auch überprüft werden, ob es wegen der fehlenden oder schadhafte Pili als Kompensationsantwort zu einer Anreicherung von HtpB an der Zelloberfläche der Mutante kommt.

Um die Ergebnisse der RT-PCR besser deuten zu können, wäre ein Weg über sog. TaqMan[®]-Sonden gangbar. Darunter versteht man gensequenzspezifische Oligonukleotide, die direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff (am 5'-Ende) und einem entsprechenden Quencher (am 3'-Ende), der alle emittierten Signale des Fluoreszenzfarbstoffes abfängt, gekoppelt sind. Erst nach dem Zerlegen der TaqMan[®]-Sonde durch die Nuklease-Aktivität der DNA-Polymerase verliert der sog. Quencher seine Abschirmfähigkeit und das Fluoreszenzsignal kann registriert werden. Damit werden unspezifisches Binden des SYBR[®] Green-Farbstoffes an jedwede doppelsträngige DNA und die damit in Verbindung tretenden falsch positiven Signale umgangen. Auch die RNA-Isolierung, die, analog der Synthese der cDNA, immer wieder zu unterschiedlichster Konzentration und Reinheit geführt hat, sollte einer neuen, andersartigen Aufreinigungsmethode unterzogen werden.

Die Aufreinigung und Konzentrierung der rekombinanten PilN-Proteine mit den jeweiligen abspaltbaren Fusionsproteinen bedürfen ebenfalls einer Optimierung, um höhere Konzentrationen für die His-Tag- bzw. GST-Tag-lose PilN-Kristallisation zu erzielen.

Um das Phasenproblem bei der Strukturaufklärung von PilN mangels passender homologer Strukturen lösen zu können, ist es möglich, wie bereits erwähnt, mittels experimenteller Phasierung auf den MAD-Ansatz zurückzugreifen. Dank der günstigen Methionin-Verteilung in der Aminosäuresequenz von PilN kann dazu bevorzugt Selenomethionin als Analogon zu Methionin eingesetzt werden.

VII Anhang

7.1 Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
%(v/v)	Volumenprozent
%(w/v)	Gewichtsprozent
Abb.	Abbildung
ACES	N-(2-Acetamido)-2-Aminoethanesulfonsäure
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
Bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	“Bovine serum albumine”
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	“copy/complementary DNA”
CHAPS	3-(3-Cholamidopropyl)Dimethylammonium-1-propansulfat
d.h.	das heißt
ddH ₂ O	zweifach deionisiertes Wasser
DIGE	“Differential gel electrophoresis”
DLS	“Dynamic light scattering”, Dynamische Lichtstreuung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	„Enzyme-linked immunosorbent assay“
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alii (Maskulinum) oder aliae (Femininum) (lat.), und andere
FPLC	„Fast protein liquid chromatography“
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	“High-pressure liquid chromatography”
HPRP	“High-pressure reverse phase”
IDA	Iminodiessigsäure
IEP	isoelektrischer Punkt
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kap.	Kapitel
<i>L. hackeliae</i>	<i>Legionella hackeliae</i>
<i>L. pneumophila</i> Corby	<i>Legionella pneumophila</i> Corby
LCV	“ <i>Legionella</i> containing vacuole”
LPS	Lipopolysaccharid
LTTR	“LysR-type transcriptional regulators”
MAD	„Multi-wavelength anomalous dispersion“, multiple anomale Dispersion
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MPD	2-Methyl-2,4-Pentandiol
MR	Molekularer Ersatz, „molecular replacement“
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NBT	Nitroblau Tetrazolium

Nr.	Nummer
OD	optische Dichte
ORF	“Open reading frame”
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	“Phosphate buffered saline”
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion
PF-2D	“Protein fractionation”, zweidimensional
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PMF	“Peptide mass fingerprint”
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	“Real-Time” Polymerasen-Kettenreaktion
s.o.	siehe oben
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SOC	“Super optimal broth with catabolite repression”
sog.	sogenannt
spp.	Spezies
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBP	Tributylphosphat
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TMH	Transmembranhelix
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TY	“Trypton-yeast”
TypIV-SS	TypIV-Sekretionssystem
U/min	Umdrehungen pro Minute
ü/N	über Nacht
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel

7.2 Danksagung

Dem Direktor des Instituts für Biochemie der Universität zu Lübeck Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Rolf Hilgenfeld danke ich für die Aufnahme und Integration in seinen Lehrstuhl und die Möglichkeit, dort meine Promotionsarbeit verfassen zu können. Fernerhin möchte ich mich für seine langjährige, immer wieder neu gewährte finanzielle Unterstützung bedanken – trotz meiner anfänglich institutsfremden und themenfernen Anstellung.

Ebenso gilt mein Dank Dr. Jörg Deiwick, der mich während all der Jahre unterstützt und detailliert in die gewissenhafte, praktische Laborarbeit mit all ihrem theoretischen Hintergrund eingearbeitet und instruiert hat.

Dr. Jeroen R. Mesters danke ich für seinen Beistand im Umgang mit hochwertigen Laborutensilien. Mit sanftem Nachdruck gebeten, war er allzeit in der Lage durch hervorragendes technisches Verständnis und durch Fingerfertigkeit, Probleme in Manier eines „technischen Direktors“ zu lösen.

Dr. Guido Hansen möchte ich meinen Dank bekunden, weil er stets die Zeit gefunden hat, sich besonders um die Mitglieder der Bakteriengruppe zu kümmern, und weil er für korrekte wissenschaftliche Vorgehensweisen und eine durchdachte Organisation gesorgt hat.

Prof. Dr. Stefan Anemüller möchte ich löblich für sein enorm weitreichendes akademisches Wissen erwähnen, welches nicht nur dann zum Tragen kam, wenn Fragen während der Vorbereitung der medizinischen Zusatzseminare aufkamen. Für die organisatorische Unterstützung bei den Zusatzseminaren möchte ich mich bei Angelika v. Keiser-Gerhus und Christina Leister bedanken.

Dipl.-Ing. Hans-Joachim Kraus danke ich für seine ausgezeichnete Administration von sämtlichen Computerarbeiten und seine Hilfsbereitschaft und Problemlösung im Zusammenhang mit allen computertechnisch aufgekommenen Fragen.

Bei Susanne Zoske und Walter Verheyen bedanke ich mich wegen ihrer vortrefflichen Einweisung in die Laborpraxis, der Beihilfe zu speziellen Arbeiten und ihrer unermüdlichen täglichen Aufrechterhaltung des Laborbetriebes. Gleiches gilt für Silke Schmidtke und Doris Mutschall.

Namentlich von allen ehemaligen Doktoranden/Doktoren erwähnen möchte ich wegen ihrer besonderen Unterstützung und über den Arbeitsalltag hinausgehenden Hilfe Dipl.-Biochem. Helgo Schmidt und Dipl.-Biochem. Robert Wrase, Dr. Krishna Nagarajan, Dr. Rajesh Ponnusamy und M.Sc. Raspudin Saleem Batcha sowie Dr. Ksenia Pumpor.

Grundsätzlich schulde ich sowohl allen nicht exquisit genannten Mitarbeitern des Instituts für Biochemie als auch vielen Mitgliedern anderer Arbeitsbereiche für ihre dauerhafte

Hilfsbereitschaft Dank. In sehr angenehmer Erinnerung bleibt für mich obendrein die einzigartige und auf dem Uni-Gelände sicher auch außergewöhnliche multinationale und -linguale Umgebung und Atmosphäre in unserem Institut.

Zu guter Letzt drücke ich meinen besonderen Dank meinen Eltern, meinen beiden Geschwistern und meinen Freunden aus, die es immer verstanden haben, mir genau im richtigen Moment vollsten Rückhalt in jeglicher Hinsicht zu geben.

7.3 Literaturangaben

Abu Kwaik, Y., Gao, L.Y., Harb, O.S. & Stone, B.J. (1997): Transcriptional regulation of the macrophage-induced gene (*gspA*) of *Legionella pneumophila* and phenotypic characterization of a null mutant. *Mol. Microbiol.* **24**, 629-642

Abu Kwaik, Y.A. (1998): Fatal attraction of mammalian cells to *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* **30**, 689-695

Adamski, F.M., Atkins, J.F. & Gesteland, R.F. (1996): Ribosomal protein L9 interactions with 23S-rRNA: the use of a translational bypass assay to study the effect of amino acid substitutions. *J. Mol. Biol.* **261**, 357-371

Albert-Weissenberger, C., Cazalet, C. & Buchrieser, C. (2007): *Legionella pneumophila* - a human pathogen that co-evolved with fresh water protozoa. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 432-448

Allard, K.A., Viswanathan, V.K. & Cianciotto, N.P. (2006): *lbtA* and *lbtB* are required for production of the *Legionella pneumophila* siderophore legiobactin. *J. Bacteriol.* **188**, 1351-1363

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990): Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410

Andrade, M.A., Perez-Iratxeta, C. & Ponting, C.P. (2001): Protein repeats: structures, functions, and evolution. *J. Struct. Biol.* **134**, 117-131

Aragon, V., Rossier, O. & Cianciotto, N.P. (2002): *Legionella pneumophila* genes that encode lipase and phospholipase C activities. *Microbiology* **148**, 2223-2231

Banerji, S., Aurass, P. & Flieger, A. (2008): The manifold phospholipases A of *Legionella pneumophila* - identification, export, regulation, and their link to bacterial virulence. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**, 169-181

Barker, J., Brown, M.R., Collier, P.J., Farrell, I. & Gilbert, P. (1992): Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2420-2425

Barre, O. & Solioz, M. (2006): Improved protocol for chromatofocusing on the ProteomeLab PF2D. *Proteomics* **6**, 5096-5098

Bayan, N., Guilvout, I. & Pugsley, A.P. (2006): Secretins take shape. *Mol. Microbiol.* **60**, 1-4

Bellinger-Kawahara, C. & Horwitz, M.A. (1990): Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. *J. Exp. Med.* **172**, 1201-1210

Benos, P.V., Bulyk, M.L. & Stormo, G.D. (2002): Additivity in protein-DNA interactions: how good an approximation is it? *Nucleic Acids Res.* **30**, 4442-4451

- Benson, R.F. & Fields, B.S. (1998): Classification of the genus *Legionella*. *Semin. Respir. Infect.* **13**, 90-99
- Berger, K.H., Merriam, J.J. & Isberg, R.R. (1994): Altered intracellular targeting properties associated with mutations in the *Legionella pneumophila* dotA gene. *Mol. Microbiol.* **14**, 809-822
- Berggren, K., Chernokalskaya, E., Steinberg, T.H., Kemper, C., Lopez, M.F., Diwu, Z., Haugland, R.P. & Patton, W.F. (2000): Background-free, high sensitivity staining of proteins in one- and two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using a luminescent ruthenium complex. *Electrophoresis* **21**, 2509-2521
- Bergh, G.V. (2009): Two-dimensional difference gel electrophoresis. *Methods Mol. Biol.* **519**, 439-454
- Berth, M., Moser, F.M., Kolbe, M. & Bernhardt, J. (2007): The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**, 1223-1243
- Birdi, K.S. & Steinhardt, J. (1978): The effects of diverse proteins on the solubilization of various hydrophobic probes by protein detergent complexes. *Biochim. Biophys. Acta* **534**, 219-227
- Blake, M.S., Johnston, K.H., Russell-Jones, G.J. & Gotschlich, E.C. (1984): A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal. Biochem.* **136**, 175-179
- Blasi, F. (2004): Atypical pathogens and respiratory tract infections. *Eur. Respir. J.* **24**, 171-181
- Borchardt, J., Helbig, J.H. & Lück, P.C. (2008): Occurrence and distribution of sequence types among *Legionella pneumophila* strains isolated from patients in Germany: common features and differences to other regions of the world. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **27**, 29-36
- Borella, P., Guerrieri, E., Marchesi, I., Bondi, M. & Messi, P. (2005): Water ecology of *Legionella* and protozoan: environmental and public health perspectives. *Biotechnol. Annu. Rev.* **11**, 355-380
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- Bradley, D.E. (1973): Basic characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* pilus-dependent bacteriophage with a long noncontractile tail. *J. Virol.* **12**, 1139-1148
- Brenner, D.J., Steigerwalt, A.G. & McDade, J.E. (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

- Brenner, D.J., Steigerwalt, A.G., Gorman, G.W., Wilkinson, H.W., Bibb, W.F., Hackel, M., Tyndall, R.I., Campbell, J., Feeley, J.C., Thacker, W.L., Skalyi, P., Martin, W.T., Brake, B.J., Fields, B.S., McEachern, H.V. & Corcoran, L.K. (1985): Ten New Species of *Legionella*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**, 50-59
- Brüggemann, H., Hagman, A., Jules, M., Sismeiro, O., Dillies, M.A., Gouyette, C., Kunst, F., Steinert, M., Heuner, K., Coppee, J.Y. & Buchrieser, C. (2006): Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*. *Cell. Microbiol.* **8**, 1228-1240
- Burns, D.L. (2003): Type IV transporters of pathogenic bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 29-34
- Burrows, L.L. (2005): Weapons of mass retraction. *Mol. Microbiol.* **57**, 878-888
- Byrne, B. & Swanson, M.S. (1998): Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. *Infect. Immun.* **66**, 3029-3034
- Carlson, P.E., Jr., Carroll, J.A., O'Dee, D.M. & Nau, G.J. (2007): Modulation of virulence factors in *Francisella tularensis* determines human macrophage responses. *Microb. Pathog.* **42**, 204-214
- CCP4 (1994): The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Cryst.* **D50**, 760-763
- Chatfield, C.H. & Cianciotto, N.P. (2007): The secreted pyomelanin pigment of *Legionella pneumophila* confers ferric reductase activity. *Infect. Immun.* **75**, 4062-4070
- Chen, D. & Swenson, R.P. (1994): Cloning, sequence analysis, and expression of the genes encoding the two subunits of the methylotrophic bacterium W3A1 electron transfer flavoprotein. *J. Biol. Chem.* **269**, 32120-32130
- Chung, C.T., Niemela, S.L. & Miller, R.H. (1989): One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2172-2175
- Cianciotto, N.P. (2001): Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**, 331-343
- Cianciotto, N.P. (2007): Iron acquisition by *Legionella pneumophila*. *Biometals* **20**, 323-331
- Cirillo, S.L., Yan, L., Littman, M., Samrakandi, M.M. & Cirillo, J.D. (2002): Role of the *Legionella pneumophila* rtxA gene in amoebae. *Microbiology* **148**, 1667-1677
- Cloud, J.L., Carroll, K.C., Pixton, P., Erali, M. & Hillyard, D.R. (2000): Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 1709-1712
- Coil, D.A. & Anne, J. (2009): Twitching motility in *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiol. Lett.* **293**, 271-277

- Comolli, J.C., Hauser, A.R., Waite, L., Whitchurch, C.B., Mattick, J.S. & Engel, J.N. (1999): *Pseudomonas aeruginosa* gene products PilT and PilU are required for cytotoxicity in vitro and virulence in a mouse model of acute pneumonia. *Infect. Immun.* **67**, 3625-3630
- Craig, L. & Li, J. (2008): Type IV pili: paradoxes in form and function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 267-277
- Crowther, L.J., Anantha, R.P. & Donnenberg, M.S. (2004): The inner membrane subassembly of the enteropathogenic *Escherichia coli* bundle-forming pilus machine. *Mol. Microbiol.* **52**, 67-79
- Cunha, B.A. (2006): The atypical pneumonias: clinical diagnosis and importance. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**, 12-24
- Cunha, B.A. (2008): Atypical pneumonias: current clinical concepts focusing on Legionnaires' disease. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **14**, 183-194
- D'Andrea, L.D. & Regan, L. (2003): TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 655-662
- Dalebroux, Z.D., Edwards, R.L. & Swanson, M.S. (2009): SpoT governs *Legionella pneumophila* differentiation in host macrophages. *Mol. Microbiol.* **71**, 640-658
- de Buck, E., Anne, J. & Lammertyn, E. (2007): The role of protein secretion systems in the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Microbiology* **153**, 3948-3953
- de Felipe, K.S., Glover, R.T., Charpentier, X., Anderson, O.R., Reyes, M., Pericone, C.D. & Shuman, H.A. (2008): *Legionella* eukaryotic-like type IV substrates interfere with organelle trafficking. *PLoS Pathog.* **4**, 1-16
- DebRoy, S., Dao, J., Soderberg, M., Rossier, O. & Cianciotto, N.P. (2006): *Legionella pneumophila* type II secretome reveals unique exoproteins and a chitinase that promotes bacterial persistence in the lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 19146-19151
- Dietrich, C., Heuner, K., Brand, B.C., Hacker, J. & Steinert, M. (2001): Flagellum of *Legionella pneumophila* positively affects the early phase of infection of eukaryotic host cells. *Infect. Immun.* **69**, 2116-2122
- Eleaume, H. & Jabbouri, S. (2004): Comparison of two standardisation methods in real-time quantitative RT-PCR to follow *Staphylococcus aureus* genes expression during in vitro growth. *J. Microbiol. Methods* **59**, 363-370
- Engraber, M. & Loos, M. (1992): A 66-kilodalton heat shock protein of *Salmonella typhimurium* is responsible for binding of the bacterium to intestinal mucus. *Infect. Immun.* **60**, 3072-3078
- Ensminger, A.W. & Isberg, R.R. (2009): *Legionella pneumophila* Dot/Icm translocated substrates: a sum of parts. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 67-73
- Evans, P. (2006): Scaling and assessment of data quality. *Acta Cryst.* **D62**, 72-82

- Falkow, S. (1988): Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *Rev. Infect. Dis.* **10**, 274-276
- Falkow, S. (2004): Molecular Koch's postulates applied to bacterial pathogenicity--a personal recollection 15 years later. *Nature Rev. Microbiol.* **2**, 67-72
- Farbrother, P., Wagner, C., Na, J., Tunggal, B., Morio, T., Urushihara, H., Tanaka, Y., Schleicher, M., Steinert, M. & Eichinger, L. (2006): *Dictyostelium* transcriptional host cell response upon infection with *Legionella*. *Cell. Microbiol.* **8**, 438-456
- Fields, B.S., Fields, S.R., Loy, J.N., White, E.H., Steffens, W.L. & Shotts, E.B. (1993): Attachment and entry of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis*. *J. Infect. Dis.* **167**, 1146-1150
- Fink, S.L. & Cookson, B.T. (2005): Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect. Immun.* **73**, 1907-1916
- Flieger, A., Gong, S., Faigle, M., Northoff, H. & Neumeister, B. (2001): In vitro secretion kinetics of proteins from *Legionella pneumophila* in comparison to proteins from non-*pneumophila* species. *Microbiology* **147**, 3127-3134
- Flieger, A., Rydzewski, K., Banerji, S., Broich, M. & Heuner, K. (2004): Cloning and characterization of the gene encoding the major cell-associated phospholipase A of *Legionella pneumophila*, *plaB*, exhibiting hemolytic activity. *Infect. Immun.* **72**, 2648-2658
- Flieger, A., Gongab, S., Faigle, M., Mayer, H.A., Kehrer, U., Mussotter, J., Bartmann, P. & Neumeister, B. (2000): Phospholipase A secreted by *Legionella pneumophila* destroys alveolar surfactant phospholipids. *FEMS Microbiol. Lett.* **188**, 129-133
- Forsbach-Birk, V., McNealy, T., Shi, C., Lynch, D. & Marre, R. (2004): Reduced expression of the global regulator protein CsrA in *Legionella pneumophila* affects virulence-associated regulators and growth in *Acanthamoeba castellanii*. *Int. J. Med. Microbiol.* **294**, 15-25
- Fraser, D.W., Tsai, T.R., Orenstein, W., Parkin, W.E., Beecham, H.J., Sharrar, R.G., Harris, J., Mallison, G.F., Martin, S.M., McDade, J.E., Shepard, C.C. & Brachman, P.S. (1977): Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N. Engl. J. Med.* **297**, 1189-1197
- Fuqua, W.C., Winans, S.C. & Greenberg, E.P. (1994): Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* **176**, 269-275
- Gallagher, S.R. (2007): One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **Kap. 6**, 6.1.1-6.1.38
- Gao, L.Y. & Abu Kwaik, Y. (1999a): Activation of caspase 3 during *Legionella pneumophila*-induced apoptosis. *Infect. Immun.* **67**, 4886-4894
- Gao, L.Y. & Abu Kwaik, Y. (1999b): 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., Susa, M., Ticac, B. & Abu Kwaik, Y. (1999): Heterogeneity in intracellular replication and cytopathogenicity of *Legionella pneumophila* and *Legionella micdadei* in mammalian and protozoan cells. *Microb. Pathog.* **27**, 273-287
- Garduno, R.A., Garduno, E. & Hoffman, P.S. (1998): Surface-associated hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model. *Infect. Immun.* **66**, 4602-4610
- Godet, C., Frat, J.P., Le Moal, G., Roblot, F., Michalakis, G., Cabon, E. & Tasu, J.P. (2007): Legionnaire's pneumonia: is there really an interstitial disease? *Eur. J. Radiol.* **61**, 150-153
- Görg, A. (1993): Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients: current state. *Biochem. Soc. Trans.* **21**, 130-132
- Görg, A., Drews, O., Luck, C., Weiland, F. & Weiss, W. (2009): 2-DE with IPGs. *Electrophoresis* **30**, 122-132
- Gosting, L.H., Cabrian, K., Sturge, J.C. & Goldstein, L.C. (1984): Identification of a species-specific antigen in *Legionella pneumophila* by a monoclonal antibody. *J. Clin. Microbiol.* **20**, 1031-1035
- Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D.I. & Metz, F. (1999): ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**, 305-308
- Hahn, H.P. (1997): The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*--a review. *Gene* **192**, 99-108
- Halablab, M.A., Richards, L. & Bazin, M.J. (1990): Phagocytosis of *Legionella pneumophila*. *J. Med. Microbiol.* **33**, 75-83
- Hammer, B.K. & Swanson, M.S. (1999): Co-ordination of *Legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp. *Mol. Microbiol.* **33**, 721-731
- Hammer, B.K., Tateda, E.S. & Swanson, M.S. (2002): A two-component regulator induces the transmission phenotype of stationary-phase *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* **44**, 107-118
- Hazes, B. & Frost, L. (2008): Towards a systems biology approach to study type II/IV secretion systems. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**, 1839-1850
- Hazlett, L.D., Moon, M.M., Singh, A., Berk, R.S. & Rudner, X.L. (1991): Analysis of adhesion, piliation, protease production and ocular infectivity of several *P. aeruginosa* strains. *Curr. Eye Res.* **10**, 351-362
- Hendrix, L.R., Mallavia, L.P. & Samuel, J.E. (1993): Cloning and sequencing of *Coxiella burnetii* outer membrane protein gene com1. *Infect. Immun.* **61**, 470-477
- Hennequin, C., Porcheray, F., Waligora-Dupriet, A., Collignon, A., Barc, M., Bourlioux, P. & Karjalainen, T. (2001): GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. *Microbiology* **147**, 87-96

- Heuner, K. & Steinert, M. (2003): The flagellum of *Legionella pneumophila* and its link to the expression of the virulent phenotype. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**, 133-143
- Heuner, K., Hacker, J. & Brand, B.C. (1997): The alternative sigma factor sigma28 of *Legionella pneumophila* restores flagellation and motility to an *Escherichia coli* fliA mutant. *J. Bacteriol.* **179**, 17-23
- Heuner, K., Brand, B.C. & Hacker, J. (1999): The expression of the flagellum of *Legionella pneumophila* is modulated by different environmental factors. *FEMS Microbiol. Lett.* **175**, 69-77
- Heuner, K., Dietrich, C., Steinert, M., Gobel, U.B. & Hacker, J. (2000): Cloning and characterization of a *Legionella pneumophila*-specific gene encoding a member of the LysR family of transcriptional regulators. *Mol. Gen. Genet.* **264**, 204-211
- Heuner, K., Dietrich, C., Skriwan, C., Steinert, M. & Hacker, J. (2002): Influence of the alternative sigma(28) factor on virulence and flagellum expression of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* **70**, 1604-1608
- Heuner, K., Bender-Beck, L., Brand, B.C., Lück, P.C., Mann, K.H., Marre, R., Ott, M. & Hacker, J. (1995): Cloning and genetic characterization of the flagellum subunit gene (flaA) of *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Infect. Immun.* **63**, 2499-2507
- Hilbi, H., Segal, G. & Shuman, H.A. (2001): Icm/dot-dependent upregulation of phagocytosis by *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* **42**, 603-617
- Hilbi, H., Weber, S.S., Ragaz, C., Nyfeler, Y. & Urwyler, S. (2007): Environmental predators as models for bacterial pathogenesis. *Environ. Microbiol.* **9**, 563-575
- Hirokawa, T., Boon-Chieng, S. & Mitaku, S. (1998): SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* **14**, 378-379
- Hoffman, P.S. & Garduno, R.A. (1999): Surface-associated heat shock proteins of *Legionella pneumophila* and *Helicobacter pylori*: roles in pathogenesis and immunity. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* **7**, 58-63
- Hogg, T., Mechold, U., Malke, H., Cashel, M. & Hilgenfeld, R. (2004): Conformational antagonism between opposing active sites in a bifunctional RelA/SpoT homolog modulates (p)ppGpp metabolism during the stringent response [corrected]. *Cell* **117**, 57-68
- 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
- Ingmundson, A., Delprato, A., Lambright, D.G. & Roy, C.R. (2007): *Legionella pneumophila* proteins that regulate Rab1 membrane cycling. *Nature* **450**, 365-369
- Isberg, R.R., O'Connor, T.J. & Heidtman, M. (2009): The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nature Rev. Microbiol.* **7**, 13-24

- Jepras, R.I., Fitzgeorge, R.B. & Baskerville, A. (1985): A comparison of virulence of two strains of *Legionella pneumophila* based on experimental aerosol infection of guinea-pigs. *J. Hyg.* **95**, 29-38
- Joshi, A.D. & Swanson, M.S. (1999): Comparative analysis of *Legionella pneumophila* and *Legionella micdadei* virulence traits. *Infect. Immun.* **67**, 4134-4142
- Juhas, M., Crook, D.W. & Hood, D.W. (2008): Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cell. Microbiol.* **10**, 2377-2386
- Jules, M. & Buchrieser, C. (2007): *Legionella pneumophila* adaptation to intracellular life and the host response: clues from genomics and transcriptomics. *FEBS Lett.* **581**, 2829-2838
- Jung, R., Danziger, L.H. & Pendland, S.L. (2002): Intracellular activity of ABT-773 and other antimicrobial agents against *Legionella pneumophila*. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**, 857-861
- Kantardjieff, K.A. & Rupp, B. (2003): Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals. *Protein Sci.* **12**, 1865-1871
- Kazmierczak, M.J., Wiedmann, M. & Boor, K.J. (2005): Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**, 527-543
- Keen, M.G. & Hoffman, P.S. (1989): Characterization of a *Legionella pneumophila* extracellular protease exhibiting hemolytic and cytotoxic activities. *Infect. Immun.* **57**, 732-738
- Keller, L. & Surette, M.G. (2006): Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nature Rev. Microbiol.* **4**, 249-258
- Kelley, L.A. & Sternberg, M.J. (2009): Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature Protoc.* **4**, 363-371
- Kilvington, S. & Price, J. (1990): Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *J. Appl. Bacteriol.* **68**, 519-525
- Kirby, J.E., Vogel, J.P., Andrews, H.L. & Isberg, R.R. (1998): Evidence for pore-forming ability by *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* **27**, 323-336
- Krause, E., Wenschuh, H. & Jungblut, P.R. (1999): The dominance of arginine-containing peptides in MALDI-derived tryptic mass fingerprints of proteins. *Anal. Chem.* **71**, 4160-4165
- Krinos, C., High, A.S. & Rodgers, F.G. (1999): Role of the 25 kDa major outer membrane protein of *Legionella pneumophila* in attachment to U-937 cells and its potential as a virulence factor for chick embryos. *J. Appl. Microbiol.* **86**, 237-244
- Kyhse-Andersen, J. (1984): Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203-209

- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- Lauber, W.M., Carroll, J.A., Dufield, D.R., Kiesel, J.R., Radabaugh, M.R. & Malone, J.P. (2001): Mass spectrometry compatibility of two-dimensional gel protein stains. *Electrophoresis* **22**, 906-918
- Lautrop, H. (1962): *Bacterium anitratum* transferred to the genus Cytophaga. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Suppl.* **154**, 303-304
- Lawley, T.D., Klimke, W.A., Gubbins, M.J. & Frost, L.S. (2003): F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS Microbiol. Lett.* **224**, 1-15
- Lebeau, I., Lammertyn, E., De Buck, E., Maes, L., Geukens, N., Van Mellaert, L., Arckens, L., Anne, J. & Clerens, S. (2005): First proteomic analysis of *Legionella pneumophila* based on its developing genome sequence. *Res. Microbiol.* **156**, 119-129
- Lee, J.V. & West, A.A. (1991): Survival and growth of *Legionella* species in the environment. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* **20**, 121-129
- Leslie, A.G.W. (1992): Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. *Jnt CCP4/ESF-EAMCB Newsl. Protein Crystallogr.* **26**, 27-33
- Liles, M.R., Viswanathan, V.K. & Cianciotto, N.P. (1998): Identification and temperature regulation of *Legionella pneumophila* genes involved in type IV pilus biogenesis and type II protein secretion. *Infect. Immun.* **66**, 1776-1782
- Liles, M.R., Scheel, T.A. & Cianciotto, N.P. (2000): Discovery of a nonclassical siderophore, legiobactin, produced by strains of *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.* **182**, 749-757
- Lindsay, D.S., Abraham, W.H., Findlay, W., Christie, P., Johnston, F. & Edwards, G.F. (2004): Laboratory diagnosis of legionnaires' disease due to *Legionella pneumophila* serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods. *J. Med. Microbiol.* **53**, 183-187
- Linke, T., Ross, A.C. & Harrison, E.H. (2006): Proteomic analysis of rat plasma by two-dimensional liquid chromatography and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1123**, 160-169
- Liu, M.Y. & Romeo, T. (1997): The global regulator CsrA of *Escherichia coli* is a specific mRNA-binding protein. *J. Bacteriol.* **179**, 4639-4642
- Liu, M.Y., Gui, G., Wei, B., Preston, J.F., 3rd, Oakford, L., Yuksel, U., Giedroc, D.P. & Romeo, T. (1997): The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **272**, 17502-17510
- Lopez, M.F., Berggren, K., Chernokalskaya, E., Lazarev, A., Robinson, M. & Patton, W.F. (2000): A comparison of silver stain and SYPRO Ruby Protein Gel Stain with respect to protein detection in two-dimensional gels and identification by peptide mass profiling. *Electrophoresis* **21**, 3673-3683

- Lubman, D.M., Kachman, M.T., Wang, H., Gong, S., Yan, F., Hamler, R.L., O'Neil, K.A., Zhu, K., Buchanan, N.S. & Barder, T.J. (2002): Two-dimensional liquid separations-mass mapping of proteins from human cancer cell lysates. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **782**, 183-196
- Lucas, C.E., Brown, E. & Fields, B.S. (2006): Type IV pili and type II secretion play a limited role in *Legionella pneumophila* biofilm colonization and retention. *Microbiology* **152**, 3569-3573
- Lück, P.C. & Steinert, M. (2006): Pathogenese, Diagnostik und Therapie der *Legionella*-Infektion. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* **49**, 439-449
- Ludlam, A.V., Moore, B.A. & Xu, Z. (2004): The crystal structure of ribosomal chaperone trigger factor from *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 13436-13441
- Lüneberg, E., Zähringer, U., Knirel, Y.A., Steinmann, D., Hartmann, M., Steinmetz, I., Rohde, M., Kohl, J. & Frosch, M. (1998): Phase-variable expression of lipopolysaccharide contributes to the virulence of *Legionella pneumophila*. *J. Exp. Med.* **188**, 49-60
- Machner, M.P. & Isberg, R.R. (2006): Targeting of host Rab GTPase function by the intravacuolar pathogen *Legionella pneumophila*. *Dev. Cell* **11**, 47-56
- Maddocks, S.E. & Oyston, P.C. (2008): Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* **154**, 3609-3623
- Marra, A., Blander, S.J., Horwitz, M.A. & Shuman, H.A. (1992): Identification of a *Legionella pneumophila* locus required for intracellular multiplication in human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9607-9611
- Martin, P.R., Watson, A.A., McCaul, T.F. & Mattick, J.S. (1995): Characterization of a five-gene cluster required for the biogenesis of type 4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **16**, 497-508
- Matthews, B.W. (1968): Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* **33**, 491-497
- Matthews, M. & Roy, C.R. (2000): Identification and subcellular localization of the *Legionella pneumophila* IcmX protein: a factor essential for establishment of a replicative organelle in eukaryotic host cells. *Infect. Immun.* **68**, 3971-3982
- Mattick, J.S. (2002): Type IV pili and twitching motility. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 289-314
- Mattick, J.S., Whitchurch, C.B. & Alm, R.A. (1996): The molecular genetics of type-4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*--a review. *Gene* **179**, 147-155
- McDade, J.E., Brenner, D.J. & Bozeman, F.M. (1979): Legionnaires' disease bacterium isolated in 1947. *Ann. Intern. Med.* **90**, 659-661
- McDade, J.E., Shepard, C.C., Fraser, D.W., Tsai, T.R., Redus, M.A. & Dowdle, W.R. (1977): Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N. Engl. J. Med.* **297**, 1197-1203

- McNealy, T.L., Forsbach-Birk, V., Shi, C. & Marre, R. (2005): The Hfq homolog in *Legionella pneumophila* demonstrates regulation by LetA and RpoS and interacts with the global regulator CsrA. *J. Bacteriol.* **187**, 1527-1532
- Meighen, E.A. (1993): Bacterial bioluminescence: organization, regulation, and application of the lux genes. *FASEB J.* **7**, 1016-1022
- Merz, A.J., So, M. & Sheetz, M.P. (2000): Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature* **407**, 98-102
- Michov, B.M. (1989): Electrophoresis in one buffer at two pH values. *Electrophoresis* **10**, 686-689
- Molofsky, A.B. & Swanson, M.S. (2003): *Legionella pneumophila* CsrA is a pivotal repressor of transmission traits and activator of replication. *Mol. Microbiol.* **50**, 445-461
- Molofsky, A.B. & Swanson, M.S. (2004): Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Mol. Microbiol.* **53**, 29-40
- Molofsky, A.B., Shetron-Rama, L.M. & Swanson, M.S. (2005): Components of the *Legionella pneumophila* flagellar regulon contribute to multiple virulence traits, including lysosome avoidance and macrophage death. *Infect. Immun.* **73**, 5720-5734
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1992): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology* **24**, 17-27
- Nagai, H., Kagan, J.C., Zhu, X., Kahn, R.A. & Roy, C.R. (2002): A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on *Legionella* phagosomes. *Science* **295**, 679-682
- O'Toole, G.A. & Kolter, R. (1998): Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **30**, 295-304
- Ottow, J.C. (1975): Ecology, physiology, and genetics of fimbriae and pili. *Annu. Rev. Microbiol.* **29**, 79-108
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. (1995): How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **4**, 2411-2423
- Pasquali, C., Fialka, I. & Huber, L.A. (1997): Preparative two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins. *Electrophoresis* **18**, 2573-2581
- Payne, N.R. & Horwitz, M.A. (1987): Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors. *J. Exp. Med.* **166**, 1377-1389
- Pelacic, V. (2008): Type IV pili: e pluribus unum? *Mol. Microbiol.* **68**, 827-837
- Pennington, K., McGregor, E., Beasley, C.L., Everall, I., Cotter, D. & Dunn, M.J. (2004): Optimization of the first dimension for separation by two-dimensional gel electrophoresis of basic proteins from human brain tissue. *Proteomics* **4**, 27-30

- Petermann, N., Hansen, G., Schmidt, C.L. & Hilgenfeld, R. (2010): Structure of the GTPase and GDI domains of FeoB, the ferrous iron transporter of *Legionella pneumophila*. *FEBS Lett.* **584**, 733-738
- Plotkowski, M.C. & Meirelles, M.N. (1997): Concomitant endosome-phagosome fusion and lysis of endosomal membranes account for *Pseudomonas aeruginosa* survival in human endothelial cells. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **29**, 229-237
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. & Belfrage, G. (1975): Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**, 598-599
- Proft, T. & Baker, E.N. (2009): Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria - structure, assembly and their role in disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 613-635
- Pujol, C., Eugene, E., Marceau, M. & Nassif, X. (1999): The meningococcal PilT protein is required for induction of intimate attachment to epithelial cells following pilus-mediated adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 4017-4022
- Rasis, M. & Segal, G. (2009): The LetA-RsmYZ-CsrA regulatory cascade, together with RpoS and PmrA, post-transcriptionally regulates stationary phase activation of *Legionella pneumophila* Icm/Dot effectors. *Mol. Microbiol.* **72**, 995-1010
- Renart, J., Reiser, J. & Stark, G.R. (1979): Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 3116-3120
- Retzlaff, C., Yamamoto, Y., Okubo, S., Hoffman, P.S., Friedman, H. & Klein, T.W. (1996): *Legionella pneumophila* heat-shock protein-induced increase of interleukin-1 β -mRNA involves protein kinase C signalling in macrophages. *Immunology* **89**, 281-288
- Riboldi-Tunnicliffe, A., Konig, B., Jessen, S., Weiss, M.S., Rahfeld, J., Hacker, J., Fischer, G. & Hilgenfeld, R. (2001): Crystal structure of Mip, a prolyl isomerase from *Legionella pneumophila*. *Nature Struct. Biol.* **8**, 779-783
- Risler, J.L., Delorme, M.O., Delacroix, H. & Henaut, A. (1988): Amino acid substitutions in structurally related proteins. A pattern recognition approach. Determination of a new and efficient scoring matrix. *J. Mol. Biol.* **204**, 1019-1029
- Robey, M. & Cianciotto, N.P. (2002): *Legionella pneumophila* feoAB promotes ferrous iron uptake and intracellular infection. *Infect. Immun.* **70**, 5659-5669
- Rodgers, F.G. (1979): Ultrastructure of *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Pathol.* **32**, 1195-1202
- Rodriguez-Pineiro, A.M., Carvajal-Rodriguez, A., Rolan-Alvarez, E., Rodriguez-Berrocal, F.J., Martinez-Fernandez, M. & Paez de la Cadena, M. (2005): Application of relative warp analysis to the evaluation of two-dimensional gels in proteomics: studying isoelectric point and relative molecular mass variation. *J. Proteome Res.* **4**, 1318-1323
- Romeo, T. (1998): Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol. Microbiol.* **29**, 1321-1330

- Rossier, O. & Cianciotto, N.P. (2001): Type II protein secretion is a subset of the PilD-dependent processes that facilitate intracellular infection by *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* **69**, 2092-2098
- Rossier, O., Dao, J. & Cianciotto, N.P. (2008): The type II secretion system of *Legionella pneumophila* elaborates two aminopeptidases, as well as a metalloprotease that contributes to differential infection among protozoan hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 753-761
- Roy, C.R., Berger, K.H. & Isberg, R.R. (1998): *Legionella pneumophila* DotA protein is required for early phagosome trafficking decisions that occur within minutes of bacterial uptake. *Mol. Microbiol.* **28**, 663-674
- Rusch, S.L. & Kendall, D.A. (2007): Interactions that drive Sec-dependent bacterial protein transport. *Biochemistry (Mosc.)* **46**, 9665-9673
- Sahr, T., Brüggemann, H., Jules, M., Lomma, M., Albert-Weissenberger, C., Cazalet, C. & Buchrieser, C. (2009): Two small ncRNAs jointly govern virulence and transmission in *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* **72**, 741-762
- Sambrook, J. & Russell, D.W.: Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001
- Santic, M., Asare, R., Doric, M. & Abu Kwaik, Y. (2007): Host-dependent trigger of caspases and apoptosis by *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* **75**, 2903-2913
- Schell, M.A. (1993): Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 597-626
- Segal, G., Russo, J.J. & Shuman, H.A. (1999): Relationships between a new type IV secretion system and the icm/dot virulence system of *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* **34**, 799-809
- Segal, G., Feldman, M. & Zusman, T. (2005): The Icm/Dot type-IV secretion systems of *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 65-81
- Shevchuk, O., Batzilla, C., Hagele, S., Kusch, H., Engelmann, S., Hecker, M., Haas, A., Heuner, K., Glockner, G. & Steinert, M. (2009): Proteomic analysis of *Legionella*-containing phagosomes isolated from *Dictyostelium*. *Int. J. Med. Microbiol.* **299**, 489-508
- Shi, C., Forsbach-Birk, V., Marre, R. & McNealy, T.L. (2006): The *Legionella pneumophila* global regulatory protein LetA affects DotA and Mip. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**, 15-24
- Shin, Y.K., Lee, H.J., Lee, J.S. & Paik, Y.K. (2006): Proteomic analysis of mammalian basic proteins by liquid-based two-dimensional column chromatography. *Proteomics* **6**, 1143-1150
- Shohdy, N., Efe, J.A., Emr, S.D. & Shuman, H.A. (2005): Pathogen effector protein screening in yeast identifies *Legionella* factors that interfere with membrane trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 4866-4871
- Smith, D.B. & Johnson, K.S. (1988): Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31-40

- Spirig, T., Tiaden, A., Kiefer, P., Buchrieser, C., Vorholt, J.A. & Hilbi, H. (2008): The *Legionella* autoinducer synthase LqsA produces an alpha-hydroxyketone signaling molecule. *J. Biol. Chem.* **283**, 18113-18123
- Steinert, M., Ott, M.P., Lück, P.C., Tannich, E. & Hacker, J. (1994): Studies on the uptake and intracellular replication of *Legionella pneumophila* in protozoa and in macrophage-like cells. *FEMS Microbiol. Ecol.* **15**, 299-308
- Steinert, M., Heuner, K., Buchrieser, C., Albert-Weissenberger, C. & Glockner, G. (2007): *Legionella* pathogenicity: genome structure, regulatory networks and the host cell response. *Int. J. Med. Microbiol.* **297**, 577-587
- Stoller, G., Rucknagel, K.P., Nierhaus, K.H., Schmid, F.X., Fischer, G. & Rahfeld, J.U. (1995): A ribosome-associated peptidyl-prolyl cis/trans isomerase identified as the trigger factor. *EMBO J.* **14**, 4939-4948
- Stols, L., Millard, C.S., Dementieva, I. & Donnelly, M.I. (2004): Production of selenomethionine-labeled proteins in two-liter plastic bottles for structure determination. *J. Struct. Funct. Genomics* **5**, 95-102
- Stone, B.J. & Abu Kwaik, Y. (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**, 1768-1775
- Stone, B.J. & Abu Kwaik, Y. (1999): Natural competence for DNA transformation by *Legionella pneumophila* and its association with expression of type IV pili. *J. Bacteriol.* **181**, 1395-1402
- Strom, M.S. & Lory, S. (1993): Structure-function and biogenesis of the type IV pili. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 565-596
- Sturgill-Koszycki, S. & Swanson, M.S. (2000): *Legionella pneumophila* replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. *J. Exp. Med.* **192**, 1261-1272
- Swanson, M.S. & Hammer, B.K. (2000): *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 567-613
- Thiede, B., Lamer, S., Mattow, J., Siejak, F., Dimmler, C., Rudel, T. & Jungblut, P.R. (2000): Analysis of missed cleavage sites, tryptophan oxidation and N-terminal pyroglutamylation after in-gel tryptic digestion. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 496-502
- Tiaden, A., Spirig, T., Weber, S.S., Brüggemann, H., Bosshard, R., Buchrieser, C. & Hilbi, H. (2007): The *Legionella pneumophila* response regulator LqsR promotes host cell interactions as an element of the virulence regulatory network controlled by RpoS and LetA. *Cell. Microbiol.* **9**, 2903-2920
- Tiaden, A., Spirig, T., Carranza, P., Brüggemann, H., Riedel, K., Eberl, L., Buchrieser, C. & Hilbi, H. (2008): Synergistic contribution of the *Legionella pneumophila* lqs genes to pathogen-host interactions. *J. Bacteriol.* **190**, 7532-7547
- Timms, J.F. & Cramer, R. (2008): Difference gel electrophoresis. *Proteomics* **8**, 4886-4897

- Towsey, M., Hogan, J.M., Mathews, S. & Timms, P. (2007): The in silico prediction of promoters in bacterial genomes. *Genome Inform.* **19**, 178-189
- Ueta, M., Yoshida, H., Wada, C., Baba, T., Mori, H. & Wada, A. (2005): Ribosome binding proteins YhbH and YfiA have opposite functions during 100S formation in the stationary phase of *Escherichia coli*. *Genes Cells* **10**, 1103-1112
- Venkataraman, C., Gao, L.Y., Bondada, S. & Abu Kwaik, Y. (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
- Verma, A. & Burns, D.L. (2007): Requirements for assembly of PtlH with the pertussis toxin transporter apparatus of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **75**, 2297-2306
- Viswanathan, P., Ueki, T., Inouye, S. & Kroos, L. (2007): Combinatorial regulation of genes essential for *Myxococcus xanthus* development involves a response regulator and a LysR-type regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 7969-7974
- von Baum, H., Ewig, S., Marre, R., Suttorp, N., Gonschior, S., Welte, T. & Luck, C. (2008): Community-acquired *Legionella* pneumonia: new insights from the German competence network for community acquired pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* **46**, 1356-1364
- von Bodman, S.B., Willey, J.M. & Diggle, S.P. (2008): Cell-cell communication in bacteria: united we stand. *J. Bacteriol.* **190**, 4377-4391
- Wagner, C., Khan, A.S., Kamphausen, T., Schmausser, B., Unal, C., Lorenz, U., Fischer, G., Hacker, J. & Steinert, M. (2007): Collagen binding protein Mip enables *Legionella pneumophila* to transmigrate through a barrier of NCI-H292 lung epithelial cells and extracellular matrix. *Cell. Microbiol.* **9**, 450-462
- Weber, K. & Osborn, M. (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412
- Wilkins, M.R. & Williams, K.L. (1997): Cross-species protein identification using amino acid composition, peptide mass fingerprinting, isoelectric point and molecular mass: a theoretical evaluation. *J. Theor. Biol.* **186**, 7-15
- Wilkinson, H.W., Thacker, W.L., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J., Ampel, N.M. & Wing, E.J. (1985): Second serogroup of *Legionella hackeliae* isolated from a patient with pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* **22**, 488-489
- Wilson, R.L., Urbanowski, M.L. & Stauffer, G.V. (1995): DNA binding sites of the LysR-type regulator GcvA in the gcv and gcvA control regions of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**, 4940-4946
- Wintermeyer, E., Flugel, M., Ott, M., Steinert, M., Rdest, U., Mann, K.H. & Hacker, J. (1994): Sequence determination and mutational analysis of the lly locus of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* **62**, 1109-1117

Woods, A.H. & O'Bar, P.R. (1970): Absorption of proteins and peptides in the far ultraviolet. *Science* **167**, 179-181

Zaim, J. & Kierzek, A.M. (2003): The structure of full-length LysR-type transcriptional regulators. Modeling of the full-length OxyR transcription factor dimer. *Nucleic Acids Res.* **31**, 1444-1454

Zheng, S., Schneider, K.A., Barder, T.J. & Lubman, D.M. (2003): Two-dimensional liquid chromatography protein expression mapping for differential proteomic analysis of normal and O157:H7 *Escherichia coli*. *BioTechniques* **35**, 1202-1212