

1. Summary

1.2 Summary (German)

Legionella pneumophila ist der Erreger der Legionärskrankheit, welche eine Lungenentzündung mit gegebenenfalls tödlichem Ausgang darstellt. Das Bakterium besitzt sekretierte und zellassoziierte lipolytische Aktivitäten, insbesondere Phospholipase A Aktivitäten. Bakterielle Phospholipasen sind potentielle Virulenzfaktoren, da sie in der Lage sind, Wirtsmembrane zu lysieren und durch die Freisetzung von sekundären Botenstoffen in die Signaltransduktionswege der Wirtszelle einzugreifen. Das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* beispielsweise, das auch eine Lungenentzündung verursachen kann, sekretiert ein Enzym ExoU mit Phospholipase A (PLA) und Lysophospholipase A (LPLA) Aktivitäten, welches aufgrund seiner Zytotoxizität die Lunge schädigt. Die sekretierten Phospholipasen A von *L. pneumophila* wiederum sind in der Lage, die stabilisierende Phospholipidschicht in den Lungenalveolen, das Surfactant, zu hydrolysieren, wodurch ein direkter Zusammenhang zwischen der *Legionella* PLA und der Entstehung einer *Legionella*-induzierten Pneumonie impliziert wird. Da die Proteine, die verantwortlich sind für die *L. pneumophila* PLA Aktivität, nicht bekannt waren, war es von großem Interesse, diese zu identifizieren und ihre Rolle in der bakteriellen Virulenz zu untersuchen.

Durch das Screenen der *L. pneumophila* Genomdatenbank nach kodierten Proteinen mit einem Lipasemotif sowie durch eine Proteinaufreinigung wurden sieben Proteine indentifiziert, die als mögliche Phospholipasen A in Fragen kamen und näher untersucht wurden. Diese Proteine wurden wie folgt bezeichnet: PlaB, PlaC, PlaD, PatA, Unk1, LvrE und Aas. Eine Untersuchung der entsprechenden *L. pneumophila* knockout Mutanten sowie die Expression der entsprechenden Gene in *Escherichia coli* zeigte, dass fünf dieser sieben Proteine tatsächlich Phospholipase A Aktivität besaßen. Diese fünf Proteine, PlaB, PlaC, PlaD, PatA und Aas können vier verschiedenen Lipaseuntergruppen zugeordnet werden. Die PlaB Sequenz zeigt ein modifiziertes Lipasemotif, PlaC und PlaD gehören zu den GDSL Hydrolasen, PatA ist eines von elf *L. pneumophila* Proteinen mit einer Patatindomäne und Aas gehört zu den 2-Acylglycerophospholipid Acyltransferasen.

Drei von diesen fünf neuen *L. pneumophila* lipolytischen Enzymen, nämlich PlaC, PlaD und PatA werden in den bakteriellen Kulturüberstand sekretiert. Es wurde gezeigt, dass die GDSL hydrolase PlaC eine Glycerophospholipid:Cholesterol Acyltransferase (GCAT) Aktivität besitzt,

d.h. das Enzym spaltet eine Fettsäure von einem Phospholipid ab und überträgt diese auf Cholesterol. Dabei war die gesamte sekretierte GCAT Aktivität von *L. pneumophila* auf PlaC zurückzuführen. Zusätzlich zu seiner GCAT Aktivität zeigte PlaC auch Phospholipase A und Lysophospholipase A Aktivitäten, wenn Cholesterol als Fettsäureakzeptor fehlte. PlaC wurde außerdem durch das *L. pneumophila* Typ II Sekretionssystem in den Kulturüberstand exportiert und benötigte die Anwesenheit der ebenfalls Typ II sekretierten Zinkmetalloprotease ProA für seine GCAT Aktivität. Das andere GDSL Enzym, PlaD, zeigte Lysophospholipase A Aktivität, wenn es in *E. coli* exprimiert wurde und *L. pneumophila plaD* Mutanten waren in ihren sekretierten PLA-, LPLA- und Lipase Aktivitäten reduziert, was darauf hinweist, dass PlaD ebenfalls eine sekretierte Phospholipase A ist. Die dritte sekretierte Phospholipase A, PatA, besitzt konservierte Regionen der Kartoffelphospholipase A Patatin und ist zudem homolog zu ExoU, dem *Pseudomonas aeruginosa* Toxin. Im Unterschied zu *P. aeruginosa* ExoU benötigte PatA keine Aktivierung durch einen eukaryotischen Faktor, um seine lipolytischen Aktivitäten zu entfalten. Zusätzlich zu PatA kodiert das *L. pneumophila* Philadelphia-1 Genom für zehn weitere Paraloge mit einer Patatinomäne. Da solche patatinähnlichen Proteine bis dahin als typisch für Pflanzenzellen betrachtet wurden, erfolgte eine Untersuchung anderer bakterieller Genomdatenbanken, und es zeigte sich, dass vor allem Krankheitserreger oder Symbionten von Eukaryoten patatinähnliche Proteine besitzen.

Die zwei anderen lipolytischen Enzyme, PlaB und Aas, sind mit der Bakterienzelle assoziiert. *L. pneumophila* PlaB wurde als die hautsächliche, zellgebundene Phospholipase A und lysophospholipase A identifiziert. Die PlaB Proteinsequenz besitzt außerdem Regionen mit Homologie zu der *L. pneumophila* Lipase LipB und der humanen inositol deacylase PGAP1. Das zweite zellgebundene Enzym, Aas, hat einen Einfluss auf die Lipidzusammensetzung der Bakterienzelle, weil im Vergleich zum Wildtyp *L. pneumophila aas* Mutanten einen erhöhten Anteil an Lysophospholipiden bei gleichzeitig reduziertem Anteil an Diacylphospholipiden in ihrer Zelle zeigten. Aas war zudem erforderlich, um die Bakterien vor dem zytolytischen Einfluss von Lysophosphatidylcholin zu schützen.

Die Virulenz der *L. pneumophila plaC*, *plaD*, *patA* und *aas* Mutanten wurde in Infektionsmodellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die beiden GDSL Hydrolasen PlaC und PlaD für die intrazelluläre Vermehrung entbehrlich waren, was auch schon für das dritte *L. pneumophila* GDSL Enzym, PlaA, bekannt ist, das eine Lysophospholipase A ist. Da die vorliegende Untersuchung ergab, dass alle drei GDSL Hydrolasen sich in ihren enzymatischen Aktivitäten überlappen, ist es denkbar, dass sie sich während einer Infektion gegenseitig

ersetzen können. Das sekretierte patatinähnliche Protein PatA andererseits war notwendig für eine Infektion von Amöben und Makrophagen, da die entsprechenden *L. pneumophila* Mutanten einen drastischen Wachstumsdefekt in diesen Wirtszellen aufwiesen. Das bedeutet, dass PatA das erste lipolytische *L. pneumophila* Protein mit einer Rolle in der bakteriellen Virulenz ist. Das zellgebundene Enzym Aas war nicht notwendig für eine Infektion von Amöben, Makrophagen und Epithelzellen. Da Aas jedoch notwendig ist, um *L. pneumophila* vor zytolytischen Substanzen zu schützen, könnte das Protein während einer Infektion der menschlichen Lunge von Relevanz sein, da es dort während einer Infektion durch Abbau von Lungensurfactant zu vergleichsweise hohen Lysophosphatidylcholinkonzentrationen kommen könnte.

Als Schlussfolgerung wurden in dieser Arbeit fünf Proteine identifiziert, welche zusammen den Hauptteil der sekretierten und zellgebundenen Phospholipase A Aktivität von *L. pneumophila* verursachen und eines dieser Proteine wurde als ein bakterieller Virulenzfaktor erkannt.