

**Aus der Universitätsklinik für
Anästhesiologie und Transfusionsmedizin Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. Northoff**

**Einfluss von
Acanthamoeba castellanii und *Hartmanella vermiformis*
auf die intrazelluläre Vermehrung von
Legionellen in humanen Monozyten**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Tanja Claudia Weiß
aus Karlsruhe**

2004

Dekan:	Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatterin:	Frau Professor Dr. B. Neumeister
2. Berichterstatterin:	Privatdozentin Dr. U. Schumacher

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Historischer Hintergrund	4
1.2	Mikrobiologie der Legionellen.....	5
1.2.1	Taxonomie	5
1.2.2	Morphologische, biochemische und immunologische Identifizierung.....	5
1.2.3	Kultur.....	6
1.3	Natürliche Standorte und Erregerreservoir	7
1.4	Klinik der Legionelleninfektion	8
1.4.1	Inzidenz der Legionellenpneumonie	8
1.4.2	Pontiac-Fieber.....	9
1.4.3	Legionellenpneumonie	10
1.4.4	Extrapulmonale Manifestationen.....	11
1.4.5	Diagnostik.....	12
1.4.6	Behandlung.....	13
1.5	Pathogenese	13
1.6	Virulenzfaktoren.....	16
1.7	Interaktionen mit Amöben.....	18
1.8	Fragestellung	24
2	Material und Methoden	26
2.1	Legionellen	26
2.1.1	Material und Chemikalien für die Anzucht der Legionellen.....	26
2.1.2	Legionellenmedium	27
2.1.3	Legionellenkultur	27
2.2	Zellkulturen	28
2.2.1	Mono Mac 6-Zellen.....	28
2.2.2	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	31
2.2.3	<i>Hartmanella vermiformis</i>	33
2.3	Amöbenüberstände	35
2.3.1	Technische Geräte, Materialien und Chemikalien	35
2.3.2	Herstellung von Amöbenüberstand	36
2.4	Infektionsversuche.....	38
2.4.1	Infektion der Mono Mac 6-Zellen mit Legionellen.....	39

Inhaltsverzeichnis

2.4.2	Infektion der Mono Mac 6-Zellen mit Legionellen und <i>Acanthamoeba castellanii</i> im Transwell	42
2.5	Gelelektrophorese	44
2.6	Filtration	45
2.7	HPL-Chromatographie	45
3	Ergebnisse.....	46
3.1	Vorversuche zur Herstellung aktiven Amöben – Überstands	46
3.1.1	Volumen des Amöben-Kulturgefäß.....	46
3.1.2	Kulturmedium.....	48
3.1.3	Amöbenkonzentration	50
3.1.4	Temperatur	52
3.1.5	Zusammenfassung der Vorversuche.....	54
3.2	Einfluss von <i>Acanthamoeba castellanii</i> und <i>Hartmanella vermiformis</i> auf die intrazelluläre Vermehrung von Legionellen in MM6-Zellen	56
3.2.1	Versuche in Kokultur	56
3.2.2	Versuche mit Überständen.....	65
3.2.3	<i>Hartmanella vermiformis</i> : Kokultur und Überstände im Vergleich.....	76
3.2.4	Überstände von <i>Acanthamoeba castellanii</i> und <i>Hartmanella vermiformis</i> im Vergleich	78
3.3	Physikalische Charakterisierung des bioaktiven Mediators	79
3.3.1	Thermostabilität.....	79
3.3.2	Molekülgröße	83
3.3.3	Lyophilisation.....	86
3.3.4	Ausschluss von ADP als Mediator	87
4	Diskussion	90
4.1	<i>Acanthamoeba castellanii</i> setzt einen bioaktiven Mediator frei.....	90
4.1.1	Wirkung auf Wirtszelle oder direkt auf <i>Legionella</i> ?.....	91
4.1.2	Effekt der veränderten Ionenkonzentration ?	93
4.2	Vergleich <i>Hartmanella vermiformis</i> und <i>Acanthamoeba castellanii</i>	94
4.2.1	Freisetzung des bioaktiven Mediators ist nicht spezifisch für <i>Acanthamoeba castellanii</i>	94
4.2.2	Tiermodell und bioaktiver Mediator.....	95

Inhaltsverzeichnis

4.2.3	Anpassung der Legionellen an bestimmte Protozoen	96
4.3	Eigenschaften des bioaktiven Mediators	97
4.4	Ausschluss von Adenosindiphosphat	98
4.5	Stress für Amöben	99
5	Zusammenfassung	100
6	Literaturverzeichnis	103

1 Einleitung

1.1 Historischer Hintergrund

Der Begriff „Legionärskrankheit“ geht auf eine Pneumonieepidemie zurück, die sich im Juli und August 1976, während des 58. Jahrestreffens der „American Legion“, des mächtigen Veteranenverbandes der USA, im Bellevue-Stratford-Hotel in Philadelphia ereignete.

Von den 4400 Teilnehmern der Konvention erkrankten insgesamt 182 Mitglieder, 29 der Erkrankten starben. Auch einige Teilnehmer des Eucharistischen Kongresses, der zur gleichen Zeit im Bellevue-Stratford-Hotel stattfand, und weitere Hotelgäste bekamen eine Lungenentzündung. Insgesamt waren im Juli 1976 in Philadelphia 221 Menschen mit den gleichen Symptomen erkrankt und 34 davon gestorben. Aufgrund des hauptsächlich betroffenen Personenkreises wurde die noch unbekannte und mysteriöse Erkrankung „Legionärserkrankung“ bzw. „Veteranenerkrankung“ genannt (Ruckdeschel und Ehret 1993, Neumeister 1996). Die Aufklärung dieser neu aufgetretenen Epidemie galt als die „größte epidemiologische Herausforderung“ des Jahrhunderts (Weisse 1992). Nach sechsmonatiger intensiver Forschung gelang es McDade und seinen Mitarbeitern des CDC (Center for Disease Control), mittels Methoden der Rickettsienanzüchtung sehr kleine „rickettsienähnliche“ Mikroorganismen im Lungengewebe eines an der Legionärskrankheit verstorbenen Patienten nachzuweisen (McDade et al. 1977). Dass die gefundenen Mikroorganismen für diese schwere Epidemie verantwortlich waren, wurde durch anschließende serologische Untersuchungen nachgewiesen. Mehr als 90 % der während des Ausbruchs gesammelten Patientenserum reagierten im Immunfluoreszenztest mit den gezüchteten Mikroorganismen und führten zu einem Anstieg des Antikörpertiters, der die spezifische Immunantwort beweist. Der Erreger der Legionärskrankheit, *Legionella pneumophila*, war entdeckt (Ruckdeschel und Ehret 1993, Neumeister 1996).

1 Einleitung

Nachdem der spezifische Antikörpernachweis mittels der indirekten Immunfluoreszenz möglich war, konnte retrospektiv anhand von eingefrorenen Patientenseren serologisch frühere Ausbrüche von *Legionella pneumophila* Infektionen festgestellt werden. Im Jahre 1968 erkrankten Besucher eines Gesundheitsamtes in Pontiac (Michigan/ USA) an einer anderen, leichteren Verlaufsform der Infektion mit *Legionella pneumophila*, die nur durch eine grippeähnliche Infektion der oberen Atemwege charakterisiert war. Diese Erkrankung forderte keine Todesopfer und wurde als Pontiac-Fieber bekannt (Glick et al. 1978). Als es gelang, Legionellen problemlos auf synthetischen Agarnährböden anzuzüchten, wurden immer mehr Spezies dieser Gattung, sowohl aus Patientenproben als auch aus Umweltmaterial, isoliert und charakterisiert (Winn 1988, Neumeister 1996).

1.2 Mikrobiologie der Legionellen

1.2.1 Taxonomie

Bisher wurden 42 Spezies und 64 verschiedene Serogruppen der Gattung *Legionella* isoliert. Von der Spezies *Legionella pneumophila* sind inzwischen 15 Serogruppen bekannt. In 91 % der Pneumonie-Fälle wird unter den isolierten Spezies *Legionella pneumophila* gefunden (Benson und Fields 1998, Breiman und Butler 1998, Fields 1996).

1.2.2 Morphologische, biochemische und immunologische Identifizierung

Legionellen sind aerob wachsende, gramnegative, 1-10 µm lange Stäbchen mit mono- oder lophotricher Begeißelung, nicht säurefest (außer *Legionella micdadei*), besitzen keine Kapsel und bilden auch keine Sporen. Sie lassen sich mit der üblichen Gram-Färbung schlecht anfärben. Eine bessere Darstellung wird mit 0,1 %-igem Karbolfuchsin, der Gimenez-Färbung, oder dem Silberimprägnationsverfahren erreicht. Optimal ist die direkte Immunfluoreszenz

(Neumeister 1996). Legionellen unterscheiden sich sowohl genetisch wie auch hinsichtlich ihrer Pathogenität erheblich voneinander. Die Zugehörigkeit des isolierten Legionellenstammes zu einer Serogruppe bzw. zu einer Spezies wird mittels direkter Immunfluoreszenz mit spezifischen monoklonalen Antiseren gegen das LPS der einzelnen Legionellen bestimmt (Ciesielski et al. 1986, Conlan und Ashworth 1986, Otten et al. 1986, Jürgens und Fehrenbach 1995). Zu beachten ist die ausgeprägte Kreuzreaktivität, sowohl innerhalb des Genus *Legionella* (Collins et al. 1983, Pelaz et al. 1987), als auch mit zahlreichen anderen gramnegativen Stäbchenbakterien (zitiert nach Neumeister 1996).

1.2.3 Kultur

Legionellen stellen ungewöhnlich hohe Nährstoffansprüche an das Kulturmedium. Im Gegensatz zu den meisten anderen Bakterien benötigen sie zwei Wachstoffsstoffe, L-Cystein und Eisenpyrophosphat, und wachsen daher nicht auf den üblichen bakteriologischen Nährmedien. Sie benötigen als Energie- und Kohlenstoffquelle Aminosäuren, jedoch keine Kohlehydrate. Zur In-Vitro-Kultur wird üblicherweise **B**uffered **C**harcoal **Y**east **E**xtract-Agar (BCYE-Agar) verwendet, der L-Cystein, α -Ketoglutarat, Aktivkohle und Hefeextrakt enthält und einen pH-Wert zwischen 6,85 und 6,95 aufweist. Die optimalen Inkubationsbedingungen sind 30-35 °C bei normaler Atmosphäre oder 5 % CO₂ und erhöhte Luftfeuchtigkeit. Auf BCYE α -Agar werden die Legionellen nach 2-3 Tagen als runde, leicht konvexe, milchglasartige, teilweise gelbliche oder blau-rosa opaleszierende Kolonien sichtbar. Die relativ lange Generationszeit von 7 Stunden deuten einige Autoren als Artefakt durch eine lange initiale Lag-Phase (Kramer und Ford 1994). Primärkulturen können bis zu 10 Tage benötigen, agaradaptierte Stämme wachsen in der Regel schneller (Ruckdeschel und Ehret 1993, Nguyen 1991a, Nguyen und Yu 1991b, Neumeister 1996).

1.3 Natürliche Standorte und Erregerreservoir

Legionellen sind weltweit vorkommende Mikroorganismen, die natürliche Gewässer wie auch künstliche Wassersysteme besiedeln (Atlas et al. 1999). Das Temperaturoptimum der Legionellen liegt zwischen 32 °C und 35 °C. Temperaturen über 60 °C haben eine bakterizide Wirkung (Kramer und Ford 1994). Wasserleitungen aus Kunststoff, Silikon oder Gummi fördern die Bildung eines Biofilms, welcher den Lebensraum für Mikroorganismen darstellt (Neumeister 1996). Innerhalb dieses Biofilms überleben die Legionellen in erster Linie in einer Ernährungssymbiose mit anderen Bakterien oder intrazellulär in Protozoen und Amöben. Die eukaryontischen Mikroorganismen *Acanthamoeba castellanii* und *Hartmanella pyriformis* stellen die häufigsten Wirte dar (Hacker et al. 1994). Mikroorganismen, Sedimente, metallische Komponenten und Korrosionsprodukte liefern direkt oder indirekt essentielle Nährstoffe, wie zum Beispiel Eisen, L-Cystein, Zink, Magnesium, Kalium, Kohlenstoff und Energie für das Wachstum der Legionellen. Legionellen besitzen eine relativ hohe Chlorresistenz, wobei der Mechanismus nicht ganz klar ist. Mehrere Faktoren werden diskutiert: Änderungen des Zellwandaufbaues, Schutz durch die Matrix des Biofilms und/oder intrazelluläres Wachstum in Protozoen und die dadurch veränderten Fettsäurestrukturen und Oberflächenproteine (Kramer und Ford 1994, Kilvington und Price 1990, Barker et al. 1993, Barker et al. 1995, Atlas et al. 1999). Legionellen können in Zysten von Amöben überleben und sind somit auch Desinfektionsmitteln und physikalischen Einflüssen gegenüber resistenter. Jedoch zeigen nur Acanthamoeben dieses Phänomen (Rowbotham 1986). Eine Assoziation zwischen der Legionellenkonzentration (für gefährdete Personen bereits ab ca. 10 CFU/l) im Wasser und dem Ausbruch von Legionelleninfektionen wurde beschrieben (Kramer und Ford 1994). Keimzahlen ab 10^4 CFU/l (*Legionella pneumophila* SG 1 als hochvirulente Subgruppe schon ab 10^2 /l) können gefährlich sein. Eine derartig hohe Legionellenbelastung des Trinkwassers wird insbesondere in Wassersystemen erreicht, die stark durch Amöben kontaminiert sind und somit über ideale Vermehrungsbedingungen für Legionellen verfügen (Neumeister 1996).

1.4 Klinik der Legionelleninfektion

1.4.1 Inzidenz der Legionellenpneumonie

Die Mehrzahl aller Legionelleninfektionen treten sporadisch und meist ohne epidemiologisch fassbare Zusammenhänge auf (Ruckdeschel und Ehret 1993). In zahlreichen prospektiven Studien über ambulant erworbene Pneumonien, die eine stationäre Behandlung erforderten, variiert die Inzidenz der Legionellenpneumonie zwischen 2 und 15 %. Legionellen gehören somit neben den Pneumokokken und *Hämophilus influenzae* zu den drei häufigsten Erregern ambulant erworbener Pneumonien (Muder et al. 1989, Fang et al. 1990, Stout und Yu 1997). Legionellen scheinen eine schwerere Pneumonie zu verursachen als die üblichen Erreger ambulant erworbener Pneumonien (Falco et al. 1991, Rello et al. 1993, Fang et al. 1990). Eine große Multicenter-Studie in Ohio zeigt, dass nur etwa 3 % der Fälle sporadisch auftretender Legionellose richtig diagnostiziert werden (zitiert nach Stout und Yu 1997).

Die Inzidenz der nosokomial erworbenen Legionellenpneumonien schwankt zwischen 1 und 40 % (Nguyen et al. 1991a). *Legionella pneumophila* SG 6 ist am häufigsten mit einer nosokomialen Pneumonie assoziiert und auch mit einem schwereren Verlauf (Harrison et al. 2001). Chirurgische, vor allem aber transplantierte Patienten haben das höchste Risiko, an einer Legionellenpneumonie zu erkranken (Lowry und Tompkins 1993). Etwa 70-85 % der Legionellenpneumonien werden durch *Legionella pneumophila* SG 1 ausgelöst, gefolgt von *Legionella pneumophila* SG 6 (10 %) und *Legionella micdadei* (6 %) (Reingold et al. 1984, Benson und Fields 1998, Breiman und Butler 1998). Oft werden auch andere Serogruppen von *Legionella pneumophila*, *L. bozemanii* und *Legionella dumoffii* als Ursache einer Legionellenpneumonie gefunden. Andere gering humanpathogene Legionellenspezies treten nur gelegentlich, insbesondere bei immunsupprimierten Patienten auf (Winn 1988, Fang et al. 1989, Winn 1993). Die Mortalität der Legionellenpneumonie beträgt zwischen 15 % und 45 % und

hängt entscheidend von einem frühzeitigen Therapiebeginn ab (Davis und Winn 1987, Pachon et al. 1990).

Das Pontiac-Fieber wird hauptsächlich von *Legionella pneumophila* SG 1, gefolgt von *Legionella pneumophila* SG 6 und *L. feelei* verursacht (Glick et al. 1978).

Infektionen, welche durch Legionellen verursacht sind, umfassen eine große Bandbreite an klinischen Symptomen; von einer asymptomatischen Serokonversion über das Pontiac-Fieber bis hin zu einer tödlich verlaufenden Pneumonie.

Die Übertragung der Legionellen vom Gewässersystem auf den Menschen geschieht über die Inhalation von Aerosolen, die die infektiöse Form der Bakterien enthalten (Abu Kwaik et al. 1998, Hoge und Brieman 1991). Solche Aerosole werden hauptsächlich mechanisch verbreitet, wie zum Beispiel über Kühltürme, Nebelmaschinen, Klimaanlage, Kühlaggregate, Duschen, Whirlpools, Springbrunnen, Wasserhähne, Beleuchteranlagen und medizinische Verneblergeräte. Jedoch ist die exakte Natur des infektiösen Partikels noch nicht bekannt. Mehrere Möglichkeiten werden diskutiert. Es könnten Legionellen sein, welche frei in der Umwelt vorkommen, nachdem sie ihren Wirt (Protozoen) oder den Biofilm verlassen haben. Des weiteren könnten die Legionellen in Vesikeln enthalten sein, welche von bestimmten *Acanthamoeba* Spezies produziert werden (Berk et al. 1998). Die dritte Möglichkeit wäre, dass Amöben, welche Legionellen beherbergen, direkt als infektiöse Partikel dienen (Brieland et al. 1997b). Die Inhalation von Aerosolen, die Amöben mit intrazellulären Legionellen enthalten, soll besonders effektiv hinsichtlich einer Infektionsinduktion sein (O'Brien und Bophal 1993). Aspiration oder auch direktes Einbringen in die Alveolen der Lunge stellen ebenfalls mögliche Infektionswege dar (Blatt et al. 1993, Yu 1993).

1.4.2 Pontiac-Fieber

Das Pontiac-Fieber ist eine akute, selbstlimitierende Erkrankung, ähnlich einem grippalen Infekt. Die Inkubationszeit beträgt zwischen 24 h und 48 h.

1 Einleitung

Charakteristisch für das Pontiac-Fieber ist der im Gegensatz zur Legionellenpneumonie auffallend hohe Kontagionsindex; bis zu 95 % der exponierten Personen erkranken, wobei beide Geschlechter und alle Altersstufen im gleichen Maße betroffen sind. Auf ein Prodromalstadium mit Unwohlsein, Myalgie und Kopfschmerzen, folgt dann hohes Fieber mit Schüttelfrost. Zusätzlich können Husten, Schnupfen und Halsschmerzen auftreten. Diarrhoe, Übelkeit und leichte neurologische Symptome, wie Schwindel oder Photophobie, können vorkommen. Eine Pneumonie ist nicht nachweisbar. Die Patienten genesen auch ohne antibiotische Therapie innerhalb einer Woche. Die Diagnose wird mittels Serumantikörper gestellt, da bei diesem Krankheitsbild die Isolation vitaler Legionellen noch nie gelungen ist (Nguyen et al.1991a, Nguyen und Yu 1991b).

1.4.3 Legionellenpneumonie

Die Legionellenpneumonie zählt zu den opportunistischen Erkrankungen und setzt somit eine gewisse Disposition des Wirts voraus. Zu den allgemeinen Risikofaktoren für die Entwicklung einer Legionellenpneumonie zählen Zigarettenrauchen, chronische Lungenerkrankungen, Alkoholismus, Diabetes mellitus, männliches Geschlecht und Lebensalter über 50 Jahre. Spezielle Risikofaktoren sind Transplantationen, Nierendialyse, immunsuppressive Therapien bzw. Krankheiten, welche mit einer Immunsuppression einhergehen und die Behandlung mit Chemotherapeutika. Die Infektion wird außerdem durch alle Einflüsse gefördert, die die mukoziliäre Clearance und die Phagozytose als Abwehrmechanismus des Respirationstraktes schädigen (Thomas 2000, Neumeister 1996). Die Inkubationszeit beträgt zwischen 2 und 10 Tagen. Während den ersten 48 h sind unspezifische Symptome wie Unwohlsein, Müdigkeit, Kopf- und Gliederschmerzen, Benommenheit, Myalgien und Schwäche sehr häufig. Hohes Fieber und Schüttelfrost kommen kurze Zeit später hinzu. Der anfänglich trockene Husten geht in einen produktiven Husten mit purulentem, teilweise blutigem Sputum über. Die Minderung des pulmonalen Gasaustausches führt zu schwerer arterieller Hypoxämie bis hin

zum ARDS (Ruckdeschel und Ehret 1993). Ein Drittel der Patienten leidet zusätzlich an pleuritischen Brustschmerzen, Dyspnoe und Thoraxschmerzen. Als unspezifische Symptome gelten die relative Bradykardie und die Hypotension (Nguyen et al. 1991a). Andere Autoren sehen die relative Bradykardie als wichtigen differentialdiagnostischen Hinweis (Fraser et al. 1977, Kirby et al. 1980). Gastrointestinale Symptome werden häufig beobachtet, vor allem wässrige, teils blutige Diarrhoen, welche in 20-40 % der Fälle auftreten. Bauchkrämpfe, Übelkeit und Erbrechen werden in 10-20 % berichtet. Neurologische Symptome manifestieren sich in Form von Kopfschmerzen über Lethargie bis hin zu einer schweren Enzephalopathie. Die auskultatorischen Befunde sind, verglichen mit den radiologischen Ergebnissen, eher geringgradig (Stout und Yu 1997, Neumeister 1996, Ruckdeschel und Ehret 1993). Laborchemisch zeigt sich eine Leukozytose mit Lymphopenie, Thrombozytopenie, erhöhte BSG, Hyponatriämie, absolute Hypophosphatämie, Hämaturie. Enzyme wie die LDH, die alkalische Phosphatase und die GOT zeigen eine gesteigerte Aktivität (Harrison et al. 2001). Die Patienten erholen sich selbst unter konsequenter antibiotischer Therapie häufig nur sehr langsam. Rezidive sind bei zu frühem Absetzen der Therapie zu beobachten (Nguyen et al. 1991a, Nguyen und Yu 1991b, Thomas 2000).

1.4.4 Extrapulmonale Manifestationen

Extrapulmonale Manifestationen der Legionellose sind selten, verlaufen aber häufig sehr dramatisch. Zu diesen gehören Sinusitis, nekrotisierende Zellulitis, Pankreatitis, Peritonitis, autoimmunhämolytische Anämie, aplastische Anämie, Myositis, Wundinfektionen, akute ulzerative Colitis, interstitielle Nephritis, akutes Nierenversagen und Tubulusnekrosen (Neumeister 1996). Die Ausbreitung erfolgt über eine Bakteriämie (Lowry und Tompkins 1993). Am häufigsten ist das Herz betroffen. Es gibt zahlreiche Berichte über Myokarditis, Perikarditis, Postkardiotomie-Syndrom und Kunstklappenendokarditis. Interessanterweise gab es in vielen Fällen keinen Zusammenhang mit einer bestehenden oder vorausgegangenen Pneumonie. Möglicherweise werden die Infektionen des

Herzens durch das Eindringen von kontaminiertem Wasser in die postoperative Wunde bzw. durch Wunddrainagen hervorgerufen (Nelson et al. 1985, Tompkins et al. 1998, Lowry et al. 1991).

1.4.5 Diagnostik

Für die Diagnose einer Legionellose werden spezielle Laborverfahren benötigt, welche nicht routinemäßig durchgeführt werden und somit eine spezielle Anforderung durch den Kliniker erfordern (Stout und Yu 1997).

Die Kultur ist der Goldstandard der Legionellendiagnostik, dazu werden mehrere Selektivmedien benützt. Die Sensitivität jedoch ist sehr niedrig (9-70 %) (Ehret 1995). Der direkte Fluoreszenztest ist schnell durchzuführen und sehr spezifisch (95-99 %). Jedoch müssen sehr viele Erreger in der Probe enthalten sein. Der Urin-Antigentest ist ebenfalls eine schnelle Methode, relativ preiswert, einfach anzuwenden und hoch spezifisch (100 %). Die Sensitivität (70 %) kann durch die Konzentrierung des Urins mittels Ultrazentrifugation gesteigert werden. Im Gegensatz zur Kultur bleibt der Test trotz antibiotischer Therapie für einige Wochen positiv. Nachteil ist, dass dieser Test nur *Legionella pneumophila* SG 1 erfasst. Serologische Tests sind sinnvoll für epidemiologische Untersuchungen, jedoch weniger wertvoll für den betreuenden Arzt. 4-12 Wochen können vergehen, bis eine Antikörperantwort messbar ist. Manche Patienten serokonvertieren nie. IgM und IgG werden getestet. Ein einfacher Titeranstieg auf $\geq 1:128$ macht eine Erkrankung wahrscheinlich, während ein Titer von $\geq 1:256$ oder ein vierfacher Titeranstieg eine Infektion beweisen. Eine klinische Diagnostik ist serologisch nur retrospektiv zu bestätigen und aufgrund einer Vielzahl möglicher Kreuzreaktionen mit erheblicher Unsicherheit behaftet. Die PCR ist eine hoch sensitive und spezifische Methode. Vorteil dieser Methode ist, dass alle Legionellenspezies getestet werden können (Stout und Yu 1997, Thomas 2000, Harrison et al. 2001).

1.4.6 Behandlung

Zur Behandlung der Legionellenerkrankung war bisher Erythromycin das Antibiotikum der Wahl. Jedoch haben die neueren Makrolide, vor allem das Azithromycin eine höhere In-Vitro-Aktivität und dringen besser in die Zellen und das Lungengewebe ein (Stout und Yu 1997). Chinolone besitzen ebenfalls eine starke intrazelluläre Wirksamkeit und ein gutes Penetrationsvermögen in das Lungengewebe. Chinolone sind die Antibiotika der Wahl bei transplantierten Patienten, da im Gegensatz zu den Makroliden und Rifampicin keine Wechselwirkungen mit Immunsuppressiva, wie zum Beispiel Cyclosporin und Tacrolimus, besteht (Harrison et al. 2001). Rifampicin ist ausgesprochen wirksam gegenüber extrazellulären und intrazellulären Legionellen. Bei einer Monotherapie jedoch ist die Gefahr einer Resistenzinduktion sehr groß, deshalb wird es nur als Kombinationstherapie mit Makroliden oder Chinolonen bei schweren Verläufen eingesetzt (Dedicoat und Venkatesan 1999). Die Behandlungsdauer sollte mindestens zwei Wochen betragen, bei Immunsupprimierten bis zu 3-4 Wochen (Simon und Stille 2001).

1.5 Pathogenese

Als entscheidender Pathogenesefaktor wird die Fähigkeit virulenter Legionellen angesehen, sich in Alveolarmakrophagen vermehren zu können (Horwitz und Silverstein 1980). Vermutungen wurden angestellt, dass Legionellen aufgrund des intensiven Kontaktes mit Protozoen die Überlebensfähigkeit in eukaryontischen Zellen erlernt haben (Hacker et al. 1994). Legionellen besitzen Pili, welche die Anhaftung an das Epithel des Respirationstraktes ermöglichen. Nach Inhalation der Erreger kommt es zur Fixierung der Komplementkomponente C 3 an das „Major Outer Membrane Protein“ (MOMP) der Legionellen. Dieser Schritt vermittelt die Phagozytose der Legionellen durch Alveolarmakrophagen (Horwitz 1992). Legionellen können Komplement auf klassischem, aber auch auf alternativem Weg aktivieren (Bellinger-Kawahara und Horwitz 1990, Mintz et al. 1995). Nach der Bildung des MOMP-Komplement-Komplexes wird *Legionella pneumophila* SG 1 über eine spezielle Form der

1 Einleitung

Phagozytose, die sogenannte „Coiling“-Phagozytose, in die Makrophagen aufgenommen (Horwitz 1984a, Payne und Horwitz 1987, Marra et al. 1990). Bei diesem Prozess wickelt sich eine lange pseudopodienartige Ausstülpung des Phagozyten spiralförmig um das Bakterium und internalisiert es, unabhängig von der Vitalität (Horwitz 1984a). Diese „Coiling“-Phagozytose scheint typisch für die komplement-vermittelte Phagozytose von *Legionella pneumophila* SG 1 zu sein. Andere Serogruppen von *Legionella pneumophila*, sowie andere Legionellenspezies werden konventionell phagozytiert (Horwitz 1984a, Weinbaum et al. 1984, Rechnitzer und Blom 1989). Nach der Phagozytose liegen die Legionellen in einem Phagosom, das von Ribosomen umgeben ist und dessen Membran vom endoplasmatischen Retikulum abstammt. In diesem Phagosom verdoppelt sich *Legionella pneumophila* innerhalb 2 h während der mid-log Phase. Das Phagosom fusioniert nicht mit den monozytären Lysosomen und wird auch nicht angesäuert (Horwitz 1983, Horwitz und Maxfield 1984b). Weiterhin ist die Bildung bakteriozider Sauerstoffradikale („oxidativer Burst“) in den Wirtszellen stark reduziert. Dieser Mechanismus scheint eine aktive Leistung der Legionellen darzustellen, da Phagosomen, welche formalininaktivierte *Legionella pneumophila* enthalten, mit dem Lysosom fusionieren. Das Phagosom wird angesäuert und die Legionellen verdaut (Horwitz und Maxfield 1984b). Allerdings konnte die Hemmung der Phagolysosomenbildung bisher nur für *Legionella pneumophila* SG 1 nachgewiesen werden, andere Serogruppen und andere Legionellenspezies, die die Phagolysosomenbildung nicht hemmen können, vermehren sich – zumindest teilweise – trotzdem intrazellulär (Rechnitzer und Blom 1989, Neumeister et al. 1997). Neuere Untersuchungen zeigen, dass die pathogene Vakuole dramatische Veränderungen in Abhängigkeit von der Zeit durchmacht. Übereinstimmend mit vorausgehenden Untersuchungen konnte die Arbeitsgruppe um Swanson zeigen, dass innerhalb der ersten 4 Stunden nach Infektion mit *Legionella pneumophila* die Phagolysosomenbildung und die Ansäuerung des Phagosoms gehemmt wird. Diese Zeit entspricht der Lag-Phase von *Legionella pneumophila*. Mit dem Übergang in die replikative Wachstumsphase (nach 4-6 h) erwerben die Vakuolen verschiedene lysosomale Proteasen und akkumulieren Stoffe des endozytären Pathways. Innerhalb 18 h enthalten 70 % der Vakuolen

1 Einleitung

lysosomale Membranproteine wie LAMP-1, ein spätes endosomales und lysosomales Protein und 40 % enthalten Cathepsin D (lysosomale Protease). In 3-6 h alten Phagosomen, die vitale *Legionella pneumophila* enthalten, herrscht ein pH-Wert von 7,4, im Gegensatz zu Phagosomen, welche inaktivierte *Legionella pneumophila* enthalten und angesäuert werden (pH 5,5). Innerhalb 16-20 h nach Infektion mit *Legionella pneumophila* wird die Mehrzahl der Vakuolen angesäuert und der mittlere pH-Wert liegt bei 5,6. Für die Ansäuerung der Vakuolen ist die Aktivität von ATP-ase erforderlich. Ferner scheint der Aufenthalt in lysosomalen Kompartimenten das Wachstum von *Legionella pneumophila* zu unterstützen. Eine Neutralisation des endosomalen Kompartiments hemmt sogar die Ausreifung der Vakuole und die bakterielle Replikation. Die Replikationsphase liegt zwischen 20-28 h, wonach es zur Lyse der Wirtszelle kommt (Sturgill-Koszycki und Swanson 2000, Swanson und Hammer 2000, Joshi et al. 2001). Zwei Phasen der intrazellulären Vermehrung werden beschrieben, die erste Phase ist durch die aktive Multiplikation der Bakterien charakterisiert, welche sich im frühen Stadium der Wirtszellinfektion finden lässt, diese Bakterien sind unbeweglich und haben eine „zerknitterte“ Zellwand. Während der zweiten „aktiven Infektionsphase“ werden kurze, stark bewegliche Stäbchen beobachtet, die mit einem späteren Infektionsstadium und der Lyse der Wirtszellen in Zusammenhang stehen. Diese Verwandlung lässt auf einen sehr komplexen und präzisen Wachstumszyklus schließen, in welchem Beweglichkeit sehr eng mit der Freisetzung der Bakterien verknüpft ist (Rowbotham 1986). Während der intrazellulären logarithmischen Wachstumsphase werden zahlreiche Virulenzmerkmale, wie NaCl-Sensitivität, osmotische Resistenz, Zytotoxizität und Beweglichkeit gehemmt, welche dann in der postexponentiellen Wachstumsphase wieder induziert werden (Byrne und Swanson 1998). *Legionella pneumophila* zerstört ihre „menschliche“ Wirtszelle in zwei Schritten (Gao und Abu Kwaik 1999). Im ersten Schritt, während des frühen Stadiums der Infektion, induziert *Legionella pneumophila* Apoptose durch Aktivierung von Caspase-3 in Makrophagen, Monozyten und Alveolarepithelzellen. Die Apoptoseinduktion ist unabhängig von der bakteriellen Wachstumsphase, wohl aber abhängig von der Infektionsdosis. Der zweite Schritt wird durch eine rasche Nekroseinduktion und anschließender Zytolyse der

Makrophagen, durch ein „pore-forming“ Toxin bzw. Aktivität vermittelt. Diese Aktivität ist zeitlich begrenzt, unterdrückt während der exponentiellen Wachstumsphase und maximal exprimiert, sobald die Bakterien ihre Replikation beenden und in die postexponentielle Wachstumsphase übergehen (Alli et al. 2000). Das Signal, welches die Expression des „pore-forming“ Toxins in den intrazellulären Legionellen auslöst, ist noch nicht bekannt. Faktoren wie Nährstoffmangel oder die Verlangsamung von Stoffwechselprozessen könnten daran beteiligt sein.

1.6 Virulenzfaktoren

Im Laufe der Zeit konnten verschiedene Virulenzfaktoren von Legionellen charakterisiert werden. Die Inkubationstemperatur der Legionellenkultur, wie auch das Nährmedium und das Nährstoffangebot beeinflussen die Virulenz der Legionellen (Edelstein et al. 1987, Mauchline et al. 1994, McDade und Shepard 1979, Catrenich und Johnson 1989, Yamamoto et al. 1993). Solange das Nährstoffangebot in der Wirtszelle günstig ist, produzieren die Legionellen Faktoren, um eine maximale Replikation zu gewährleisten. Während dieser intrazellulären Wachstumsphase sind die Erreger NaCl-resistent und besitzen auch keine Flagellen. Werden die Nährstoffe bzw. die Aminosäuren knapp, exprimieren die Legionellen Faktoren, um die verbrauchte Wirtszelle zu lysieren. Dieser virulente Phänotyp geht mit einer NaCl-Sensitivität, osmotischen Resistenz, Zytotoxizität, Beweglichkeit und der Fähigkeit, sich lysosomaler Verdauung entziehen zu können, einher (Byrne und Swanson 1998). MIP, ein Oberflächenprotein (**M**acrophage **I**nfectivity **P**otentiator) und DOT, ein integrales zytoplasmatisches Membranprotein (**D**efect in **O**rganelle **T**rafficking) werden mit der intrazellulären Vermehrungsfähigkeit sowohl in Phagozyten als auch in Protozoen in Zusammenhang gebracht (Cianciotto et al. 1989, Cianciotto und Fields 1992). Ebenfalls für die intrazelluläre Vermehrung verantwortlich ist ICM (**I**ntracellular **M**ultiplication **L**ocus) (Marra et al. 1992). Das Legionellatoxin hemmt den „oxidativen Burst“ in neutrophilen Granulozyten und wirkt zytotoxisch. Das **M**ajor **O**uter **M**embrane **P**rotein (MOMP) wurde in

1 Einleitung

der Zellwand aller Spezies außer *L. bozemanii* gefunden und ist für die Bindung an Komplement verantwortlich (Butler et al. 1985). Das MSP (**M**ajor **S**ecretory **P**rotein), welches der Zink-Metalloprotease entspricht, besitzt proteolytische, hämolytische und zytotoxische Eigenschaften. Das Legiolysin besitzt hämolytische Eigenschaften und ist für die Pigmentbildung, die Fluoreszenz und den Lichtschutz verantwortlich (Wintermeyer et al. 1991). Wichtig für den Eisenmetabolismus sind die Aconitase (**M**ajor **I**ron **C**ontaining **P**rotein: MICP), das FUR (**F**erric **U**ptake **R**egulation Protein) und die periplasmatische Eisenreduktase. Der Transferrinrezeptor wird bei Interferon- γ -aktivierten humanen Monozyten herunterreguliert und führt durch die damit verminderte Bereitstellung von Eisen zu einer Hemmung der intrazellulären Vermehrung (Byrd und Horwitz 1989). Weiterführende Untersuchungen von Byrd zeigen, dass bei einer extrem niedrigen Transferrinrezeptorexpression auf humanen Monozyten keine intrazelluläre Vermehrung von *Legionella pneumophila* möglich ist (Byrd und Horwitz 2000). Die Transferrinrezeptorexpression jedoch ist variabel und zum Beispiel durch INF- γ herunterregulierbar (Neumeister et al. 1998). Die Ausbildung von Flagellen ist für die Bakterienmotilität und Immunogenität verantwortlich. Neue Untersuchungen zeigen, dass Flagellen von *Legionella pneumophila* die frühe Phase der Infektion eukarionter Wirtszellen positiv beeinflussen. Die Expression von Flagellen ist speziell für das initiale Zusammenkommen von Legionellen und deren jeweiligen Wirte von Bedeutung (Dietrich et al. 2001). Das LPS trägt zur Serogruppenspezifität bei, hat eine geringe Endotoxinaktivität und aktiviert Komplement (Übersicht bei Neumeister 1996). Mutanten von *Legionella pneumophila* wurden gefunden, welche Defekte in der Zytopathogenese, intrazellulärem Überleben und Vermehrung in humanen Makrophagen, jedoch nicht in Protozoen aufweisen. Dieser defekte Genlocus wird „mil“ (**m**akrophage-spezific infectivity loci) genannt. Mil ist nicht zellspezifisch, sondern speziesspezifisch (Gao et al. 1998).

1.7 Interaktionen mit Amöben

Die umfangreichste Bakteriengattung, welche fast ausschließlich als Parasiten einzelliger Protozoen überlebt, ist die der Legionellen. Die Fähigkeit in Protozoen zu überleben ist ein Charakteristikum dieser Bakterien (Fields 1996). Diese hochentwickelte Wechselbeziehung zwischen Legionellen und Protozoen ist der maßgebliche Faktor in der beständigen Präsenz der Erreger in der Umwelt (Abu Kwaik et al. 1998). Neben den Legionellen gibt es mehrere andere Bakterienarten wie Mycobakterien, Chlamydien, Listerien, Burkholderia und Francisella, welche Krankheitserreger für den Menschen darstellen und Protozoen infizieren können (Harb et al. 2000). Bislang ist erst wenig über die Natur dieser Bakterien-Protozoen Interaktion bekannt.

1980 beschrieb Rowbotham erstmalig die Fähigkeit zur intrazellulären Vermehrung von *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba* und *Naegleria* (Rowbotham 1980). In der Folgezeit erschien eine Anzahl von Publikationen, die die Vermehrung von verschiedenen Legionellenspezies auch in anderen Protozoenarten charakterisierten (Tyndall und Domingue 1982, Holden et al. 1984, Fields et al. 1984, Rowbotham 1986, Vandenesch et al. 1990, Smith-Somerville et al. 1991, Moffat und Tompkins 1992). Legionellen können sich in 13 verschiedenen Amöbenspezies und zwei unterschiedlichen begeißelten Protozoen vermehren. Dies war ziemlich verblüffend, da Protozoen Bakterien eigentlich als Nahrungsquelle phagozytieren (Abu Kwaik et al. 1998). *Legionella pneumophila* besitzt das umfassendste Wirtsspektrum unter den Legionellen. Andere Legionellenspezies sind in Bezug auf ihre Wirtszellen sehr eingeschränkt, derzeit ist nur eine Amöbenspezies bekannt, welche das Wachstum von *L. anisa* unterstützt. Es existieren keine Aufzeichnungen über extrazelluläre Vermehrung von Legionellen im Gewässersystem (Fields 1996). Bei niedrigen Wassertemperaturen sind Amöben in der Lage, die phagozytierten Legionellen zu zerstören, während Warmwasser mit Temperaturen zwischen 37 °C und 49 °C die intrazelluläre Vermehrung sogar fördert (Tyndall und Domingue 1982, Smith-Sommerville et al. 1991). Amöben benötigen ein reichhaltiges Nährstoffangebot und eventuell zusätzliche Faktoren, um das intrazelluläre Legionellenwachstum zu unterstützen. Wenn

1 Einleitung

sie in sehr reduziertem Nährmedium gehalten werden, findet kein intrazelluläres Legionellenwachstum statt, und die Legionellen werden zerstört (Rowbotham 1986).

Legionellen haben die verschiedenartigsten Mechanismen entwickelt, um in Protozoen einzudringen. Die anfängliche Wechselwirkung zwischen intrazellulären Erregern und Wirtszelle wird über die Bindung eines bakteriellen Liganden, wie z.B. Pili, an einen Oberflächenrezeptor der Wirtszelle vermittelt. Ein genetischer Beweis für die Expression mindestens zwei unterschiedlicher Pili auf der Zelloberfläche von *Legionella pneumophila* wurde erst kürzlich erbracht. Einer dieser Pili ist ein Typ IV Pilus, welcher als CAP (**C**ompetence- and **A**dherence-associated **P**ili) bezeichnet wird. Mutanten von *Legionella pneumophila*, welche kein CAP exprimieren können, zeigen eine reduzierte Bindung an Protozoen, die intrazelluläre Vermehrung jedoch wird dabei nicht beeinflusst (Stone und Abu Kwaik 1998). Folglich ist CAP von *Legionella pneumophila* an der Bindung an Protozoen beteiligt. CAP könnte *Legionella pneumophila* einen selektiven Vorteil bei der Bindung an Oberflächen und Biofilmen in der Umwelt liefern (Abu Kwaik et al. 1998). Der Wirtszellrezeptor, an den CAP bindet, ist noch nicht bekannt (Weissgerber et al. 2003). Legionellen werden einzeln, aber auch zu mehreren in die Wirtszellen aufgenommen (Rowbotham 1986, Fields et al. 1993). Nur 0,05 % extrazellulärer Legionellen binden nach einer Stunde an die Amöben. Diese ineffektive Bindungsrate virulenter wie avirulenter Stämme von *Legionella pneumophila* ist identisch, jedoch werden nur virulente *Legionella pneumophila* aufgenommen. Diese Beobachtungen unterstützen die Vermutung einer mikrofilamentenunabhängigen Endozytose und deuten darauf hin, dass die Aufnahme der Bakterien und nicht die Bindung der entscheidende Schritt im Invasionsprozess ist (Fields et al. 1993).

Die Bindung von *Legionella pneumophila* an *Hartmanella vermiformis* wird durch einen Protozoenrezeptor vermittelt, welcher als Galaktose/N-Acetylgalactosamine-Lectin (Gal/GalNAc-Lectin) beschrieben wird. Die Bindung von *Legionella pneumophila* an Gal/ GalNAc-Lectin löst eine Signaltransduktion in *Hartmanella vermiformis* aus, welche zu einer dramatischen

1 Einleitung

Tyrosindephosphorylierung des Lektinrezeptors und anderer Proteine führt, wie z. B. der Zytoskelettproteine Paxillin, Vinculin und der fokalen Adhäsionskinase (Venkataraman et al. 1997). Dieser Dephosphorylierungsprozess ist spezifisch für *Legionella pneumophila*, ist vom Kontakt lebensfähiger *Legionella pneumophila* abhängig und lässt sich durch einen Tyrosinphosphataseinhibitor blocken. Tyrosinphosphatasen haben die Fähigkeit, das Zytoskelett von Säugetierzellen zu zerstören. Folglich könnte sich die induzierte Tyrosinphosphataseaktivität in *Hartmanella vermiformis* während der Aufspaltung des protozoischen Zytoskelettes manifestieren, um das Eindringen durch Zytoskelett-unabhängige Rezeptor-vermittelte Endozytose zu erleichtern (Abu Kwaik et al. 1998). Durch das Eindringen von Legionellen wird eine spezifische Genexpression in *Hartmanella* induziert, eine Hemmung dieser Genexpression blockiert das Eindringen der Bakterien (Abu Kwaik et al. 1994). Untersuchungen zeigen unterschiedliche Mechanismen in der Bindung und anschließenden Aufnahme von *Legionella pneumophila* durch *Hartmanella vermiformis* und durch *A. polyphaga*. Die Aufnahme von *Legionella pneumophila* durch *Hartmanella vermiformis* wird durch monovalente Zucker vollständig blockiert, die Aufnahme von *Legionella pneumophila* in *A. polyphaga* jedoch nur teilweise. Darüber hinaus geht die Bindung von *Legionella pneumophila* an *Hartmanella vermiformis* mit einer reversiblen Dephosphorylierung zahlreicher Proteine der Wirtszelle einher. Im Gegensatz dazu kommt es während der Infektion von *A. polyphaga* nur zu einer unwesentlichen Dephosphorylierung eines Proteins (Harb et al. 1998). Dieses Phänomen zeigt die bemerkenswerte Anpassungsfähigkeit von *Legionella pneumophila*, um in verschiedene protozoische Wirte einzudringen. Die anschließende Aufnahme von *Legionella pneumophila* durch Protozoen geschieht durch konventionelle und durch Coiling-Phagozytose (Abu Kwaik 1996, Bozue und Johnson 1996). Die Replikation innerhalb von Protozoen entspricht der in Makrophagen. Auch in Protozoen kommt es nicht zu einer Phagosom-Lysosom Fusion und die Legionellen vermehren sich in einem sogenannten replikativen Phagosom, welches von rauhem endoplasmatischem Retikulum umgeben ist (Bozue und Johnson 1996, Abu Kwaik 1996, Vogel und

Isberg 1999). Die bemerkenswerte Ähnlichkeit der intrazellulären Infektion der beiden evolutionär unterschiedlichen Wirtszellen, Makrophagen und Protozoen, ließ darauf schließen, dass *Legionella pneumophila* die gleichen molekularen Mechanismen und die gleichen Gene verwendet um die Wirtszellprozesse von Makrophagen und Protozoen zu manipulieren (Gao et al. 1997, Segal und Shuman 1999). Weiterführende Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Gao haben jedoch Mutanten von *Legionella pneumophila* aufgezeigt, welche Defekte in der Zytopathogenese, im intrazellulären Überleben und in der Vermehrung in humanen Makrophagen, jedoch nicht in Protozoen aufweisen. Dieser, den Mutanten fehlende Genlocus, wird „mil“ genannt (Gao et al. 1998). Darüber hinaus wurde ein Genlocus von *Legionella pneumophila* gefunden, welcher für die Replikation in U 937 und in *A. polyphaga* notwendig ist. Dieser Genlocus wird als „pmi“ (**p**rotozoan and **m**acrophage **i**nfektivty loci) bezeichnet (Gao et al. 1997).

Legionella pneumophila induziert in *Acanthamoeba* keine Apoptose, obwohl *Acanthamoeba* die Fähigkeit zur Apoptose besitzt. Die Zerstörung von *A. polyphaga* wird durch eine Nekroseinduktion verursacht, welche durch die „pore-forming“ Aktivität von *Legionella pneumophila* vermittelt wird. Mutanten, welchen die „pore-forming“ Aktivität fehlt, haben eine identische intrazelluläre Vermehrung, sind jedoch unfähig, den Wirt zu zerstören und bleiben somit intrazellulär gefangen (Gao und Abu Kwaik 2000, Harb et al. 2000).

Das intrazelluläre Wachstum von *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba* führt in-vitro zu einer 100-fach höheren Infektiosität gegenüber Epithelzellen und einer 10-fach höheren Infektiosität gegenüber Makrophagen und *Acanthamoeba castellanii*. Die Morphologie und Struktur von *Legionella pneumophila* ändert sich dramatisch durch die intrazelluläre Replikation in *Acanthamoeba*. Darüber hinaus werden *Legionella pneumophila* nach intrazellulärer Vermehrung in Amöben häufiger mittels Coiling-Phagozytose durch Makrophagen aufgenommen als auf Agar gewachsene Bakterien. Diese Beobachtungen könnten mit der Expression zusätzlicher Proteine zusammenhängen, die *Legionella pneumophila* während des intrazellulären Wachstums in Amöben produziert und die möglicherweise zu einer Triggerung

1 Einleitung

der Coiling-Phagozytose führen (Abu Kwaik et al. 1994, Barker et al. 1993). Diese Erkenntnisse lassen den Schluß zu, dass die Vermehrung von Legionellen innerhalb von Protozoen deren anschließende Fähigkeit, Säugetierzellen zu infizieren, in-vivo erheblich steigert (Cirillo et al. 1994).

Brieland stellte einen Tierversuch vor, um daran den Einfluss von *Hartmanella vermiformis* auf eine Legionelleninfektion zu untersuchen. Sie injizierte den Versuchstieren intratracheal *Legionella pneumophila* oder *Legionella pneumophila* und Amöben der Gattung *Hartmanella vermiformis*. Analysen des Lungengewebes ergaben, dass Mäuse, welche nur mit *Legionella pneumophila* infiziert wurden, eine multifokale Pneumonie mit einer geringen Mortalität entwickelten. Die Koinjektion von *Legionella pneumophila* und *Hartmanella vermiformis* führte zu einer diffusen Pneumonie mit einer verminderten intrapulmonalen Rekrutierung von Lymphozyten und mononukleären Phagozytosezellen und einer signifikant gesteigerten Mortalität. Zusätzlich kam es zu einer vierfach höheren intrapulmonalen Konzentration an Interferon- γ und TNF- α (Brieland et al. 1996b). Daraufhin wurde der Effekt von *Hartmanella vermiformis* auf das intrapulmonale Wachstum von *Legionella pneumophila* an resistenten Wirtszellen (BALB/c-Mäuse) untersucht. Während nur mit *Legionella pneumophila* infizierte BALB/c-Mäuse keine Legionellenpneumonie entwickeln, kam es durch die Koinhalation zu Pneumonien mit einer Mortalität von 30 %. Diese Ergebnisse zeigen den potenzierenden Einfluss intrapulmonaler *Hartmanella vermiformis* auf die Legionellenpneumonie, sowohl in empfindlichen als auch in resistenten Wirten. Weitere Untersuchungen an A/J-Mäusen mit einem für *Hartmanella vermiformis* avirulenten Stamm von *Legionella pneumophila*, welcher jedoch seine volle Virulenz für mononukleäre Phagozytosezellen behalten hat, wurden durchgeführt. Diese Studie demonstriert, dass für das maximale intrapulmonale Wachstum der Legionellen in A/J-Mäusen, welchen zusätzlich *Hartmanella vermiformis* injiziert wurden, die vollständige Virulenz der Legionellen für die Amöben erhalten sein muß (Brieland et al. 1997a). Versuchstiere, die intratracheal mit *Legionella pneumophila*-infizierten *Hartmanella vermiformis* infiziert wurden, bekamen eine deutlich aggressivere Legionellenpneumonie als Vergleichsmäuse mit einer

1 Einleitung

äquivalenten Menge an alleinig injizierten *Legionella pneumophila* oder einer Koinjektion von *Legionella pneumophila* und *Hartmannella vermiformis* (Brieland et al. 1997b).

Erstmals gelang es Reiff (2002) auf der Basis des von Neumeister et al. (1997) etablierten In-Vitro-Zellkulturmodells ein Kokulturmodell zu entwickeln, in dem Interaktionen von Makrophagen, Legionellen und Amöben untersucht werden können.

Als repräsentative natürliche Wirtszelle von Legionellen wurde *Acanthamoeba castellanii* ausgewählt, da sich diese Amöbenspezies als besonders geeignet hinsichtlich Untersuchungen von Interaktionen zwischen Legionellen und Amöben gezeigt hat (Neumeister et al. 1997). Die von Reiff (2002) verwendeten MonoMac6-Zellen stellen eine reife, permanente Zelllinie aus monozytären Leukämiezellen dar, besitzen fast identische Oberflächenmarker wie reife Monozyten und sind zur Zytokinproduktion fähig (Ziegler-Heitprock et al. 1988, Neumeister et al. 1997, Neumeister et al. 1998, Marra et al. 1990). Um einen direkten Einfluss der Amöben auf die infizierten MM6 Zellen auszuschließen, wurden die Zellen durch eine Transwell-Membran getrennt.

Die Ergebnisse der Kokulturversuche Reiffs zeigen unterschiedliche Einflüsse von *Acanthamoeba castellanii* auf die intrazelluläre Vermehrung der verschiedenen Legionellenspezies .

Bei *Legionella pneumophila* SG1, Subtyp Pontiac, Vertreterin der humanpathogenen Spezies, konnte die bereits initiale intrazelluläre Vermehrung um etwa vier Logarithmenstufen durch *Acanthamoeba castellanii* in Kokultur nicht weiter gesteigert werden.

Legionella gormanii, *Legionella micdadei*, *Legionella longbeachae*, Vertreterinnen der mäßig bis gering pathogenen Spezies und *Legionella steigerwaltii*, als apathogene Spezies zeigen eine nur mäßige intrazelluläre Vermehrungsfähigkeit in MM6-Zellen, welche aber durch *Acanthamoeba castellanii* in Kokultur signifikant gesteigert werden konnte.

Legionella dumoffii, mäßig pathogen, ist unfähig sich in MM6-Zellen zu vermehren. Durch Zugabe von *Acanthamoeba castellanii* lässt sich eine etwa

10-fache intrazelluläre Vermehrung induzieren. Dieser Effekt ist nur mit uninfizierten Amöben zu erzielen.

Die Vermehrungsversuche durch Zugabe von Überständen der vorangegangenen Infektion zeigten folgende Ergebnisse: Die Vermehrung von *Legionella dumoffii* ließ sich durch Überstände nach einer vorangestellten *Legionella dumoffii* Kokulturfektion signifikant steigern.

Diese Beobachtung gibt Anlass zu vermuten, dass Amöben eine Substanz produzieren, die einen vermehrungssteigernden Effekt auf die intrazelluläre Replikation von Legionellen hat.

1.8 Fragestellung

Ausgehend von der Arbeit Brielands et al. (1997b), die im Tiermodell beobachtete, dass intrapulmonale *Hartmannella vermiformis* auf die Legionellen-Pneumonie einen potenzierenden Einfluss haben, entwickelte Reiff ein Zellkulturmodell, in dem der Einfluss von Amöben auf die Vermehrung von Legionellen in infizierten Makrophagen in einem definierten Zellkulturmodell untersucht werden kann.

Damit konnte sie zeigen, dass *Acanthamoeba castellanii* einen positiven Effekt auf die intrazelluläre Vermehrung von verschiedener Legionellenspezies in MM6-Zellen hat.

Besonders interessant erscheint die Beobachtung, dass dieser Effekt nicht nur auftritt, wenn Amöben und Legionellen-infizierte MM6-Zellen im selben Medium, durch eine Transwell-Membran getrennt, kultiviert werden, sondern auch durch die Zugabe eines zellfreien Überstands einer vorangegangenen Kokulturfektion zu einer Legionelleninfektion erreicht werden kann. So ließ sich die Vermehrung von *Legionella dumoffii* durch die Zugabe von Überstand einer *Legionella dumoffii*-Kokulturfektion signifikant steigern. Dieses Ergebnis führt zu der Annahme, dass *Acanthamoeba castellanii* eine Substanz sezerniert, die in der Lage ist, die intrazelluläre Vermehrung von Legionellen zu potenzieren.

1 Einleitung

Für diese Arbeit ergeben sich folgende Fragestellungen:

- Unter welchen Bedingungen sezerniert *Acanthamoeba castellanii* die Substanz? Ist die Sekretion abhängig von der Kokultur mit Legionellen-infizierten Makrophagen oder findet man sie auch in Überständen, die unter anderen Versuchsbedingungen gewonnen wurden?
- Ist der Effekt spezifisch für *Acanthamoeba castellanii* oder sind auch andere Amöbenspezies in der Lage, eine für Legionellen vermehrungsfördernde Substanz zu produzieren? Neben *Acanthamoeba castellanii* ist *Hartmanella vermiformis* der zweite wichtige Protozoen-Wirt für Legionellen, so dass es interessant scheint zu untersuchen, ob auch diese Spezies die Fähigkeit besitzt, eine ähnlich aktive Substanz freizusetzen.
- Um die Substanz näher zu charakterisieren und eine erste Eingrenzung der infragekommenden Substanzklassen zu ermöglichen, sollen physikalischen Eigenschaften wie Hitzeinaktivierbarkeit, Bioaktivität nach Lyophilisation und Größe und Ladung der im Überstand enthaltenen Moleküle untersucht werden.
- *Acanthamoeba castellanii* ist in der Lage ADP freizusetzen. Dieses extrazelluläre ADP erhöht in anderen Zellen den zytosolischen Kalziumspiegel und dient damit als Signalmolekül für Prozesse wie Apoptose (Mattana 2001). ADP könnte somit unsere gesuchte Substanz sein, die von *Acanthamoeba castellanii* sezerniert wird und Ca^{2+} -vermittelt die intrazelluläre Vermehrung von Legionellen in MM6-Zellen fördert. Diese Hypothese soll im Rahmen dieser Arbeit falsifiziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Legionellen

Für die Versuche wurden folgende Legionellenspezies und -serogruppen aus der Stammsammlung der Abteilung Transfusionsmedizin der Universität Tübingen verwendet:

als Vertreter von humanpathogenen Spezies:

- *Legionella (L.) pneumophila* Serogruppe 1, Subtyp Pontiac
(Patientenisolat aus München, freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. G. Ruckdeschel, Max-von-Pettenkofer-Institut der Universität München, zur Verfügung gestellt)

als Vertreter mäßig humanpathogener Spezies:

- *Legionella (L.) dumoffii* (NY 23), ATCC 33279
- *Legionella (L.) micdadei* (Tatlock), ATCC 33218
- *Legionella (L.) longbeachae* Serogruppe 1 (Long Beach 4), ATCC 33462

als Vertreter gering pathogener Spezies:

- *Legionella (L.) gormanii* (LS 13), ATCC 32979

als Vertreter apathogener Spezies:

- *Legionella steigerwaltii* ATCC 35302

2.1.1 Material und Chemikalien für die Anzucht der Legionellen

Es wurden die in Tab. 2.1 beschriebenen Materialien und Chemikalien verwendet.

2 Material und Methoden

Tab. 2.1: Materialien und Chemikalien für die Anzucht der Legionellen

Materialien/ Chemikalien	Bezugsquelle
Lysiertes Pferdeblut	Oxoid, Wesel
Legionella-Wachstumssupplement,	Oxoid, Wesel
Columbia-Blutagar (Kontroll-Agar)	Oxoid, Wesel
Impfschlingen, 10 µl	Sarstedt, Nümbrecht
BCYE- α - Agarplatten	Heipha Biotest

2.1.2 Legionellenmedium

Zusammensetzung der BYE-Bouillon

1 g Hefeextrakt wurde in 1 l Aqua dest. gelöst und 15 min bei 121 °C autoklaviert. Danach wurde Wachstumssupplement, das aus 5 g ACES, 0,2 g L-Cystein, 0,125 g Eisenpyrophosphat, 0,5 g α -Ketoglutarat und 1,0 g KOH (pH-Einstellung auf 6,9) besteht, zugegeben. Die gesamte Bouillon wurde anschließend sterilfiltriert und portioniert.

2.1.3 Legionellenkultur

Die Legionellen der Stammsammlung lagern eingefroren bei -70 °C in lysiertem Pferdeblut. Die für die Versuche benötigten Stämme wurden durch schnelles Erwärmen aufgetaut, unter sterilen Bedingungen auf eine BCYE-Agarplatte gegeben und mit einer Einmalimpföse verteilt. Die so beimpften BCYE-Platten wurden 2 bis 4 Tage bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ bebrütet. Danach wurde je eine Subkultur als 3-Ösen-Ausstrich hergestellt und erneut 4 bis 7 Tage bebrütet. Erst dann konnten die benötigten Stämme für einen Versuch verwendet werden. Als Kontrolle der Reinkultur diente eine Subkultur auf Columbia-Blutagar, auf dem Kontaminanten, jedoch keine Legionellen wachsen können.

2.2 Zellkulturen

Für die Versuche wurden Mono Mac 6 (MM6)-Zellen, die als Zelllinie aus Monozyten einer monozytären Leukämie etabliert wurden (Ziegler-Heitbrock et al. 1988), *Acanthamoeba (A.) castellanii* und *Hartmanella (H.) vermiformis* (zur Verfügung gestellt von Dr. Jürgen Hellbig, Institut für Medizinische Mikrobiologie TU Dresden) verwendet.

2.2.1 Mono Mac 6-Zellen

2.2.1.1 Technische Geräte und Materialien

Die für die Zellkulturen verwendeten technischen Geräte und Materialien sind in Tab. 2.2 und Tab 2.3 aufgelistet.

Tab. 2.2: Technische Geräte

Technische Geräte	Bezugsquelle
Zentrifuge (TI-6)	Beckmann, UK
CO ₂ Water-Jacket Incubator	Multimed Wicker, Kirchheim unter Teck
Sterile Werkbank	Heraeus, Hanau
Lichtmikroskop	Zeiss, Jena
Invert-Mikroskop IMT-2	Olympus
Vortex	Bender und Hobein, Zürich

Tab. 2.3: Materialien

Materialien	Bezugsquelle
Zentrifugenröhrchen (Bluecap-Röhrchen, 50 ml),	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Einmal-Pipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 25 ml)	Greiner, Frickenhausen
Neubauer-Zählkammer	Bender und Hobein, Zürich
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Costar, Bodenheim
Kryoröhrchen	Eppendorf, Hamburg
Trypanblau (0,4 %)	Sigma, München

2 Material und Methoden

2.2.1.2 Chemikalien

Für die MM6-Zellen benötigten Chemikalien sind in Tab. 2.4 dargestellt.

Tab. 2.4: Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
RPMI 1640-Nährmedium mit 25 mm Hepes Buffer, ohne L-Glutamin	Gibco, Eggenstein
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein
OPI-Supplement (Oxalacetat-Pyruvat-Insulin)	Sigma, München
MEM nicht-essentielle Aminosäuren (enthält: L-Alanin, L-Asparagin, L-Asparaginsäuren, L-Glutaminsäure, Glycin, L-Prolin, L-Serin)	Gibco, Eggenstein
Fötale Kälberserum (Myoclon super plus)	Gibco, Eggenstein
Distilled Water, tissue culture tested	Gibco, Eggenstein
DMSO	Sigma, München

2.2.1.3 Kulturmedium und Infektionsmedium

Kulturmedium

Die Anzucht und Kultivierung der MM6-Zellen erfolgte in RPMI 1640 Medium, das folgende Zusätze in der Endkonzentration enthielt (Mono-Mac-Medium, entwickelt von Ziegler-Heitbrock et al. 1988):

- 10 % fötales Kälberserum (Myoclon plus, 0,5 h bei 56 °C im Wasserbad inaktiviert)
 - 1 % -Glutamin
 - 1 % nicht-essentielle Aminosäuren
 - 1 % OPI-Lösung (Oxalacetat 1 mmol, Pyruvat 1 mmol, Insulin 9 µg/ml)
- Glutamin, Aminosäuren und Oxalacetat wurden sterilfiltriert zugegeben.

Infektionsmedium

Für die Infektionsversuche wurde serumfreies Kulturmedium verwendet

2.2.1.4 Kultur

Die MM6-Zellen wurden als Suspensionskultur bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5,0 % CO₂ gehalten. Zur Kultivierung wurden die Zellen regelmäßig zweimal pro Woche umgesetzt.

Um eventuelle Kontaminationen durch Mykoplasmen festzustellen wurden alle Zellkulturen regelmäßig mittels 4,6-Diamino-2-Phenylindol (DAPI)-Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop, entsprechend der Methodenvorschrift des Herstellers, geprüft (DAPI-Fluoreszenz-Kit, Boehringer Mannheim).

2.2.1.5 Passage

Nach einer Inkubationszeit von drei Tagen wurde der Inhalt einer Zellkulturflasche in ein steriles 50 ml Falcon Tube pipettiert und 10 min bei 400 × g zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes folgte die Resuspendierung des Zellpellets mit 3 ml Kulturmedium. In eine frische Zellkulturflasche wurden 24 ml Kulturmedium vorgelegt und je 1 ml des resuspendierten Pellets hinzupipettiert. Die Zellen wurden dabei regelmäßig lichtmikroskopisch auf Verunreinigungen hin betrachtet, parallel dazu erfolgte eine Sterilkontrolle auf Columbia-Blutagar. Desweiteren wurde darauf geachtet, dass die Zellen regelmäßig geformt waren und nicht verklumpten. Flaschen mit verklumpten oder verkeimten Zellen wurden verworfen.

2.2.1.6 Einfrieren und Auftauen

Um auf einen Vorrat an MM6-Zellen zurückgreifen zu können, wurden zu Beginn Zellen mehrerer gut bewachsener Kulturflaschen eingefroren. Dabei wurde jeweils der Inhalt einer Zellkulturflasche bei 400 × g abzentrifugiert, der Überstand abgekippt und das Pellet mit 3 ml eiskaltem Zellkulturmedium, dem 10 % DMSO zugesetzt wurde, resuspendiert. Je 1 ml wurde in ein Kryoröhrchen gefüllt. Die Röhrchen wurden in eine mit Isopropanol gefüllte Einfrierbox gesetzt und bei -70°C eingefroren. Durch das Isopropanol ist eine kontrollierte Einfrierate von 1g/ min gewährleistet. Die Zellen blieben über Nacht bei -70 °C, wonach sie in flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurden.

2 Material und Methoden

Zum Auftauen wurden die Röhrchen aus dem Stickstoff in der Hand schnell erwärmt, sofort mit Zellkulturmedium im 50 ml Falcon Tube auf 20 ml aufgefüllt und bei $400 \times g$ 10 min zentrifugiert. Die Zellen wurden in 20 ml Medium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Danach konnten die in 10 ml Medium resuspendierten Zellen in eine kleine Zellkulturflasche gegeben und weiter passagiert werden.

2.2.2 *Acanthamoeba castellanii*

2.2.2.1 Technische Geräte und Materialien

Es wurden dieselben technischen Geräte und Materialien verwendet wie für die MM6-Zellen. Die genaue Auflistung ist unter 2.2.1.1 beschrieben.

2.2.2.2 Chemikalien

Die Chemikalien für die Kultur von *Acanthamoeba castellanii* sind in der Tab. 2.5 aufgelistet.

Tab. 2.5: Chemikalien für die Kultur von *Acanthamoeba castellanii*

Chemikalien	Bezugsquelle
Proteose Peptone	Oxoid, Wesel
Hefeextrakt, neutral, gepulvert	Oxoid, Wesel
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid-Dihydrat	Sigma, München
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
di.-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt
Eisenammoniumsulfat	Sigma, München
D-Glukose, wasserfrei	Merck, Darmstadt
Tri-Natriumcitrat-2-Hydrat	Riedel-de-Haen, Seelze

2.2.2.3 Kulturmedium und Infektionsmedium

Kulturmedium

Die Anzucht und Kultivierung der Amöben erfolgte in PYG-Medium (Moffat und Tompkins 1992), das sich folgendermaßen zusammensetzte:

- 2 % Proteosepepton
- 0,1 % Hefeextrakt
- 0,1 mol Glukose
- 4 mmol MgSO_4
- 0,4 mol CaCl_2
- 0,1 % Natriumcitrat
- 0,05 mmol $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$
- 2,5 mmol NaH_2PO_4
- 2,5 mmol K_2HPO_4

Die Glukose wurde nach dem Autoklavieren sterilfiltriert zugegeben.

Infektionsmedium

Für die Infektionsversuche wurde eine abgewandelte Form des PYG-Mediums als Infektionsmedium verwendet, das außer Glukose, Hefeextrakt und Proteosepepton die gleichen Bestandteile enthielt (Moffat und Tompkins 1992).

2.2.2.4 Kultur

Die Amöben der Spezies *Acanthamoeba castellanii* benötigten dieselben Kulturbedingungen wie die MM6-Zellen, diese sind in Kapitel 2.2.1.4 beschrieben.

2.2.2.5 Passage

Die Arbeitsschritte zur Passage von *Acanthamoeba castellanii* war der Passage von MM6-Zellen sehr ähnlich und unter 2.2.1.5 genau beschrieben. Lediglich drei Unterschiede waren zu beachten: die Zentrifugationsdauer betrug für *Acanthamoeba castellanii* 5 min, die Zentrifugationsgeschwindigkeit $300 \times g$.

2 Material und Methoden

Als Medium wurde Amöbenkulturmedium verwendet. Diese im Vergleich zu den MM6-Zellen unterschiedlichen Zentrifugationsbedingungen sind in der empfindlicheren Zellwand der Amöben begründet.

2.2.2.6 Einfrieren und Auftauen

Zum Einfrieren wurde jeweils der Inhalt einer Zellkulturflasche bei $300 \times g$ abzentrifugiert, der Überstand abgekippt und das Pellet in 3 ml PYG-Medium resuspendiert und je 1 ml in ein Kryoröhrchen gefüllt. Die Kryoröhrchen wurden für 30 min auf Eis in den Kühlschrank gestellt. Daraufhin wurden sie für 2 Stunden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Anschließend verblieben sie bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Zum Auftauen der Amöben wurde der Inhalt eines Kryoröhrchens mit 9 ml PYG-Medium in eine kleine Zellkulturflasche gegeben, anschließend bebrütet und weiter passagiert.

2.2.3 *Hartmanella vermiformis*

2.2.3.1 Technische Geräte und Materialien

Es wurden dieselben technischen Geräte und Materialien verwendet wie für MM6-Zellen und *Acanthamoeba*. Die genaue Auflistung ist unter 2.2.1.1 zu finden.

2.2.3.2 Chemikalien

Die Chemikalien für die Kultur von *Hartmanella vermiformis* sind in der Tab. 2.6 aufgelistet.

2 Material und Methoden

Tab. 2.6: Chemikalien für die Kultur von *Hartmanella vermiformis*

Chemikalien	Bezugsquelle
Proteose Peptone	Oxoid, Wesel
Hefeextrakt, neutral, gepulvert	Oxoid, Wesel
Nucleinsäure	Sigma, München
Folsäure	Sigma, München
Hemin	Sigma, München
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum (Myclons super plus), hitzeinaktiviert	Gibco, Eggenstein

2.2.3.3 Kulturmedium

Die Anzucht und Kultivierung der Amöben erfolgte in einem Wachstumsmedium, das sich folgendermaßen zusammensetzte:

- 10 g Proteosepepton
- 10 g Hefeextrakt
- 1 g Nucleinsäuren
- 15 mg Folsäure
- 1 mg Hemin
- 360 mg KH_2PO_4
- 50 mg Na_2HPO_4
- 100 ml Fötale Rinderserum, hitzeinaktiviert
- 900 ml Aqua bidest

Das fötale Rinderserum wurde nach dem Autoklavieren sterilfiltriert zugegeben, der pH-Wert auf 6,5 eingestellt.

2.2.3.4 Kultur

Die Amöben der Spezies *Hartmanella vermiformis* benötigten dieselben Kulturbedingungen wie die MM6-Zellen und *Acanthamoebae*, diese sind in Kapitel 2.2.1.4 beschrieben.

2.2.3.5 Passage

Nach einer Bebrütungszeit von drei Tagen wurde der Inhalt einer Zellkulturflasche in ein steriles 50 ml Falcon Tube pipettiert und 15 min bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das verbliebene Zellpellet in 6 ml Kulturmedium resuspendiert. Zu einer frischen Zellkulturflasche mit 48 ml Hartmanella-Kulturmedium wurden je 2 ml der Zellsuspension pipettiert.

Regelmäßig wurden die Zellen lichtmikroskopisch auf Verunreinigungen hin untersucht, parallel dazu erfolgte eine Sterilkontrolle auf Columbia-Blutagarplatten.

2.2.3.6 Einfrieren und Auftauen

Zum Einfrieren wurde jeweils der Inhalt einer Zellkulturflasche bei 200 x g abzentrifugiert, der Überstand abgekippt und das Pellet in 3 ml Kulturmedium resuspendiert und je 1 ml in ein Kryoröhrchen gefüllt. Die Kryoröhrchen wurden für 30 min auf Eis in den Kühlschrank gestellt. Daraufhin wurden sie für 2 Stunden bei -20 °C eingefroren. Anschließend verblieben sie bei -70 °C. Zum Auftauen der Amöben wurde der Inhalt eines Kryoröhrchens mit 9 ml Hartmanella-Kulturmedium in eine kleine Zellkulturflasche gegeben, anschließend bebrütet und weiter passagiert.

2.3 Amöbenüberstände

2.3.1 Technische Geräte, Materialien und Chemikalien

Die für die Herstellung von Amöbenüberständen verwendeten technischen Geräte sind in Tab.2.7, Materialien und Chemikalien in Tab. 2.8 aufgelistet.

2 Material und Methoden

Tab. 2.7: Technische Geräte

Technische Geräte	Bezugsquelle
Zentrifuge (TI-6)	Beckmann, UK
CO ₂ Water-Jacket Incubator	Multimed Wicker, Kirchheim unter Teck
Sterile Werkbank	Heraeus, Hanau
Lichtmikroskop	Zeiss, Jena
Invert-Mikroskop IMT-2	Olympus
Vortex	Bender und Hobein, Zürich
Anaerobiertopf	Merck, Darmstadt

Tab. 2.8: Materialien und Chemikalien

Material und Chemikalien	Bezugsquelle
Zentrifugenröhrchen (Bluecap-Röhrchen, 50 ml),	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Einmal-Pipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 25 ml)	Greiner, Frickenhausen
Neubauer-Zählkammer	Bender und Hobein, Zürich
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Costar, Bodenheim
Kryoröhrchen	Eppendorf, Hamburg
Millex-GP Filter-Unit 0,22 µm Porengröße	Millipore, Molsheim, Frankreich
Trypanblau (0,4 %)	Sigma, München
Anaerobierpäckchen	Oxoid, Wesel
PBS	Gibco, Eggenstein

2.3.2 Herstellung von Amöbenüberstand

Das Vorgehen bei der Herstellung der Amöbenüberstände war für *Acanthamoeba castellanii* und *Hartmanella vermiformis* gleich, lediglich die Zentrifugationsbedingungen unterscheiden sich.

Der Inhalt mehrerer gut bewachsener Zellkulturflaschen mit *Hartmanella vermiformis* oder *Acanthamoeba castellanii* wurden in sterile 50ml Falcon Tubes pipettiert. Unter Kulturbedingungen betrug die Konzentration der Amöben zum Verwendungszeitpunkt ca. 1×10^6 Zellen / ml. Die Amöben wurden bei 300 x g (*Acanthamoeba castellanii*) beziehungsweise 200 x g (

2 Material und Methoden

Hartmanella vermiformis) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbliebene Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert. Um die Gesamtzellzahl zu ermitteln wurden aus der Suspension 100µl entnommen und zu 900 µl PBS gegeben. Aus dieser Verdünnung entnahm man 100 µl und pipettierte sie zu 100µl 0,4%-igem Trypanblau. Nach 4 min Inkubationszeit wurde eine Neubauer-Zählkammer mit dem Gemisch befüllt und 4 Eckquadrate ausgezählt. Dieser Arbeitsschritt diente gleichzeitig der Kontrolle der Vitalität der Amöben. Anschließend konnte die Gesamtzellzahl berechnet werden. Die Amöben wurden nun erneut abzentrifugiert und zum Einstellen einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ ml in PBS resuspendiert. Entsprechend der Zellzahl wurde das benötigte Volumen an PBS vorher berechnet.

Die Zellsuspension wurde in Zellkulturflaschen pipettiert und in einem geschlossenen Gefäß 72 h unter anaeroben Bedingungen und bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Inhalt der Zellkulturflaschen in 50 ml Tubes pipettiert, die Zellen abzentrifugiert und der Überstand entnommen und sterilfiltriert. Der so gewonnene, zellfreie Amöbenüberstand wurde dann sofort verwendet und zu einer Infektion von MM6-Zellen mit Legionellen gegeben.

2 Material und Methoden

2.4 Infektionsversuche

Die technischen Geräte, Materialien und Chemikalien sind in den folgenden Tabellen 2.10 und 2.11 aufgelistet.

Tab. 2.10: Technischen Geräte

Technische Geräte	Bezugsquelle
Zentrifuge (TI-6)	Beckmann, UK
CO ₂ Water-Jacket Incubator	Multimed Wicker, Kirchheim unter Teck
Sterile Werkbank	Heraeus, Hanau
Ultrospec 2000	Pharmacia, Freiburg
Lichtmikroskop	Zeiss, Jena
Invert-Mikroskop IMT-2	Olympus
Pipettboy	Hirschmann
Vortex	Bender und Hobein, Zürich
Ultrachallgerät Sonorex 35kHz	Bandolin
Spiralplater	Meintrupp

Tab. 2.11: Materialien und Chemikalien

Materialien/ Chemikalien	Bezugsquelle
Einmal-Pipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Neubauer-Zählkammer	Bender und Hobein, Zürich
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Costar, Bodenheim
Millex-GP Filter-Unit 0,22 µm Porengröße	Millipore, Molsheim, Frankreich
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen, Standardtips, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Falcon Tubes 2070 Blue max 50 ml, Polypropylene	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Falcon Tubes 2095, Polystyrene max. 15 ml	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Falcon Röhrchen 2052, Polystyrene max. 5 ml („FACS-Röhrchen“)	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Eppendorf-Cup, 2 ml, safelock	Eppendorf, Hamburg
24 Well all culture cluster	Costar, Wesel
6 Well Platte	Greiner, Frickenhausen
Transwell, 24 mm Diameter, 0,4 µm Porengröße	Costar, Wesel
Transwell, 6,5 mm Diameter, 0,1 µm Porengröße	Costar, Wesel
Gentamicin, 50 mg/ml	Gibco, Eggenstein
Aqua ad injectabilia PH. Eur.	Delta Pharma GmbH
Trypanblau (0,4 %)	Sigma, München

2.4.1 Infektion der Mono Mac 6-Zellen mit Legionellen

2.4.1.1 Versuchsablauf

2.4.1.1.1 *Herstellen der Legionellensuspension*

Für die Herstellung einer Legionellensuspension wurden Legionellen verwendet, die nach einem 3-Ösen-Ausstrich 4-5 Tage auf einer BCYE- α -Agarplatte bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ in Form von gut sichtbaren Einzelkolonien wuchsen. Mit einer sterilen Einmalimpföse wurden einige Einzelkolonien des benötigten Teststammes abgenommen und in erwärmtes MM6-Infektionsmedium eingerieben. Um eine gleichmäßige Verteilung der Legionellen zu erreichen, wurde die Suspension mit dem Vortex gut durchmischt. Die Legionellensuspension wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 578 nm auf eine optische Dichte von 0,2 eingestellt. Als Nullabgleich diente MM6-Infektionsmedium. Bei dieser Extinktion enthielt die hergestellte Legionellensuspension ca. 3×10^8 koloniebildende Einheiten pro Milliliter (CFU/ml). Anhand der im Versuch verwendeten Zellzahl und der gewünschten Infektionsdosis (Infektionsverhältnis von Legionellen zu Zellen), musste das benötigte Volumen an Legionellensuspension errechnet werden. Das errechnete Volumen an Legionellensuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und 15 min bei $3000 \times g$ abzentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das verbliebene Legionellenpellet in 1,5 ml MM6-Infektionsmedium (Amöbeninfektionsmedium) aufgenommen und mit dem Vortex nochmals gut durchmischt.

2.4.1.1.2 *Vorbereitung der Mono Mac 6-Zellen*

Entsprechend der benötigten Zellzahl wurde der Inhalt einer bzw. mehrerer gut bewachsener Zellkulturflaschen in ein bzw. mehrere Blue Caps pipettiert und 10 min bei $400 \times g$ abzentrifugiert. Der Überstand konnte abpipettiert und das

Zellpellet mit 10 ml MM6-Infektionsmedium resuspendiert werden. Um die Zellzahl und gleichzeitig die Vitalität zu ermitteln, wurden aus dieser Suspension 100 µl entnommen und zu 900 µl Infektionsmedium hinzupipettiert. Aus dieser Verdünnung mußten 100 µl mit 100 µl 0,3 %-igem Trypanblau vermischt und 4 min inkubiert werden. Daraufhin wurde eine Neubauer-Zählkammer mit diesem Gemisch befüllt und 4 Eckquadrate ausgezählt. Die Zellen waren nur verwendbar, wenn mehr als 90 % vital waren. Anschließend konnte die Gesamtzellzahl errechnet werden. Aus der Zellsuspension konnte nun das entsprechende Volumen, welches der benötigten Zellzahl entsprach, in ein steriles 50 ml Falcon Tube pipettiert und 10 min bei 400 × g (5 min bei 300 × g) abzentrifugiert werden, der Überstand wurde verworfen.

2.4.1.1.3 Durchführung der Infektion

Das verbleibende Zellpellet konnte nun mit den vorbereiteten 1,5 ml Legionellensuspension resuspendiert und in eine Vertiefung einer 6-Loch-Platte pipettiert werden.

2.4.1.1.4 Inkubation

Das Zell-Legionellen-Gemisch blieb für 2 h bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ im Brutschrank. In dieser Zeit wurden die Legionellen von den MM6-Zellen phagozytiert.

2.4.1.1.5 Abtöten der nicht phagozytierten, extrazellulären Legionellen

Nach der zweistündigen Inkubationszeit wurden 4,5 ml einer zuvor hergestellten Gentamicinlösung (49,9 ml RPMI bzw. Amöbeninfektionsmedium + 0,1 ml Gentamicin; Endkonzentration der so hergestellten Gentamicinlösung: 100 µg/ml) zu der Suspension pipettiert. Die Gentamicinendkonzentration betrug somit 75 µg/ml. Es folgte eine erneute Inkubationszeit von 1 h. In dieser Zeit wurden alle extrazellulären Legionellen abgetötet.

2.4.1.1.6 Auswaschen der Gentamicinlösung

Der Inhalt der 6-Loch-Platte wurde sorgfältig in ein 50 ml Falcon-Tube pipettiert und mit RPMI dreimal für 15 min bei $300 \times g$ (5 min bei $300 \times g$) gewaschen. Die jeweils anfallenden Überstände wurden abpipettiert und verworfen.

2.4.1.1.7 Aufteilung der Zellen in die 24-Loch-Platte

Nach dem letzten Waschvorgang wurde das Zellpellet mit der entsprechenden Menge an MM6-Infektionsmedium resuspendiert. Pro Vertiefung der 24-Loch-Platte wurde 1 ml Zellsuspension benötigt. Je Versuch wurden vier Zeitpunkte: 0 h, 24 h, 48 h, 72 h mit jeweils einem Doppelansatz getestet.

2.4.1.1.8 Hinzufügen des Versuchsansatzes

Von dem Amöbenüberstand, der getestet werden sollte, wurden je Vertiefung der 24-Loch-Platte 0,5 ml zugegeben. Als Kontrolle hierzu wurde PBS verwendet, auch hier wurden 0,5 ml zugegeben und jeweils im Doppelansatz die Vermehrung zu den Zeitpunkten 0h, 24h, 48h und 72 h untersucht.

2.4.1.2 Lyse der Zellen zur anschließenden Bestimmung der intrazellulären Vermehrung der Legionellen

Die Lyse der Zellen und die Bestimmung der CFU/ml erfolgte 0 h, 24 h, 48 h und 72 h (bzw. 96 h bei den Amöben) nach Ende der Infektion. Als Zeitpunkt 0 h wurde der Zeitpunkt nach Herauswaschen des Gentamicins und Einfüllen der Zellsuspension in die 24-Loch-Platte definiert. Zu jedem Zeitpunkt wurde ein Doppelansatz ausgewertet, d. h. es wurde pro Zeitpunkt der Inhalt zweier Vertiefungen der 24-Loch-Platte benötigt.

Um die Vitalität der Zellen zu den jeweiligen Lysezeitpunkten zu ermitteln, wurden jeweils 50 μ l des Doppelwertes abgenommen und nach Vermengung mit 50 μ l Trypanblau in einer Neubauerzählkammer gezählt.

Zu jedem Lysezeitpunkt wurde der entsprechende Inhalt der beiden Vertiefungen aus der 24-Loch-Platte in je ein Eppendorf-Cup pipettiert und 10 min bei $400 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein FACS-Röhrchen pipettiert. Das Zellpellet wurde mit 1 ml eiskaltem Aqua dest. resuspendiert und zur Lyse der Zellen im Ultraschallbad 5 min beschallt. Die Kontrolle der vollständigen Lyse der Zellen erfolgte lichtmikroskopisch. Das Lysat wurde danach zum Überstand gegeben.

2.4.1.3 Bestimmung der CFU/ml

Die Bestimmung der in dieser Suspension enthaltenen Legionellenzahl erfolgte durch Ausplattieren einer Verdünnungsreihe auf BCYE- α -Agar. Dazu wurde eine Spiralplater verwendet.

Die BCYE- α -Platten mussten 5 bis 7 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ bebrütet werden, bis gut sichtbare Einzelkolonien gewachsen waren. Nun konnten die Kolonien gezählt werden, woraus sich unter Berücksichtigung der Verdünnungen die Anzahl der koloniebildenden Einheiten pro Milliliter (CFU/ml) berechnen ließ.

2.4.2 Infektion der Mono Mac 6-Zellen mit Legionellen und *Acanthamoeba castellanii* im Transwell

2.4.2.1.1 Infektionsmedium für die Infektionsversuche mit Amöben im Transwell

Da bei diesen Versuchen beide Ziellinien in derselben Vertiefung, nur durch das Transwell getrennt, 72 h inkubiert wurden, wurde ein spezielles Infektionsmedium benötigt, in dem beide Ziellinien überleben konnten. Dieses spezielle Infektionsmedium bestand aus einem Gemisch zu gleichen Anteilen (1:1) MM6-Infektionsmedium und Amöbeninfektionsmedium und wurde als Kokulturmedium bezeichnet (Reiff et al. 2000).

Da der Versuchsablauf dieser Infektion bis zur Aufteilung der Zellen in der 24-Loch-Platte mit dem Versuchsablauf unter 2.3.1.1 identisch war, wird an dieser Stelle nur das weitere Vorgehen beschrieben.

Um das Legionellenwachstum in MM6-Zellen mit dem Legionellenwachstum in MM6-Zellen und Amöben im Transwell vergleichen zu können, wurden diese beiden Versuche parallel durchgeführt.

2.4.2.1.2 Aufteilung der MM6-Zellen in der 24-Loch-Platte

Nach dem letzten Waschvorgang wurde das Zellpellet mit der entsprechenden Menge an Kokulturmedium resuspendiert. Pro Vertiefung der 24-Loch-Platte wurde 1 ml dieser Zell-suspension benötigt. Je Versuch wurden vier Zeitpunkte (0 h, 24 h, 48 h, 72 h) mit jeweils einem Doppelansatz getestet.

2.4.2.1.3 Vorbereitung der Amöben

Für diese Art der Infektion wurde im Transwell die gleiche Anzahl Amöben benötigt, wie MM6-Zellen pro Vertiefung vorgelegt wurden. Dazu wurde der Inhalt mehrerer Zellkulturflaschen in ein bzw. mehrere Blue Caps pipettiert und 5 min bei $300 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Anschließend wurden die Amöben mit derselben Methode wie die MM6-Zellen gezählt, die Vitalität bestimmt und die Gesamtzellzahl berechnet. Der Versuch konnte nur durchgeführt werden, wenn mehr als 90 % der Amöben vital waren. Aus der Zellsuspension wurde das benötigte Volumen abpipettiert und erneut 5 min bei $300 \times g$ zentrifugiert, der Überstand wiederum verworfen und das Zellpellet mit 1,6 ml Kokulturmedium (mit/ ohne NaCl) resuspendiert.

2.4.2.1.4 Aufteilung der Amöben in der 24-Loch-Platte

Mit einer sterilen Pinzette wurden die Transwells in die Vertiefungen mit den infizierten MM6-Zellen gegeben. Anschließend wurden in jedes Transwell 200 μ l der Amöbensuspension pipettiert. Die 24-Loch-Platte wurde bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ bebrütet.

2.4.2.2 Lyse der Zellen zur anschließenden Bestimmung der intrazellulären Vermehrung der Legionellen

Die Lyse der MM6-Zellen und die Bestimmung der CFU/ml erfolgte in gleicher Weise 0 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Ende der Infektion. Als Zeitpunkt 0 h wurde ebenfalls der Zeitpunkt nach Herauswaschen des Gentamycins und Einfüllen der Zellsuspension in die 24-Loch-Platte definiert. Zu jedem Zeitpunkt wurde ein Doppelansatz ausgewertet, d. h. es wurde pro Zeitpunkt der Inhalt zweier Vertiefungen der 24-Loch-Platte benötigt. Die Transwells wurden vorsichtig mit einer sterilen Pinzette aus den Vertiefungen genommen. Um die Vitalität beider Zelllinien zu den jeweiligen Lysezeitpunkten zu ermitteln, wurden jeweils 50 µl des Doppelwertes aus dem Transwell und aus der Vertiefung abgenommen und jeweils nach Vermengung mit 50 µl Trypanblau in einer Neubauerzählkammer gezählt.

2.4.2.2.1 Lyse der Mono Mac 6-Zellen

Die Lyse der MM6-Zellen entsprach der unter 2.3.1.2 dargestellten Vorgehensweise.

2.4.2.3 Bestimmung der CFU/ml

Die Bestimmung der CFU/ml entsprach der unter 2.3.1.3 dargestellten Vorgehensweise.

2.5 Gelelektrophorese

Die Analyse mittels Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-Page) der *Acanthamoeba castellanii*- und *Hartmannella vermiformis*-Überstände wurde unter dissozierenden und denaturierenden Bedingungen, wie von Laemmli, U.K. (1970) beschrieben, durchgeführt. Je zehn Mikroliter der Proben wurden auf das 12,5 prozentige Polyacrylamidgel aufgetragen und

elektrophoretisch aufgetrennt. Das Molekulargewicht der verschiedenen Proteinbanden wurde anhand eines Molekulargewichtsstandard der Firma PEQLAB-Biotech bestimmt. Durch Silberfärbung wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht. Für diese Silberfärbung wurde ein Kit der Firma Amersham Pharmacia Biotech entsprechend der Hinweise des Herstellers verwendet.

Die Gelelektrophorese wurde von Dr. Ali (Institut für Transfusionsmedizin, Universität Tübingen) durchgeführt.

2.6 Filtration

Um die Molekülgröße des bioaktiven Mediators einzugrenzen, wurde der Überstand filtriert. Für die Filtration wurden Filter der definierten Porengröße von 3kDalton der Firma Millipore (Microcons, Centiprep) verwendet. Die Filtration erfolgte in der Zentrifuge bei 4000g für 2 Stunden. Das Filtrat wurde zum Testen der Aktivität auf eine Infektion gegeben (wie in 2.4.1 beschrieben).

2.7 HPL-Chromatographie

Mit der Absicht, ADP als einen möglichen bioaktiven Mediator für die Aktivität nachzuweisen, wurde eine analytische Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC, ActaBASIC, Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt. Sowohl *Acanthamoeba castellanii*-Überstand (<3kD Fraktion), Überstand des organischen Extakts in wässriger Lösung (Phenol, Chloroform und Isoamylalcohol,; 25:25:2 v/v, Sigma) wie auch Standard-ADP (Sigma) der bekannten Konzentration von 20 nM wurden auf eine Hypersil-Elite C18 (250 x 4,6 mm, 5 microne) Reversed Phase Säule (ThermoQuest, Cheshire-UK) gegeben.

Die Separation erfolgte unter folgenden Versuchsbedingungen: Lösung A, 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) in Wasser (v/v); Lösung B, 80%Acetonitril mit 0.05% TFA-Wasser (v/v). Das folgende Gradienten-Programm wurde benutzt: 0% B für 10 Minuten mit anschließendem linearen Gradienten bis 60% B in 45 Minuten bei einer konstanten Durchflussrate von 1 ml/min. Die UV-Absorbtion der Lösung wurde bei 260 nm gemessen.

Die HPLC-Chromatographien wurden von Dr. Ali (Institut für Transfusionsmedizin, Universität Tübingen) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Vorversuche zur Herstellung aktiven Amöben – Überstands

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Beobachtung, dass die Zugabe des Überstands einer Kokultur-Infektion von Amöben und Legionellen-infizierten MM6-Zellen zu einer anderen Legionelleninfektion eine Zunahme der intrazellulären Vermehrung der Legionellen bewirkte. Dies ließ vermuten, dass die Amöben eine Substanz sezernieren, die im Überstand enthalten ist. Die erste Aufgabe war es daher, ein System zu finden, in dem der aktive Überstand in größeren Mengen hergestellt werden kann.

Dazu wurde der unter verschiedenen Versuchsbedingungen produzierte Amöbenüberstand zu einer Infektion von MM6-Zellen mit *Legionella dumoffii* gegeben und das Wachstum zu den Zeitpunkten 0h und 72h nach Zugabe des Überstands im Vergleich zu einer Kontrollinfektion ohne Amöbenüberstand beobachtet.

Alle Vorversuche wurden mindestens dreimal durchgeführt, repräsentativ sind hier jeweils Einzelversuche dargestellt.

3.1.1 Volumen des Amöben-Kulturgefäß

Um den Einfluss der Größe des Amöben-Gefäßes zu untersuchen wurden die *Acanthamoebae* 72 h in unterschiedlichen Kulturgefäßen belassen. Dazu wurden 24-Well-Platten, 6-Well-Platten und Zellkulturflaschen verwendet. Die 24-Well-Platten wurden mit 1 ml befüllt, die 6-Well-Platten mit 5 ml und die Zellkulturflaschen mit 20 ml. Die Konzentration der Amöben war in allen Gefäßen auf 1×10^7 eingestellt. Die verschiedenen Gefäße wurden bei Raumtemperatur unter anaeroben Bedingungen 72 Stunden inkubiert, die Amöben waren in MM6-Infektionsmedium (IM) resuspendiert worden. Danach wurde der Überstand entnommen und zu einer Infektion von MM6-Zellen mit *Legionella dumoffii* zugegeben. Aus der Zunahme der Colonie-forming-Units pro ml (CFU/ml) der Legionellen können Rückschlüsse auf den vermehrungspotenzierenden Effekt des Amöbenüberstands gezogen werden.

3 Ergebnisse

Wie Abbildung 3.1 zeigt, war der vermehrungsfördernde Effekt des Amöbenüberstands auf die Legionelleninfektion am größten, wenn der Überstand in Zellkulturflaschen gewonnen wurde. Da diese das größte Volumen der verwendeten Gefäße besitzen, somit also eine größere Menge Überstand als in den 24- und 6-Well-Platten gewonnen werden konnte, habe ich in den folgenden Versuchen Überstand verwendet, der in Zellkulturflaschen hergestellt wurde.

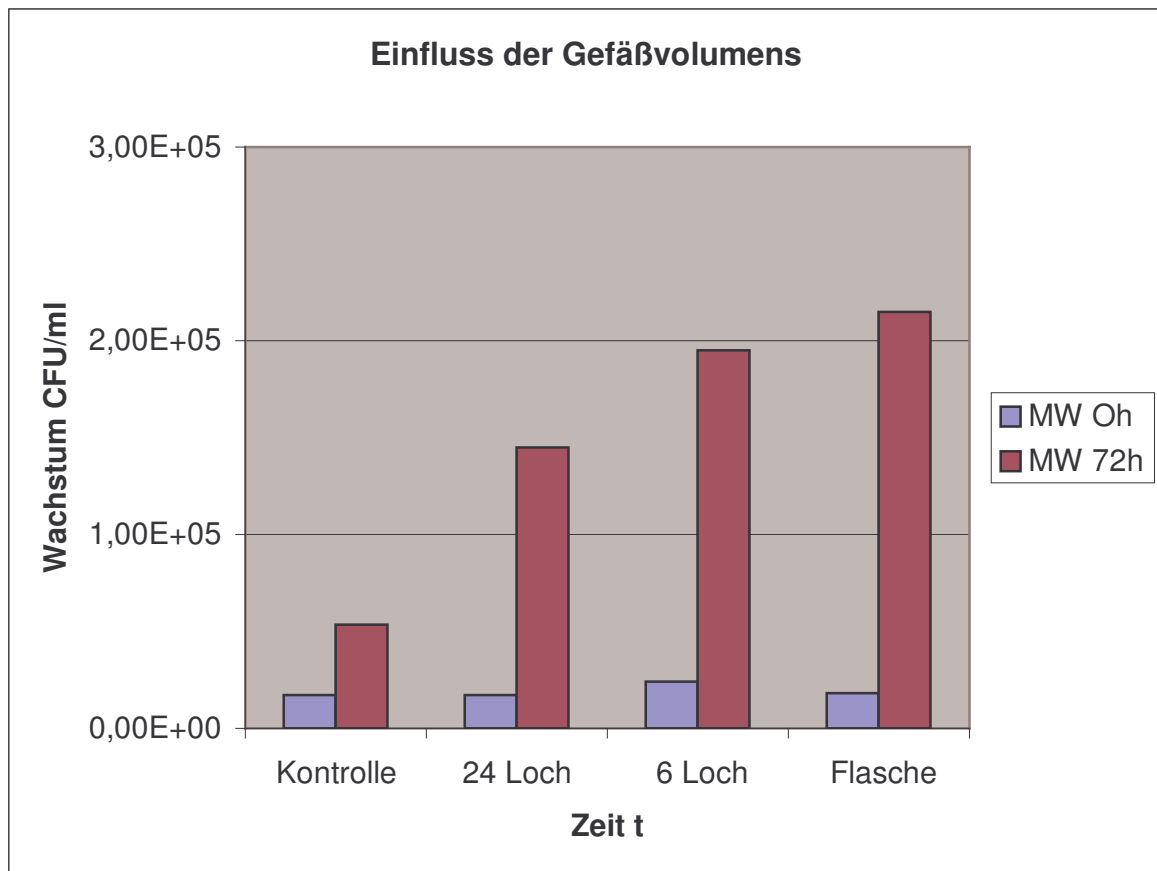


Abbildung 3.1: Einfluss des Gefäßvolumens (bei ansonsten konstanten Bedingungen: Raumtemperatur, anaerob, IM, Amöbenkonzentration 1×10^7 Zellen/ml) des Amöbenüberstands auf die Vermehrung von *Legionella dumoffii* in MM6-Zellen. Dargestellt ist ein Beispiel aus 3 Versuchen.

3.1.2 Kulturmedium

In den Experimenten von Frau Reiff (2000), in denen der Effekt des Überstand auf die Vermehrung von *Legionella dumoffii* in MM6-Zellen erstmalig beobachtet wurde, wurde ein Kokultur-Mischmedium verwendet, das aus je 50% Amöben-Infektionsmedium (AI) und MM6-Infektionsmedium (IM) bestand. Um nun das am besten geeignete Medium für die Überstandsproduktion zu finden, wurden die Überstände sowohl in IM wie auch in AI hergestellt. Dabei zeigte sich, wie in Abbildung 3.2 zu sehen, dass der vermehrungsfördernde Effekt des in Amöbeninfektionsmedium (AI) angesetzten Überstands zwar vorhanden ist, die Kontrolle, die mit AI (ohne Kontakt zu Amöben) durchgeführt wurde, sich allerdings nach 72 Stunden auch vermehrungsfördernd auf die Legionellen auswirkt. Die Ursache dafür könnte in dem höheren Gehalt an Nährstoffen des Amöben-Infektionsmediums (AI) im Vergleich zum MM6-Infektionsmedium (IM) liegen. Daher ist dieses Medium weniger geeignet. Für alle weiteren Versuche wurde IM verwendet, hier ist nach 72 Stunden ein signifikanter Unterschied zwischen Amöbenüberstand in IM und der aus reinem IM bestehenden Kontrolle feststellbar.

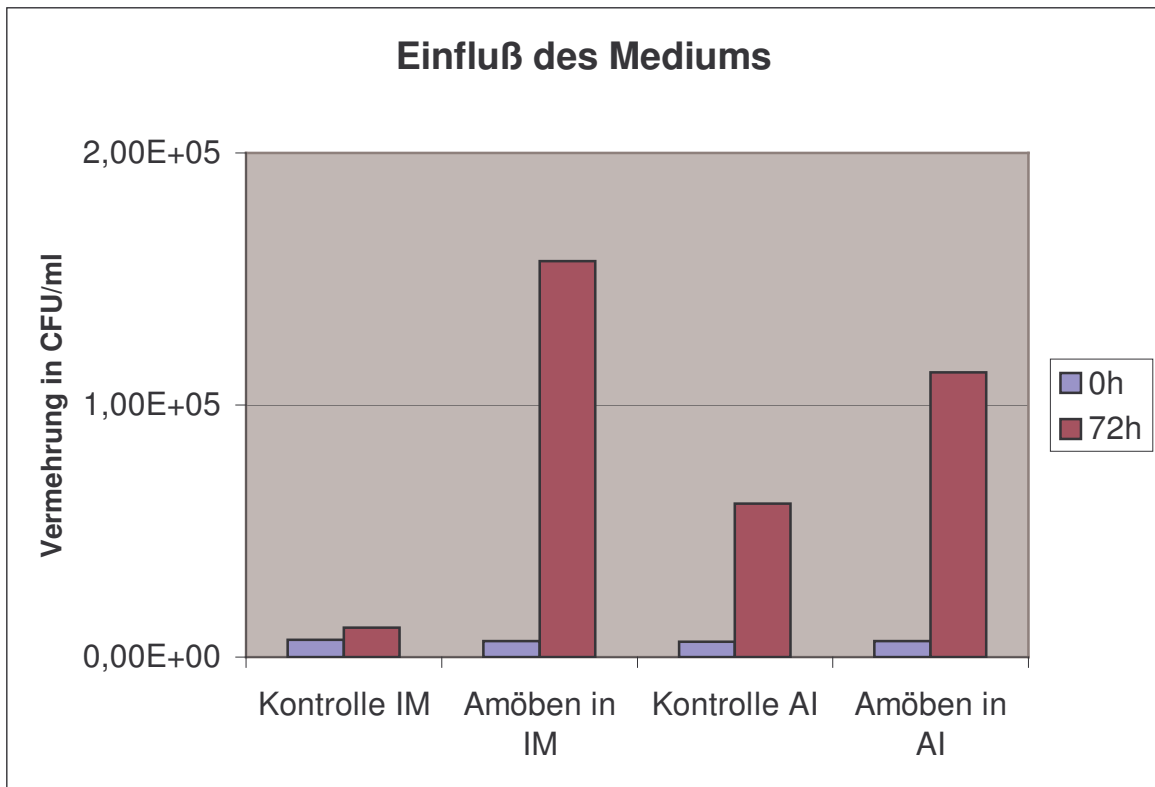


Abbildung 3.2: Einfluss des Mediums (bei ansonsten konstanten Bedingungen: Raumtemperatur, anaerob, Amöbenkonzentration 1×10^7 Zellen/ml) des Amöbenüberstands auf die Vermehrung von *Legionella dumoffii* in MM6-Zellen. AI=Amöbeninfektionsmedium, IM= MM6-Infektionsmedium. Dargestellt ist ein Beispiel aus 3 Versuchen

Um die Inhaltsstoffe des Amöbenüberstands genauer analysieren zu können, ergab sich im Verlauf der Arbeit die Zielsetzung, den Überstand in einem möglichst proteinarmen Medium herzustellen. Daher verwendeten wir später PBS zur Herstellung der Überstände. Es stellte sich heraus, dass die in PBS als Medium produzierten Amöbenüberstände noch weitaus aktiver, also vermehrungsfördernder sind, als die bisher verwendeten IM- und AI-Überstände. Man kann also folgendermaßen argumentieren: je nährstoffärmer das Nährmedium, umso aktiver der Überstand.

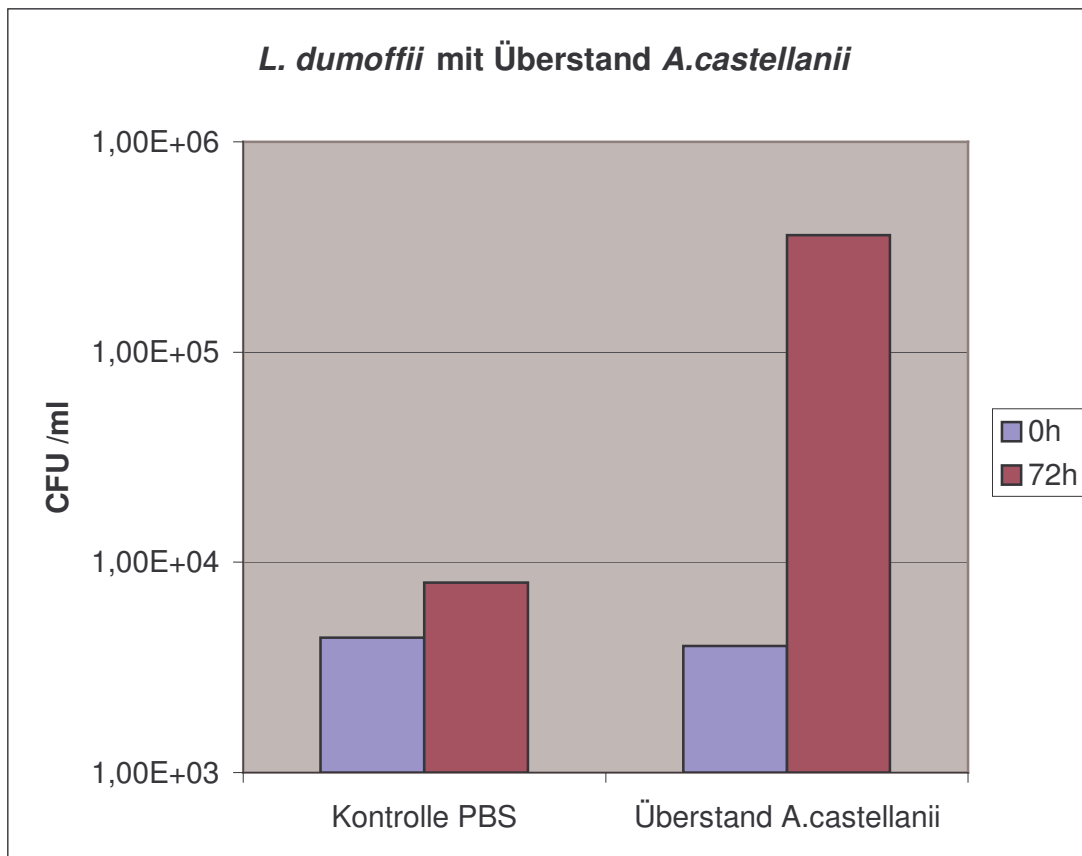


Abbildung 3.3: Einfluss des Mediums; hier: PBS (unter den Bedingungen: Raumtemperatur, anaerob, Amöbenkonzentration 1×10^7 Zellen/ml) des Amöbenüberstands auf die Vermehrung von *Legionella dumoffii* in MM6-Zellen. Skalierung der y-Achse in logarithmischer Darstellung. Im Diagramm ist beispielhaft einer von 3 Versuchen gezeigt.

3.1.3 Amöbenkonzentration

Bei der Vermehrung der *Acanthamoebae* sowie bei den Versuchen in Kokultur wurde die Amöbenkonzentration auf 1×10^6 Zellen / ml eingestellt. Dies ist eine dem Amöbenwachstum zuträgliche Zelldichte, die Totzellzahl liegt bei ungefähr 1%, die Zellen erscheinen mikroskopisch mit zahlreichen Fortsätzen, wie für vitale *Acanthamoebae* zu erwarten. Erhöht man die Zellkonzentration auf 1×10^7 Zellen/ml, dominiert im Mikroskop die zystische Form der Amöben, die einem Ruhezustand entspricht, die Totzellzahl steigt auf 3 bis 5% an.

3 Ergebnisse

Bei dieser stark erhöhten Zelldichte ist allerdings der größere wachstumsteigernde Effekt des Überstands zu beobachten. Dies könnte so gedeutet werden, dass eine Erhöhung der Amöbenkonzentration die *Acanthamoebae* zu stärkerer Sekretion der gesuchten Substanz stimuliert. Der im Amöben-Überstand enthaltene Faktor, der die Vermehrung der Legionellen potenziert, scheint besonders aktiv zu sein, wenn die Amöben zuvor starkem Stress ausgesetzt waren.

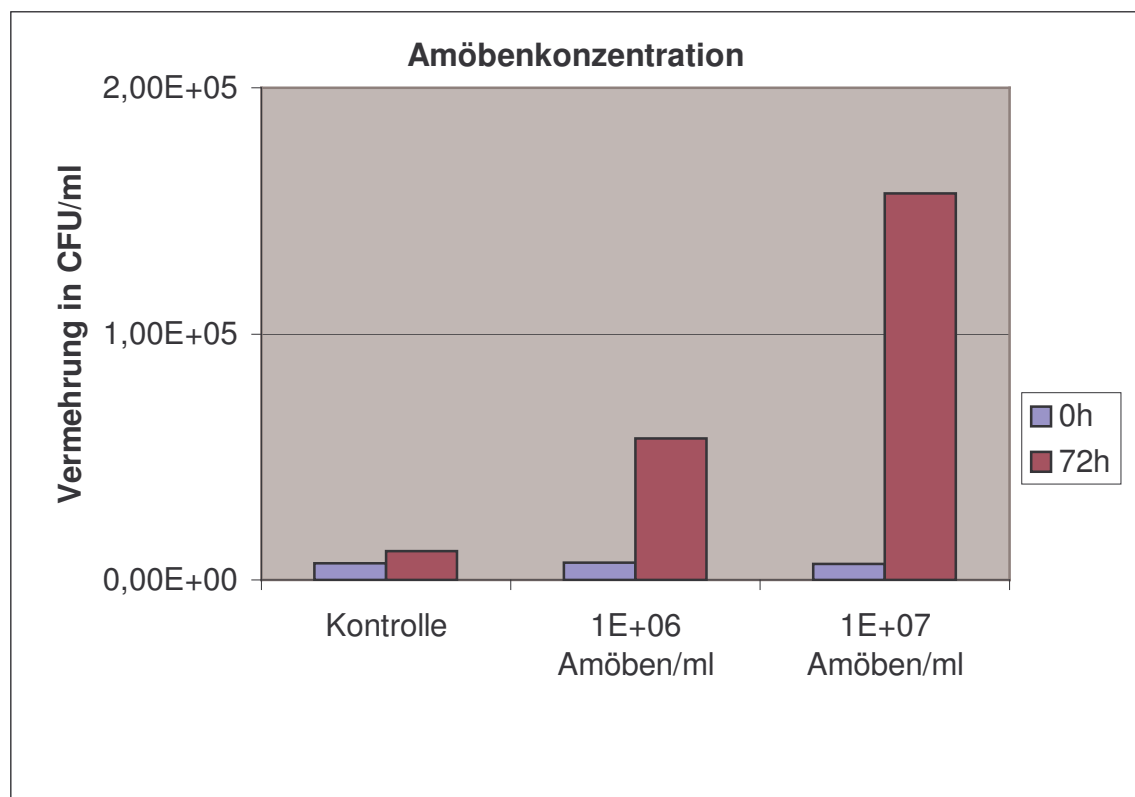


Abbildung 3.4: Einfluss der Amöbenkonzentration (bei ansonsten konstanten Bedingungen: Raumtemperatur, anaerob, IM) des Amöbenüberstands auf die Vermehrung von *Legionella dumoffii* in MM6-Zellen. Dargestellt ist ein Beispiel aus 3 Versuchen

3.1.4 Temperatur

Wie im vorhergehenden Versuch zum Einfluss der Amöbenkonzentration beobachtet werden konnte, haben verschiedene Arten von Stress für die Amöben positive Auswirkungen auf die Sekretion der gesuchten Substanz. Um dieses Phänomen näher zu untersuchen, wurde in den folgenden Versuchen eine andere Art von Stress für die Amöben erzeugt: zu niedrige und zu hohe Temperatur.

Die Vermehrung und Kultur der Amöben erfolgte bisher im Inkubator bei 37° Celsius und einer CO₂ Konzentration von 5%. Die sind die Optimalbedingungen für das Wachstum der *Acanthamoebae*. Weicht man von diesem Optimum ab, ist zu beobachten, dass der entnommene Überstand wiederum einen stärkeren Effekt auf die Legionellenvermehrung hat, als der unter Idealbedingungen produzierte.

3.1.4.1 Raumtemperatur und 37°C

Der im folgenden dargestellte Versuch zeigt (indirekt) den Einfluss zu niedriger Temperatur auf die Sekretion der gesuchten Substanz. Der Amöben-Überstand wurden zum einen unter Idealbedingungen, also von Amöben, die bei 37° und einer CO₂ Konzentration von 5% kultiviert waren, gewonnen, zum anderen wurde Überstand von Amöben verwendet, die 72 h Raumtemperatur und anaeroben Bedingungen ausgesetzt waren. Hier ist zu sehen, dass der unter Stress- Bedingungen (wie der zu niedrigen Temperatur) produzierte Überstand einen größeren Einfluss auf die intrazelluläre Vermehrung der Legionellen hat.

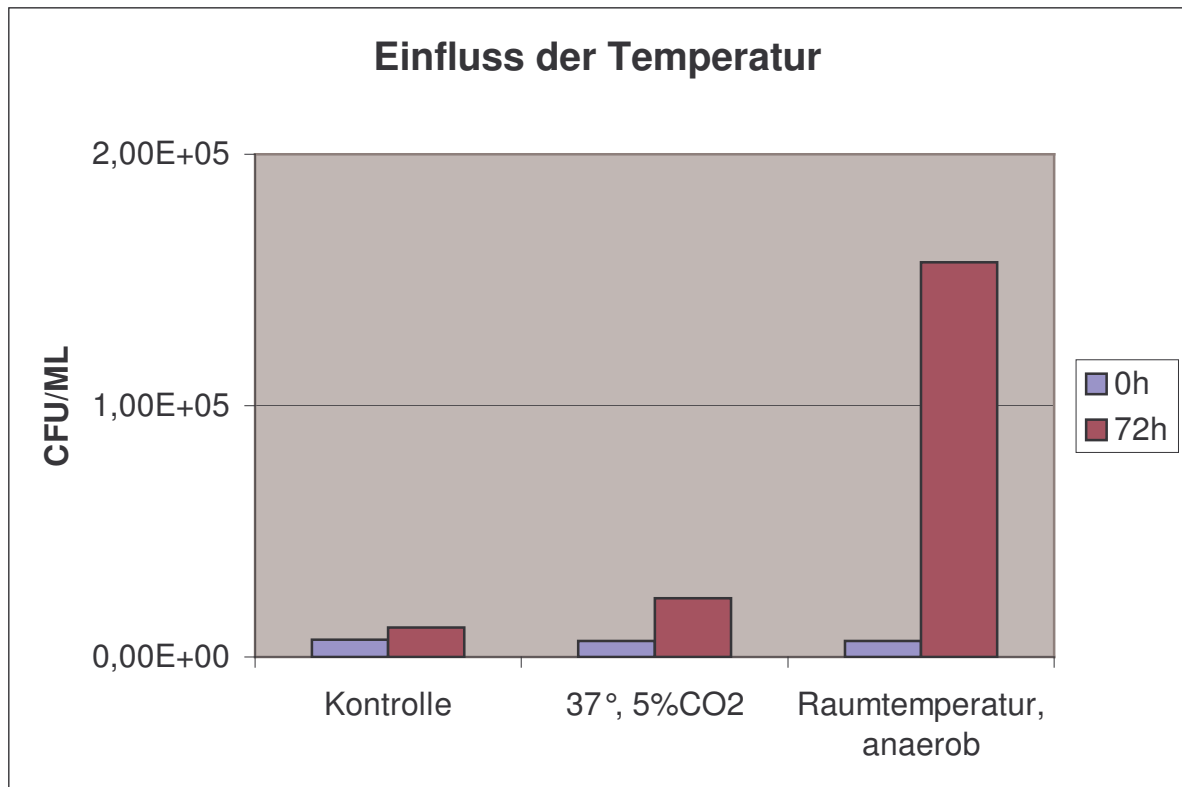


Abbildung 3.5: Einfluss der Temperatur (bei ansonsten konstanten Bedingungen: Amöbenkonzentration 1×10^7 /ml, IM) des Amöbenüberstands auf die Vermehrung von *Legionella dumoffii* in MM6-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch

3.1.4.2 Hitzeschock

Nicht nur zu niedrige Temperaturen haben einen Einfluss auf die Potenz des Amöbenüberstands, auch mit zu hohen Temperaturen kann ein aktiverer Überstand hergestellt werden. Da die Amöben relativ hitzesensitiv sind, wurde ein System entwickelt, bei dem die Amöben für eine Stunde einer Temperatur von 45° ausgesetzt waren. Dieses Vorgehen haben wir Hitzeschock genannt. Die behandelten Überstände wurden zunächst sofort abgenommen und zu einer Legionelleninfektion gegeben. Im Diagramm 3.6 ist dargestellt, dass der Hitzeschock-Überstand, der sofort verwendet wurde (Hitzeschock 0h), zwar eine gewisse vermehrungsfördernde Eigenschaft hat, diese aber ausgeprägter

3 Ergebnisse

ist, verwendet man der Überstand nicht sofort, sondern belässt die hitzegeschockten Amöben für weitere 72 h im Inkubator und entnimmt erst dann den Überstand.

Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die Amöben die gesuchte Substanz nicht sofort freisetzen, sondern erst nach einer gewissen Zeit, wie hier 72 h nach dem Stress-Ereignis.

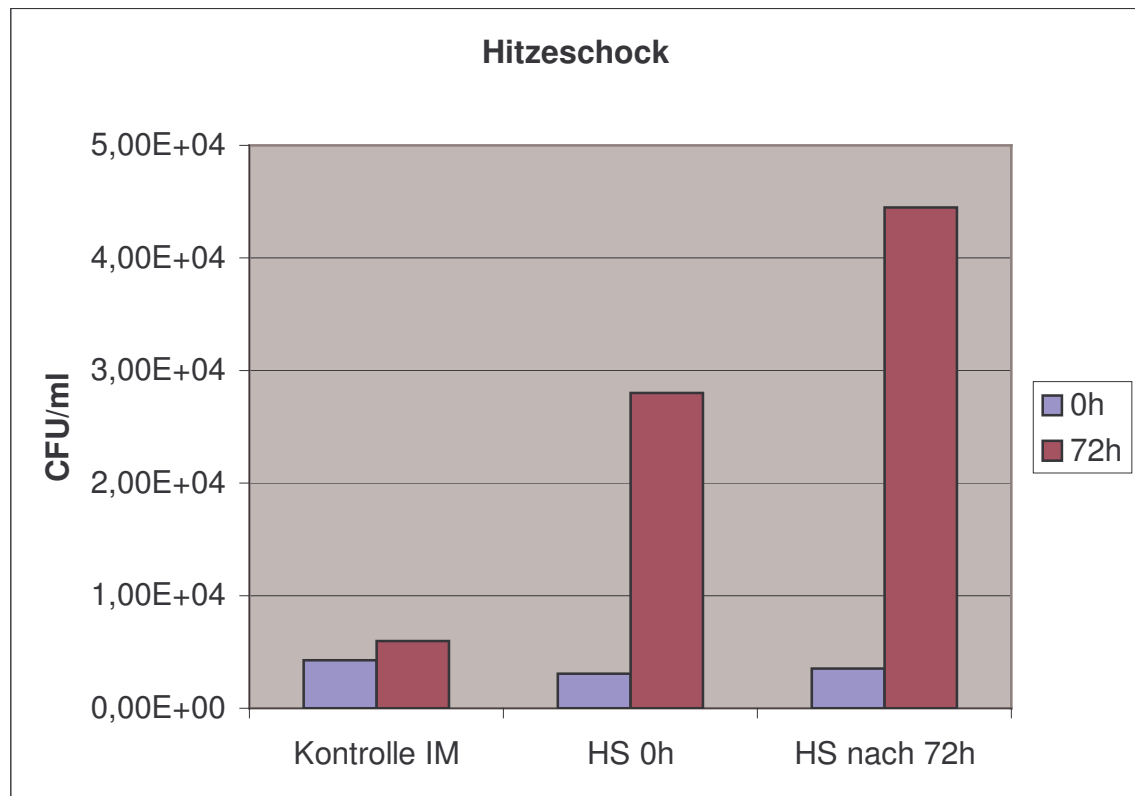


Abbildung 3.6: Einfluss der Temperatur als Stress-Ereignis und der Zeit (bei ansonsten konstanten Bedingungen: Amöbenkonzentration 1×10^7 /ml, IM) des Amöbenüberstands auf die Vermehrung von *Legionella dumoffii* in MM6-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch.

3.1.5 Zusammenfassung der Vorversuche

Als wichtigstes Ergebnis der Vorversuche lässt sich folgendes festhalten:

3 Ergebnisse

Der Amöbenmediator, der die Vermehrung der Legionellen steigert, ist unabhängig von der Interaktion verschiedener Spezies. Er ist in den Überständen uninfizierter *Acanthamoebae castellanii* enthalten und nicht abhängig von Kokulturen mit Legionellen-infizierten Makrophagen. *Acanthamoeba castellanii* sezerniert eine Substanz, die die Vermehrung von *Legionella dumoffii* in MM6-Zellen steigert.

Die Bedingungen, unter denen *Acanthamoba castellanii* die Substanz besonders stark produziert, scheinen mit Stress für die Amöben einherzugehen. So konnte der Effekt gesteigert werden, indem die Amöbenkonzentration stark erhöht wurde und die Temperatur auf unter und über 37°C verändert wurde. Auch der Nährstoffgehalt des Mediums hat einen Einfluss: je weniger Nährstoffe, umso stärker der Effekt des Überstands und damit auch die postulierte Sekretion.

Für die weiteren Versuche hat sich aus den Vorversuchen folgendes System zur Herstellung der Überstände am besten bewährt:

- es werden Zellkulturflaschen verwendet
- Amöben werden in MM6-Infektionsmedium (IM) resuspendiert, auch PBS ist geeignet
- die Amöbenkonzentration beträgt 1×10^7 Zellen pro Milliliter
- die Amöben werden für 72 h bei Raumtemperatur im Anaerobiertopf gehalten, danach wird der Überstand entnommen.

3.2 Einfluss von *Acanthamoeba castellanii* und *Hartmanella vermiformis* auf die intrazelluläre Vermehrung von Legionellen in MM6-Zellen

3.2.1 Versuche in Kokultur

In den von Frau Reiff (2002) durchgeführten Versuchen wurde die intrazelluläre Vermehrungsfähigkeit unterschiedlicher Legionellenspezies in MM6-Zellen alleine und im Vergleich mit *Acanthamoeba castellanii* untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Kokultur mit *Acanthamoeba castellanii* einen positiven Effekt auf die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella gormanii*, *Legionella micdadei*, *Legionella steigerwaltii*, *Legionella longbeachae* und *Legionella dumoffii* hat, während die Vermehrung von *Legionella pneumophila* nicht weiter gesteigert werden konnte. Eine der Hauptfragestellungen dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob dieser Effekt nur bei *Acanthamoeba castellanii* existiert oder ob auch andere Protozoen in der Lage sind, die intrazelluläre Vermehrung von Legionellen zu steigern. Neben *Acanthamoeba castellanii* ist *Hartmanella vermiformis* der zweite wichtige Protozoen-Wirt für Legionellen, so dass es interessant erschien zu untersuchen, ob auch diese Spezies die Fähigkeit besitzt, das Wachstum von intrazellulären Legionellen in MM6-Zellen zu beeinflussen.

Alle Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt, graphisch dargestellt ist exemplarisch jeweils einer der Versuche.

3.2.1.1 *Legionella dumoffii* in Kokultur mit *Hartmanella vermiformis*

Als Vertreterin mäßig humanpathogener Legionellenspezies zeigt *Legionella dumoffii* eine geringe intrazelluläre Vermehrungsfähigkeit. Es kann ein Absinken der Zellzahl nach 72 Stunden beobachtet werden. In Kokultur mit *Hartmanella vermiformis* hingegen kommt es zu einem Wachstumsschub. *Hartmanella vermiformis* bewirkt also eine signifikante Vermehrungssteigerung bei intrazellulären *Legionella dumoffii*.

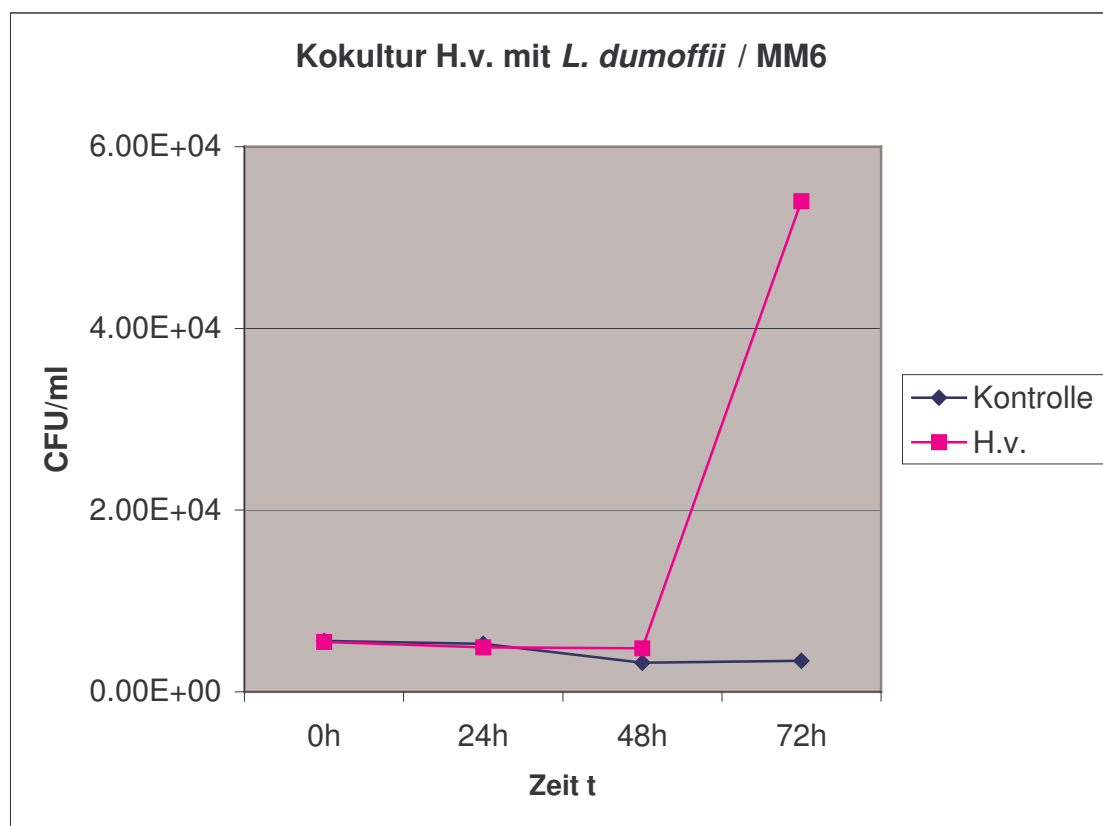


Abbildung 3.7: Einfluss der Kokultur von *Hartmanella vermiformis* (H.v.) auf die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella dumoffii* in infizierten MM6-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch.

3.2.1.2 *Legionella pneumophila* in Kokultur mit *Hartmanella vermiformis*

Nach Infektion von MM6-Zellen mit der humanpathogenen Spezies *Legionella pneumophila* SG1, Subtyp Pontiac, kam es zu einer Vermehrung um ca. vier Logarithmenstufen nach 72 Stunden. Diese maximale intrazelluläre Vermehrung konnte durch Kokultur mit *Hartmanella vermiformis* in geringem Ausmaß gesteigert werden.

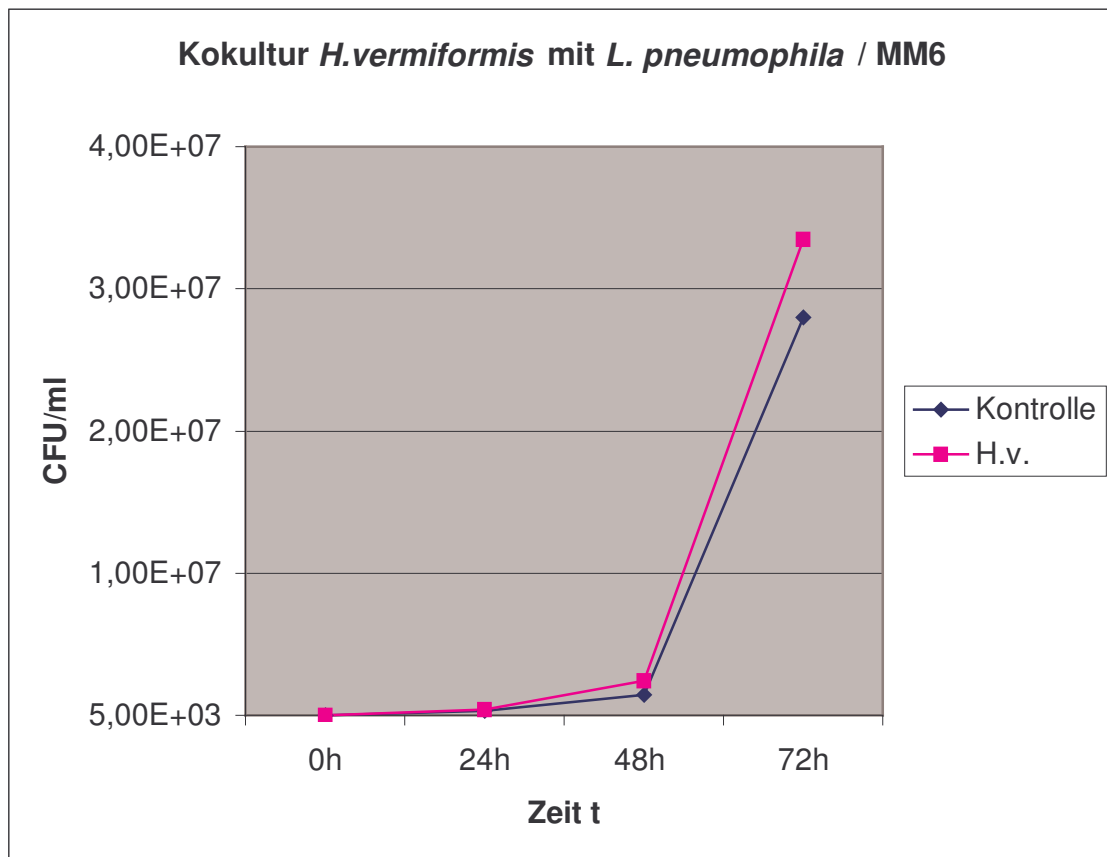


Abbildung 3.8: Einfluss der Kokultur von *Hartmanella vermiformis* auf die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella pneumophila* in infizierten MM6-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch.

3.2.1.3 *Legionella gormanii* in Kokultur mit *Hartmanella vermiformis*

Legionella gormanii ist wiederum eine Vertreterin gering humanpathogener Spezies. Sie kann sich in MM6- Zellen vermehren. Dabei zeigt sie ein Wachstum um ca. eine Zehnerpotenz. Durch die Kokultur mit *Hartmanella vermiformis* konnte dieses Wachstum nicht weiter gesteigert werden. *Hartmanella vermiformis* hat also in Kokultur keinen vermehrungsfördernden Einfluss auf die Spezies *Legionella gormanii*.

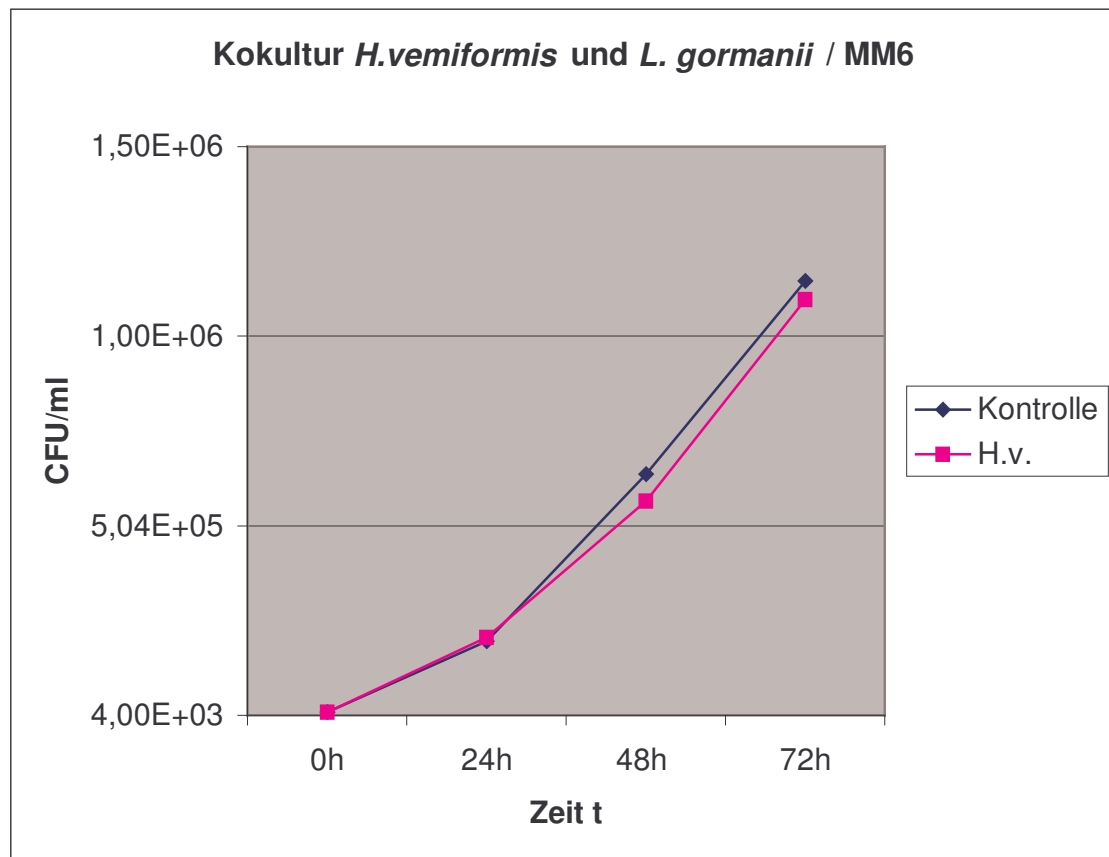


Abbildung 3.9: Einfluss der Kokultur von *Hartmanella vermiformis* auf die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella gormanii* in infizierten MM6-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch.

3.2.1.4 *Legionella steigerwaltii* in Kokultur mit *Hartmanella vermiformis*

Die apathogene Spezies *Legionella steigerwaltii* verfügt nicht über die Fähigkeit zur intrazellulären Vermehrung. Die Zellzahl fällt nach 72 Stunden um ca. eine Zehnerpotenz ab. Auch durch Kokultur mit *Hartmanella vermiformis* konnte die Vermehrung nicht gesteigert werden.

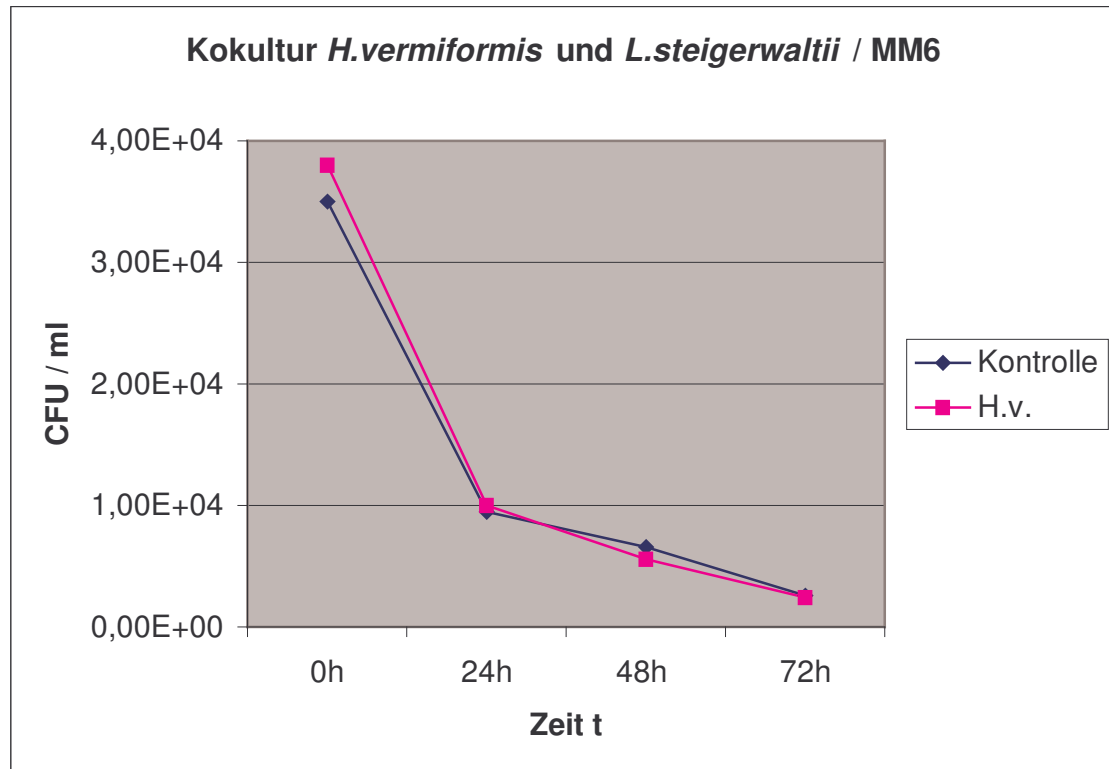


Abbildung 3.10: Einfluss der Kokultur von *Hartmanella vermiformis* auf die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella steigerwaltii* in infizierten MM6-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch.

3.2.1.5 *Legionella micdadei* in Kokultur mit *Hartmanella vermiformis*

Bei der Spezies *Legionella micdadei* handelt es sich um mäßig humanpathogene Legionellen. Sie zeigen eine mäßig ausgeprägte Fähigkeit zur intrazellulären Vermehrung. Die Zellzahl bleibt ungefähr konstant im Zeitraum von 72 Stunden. In einer Kokultur mit *Hartmanella vermiformis* kann die Vermehrungsrate erheblich gesteigert werden. Nach 72 Stunden hat die Zellzahl um ca. eine Logarithmusstufe zugenommen.

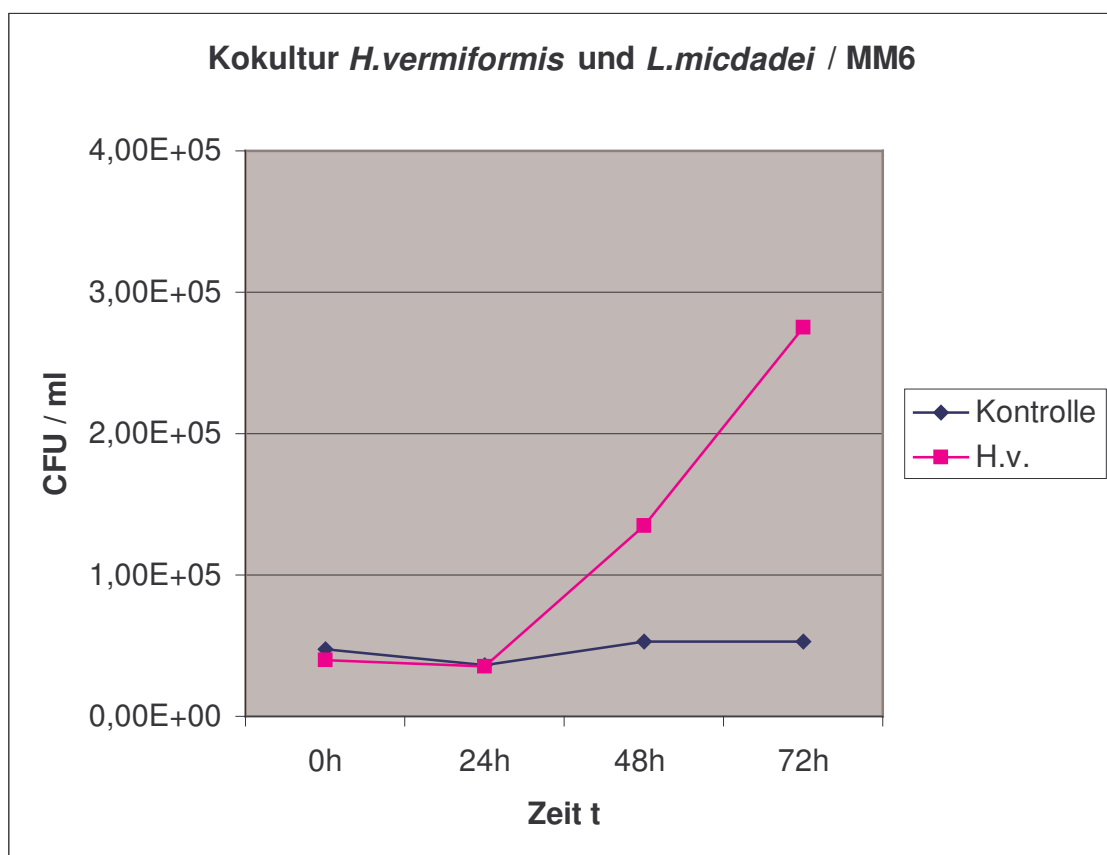


Abbildung 3.11: Einfluss der Kokultur von *Hartmanella vermiformis* auf die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella micdadei* in infizierten MM6-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch.

3.2.1.6 *Legionella longbeachae* in Kokultur mit *Hartmanella vermiformis*

Legionella longbeachae, ebenfalls eine Vertreterin der mäßig humanpathogenen Spezies, zeigt eine geringe intrazelluläre Vermehrungsfähigkeit in MM6-Zellen, welche durch Kokultur mit *Hartmanella vermiformis* signifikant gesteigert werden konnte.

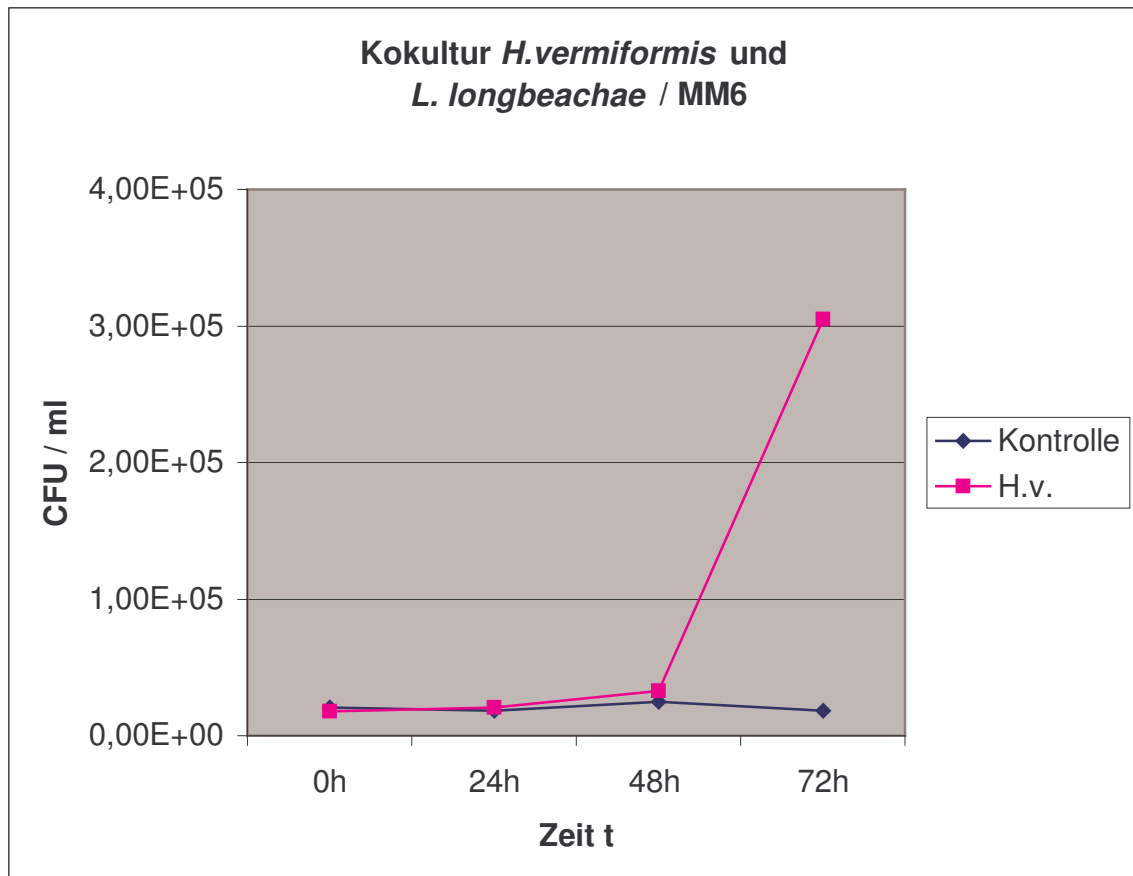


Abbildung 3.12: Einfluss der Kokultur von *Hartmanella vermiformis* auf die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella longbeachae* in infizierten MM6-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch.

3.2.1.7 Zusammenfassung der Versuche in Kokultur mit *Hartmanella vermiformis*

Zusammenfassend konnte man folgende Effekte der Kokultur mit *Hartmanella vermiformis* auf die intrazelluläre Vermehrung der verschiedenen Legionellenspezies beobachten:

- *Legionella dumoffii* und *Legionella longbeachae* zeigten eine deutliche Zunahme der intrazellulären Vermehrung in Kokultur mit *Hartmanella vermiformis*. Nach 72 Stunden war die Zahl der Colony-Forming–Units um mehr als eine Zehnerpotenz höher als in der Kontrollinfektion ohne *Hartmanella vermiformis*.
- Auch bei *Legionella micdadei* war eine gesteigerte Vermehrung zu beobachten, die etwas geringer war als bei den Spezies *Legionella dumoffii* und *Legionella longbeachae* und nach 72 Stunden ca. das fünffache der Kontrollinfektion betrug.
- *Legionella pneumophila* zeigte eine sehr geringe Zunahme unter dem Einfluss der Kokultur mit *Hartmanella vermiformis*.
- Bei *Legionella gormanii* und *Legionella steigerwaltii* konnte kein vermehrungsfördernder Effekt der Kokultur mit *Hartmanella vermiformis* beobachtet werden.

3 Ergebnisse

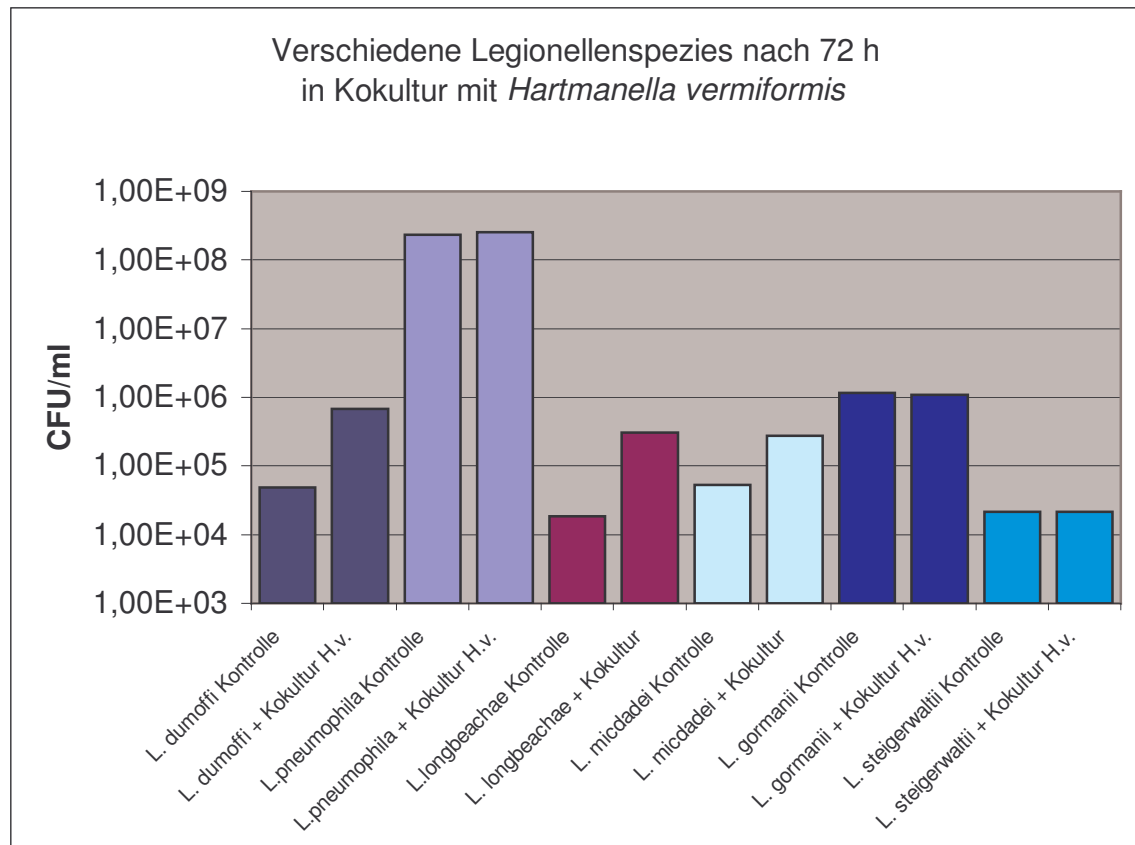


Abbildung 3.13: Einfluss der Kokultur von *Hartmanella vermiformis* auf die intrazelluläre Vermehrung von verschiedenen Legionellenspezies in infizierten MM6-Zellen. Dargestellt ist die Zahl der Colony-Forming-Units der verschiedenen Spezies nach 72 Stunden in Kokultur im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ohne Kokultur bei einem repräsentativen Versuch.

3.2.2 Versuche mit Überständen

Als wichtigstes Ergebnis der Vorversuche konnte festgestellt werden, dass *Acanthamoeba castellanii* eine Substanz sezerniert, die vor allem die Vermehrung von *Legionella dumoffii* in MM6-Zellen steigert. Die Sekretion dieser Substanz ist unabhängig von der Interaktion verschiedener Spezies: Sie ist in den Überständen uninfizierter *Acanthamoebae castellanii* enthalten und nicht abhängig von Kokulturen mit Legionellen-infizierten Makrophagen

In den Vorversuchen wurde ein System zur Herstellung aktiver Amöbenüberstände im Large-Scale-Verfahren entwickelt. Die so produzierten Überstände von *Acanthamoeba castellanii* und *Hartmanella vermiformis* wurden zu MM6-Zellen gegeben, die mit verschiedenen Legionellenspezies infiziert worden waren, um die Effekte der Überstände auf die intrazelluläre Vermehrung der Legionellen zu untersuchen.

3.2.2.1 *Legionella dumoffii* und Überstände von *Acanthamoeba castellanii*

Zu einer intrazellulären Infektion von MM6-Zellen mit *Legionella dumoffii* wurde der Überstand von *Acanthamoeba castellanii* gegeben. Nach 72 Stunden wurde ein signifikanter Anstieg der intrazellulären Vermehrung beobachtet. Dies war auch schon in den Vorversuchen festgestellt worden. Aus diesen Versuchen war auch die Wachstumskinetik bekannt. Die maximale Vermehrung ist nach 72 Stunden zu erwarten gewesen, daher wurden hier nur die Zeitpunkte 0 Stunden und 72 Stunden untersucht.

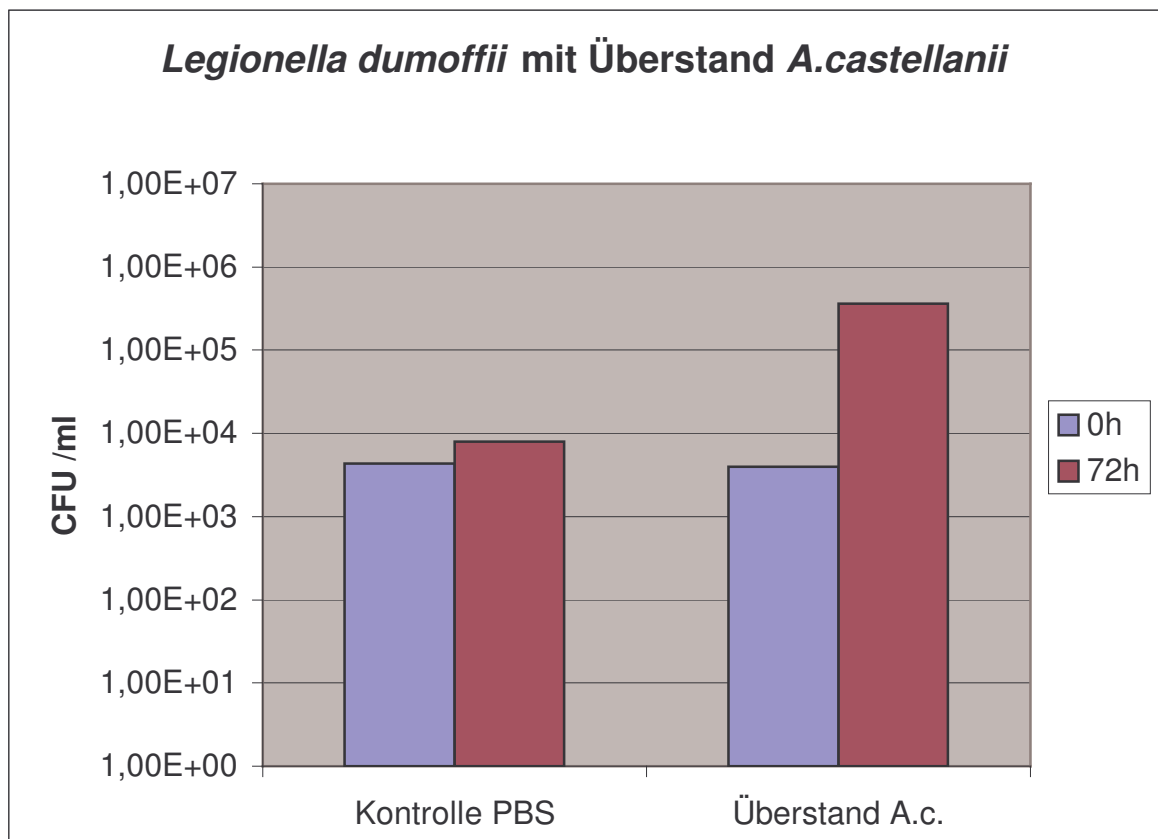


Abbildung 3.14: Einfluss des Überstands von *Acanthamoeba castellanii* auf die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella dumoffii* in infizierten MM6-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch. Skalierung der y-Achse in logarithmischer Darstellung.

3.2.2.2 *Legionella dumoffii* und Überstände von *Hartmanella vermiformis*

Die Vermehrung von *Legionella dumoffii* wird nicht nur durch die von *Acanthamoeba castellanii* produzierten Substanzen beeinflusst. Auch durch die Zugabe von Überständen von *Hartmanella vermiformis* lässt sich die intrazelluläre Vermehrung steigern.

Dieser Effekt ist bei Überständen von *Hartmanella vermiformis* sogar noch stärker ausgeprägt als bei *Acanthamoeba castellanii*-Überständen. Vergleicht man den vermehrungsfördernden Effekt von Überstand und Kokultur, so zeigt sich, dass die Überstände potenter sind. Während in der oben dargestellten Infektion (Abbildung 3.14) nach Zugabe von *Acanthamoeba castellanii* Überständen das Wachstum im Vergleich zur Kontrolle um ca. eine Zehnerpotenz zunimmt, ist mit *Hartmanella vermiformis* sogar eine Wachstumssteigerung um mehr als zwei Zehnerpotenzen zu beobachten, wie in Abbildung 3.15 gezeigt.

Der Vergleich der beiden Überstände ist unter Abbildung 3.23 im Kapitel 3.4.2 nochmals separat dargestellt.

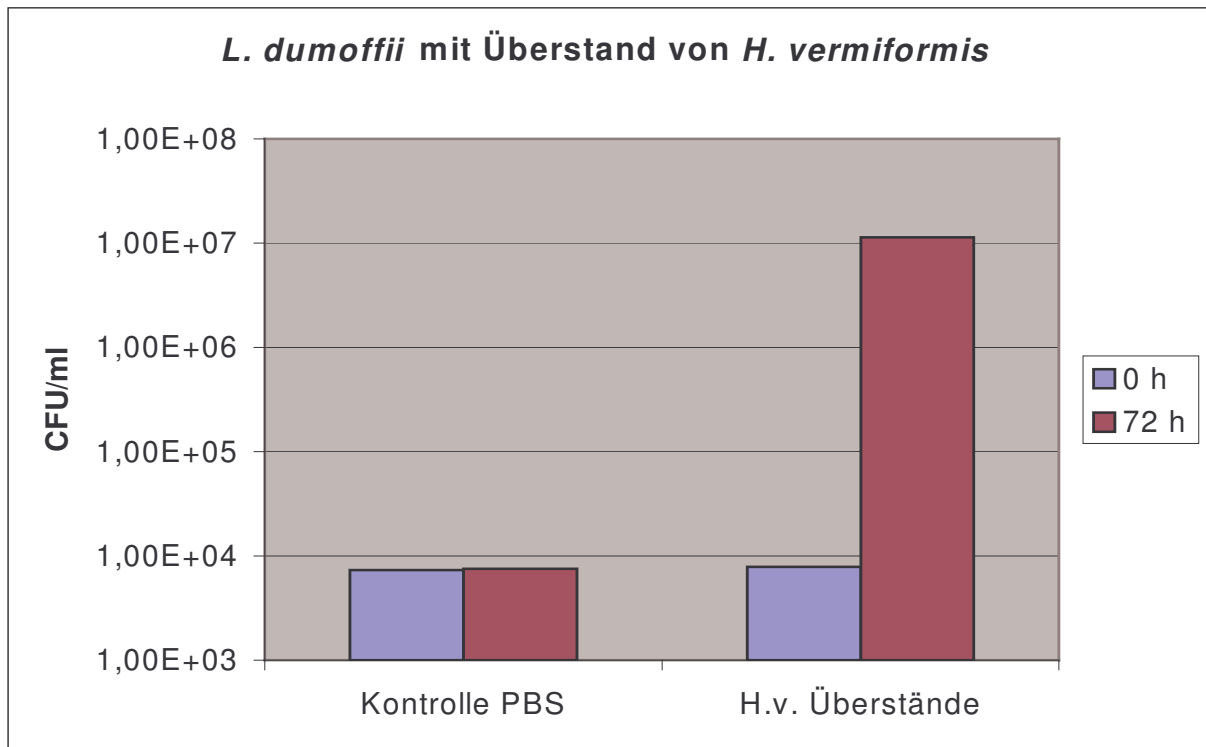


Abbildung 3.15: Einfluss des Überstands von *Hartmanella vermiformis* auf die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella dumoffii* in infizierten MM6-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch. Skalierung der y-Achse in logarithmischer Darstellung.

3.2.2.3 *Legionella pneumophila* und Überstände von *Hartmanella vermiformis*

Gibt man zu einer intrazellulären Infektion von *Legionella pneumophila* in MM6 Zellen Überstände von *Hartmanella vermiformis*, lässt sich eine weitere signifikante Zunahme der Vermehrung beobachten. Anders als bei Überständen von *Acanthamoeba castellanii*, die nicht in der Lage sind, die Vermehrung zu steigern, ist der Überstand von *Hartmanella vermiformis* dazu fähig. Auch hier zeigt sich, dass die Überstände potenter sind als die Kokultur, denn bei Kokultur mit *Hartmanella vermiformis* war nur eine sehr geringe Zunahme der intrazellulären Vermehrung gezeigt worden.

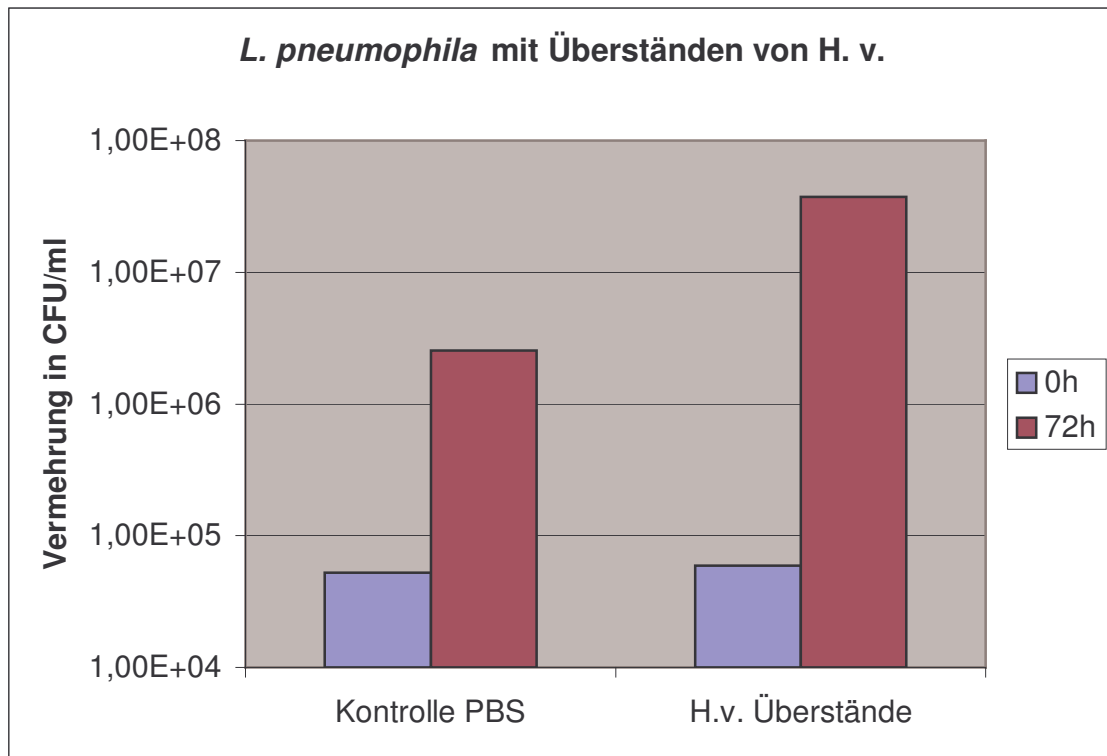


Abbildung 3.16: Einfluss des Überstands von *Hartmanella vermiformis* auf die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella pneumophila* in infizierten MM6-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch. Skalierung der y-Achse in logarithmischer Darstellung.

3.2.2.4 *Legionella gormanii* und Überstände von *Hartmanella vermiformis*

Die intrazelluläre Infektion von *Legionella gormanii* in MM6-Zellen hat in der Kokultur mit *Hartmanella vermiformis* keine gesteigerte Vermehrung gezeigt. Unter dem Einfluss von *Hartmanella vermiformis* – Überständen hingegen ist nach 72 Stunden eine signifikante Zunahme der Vermehrung zu beobachten

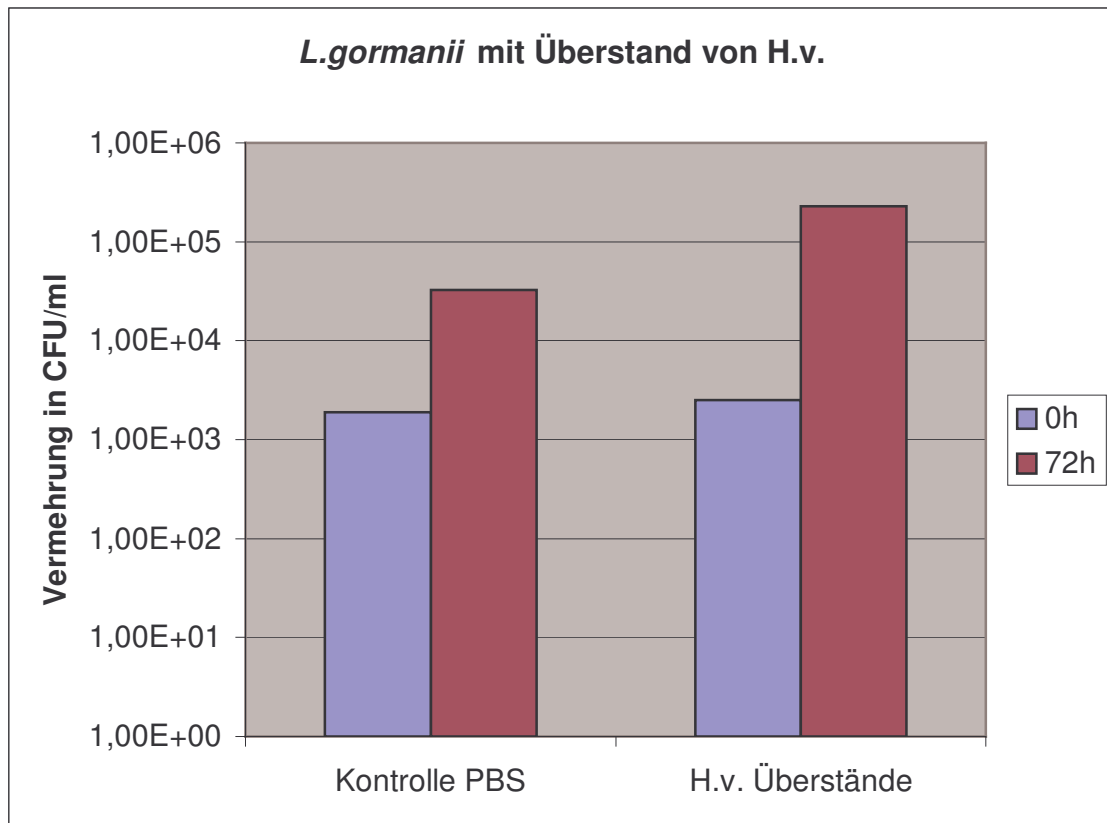


Abbildung 3.17: Einfluss des Überstands von *Hartmanella vermiformis* auf die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella gormanii* in infizierten MM6-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch. Skalierung der y-Achse in logarithmischer Darstellung.

3.2.2.5 *Legionella steigerwaltii* und Überstände von *Hartmanella vermiformis*

Die nicht humanpathogene Spezies *Legionella steigerwaltii* zeigt eine geringe Fähigkeit zur Vermehrung in MM6-Zellen. Die Zellzahl hat 72 Stunden nach Beginn der Infektion deutlich abgenommen, unabhängig davon, ob man eine Kokultur mit *Hartmanella vermiformis* durchführt, oder, wie hier im Experiment gezeigt, Überstände von *Hartmanella vermiformis* zugibt.

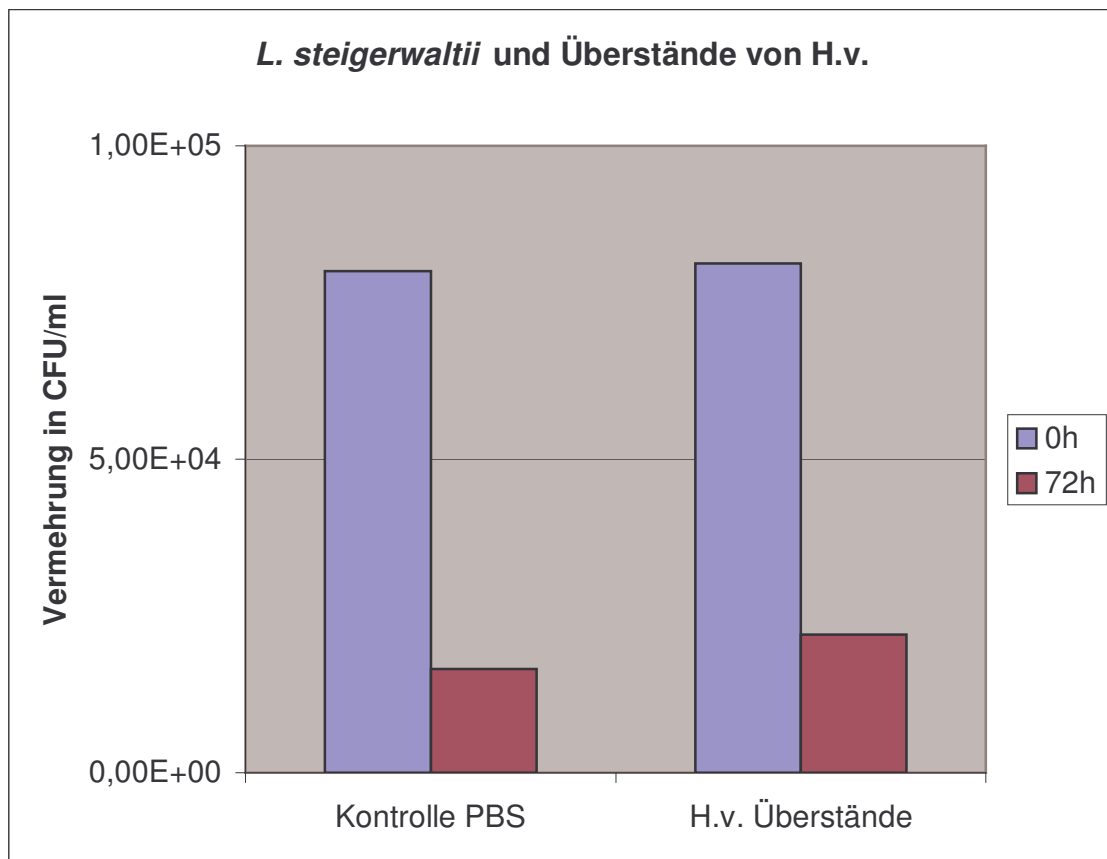


Abbildung 3.18: Einfluss des Überstands von *Hartmanella vermiformis* auf die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella dumoffii* in infizierten MM6-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch.

3.2.2.6 *Legionella micdadei* und Überstände von *Hartmanella vermiformis*

Die mäßig humanpathogene Spezies *Legionella micdadei* zeigt eine mäßig ausgeprägte Fähigkeit zur intrazellulären Vermehrung.

Mit Überständen von *Hartmanella vermiformis* kann die Vermehrungsrate um etwa eine Zehnerpotenz gesteigert werden.

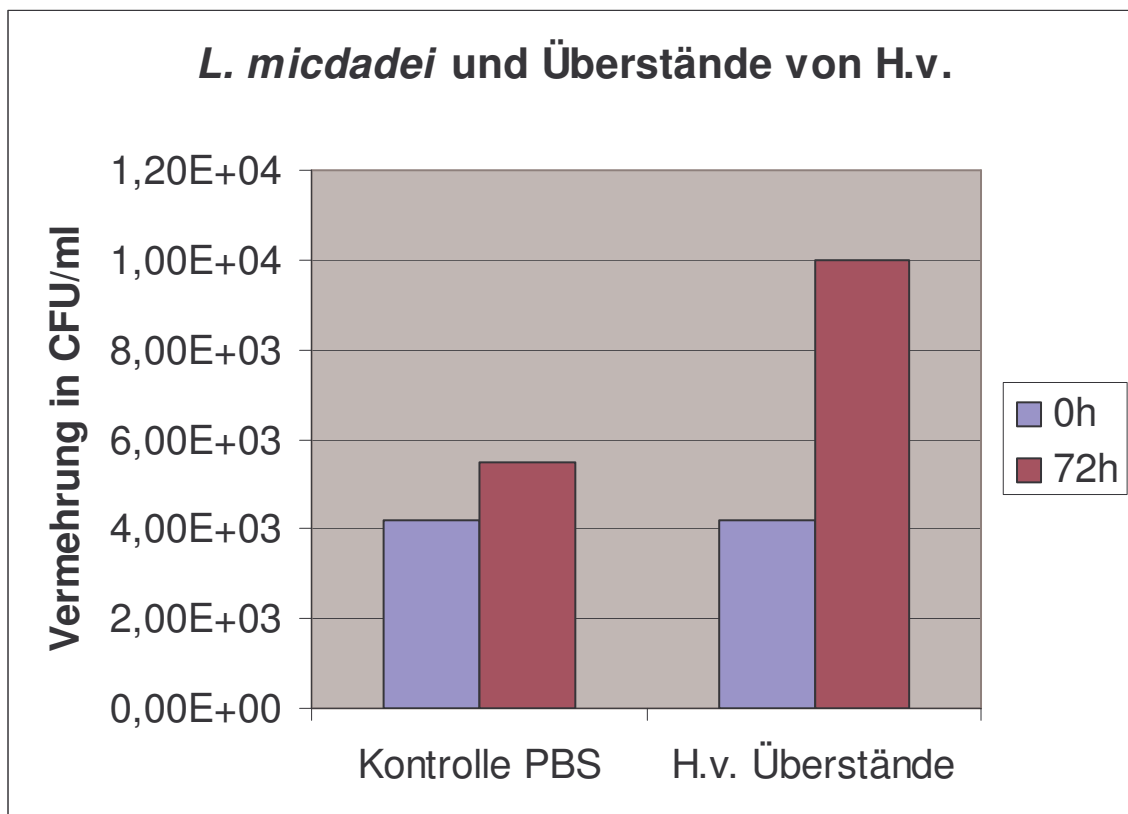


Abbildung 3.19: Einfluss des Überstands von *Hartmanella vermiformis* auf die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella micdadei* in infizierten MM6-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch.

3.2.2.7 *Legionella longbeachae* und Überstände von *Hartmanella vermiformis*

Als Vertreterin der mäßig humanpathogenen Legionellenspezies zeigte *Legionella longbeachae* eine gering ausgeprägt Fähigkeit zur intrazellulären Vermehrung. Nach 72 Stunden ist die Anzahl der kolonie formenden Einheiten deutlich gesunken. Durch den Einfluss von *Hartmanella vermiformis*-Überständen kann die Vermehrungsfähigkeit signifikant gesteigert werden. Es wurde eine Zunahme der Zellzahlen um eine Zehnerpotenz beobachtet.

Dieser positive Effekt von *Hartmanella vermiformis* auf die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella longbeachae* konnte auch schon bei den Versuchen in Kokultur gezeigt werden, allerdings ist er bei den Überständen ausgeprägter.

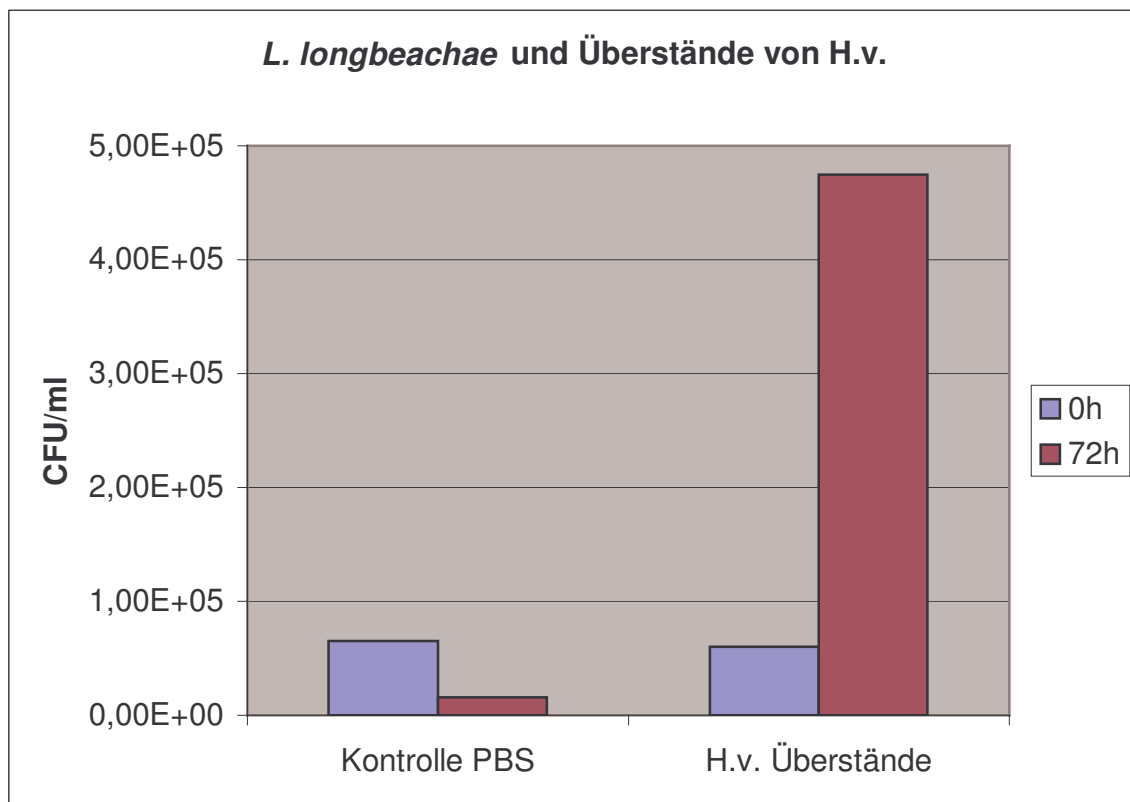


Abbildung 3.20: Einfluss des Überstands von *Hartmanella vermiformis* auf die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella longbeachae* in infizierten MM6-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch.

3.2.2.8 Zusammenfassung der Versuche mit Überständen

Die Überstände von *Hartmanella vermiformis* bewirkten bei den Infektionen mit den verschiedenen Legionellenspezies folgende Effekte:

- *Legionella longbeachae* zeigte die deutlichste Zunahme der intrazellulären Vermehrung nach Zugabe der Überstände von *Hartmanella vermiformis*. Nach 72 Stunden war die Zahl der Colony-Forming–Units um mehr als das fünfzehnfache höher als in der Kontrollinfektion ohne *Hartmanella vermiformis*- Überstände.
- Auch bei *Legionella dumoffii*, *Legionella micdadei* und *Legionella gormanii* war eine gesteigerte Vermehrung zu beobachten, die nach 72 Stunden ca. das zehnfache der Kontrollinfektion betrug.
- *Legionella pneumophila*, bei der in den Versuchen in Kokultur kein signifikanter Einfluss von *Hartmanella vermiformis* beobachtet werden konnte, zeigt nun mit den Überständen von *Hartmanella vermiformis* eine deutlich gesteigerte Zunahme der intrazellulären Vermehrung. Im Vergleich zur Kontrollinfektion betrug die Zahl der Colony-Forming –Units pro Milliliter ca. eine Zehnerpotenz mehr bei Zugabe von *Hartmanella vermiformis*-Überstand.
- Bei *Legionella steigerwaltii* konnte kein signifikanter vermehrungsfördernder Effekt der Überstände von *Hartmanella vermiformis* beobachtet werden.
- Bei den Spezies, bei denen ein vermehrungsfördernder Effekt der *Hartmanella vermiformis*-Überstände beobachtet werden konnte, war dieser stärker ausgeprägt, als bei den Versuchen in Kokultur.
- Bei den Spezies, bei denen ein vermehrungsfördernder Effekt der *Hartmanella vermiformis*-Überstände beobachtet werden konnte, trat dieser nach 72 Stunden auf.

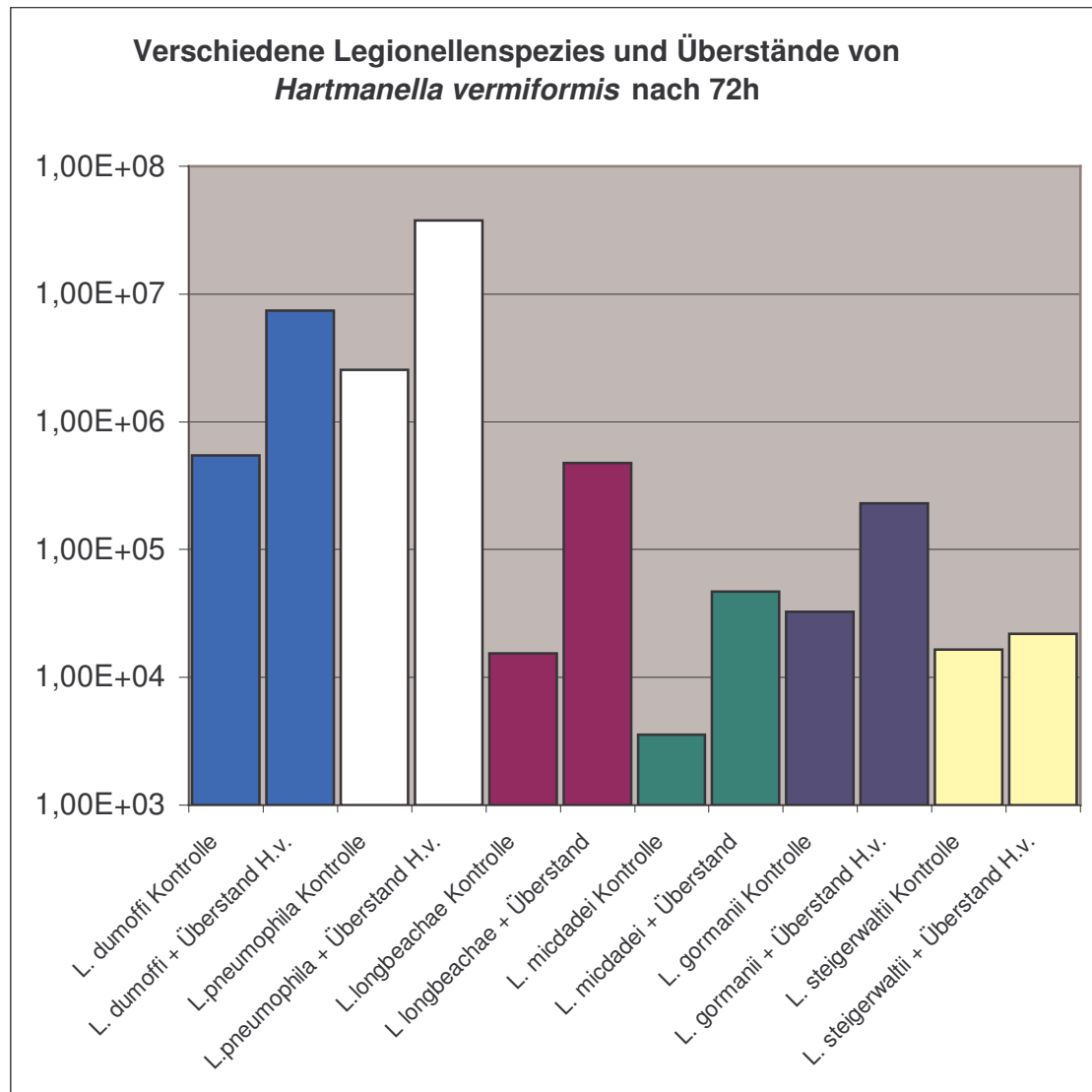


Abbildung 3.21: Einfluss des Überstands von *Hartmanella vermiformis* auf die intrazelluläre Vermehrung von verschiedenen Legionellenspezies in infizierten MM6-Zellen. Dargestellt ist die Zahl der Colony-Forming-Units der verschiedenen Spezies nach 72 Stunden mit Überstand im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ohne Überstand aus repräsentativen Einzelversuchen. Skalierung der y-Achse in logarithmischer Darstellung.

3.2.3 *Hartmanella vermiformis*: Kokultur und Überstände im Vergleich

Exemplarisch dargestellt ist hier eine Infektion von MM6-Zellen mit *Legionella dumoffii*, die in Kokultur mit *Hartmanella vermiformis* waren, mit Überstand von *Hartmanella vermiformis* behandelt wurden und einer Kontrollinfektion zum Vergleich. Nach 72 Stunden zeigt die Kokultur-Infektion ein deutlich vermehrtes Wachstum gegenüber der Kontrolle. Weitaus aktiver aber ist der Überstand von *Hartmanella vermiformis*. Das Wachstum der *Legionella dumoffii*-Infektion, die mit Überstand behandelt wurde, übersteigt das der Kokultur um ein Vielfaches. Der Effekt der Potenzierung des intrazellulären Wachstums von Legionellen ist beim Überstand von *Hartmanella vermiformis* deutlich stärker ausgeprägt als bei der Kokultur.

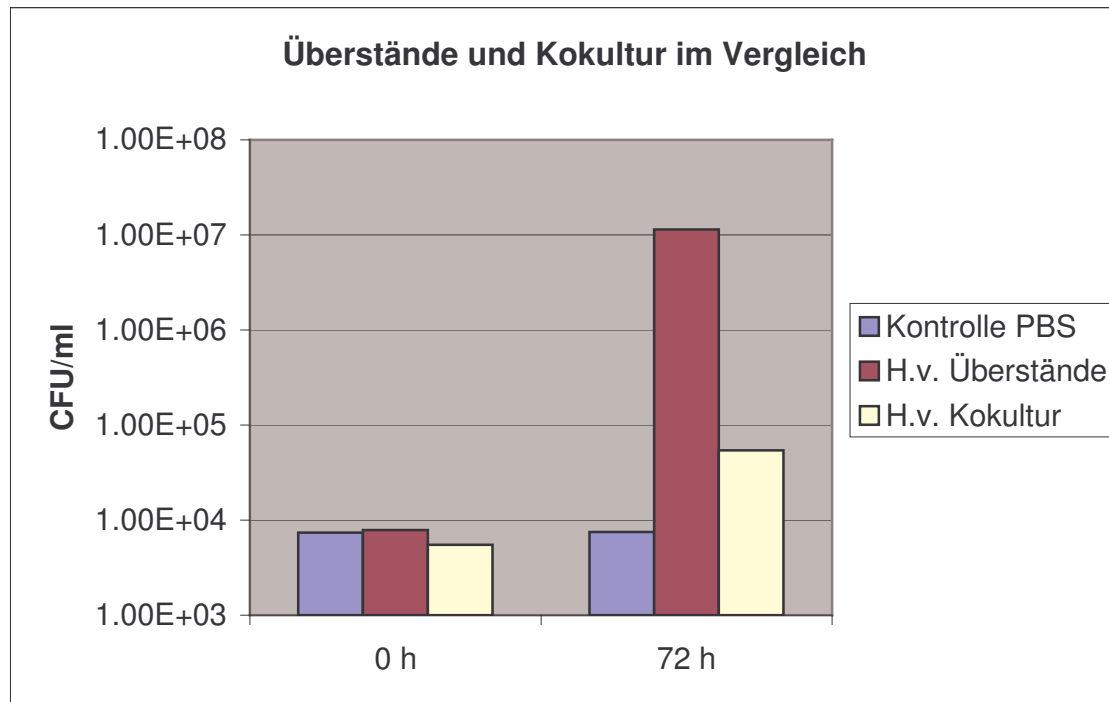


Abbildung 3.22: Vergleich des Einfluss von Überständen von *Hartmanella vermiformis* und Kokultur mit *Hartmanella vermiformis* auf die intrazelluläre Vermehrung am Beispiel von *Legionella dumoffii* in MM6-Zellen im Vergleich zur Kontrollinfektion mit PBS. Dargestellt sind die Zeitpunkte 0 Stunden und 72 Stunden eines repräsentativen Versuchs. Skalierung der y-Achse in logarithmischer Darstellung.

3.2.4 Überstände von *Acanthamoeba castellanii* und *Hartmanella vermiformis* im Vergleich

Um die Effekte von *Acanthamoeba castellanii* und *Hartmanella vermiformis* im Vergleich beurteilen zu können, wurde ein Infektion mit *Legionella dumoffii* durchgeführt und sowohl Überstände von *Hartmanella vermiformis* und *Acanthamoeba castellanii* zugegeben. Dabei zeigt sich, wie in Abbildung 3.23 dargestellt, dass die Überstände von *Hartmanella vermiformis* weitaus potenter sind als die von *Acanthamoeba castellanii*.

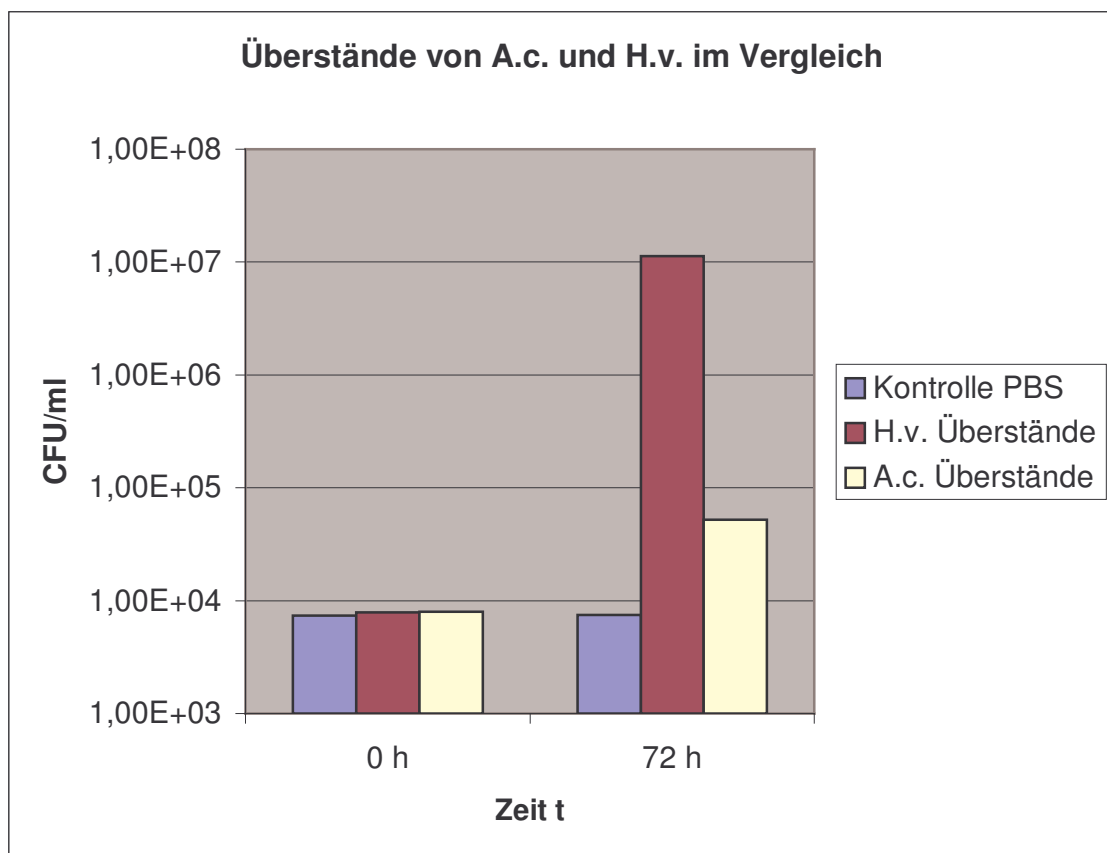


Abbildung 3.23: Einfluss der Überstände von *Hartmanella vermiformis* und *Acanthamoeba castellanii* auf die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella dumoffii* in MM6-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch. Skalierung der y-Achse in logarithmischer Darstellung.

3.3 Physikalische Charakterisierung des bioaktiven Mediators

Nachdem in den vorangegangenen Versuchen gezeigt werden konnte, dass sowohl *Acanthamoeba castellanii* als auch *Hartmanella vermiformis* einen Faktor sezernieren, der in der Lage ist, die intrazelluläre Vermehrung von Legionellen zu fördern, sollen im Folgenden die physikalischen Eigenschaften dieses Mediators näher charakterisiert werden.

3.3.1 Thermostabilität

Die Thermostabilität unseres bioaktiven Mediators wurde getestet, indem wir verschiedene Überstände für 10 Minuten auf 95° Celsius erhitzt haben und für jeweils 72 Stunden im Gefrierschrank bei -30° Celsius, in Kühlschrank bei 3° Celsius und bei Raumtemperatur (20°C) aufbewahrt haben. Danach wurde die Aktivität der so behandelten Überstände in einer Legionelleninfektion getestet. Als Testinfektion wurden in allen Versuchen *Legionella dumoffi* in MM6-Zellen verwendet, die Überstände stammten von *Acanthamoeba castellanii*.

Bevor die Überstände den verschiedenen Temperaturen ausgesetzt wurden, wurde die Aktivität in einer Infektion getestet, so dass jeweils die Aktivität vor und nach der Thermobehandlung im Vergleich zur Kontrolle beurteilt werden kann.

3 Ergebnisse

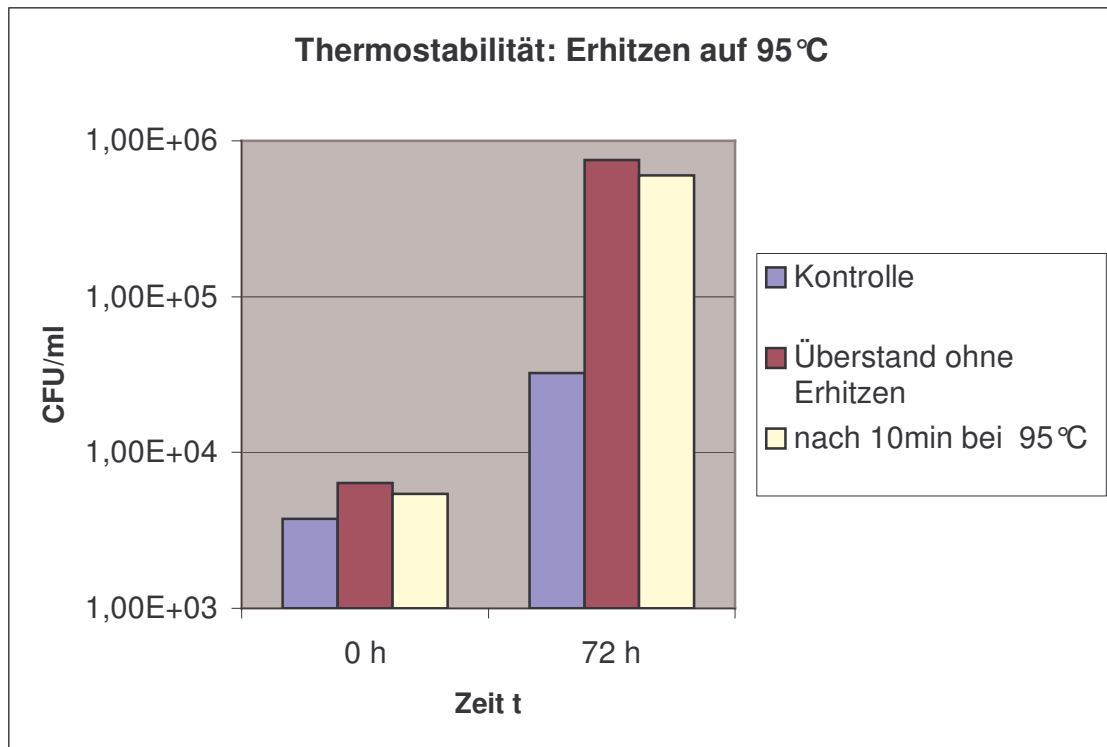


Abbildung 3.24: Einfluss des Überstand von *Acanthamoeba castellanii* vor und nach dem Erhitzen auf 95°Celsius für 10 Minuten auf die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella dumoffii* in MM6-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch Skalierung der y-Achse in logarithmischer Darstellung.

Erhitzt man den Überstand auf 95° Celsius und belässt ihn für 10 Minuten bei dieser Temperatur, so zeigt sich, dass er im Vergleich zum unbehandelten Überstand ähnlich aktiv ist wie dieser. Dies ist in Abbildung 3.24 dargestellt.

In den folgenden Versuchen wurden die Überstände für 72 Stunden bei unterschiedlichen Temperaturen aufbewahrt. Die Aktivität der Überstände wurde in einer Legionelleninfektion vorher getestet. Nach Ablauf der 72 Stunden wurde die Aktivität nochmals geprüft.

Vergleicht man die Aktivität des Überstand vor der Temperatur-Behandlung mit der Kontrollinfektion, die mit PBS durchgeführt wurde, so zeigt sich ein ca. um das vierfache gesteigertes Wachstum. Bei der Infektion, die 72 Stunden später durchgeführt wurde, ist wiederum eine ca. um das vierfache erhöhte Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Zwar handelt es sich um verschiedene

3 Ergebnisse

Infektionen, die an verschiedenen Tagen durchgeführt wurden (vor und nach der Temperatur-Behandlung), daher sind die Ausgangswerte unterschiedlich, aber der Effekt der Amöben-Überstände ist vergleichbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Überstände nach 72 Stunden bei Raumtemperatur, im Kühlschrank und im Gefrierschrank noch vergleichbar aktiv waren wie zuvor. Der gesuchte bioaktive Mediator ist also beständig auch nach Erhitzen auf 95° Celsius, Tiefkühlen und der Aufbewahrung bei 3° und 20°Celsius.

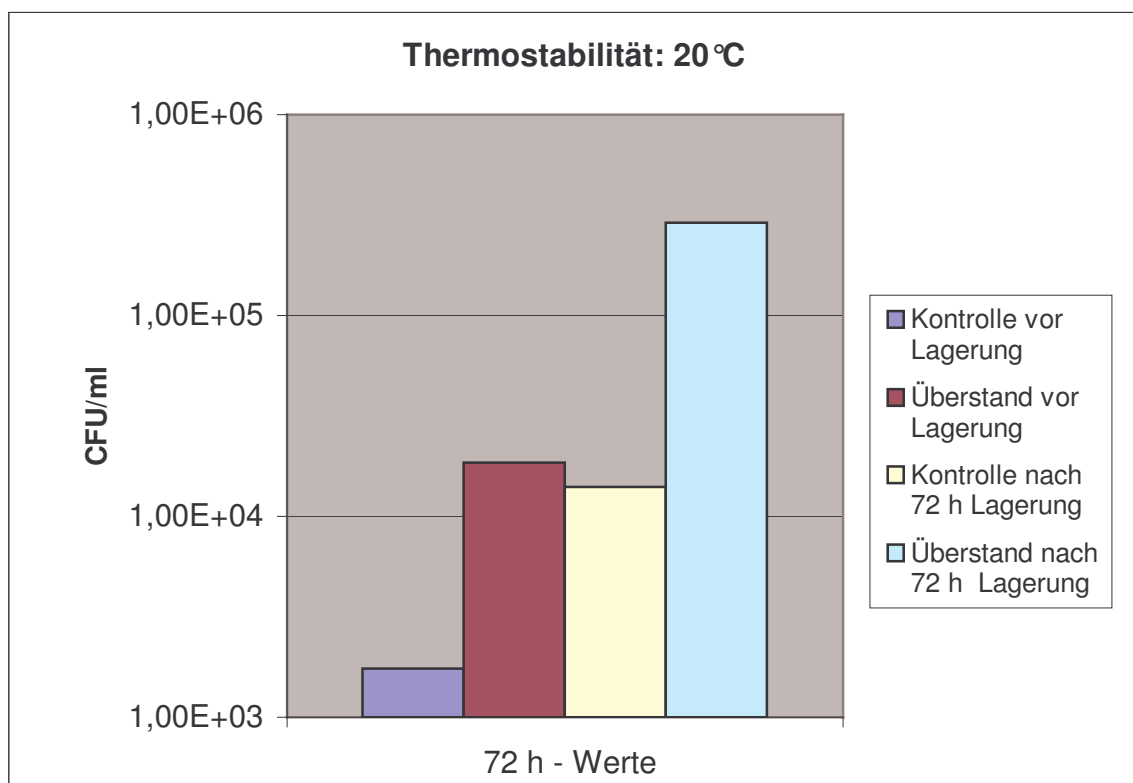


Abbildung 3.25: Einfluss des Überstand von *Acanthamoeba castellanii* vor und nach der Aufbewahrung bei 20° Celsius für 72 Stunden auf die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella dumoffii* in MM6-Zellen. Dargestellt sind die 72 Stunden-Werte eines repräsentativen Einzelversuchs.

3 Ergebnisse

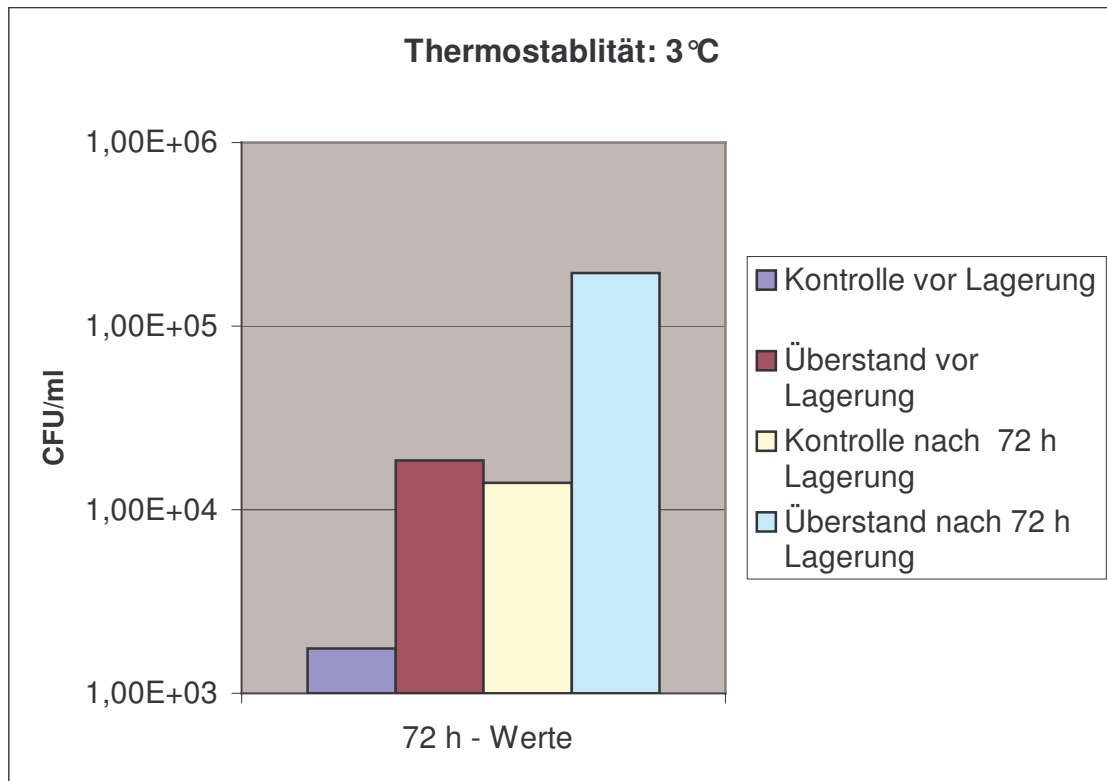


Abbildung 3.26: Einfluss des Überstand von *Acanthamoeba castellanii* vor und nach der Aufbewahrung bei 3° Celsius für 72 Stunden auf die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella dumoffii* in MM6-Zellen. Dargestellt sind die 72 Stunden-Werte eines repräsentativen Einzelversuchs.

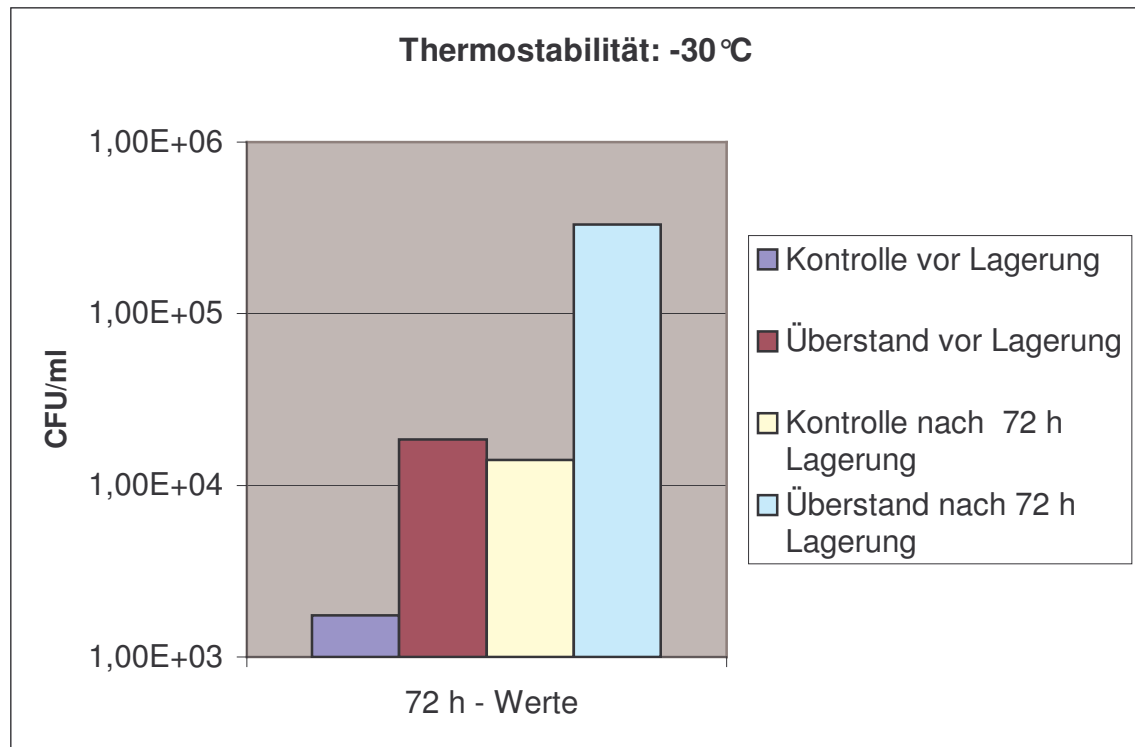


Abbildung 3.27: Einfluss des Überstand von *Acanthamoeba castellanii* vor und nach der Aufbewahrung bei -30°Celsius für 72 Stunden auf die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella dumoffii* in MM6-Zellen. Dargestellt sind die 72 Stunden-Werte eines repräsentativen Einzelversuchs.

3.3.2 Molekülgröße

Als weiteres Charakteristikum des bioaktiven Mediators wurde die Größe des Moleküls versucht einzugrenzen. Dies wurde mittels Gelelektrophorese und Filtration mit definierten Porengrößen untersucht.

3.3.2.1 Gelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese wurden die entsalzten und reduzierten Proben der Überstände analysiert. Dazu wurde ein 12,5 prozentiges Gel verwendet. Die Proteinbanden wurden durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht.

Wie in dem in Abbildung 3.28 dargestellten SDS-Page-Gel zu sehen, sind im Überstand von *Hartmanella vermiformis* und *Acanthamoeba castellanii*

3 Ergebnisse

zahlreiche Fraktionen unterschiedlicher Molekülgröße enthalten, wobei hier entsprechend dem verwendeten Standard Banden zwischen 14 und 130 kDa sichtbar sind.

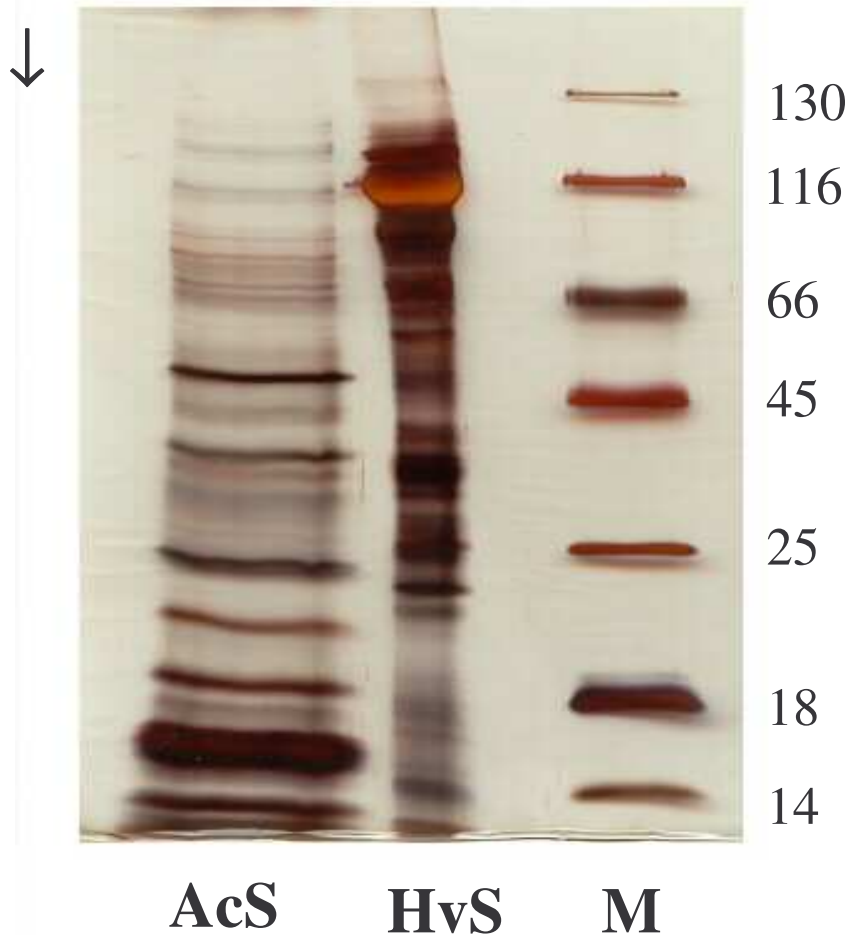


Abbildung 3.28: SDS-Page Gelelektrophorese der Überstände von *Hartmanella vermiformis* (HvS) und *Acanthamoeba castellanii* (AcS). M=Molekulargewichtsstandard

3.3.2.2 3kDa Filtration

Um die Größenordnung des Faktors weiter beschreiben zu können, wurde der Überstand durch einen Filter zentrifugiert, der die definierte Porengröße von 3

3 Ergebnisse

kDalton besitzt. Das Filtrat, das nun nur noch Moleküle enthielt, die kleiner 3 kDa waren, wurde in einer Legionelleninfektion auf eine noch vorhandene Aktivität getestet. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.28 graphisch dargestellt und zeigt, dass der bioaktive Faktor kleiner 3 kDa sein muss, da auch nach der Filtration die vermehrungsfördernde Wirkung auf intrazelluläre Legionellen noch nachweisbar ist.

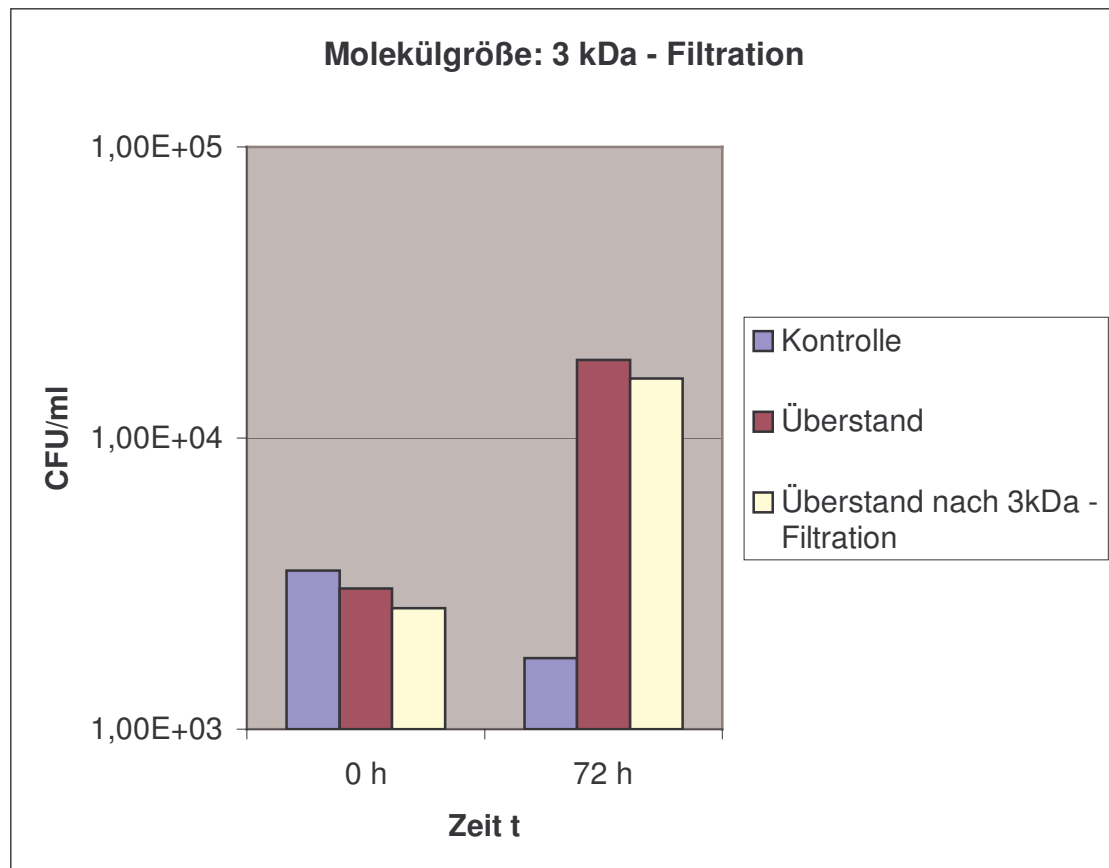


Abbildung 3.29: Einfluss des Überstands von *A. castellanii* vor und nach 3kDalton-Filtration auf die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella dumoffii* in MM6-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Einzelversuch.

3.3.3 Lyophilisation

Um den Amöben-Überstand weiter biochemisch zu analysieren, wurde er lyophilisiert. Mit der durch Lyophilisation hergestellten pulverförmigen Substanz sollten weitere Experimente durchgeführt werden. Dazu war es wichtig festzustellen, ob die Aktivität des Faktors auch nach Lyophilisation noch erhalten ist.

In dem in Abbildung 3.29 dargestellten Experiment wurde die Aktivität in einer Legionelleninfektion vor und nach Lyophilisation getestet. Dabei zeigt sich, dass die Aktivität erhalten ist, wenn man das Lyophilisat wieder in der entsprechenden Menge destilliertem Wasser löst und zu einer Legionelleninfektion gibt.

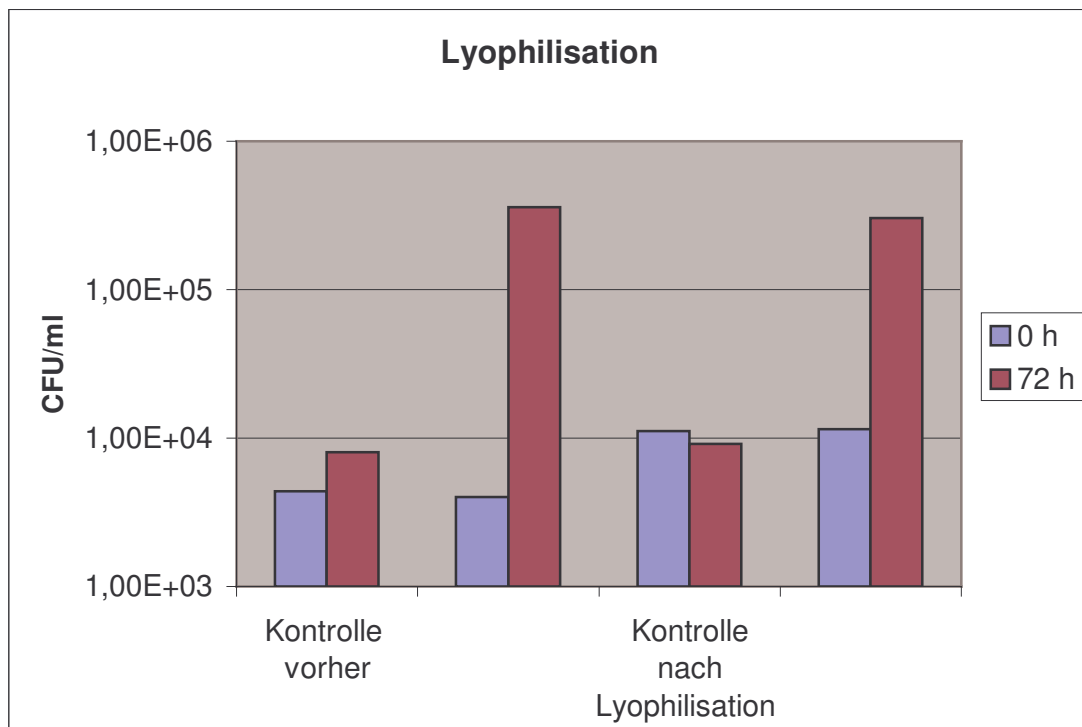


Abbildung 3.30: Einfluss des Überstands von *A. castellanii* vor und nach Lyophilisation auf die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella dumoffii* in MM6-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Einzelversuch.

3.3.4 Ausschluss von ADP als Mediator

Mattani et al. (2001, 2002) konnten zeigen, dass *Acanthamoeba castellanii* ADP freisetzt, das wiederum in der Lage ist, in anderen Zellen den zytosolischen Kalziumspiegel zu erhöhen. Ausgehend von dieser Beobachtung entwickelten wir die Hypothese, dass der von uns beobachtete Effekt der intrazellulären Vermehrungssteigerung von Legionellen in MM6-Zellen durch Amöbenüberstände ADP-vermittelt sein könnte. Auch das Molekulargewicht von kleiner 3 kDa wäre damit vereinbar gewesen. Um dies zu prüfen, wurde der Effekt von ADP in verschiedenen Konzentrationen auf eine Infektion von *Legionella dumoffii* in MM6-Zellen untersucht. Der in Abbildung 3.30 dargestellte Versuch lässt allerdings keinen Zusammenhang zwischen ADP-Konzentration und intrazellulärem Wachstum erkennen. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass der von uns beobachtete Effekt auf den Einfluss von ADP zurückzuführen

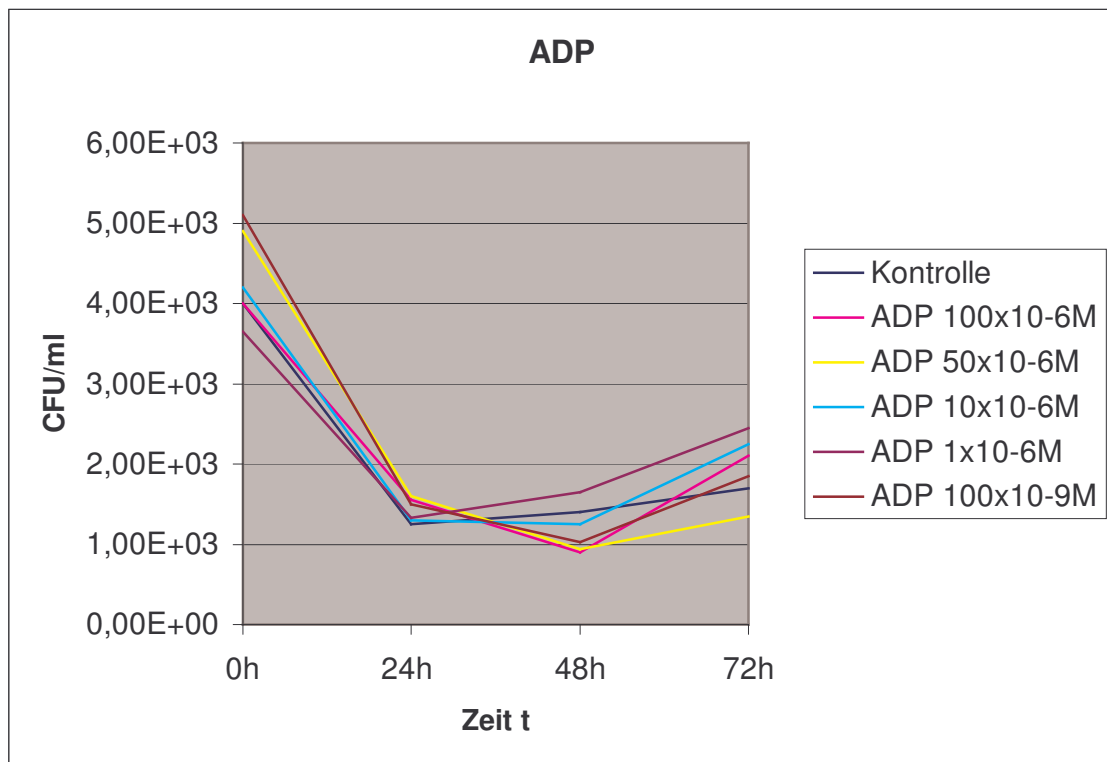


Abbildung 3.31: Einfluss von Adenosindiphosphat in verschiedenen Konzentrationen auf die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella dumoffii* in MM6-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Einzelversuch.

3 Ergebnisse

Mittels RP-HPLC wurden der *Acanthamoeba castellanii* Überstand (<3kD-Fraktion), der wässrige Überstand der organischen Extraktion und ein ADP-Standard analysiert und verglichen. Bei dieser chromatographischen Darstellung zeigte sich, dass in den Überstands-Fraktionen kein dem ADP-Standard entsprechender Absorptions-Peak nachgewiesen werden kann. Damit ist in unserem Amöben-Überstand kein ADP enthalten. Somit sind die von uns beobachteten Effekte auch nicht auf ADP zurückzuführen. ADP kann somit als unser gesuchter bioaktiver Mediator ausgeschlossen werden. Weder hat ADP die von uns beobachtete vermehrungsfördernde Wirkung, wie in Abbildung 3.30 dargestellt, noch konnten wir bestätigen, dass es überhaupt von *Acanthamoeba castellanii* freigesetzt wird.

3 Ergebnisse

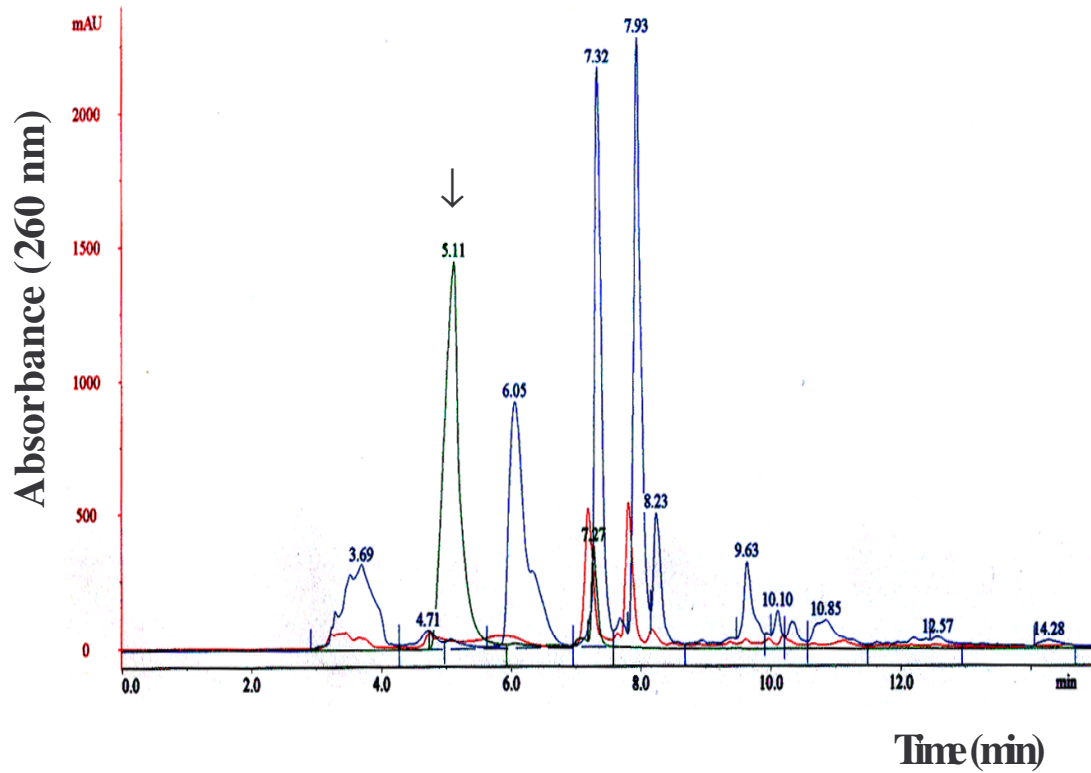


Abbildung 3.32: RP-HPLC Überstands (blau), der <3kDa-Fraktion des Überstands (rot) und des ADP-Standards (grün).

4 Diskussion

4.1 *Acanthamoeba castellanii* setzt einen bioaktiven Mediator frei

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein System etabliert werden in dem Überstand von *Acanthamoeba castellanii* im Large-Scale-Verfahren hergestellt werden kann, der auf intrazelluläre Legionelleninfektionen einen wachstumssteigernden Effekt besitzt.

Dabei werden *Acanthamoeba castellanii* für 72 h bei Raumtemperatur im Anaerobiertopf gehalten, es wird eine Amöbenkonzentration von 1×10^7 Zellen pro Milliliter eingestellt und Zellkulturflaschen verwendet. Als Medium für die Amöben ist sowohl MM6-Infektionsmedium wie auch PBS geeignet. Nach Ablauf der 72 Stunden im Anaerobiertopf wird der Überstand entnommen, abzentrifugiert, sterilfiltriert und zum Testen der Aktivität zu einer Infektion von *Legionella dumoffii* in MM6-Zellen gegeben. Dabei ist eine um den Faktor 10 gesteigerte Vermehrung im Vergleich zur Kontrolle (PBS oder MM6-Infektionsmedium) zu beobachten. Somit kann man davon ausgehen, dass die Amöben einen bioaktiven Mediator sezernieren, der diese Vermehrungssteigerung vermittelt.

Brielandts et al. (1997b) beobachtete im Tiermodell, das intrapulmonale *Hartmannella vermiformis* auf die Legionellen-Pneumonie einen potenzierenden Einfluss haben. Davon ausgehend entwickelte Reiff (2002) ein Zellkulturmodell, in dem der Einfluss von Amöben auf die Vermehrung von Legionellen in infizierten Makrophagen untersucht werden kann. Damit konnte sie zeigen, dass *Acanthamoeba castellanii* einen positiven Effekt auf die intrazelluläre Vermehrung verschiedener Legionellenspezies in MM6-Zellen hat. Dieser Effekt tritt nicht nur auf, wenn Amöben und Legionellen-infizierte MM6 Zellen im selben Medium, durch eine Transwell-Membran getrennt, kultiviert werden, sondern kann auch durch die Zugabe eines zellfreien Überstands einer vorangegangenen Kokulturrinfektion zu einer Legionelleninfektion erreicht werden.

So ließ sich die Vermehrung von *Legionella dumoffii* durch die Zugabe von Überstand einer *Legionella dumoffii*-Kokulturinfektion signifikant steigern. Dieses Ergebnis führt zu der Annahme, dass *Acanthamoeba castellanii* eine Substanz sezerniert, die in der Lage ist, die intrazelluläre Vermehrung von Legionellen zu potenzieren. Durch die vorliegende Arbeit konnte dies bestätigt und dahingehend ergänzt werden, dass nicht Kokultur-Überstände vorangegangener Infektionen nötig sind, sondern Überstände von *Acanthamoeba castellanii* ohne Kontakt zu anderen Spezies in der Lage sind, diesen Effekt zu bewirken. Die Vermehrungssteigerung ist unabhängig von Zell-Zell-Interaktionen. Es handelt sich bei dem bioaktiven Mediator, der die intrazelluläre Vermehrung von Legionellen steigert, um ein Produkt der Amöben, hier von *Acanthamoeba castellanii*, das diese unabhängig von Legionellen, Makrophagen oder anderen Spezies freisetzen.

4.1.1 Wirkung auf Wirtszelle oder direkt auf *Legionella*?

Auf welcher Ebene sich die vermehrungsfördernde Wirkung des bioaktiven Mediators abspielt, ist fraglich. Einiges spricht dafür, dass der Faktor nicht direkt auf die intrazellulären Legionellen wirkt, sondern auf die Wirtszellen. Damit wäre die beobachtete Vermehrungssteigerung der Legionellen ein indirekter Effekt des Amöben-Überstands. Es ist denkbar, dass der Amöbenüberstand beispielsweise eine Zellschwellung der MM6-Zellen bewirkt und so die Vermehrung der Legionellen unterstützt. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass eine Zellschwellung die Legionellenreplikation steigert (Reiff 2000). Eine Zellschwellung geht mit einer Alkalisierung des endosomalen pH-Werts einher (Busch et al. 1994, Busch et al. 1996a, Busch et al. 1996b, Busch et al. 1997a, Busch et al. 1997b, Busch et al. 1997c, Reiff 2002, Völkl et al. 1993a, Völkl et al. 1993b, Völkl et al. 1994). Dieser Mechanismus könnte der intrazellulären Vermehrung dienlich sein, da ein zentraler Schritt der Pathogenese von *Legionella pneumophila* in der verzögerten Ansäuerung des Phagosoms vermutet wird (Horowitz 1983, Horowitz und Maxfield 1984b,

4 Diskussion

Horowitz 19985, Swanson und Isberg 1996, Strugill-Koszycki und Swanson 2000, Swanson und Hammer 2000).

Möglich wäre es auch, dass der Faktor aus dem Amöben-Überstand extrazellulär an der Wirtszelle wirkt und über eine Signalkaskade, z.B. durch extrazelluläres ADP und intrazellulär Kalzium-vermittelt (Mattani et al 2001), die Fusion von Phagosom und Lysosom hemmt oder auch nur hinauszögert. Die Fähigkeit von *Legionella pneumophila*, die Fusion von Phagosom und Lysosom während der ersten Stunden der intrazellulären Vermehrung zu verhindern, ist ein entscheidender Pathogenesefaktor (Swanson and Hammer 2000). Während dieser ersten 3 bis 6 Stunden herrscht in den Vakuolen ein pH-Wert von 7,4, dies ist auch die Zeit, nach der *Legionella pneumophila* in die replikative Wachstumsphase übergeht. Danach, etwa 16 bis 20 Stunden nach Infektion, wird das Phagosom angesäuert und hat nun einen pH-Wert von 5,6, der aber den eingeschlossenen Legionellen nicht mehr schadet, sondern ihre Ausreifung zu unterstützen scheint (Strugill-Koszycki und Swanson 2000, Swanson und Hammer 2000, Joshi et al. 2001). Diese Hemmung oder Verzögerung der Phagosom-Lysosom-Fusion konnte bisher nur bei *Legionella pneumophila* beobachtet werden. Die weniger pathogenen Legionellenspezies, die die Phagolysosombildung nicht verzögern können, sind (in geringerem Maße) dennoch zur intrazellulären Vermehrung fähig (Neumeister et al. 1997). Diese Beobachtung könnte man, bezogen auf die Ergebnisse dieser Arbeit, so interpretieren, dass der bioaktive Mediator über einen noch unbekanntem Mechanismus die Fusion hemmt und somit auch weniger pathogenen Legionellen eine gesteigerte intrazelluläre Vermehrung ermöglicht.

In Anbetracht der Tatsache, dass die Legionellen in der Wirtszelle in Phagosomen eingeschlossen sind und sich dort die intrazelluläre Vermehrung abspielt, erscheint es, schon aufgrund der räumlichen Trennung durch Zellmembran und Phagosom, wahrscheinlich, dass der bioaktive Mediator über Mechanismen an der Wirtszelle wirkt und nicht direkt an den eingeschlossenen Legionellen.

Andererseits wurde beobachtet, dass das intrazelluläre Wachstum von *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* eine um das zehnfache

erhöhte Infektiosität gegenüber Makrophagen und *Acanthamoeba castellanii* bewirkt. Als ursächlich dafür wird die Expression zusätzlicher Proteine angesehen, die *Legionella pneumophila* während des intrazellulären Wachstums produziert (Abu Kwaik et al.1994, Baker et al.1993). Es wäre möglich, dass dieser Effekt nicht im allgemeinen durch das intrazelluläre Wachstum zu erklären ist, sondern durch die von uns beobachtete Sekretion eines Mediators von *Acanthamoeba castellanii*. Somit wäre von einer direkten Wirkung auf die intrazellulären Legionellen auszugehen.

4.1.2 Effekt der veränderten Ionenkonzentration ?

Als gewichtigstes Argument gegen die Existenz eines von Amöben produzierten bioaktiven Mediators könnte man anführen, dass der von uns beobachtete Effekt auf eine Änderung der Ionenkonzentration zurückzuführen ist. Die gesteigerte intrazelluläre Vermehrung der Legionellen wäre so als ein osmotischer Effekt zu erklären. Durch die Ausscheidungsprodukte der Amöben könnte die Ionenkonzentration des Mediums erhöht sein. Damit wäre nicht von der spezifischen Wirkung eines Faktors auszugehen, sondern von der Änderung des osmotischen Gradienten, der eine Zellschrumpfung der Wirtszellen MM6 bewirkt und damit das Vermehrungsverhalten der intrazellulären Legionellen beeinflusst. Eine erhöhte extrazelluläre Osmolarität führt zu einer osmotischen Zellschrumpfung, welche zahlreiche zelluläre Funktionen, wie zum Beispiel Transportfunktion, Zellmetabolismus, Zellproliferation und Zelltod modifiziert (Lang et al. 1998). Dass eine veränderte Ionenkonzentration eher Auswirkungen auf die Wirtszelle als direkt auf die Legionellen hat, wurde in vorausgegangenen Arbeiten gezeigt (Neumeister et al. 1997, Reiff 2002).

Ebenfalls gut erforscht und bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Zellschwellung mit einer Alkalisierung, die Zellschrumpfung mit einer Ansäuerung des endosomalen pH-Werts einhergeht. Wie oben dargelegt, vermutet man den entscheidenden Schritt der Pathogenese von *Legionella pneumophila* in ihrer Fähigkeit, die Ansäuerung der Phagosomen zu verzögern. In dieser Lesart nützt also eine Zellschwellung der Legionellen-Vermehrung,

weil der pH-Wert des Phagosoms in Richtung alkalischer Werte verändert wird. Eine Zellschrumpfung hingegen bewirkt eine zusätzliche Ansäuerung der Phagosomen, was einer Legionellenvermehrung nicht dienlich ist. Es erscheint wenig wahrscheinlich, dass die beobachtete Steigerung der Legionellenvermehrung nur auf eine erhöhte Osmolarität zurückzuführen ist, da sie über die Zellschrumpfung der MM6-Zellen eher ein Absinken des pH-Werts des Phagosoms bewirkt und die Vermehrung dadurch eher behindert. Somit ist von der Existenz einer von Amöben freigesetzten Substanz, einem bioaktiven Mediator auszugehen, der die intrazelluläre Vermehrung von Legionellen steigert.

4.2 Vergleich *Hartmanella vermiformis* und *Acanthamoeba castellanii*

4.2.1 Freisetzung des bioaktiven Mediators ist nicht spezifisch für *Acanthamoeba castellanii*

Ein zentrales Ergebnis dieser Arbeit ist es, dass der bioaktive Mediator, den wir im Überstand von *Acanthamoeba castellanii* vermuteten (Neumeister 2000; Reiff 2002), nicht nur im Überstand dieser Spezies vorhanden ist. Auch *Hartmanella vermiformis*, der zweite wichtige Protozoen-Wirt für Legionellen neben *Acanthamoeba castellanii*, ist in der Lage, eine für Legionellen vermehrungsfördernde Substanz zu produzieren. Mit Überständen von *Hartmanella vermiformis* gelang es sogar noch stärkere Vermehrungseffekte bei einigen Legionellenspezies zu erzielen. Der von uns beobachtete Effekt ist somit nicht spezifisch für *Acanthamoeba castellanii*, sondern auch andere Amöbenspezies, wie *Hartmanella vermiformis*, besitzen die Fähigkeit, ähnliche vermehrungsfördernde Substanzen freizusetzen.

4.2.2 Tiermodell und bioaktiver Mediator

Dass *Acanthamoeba castellanii* im Zellkulturmodell eine vermehrungsfördernde Wirkung auf die Legionellenspezies *Legionella dumoffii*, *L.longbeachae*, *Legionella micdadei*, *L.steigerwaltii* und *Legionella gormanii* hat, ist durch die Arbeit von Neumeister (2000) und Reiff (2002) bekannt gewesen. Für *Legionella pneumophila*, der klinisch prominentesten Legionellenspezies, konnte ein gesteigertes Wachstum durch *Acanthamoeba castellanii* bisher nicht gezeigt werden (Reiff 2002). Lediglich im Tierversuch war bei Koinhalation von Amöben, hier *Hartmanella vermiformis*, und *L.pneumophila* ein ähnlicher Effekt beobachtet worden: Brieland et al. untersuchten die Auswirkungen von inhalierten *Hartmanella vermiformis* auf die Pathogenese der Legionellenpneumonie an einem Tiermodell (Brieland et al. 1996b, Brieland et al. 1997a und b). Die Ergebnisse zeigen, dass die intratracheale Koinhalation von *Legionella pneumophila* und *Hartmanella vermiformis* im Vergleich zur alleinigen Inhalation von *Legionella pneumophila* eine signifikante intrazelluläre Vermehrungssteigerung von *Legionella pneumophila* in den A/J-Mäusen induziert. Diese Vermehrungssteigerung geht mit einer aggressiveren Pneumonie und einer signifikant höheren Mortalität einher (Brieland et al. 1996b). Der Mechanismus, mit dem die intrapulmonalen *Hartmanella vermiformis* die Replikation von *Legionella pneumophila* in der Mäuselunge potenzieren, und die Bedeutung dieser Erkenntnisse für die Infektion beim Menschen blieben unklar. Das Tiermodell ist zu komplex, die biochemische Analyse der Vorgänge nicht möglich. Daher war die Entwicklung eines Zellkulturmodells notwendig.

Interessanterweise ist mit Überständen der Spezies *Hartmanella vermiformis* gelungen, was mit *Acanthamoeba castellanii*-Überständen nicht möglich war: Die humanpathogene Spezies *L.pneumophila* zeigt in vitro eine Vermehrung um vier Logarithmusstufen nach 72 Stunden, durch Überstände von *Hartmanella vermiformis* konnte die Replikation um eine weitere Logarithmusstufe gesteigert werden. Die im Tiermodell beobachtete Vermehrungssteigerung könnte nun mit den Ergebnissen dieser Arbeit erklärt werden.

Bisher wurden drei Hypothesen für den potenzierenden Effekt der Koinhalation für die Legionelleninfektion diskutiert (Brieland et al. 1996b, Reiff 2002):

Erstens die Modifikation der Wirtszellantwort auf die Legionelleninfektion durch Amöben, hier wäre auch die Signalübertragung durch einen Botenstoff denkbar. Zweitens wäre es möglich, dass die Amöben als intrapulmonale Wirtszelle fungieren, in denen sich die Legionellen vermehren können.

Drittens könnte die Ursache eine gesteigerte Virulenz der Legionellen sein, die durch vorherige intrazelluläre Replikation in Amöben entstanden wäre.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit kann man hier noch einen weiteren Erklärungsansatz hinzufügen: Die Amöben setzen einen bioaktiven Mediator frei, der entweder die Legionellen oder die Wirtszellen beeinflusst und eine gesteigerte Legionellenvermehrung bewirkt.

Da nun der im Tiermodell erzeugte Effekt von *Hartmanella vermiformis* auf *Legionella pneumophila* erstmals in vitro nachvollzogen wurde, kann hiermit die Bedeutung des von Neumeister und Reiff (2000) entwickelten Zellkulturmodells bestätigt werden. Im Gegensatz zum Tierversuch kann im reproduzierbaren Zellkulturmodell, das aus drei umschriebenen Reaktanten besteht, der molekulare Mechanismus der Replikationsstimulation näher untersucht werden.

4.2.3 Anpassung der Legionellen an bestimmte Protozoen

In den Kokultur- und Überstand-Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass *Hartmanella vermiformis* einen potenzierenden Einfluss auf die Vermehrung folgender Legionellenspezies hat:

- *Legionella dumoffii* (Überstand und Kokultur)
- *Legionella longbeachae* (Überstand und Kokultur)
- *Legionella pneumophila* (nur Überstand)
- *Legionella gormanii* (nur Überstand)
- *Legionella micdadei* (Überstand und Kokultur)

Für die Spezies *Legionella steigerwaltii* konnte kein vermehrungsfördernder Effekt von *Hartmanella vermiformis* nachgewiesen werden.

Acanthamoeba castellanii hingegen steigert die intrazelluläre Replikation von *Legionella steigerwaltii*, *Legionella longbeachae*, *Legionella dumoffii*, *Legionella micdadei*, *Legionella gormanii*, allerdings wurde kein Effekt auf die Vermehrung von *Legionella pneumophila* beschrieben (Reiff 2002).

Diese Unterschiede lassen sich eventuell durch unterschiedliche Anpassungen und Spezifitäten der verschiedenen Legionellen an bestimmte Amöbenspezies erklären (Fields et al. 1984, Fields et al. 1986, Holden et al. 1984, Moffat und Thompkins 1992, Rowbotham 1986, Smith-Sommerville et al. 1991, Tyndall und Domingue 1982, Vandenesch et al. 1990) Legionellen können sich in 13 verschiedenen Amöbenspezies vermehren (Abu Kwaik et al. 1998). Während *Legionella pneumophila* das umfassendste Wirtsspektrum unter den Legionellen besitzt, sind andere Legionellenspezies in Bezug auf ihre Wirtszellen sehr eingeschränkt. Derzeit ist nur eine Amöbenspezies bekannt, die das Wachstum von *L. anisa* unterstützt (Fields 1996). Die wenig humanpathogene *Legionella dumoffii* ist neben *L. pneumophila* die einzige der in dieser Arbeit verwendeten Spezies, die sich in *Acanthamoeba castellanii* effizient vermehren kann (Neumeister et al 1997).

Das Phänomen der besonders entwickelten Anpassungsfähigkeit bestimmter Legionellenspezies an bestimmte Protozoen könnte nicht nur bezüglich der Wirtswahl von Bedeutung sein, sondern auch bei Freisetzung von Mediatoren und deren Wirkung. Dies würde implizieren, dass der von den Amöben produzierte vermehrungsfördernde Faktor bei *A. castellanii* und *Hartmanella vermiformis* nicht ganz identisch ist. Genauere biochemische Analysen des Mediators sind notwendig, um diese Frage beantworten zu können.

4.3 Eigenschaften des bioaktiven Mediators

Zusammenfassend haben die Versuche zur Charakterisierung des bioaktiven Mediators folgendes ergeben: Es handelt sich um eine Substanz mit sehr geringer Molekülgröße von kleiner 3 kDa, die gleichzeitig sehr stabil ist. Bei Temperaturen über 95 Grad Celsius und unter 0 Grad Celsius blieb die Aktivität erhalten.

Durch diese Eigenschaften wird der Kreis der infrage kommenden Substanzen deutlich enger; höhermolekulare Proteine sind damit ausgeschlossen, möglich wären unter anderem kleine Peptide, einzelne Aminosäuren, Arachidonsäuremetaboliten wie Prostaglandine und Leukotriene, Steroide, Nucleotide, Lipide und Lipidmetaboliten. Eine interessante Hypothese wäre zum Beispiel, dass Amöben eine Steroid-ähnliche Substanz freisetzen, die mit monozytären Steroidrezeptoren interagiert und so zu einer Reduktion der Makrophagenaktivität und damit zu einer Permissivität für die intrazelluläre Vermehrung von Legionellen führt.

4.4 Ausschluss von Adenosindiphosphat

Mattani et al. (2001) konnten zeigen, dass *Acanthamoeba castellanii* ADP freisetzt, dass wiederum in der Lage ist, in anderen Zellen den zytosolischen Kalziumspiegel zu erhöhen. Wir entwickelten die Hypothese, dass möglicherweise von *Acanthamoeba castellanii* freigesetztes ADP für die von uns beobachtete Vermehrungssteigerung verantwortlich ist und damit der gesuchte Mediator sein könnte. Auch der intrazelluläre Kalziumanstieg wäre als Erklärungsmodell für die Vermehrung der Legionellen interessant. *Mykobakterium tuberculosis* beispielsweise, das über einen ähnlichen Pathomechanismus verfügt wie Legionellen, ist in der Lage, die durch Ca^{2+} gesteuerte Phagosom-Lysosom-Fusion zu reduzieren und damit in humanen Makrophagen zu überleben (Malik et al. 2000). *M. tuberculosis*-Phagosomen können die Calmodulin-abhängigen Signalkaskaden dahingehend zu beeinflussen, dass die Verschmelzung mit den Lysosomen unterbleibt (Malik et al. 2001). Allerdings handelt es sich bei *M. tuberculosis* um eine Unterdrückung eines Ca^{2+} - Anstiegs in den Wirtszellen, während das angeblich von *Acanthamoeba castellanii* freigesetzte ADP einen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} bewirkt (Mattana 2001). Weiterhin könnte man argumentieren, dass auch die Eigenschaften der gesuchten Substanz wie Thermostabilität und die geringe Molekülgröße zu ADP passen würden.

In unseren Experimenten konnten wir zeigen, dass ADP in verschiedensten Konzentrationen keinen potenzierenden Einfluss auf die intrazelluläre

Vermehrung von Legionellen hat. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass der von uns beobachtete Effekt auf die Wirkung von ADP zurückzuführen ist. Weiterhin haben wir die Sekretionsprodukte von *Acanthamoeba castellanii* mittels RP-HPLC untersucht und konnten zeigen, dass im Überstand kein ADP enthalten ist, was im Widerspruch zu den Ergebnissen von Mattana (2001) steht. Eine mögliche Erklärung hierfür sind eventuell Unterschiede in der Herstellung der Überstände von *Acanthamoeba castellanii*. Mattana et al. verwendete den Überstand nach einer Inkubationszeit von nur zwei Stunden, während unsere Amöbenüberstände erst nach 72 Stunden verwendet wurden, allerdings ist ADP ein stabiles und nicht flüchtiges Molekül, dass auch nach 72 Stunden noch nachweisbar sein sollte.

4.5 Stress für Amöben

Ein interessanter Nebenbefund dieser Arbeit ist die beobachtete Reaktion von *Hartmanella vermiformis* und *Acanthamoeba castellanii* auf verschiedene Arten von Stress. Als Stress für die Amöben bezeichne ich hier sich verschlechternde Umweltbedingungen wie die zu hohe Konzentration von Amöben, ein geringes Nährstoffangebot, anaerobe Bedingungen, zu niedrige oder zu hohe Temperaturen. Unter all diesen Stressfaktoren war zu beobachten, dass die Überstände der Amöben deutlich aktiver waren, was den vermehrungsfördernden Effekt auf die Legionelleninfektion anging. Damit spricht einiges dafür, dass es sich bei dem bioaktiven Mediator um ein Sekretionsprodukt der Amöben handelt, das diese vermehrt bei Stress freisetzen. Bekannt ist, dass Amöben auf verschiedene Stressfaktoren wie Hitze, oxidativem Stress und Veränderungen des pH-Werts reagieren (Perez-Serrano 2000). Dabei konnte beobachtet werden, dass unter den veränderten Umweltbedingungen die Produktion von Hitzeschockproteinen ansteigt. Über anderweitige Sekretionsprodukte von Amöben, die bei Stress vermehrt ausgeschüttet werden, wie beispielsweise Cortisol-Metaboliten ist bisher wenig bekannt. In Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit wäre dies sicher ein lohnendes Gebiet für weitere Untersuchungen.

5 Zusammenfassung

Im Juli 1976 kam es in Philadelphia zu einer Pneumonieepidemie, bei der 221 Menschen mit den gleichen Symptomen erkrankten. Aufgrund des hauptsächlich betroffenen Personenkreises, den Teilnehmern eines Veteranenkongresses, wurde die noch unbekannte Erkrankung „Legionärserkrankung“ bzw. „Veteranenerkrankung“ genannt (Ruckdeschel und Ehret 1993, Neumeister 1996). Die Aufklärung dieser neu aufgetretenen Epidemie galt als die „größte epidemiologische Herausforderung“ des Jahrhunderts (Weisse 1992). Als Erreger der Legionärskrankheit wurde in den folgenden Monaten die bis dahin unbekannte Spezies *Legionella pneumophila* entdeckt. Bis heute sind innerhalb der Gattung *Legionella* 42 Spezies und 64 verschiedene Serogruppen bekannt. In zahlreichen prospektiven Studien über ambulant erworbene Pneumonien, die eine stationäre Behandlung erforderten, variiert die Inzidenz der Legionellenpneumonie zwischen 2 und 15 %. Legionellen gehören neben Pneumokokken und *Hämophilus influenzae* zu den drei häufigsten Erregern ambulant erworbener Pneumonien (Muder et al. 1989, Fang et al. 1990, Stout und Yu 1997) und besitzen damit eine erhebliche klinische Relevanz.

Kennzeichnend für Legionellen ist ihre Fähigkeit zur intrazellulären Vermehrung. Die eukaryontischen Mikroorganismen *Acanthamoeba castellanii* und *Hartmanella vermiformis* stellen die häufigsten Wirte dar (Hacker et al. 1994). Ausgehend von der Arbeit Brielandts et al. (1997b), die im Tiermodell beobachtete, dass intrapulmonale *Hartmanella vermiformis* auf die Legionellen-Pneumonie einen potenzierenden Einfluss haben, entwickelte Reiff (2002) ein Zellkulturmodell, in dem der Einfluss von Amöben auf die Vermehrung von Legionellen in infizierten Makrophagen in einem definierten Zellkulturmodell untersucht wurde. Dabei stellte sie fest, dass die Zugabe des Überstands einer Kokultur-Infektion von Amöben und legionellen-infizierten MM6-Zellen zu einer anderen Legionelleninfektion eine Zunahme der intrazellulären Vermehrung der Legionellen bewirkte. Dies ließ vermuten, dass die Amöben eine Mediatorsubstanz sezernieren, die im Überstand enthalten ist.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein System etabliert werden, in dem ein Überstand von *Acanthamoeba castellanii* im Large-Scale-Verfahren hergestellt werden kann, der auf intrazelluläre Legionelleninfektionen einen wachstumssteigernden Effekt besitzt. Die Vermehrungssteigerung ist unabhängig von Zell-Zell-Interaktionen. Es handelt sich bei dem bioaktiven Mediator, der die intrazelluläre Vermehrung von Legionellen steigert, um ein Produkt der Amöben, das diese unabhängig von Legionellen, Makrophagen oder anderen Spezies freisetzen.

Ein zentrales Ergebnis dieser Arbeit ist, dass der bioaktive Mediator nicht nur im Überstand der Spezies *Acanthamoeba castellanii* vorhanden ist. Auch *Hartmanella vermiformis*, der zweite wichtige Protozoen-Wirt für Legionellen neben *Acanthamoeba castellanii*, ist in der Lage, eine für Legionellen vermehrungsfördernde Substanz zu produzieren. Mit Überständen von *Hartmanella vermiformis* gelang es sogar, noch stärkere Vermehrungseffekte bei einigen Legionellenspezies zu erzielen. In Kokultur- und Überstandsversuchen konnte für *Hartmanella vermiformis* einen potenzierenden Einfluss auf die Vermehrung von *Legionella dumoffii*, *Legionella longbeachae*, *Legionella pneumophila*, *Legionella gormanii* und *Legionella micdadei* gezeigt werden. Für die Spezies *Legionella steigerwaltii* konnte kein vermehrungsfördernder Effekt von *Hartmanella vermiformis* nachgewiesen werden. *Acanthamoeba castellanii* hingegen steigert die intrazelluläre Replikation von *Legionella steigerwaltii*, *Legionella longbeachae*, *Legionella dumoffii*, *Legionella micdadei*, *Legionella gormanii*, allerdings wurde kein Effekt auf die Vermehrung von *Legionella pneumophila* festgestellt.

Interessanterweise ist mit Überständen der Spezies *Hartmanella vermiformis* gelungen, was mit *Acanthamoeba castellanii*-Überständen nicht möglich war: Die humanpathogene Spezies *L.pneumophila* zeigt in vitro eine Vermehrung um vier Logarithmusstufen nach 72 Stunden, durch Überstände von *Hartmanella vermiformis* konnte die Replikation um eine weitere Logarithmusstufe gesteigert werden. Die im Tiermodell beobachtete Vermehrungssteigerung dieser Spezies konnte nun mit den Ergebnissen dieser Arbeit erklärt werden.

Weitergehend wurden in der vorliegenden Arbeit die physikalischen Eigenschaften des im Überstand enthaltenen bioaktiven Mediators untersucht. Zusammenfassend haben die Versuche zur Charakterisierung des Mediators folgendes ergeben: Es handelt sich um eine Substanz mit sehr geringer Molekülgröße von kleiner 3 kDa, die gleichzeitig sehr stabil ist. Bei Temperaturen über 95 Grad Celsius und unter 0 Grad Celsius blieb die Aktivität erhalten.

Mattani et al. (2001) konnten zeigen, dass *Acanthamoeba castellanii* ADP freisetzt. Da ADP hinsichtlich seiner physikalischen Eigenschaften und Effekte auf Signalkaskaden hypothetisch als unsere gesuchte Mediatorsubstanz denkbar gewesen wäre, wurde dies weiter untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass ADP in verschiedensten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Vermehrung von Legionellen hat und somit als die gesuchte Substanz ausgeschlossen werden kann.

Bei den Vorversuchen konnte festgestellt werden, dass *Hartmanella vermiformis* und *Acanthamoeba castellanii* unter schlechten Umweltbedingungen (zu hohe Konzentration von Amöben, ein geringes Nährstoffangebot, anaerobe Bedingungen, zu niedrige oder zu hohe Temperaturen) deutlich aktivere Überstände ergaben, was den vermehrungsfördernden Effekt auf die Legionelleninfektion anging. Damit scheint der aktive Mediator ein Sekretionsprodukt der Amöben zu sein, das vermehrt bei Stress freigesetzt wird.

Ein besseres Verständnis des hier untersuchten Potenzierungseffekts könnte eventuell eine Möglichkeit für neue Therapieansätze aufzeigen. Dies gilt nicht nur für Legionellen, sondern auch für andere intrazelluläre Bakterien wie beispielsweise *Mykobakterium tuberculosis*, die aufgrund rasch zunehmender Resistenzen gegen Antibiotika größere therapeutische Probleme verursachen.

6 Literaturverzeichnis

Abu Kwaik Y (1996):

The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmatic reticulum. Appl. Environm. Microbiol. 62:2022-2028.

Abu Kwaik Y (2000):

Invasion of mammalian and protozoan cells by *Legionella pneumophila*. Subcell. Biochem. 33:383-410.

Abu Kwaik Y, Fields BS, Engleberg NC (1994):

Protein expression by the protozoan *Hartmannella vermiformis* upon contact with its bacterial parasite *Legionella pneumophila*. Infect. Immun. 62:1860-1866.

Abu Kwaik Y, Gao LY, Stone BJ, Venkataraman C, Harb OS (1998):

Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. Appl. Environm. Microbiol. 64:3127-3133.

Alli OA, Gao LY, Pedersen LL, Zink S, Radulic M, Doric M, Abu Kwaik Y (2000):

Temporal pore formation-mediated egress from macrophages and alveolar epithel cells by *Legionella pneumophila*. Infect. Immun. 68:6431-6440.

Amann R, Springer N, Schonhuber W, Ludwig W, Schmid EN, Muller KD, Michel R (1997):

Obligate intracellular bacterial parasites of *Acanthamoeba* related to *Chlamydia* spp. Appl. Environm. Microbiol. 63:115-121.

Atlas RM (1999):

Legionella: from environmental habitats to disease -pathology, detection and control. Environ.Microbiol. 1:283-293.

Barker J, Lambert PA, Brown MR (1993):

Influence of intra amoebic and other growth conditions on the surface properties of *Legionella pneumophila*. Infect. Immun. 61:3503-3510.

Barker J, Scaife H, Brown RW (1995):

Intraphagocytic growth induces an antibiotic resistant phenotype of *Legionella pneumophila*. Antimicrob. Agents Chemother. 39:2684-2688.

Bellinger-Kawahara C, Horwitz MA (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.

6 Literaturverzeichnis

- Benson RF, Fields BS (1998):
Classification of the genus *Legionella*. *Semin. Respir. Infect.* 13:90-99.
- Berdal SG, Mehl R, Meidell NK, Lorentzen -Styr AM, Scheel O (1996):
Field investigations of tularemia in Norway. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 13:191-195.
- Berk SG, Ting RS, Turner GW, Aschburn RJ (1998):
Produktion of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp.. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:279-286.
- Blatt SP, Parkinson MD, Pace E, Hoffman P, Dolan D, Lauderdale P, Zajac RA, Melcher GP (1993):
Nosocomial Legionnaires' disease: aspiration as a primary mode of disease acquisition. *Am. J. Med.* 95:16-22.
- Bozue JA, Johnson W (1996):
Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome lysosome fusion. *Infect. Immun.* 64:668-673.
- Breiman RF, Butler JC (1998):
Legionnaires' disease: clinical, epidemiological, and public health perspectives. *Semin. Respir. Infect.* 13:84-89.
- Brieland J, Fantone JC, Remick DG, LeGendre M, McClain M, Engleberg NC (1997a):
The role of *Legionella pneumophila*-infected *Hartmannella vermiformis* as an infectious particle in a murine model of Legionnaire's disease. *Infect. Immun.* 65:5330-5333.
- Brieland J, Freeman P, Kunkel R, Chrisp C, Hurley M, Fantone J, Engleberg C (1994):
Replicative *Legionella pneumophila* lung infection in intratracheally inoculated A/J mice, a murine model of human Legionnaires' disease. *Am. J. Pathol.* 145:1537-1546.
- Brieland J, Heath LA, Huffnagle GB, Remick DG, McClain MS, Hurley MC, Kunkel RK, Fantone JC, Engleberg C (1996a):
Humoral immunity and regulation of intrapulmonary growth of *Legionella pneumophila* in the immunocompetent host. *J. Immunol.* 157:5002-5008.
- Brieland J, McClain M, Heath L, Chrisp C, Huffnagle G, LeGendre M, Hurley M, Fantone J, Engleberg C (1996b):
Coinoculation with *Hartmannella vermiformis* enhances replicative *Legionella pneumophila* lung infection in a murine model of Legionnaires' disease. *Infect. Immun.* 64:2449-2456.

- Brieland J, McClain M, LeGendre M, Engleberg C (1997b):
Intrapulmonary *Hartmannella vermiformis*: a potential niche for
Legionella pneumophila replication in a murine model of legionellosis.
Infect. Immun. 65:4892-4896.
- Busch G, Guenther E, Hewig B, Zrenner E, Lang F (1997a):
Effekt of cell swelling, NH₄Cl and glutamat on acridine orange
flueorescence in retinal ganglion cells. Cell. Physiol. Biochem. 6:185-
194.
- Busch G, Kaba NK, Bukara M, Lang F (1997b):
Osmotic cell swelling alkalizes acidic cellular compartments of
pancratic islet and RINm5F cells. Pancreas 15:420-423.
- Busch G, Lang HJ, Lang F (1996a):
Studies on the mechanism of swelling-induced lysosomal alkalization in
vascular smooth muscle cells. Pflügers Arch 431:690-696.
- Busch G, Schreiber R, Dartsch PC, Völkl H, vom Dahl S, Häussinger D, Lang F
(1994):
Involvement of microtubules in the link between cell volume and pH of
acidic cellular compartments in rat and human hepatocytes.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:9165-9169.
- Busch G, Völkl H, Haller R, Ritter M, Siemen D, Moest J, Koch F, Lang F
(1997c):
Vesicular pH is sensitive to changes in cell volume. Cell. Physiol.
Biochem. 7:25-34.
- Busch G, Wiesinger H, Gulbins E, Wagner HJ, Hamprecht B, Lang F (1996b):
Effekt of astroglial cell swelling on pH of acidic intracellular
compartments. Biochim. Biophys.Acta 1285:212-218.
- Butler CA, Street ED, Hatch TP, Hoffman PS (1985):
Disulfide bonded outer membrane proteins in the genus *Legionella*.
Infect. Immun. 48:14-18.
- Byrd TF, Horwitz MA (1989):
Interferon gamma activated human monocytes downregulate transferrin
receptors and inhibit the intracellular multiplication of *Legionella*
pneumophila by limiting the availability of iron. J. Clin. Invest. 83:1457-
1465.
- Byrd TF, Horwitz MA (2000):
Abberantly low transferrin receptor expression on human monocytes is
associated with nonpermissiveness for *Legionella pneumophila* growth.
J. Infect. Disease 181:1394-1400.

- Byrne B, Swanson M (1998):
Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. *Infect. Immun.* 66:3029-3034.
- Catrenich CE, Johnson W (1989):
Characterization of the selective inhibition of growth of virulent *Legionella pneumophila* by supplemented Mueller Hinton medium. *Infect. Immun.* 57:1862-1864.
- Cianciotto NP, Eisenstein BI, Mody CH, Toews GB, Engleberg NC (1989):
A *Legionella pneumophila* gene encoding a species specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection. *Infect. Immun.* 57:1255-1262.
- Cianciotto NP, Fields BS (1992):
Legionella pneumophila mip gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5188-5191.
- Ciesielski CA, Blaser MJ, Wang WL (1986):
Serogroup specificity of *Legionella pneumophila* is related to lipopolysaccharide characteristics. *Infect. Immun.* 51:397-404.
- Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS (1994):
Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect. Immun.* 62:3254-3261.
- Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS, Bermudez LE (1997):
Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect. Immun.* 65:3759-3767.
- Collins MT, Espersen F, Hoiby N, Cho SN, Friis-Moller A, Reif JS (1983):
Cross reactions between *Legionella pneumophila* (serogroup 1) and twenty eight other bacterial species, including other members of the family *Legionellaceae*. *Infect. Immun.* 39:1441-1456.
- Conlan JW, Ashworth LA (1986):
The relationship between the serogroup antigen and lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila*. *J. Hyg. Lond.* 96:39-48.
- Davis GS, Winn WC (1987):
Legionnaires' disease: respiratory infections caused by *Legionella* bacteria. *Clin. Chest Med.* 8:419-439.
- Dedicoat M, Venkatesan P (1999):
The treatment of Legionnaires' disease. *J. Antimicrob. Chemother.* 43:747-752.

6 Literaturverzeichnis

- Dietrich C, Heuner K, Brand BC, 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.
- Edelstein PH, Beer KB, DeBoynton E (1987):
Influence of growth temperature on virulence of *Legionella pneumophila*.
Infect. Immun. 55:2701-2705.
- Ehret W (1995):
Diagnostik der Legionelleninfektion. *Internist Berl.* 36:106-113.
- Falco V, Fernandez de Sevilla T, Alegre J, Ferrer A, Vazquez JM (1991):
Legionella pneumophila: a cause of severe community-acquired pneumonia. *Chest* 100:1007-1011.
- Fang GD, Fine M, Orloff J, Arisumi D, Yu VL, Kapoor W, Grayston JT, Wang SP, Kohler R, Muder RR (1990):
New and emerging etiologies for community acquired pneumonia with implications for therapy. A prospective multicenter study of 359 cases. *Medicine Baltimore* 69:307-316.
- Fang GD, Yu VL, Vickers RM (1989):
Disease due to the *Legionellaceae* (other than *Legionella pneumophila*).
Historical, microbiological, clinical, and epidemiological review. *Medicine Baltimore.* 68:116-132.
- Fields BS (1996):
The molecular ecology of *Legionellae*. *Trends Microbiol.* 4:286-290.
- Fields BS, Barbaree JM, Shotts EB, Feeley JC Jr., Morrill WE, Sanden GN, Dykstra MJ (1986):
Comparison of guinea pig and protozoan models for determining virulence of *Legionella* species. *Infect. Immun.* 53:553-559.
- Fields BS, Fields SR, Loy JN, White EH, Steffens WL, Shotts EB (1993):
Attachment and entry of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis*. *J. Infect. Dis.* 167:1146-1150.
- Fields BS, Nerad TA, Sawyer TK (1990):
Characterization of an axenic strain of *Hartmannella vermiformis* obtained from an investigation of nosocomial legionellosis. *J. Protozool.* 37:581-583.
- Fields BS, Shotts EB, Feeley JC Jr., Gorman GW, Martin WT (1984):
Proliferation of *Legionella pneumophila* as an intracellular parasite of the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:467-471.
- Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, Parkin WE, Beecham HJ, Sharrar RG, Harris J, Mallison GF, Martin SM, McDade JE, Shepard CC, Brachman

- PF (1977):
Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. N. Engl. J. Med. 297:1189-1197.
- Gao LY, Harb OS, Abu Kwaik Y (1997):
Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa. Infect. Immun. 65:4738-4746.
- Gao LY, Harb OS, Abu Kwaik Y (1998):
Identification of macrophage-specific infectivity loci (mil) of *Legionella pneumophila* that are not required for infectivity of protozoa. Infect. Immun. 66:883-892.
- Gao LY, Abu Kwaik Y (1999):
Activation of caspase 3 during *Legionella pneumophila*-induced apoptosis. Infect. Immun. 67:4886-4894.
- Gao LY, Abu Kwaik Y (2000):
The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba polyphaga* by *Legionella pneumophila*. Environ. Microbiol. 2:79-90.
- Glick TH, Gregg MB, Bermann B, Mallison G, Rhodes WW, Kassanoff J (1978):
Pontiac fever: an epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiological aspects. Am. J. Epidemiol. 107:149-160.
- Hacker J, Ott M, Marre R (1994):
Genetische Analysen zur Pathogenität und Fitness von Legionellen. Klein. Lab. 3:217-222.
- Harb OS, Gao LY, Abu Kwaik Y (2000):
From protozoa to mammalian cells: a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens. Environ. Microbiol. 2:251-265.
- Harb OS, Venkataraman C, Haack BJ, Gao LY, Abu Kwaik Y (1998):
Heterogeneity in the attachment and uptake mechanisms of the Legionnaires' disease bacterium, *Legionella pneumophila*, by protozoan hosts. Appl. Environ. Microbiol. 64:126-132.
- Harrison TR, Tinsley R, Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB (2001):
Harrison's Principles of Internal Medicine. 15. Auflage. McGraw-Hill, Inc., New York.
- Heller R, Holler C, Sussmuth R, Gundermann KO (1998):
Effect of salt concentration and temperature on survival of *Legionella pneumophila*. Lett Appl Microbiol. 26:64-68.

- Hoge CW, Brieman RF (1991):
Advances in the epidemiology and control of *Legionella* infections. Epidemiol. Rev. 13:329-340.
- Holden EP, Winkler HH, Wood DO, Leinbach ED (1984):
Intracellular growth of *Legionella pneumophila* within *Acanthamoeba castellanii* Neff. Infect. Immun. 45:18-24.
- Horwitz MA (1983):
The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. J. Exp. Med. 158:2108-2126.
- Horwitz MA (1984a):
Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. Cell 36:27-33.
- Horwitz MA (1992):
Interactions between macrophages and *Legionella pneumophila*. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 181:265-282.
- Horwitz MA (1995):
The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. J. Exp. Med. 158:2108-2126.
- Horwitz MA, Maxfield FR (1984b):
Legionella pneumophila inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. J. Cell. Biol. 99:1936-1943.
- Horwitz MA, Silverstein SC (1980):
Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiples intracellularly in human monocytes. J. Clin. Invest. 66:441-450.
- Joshi AD, Sturgill-Koszycki S, Swanson MS (2001):
Evidence that Dot-dependent and -independent factors isolate the *Legionella pneumophila* phagosome from the endocytic network in mouse macrophages. Cell Microbiol. 3:99-114.
- Jürgens D, Fehrenbach FJ (1995):
Cross-reacting lipopolysaccharide antigens in *Legionella pneumophila* serogroups 1 to 14. Infect. Immun. 63:2180-2184.
- Kilvington S, Price J (1990):
Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. J. Appl. Bacteriol. 68:519-525.

- Kirby BD, Snyder KM, Meyer RD, Finegold SM (1980):
Legionnaires' disease: report of sixty five nosocomially acquired cases of review of the literature. *Medicine Baltimore* 59:188-205.
- Kramer MH, Ford TE (1994):
Legionellosis: ecological factors of an environmentally 'new' disease. *Zentralbl. Hyg. Umweltmed.* 195:470-482.
- Kusner DJ, Barton JA (2001)
ATP Stimulates Human Makrophages to Kill Intracellular Virulent *Mycobacterium tuberculosis* Via Calcium-Dependent Phagosom-Lysosom Fusion . *Journal of Immunologie* 167:3308-3315.
- Lang F, Busch GL, Völkl H (1998):
The diversity of volume regulatory mechanisms. *Cell.Physiol.Biochem.* 8:1-45.
- Lowry PW, Blankenship RJ, Gridley W, Troup NJ, Tompkins LS (1991):
A cluster of *Legionella* sternal wound infections due to postoperative topical exposure to contaminated tap water. *N. Engl. J. Med.* 324:109-113.
- Lowry PW, Tompkins LS (1993):
Nosocomial legionellosis: a review of pulmonary and extrapulmonary syndromes. *Am J Infect Control* 21:21-27.
- Ly TM, Muller HE (1990):
Ingested *Listeria monocytogenes* survive and multiply in protozoa. *J.Med. Microbiol.* 33:51-54.
- Malik ZA, Iyer S, Kusner DJ (2001):
Mycobacterium tuberculosis Phagosomes Exhibit Altered Calmodulin-Dependent Signal Transduction: Contribution to Inhibition of Phagosom-Lysosome Fusion and Intracellular Survival in Human Macrophages. *Journal of Immunologie* 166: 33392-3401.
- Marolda CL, Hauröder B, John MA, Michel R, Valvano MA (1999):
Intracellular survival and saprophytic growth of isolates from the *Burkholderia capacia* complex in free-living amoebae. *Microbiology* 145:1509-1517.
- Marra A, Blander SJ, Horwitz MA, Shuman HA (1992):
Identification of a *Legionella pneumophila* locus required for intracellular multiplication in human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 89:9607-9611.

- Marra A, Horwitz MA, Shuman HA (1990):
The HL 60 model for the interaction of human macrophages with the Legionnaires' disease bacterium. *J. Immunol.* 144:2738-2744.
- Mauchline WS, James BW, Fitzgeorge RB, Dennis PJ, Keevil CW (1994):
Growth temperature reversibly modulates the virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 62:2995-2997.
- Mattana A; Tozzi MG, Costa M, Delogu G, Fiori PL, Cappucinelli P (2001):
By Releasing ADP, *Acanthamoeba castellanii* Causes an Increase in the Cytosolic Free Calcium Concentration and Apoptosis in Wish Cells. *Infect. Immun.* 69:4134-4140.
- Mattana A, Cappai V, Alberti L, Serra C, Fiori PL, Cappucinelli P (2002):
ADP and Other Metabolites Released from *Acanthamoeba castellanii* Lead to Human Monocytic Cell Death through Apoptosis and Stimulate the Secretion of Proinflammatory Cytokines. *Infect. Immun.* 70; 4424-4432.
- McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA, Dowdle WR (1977):
Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N. Engl. J. Med.* 297:1197-1203.
- McDade JE, Shepard CC (1979):
Virulent to avirulent conversion of Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*): its effect on isolation techniques. *J. Infect. Dis.* 139:707-711.
- Mintz CS, Arnold PI, Johnson W, Schultz DR (1995):
Antibody independent binding of complement component C1q by *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 63:4939-4943.
- Moffat JF, Tompkins LS (1992):
A quantitative model of intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii*. *Infect. Immun.* 60:296-301.
- Muder RR, Yu VL, Fang GD (1989):
Community-acquired Legionnaires' disease. *Semin Respir Infect* 4:32-39.
- Nelson DP, Rensimer ER, Raffin TA (1985):
Legionella pneumophila pericarditis without pneumonia. *Arch. Intern. Med.* 145:926.
- Neumeister B (1996):
Legionelleninfektionen-Epidemiologie, Diagnostik, Klinik und Pathogenese. *Clin. Lab.* 42: 715-729.
- Neumeister B, Kleihauer A, Rossmann V, Fehrenbach E, Faigle M, Baumbach S, Eichner M, Northoff H (1998):
Induction of cytokines and expression of macrophage surface receptors in

- Mono Mac 6 cells after infection with different *Legionella* species. APMIS 106:319-333.
- Neumeister B, Reiff G, Faigle M, Dietz K, Northoff H, Lang F (2000):
Influence of *Acanthamoeba castellanii* on intracellular growth of different *Legionella* species in human monocytes. Appl. Environ. Microbiol. 66:914-919.
- Neumeister B, Schöniger S, Essig A, Marre R (1997):
Multiplication of different *Legionella* species in Mono Mac 6 cells and in *Acanthamoeba castellanii*. Appl. Environm. Microbiol. 63:1219-1224.
- Nguyen MI, Stout JE, Yu VL (1991a):
Legionellosis. Infect. Dis. Clin. North Am. 5:561-584.
- Nguyen ML, Yu VL (1991b):
Legionella infection. Clin. Chest Med. 12:257-268.
- O'Brien SJ, Bhopal RS (1993):
Legionnaires' disease: the infective dose paradox. Lancet 342:5-6.
- Otten S, Iyer S, Johnson W, Montgomery R (1986):
Serospecific antigens of *Legionella pneumophila*. J. Bacteriol. 167:893-904.
- Pachon J, Prados MD, Capote F, Cuello JA, Garnacho J, Verano A (1990):
Severe community acquired pneumonia. Etiology, prognosis, and treatment. Am. Rev. Respir. Dis. 142:369-373.
- Payne NR, Horwitz MA (1987):
Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors. J. Exp. Med. 166:1377-1389.
- Pelaz C, Garcia Albert L, Bourgon CM (1987):
Cross reactivity among *Legionella* species and serogroups. Epidemiol. Infect. 99:641-646.
- Perez-Serrano J, Martinez J, Perez B, Bernadina WE, Rodriguez-Caabeiro F (2000):
In vitro Shock response to diferent stressors in free living and pathogenic *Acanthamoeba*. Int J Parasitol 30(7) 929-35.
- Rechnitzer C, Blom J (1989):
Engulfment of the Philadelphia strain of *Legionella pneumophila* within pseudopod coils in human phagocytes. Comparison with other *Legionella* strains and species. APMIS 97:105-114.
- Reiff G (2002):
Einfluss von *Acanthamoeba castellani* auf das intrazelluläre Wachstum verschiedener Legionellenspezies in humanen Monozyten: Entwicklung

eines Kokulturmodells. Dissertation der Med. Fakultät der Universität Tübingen, Klinik für Anaesthesiologie und Transfusionsmedizin.

- Reingold AL, Thomason BM, Brake BJ, Thacker L, Wilkinson HW, Kuritsky JN (1984):
Legionella pneumonia in the United States: the distribution of serogroups and species causing human illness. J. Infect. Dis. 149:819.
- Rello J, Quintana E, Ausina V, Net A, Prats G (1993):
A three-year study of severe community-acquired pneumonia with emphasis on outcome. Chest 103:232-235.
- Roberts EA, Coote GC (1965):
The estimation of concentration of viruses and bacteria from dilution counts. Biometrics 21:600-615.
- Rowbotham TJ (1980):
Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. J. Clin. Pathol. 33:1179-1183.
- Rowbotham TJ (1986):
Current views on the relationships between amoebae, *Legionellae* and man. Isr. J. Med. Sci. 22:678-689.
- Ruckdeschel G, Ehret W (1993):
Die Legionelleninfektion. Ergeb. Inn. Med. Kinderheilkd. 61:207-302.
- Segal G, Shuman HA (1999):
Legionella pneumophila utilizes the same genes to multiply within *Acanthamoeba castellanii* and human makrophages. Infect Immun 67:2117-2124.
- Simon C, Stille W (2001):
Antibiotika – Therapie in Klinik und Praxis. 10. Auflage. Schattauer, Stuttgart-New York.
- Smith-Somerville HE, Huryn VB, Walker C, Winters AL (1991):
Survival of *Legionella pneumophila* in the cold water ciliate *Tetrahymena vorax*. Appl. Environ. Microbiol. 57:2742-2749.
- Steinert M, Emody L, Amann R, Hacker J (1997):
Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. Appl. Environ. Microbiol. 63:2047-2053.
- Stone BJ, 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.

- Stout JE, Yu VL (1997):
Legionellose. N. Engl. J. Med. 337:682-687.
- Sturgill-Koszycki S, Swanson MS (2000):
Legionella pneumophila replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. J Exp Med. 192:1261-1272.
- Susa M, Ticac B, Rukavina T, Doric M, Marre R. (1998):
Legionella pneumophila infection in intratracheally inoculated T cell-depleted or -nondepleted A/J mice. J. Immunol 160:316-321.
- Swanson MS, Isberg RR (1996):
Identification of *Legionella pneumophila* mutants that have aberrant intracellular fates. Infect. Immun. 64:2585-2594.
- Swanson MS, Hammer BK (2000):
Legionella pneumophila pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. Annu. Rev. Microbiol. 54:567-613.
- Thomas L (2000):
Labor und Diagnose. TH-Books-Verl.-Ges., Frankfurt/ Main.
- Tompkins LS, Roessler BJ, Redd SC, Markowitz LE, Cohen ML (1998):
Legionella prosthetic valve endocarditis N. Engl. J. Med. 318:530-535.
- Tyndall RL, Domingue EL (1982):
Cocultivation of *Legionella pneumophila* and free living amoebae. Appl. Environ. Microbiol. 44:954-959.
- Vandenesch F, Surgot M, Bornstein N, Paucod JC, Marmet D, Isoard P, Fleurette J (1990):
Relationship between free amoebae and *Legionella*: studies in-vitro and in-vivo. Int. J. Med. Microbiol. 272:265-275.
- Venkataraman C, Haack BJ, Bondada S, Abu Kwaik Y (1997):
Identification of a Gal/ GalNAc lectin in the protozoan *Hartmannella vermiformis* as a potential receptor for attachment and invasion by the Legionnaires' disease bacterium. J. Exp. Med. 186:537-547.
- Vogel JP, Isberg RR (1999):
Cell biology of *Legionella pneumophila*. Curr. Opin. Microbiol. 2:30-34.
- Vogel JP, Roy C, Isberg RR (1996):
Use of salt to isolate *Legionella pneumophila* mutants unable to replicate in macrophages. Ann. N.Y. Acad.Sci. 797:271-272.
- Völkl H, Busch GL, Häussinger D, Lang F (1994):
Alkalinization of acidic cellular compartments following cell swelling. FEBS Lett. 338:27-30.

6 Literaturverzeichnis

- Völkl H, Friedrich F, Häussinger D, Lang F (1993a):
Effect of cell volume on acridine orange fluorescence in hepatocytes.
Biochem.J. 295:11-14.
- Völkl H, Rehwald W, Waitz W, Häussinger D, Lang F (1993b):
Acridine orange fluorescence in renal proximal tubulules: effects of
NH₃/NH₄⁺ and cell volume. Cell. Physiol.Biochem. 3:28-33.
- Weinbaum DL, Benner RR, Dowling JN, Alpern A, Pasculle AW, Donowitz GR
(1984):
Interaction of *Legionella micdadei* with human monocytes. Infect. Immun.
46:68-73.
- Weisse AB (1992):
A plague in Philadelphia. The story of Legionnaires' disease. Hosp.
Pract. Off. Ed. 27:151-168.
- Weissgerber P, Faigle M, Northoff H, Neumeister B (2003):
Investigation of Mechanisms involved in Phagocytosis of *Legionella*
pneumophila by Human Cells. FEMS Microbiology Letters. Im Druck.
- Winn WC (1988):
Legionnaires disease: historical perspective. Clin. Microbiol. Rev. 1:60-
81.
- Winn WC (1993):
Legionella and the clinical microbiologist. Infect. Dis. Clin. North Am,
7:377-392.
- Wintermeyer E, Rdest U, Ludwig B, Debes A, Hacker J (1991):
Characterization of legiolysin (lly), responsible for haemolytic activity,
colour production and fluorescence of *Legionella pneumophila*. Mol.
Microbiol. 5:1135-1143.
- Yamamoto Y, Klein TW, Friedman H (1993):
Legionella pneumophila virulence conserved after multiple single colony
passage on agar. Curr. Microbiol. 27:241-245.
- Yu VL (1993):
Could aspiration be the major mode of transmission for *Legionella*? Am.
J. Med. 95:13-15.
- Ziegler-Heitbrock HWL, Thiel E, Fütterer A, Herzof V, Wirtz A, Riethmüller G
(1988):
Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of
mature monocytes. Int. J. Cancer 41:456-461.

Erklärung:

Die Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.6), die HPL-Chromatographie (2.7) und die Lyophilisation des Überstands (3.3.3) wurden durchgeführt von Dr Ali, Abteilung für Transfusionsmedizin, Universitätsklinik Tübingen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum	29. Juni 1975
Geburtsort	Karlsruhe
Familienstand	ledig

Studium

Medizinstudium

Sommersemester 1998-2004	Universität Tübingen
04/ 2000	Physikum
03/ 2001	Erstes Staatsexamen (Note 2,0)
04/ 2003	Zweites Staatsexamen (Note 1,66)
14.05.2004	Drittes Staatsexamen (Note 2,0; Abschlussnote 1,83)

Praktisches Jahr

04-08/2003	Gynäkologie	Mayo General Hospital, Irland
08-11/2003	Innere Medizin	Diakonie Klinikum Stuttgart
11/2003 – 03/2004	Chirurgie	Hospital Luis Vernaza, Guayaquil, Ecuador

Famulaturen

08/2000	Innere Medizin	Kreiskrankenhaus Husum
07/2001	Unfallchirurgie	Theresienkrankenhaus Mannheim
08/2001	Anästhesie	Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart
07-09/2002	Chirurgie und Gynäkologie	Chitipa District Hospital, Malawi, Afrika

Promotion

2002-2004

Experimentelle Doktorarbeit: Einfluss verschiedener Amöbenspezies auf die intrazelluläre Vermehrung von Legionellen.

Universität Tübingen, Abteilung für Transfusionsmedizin.

Betreuung: PD Dr. Neumeister

Magisterstudiengang

seit Wintersemester 1996

Hauptfach Politikwissenschaft,
Nebenfächer Rechtswissenschaft und Pädagogik

Universität Tübingen
(scheinfrei im Hauptstudium)

Studium generale

1995/96

am Leibniz Kolleg, Tübingen

Tanja Weiß

Schulbildung

1981-1990	Grund- und Hauptschule Bruchsal-Untergrombach
1990	Hauptschulabschluss
1990-1992	Berufsfachschule für Elektrotechnik, Bruchsal
1992	Mittlere Reife
1992-1995	Technisches Gymnasium, Bruchsal
1995	Abitur (Note 1,4)
	Leistungskurse Physik und Technik

Fremdsprachen

Englisch, Spanisch: fließend in Wort und Schrift
Französisch, Italienisch: Grundkenntnisse

Berufserfahrung/ Praktika

seit 2001	Fahrerin und Praxisassistentin	Ärztliche Notfallpraxis, Ditzingen
07/08 1998	Pflegepraktika	Derriford Hospital, Plymouth, UK
07/08 1996		Vincencius Krankenhaus, Karlsruhe