



# Profiling von Pathogen- Wirt-Interaktomen, die *Legionella*-Überlebens- strategien koordinieren (LegioProTect)

## Verbundkoordinator:

- Prof. Dr. Michael Steinert, Institut für Mikrobiologie, Technische Universität Braunschweig

## Projektpartner:

- Prof. Dr. Lothar Jänsch, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig
- Prof. Dr. Antje Flieger, Robert-Koch-Institut Wernigerode
- Prof. Dr. Michael Hecker/ Prof. Dr. Dörte Becher/ Dr. Birgit Voigt, Institut für Mikrobiologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
- Prof. Dr. Torsten Goldmann, Forschungszentrum Borstel



Medizinische Infektionsgenomik

Gefördert vom:



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung



*Legionella pneumophila*, der Erreger der Legionärskrankheit, ist in technischen und natürlichen Wassersystemen weit verbreitet. Die Infektion des Menschen erfolgt durch Inhalation von Legionellen-haltigen Aerosolen und anschließender Vermehrung der Bakterien in der Lunge. Legionellen kommen in verschiedenen Lebensstadien vor, die sich physiologisch und in ihrem pathogenetischen Potenzial stark unterscheiden. Die nicht kultivierbaren Dauerformen kommen in der Umwelt am häufigsten vor und stellen ein bisher unterschätztes Reservoir für die Infektion mit Legionellen dar. Im Rahmen des Verbundprojektes *LegioProTect* wurde ein systematischer Proteomvergleich der verschiedenen Legionellen-Stadien durchgeführt. Es wurde das Infektionsrisiko, das von den verschiedenen Legionellen-Stadien ausgeht und die Reaktion des Wirtes auf diese Stadien, analysiert. Hierfür wurde ein humanes *ex vivo* Lungeninfektionsmodell für Legionellen etabliert. Darüber hinaus konnten proteomische Analyseverfahren der eukaryonten Signaltransduktion erfolgreich validiert und wichtige Mechanismen der Legionellen-Pathogenese auf zellulärer Ebene aufgeklärt werden.

## Einleitung

Das Gram-negative Bakterium *L. pneumophila* verursacht beim Menschen die Legionärskrankheit, eine schwere Form der Lungenentzündung. Die Erreger kommen in der Umwelt in verschiedenen Lebensstadien vor, die sich physiologisch und in ihrem pathogenetischen Potenzial stark unterscheiden. So kommen zum Beispiel hoch umweltresistente, nicht-kultivierbare Dauerformen (VBNC-Legionellen) in der Umwelt am häufigsten vor, sind aber bislang am wenigsten charakterisiert (Steinert, 2014). Vor diesem Hintergrund wurden für das Verbundprojekt *LegioProTect* folgende Hauptziele formuliert. (i) Charakterisierung und Proteinprofiling von replikativen (RP), transmissiven (TP) und VBNC-Legionellen. (ii) Entwicklung eines realitätsnahen Infektionsmodells mit Hilfe von explantiertem humanen Lungengewebe. (iii) Proteom- und Phosphoproteom-Analysen der Pathogen-Wirt-Interaktionen. Langfristig sollen die gewonnenen

Erkenntnisse des Verbundes *LegioProTect* einer verbesserten Legionellen-Detektion dienen.

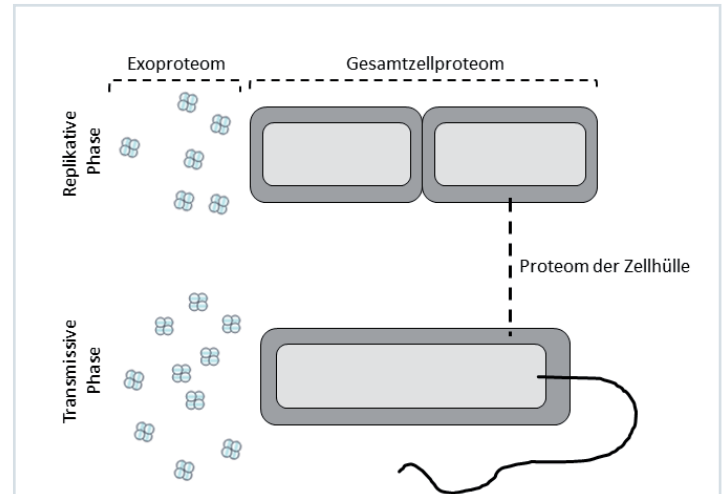
## Replikative, transmissive und VBNC-Legionellen weisen markante Unterschiede auf

Zur Charakterisierung von replikativen (RP), transmissiven (TP) und VBNC-Legionellen wurden entsprechende Legionellen-Stadien durch geeignete Kultivierungsverfahren generiert. Es konnte bestätigt werden, dass die verschiedenen Legionellen-Stadien mit den Wachstumsphasen der Bakterien korrelieren, wobei die RP-Bakterien der logarithmischen und die TP-Bakterien der stationären Wachstumsphase entsprechen (Shevchuk et al., 2011). Als Infektionsmodelle wurden Acanthamoeben (natürliche

Wirte), die Makrophagen-ähnliche Zell-Linie U937 und explantiertes humanes Lungengewebe verwendet. In den durchgeführten Infektionen erwiesen sich TP-Legionellen als hoch, RP-Legionellen als wenig infektiös.

Für die nachfolgenden Proteomanalysen mit *L. pneumophila* wurden Zellfraktionierungsmethoden entwickelt (siehe Abbildung). Sekretierte Proteine wurden aus dem Kulturüberstand heraus angereichert und der Analyse zugeführt. Zellinterne Proteine wurden durch Aufschluss und Analyse der gewaschenen, intakten Bakterienzellen untersucht. Proteine, die mit der Zellohülle assoziiert waren, wurden an den intakten Bakterien zunächst kovalent mit Biotinmolekülen markiert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss und mit Hilfe einer Affinitätsmatrix wurden biotinylierte Proteine von den anderen abgetrennt. Mit dieser Methode war es möglich, die vormals Zellohülle-assoziierten Proteine abzutrennen und separat zu analysieren. Sämtliche Proteinfractionen wurden mittels eindimensionaler-Gelelektrophorese analysiert. Dieses Vorgehen hat den Vorteil, dass Proteine über einen sehr großen Massen-, pI- und Hydrophobizitätsbereich erfasst werden können und deshalb die aufgelöste Proteinvielfalt besonders groß ist.

Mit modernen Methoden der Proteomik, insbesondere mit der GeLC-MS/MS (Kombination 1D Gel, Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie) ist eine umfassende Analyse von bakteriellen Proteomen möglich. Mit dieser Technik können die Proteine nicht nur identifiziert werden, es kann auch die Menge der einzelnen Proteine bestimmt werden. Weiterhin können in proteomweitem Maßstab Modifikationen von Proteinen untersucht werden, die für die Aktivität von Bedeutung sein können. Das räumlich und quantitativ aufgelöste Proteinprofiling wurde auf *in vitro* erzeugte replikative (RP) sowie auf transmissive (TP) Legionellen angewendet. Weiterhin wurden Proteine aus Proben, die unkultivierbare (VBNC) Legionellen enthielten, quantifiziert. Es wurden nach Applizierung interner Qualitätsstandards rund 1200 verschiedene Proteine von *L. pneumophila* identifiziert und quantifiziert, was etwa 40% der genom-basiert annotierten ORFs entspricht, und den umfassendsten bisher generierten Proteom-Datensatz für Legionellen darstellt.



**Replikative und transmissive *L. pneumophila* und die untersuchten Proteinfractionen.**

Die Flagellenbildung von Legionellen stellt ein Beispiel für einen TP-spezifischen Prozess dar.

Insgesamt konnten 90% der quantifizierten Proteine sowohl in RP als auch in TP Proben detektiert werden. Interessanterweise ließen sich Protein-Sets identifizieren, die ausschließlich in RP (rund 60 Proteine), aber nicht in TP Proben vorkommen und umgekehrt (rund 100 Proteine). Ebenfalls erwiesen sich zahlreiche Proteine als räumlich distinkt verteilt, d.h. diese wurden ausschließlich an der Zellohülle oder ausschließlich in sekretierter Form gemessen. Die Messergebnisse an VBNC Legionellen sind im Vergleich weitaus weniger komplex. Rund ¼ der in RP oder TP identifizierten Proteine konnten hier detektiert und quantifiziert werden, was mit einer generellen Reduktion der physiologischen Vorgänge in dormanten Bakterien korreliert. Gleichwohl zeichneten sich auch diese weniger komplexen Proben durch die Detektion von rund 20 Phasenexklusiven Proteinen aus. Im Ergebnis konnten durch die Proteomanalysen spezifische Stadienabhängige zelluläre Legionellen-Marker identifiziert werden, die für die Entwicklung von molekularen Nachweissystemen notwendig sind.

## Humane Lungengewebeexplantate ermöglichen detailliertere Analysen der Legionellen-Infektion

Um die Legionellen-Wirt-Interaktionen während einer humanen Infektion umfassender als bisher zu charakterisieren, wurde ein neuartiges Infektionsmodell mit lebendem menschlichen Lungengewebe entwickelt (Jäger et al., 2014). Bei den verwendeten Geweben handelt es sich um gesunde Randgebiete aus Tumorsektionen, die keine histopathologischen Auffälligkeiten aufwiesen. Im Gegensatz zu bisherigen Infektionsmodellen beinhaltet dieses Modell alle Zelltypen und extrazellulären Komponenten der menschlichen Lunge und spiegelt somit die Situation während einer Infektion *in vivo* sehr gut wieder. Darüber hinaus können in diesem Modell frühe Infektionsprozesse der humanen Infektion untersucht werden, was in *post mortem*-Studien naturgemäß nicht möglich ist. Mit Hilfe von *Legionella*-spezifischen Antikörpern wurde in explantiertem Lungengewebe eine Lokalisierung der Erreger im Gewebe vorgenommen. Hierbei gelang es insbesondere den Zeitverlauf der bakteriellen Kolonisierung im Lungengewebe zu charakterisieren. Es zeigte sich, dass *L. pneumophila* zunächst an der gesamten Alveolaroberfläche adhärirt und patrouillierende Alveolarmakrophagen rekrutiert, in denen dann die bakterielle Vermehrung stattfindet. Histopathologische Analysen ergaben, dass das Lungengewebe nach der Infektion spezifische Schäden aufweist, die aufgrund eines neu entwickelten Rating-Schemas quantifizierbar gemacht wurden. Ein besonderes Augenmerk wurde auf die bakteriellen Wachstumskinetiken der Erreger im Gewebe gelegt. Die Vermehrungsfähigkeit wildtypischer Legionellen aus der transmissiven Phase konnte in dem neuen Modell zweifelsfrei bewiesen werden. Avirulente Mutanten führten zu deutlich geringeren Gewebeschäden und konnten sich nicht replizieren. Für die Charakterisierung von Transposon-Mutationen in *L. pneumophila* wurde die Computer-Software *InFire* entwickelt und erfolgreich eingesetzt (Shevchuk et al., 2012). Interessanterweise lieferten die Ko-Inkubation von humanem Lungengewebe mit VBNC-Legionellen uneinheitliche Ergebnisse. Dies spricht für die Hypothese, dass für die Rek-

rutierung von VBNC-Stadien bestimmte Triggerfaktoren des Wirtes notwendig sind, die je nach Konstitution des Gewebespenders vorhanden oder nicht vorhanden sind.

## Protein-Profilung in humanem Lungengewebe

Im Rahmen des Verbundprojektes wurde die HOPE (Hepes-glutamic acid buffer mediated Organic solvent Protection Effect)-Fixierung für humanes Lungengewebe etabliert. Diese Fixierungsmethode erzielt vergleichbare Ergebnisse wie die Formalin-Fixierung, erlaubt aber darüber hinaus RNA- und DNA-Sequenzierungen. Durch den Vergleich von schockgefrorenen und HOPE-fixierten Gewebeschnitten konnte gezeigt werden, dass das HOPE-Verfahren auch sehr gute Ergebnisse bei Proteom- und Phosphoproteom-Analysen liefert (Shevchuk et al., 2014). Diese wichtige Erkenntnis ermöglicht es in Zukunft retrospektive Untersuchungen in HOPE-fixierten *L. pneumophila*-infizierten Lungengeweben durchzuführen.

## Fazit

Die Ergebnisse des Verbundes *LegioProTect* werden die Entwicklung von sensitiveren und genaueren Nachweismethoden ermöglichen und das Verständnis der Pathogen-Wirt-Interaktion vertiefen. Insbesondere mit der Entdeckung von neuen Nachweismarkern für nicht-kultivierbare Legionellen schafft *LegioProTect* die Voraussetzungen dafür, diese Dauerformen in ihrer Umwelt sicherer nachzuweisen und das Risikopotenzial von Trinkwasser besser einschätzen zu können.

#### Publikationen aus dem Verbundprojekt:

- Shevchuk, O., Abidi, N., Klawonn, F., Wissing, J., Nimtz, M., Kugler, C., Steinert, M., Goldmann, T., Jänsch, L. (2014) HOPE-fixation of lung tissue allows retrospective proteome and phosphoproteome studies. *J. Prot. Res.* DOI 10.1021/pr500096a
- Jäger, J., Marwitz, S., Tiefenau, J., Rasch, J., Shevchuk, O., Kugler, C., Goldmann, T., Steinert, M. (2014) Human lung tissue explants reveal novel interactions during *Legionella pneumophila* infections. *Infect. Immun.* 82:275-285.
- Steinert, M. (2014) Pathogen intelligence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4:8
- Shevchuk, O., Roselius, L., Günther, G., Klein, J., Jahn, D., Steinert, M., Münch, R. (2012) InFiRe – a novel computational method for the identification of insertion sites in transposon mutagenized bacterial genomes. *Bioinform.* 28:306-310.
- Shevchuk, O., Jäger, J., Steinert, M. (2011) Virulence properties of the *Legionella pneumophila* cell envelope. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2: 74.

Weitere Publikationen aus den Ergebnissen des Verbundprojektes sind in Vorbereitung.

