

***Legionella pneumophila* – intrazelluläre Propagierung des LPS und
Assoziation des Phagosoms mit dem endoplasmatischen Retikulum
während der intrazellulären Vermehrung in humanen Monozyten**

Dissertation

der Fakultät für Biologie
der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

vorgelegt

von

Nadja Mannowetz

aus Göppingen

2004

Tag der mündlichen Prüfung:	05. April 2004
Dekan:	Prof. Dr. H.-U. Schnitzler
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. F. Götz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Wolburg

DANKE !

Folgenden Personen, die wesentlich am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren, möchte ich herzlich danken:

Frau PD Dr. med. Birgid Neumeister für die Ermöglichung dieser Arbeit, ihre tatkräftige Unterstützung und ihr Engagement

Herrn Prof. Hartwig Wolburg für hilfreiche Morphologie-Diskussionen und seine Begeisterungsfähigkeit für meine Arbeit

Marion Faigle für ALLES

Der Arbeitsgruppe in Derendingen, wie auch der Arbeitsgruppe in der Patho für das wunderbare Arbeitsklima, den Humor und den super Beistand in allen Lebenslagen

Herrn Prof. Fritz Götz für die gute Zeit im Gkl

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1 Einleitung

1.1	Geschichtliches und Aktuelles	1
1.2	Taxonomische Einordnung	3
1.3	Diagnostik und klinische Relevanz	3
1.4	Virulenzfaktoren von <i>Legionella pneumophila</i>	6
1.4.1	Oberflächenstrukturen und zellassoziierte Komponenten.....	6
1.4.2	Sekretionssysteme	10
1.5	Bimorpher Lebenszyklus von <i>L. pneumophila</i>	12
1.6	Phagosomenreifung/Intrazelluläre Pathogene	13
1.7	Zielsetzung dieser Arbeit	15

Kapitel 2 Material und Methoden

2.1	Zellkultur.....	17
2.1.1	Anzucht und Stammhaltung von <i>L. pneumophila</i>	17
2.1.2	Kultivierung der Mono Mac 6 (MM6)-Zellen	18
2.2	Infektion der MM6-Zellen	18
2.2.1	Herstellung der MM6-Suspension.....	19
2.2.2	Herstellung der Legionellensuspension	19

2.2.3	Durchführung der Infektion.....	20
2.2.4	Ermittlung der Lebendkeimzahl von <i>L. pneumophila</i>	20
2.3	γ-Bestrahlung von <i>Legionella</i>-Bakterien.....	21
2.4	Immunogoldmarkierung von <i>L. pneumophila</i>.....	21
2.5	Isolation intrazellulärer <i>Legionella</i>-Bakterien	22
2.5.1	Isolation für Immunogoldmarkierungen	22
2.7.1	Isolation zur Reinfektion von MM6-Zellen	22
2.6	Hemmung der Proteaseaktivität der MM6-Zellen.....	23
2.7	Elektronenmikroskopie.....	23
2.7.1	Einbettung der Zellen in Araldit	23
2.7.2	Einbettung der Zellen in Unicryl und Lowicryl K4M	24
2.7.3	Anfertigung der Semi- und Ultradünnschnitte.....	25
2.8	Immunogoldmarkierung am Ultradünnschnitt.....	26
2.9	Untersuchung der LPS-Biosynthese auf RNA-Ebene	26
2.9.1	Beschichtung von Dynabeads	26
2.9.2	Isolierung intrazellulärer Legionellen	27
2.9.3	Flüssigkulturen von <i>L. pneumophila</i>	27
2.9.4	Präparation totaler Bakterien-RNA	28
2.9.5	Primer Design.....	28
2.9.6	RT-PCR.....	29
2.9.7	Elektrophorese	31
2.10	Geräte	31

2.11 Verbrauchsmaterialien 31

2.12 Medien 32

Kapitel 3 Ergebnisse

3.1 Phagozytoserate markierter und nichtmarkierter Legionellen 33

3.2 Elektronenmikroskopie 34

3.2.1 Einbettungsvorversuche mit Unicryl und Lowicryl K4M..... 35

3.2.2 Intrazelluläre LPS-Verteilung 37

3.2.3 Einfluss des Protease-Inhibitors 41

3.2.4 LPS-Nachweis auf agaradaptierten und wirtszellpassagierten Legionellen
..... 43

3.2.5 Nachweis von Calnexin auf wirtszellpassagierten Legionellen 46

3.2.6 Morphologie der Phagosomen und deren Assoziation mit dem ER..... 47

3.2.7 Morphologie intraphagosomaler Legionellen 56

3.3 Expressionsanalyse 57

3.4 Intrazelluläre Vermehrung LPS-reduzierter Legionellen 58

3.5 Quantitativer Nachweis von Legionellen im Infektionsüberstand... 59

Kapitel 4 Diskussion..... 61

Kapitel 5 Zusammenfassung..... 76

Kapitel 6 Literatur 80

Lebenslauf..... 94

Kapitel 1 Einleitung

1.1 Geschichtliches und Aktuelles

Im Juli 1976 versammelte sich die Sektion Pennsylvania der amerikanischen Legion zu ihrem 58. Kongress im Bellevue-Stratford-Hotel in Philadelphia. Von den etwa 4400 Delegierten klagten bereits einen Tag nach der Eröffnung einige über Husten, Fieber und Lungenentzündung. Innerhalb von zwei Wochen erkrankten insgesamt 149 Personen, von denen 29 starben. Von weiteren 72 Personen, die zwar nicht an der Veranstaltung teilgenommen, sich aber im oder in der Nähe des Bellevue-Stratford-Hotels aufgehalten hatten, und die gleichen Symptome wie die Legionäre aufwiesen, starben fünf. Keiner der bis dahin bekannten Erreger, sei er zur Klasse der Bakterien, Rickettsien oder Viren gehörig, konnte als Auslöser für diese Krankheit, die in den Medien als „Legionärskrankheit“ bezeichnet wurde, ausgemacht werden. Erst 1977 gelang es Wissenschaftlern, aus Lungengewebe von verstorbenen Legionären ein bis dato unbekanntes Bakterium zu isolieren. Dass der isolierte Mikroorganismus auch der Krankheitserreger war, konnte eindeutig belegt werden, da sich in über 90 % der Patientenserum ein hoher Antikörperspiegel gegen dieses Bakterium feststellen ließ. Benannt wurde das Bakterium nach dem Personenkreis, der erstmals an einer derartigen Infektion erkrankte und dem

Organ, welches das Bakterium vorwiegend infiziert - *Legionella (L.) pneumophila*.

Meist erfährt man nur von großen Ausbrüchen, wohingegen Einzelfälle so gut wie nie in der Presse erscheinen. Dass Legionellen immer wieder bzw. in immer kürzeren Zeitabständen zu tödlich verlaufenden Krankheitsausbrüchen führen, zeigt ein kleiner Diskurs in die letzten fünf Jahre:

- Februar 1999 (den Boer et al. 2002): Nach dem Besuch der Flora-Blumenschau in Bovenkarspel, Niederlande, erkrankten 188 Personen an der Legionärskrankheit, wobei 17 Personen daran starben. In zwei Whirlpools und einer Sprinkleranlage konnten Legionellen nachgewiesen werden.
 - April/Juni 2000: Von 107 erkrankten Besuchern des Aquariums in Melbourne starben zwei. Die Bakterien hatten sich im Kühlturm der Klimaanlage des Aquariums angereichert. Auffällig bei diesem Ausbruch war die Tatsache, dass vorwiegend Kinder betroffen waren.
 - Juni/Juli 2001: Im spanischen Murcia infizierten sich 315 Personen mit Legionellen, wobei ein Mann der Legionellose erlag. Ein Kühlturm im Stadtzentrum wurde als Ursache für den Ausbruch angesehen.
 - Juli 2002: Von 116 Personen, die sich im Stadtzentrum von Barrow-in-Furness, Groß-Britannien, infiziert hatten, verstarben drei. Ursache für diesen Ausbruch war eine Klimaanlage in einem Gebäude des Stadtrates.
 - Juli 2003: In einer Klinik in Frankfurt an der Oder erlagen zwei Patienten der Legionärskrankheit. Aller Wahrscheinlichkeit nach verbreiteten sich die Erreger über die Warmwasseranlage des Klinikums.
 - August 2003: Nach Ausbruch der Legionärskrankheit an Bord des Kreuzfahrtschiffes "Ocean Monarch" starb ein Opfer.
 - Januar 2004: In der nordfranzösischen Industrieregion bei Arras infizierten sich in einer Petrochemiefabrik 59 Menschen mit Legionellen, wobei sieben daran starben. Es musste sich bei diesem Ausbruch um einen sehr virulenten Stamm gehandelt haben, da Legionellen normalerweise warme Temperaturen
-

bevorzugen und vornehmlich im Sommer Krankheitsausbrüche dieser Art hervorrufen.

1.2 Taxonomische Einordnung

Phänotypisch kann die Gattung *Legionella* in zahlreiche Spezies eingeteilt werden, die allerdings keine einheitliche DNA-Homologie aufweisen. Dennoch werden diese Spezies in einer einzigen Gattung zusammengefasst, da sie sich trotz geringer genotypischer Übereinstimmungen phänotypisch sehr ähnlich sind (Neumeister 1996). Mittlerweile umfasst die Gattung Legionella 46 Spezies (Cianciotto, 2001) mit 64 Serogruppen (Sg), die sich in humanpathogene (z. B. *L. pneumophila* Sg 1), mäßig humanpathogene (z. B. *L. micdadei*, *L. dumoffii*), selten humanpathogene (z. B. *L. anisa*, *L. longbeachae*) und solche unterteilen lassen, für die bisher noch keine Humanpathogenität beschrieben wurde (z. B. *L. brunensis*, *L. steigerwaltii*) (Neumeister, 1996). Hierbei versteht man unter humanpathogenen Spezies solche, die befähigt sind, in humane Wirtszellen einzudringen und intrazellulär zu replizieren.

1.3 Diagnostik und klinische Relevanz

Bei Legionellen handelt es sich um mono- oder lophotrich begeißelte, gram-negative, fakultativ anaerobe Stäbchen mit einer Länge von 2-20 µm oder mehr und einem Durchmesser von 0,3-0,9 µm. Anstelle der Gram-Färbung eignet sich die für den Rickettsien- und Chlamydien-Nachweis entwickelte Gimenez-Färbung allerdings bedeutend besser. Sehr sichere Ergebnisse für den mikroskopischen Nachweis der am häufigsten vorkommenden Stämme liefert die direkte Immunfluoreszenz. Hierbei werden die Antikörper eines kommerziell erwerbbar Antiserums, welche gegen das Hauptmembranprotein der

Bakterien (major outer membrane protein = MOMP) gerichtet sind, FITC (Fluoreszein-Isothiocyanat)-markiert, so dass Legionellen im UV-Licht grün erscheinen. Der Nachweis von Legionellen-Antigenen im Urin erfolgt mit Hilfe des Enzym-Immuno-Assays (enzyme linked immuno sorbent assay = ELISA) (White et al. 1981, de Ory 1999), des Radio-Immuno-Assays (radio immuno assay = RIA) (Kohler et al. 1981), der Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction = PCR) (Helbig et al. 1999) und/oder der Latexagglutination (Sedgwick und Tilton 1983). Dieser Test dient zwar vornehmlich der Identifizierung von *L. pneumophila* Sg 1, allerdings verursacht diese Spezies aber auch mehr als 80% der Legionellose.

Aminosäuren sind die primär verwertbaren Kohlenstoff- und Energiequellen, da Legionellen als chemoorganotrophe Organismen nicht in der Lage sind, Zucker zu spalten. Für ihre Anzucht dient BCYE α -Agar (pH 6,90 \pm 0,1), bestehend aus Hefeextrakt, ACES-Puffer (Pasculle et al. 1980), Aktivkohle, α -Ketoglutarat (Edelstein 1982), L-Cystein (Feeley et al. 1979) und Eisenphosphat. Der Zusatz von Aktivkohle dient der Inaktivierung von Sauerstoffradikalen, gegen die Legionellen hochgradig empfindlich sind (Hoffman et al. 1983). Auf diesem schwarzen Agar erscheinen Legionellen als runde, milchglasartige Kolonien, die bisweilen leicht gelblich oder blau-rosa opaleszieren. Auf diesem schwarzen Agar erscheinen Legionellen als runde, milchglasartige Kolonien, die bisweilen leicht gelblich oder blau-rosa opaleszieren. Die Bebrütung der Kolonien erfolgt bei 35°C und einem CO₂-Gehalt von 3-5% für circa vier Tage. Legionellen kommen ubiquitär in stehenden Süßgewässern in der Natur vor, sind dort aber stets mit Amöben assoziiert, die damit den natürlichen Wirt dieser Bakterien darstellen. Durch Aerosole eingeatmet, gelangen Legionellen in die humanen Alveolarmakrophagen, wo sie replizieren (Abb. 1) und unter Schädigung des Lungenepithels und des Lungensurfactants atypische Pneumonien hervorrufen. Haupterreger dabei ist *L. pneumophila* Sg 1, welche somit die epidemiologisch bedeutsamste Spezies darstellt. Der Anteil an ambulant erworbenen Legionellen-Pneumonien an der Gesamtheit aller Pneumonien liegt zwischen 1 und 22,5% (Macfarlane et al. 1982, Friis-Moller et al. 1986, File et al. 1992). Der

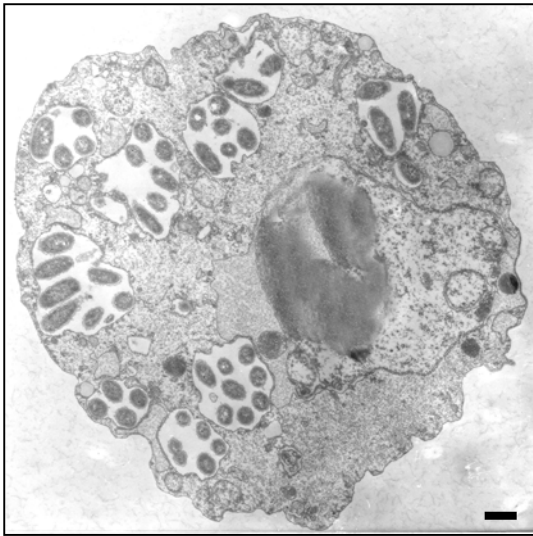


Abb. 1: Ein mit *L. pneumophila* infizierter Makrophage 11 h p. i.
Bar = 0,1 μm

Anteil an nosokomialen Pneumonien mit bis zu 40% (Muder et al. 1983, Johnson et al. 1985, Ruf et al. 1989) ist nicht unerheblich, so dass Legionellenpneumonien ein nicht zu unterschätzendes Gesundheitsrisiko darstellen. Je nach Immunstatus der infizierten Person sind zwei resultierende Krankheitsbilder zu unterscheiden – die Legionellose und das Pontiac-Fieber. Die klassische Legionärskrankheit (Legionellose), eine atypische und immer noch oft tödlich verlaufende Pneumonie, tritt vor allem

vor allem bei alten und immunsupprimierten Menschen auf. Die Anfangsstadien sind gekennzeichnet durch Übelkeit, Unwohlsein, Benommenheit, Kopf- und Gliederschmerzen, unproduktiven Husten und Fieber. Manifestiert sich die Krankheit, so leiden die Patienten unter produktivem Husten, Atemnot, Brustschmerzen und Fieber, welches nicht selten auf über 40°C ansteigt und von Schüttelfrost begleitet ist. In komplizierten Fällen ist eine Legionelleninfektion mit einem ARDS (acute/addult respiratory distress syndrome) verbunden, was ein Multiorganversagen und damit den tödlichen Ausgang der Krankheit zur Folge hat (Hervas et al. 1988, Monforte et al. 1989, Waanders et al. 1991, Fumarola et al. 1992). Das Pontiac-Fieber hingegen ist vergleichbar mit einer Sommergrippe, tritt vorwiegend bei jungen und gesunden Menschen auf und fordert keine Todesopfer. Die Krankheitssymptome hierbei sind unproduktiver Husten, allgemeines Unwohlsein, Fieber, Müdigkeit, Kopf-, Glieder-, Brust- und Muskelschmerzen. Während sich eine Legionellose über Monate hinwegziehen kann, ist das Pontiac Fieber meist nach circa fünf Tagen wieder abgeklungen.

1.4 Virulenzfaktoren von *Legionella pneumophila*

Die intrazelluläre Vermehrungsfähigkeit in monozytären Zellen wird als Schlüsselmechanismus der *Legionella*-Pathogenese angesehen. Im Genom von *L. pneumophila* konnten bereits mehrere Genloci nachgewiesen werden, die im Zusammenhang mit der Fähigkeit zur intrazellulären Vermehrung in Phagozyten stehen: *mip* (macrophage infectivity potentiator) (Cianciotto et al. 1989, Fischer et al. 1992), *icm* (intracellular multiplication) (Marra et al. 1992), *dot* (defective organelle trafficking) (Berger und Isberg 1993), *pmi* (protozoan and macrophage infectivity loci) (Gao et al. 1997), *mil* (macrophage-specific infectivity loci) (Gao et al. 1998), *prp* (Stone et al. 1999), *iraAB* (Viswanathan et al. 2000) und *lvgA* (Edelstein et al. 2003). Das Fehlen eines dieser Genbereiche hebt die Fähigkeit zur intrazellulären Vermehrung von *L. pneumophila* Sg 1 auf bzw. führt zu einer Reduzierung und Verzögerung dieses Phänomens (Cianciotto et al. 1990, Cianciotto und Fields 1992, Marra et al. 1992, Berger und Isberg 1993, Gao et al. 1997, Gao et al. 1998, Stone et al. 1999, Viswanathan et al. 2000, Edelstein et al. 2003). Neben zwei Sekretionssystemen besitzt *L. pneumophila* zellassozierte Proteine, Enzyme und Toxine als potentielle Virulenzfaktoren, die es den Bakterien ermöglicht, in Amöben und Makrophagen einzudringen und dort in speziellen Phagosomen zu replizieren. Bislang konnte jedoch keinem der zur Virulenz beitragenden Faktoren eine herausragende Bedeutung beigemessen werden (Dowling et al. 1992).

1.4.1 Oberflächenstrukturen und zellassozierte Komponenten

- LPS (Lipopolysaccharid). Aufgrund seiner chemischen Struktur unterscheidet sich das LPS von *L. pneumophila* Sg 1 (Subtyp Philadelphia) von dem anderer gram-negativer Bakterien. Das Lipid A weist hohe Mengen an verzweigten

Fettsäuren auf, die doppelt so lang sind wie die Acylgruppen in Lipopolysacchariden von Enterobakterien (Zähringer et al. 1995). Es wäre denkbar, dass dieser erhöhte Gehalt an Fettsäuren phagozytierte Bakterien vor intrazellulär in Amöben vorkommenden Esterasen schützt (Zähringer et al. 1995). N- und O-Acetylgruppen, wie auch 6-Desoxyzucker sind die Hauptbestandteile der äußeren Kernzone, die durch diesen Aufbau hydrophobe Eigenschaften aufweist. Die innere Kernzone ist durch das Vorhandensein von Kdo (3-Desoxy-D-manno-octulosonsäure) durchaus mit Kernzonen enterobakterieller Lipopolysaccharide vergleichbar, unterscheidet sich durch das Fehlen von Heptose und Phosphatgruppen aber gleichzeitig von diesen (Zähringer et al. 1995). Die O-spezifische Seitenkette ist ein Homopolymer aus zehn bis 75 Einheiten von 5-Acetamido-7-acetamido-8-O-acetyl-3,5,7,9-tetradesoxy-D-glycero-L-galacto-nonulosonsäure (Knirel et al. 1994, Zähringer et al. 1995), welches auch als Legionaminsäure bezeichnet wird. Die hydrophoben Oberflächeneigenschaften könnten es extrazellulären Legionellen erleichtern, an Amöbenmembranen, bzw. an Membranen der Alveolarmakrophagen der Lunge zu adhären (Knirel et al. 1994, Zähringer et al. 1995). Während sich Lipopolysaccharide anderer gram-negativer Bakterien, wie z. B. *E. coli* oder *Salmonella* ssp., aus phenolischen Phasen extrahieren lassen, ist dies für das *L. pneumophila*-LPS nicht möglich. Dieses LPS weist aufgrund fehlender freier Hydroxylgruppen derartig gesteigerte hydrophobe Eigenschaften auf, dass die Extraktion dieses Moleküls nur aus unpolaren Phasen erfolgen kann (Zähringer et al. 1995). Im Gegensatz zu Lipopolysacchariden anderer gram-negativer Bakterien ruft das *L. pneumophila*-LPS weder Sepsis noch septischen Schock hervor und fungiert damit nicht als klassisches Endotoxin. Es reagiert im Limulus-Test zwar positiv, ruft aber keine Schwartzman-Reaktion in Hasen und Mäusen hervor (Fumarola et al. 1992). Des Weiteren konnte für dieses Molekül gezeigt werden, dass es im Vergleich zum *Salmonella enterica* (Serovar Minnesota)-LPS erst ab einer tausendfach höheren Konzentration in der Lage ist, Monozyten zu aktivieren, d. h. eine Sekretion proinflammatorischer Zytokine auszulösen (Neumeister et al. 1998).

Auffällig ist auch, dass dieses LPS nicht den Toll-like Rezeptor (TLR) 4 stimuliert, sondern vielmehr TLR 2 an der Signalkaskade beteiligt ist (Lettinga et al. 2002, Girard et al. 2003). Des Weiteren ist das LPS von *L. pneumophila* nicht zwingend an der Phagozytose beteiligt, wie es eigentlich bei gram-negativen Bakterien zu erwarten wäre. Dabei muss die Bedeutung von Komplementrezeptoren für die Phagozytose von Legionellen (Payne und Horwitz 1987) in Frage gestellt werden, da bei Blockierung von Komplementrezeptoren (CD35 und CD11b/18), wie auch bei Verwendung von HeLa-Zellen, die nur sehr geringe Mengen an Komplementrezeptoren exprimieren, die Phagozytoserate für Legionellen identisch zu normalen humanen Monozyten war (Weissgerber et al. 2003). Auch die Blockierung anderer Rezeptoren, wie CD14 (LPS-Rezeptor), CD29 (β_1 -Integrin Kette des Fibronektin Rezeptors), ICAM-1 (intracellulär Adhäsionsmolekül 1) und CD71 (Transferrinrezeptor), änderte die Phagozytoserate nicht (Weissgerber et al. 2003).

- Mip (macrophage infectivity potentiator). Mip ist ein von *L. pneumophila* exprimiertes Oberflächenprotein, welches intraphagosomal als multilamelläre Membranstruktur vorliegt (Helbig et al. 2001). Mip gehört zur Familie der FK-506 bindenden Proteine und weist eine Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerase (PPIase) Aktivität auf, wobei gezeigt werden konnte, dass nicht die PPIase Aktivität für vollständige Virulenz in *Acanthamoeba castellanii* verantwortlich ist, sondern die N-terminale Region des Moleküls, welche für die Ausbildung stabiler Mip Homodimere benötigt wird (Köhler et al. 2003). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Mip Promoter direkt nach Phagozytose unterdrückt wird und erst 24 h nach Infektion wieder seine volle Aktivität erlangt (Wieland et al. 2002).

- Hsp60 (heat shock protein 60). Dieses zur Familie der Hitzeschockproteine gehörige und als Chaperon fungierende Protein ist in der Zellwand von *L. pneumophila* verankert und wird während sehr früher und sehr später Infektionsstadien in enormen Mengen synthetisiert (Fernandez et al. 1996,

Garduño et al. 1998a). Auch diesem Molekül wird eine Bedeutung für die Virulenz zugesprochen, da die Blockierung des Hsp60 Rezeptors in mengenabhängiger Art und Weise die Adhärenz der Bakterien beeinflusst (Garduño et al. 1998b). Darüber hinaus belegen elektronenmikroskopische Studien eine Prozessierung von Hsp60 in das Zytoplasma der Wirtszelle bei *L. pneumophila*, nicht aber bei *E. coli* (Garduño et al. 1998b).

▪ MOMP (major outer membrane protein). Dieses 100 kDa große Protein ist mit Peptidoglykan assoziiert und weist die Funktion eines porenbildenden Kanals auf (Gabay et al. 1985). Des weiteren bindet die 28 kDa große Untereinheit von MOMP an den Komplementfaktor C3. Der sich dabei bildende Komplex aus MOMP, C3bi und CR3 wird dann letztendlich phagozytiert (Bellinger-Kawahara und Horwitz 1990). Dies ist wahrscheinlich nur einer von mehreren Wegen, die es *L. pneumophila* ermöglichen, in Wirtszellen zu gelangen, da, wie bereits erwähnt wurde, bei Blockierung von Komplementrezeptoren die Phagozytoserate für Legionellen identisch zu normalen humanen Monozyten war (Weissgerber et al. 2003).

▪ DotO/DotH Diese beiden Proteine werden (wie Hsp60) zu sehr frühen und zu sehr späten Infektionsstadien in enormen Mengen auf den Bakterienoberflächen exprimiert (Watarai et al. 2001). Da Bakterien, die DotO und DotH exprimieren, bedeutend besser von Wirtszellen phagozytiert werden als Bakterien, die entweder keine oder nur sehr geringe Mengen dieser Proteine aufweisen, stellen DotO und DotH wahrscheinlich wichtige Mediatoren für eine verbesserte Aufnahme in Wirtszellen dar (Watarai et al. 2001).

▪ Flagellen Flagellen werden nur von virulenten *Legionella*-Spezies exprimiert. *L. pneumophila* besitzt einzelne, monopolare Flagellen, die aus einer Einheit bestehen, dem Protein FlaA. Zum einen tragen die Flagellen zur Motilität der Bakterien bei, zum anderen unterstützen sie das Eindringen der Bakterien in Wirtszellen. Molekularbiologische Studien zeigen, dass *flaA*-Mutanten von *L.*

pneumophila im Vergleich zum Wildtyp deutlich schlechter in HeLa-Zellen einzudringen vermögen. (Dietrich et al. 2001, Heuner et al. 2003). Die Expression der Flagellen ist abhängig von der Wachstumsphase, in der sich die Bakterien befinden, von der Temperatur, der Verfügbarkeit von Aminosäuren und der Viskosität und Osmolarität des Mediums (Heuner et al. 1999).

1.4.2 Sekretionssysteme

L. pneumophila verfügt mit Lsp und Icm/Dot über zwei Sekretionssysteme, wobei das Icm/Dot-System bis dato bedeutend besser charakterisiert ist.

▪ Lsp: Dieses Typ II Protein-Sekretionssystem kontrolliert die Translozierung diverser Enzyme, wie beispielsweise RNase, Lipase, Phospholipase A, Phospholipase C und Lysophospholipase A (Rossier et al. 2004). Allerdings ist noch nicht vollständig geklärt, welche dieser exportierten Faktoren die eigentlichen Effektoren für die intrazelluläre Vermehrung und Virulenz sind.

▪ Icm/Dot: Dieses Typ IV Sekretionssystem wird von 24 *dot* und *icm* Genen kodiert (Marra et al. 1992, Berger und Isberg 1993, Sadosky et al. 1993, Andrews et al. 1998). *Dot/Icm* Mutanten von *L. pneumophila* sind nicht zur intrazellulären Replikation befähigt, da deren Phagosomen schnell mit Endo- und Lysosomen fusionieren (Wiater et al. 1998, Andrews et al. 1998, Roy et al. 1998, Zuckman et al. 1999, Matthews und Roy 2000, Coers et al. 2000). Aufgrund dieser Daten erscheint es realistisch, dass Proteine, die durch den Dot/Icm Transporter sezerniert werden, für *L. pneumophila* essentielle Effektormoleküle darstellen, um in Amöben oder Makrophagen sowohl ein replikatives Phagosom zu etablieren, als auch die Wirtszellen verlassen zu können (Berger und Isberg 1993, Berger et al. 1994, Segal und Shuman 1997, Purcell und Shuman 1998, Andrews et al. 1998, Kirby et al. 1998, Vogel et al. 1998, Segal et al. 1998, Coers et al. 2000, Hilbi et al. 2001). Bislang konnten nur vier derartige Proteine (DotA, IcmX, RalF

und LidA) identifiziert werden: DotA ist ein integrales Protein der bakteriellen Cytoplasmamembran (Roy und Isberg 1997) und wird von flüssigkulturgezogenen Bakterien in Kulturüberstände sezerniert (Nagai und Roy 2001). Des Weiteren ergaben elektronenmikroskopische Aufnahmen, dass DotA eine hohle Ringstruktur aufweist und damit als Bestandteil von Poren oder Membrankanälen fungieren könnte (Nagai und Roy 2001). IcmX ist im Periplasma der Bakterien lokalisiert und wird (wie DotA) von flüssigkulturgezogenen Bakterien in Kulturüberstände sezerniert. Die Prozessierung des DotA, wie auch des IcmX Proteins in eukaryotischen Wirtszellen konnte allerdings noch nicht gezeigt werden (Matthews und Roy 2000, Nagai und Roy 2001). RalF hingegen, ein ARF/GTPase Austauschfaktor, wird über den Dot/Icm Sekretionsapparat in Wirtszellen sezerniert und ist essentiell für die Lokalisierung von ARF1 auf den Phagosomen, einem GTP bindenden Protein, welches den Transport zwischen ER und Golgi-Apparat steuert (Nagai et al. 2002). Phagosomen, die *dot/icm* Mutanten enthalten, sind nicht mit ARF1 assoziiert (Kagan und Roy, 2002). LidA (*lid* = lowered viability in the presence of *dot*) wird in Dot/Icm-abhängiger Art und Weise durch die phagosomale Membran transloziert (Conover et al. 2003). Es fungiert dabei wahrscheinlich als „coupling protein“ (Cabezon et al. 1997) und erleichtert möglicherweise die Sezernierung von Effektormolekülen durch den Dot/Icm Sekretionsapparat in Wirtszellen. Gestützt wird diese These dadurch, dass LidA membranassoziierten nukleotidbindenden Proteinen der TraG Familie sehr ähnlich ist (Conover et al. 2003), welche mit den zu sezernierenden Effektormolekülen derart interagieren, indem sie die Effektormoleküle rekrutieren und sie dem Sekretionsapparat zuführen.

Um ihre Wirtszellen wieder verlassen zu können, bilden intrazelluläre *Legionella*-Bakterien mit intaktem Dot/Icm Typ IV Sekretionssystem ein porenbildendes Toxin, welches zur Cytolyse der Wirtszelle führt (Byrne und Swanson 1998, Alli et al. 2000). Mutanten, die nicht zur Toxinbildung befähigt sind, sind zwar in der Lage, intrazellulär zu replizieren, vermögen aber nicht, neue Wirtszellen zu infizieren (Alli et al. 2000, Molmeret 2002). Während die Zytotoxizität erst am Ende eines Infektionszyklusses zum Tragen kommt, ist die

Induktion der Apoptose ein Prozess der frühen Infektionsstadien (Alli et al. 2000, Zink et al. 2002). Auch hierbei spielt der Dot/Icm Sekretionsapparat eine wichtige Rolle, da diverse *dot/icm* Mutanten nicht in der Lage sind, Apoptose zu induzieren (Zink et al. 2002). Molmeret et al. (2004) haben im Rahmen der Apoptoseinduktion die Aktivierung von Caspase 3 in Abhängigkeit von IcmS, IcmR und IcmQ beschrieben. Neumeister et al. (2002) konnten den Mechanismus der Apoptoseinduktion durch Legionellen über den mitochondrialen Aktivierungsweg ausarbeiten.

1.5 Bimorpher Lebenszyklus von *Legionella pneumophila*

Legionelleninfektionen sind gekennzeichnet durch intrazelluläres Wachstum der Bakterien und extrazelluläre Zwischenstadien, in denen die Bakterien neue Wirtszellen infizieren. Während intra- und extrazellulären Wachstumsphasen weisen Legionellen unterschiedliche Eigenschaften auf und lassen sich in replikative (intrazelluläre) und transmissive (extrazelluläre) Formen einteilen. Während der intrazellulären Vermehrung wechselt *L. pneumophila* durchgängig die morphologische Erscheinung von anfänglichen replikativen Formen zu sogenannten MIFs (mature intracellular forms) später Infektionsstadien. Dieser morphologische Switch geht einher mit mannigfaltigen Änderungen des Erscheinungsbildes der Membranen, einer gesteigerten Synthese von Hsp60 und resultiert in einer zehnfachen Steigerung der Infektiosität, d. h. erhöhter Resistenz gegenüber Antibiotika, Detergenzien und der Änderung des pH-Wertes (Garduño et al. 2002). Der Übergang von der exponentiellen in die post-exponentielle Wachstumsphase, wie auch die Limitierung von Nährstoffen löst den Übergang von replikativen zu transmissiven, virulenten Bakterien aus, welche zytotoxisch, beweglich, stressresistent und natriumsensitiv sind (Byrne und Swanson et al. 1998). Zu diesem Zeitpunkt führt die initiale Bildung und Akkumulation von ppGpp zur „stringent response“ (Cashel et al. 1996) und löst

eine regulatorische Kaskade aus, die zur vollen Ausbildung der genannten Virulenzfaktoren führt, bei der intrazellulären Vermehrung jedoch keine Rolle spielt (Hammer und Swanson 1999, Bachman und Swanson 2001, Hammer et al. 2002). Die Konstituenten dieser Kaskade sind LetA/LetS, ein Zweikomponentenregulator, RpoS und FliA, zwei σ -Faktoren und *letE*, ein neu identifizierter Genlokus (Hammer et al. 2002). Die Expression von CsrA, welches ebenfalls wesentlich am Switch von replikativen zu virulenten Bakterienformen beteiligt ist, wird wiederum reziprok von LetA/S gesteuert, indem CsrA kurz nach Phagozytose und während der replikativen Phase von LetA/S reprimiert und erst am Ende der post-exponentiellen Phase wieder aktiviert wird (Molofsky und Swanson 2003).

1.6 Phagosomenreifung/Intrazelluläre Pathogene

Gelangen Fremdpartikel, wie beispielsweise Mikroorganismen, in den menschlichen Organismus, werden sie in Phagosomen aufgenommen. Diese fusionieren nachfolgend mit Endo- und Lysosomen, ein Prozess, der auch als Phagosomenreifung bezeichnet wird und dem enzymatischen Abbau internalisierter Fremdpartikel dient. Dies beinhaltet auch die Ansäuerung der Phagosomen, da lysosomale Enzyme erst bei niedrigen pH-Werten (pH 4,5-5,5) voll aktiv sind. Phagosomenmembranen weisen zu verschiedenen Zeitpunkten nur bestimmte Markerproteine auf. Dies gewährleistet den zeitlich streng konzertierten Ablauf von Fusionsprozessen zwischen Phago-, Endo- und Lysosomen und lässt gleichzeitig auf den „Reifungsgrad“ der Phagosomen schließen. Die wichtigsten Markerproteine sind rab5 und der Transferrinrezeptor (TfR) als Marker früher Endosomen und rab7, Mannose-6-phosphatrezeptor, Cathepsin D, LAMP-1 (*lysosome associated membrane protein 1*) und die vakuoläre H⁺-ATPase als späte endosomale bzw. lysosomale Marker. Bestimmte intrazelluläre Pathogene allerdings umgehen die Ansäuerung ihrer

Phagosomen, wie auch den beschriebenen Abbauprozess und sind deshalb befähigt, in Zellen des Organismus zu persistieren und zu replizieren. Dabei präsentieren sie nur bestimmte Markerproteine auf ihren Phagosomen und unterbinden demzufolge die Phagosomenreifung zu bestimmten, für sie charakteristischen, Zeitpunkten. Die Charakterisierung *Mycobacterium bovis* BCG enthaltender Phagosomen verdeutlichte, dass diese zwar den endosomalen Marker rab5 aufwiesen (Via et al. 1997), allerdings nicht mit Lysosomen fusionierten (Hasan et al. 1997, Via et al. 1997) und darüber hinaus das v-SNARE Protein Cellubrevin degradierten (Fratti et al. 2002). Für isolierte *Salmonella typhimurium*-Phagosomen konnte demonstriert werden, dass sie die Markerproteine LAMP-1 und zu 40% Cathepsin-D aufwiesen und nicht lysosomal zerstört wurden, wohingegen isolierte *Yersinia pseudotuberculosis*-Phagosomen Cathepsin-D und Cathepsin-L als Markerproteine aufwiesen und einer lysosomalen Degradation unterworfen waren (Mills und Finlay 1998). Isolierte *Afipia felis* enthaltende Phagosomen waren weder mit frühen endosomalen Markern, wie EEA1 (early endosome antigen 1), rab5, TfR und TACO (tryptophane aspartate containing protein) assoziiert, noch mit späten endosomalen oder lysosomalen Markern, wie Cathepsin-D, β -Glucuronidase, v-ATPase, rab7, Mannose-6-phosphatrezeptor, VAMP-8 (vesicle-associated membrane protein 8), LAMP-1 und LAMP-2 (Lührmann et al. 2001).

Das Phagosom von *L. pneumophila* weist kein rab5 und auch nur geringe Mengen an rab7 auf (Clemens et al.; 2000a, 2000b), LAMP-1 und Cathepsin-D lassen sich allerdings zu späten Zeitpunkten (~16-20 h) auf diesen Phagosomen nachweisen (Sturgill-Koszycki und Swanson 2000). 18-20 h nach Infektion sind circa 50% der *L. pneumophila*- Phagosomen mit Lysosomen verschmolzen, was in Einklang mit einer Ansäuerung auf einen pH-Wert von ~5,6 steht (Horwitz und Maxfield 1984, Sturgill-Koszycki und Swanson 2000). Bis jetzt sind die Mechanismen der ausbleibenden frühen Ansäuerung unklar, über eine Blockierung der vakuolären H⁺-ATPase und die Neutralisierung des intraphagosomalen Milieus wird aber diskutiert (Roy und Tilney 2002). Durch den Besitz zweier Katalase-Peroxidasen unterbindet *L. pneumophila* auch den

„oxidative burst“ und gewährleistet somit die Bildung des replikativen Phagosoms und damit das intrazelluläre Überleben (Bandyopadhyay, et al. 2003). Ein durchgängiges Phänomen ist die Tatsache, dass das replikative *L. pneumophila*-Phagosom im Laufe einer Infektion sowohl mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER) als auch mit Ribosomen assoziiert ist und die anfängliche phagosomale Plasmamembran in eine ER-Membran umgewandelt wird (Katz und Hashemi 1982, Horwitz 1983, Swanson und Isberg 1993, Tilney et al. 2001). Des Weiteren weist das Phagosom auch Markerproteine des ER auf (Abu-Kwaik 1996, Swanson und Isberg 1995, Swanson et al. 1996, Kagan und Roy 2002) und könnte als Autophagosom angesehen werden (Swanson und Isberg 1993, Dorn et al. 2002). Das Einschlagen des autophagischen Weges ist wahrscheinlich als Schlüsselmechanismus für das Überleben von *L. pneumophila* anzusehen, da Peptide als einzige verwertbare Kohlenstoff- und Energiequelle nur innerhalb des autophagosomalen Weges prozessiert werden (Dorn et al. 2002).

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Legionellen sind bedeutsame Pneumonieerreger, die befähigt sind, sich nach inhalativer Infektion unter Ausbildung spezieller Phagosomen, welche mit endoplasmatischem Retikulum und Ribosomen assoziiert sind, intrazellulär in Alveolarmakrophagen zu vermehren. Die Mechanismen der Phagosomenbildung, wie auch die der intrazellulären Replikation, die beide als Grundlage für die Virulenz dieser Organismen anzusehen sind, sind nur in Ansätzen charakterisiert. Obwohl bereits eine Vielzahl an Virulenzfaktoren beschrieben wurde, konnte bislang keinem dieser Faktoren eine dominante Bedeutung beigemessen werden. Schon lange Zeit wird aber diskutiert, ob das LPS von *L. pneumophila* Sg 1 während einer Infektion als wichtiges Effektormolekül anzusehen sein könnte, da es sich aufgrund seiner chemischen

Struktur deutlich von den Lipopolysacchariden anderer gram-negativer Bakterien unterscheidet und keine klassische Endotoxinkapazität aufweist. Gestützt wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass *L. pneumophila* Sg 1 als Haupterreger der Legionellose die immundominante Spezies darstellt. Denkbar wäre die Interaktion mit Phagosomenmembranen und gegebenenfalls die Translozierung des LPS in zytoplasmatische Kompartimente der Wirtszellen, da der ungewöhnlich hohe Anteil an Fettsäuren und die enorme Hydrophobizität grundlegende Voraussetzungen dafür darstellen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte deshalb eingangs mittels Immunogold-Markierungen und Elektronenmikroskopie geklärt werden, ob das LPS von *L. pneumophila* intrazellulär gesheddet und in intraphagosomale bzw. zytoplasmatische Kompartimente der Wirtszellen propagiert wird. Im Falle intrazellulären Sheddings sollten RT-PCR Analysen Aufschluss darüber geben, ob die LPS-Biosynthese einer intrazellulären Regulation unterliegt. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war es, die zeitlichen Abläufe, denen die Assoziation der Phagosomen mit endoplasmatischem Retikulum und Ribosomen unterliegt, aufzuzeigen.

Kapitel 2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

MM6-Zellen, wie auch Legionellen, wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Soweit es nicht anders angegeben ist, wurden MM6-Zellen für zehn Minuten bei 400 x g zentrifugiert, Legionellen für 15 Minuten bei 3000 x g.

2.1.1 Anzucht und Stammhaltung von *L. pneumophila*

L. pneumophila Sg 1 Substamm Philadelphia, ein Vertreter der humanpathogenen Spezies, wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. Barry Fields* zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um ein Patientenisolat, welches weniger als drei Mal über Agar passagiert und anschließend in lysiertem Pferdeblut bei -70°C gelagert wurde. Für die Versuche wurden eingefrorene Proben aufgetaut und auf BCYE α -Agar über Nacht inkubiert. Anschließend wurde eine Impföse der angewachsenen Bakterien abgenommen, auf neuen Agar übertragen und für weitere drei bis vier Tage bebrütet. Die Weiterpassagierung der Reinkulturen erfolgte im Abstand von jeweils sieben Tagen. Als Sterilkontrolle diente bei allen Passagen eine Subkultur auf Columbia-Blutagar.

* Dr. Barry Fields, Legionella Laboratory; Respiratory Disease Lab Section, Division of Bacterial and Mycotic Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, GA 30333

2.1.2 Kultivierung der Mono Mac 6 (MM6)-Zellen

MM6-Zellen wurden aus Tumorzellen einer chronischen myeloischen Leukämie (CML) als Zelllinie etabliert (Ziegler-Heitbrock et al. 1988). Sie weisen Eigenschaften reifzelliger Monozyten auf und erfüllen sämtliche Funktionen humaner Blutmonozyten, wie Phagozytose, Synthese reaktiver Sauerstoffmetabolite, Esterase- und Lysozymproduktion und die Expression typischer Zelloberflächenmarker, wie CD14 (cluster of differentiation), CD11, MHC-Klasse-II-Antigene (major histocompatibility complex) und F_c-Rezeptoren. MM6-Zellen wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Ziegler-Heitbrock* zur Verfügung gestellt. Sie wurden in Kulturmedium als Suspensionskultur gezüchtet und zwei Mal pro Woche gesplittet. Lichtmikroskopische Untersuchungen dienten der Vitalitätsprüfung der Zellen, Subkulturen bei allen Passagen auf Columbia-Blutagar als Sterilkontrollen.

* Prof. Dr. Ziegler-Heitbrock, Universität Leicester, England

Kulturmedium: 500 ml RPMI 1640 mit Zusätzen folgender Endkonzentrationen: 10% FCS, 1% L-Glutamin, 1% nicht-essentielle Aminosäuren, 1% OPI-Lösung (1 mM Oxalacetat, 1 mM Pyruvat, 9 µg/ml Insulin)

2.2 Infektion der MM6-Zellen

Das Infektionsverhältnis zwischen MM6-Zellen und Legionellen betrug je nach Versuchsansatz 1:100, 1:10 oder 1:1. Als Zeitpunkt T=0 wurde die Vereinigung von MM6-Zellen und Bakterien definiert.

2.2.1 Herstellung der MM6-Suspension

MM6-Zellen wurden zentrifugiert und in RPMI 1640 resuspendiert. Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte mit Trypanblau, d. h. die MM6-Zellsuspension wurde mit RPMI 1640 1:10 verdünnt, anschließend im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau-Lösung versetzt und für 4 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Auszählung der vier Eckquadrate einer Neubauer-Zählkammer und unter Miteinbeziehung aller Verdünnungsstufen erfolgte die Berechnung der Gesamtzellzahl. Die benötigte Menge an MM6-Zellen wurde zentrifugiert und in Infektionsmedium resuspendiert.

Infektionsmedium: 500 ml RPMI 1640 mit Zusätzen folgender Endkonzentrationen: 1% L-Glutamin, 1% nicht-essentielle Aminosäuren, 1% OPI-Lösung (1 mM Oxalacetat, 1 mM Pyruvat, 9 µg/ml Insulin)

2.2.2 Herstellung der Legionellensuspension

Es wurden so viel Bakterien in RPMI 1640 suspendiert, dass die optische Dichte bei 578 nm (OD₅₇₈) 0,2 betrug, wobei der Nullabgleich gegen RPMI 1640 erfolgte. Bei dieser Extinktion enthält die Suspension circa 3×10^8 kolonienbildende Einheiten pro Milliliter (KbE/ml). Die benötigte Menge an Bakteriensuspension wurde zentrifugiert und in Infektionsmedium resuspendiert.

Infektionsmedium: 500 ml RPMI 1640 mit Zusätzen folgender Endkonzentrationen: 1% L-Glutamin, 1% nicht-essentielle Aminosäuren, 1% OPI-Lösung (1 mM Oxalacetat, 1 mM Pyruvat, 9 µg/ml Insulin)

2.2.3 Durchführung der Infektion

Die in Infektionsmedium suspendierten MM6- und Bakterienpellets wurden vereinigt und in die Vertiefung einer 6-Loch-Platte pipettiert, für zwei Stunden inkubiert, mit Gentamicin (Endkonzentration 75 µg/ml) versetzt und nochmals eine Stunde inkubiert. Danach wurde der Inhalt der 6-Loch-Platte drei mal mit RPMI 1640 gewaschen, in frischem Infektionsmedium resuspendiert und je nach Versuchsdauer weiter inkubiert.

2.2.4 Ermittlung der Lebendkeimzahl von *L. pneumophila*

Die Ermittlung der Lebendkeimzahl in den Versuchsreihen erfolgte in vier voneinander unabhängigen Doppelbestimmungen (0 h, 24 h, 48 h, 72 h). Zuerst wurden infizierte MM6-Zellen zentrifugiert, wobei der Überstand aufbewahrt und das Pellet durch Zugabe von 1 ml H₂O lysiert wurde, um intrazelluläre Bakterien aus den Wirtszellen freizusetzen. Anschließend wurde die Suspension für 5 min in ein Ultraschallbad gestellt, um eine komplette Lyse der Wirtszellen zu gewährleisten. Nach Vereinigung von aufbewahrtem Überstand mit Sonikat wurde eine dezimale Verdünnungsreihe erstellt und von den geeigneten Verdünnungsstufen mittels eines Spiralplaters jeweils 50 µl auf BCYE α -Agar ausplattiert. Nach abgeschlossener Inkubation wurden die kolonienbildenden Einheiten (KbE) ausgezählt. Deren Anzahl wurde mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert und so die Lebendkeimzahl ermittelt. Die Angabe erfolgt als KbE pro Milliliter (KbE/ml). Zur Ermittlung extrazellulär vorliegender Legionellen wurden infizierte MM6-Zellen zentrifugiert und 50 µl des Überstandes auf BCYE α -Agar plattiert.

2.3 γ -Bestrahlung von *Legionella*-Bakterien

Bakterien wurden in RPMI 1640 suspendiert und in einer Strahlungskammer (STS, Straubenhardt) einer Dosis von 500 Gy ausgesetzt. Nach Zentrifugation wurden die bestrahlten Bakterien in Infektionsmedium resuspendiert und, wie unter Punkt 2.2.3 beschrieben, zur Infektion eingesetzt. Als Kontrolle wurden 50 μ l der Suspension auf BCYE α -Agar ausplattiert.

2.4 Immunogoldmarkierung von *L. pneumophila*

Es wurden so viel Bakterien in 25 ml PBS/FCS (1%) suspendiert, dass die optische Dichte bei 578 nm (OD_{578}) 0,2 betrug. Der Nullabgleich erfolgte gegen PBS/FCS. Die benötigte Menge an Bakterien wurde zentrifugiert und in 100 μ l PBS/FCS resuspendiert. Zur Markierung agarpassasierter Legionellen wurde mit einer Impföse eine kleine Menge an Bakterienkolonien vom Agar abgenommen und direkt in 100 μ l PBS/FCS suspendiert. Die Bakteriensuspension wurde zuerst mit den Primärantikörpern (anti-LPS bzw. anti-Calnexin) und anschließend mit den Sekundärantikörpern gemischt, unter leichtem Schütteln inkubiert (45 Minuten bei 37°C) und zwei Mal mit PBS/FCS gewaschen. Nachfolgend wurden die markierten Legionellen in Infektionsmedium suspendiert und für die Infektion, wie unter Punkt 2.2.3 beschrieben, verwendet. Auch das Pellet isolierter intrazellulärer Legionellen (siehe Punkt 2.5.1) wurde in 100 μ l PBS/FCS resuspendiert und wie oben beschrieben immunogoldmarkiert.

Infektionsmedium: 500 ml RPMI 1640 mit Zusätzen folgender Endkonzentrationen: 1% L-Glutamin, 1% nicht-essentielle Aminosäuren, 1% OPI-Lösung (1 mM Oxalacetat, 1 mM Pyruvat, 9 μ g/ml Insulin) **Primärantikörper:** Mouse anti-Lp46 (Biotrend, Köln), Rabbit anti-Calnexin (Stressgen, Victoria, CAN), beide Antikörper 1:5 in PBS + FCS (1%) **Sekundärantikörper:** Goat anti-Mouse (British Bio Cell International, Cardiff, UK), 10 nm Goldkonjugat, Goat anti-

Rabbit (British Bio Cell International, Cardiff, UK), 5 nm Goldkonjugat, beide Antikörper 1:5 in PBS + FCS (1%)

2.5 Isolation intrazellulärer *Legionella*-Bakterien

2.5.1 Isolation für Immunogoldmarkierungen

Infizierte MM6-Zellen wurden nach fünf, sechs, zwölf und 24 Stunden zentrifugiert und das Pellet durch Zugabe von 1 ml H₂O lysiert. Daran schloss sich die mechanische Lyse der Zellen an, d. h. die Zellsuspension wurde sechs Mal durch eine 27G-Kanüle aufgezogen und wieder ausgestoßen. Das grobe Lysat wurde durch differentielle Zentrifugation (600 x g, 10 min) von groben Bestandteilen, wie beispielsweise größeren Zellfragmenten oder Zellkernen, befreit. Der Überstand wurde erneut zentrifugiert (3000 x g, 15 min) und das Pellet, bestehend aus Legionellen und kleineren assoziierten MM6-Zellfragmenten, wie unter Abschnitt 2.4 beschrieben, immunogoldmarkiert.

2.5.2 Isolation zur Reinfektion von MM6-Zellen

Infizierte MM6-Zellen wurden nach circa 4 h bzw. 24 h zentrifugiert und das Pellet durch Zugabe von 6 ml H₂O lysiert. Daran schloss sich die mechanische Lyse der Zellen an, d. h. die Zellsuspension wurde acht Mal durch eine 27G-Kanüle aufgezogen und wieder ausgestoßen. Das grobe Lysat wurde durch differentielle Zentrifugation (600 x g, 10 min) von groben Bestandteilen, wie beispielsweise größeren Zellfragmenten oder Zellkernen, befreit. Der Überstand wurde erneut zentrifugiert (3000 x g, 15 min) und das Pellet, bestehend aus Legionellen und kleineren assoziierten MM6-Zellfragmenten, wie unter Abschnitt 2.2.3 beschrieben, zur erneuten Infektion von MM6-Zellen verwendet.

Hierbei wurde ein Infektionsverhältnis zwischen MM6-Zellen und Bakterien von etwa 1:1 bzw. 1:10 gewählt.

2.6 Hemmung der Proteaseaktivität der MM6-Zellen

Protease Inhibitor Cocktail P1860 (Sigma, München) wurde im Verhältnis 1:800 Kultur- und Infektionsmedium zugesetzt. MM6-Zellen wurden 1 h in derart vorbereitetem Kulturmedium präinkubiert, bevor sie für weitere 2 h mit Legionellen koinkubiert wurden. Nach Zugabe von Gentamicin und mehrmaligem Waschen wurden infizierte MM6-Zellen in frischem Infektionsmedium ohne Inhibitor resuspendiert und inkubiert.

2.7 Elektronenmikroskopie

2.7.1 Einbettung der Zellen in Araldit

Nach Zentrifugation (5 min, 200 x g) wurde das Zellpellet mit Glutaraldehyd in HMSS-Puffer fixiert (2 h bei 4°C). Anschließend erfolgte die Behandlung des Pellets mit Osmiumtetroxid (45 min auf Eis), gefolgt von gründlichem Waschen mit Cacodylatpuffer. Nach Überführung des Pellets in Agarose (2%) wurde dieses in kleine Würfel zerteilt, woran sich die Behandlung mit Tanninsäure anschloss (15 min bei Raumtemperatur). Nach gründlichem Waschen mit Cacodylatpuffer wurden die Würfel durch die Einwirkung von 50% und 70% Ethanol (jeweils 30 min bei Raumtemperatur) vorentwässert. Nach der Behandlung mit Uranylacetat (60 min bei Raumtemperatur) erfolgte die vollständige Entwässerung der Pelletwürfel mit 80%, 90% und 96% Ethanol (jeweils 30 min bei Raumtemperatur), mit absolutem Ethanol (zwei Mal 30 min bei Raumtemperatur) und mit Propylenoxid (zwei Mal 20 min bei

Raumtemperatur). Die vollständig entwässerten Stückchen wurden anschließend in Mischungen (1:1 und 1:3) aus Propylenoxid und Araldit und in pures Araldit gegeben (jeweils 1 h bei Raumtemperatur). Im letzten Schritt wurden die Proben in Einbettformen (EMS, Fort Washington, USA) gegeben, mit purem Araldit überschichtet und auspolymerisiert (2 d bei 60°C).

HMSS-Puffer: 137mM NaCl, 3,3mM KCl, 5,5mM Glucose, 0,05mM Phenolrot, 100mM HEPES, 1mM CaCl₂ x 2 H₂O, 1mM MgCl₂ x 6 H₂O, pH 7,4; **Glutaraldehyd:** 2,5 % Glutaraldehyd (Paesel + Lorei, Hanau) in HMSS-Puffer; **Osmiumtetroxid:** 1 % (w/v) OsO₄ (Paesel + Lorei, Hanau) in Cacodylatpuffer; **Cacodylatpuffer:** 100mM Natrium-Cacodylat in Aqua dest., pH 7,4; **Tanninsäure:** 0,1% Tanninsäure (EMS, Fort Washington, USA) in Cacodylatpuffer; **Uranylacetat:** 2% (w/v) Uranylacetat (EMS, Fort Washington, USA) in 70% Ethanol; **Araldit:** 46,5% (w/w) Araldit CY 212 (Serva, Heidelberg), 50,7% (w/w) Araldit Härter HY 964 (Serva, Heidelberg), 6,5% (w/w) Araldit Beschleuniger DY 964 (Serva, Heidelberg)

2.7.2 Einbettung der Zellen in Unicryl und Lowicryl K4M

Nach Zentrifugation (5 min, 200 x g) wurde das Zellpellet mit Formaldehyd in Phosphatpuffer fixiert (2 h bei 4°C). Nach Überführung des Pellets in Agarose (2%) wurde es in kleine Würfel zerteilt und diese in Phosphatpuffer gegeben. Die Entwässerung der Proben erfolgte in einer Tieftemperatur-Einbettkammer (Bal-Tec, Witten) wie folgt: 30% Methanol (30 min bei 0°C), 50% Methanol (30 min bei -20°C), 70%, 95% und 100% Methanol (jeweils 30 min bei -35°C). Die vollständig entwässerten Stückchen wurden anschließend in Mischungen (1:1 und 1:3) aus trockenem Methanol und Unicryl (British Bio Cell International, Cardiff, UK) bzw. Lowicryl K4M gegeben (jeweils 2 h bei -35°C). Anschließend wurden die Proben zuerst für eine Stunde und nachfolgend über Nacht in pures Unicryl bzw. Lowicryl K4M (-35°C) gegeben. Im letzten Schritt wurden die Proben in Gelatine kapseln (EMS, Fort Washington, USA) gegeben, mit purem Unicryl bzw. Lowicryl K4M überschichtet und unter UV-Licht bei -20°C auspolymerisiert.

Phosphatpuffer: 0,08M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,02M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, pH 7,2-7,3;
Formaldehyd: 2% Formaldehyd in Phosphatpuffer; **Lowicryl K4M:** 0,09% (w/w) Crosslinker (EMS, Fort Washington, USA), 0,58% (w/w) Monomer (EMS, Fort Washington, USA), 0,33% (w/w) Initiator (EMS, Fort Washington, USA)

2.7.3 Anfertigung der Semi- und Ultradünnschnitte

Mit Hilfe von Glasmessern (selbst hergestellt mit einem 7800 Knifemaker, LKB Bromma, Schweden) wurden an einem Ultramikrotom (OmU3, Reichert, Wien, Österreich) circa 500 nm dicke Semidünnschnitte angefertigt. Diese wurden auf Objektträger gebracht, bei 80°C getrocknet, mit Richardson-Lösung gefärbt, erneut getrocknet und lichtmikroskopisch ausgewertet. Mit Hilfe eines Diamantmessers (Drukker, Cuijk, Niederlande) wurden circa 60 nm dicke Ultradünnschnitte angefertigt. Ultradünnschnitte von in Araldit eingebetteten Proben wurden auf pioloformbeschichtete Kupfernetzchen (200 mesh grids, Storck Veco B. V., Eerbeek, Niederlande) gebracht, wohingegen Ultradünnschnitte von in Unicryl bzw. Lowicryl K4M eingebetteten Proben auf pioloformbeschichtete Nickelnetzchen (200 mesh grids, Storck Veco B. V., Eerbeek, Niederlande) gebracht wurden. Ultradünnschnitte auf Kupfernetzchen wurden nachfolgend mit Bleicitrat kontrastiert und an einem Elektronenmikroskop (EM 902 A, Zeiss, Jena) untersucht, Ultradünnschnitte auf Nickelnetzchen wurden für Immunogoldmarkierungen (siehe Punkt 2.8) verwendet. Die Bilder der elektronenmikroskopischer Untersuchungen wurden gescannt (hp scanjet 4400c) und digital nachbearbeitet (Adobe Photoshop 5.5).

Richardson-Färbelösung: 1% (w/v) Iodsäure, 1% (w/v) Azur II, 1% (w/v) Methylenblau, 4% (w/v) Natrium-Tetraborat; **Bleicitrat-Lösung:** Lösung A: 4,4% (w/v) Blei-(II)-nitrat, 5,9% (w/v) tri-Natriumcitrat-Dihydrat; Lösung B: 40% (v/v) 1N NaOH; Lösung A und B im Verhältnis 3:2 mischen

2.8 Immunogoldmarkierung am Ultradünnschnitt

Die Nickelnetzchen wurden mit der Seite, auf der die Ultradünnschnitte lagen, nach unten auf Tropfen folgender Reihenfolge gelegt. TBS (30 min), Blockpuffer (drei Mal 5 min), Primärantikörper (1:50) in Inkubationspuffer (über Nacht, 4°C), TBS (fünf Mal 5 min), Blockpuffer (drei Mal 5 min), Sekundärantikörper (1:20) in Inkubationspuffer (1 h, 4°C), TBS (fünf Mal 5 min), Uranylacetat (ein Mal 10 min), H₂O (zehn Mal 1 min). Die markierten Schnitte wurden nachfolgend mit Bleicitrat kontrastiert und an einem Elektronenmikroskop (EM 902 A, Zeiss, Jena) untersucht. Die Bilder der elektronenmikroskopischer Untersuchungen wurden gescannt (hp scanjet 4400c) und digital nachbearbeitet (Adobe Photoshop 5.5).

TBS: 0,02M Tris-HCl, 0,15M NaCl, 1% Tween-20, pH 7,6; **Blockpuffer:** TBS mit Zusatz von 0,2 BSA (Sigma, München) und 1% Tween-20; **Primärantikörper:** Mouse anti-Lp46 (Biotrend, Köln); **Sekundärantikörper:** Goat anti-Mouse (British Bio Cell International, Cardiff, UK), 10 nm Goldkonjugat; **Inkubationspuffer:** TBS mit Zusatz von 1% Tween-20; **Uranylacetat:** 1% (w/v) Uranylacetat (EMS, Fort Washington, USA) in H₂O

2.9 Untersuchung der LPS-Biosynthese auf RNA-Ebene

2.9.1 Beschichtung von Dynabeads

Dynabeads[®] M-280 Sheep anti-Mouse IgG (DynaL, Oslo, Norwegen) wurden in PBS/BSA (0,1%) gewaschen, mit Mouse anti-Lp46 Antikörpern (Biotrend, Köln) unter leichtem Schütteln inkubiert (30 min bei 4°C) und erneut mit PBS/BSA gewaschen. Dabei wurde eine Antikörperkonzentration von 1 µg je 1 x 10⁷ Dynabeads gewählt.

2.9.2 Isolierung intrazellulärer Legionellen

MM6-Zellen wurden mit *L. pneumophila* Sg 1 infiziert. Proben für die RNA-Isolierung wurden ab der ersten Stunde nach Infektion in 120 minütigen Abständen aufgearbeitet. Hierzu wurden infizierte MM6-Zellen zentrifugiert (5 min bei 400 x g) und mittels Spritze und 27G-Kanüle lysiert. Das Lysat wurde in PBS/BSA (0,1%) suspendiert und mit beschichteten Dynabeads unter leichtem Schütteln inkubiert (30 min bei 4 °C). Die Menge an Immunobeads richtete sich nach der intrazellulären Wachstumsrate der Bakterien und wurde so gewählt, dass circa zwei Beads an einem Bakterium hafteten. Die Isolierung der mit Legionellen behafteten Dynabeads erfolgte mittels eines Magneten (DynaL, Oslo, Norwegen). Nach dreimaligem Waschen der Dynabeads schloss sich umgehend die Isolation der bakteriellen RNA, wie unter Punkt 2.8.3 beschrieben, an.

2.9.3 Flüssigkulturen von *L. pneumophila*

30 ml BYE-Bouillon wurden mit einer kleinen Menge an Bakterien-Inokulum angeimpft und bei 37°C und bei 220 Umdrehungen pro Minute in einem Schüttelinkubator als Übernachtskultur angezogen. 30 ml frisches Medium wurden am nächsten Tag mit der Übernachtskultur auf eine $OD_{578} = 0,02$ eingestellt und nachfolgend inkubiert wie oben beschrieben. Zu definierten Zeitpunkten erfolgte die Messung der optischen Dichte wie auch die Zentrifugation von Bakterien für die unmittelbar nachfolgende, unter Punkt 2.8.3 beschriebene, RNA-Präparation.

BYE-Bouillon: 1% wässriger Hefe-Extrakt (450 ml). Sterile Zugabe von 50 ml Supplement nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums auf 60°C.

2.9.4 Präparation totaler Bakterien-RNA

Dem nahezu trocken pipettierten Dynabeads-Bakterien Konjugat bzw. Bakterienpellet wurde ein Milliliter Trifast (Peqlab, Erlangen) zugegeben. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten nach dem RNA Extraktionsprotokoll des Herstellers (Peqlab, Erlangen). Die präparierte RNA wurde in RNase freiem Wasser resuspendiert und nach photometrischer Konzentrationsbestimmung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.9.5 Primer Design

Spezifische, für verschiedene Enzyme der LPS-Biosynthese codierende Gensequenzen von *L. pneumophila* Substamm Philadelphia (Referenznummer AJ007311) wurden als Vorlage für folgende spezifische Oligonukleotide, hergestellt von Thermo Electron Corporation, Ulm, verwendet:

▪ ORF 4 (592 bp Fragment; ABC Transporter des O-Antigens):

Vorwärts: 5'- ACT ACT ACA ACC GCA GCA GA -3'

Rückwärts: 5'- CAC CTA CCG CTA ACA CTT CA -3'

▪ ORF 5 (503 bp Fragment; ABC Transporter des O-Antigens):

Vorwärts: 5'- GCT GCC TAC TGT CAT GTT CT -3'

Rückwärts: 5'- TAG TAG GTG ATG GCC AAT GC -3'

▪ ORF 8 (618 bp Fragment; Methyltransferase):

Vorwärts: 5'- GTC AAC TGT CGC GCA ATA -3'

Rückwärts: 5'- ACG TCT TCA CGC TGA TTC -3'

▪ ORF 9 (773 bp Fragment; Homolog zu ORF 24):

Vorwärts: 5'- TCA GGA TCT TGG CAT AGC -3'

Rückwärts: 5'- GAT CTC GCA TTG GTT GAC -3'

▪ ORF 22 (617 bp Fragment; mögliche Acetyltransferase):

Vorwärts: 5'- CAA TCA CAG TGC CGT TGT GG -3'

Rückwärts: 5'- CAC CGA TAT GAG GCG AGG AA -3'

▪ ORF 23 (668 bp Fragment; N-Acylglucosamin-2-epimerase):

Vorwärts: 5'- CTC GTG CCG ATT ATG GAC TG -3'

Rückwärts: 5'- TGT AGC GAG TGC TGC CTG AA -3'

▪ ORF 24 (632 bp Fragment; N-Acetylneuraminsäure kondensierendes Enzym):

Vorwärts: 5'- AGT CAG GAG CTG ATG CAG TA -3'

Rückwärts: 5'- ATG ATC TGG ACC AGG AAG AG -3'

▪ ORF 25 (479 bp Fragment; CMP-N-Acetylneuraminsäuresynthase):

Vorwärts: 5'- TAG CAG ACG TCG CCG TTC AA -3'

Rückwärts: 5'- TGG CGT ATC GAT GTC GAT GG -3'

2.9.6 RT-PCR

RT-PCR Analysen erfolgten mit dem „Platinum[®] Quantitative RT-PCR ThermoScript One-Step System“ (Invitrogen, Karlsruhe) nach dem Protokoll des Herstellers. Ein interner Standard konnte bei den Analysen nicht mitgeführt werden, da Housekeeping Gene für *L. pneumophila* bislang nicht identifiziert werden konnten. Für jede Reaktion wurde deshalb die gleiche Menge an RNA-Vorlage (400 ng/ml) eingesetzt. Diese Menge wurde unter Miteinbeziehung des Verdünnungsfaktors aus der photometrisch bestimmten RNA-Konzentration

(siehe Punkt 2.8.4) rechnerisch ermittelt. Tabelle 1 und 2 erläutern die für die verschiedenen ORFs gewählten PCR-Bedingungen.

Tabelle 1: PCR-Bedingungen für ORFs 4, 5, 22, 24 und 25

	ORF 4 und ORF 22	ORF 5, ORF 24 und ORF 25
1 Zyklus à	49°C; 30 min	50°C; 30 min
1 Zyklus à	94°C; 2 min	94°C; 3 min
10 Zyklen à	94°C; 30 s 48°C; 40s 72°C; 1 min	94°C; 30 s 49°C; 40s 72°C; 2 min
20 Zyklen à	94°C; 30 s 48°C; 40s 1 st 72°C; 1 min 20 th 72°C; 2 min 40 s	94°C; 30 s 49°C; 40s 1 st 72°C; 1 min 20 th 72°C; 2 min 40 s
Prolongation	72°C; 7 min	72°C; 7 min

Tabelle 2: PCR-Bedingungen für ORFs 8, 9 und 23

	ORF 8	ORF 9 und ORF 23
1 Zyklus à	48°C; 30 min	50°C; 30 min
1 Zyklus à	94°C; 2 min	94°C; 3 min
10 Zyklen à	94°C; 30 s 47°C; 40s 72°C; 1 min	94°C; 30 s 48°C; 40s 72°C; 2 min
20 Zyklen à	94°C; 30 s 47°C; 40s 1 st 72°C; 1 min 20 th 72°C; 2 min 40 s	94°C; 30 s 48°C; 40s 1 st 72°C; 2 min 20 th 72°C; 3 min 40 s
Prolongation	72°C; 7 min	72°C; 7 min

2.9.7 Elektrophorese

1000 bp Marker (Sigma, München) und jeweils 400 ng PCR-Produkt wurden auf Agarosegele (1,5%) (Roche, Mannheim) aufgetragen und bei 80 V aufgetrennt. Die Gele wurden in Ethidiumbromidlösung (0,01% Endkonzentration) (Sigma, München) gefärbt und unmittelbar danach in einem Lumi-Imager (raytest, Straubenhardt) ausgewertet.

2.10 Geräte

- Bandelin; Berlin ▪ Sonorex RK 102H
- Bender und Hobein; Zürich, CH ▪ Neubauer Zählkammer
- Forma Scientific Inc.; Ohio, USA..... ▪ Stericult Inkubator 200
- Heraeus;..... ▪ Brutschrank Hera cell
- Hettich; Tuttlingen ▪ Zentrifuge Universal 32
▪ Zentrifuge Rotixa/AP
- Holten; Allerød, DK ▪ Lamin Air
- IKA-Works, Inc.; Wilmington, USA ▪ Vortexer
- Peqlab; Erlangen..... ▪ Thermocycler Cyclone 25
- Pharmacia Biotech; Freiburg..... ▪ Ultrascope 2000
- Don Whitley Scientific Ltd; Shipley, GB..... ▪ Automatic Plater

2.11 Verbrauchsmaterialien

- Becton Dickinson; Heidelberg ▪ Bluecap-Röhrchen
- Costar; Corning Inc.; Bodenheim ▪ Zellkulturflaschen 75 cm²
▪ 24-Lochplatten
- Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH; Hamburg..... ▪ Reaktionsgefäße

- Greiner; Frickenhausen ▪ Einwegpipetten
 - 6-Lochplatten
- Millipore; Molsheim, F ▪ Sterilfilter
- Sarstedt; Nürnbrecht..... ▪ Küvetten

2.12 Medien

- Heipha; Heidelberg ▪ BCYE α -Agarplatten
 - Columbia-Blutagarplatten
 - Invitrogen; Karlsruhe..... ▪ RPMI 1640
 - PBS
 - FCS
 - L-Glutamin
 - nicht-essentielle Aminosäuren
 - Gewebekulturwasser
 - Oxoid; Wesel ▪ lysiertes Pferdeblut
 - Legionella Growth Supplement
 - Sigma; München..... ▪ OPI-Supplement
 - Trypanblau
 - Gentamicin
 - BSA
-

Kapitel 3 Ergebnisse

3.1 Phagozytoserate markierter und nichtmarkierter Legionellen

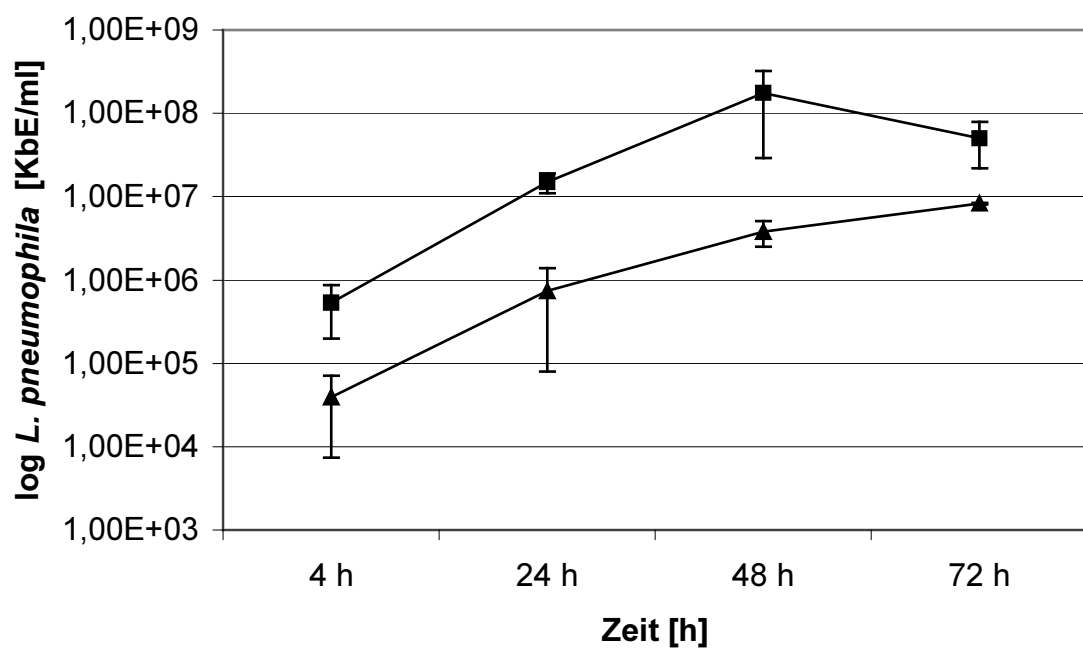


Abb. 2: Phagozytoserate und Vermehrungskurve markierter (■) und nichtmarkierter (▲) Legionellen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen dreier verschiedener Experimente.

Mono Mac 6-Zellen (MM6) wurden mit *L. pneumophila* infiziert, deren Lipopolysaccharid (LPS) zuvor mit entsprechenden Primär- und Sekundärantikörpern immunogoldmarkiert worden war. Null, 24, 48 und 72 Stunden nach Vereinigung von MM6-Zellen und Bakterien wurde die Lebendkeimzahl der Bakterien bestimmt, welche in Abb. 2 ersichtlich ist. Markierte Legionellen wurden um etwa eine logarithmische Einheit besser phagozytiert als nichtmarkierte Legionellen, d. h. circa 7×10^5 markierte Bakterien wurden während der zweistündigen Koinkubation von MM6 aufgenommen, wohingegen nur circa 6×10^4 nichtmarkierte internalisiert wurden. Die Vermehrungsrate hingegen war innerhalb 48 Stunden bei beiden Gruppen nahezu identisch. Zwischen 48 und 72 Stunden jedoch war eine Reduktion markierter Legionellen um etwa eine logarithmische Einheit (von circa 3×10^8 auf 7×10^7 Bakterien) zu verzeichnen, während sich nichtmarkierte Legionellen um etwa eine halbe logarithmische Einheit vermehrten.

3.2 Elektronenmikroskopie

Erste Vorversuche dienten dazu, Proben nicht konventionell in Araldit, sondern in Unicryl und Lowicryl K4M einzubetten, um nachfolgend die LPS-Verteilung in MM6-Zellen mittels der „post-embedding“-Methode, d. h. durch Immunogoldmarkierungen am Ultradünnschnitt, zu erfassen. Die Abbildungen in Punkt 3.2.1 sind repräsentative Bilder aus jeweils zwei voneinander unabhängigen Infektionen. Bei der Anwendung der „pre-embedding“-Methode wurden MM6-Zellen mit *L. pneumophila* Sg 1 infiziert, deren Lipopolysaccharid (LPS) zuvor mit entsprechenden Primär- und Sekundärantikörpern immunogoldmarkiert worden war. Somit stehen die Begriffe „LPS“ und „Goldpartikel“ synonym zueinander. Als Zeitpunkt T=0 wurde die Vereinigung von MM6 und Legionellen definiert. In stündlichen Abständen oder gegebenenfalls auch engeren Zeitfenstern wurden Probenwerte für die

Elektronenmikroskopie aufgearbeitet. Alle Zeitangaben beziehen sich auf den Zeitpunkt $T=0$. Es werden folgende Abkürzungen gewählt: ER – endoplasmatisches Retikulum; gER – glattes endoplasmatisches Retikulum; rER – raues endoplasmatisches Retikulum. Die Dokumentation eines kompletten Infektionszyklusses soll nachfolgend dargestellt werden. Die Abbildungen in Punkt 3.2.1, 3.2.4 und 3.2.5 sind repräsentative Bilder aus 20 voneinander unabhängigen Infektionen. Die Abbildungen in Punkt 3.2.2 und 3.2.3 sind repräsentative Bilder aus fünf voneinander unabhängigen Infektionen.

3.2.1 Einbettungsvorversuche mit Unicryl und Lowicryl K4M

Abb. 3:

2 h; bar = 0,1 μm

Einbettung mit Unicryl

In Kernnähe (Nu) befinden sich mehrere Vakuolen, deren Inhalt Bakterien gleicht, aber auch zytoplasmatischen Strukturen ähnelt.

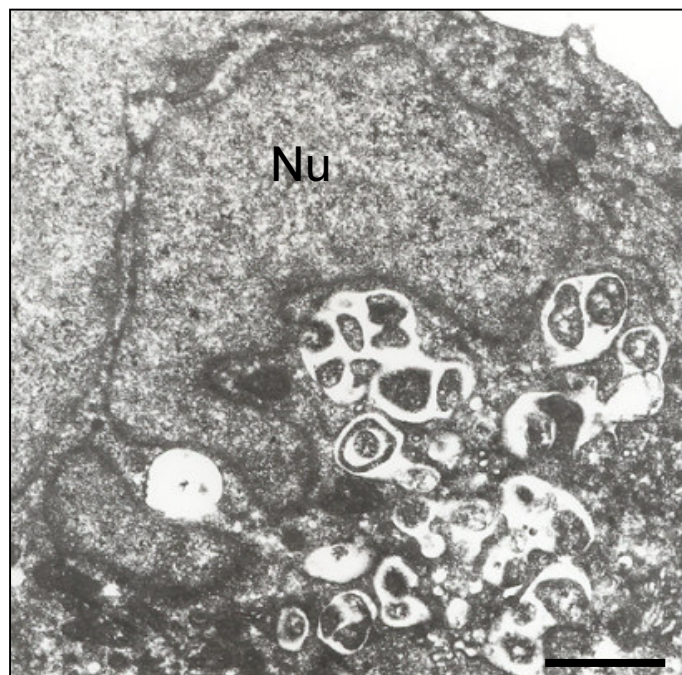
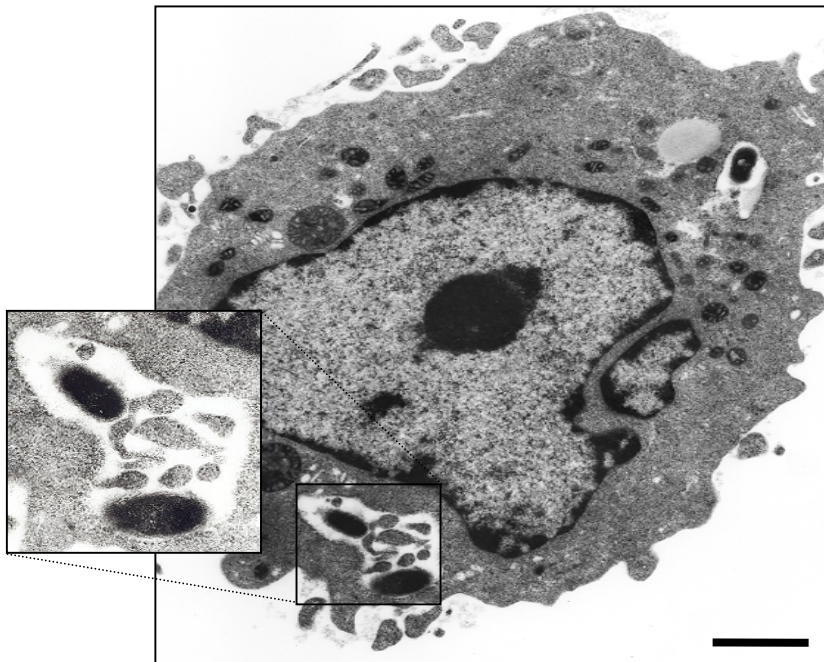


Abb. 4:

4 h; bar = 0,1 μm

Einbettung mit
Lowicryl K4M

Zellorganellen, wie
auch Phagosomen
sind zu erkennen,
Membranen
hingegen sind nur
schwer bzw. fast gar
nicht auszumachen.



Lowicryl K4M lieferte hinsichtlich der Strukturhaltung zwar bedeutend bessere Ergebnisse als Unicryl. Allerdings waren Membranen oder feine Zellstrukturen in den seltensten Fällen zu erkennen. Des Weiteren konnte aufgrund der relativ schwachen Struktur meist nicht genau zwischen Bakterien oder zytoplasmatischen Kompartimenten unterschieden werden.

3.2.2 Intrazelluläre LPS-Verteilung

Abb. 5:

1 h; bar = 0,1 μm

Die Pfeile verdeutlichen den Ablösungsvorgang der elektronendichten Schicht, die intraphagosomalen Legionellen aufliegt.

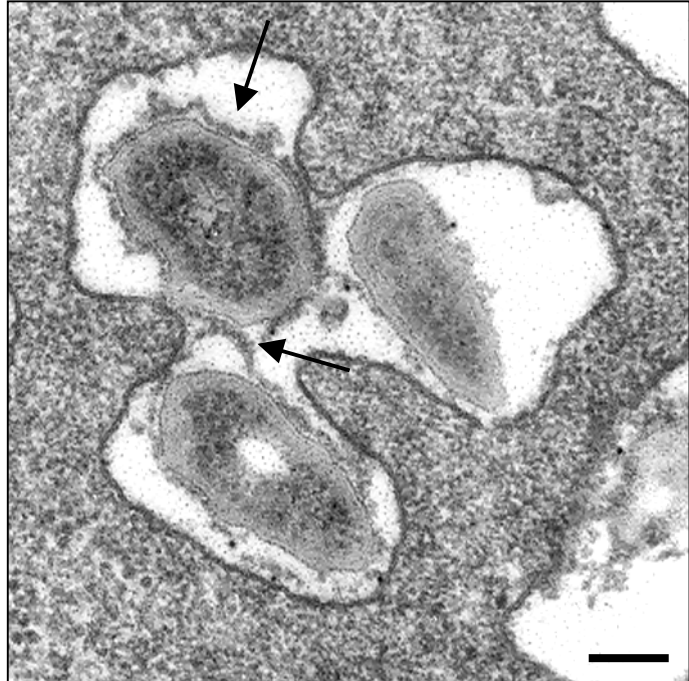


Abb. 6:

4 h; bar = 0,1 μm

Die Ablösung des LPS erfolgt überwiegend geclustert, wie es der Pfeil verdeutlicht. Danach sammelt es sich an den Randbereichen des Phagosoms.

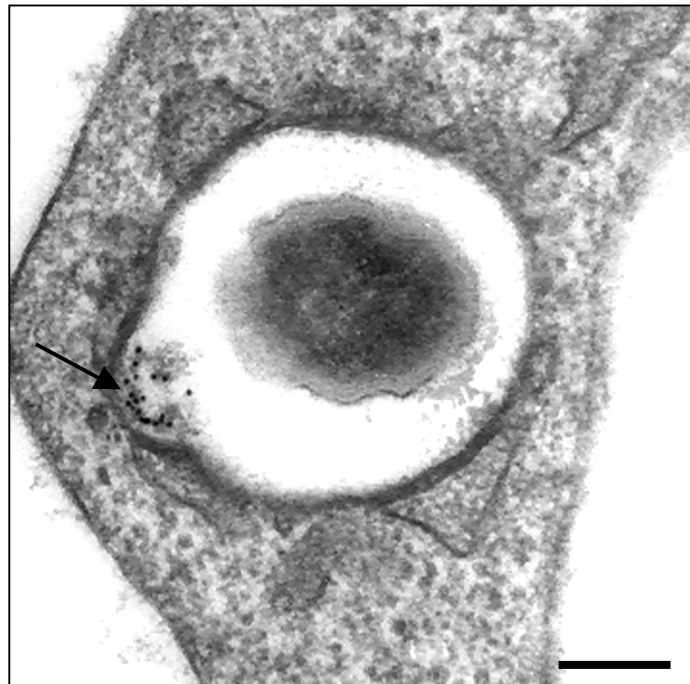
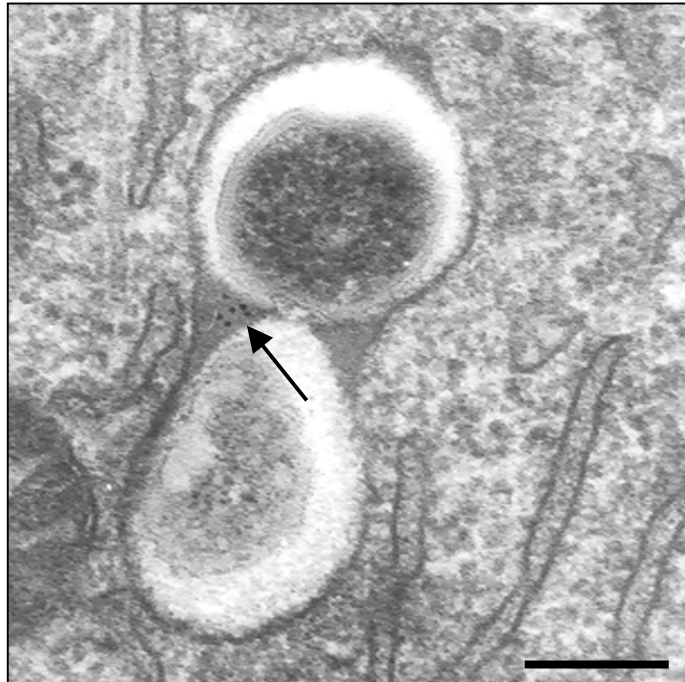


Abb. 7:

2 h; bar = 0,1 μm

Der Pfeil verdeutlicht die Ansammlung des LPS in den Fusionszonen zwischen verschmelzenden Phagosomen.

Abb. 8:

2 h; bar = 0,1 μm

Die Pfeile machen deutlich, dass sich das LPS nach abgeschlossener Fusion einzelner Phagosomen an der inneren Membran eines neu gebildeten Phagosoms ansammelt.

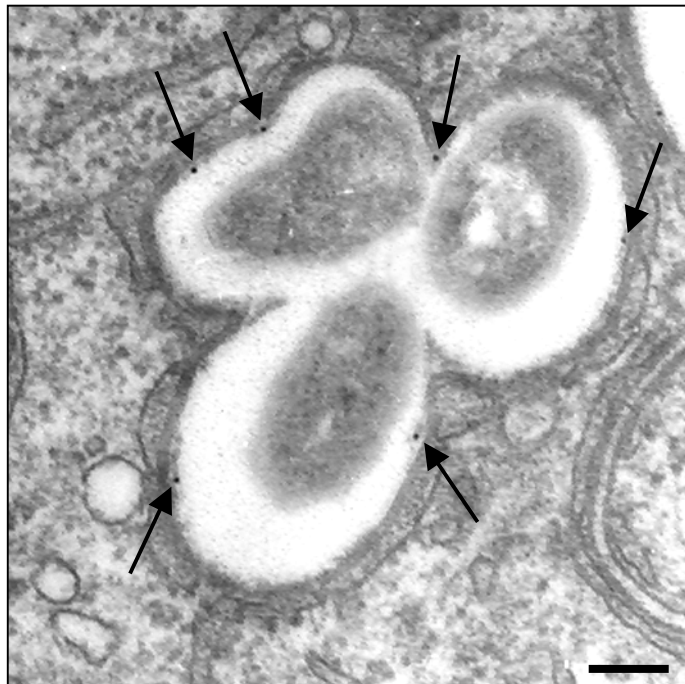


Abb. 9:
2 h 40 min; bar = 0,1 μm
An der mit Pfeil markierten
Stelle liegt das LPS frei im
Zytosol der Wirtszelle vor.

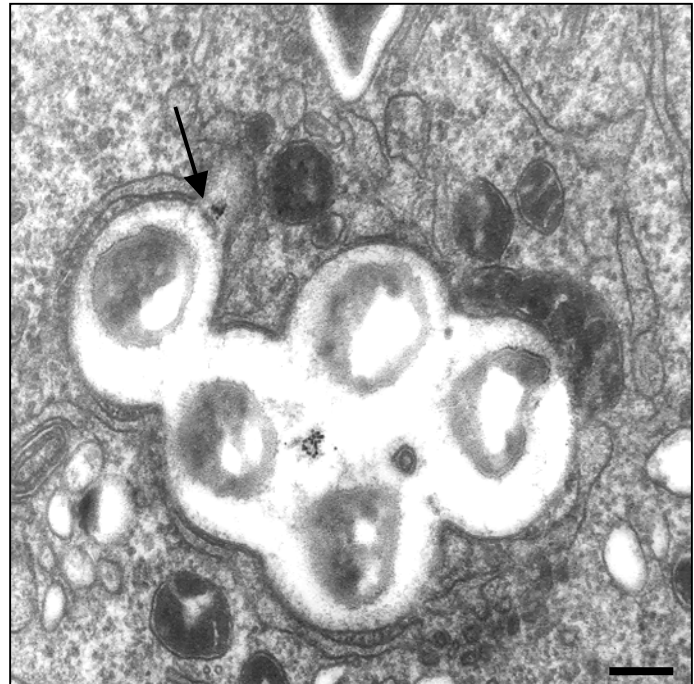


Abb. 10:
4 h; bar = 0,1 μm
An der mit Pfeil markierten
Stelle liegt das LPS vesikulär
im Zytosol der Wirtszelle vor.

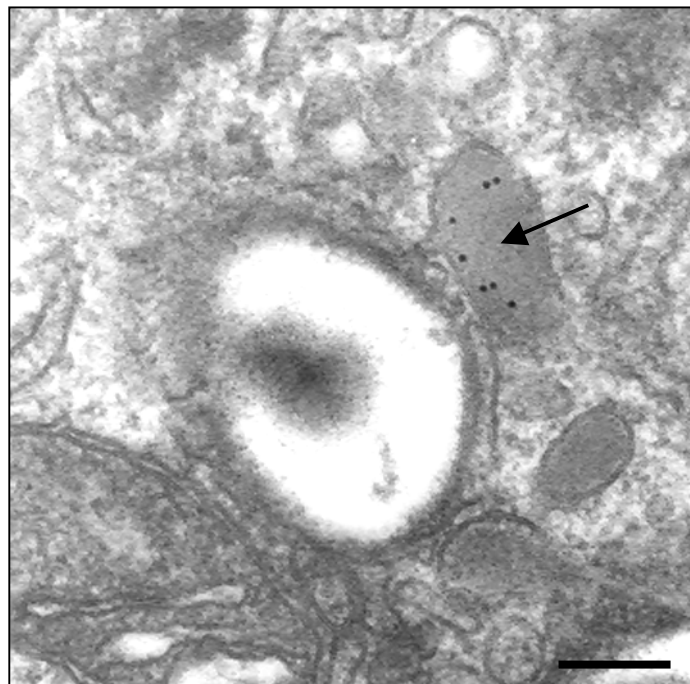
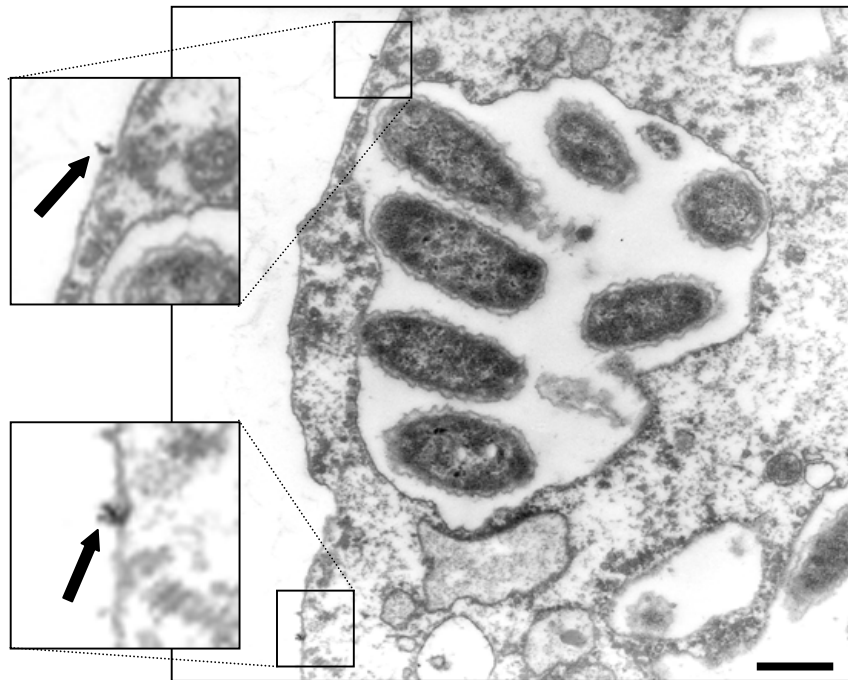


Abb. 11:11 h; bar = 0,1 μm

An den mit Pfeilen
markierten Stellen
liegt das LPS an
der
Wirtszellmembran
extrazellulär
haftend vor.



Zum Zeitpunkt $T=0$ der Infektion wiesen internalisierte Bakterien mäßig dicke Zellwände auf, die von einer aufgelockerten elektronendichten Schicht umgeben waren. In dieser Schicht ist das LPS verankert, da ausschließlich dort Primär- und Sekundärantikörper binden. Die elektronendichte Schicht löste sich zwischen einer und vier Stunden von den intraphagosomalen Legionellen ab (Abb. 5). Das LPS löste sich mit dem Zeitpunkt der Internalisierung überwiegend geclustert und sammelte sich an den inneren Phagosomenmembranen (Abb. 6). Des Weiteren fusionierten einige einzelne Phagosomen zwischen 30 und 120 Minuten zu größeren Phagosomen, die bis zu 20 Legionellen enthalten konnten. Dabei fand man Goldpartikel während der Fusionsprozesse in den Fusionszonen (Abb. 7), wohingegen sie nach abgeschlossener Fusion einzeln an den inneren Phagosomenmembranen (Abb. 8) nachzuweisen waren. Dort verblieben sie auch während des restlichen Infektionszyklusses. Zum Großteil ergab die elektronenmikroskopische Auswertung, dass das Legionellen-LPS intraphagosomal verblieb. Es fanden sich aber auch Zellen, in denen Goldpartikel zytosolisch oder extrazellulär angesammelt waren (Abb. 9, 10 und 11). Von gammabestrahlten Legionellen

löste sich das LPS in der gleichen Weise wie von lebendigen Bakterien ab (Abb. 27).

3.2.3 Einfluss des Protease-Inhibitors

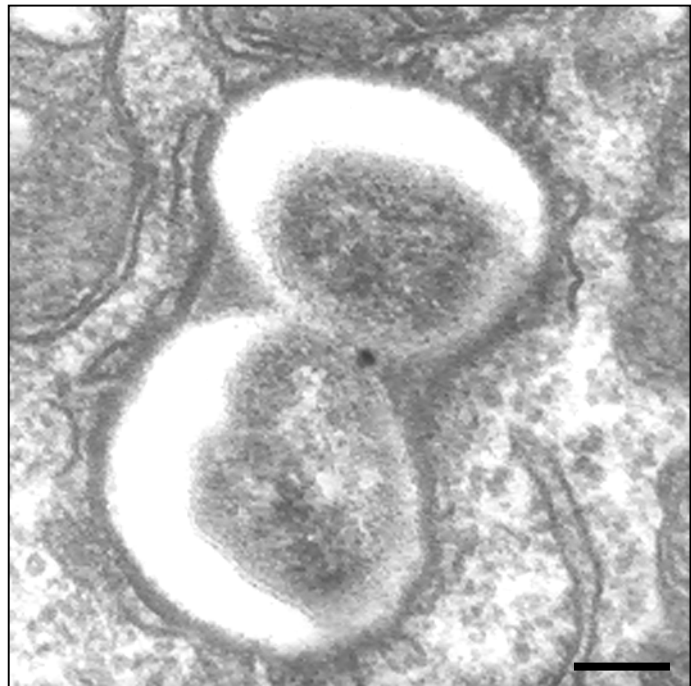


Abb. 12:

2 h; bar = 0,1 μm

Einzelne Phagosomen
verschmelzen miteinander.

Wurde die Infektion in Anwesenheit eines Protease-Inhibitors durchgeführt, so zeigten sich identische Ergebnisse hinsichtlich der zeitlichen Abläufe (Abb. 12) und des LPS-Sheddings (Abb. 13). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die Aktivität von Proteasen der Wirtszellen für die Dissoziation der Antigen-Antikörper Konjugate verantwortlich sind. Des weiteren hatte der Inhibitor keinen Einfluss auf die Phagozytoserate und die intrazelluläre Vermehrung der Bakterien (Abb. 14).

Abb. 13:

2 h; bar = 0,1 μm

Die Pfeile machen deutlich, dass sich das LPS von internalisierten Bakterien abgelöst und an den inneren Phagosomenmembranen angesammelt hat.

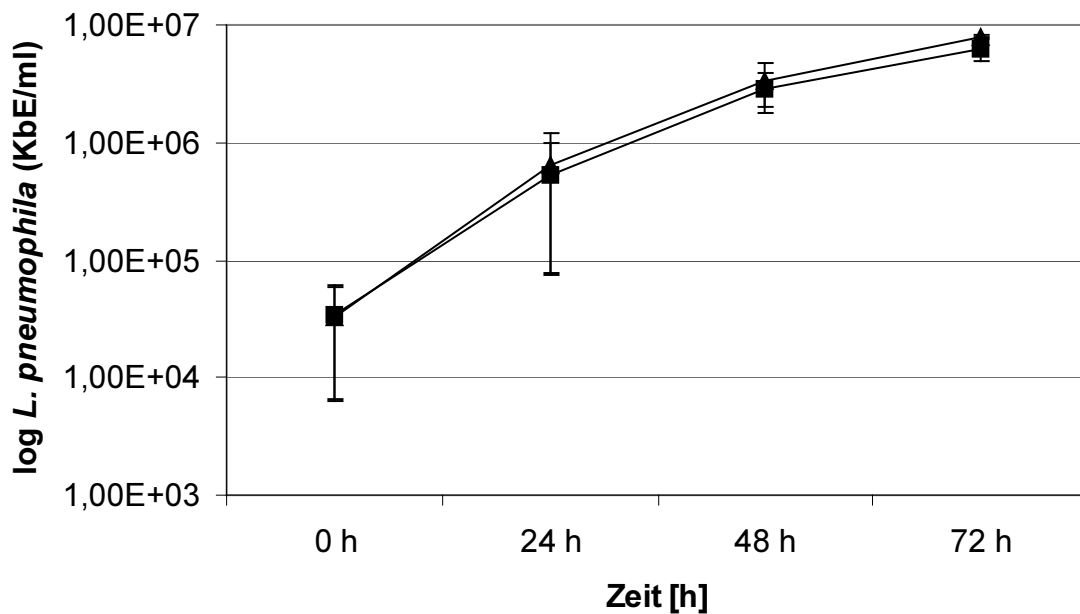
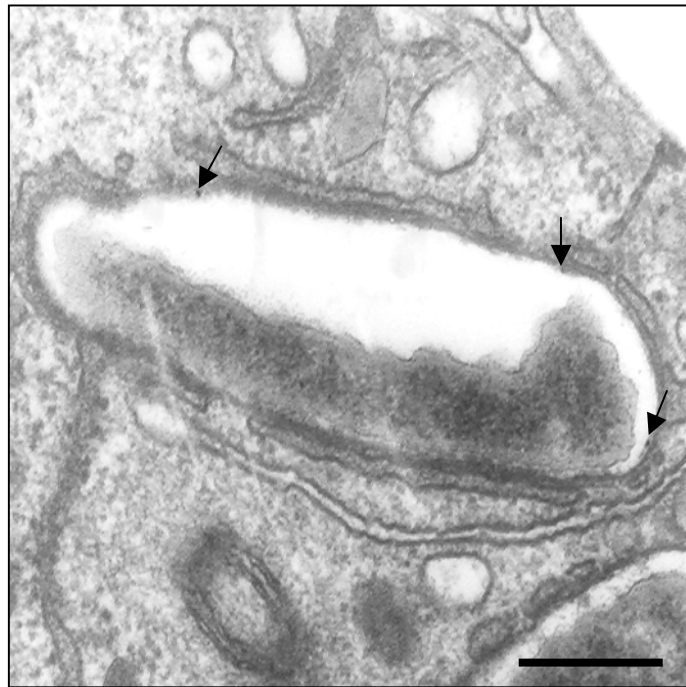


Abb. 14: Vermehrungskurven von *L. pneumophila* in Anwesenheit (■) bzw. Abwesenheit (▲) des Protease-Inhibitors. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen dreier unabhängiger Infektionen.

3.2.4 LPS-Nachweis auf agaradaptierten und wirtszellpassagierten Legionellen

Abb. 15:
Agarpassagierte Legionellen weisen moderate Mengen an LPS auf. Bar = 0,1 μm



Abb. 16:
Legionellen, die nach fünf Stunden aus Wirtszellen isoliert wurden, weisen sehr geringe Mengen an LPS auf. Bar = 0,1 μm

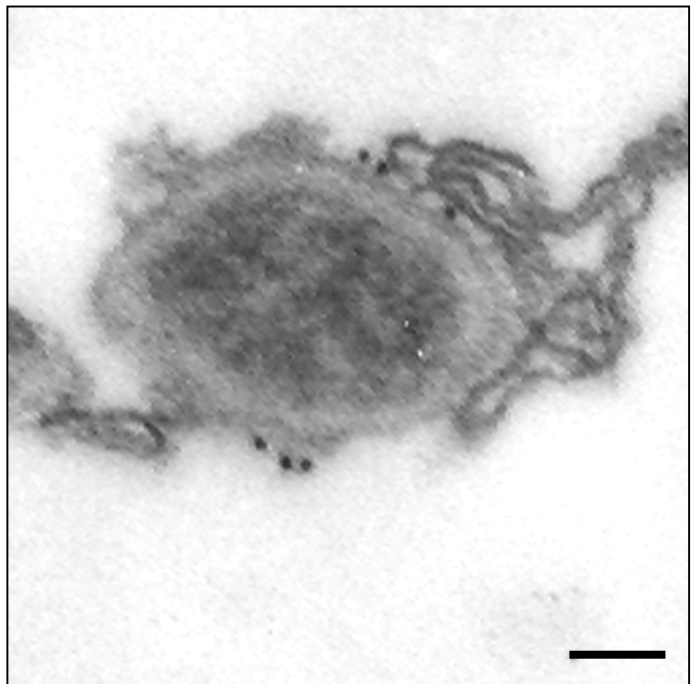


Abb. 17:

Legionellen, die nach sechs Stunden aus Wirtszellen isoliert wurden, weisen größere Mengen an LPS auf als agaradaptierte Legionellen.

Bar = 0,1 μm

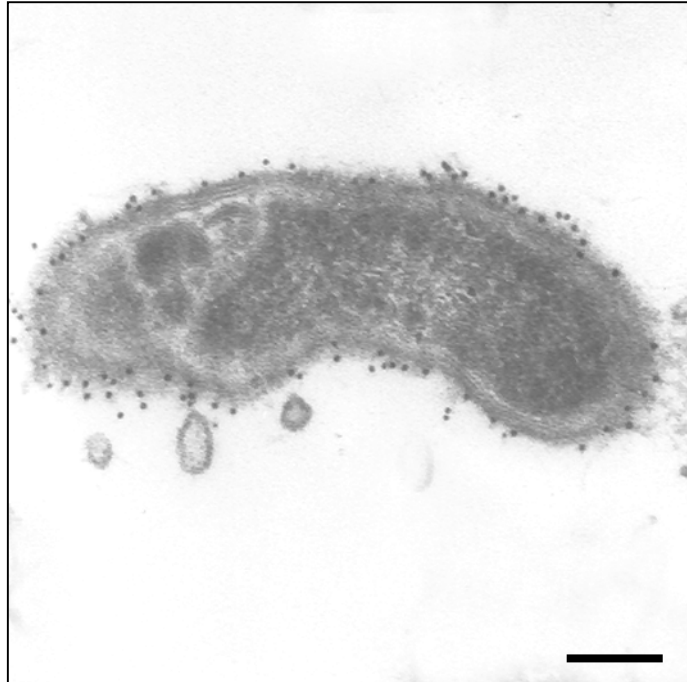


Abb. 18:

Legionellen, die nach zwölf Stunden aus Wirtszellen isoliert wurden, weisen größere Mengen an LPS auf als agaradaptierte Legionellen.

Bar = 0,1 μm

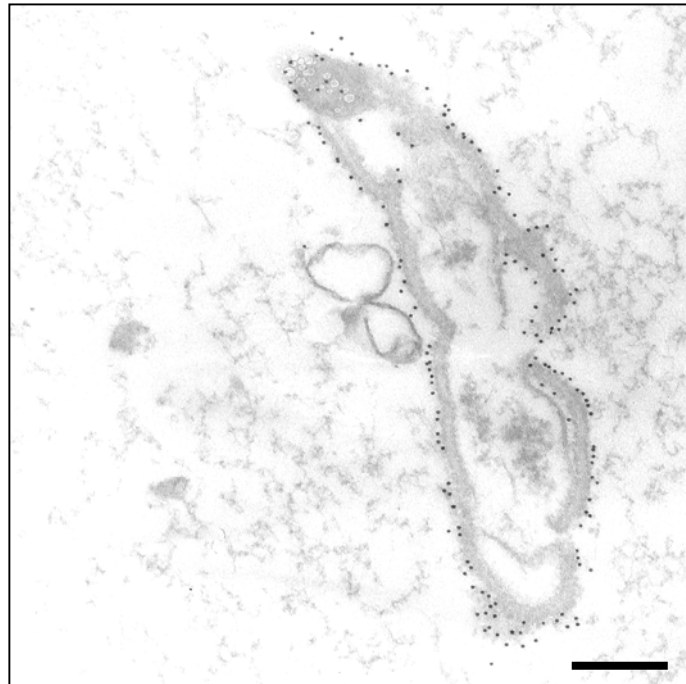
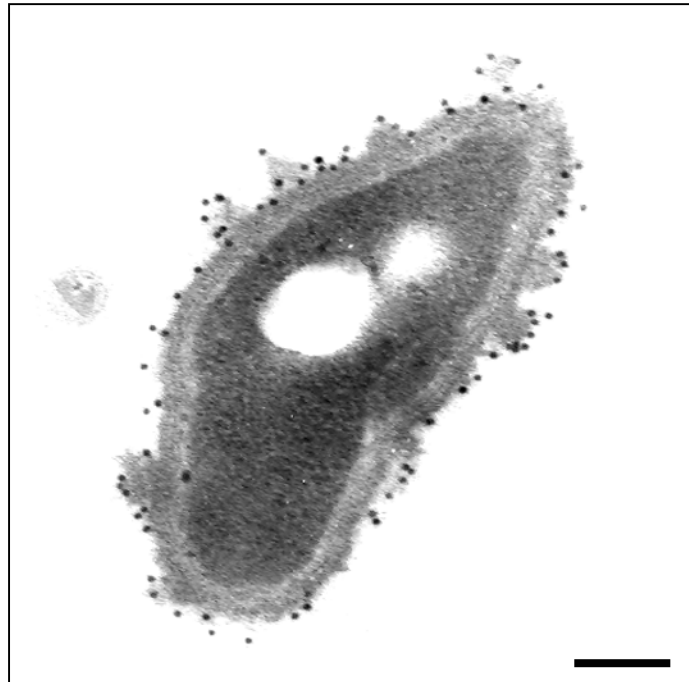


Abb. 19:

Legionellen, die nach 24 Stunden aus Wirtszellen isoliert wurden, weisen einen deutlich erhöhten Gehalt an LPS auf. Bar = 0,1 μm

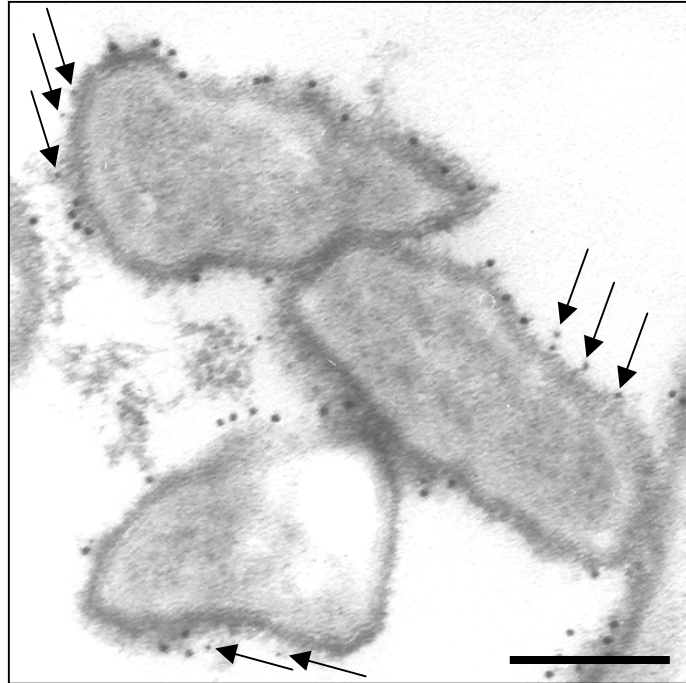


Agaradaptierte Legionellen (Abb. 15) wiesen dünne Zellwände und für Gram-negative Bakterien typische Mengen an LPS auf. Auf Legionellen, die nach fünf Stunden aus MM6-Zellen isoliert worden waren (Abb. 16), konnte nahezu kein LPS mehr nachgewiesen werden. Nach sechs Stunden stieg der Gehalt an LPS dramatisch an (Abb. 17). Dabei exponierten isolierte Bakterien deutlich mehr LPS als agarpassagierte. Auch nach zwölf (Abb. 18) und 24 Stunden (Abb. 19) konnten enorme Mengen an LPS auf den Bakterien nachgewiesen werden. Allen isolierten Bakterien war gemeinsam, dass ihre Zellwände fast fünffach dicker waren als die agaradaptierter Legionellen.

3.2.5 Nachweis von Calnexin auf wirtszellpassagierten Legionellen

Abb. 20:

Auf Legionellen, die nach sechs Stunden aus Wirtszellen isoliert wurden, kann neben LPS (10 nm Goldpartikel) auch Calnexin (5 nm Goldpartikel), auf welches die Pfeile hindeuten, nachgewiesen werden. Bar = 0,1 μm



Auf Legionellen, die nach fünf Stunden aus MM6-Zellen isoliert worden waren, konnte lediglich LPS, aber kein Calnexin nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Nach sechs Stunden hingegen war es möglich, neben LPS auch Calnexin auf den Bakterienoberflächen zu markieren (Abb. 20). Die Pfeile weisen auf das den Bakterien aufliegende Calnexin hin.

3.2.4 Morphologie der Phagosomen und deren Assoziation mit dem ER

Abb. 21:

30 min; bar = 0,1 μm

Die Sterne repräsentieren Pseudopodien einer MM6-Zelle, welche ein Bakterium mehr oder weniger fest umschließen. Der Pfeil weist auf den möglichen engen Kontakt zwischen Wirtszellmembran und LPS hin.

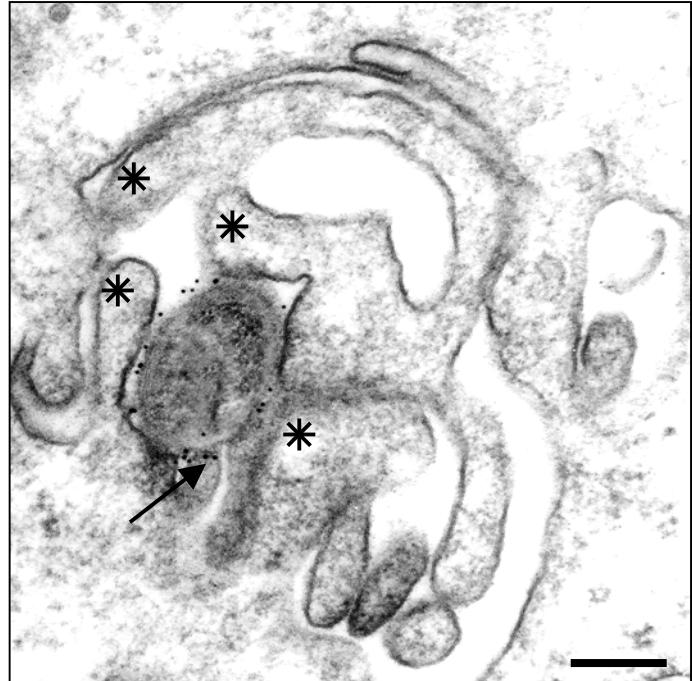


Abb. 22:

30 min; bar = 0,1 μm

Eine extrazelluläre Legionelle adhärirt an eine Wirtszelle. Die Pfeile verdeutlichen den möglichen engen Kontakt zwischen LPS und Wirtszellmembran.

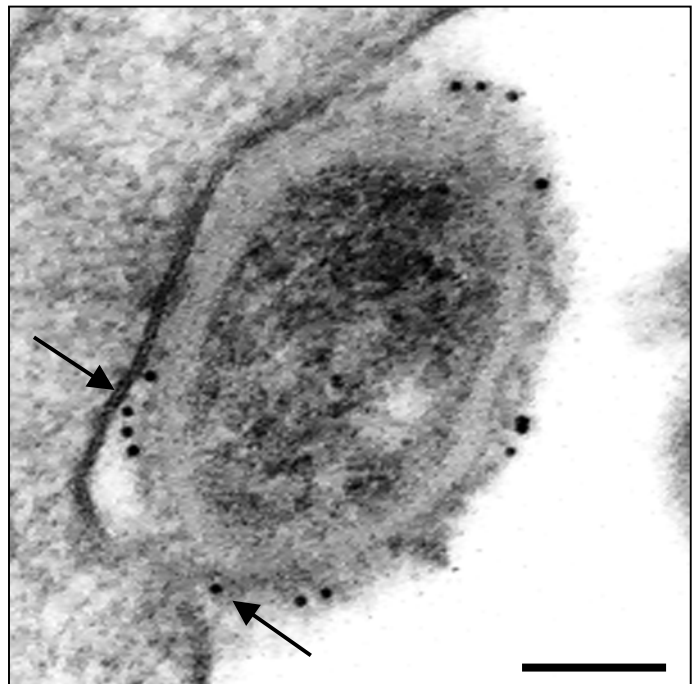


Abb. 23:

1 h; bar = 0,1 μm

Einzelne Phagosomen fusionieren zu einem großen Phagosom. Der Pfeil markiert die Stelle, an der die Membran zwischen den zwei linken einzelnen Phagosomen bereits aufgelöst ist.

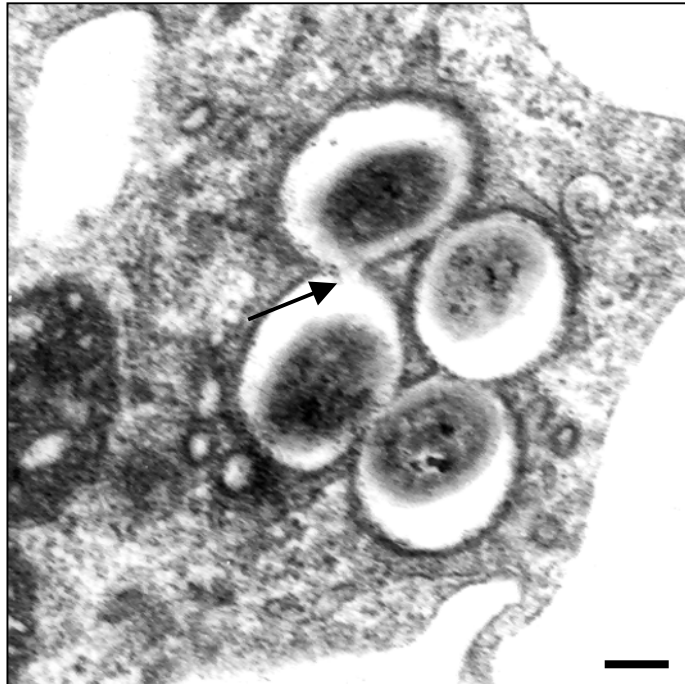


Abb. 24:

1 h; bar = 0,1 μm

rER nähert sich einem Phagosom.

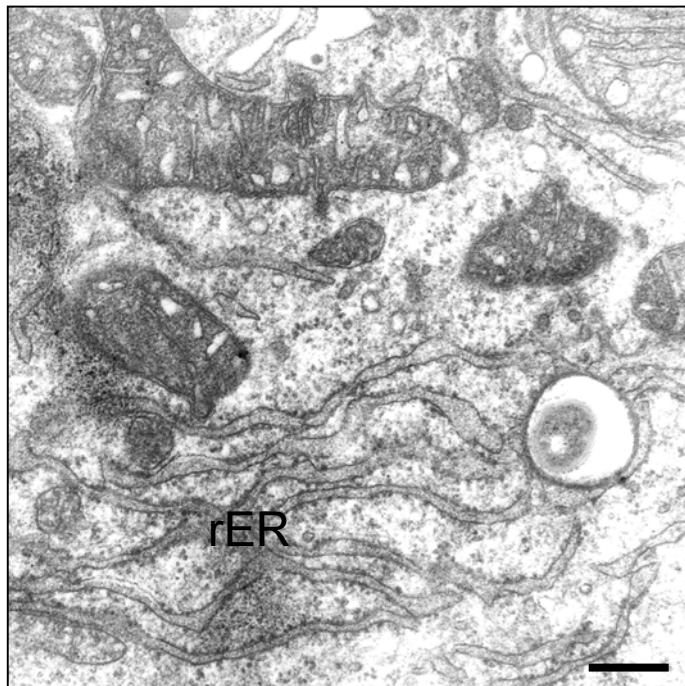


Abb. 25:

5 h; bar = 0,1 μm

Ein Phagosom wird nahezu komplett von einem Tubulus des rER umschlossen. Ribosomen sind dabei ausschließlich auf der dem Phagosom zugewandten Seite zu finden.

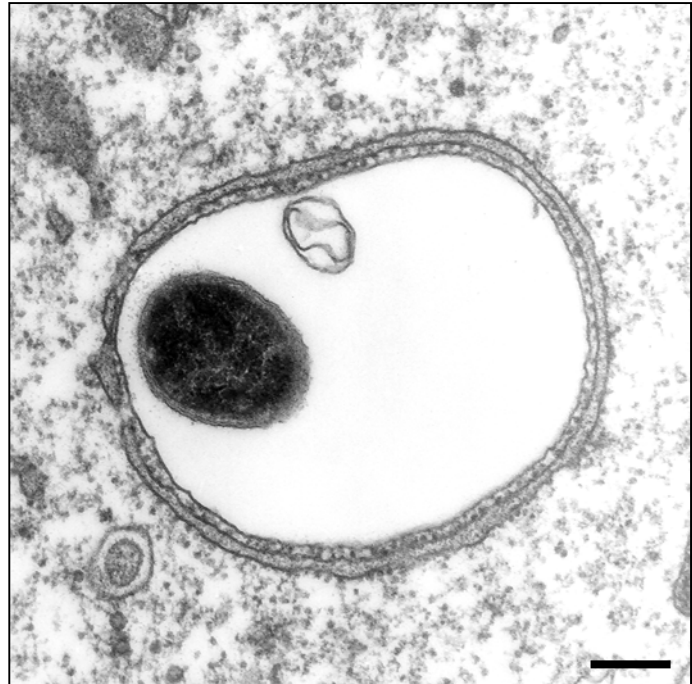


Abb. 26:

5 h; bar = 0,1 μm

Phagosomen werden nahezu komplett von Tubuli des rER umschlossen. Ribosomen sind dabei ausschließlich auf den der Phagosomen zugewandten Seiten zu finden. Phagosomale Membranabschnitte, die nicht von rER benachbart sind, in diesem Fall der Abschnitt innerhalb der zwei Pfeile, weisen auch keine Assoziation mit Ribosomen auf.

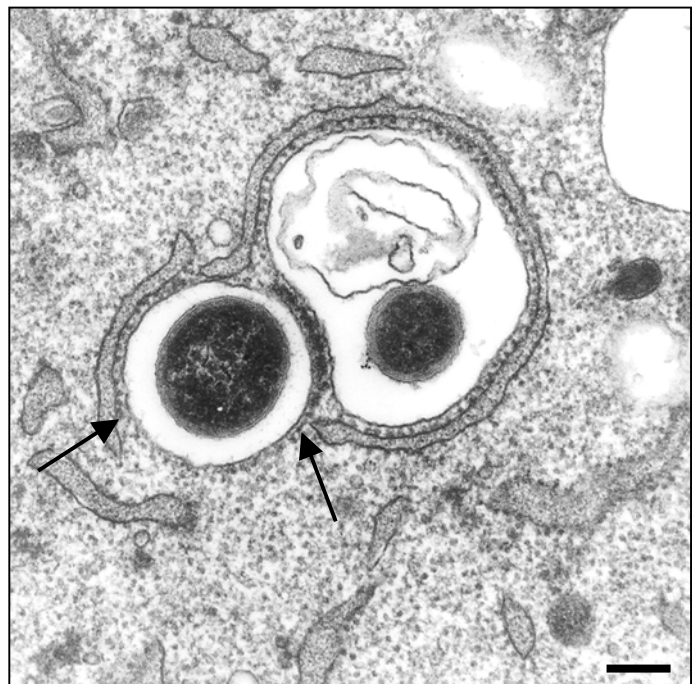
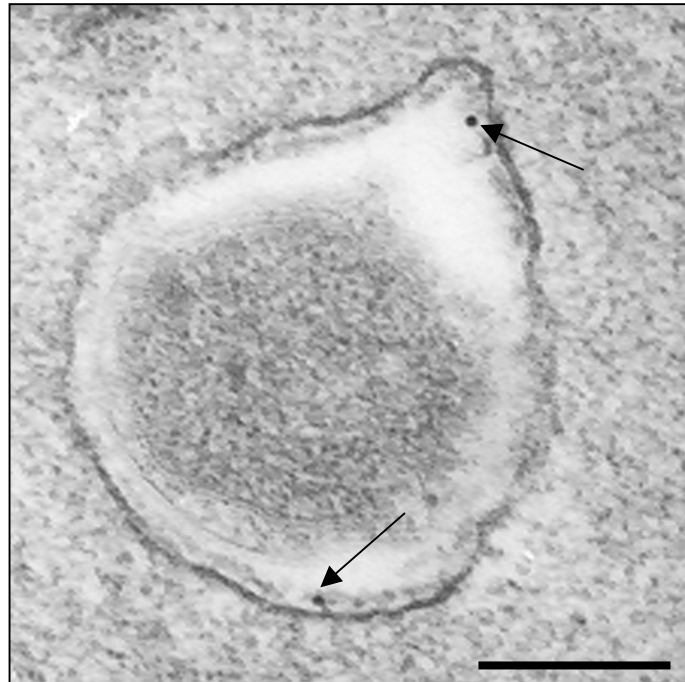


Abb. 27:5 h; bar = 0,1 μm

Phagosomen

gammabestrahlter Legionellen weisen keinen Kontakt mit ER auf. Das LPS löst sich aber ebenso wie bei lebendigen Legionellen ab, was durch die Pfeile verdeutlicht wird.

Abb. 28:5 h; bar = 0,1 μm

Ein Phagosom wird teilweise sehr eng von aufgeblähter äußerer Kernmembran (Km) umschlossen. Diese ist nur auf der dem Phagosom zugewandten Seite mit Ribosomen besetzt.

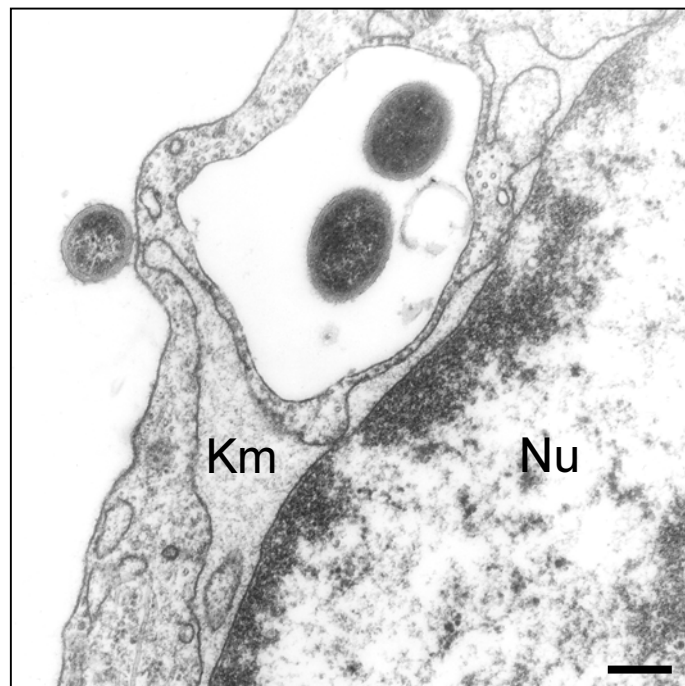


Abb. 29:

7 h; bar = 0,1 μm

Phagosomen sind nur noch teilweise mit aufgeblähtem gER (•) assoziiert. Dennoch sind ihre Membranen zu diesem Zeitpunkt vollständig mit Ribosomen besetzt.

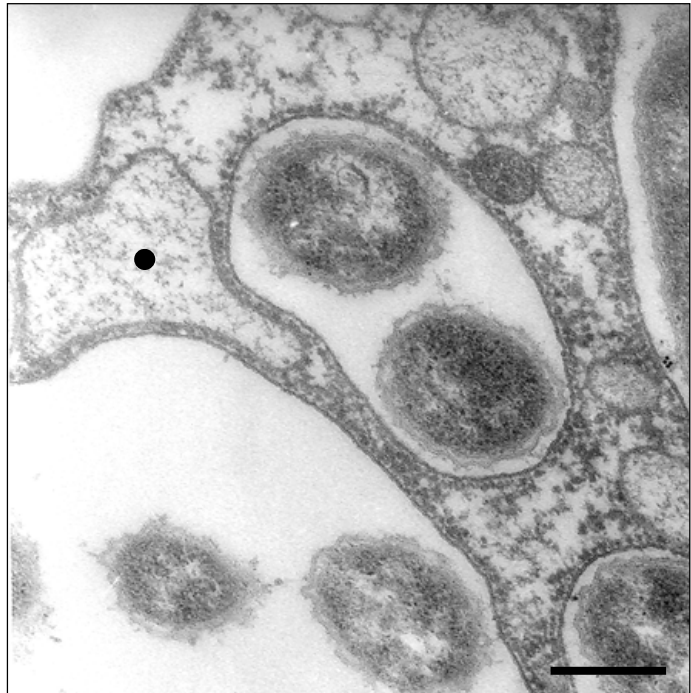


Abb. 30:

10 h; bar = 0,1 μm

Das Phagosom ist nicht mehr mit ER assoziiert. Seine Membran ist aber immer noch vollständig mit Ribosomen besetzt.

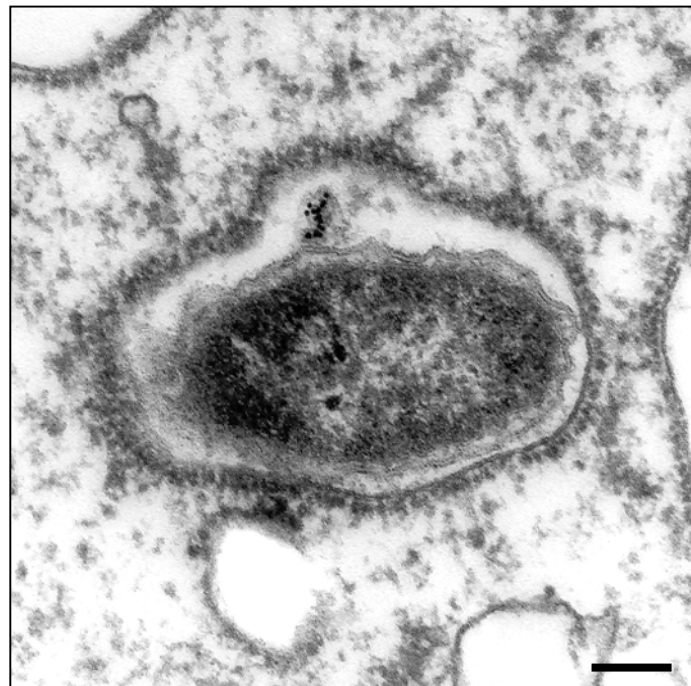
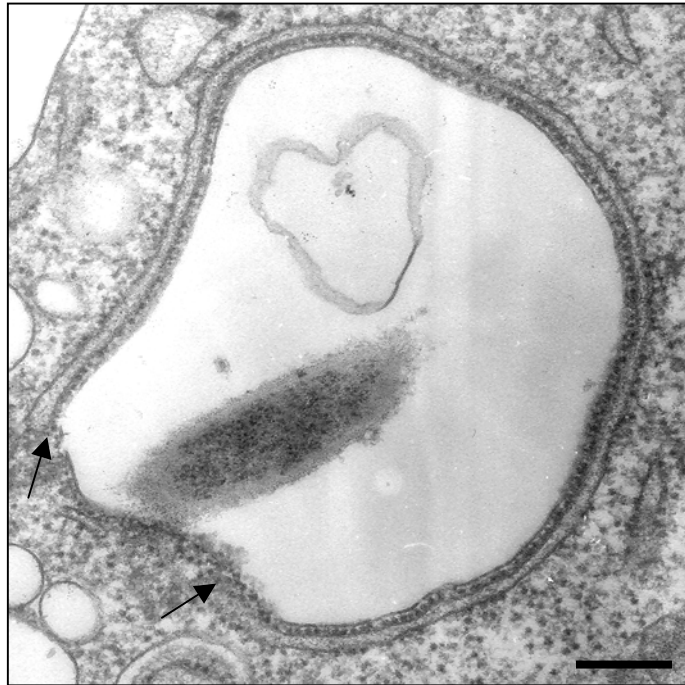


Abb. 31:

13 h, bar = 0,1 μm

Ein Phagosom wird nahezu vollständig von einem Tubulus des rER umschlossen. Ribosomen sind dabei ausschließlich auf den der Phagosomen zugewandten Membranen zu finden. Der Membranabschnitt zwischen den zwei Pfeilen verdeutlicht, dass das Phagosom bereits vollständig mit Ribosomen besetzt ist.

Abb. 32:

16 h; bar = 0,1 μm

Die Phagosomen sind teilweise mit aufgeblähter Kernmembran (Km) und aufgeblähtem gER (•) assoziiert. Ihre Membranen sind zu diesem Zeitpunkt vollständig mit Ribosomen besetzt.

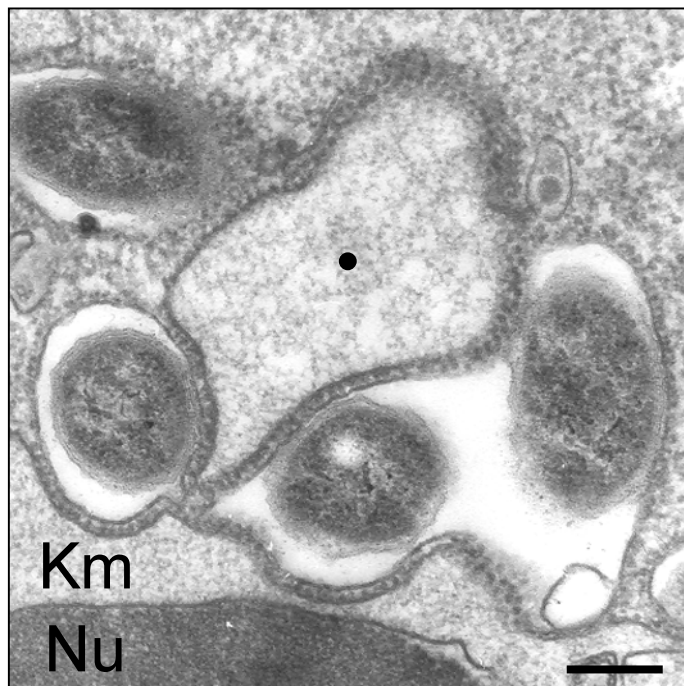
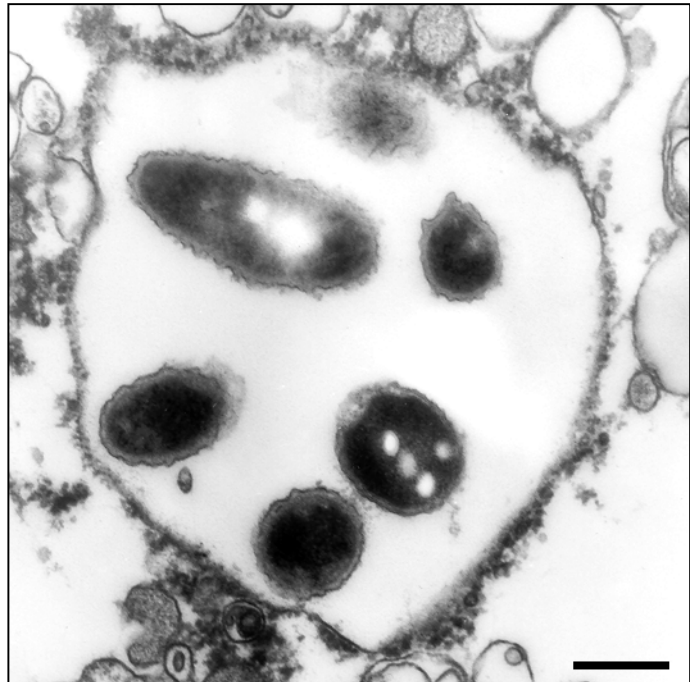


Abb. 33:

20 h; bar = 0,1 μm

Das Phagosom ist nahezu intakt, die Wirtszelle jedoch vollständig degradiert.



Spätestens nach 90 Minuten war die Internalisierung der Bakterien abgeschlossen. In den meisten Fällen umschlossen dabei Pseudopodien der MM6-Zellen die Bakterien und verschmolzen mit dem Zelleib, so dass sich Phagosomen ausbilden konnten (Abb. 21). In anderen, jedoch seltener auftretenden Fällen, adhärten die Bakterien an die Wirtszellmembranen (Abb. 22). Zwischen 30 und 90 Minuten fusionierten einige einzelne Phagosomen zu größeren Phagosomen (Abb. 23), die bis zu 20 Legionellen enthalten konnten. Zeitgleich setzte auch die Annäherung von rER und gER an die Phagosomen ein (Abb. 24). Der räumliche Kontakt zwischen diesen Zellkompartimenten war zu diesen frühen Zeitstadien noch vorwiegend lose, konnte mitunter aber auch sehr eng sein. Nach fünf Stunden fand die Assoziation von rER und Phagosomen ihren Höhepunkt. Phagosomen wurden von jeweils einem Retikulumschlauch nahezu vollständig umschlossen, wobei die Ribosomen des rER nur auf den der Phagosomen zugewandten Seiten zu finden waren (Abb. 25). Phagosomale Membranabschnitte, die nicht von rER umschlossen waren, wiesen darüber hinaus auch keine Assoziation mit Ribosomen auf (Abb. 26).

Analog dazu verhielt es sich auch mit Phagosomen, die in unmittelbarer Nähe des Zellkerns lokalisiert waren und von aufgeblähter äußerer Kernmembran umschlossen wurden (Abb. 28). Zwischen sechs und acht Stunden trat stark aufgeblähtes gER in engen Kontakt mit den Phagosomen, deren Membranen ab diesem Zeitpunkt komplett mit Ribosomen besetzt waren (Abb. 29), auch wenn sie nicht an allen Stellen Kontakt mit dem ER aufwiesen. Zwischen neun und 16 Stunden wiederholten sich zeitlich synchron die Vorgänge, die auch zwischen einer und acht Stunden abgelaufen waren. Zwischen neun und zwölf Stunden waren Phagosomen und gER nur sehr lose miteinander assoziiert, die Phagosomenmembranen blieben aber rundum mit Ribosomen besetzt (Abb. 30). Nach 13 Stunden wurden Phagosomen erneut sehr eng von jeweils einem Tubulus des rER umschlossen (Abb. 31), wohingegen zwischen 14 und 16 Stunden aufgeblähtes gER die Phagosomen umgab (Abb. 32). Ab circa 17 Stunden waren die Phagosomen nicht mehr mit ER assoziiert (Abb. 33) und begannen, wie auch die Wirtszellen, zu degradieren, bis sie nach circa 24 Stunden nahezu vollständig zerstört waren und der Großteil der Legionellen extrazellulär vorlag. Phagosomen gammabestrahlter Legionellen waren zu keinem Zeitpunkt der Infektion mit ER assoziiert (Abb. 27).

Abbildung 34 stellt die wichtigsten Prozesse, die während eines Infektionszyklusses ablaufen, nochmals schematisch dar. Daraus wird ersichtlich, dass dieser in zwei Phasen (Phase I und II) eingeteilt werden kann, die jeweils acht Stunden andauern. Des weiteren bestehen beide Phasen aus jeweils drei Abschnitten (A, B, C bzw. D, E, F), welche vier, eine und drei Stunden andauern und nach dem selben Muster ablaufen. So gleichen sich Abschnitt I A und II D, Abschnitt I B und II E, sowie Abschnitt I C und II F. Anhand dieser Abbildung wird auch der morphologische Shift zwischen I B und I C deutlich: ER-Membranständige Ribosomen wandern auf die Phagosomenmembranen. Dies hat zur Folge, dass Phagosomen nicht länger mit rER sondern mit gER assoziiert sind.

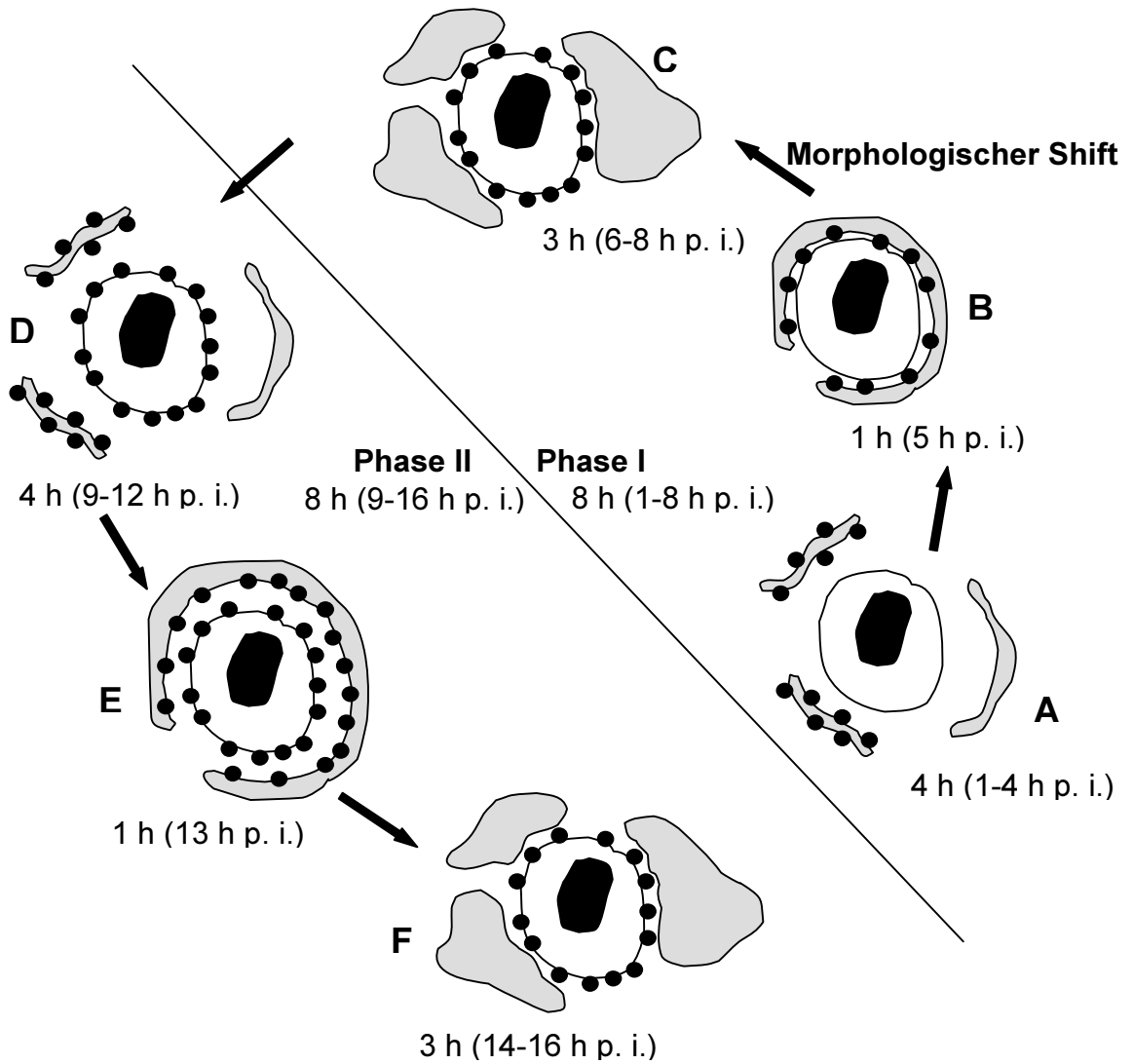
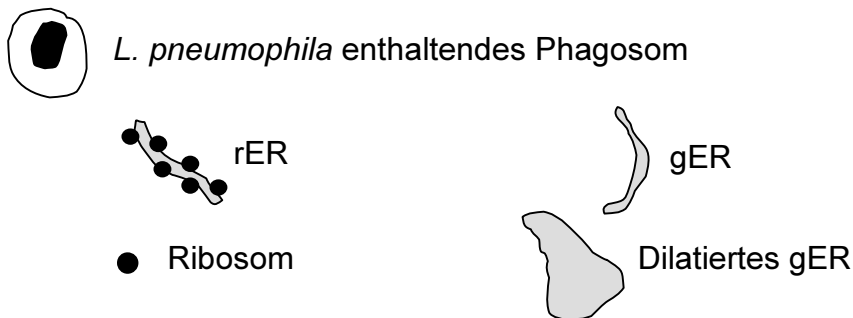


Abb. 34: Schematische Darstellung eines Infektionszyklusses. Dabei gelten folgende Symbole:



3.2.5 Morphologie intraphagosomaler Legionellen

Innerhalb der ersten vier Stunden löste sich die der äußeren Bakterienzellwand aufliegende elektronendichte Schicht ab (Abb. 5), so dass die Bakterien nach fünf Stunden glatte Oberflächen aufwiesen (Abb. 25, 26 und 28). Zu diesen Zeitpunkten lagen Zellwand und äußere Membran eng an den Bakterien an. Nach sechs Stunden lag den Bakterien wieder eine elektronendichte Schicht auf, in welcher sich LPS nachweisen lies. Außerdem hoben sich die äußeren Membranen ab diesem Zeitpunkt leicht von den Bakterien ab und nahmen eine geriffelt faltige Struktur an (Abb. 11, 29 und 30). Auffällig war, dass agarpassagierte Legionellen (Abb. 15) bedeutend dünnere Zellwände aufwiesen als intrazelluläre. Eine Verdickung der Zellwände war bereits nach 30 Minuten während des gesamten Infektionszyklusses zu verzeichnen. Sehr deutlich kommt dies in den Abbildungen 22 und 32 zum Ausdruck.

3.3 Expressionsanalyse

Tab. 3: Expressionsmuster der an der LPS-Biosynthese beteiligten Gene. Legionellen wurden entweder intrazellulär in MM6 Zellen oder extrazellulär in BYE-Bouillon bzw. BCYE α -Agar kultiviert. Die RNA agaradaptierter Legionellen diente dabei als Kontrolle (K!). Dargestellt sind die Ergebnisse aus 16 voneinander unabhängigen Experimenten, wobei die Expression zu den angegebenen Zeitpunkten jeweils drei Mal untersucht wurde.

ORF	BYE	K!	MM6				
	1- 25h	72h	1- 4h	5- 8h	9- 18h	19- 25h	30h
4 (ABC-Transporter des O-Antigens)	+	+	-	+	+	+	+
5 (ABC-Transporter des O-Antigens)	+	+	-	+	+	+	-
8 (Methyltransferase)	+	+	-	+	+	+	-
22 (Acetyltransferase)	+	+	-	-	+	+	-
23 (N-Acetylglucosamin-2-epimerase)	+	+	-	+	+	+	+
25 (CMP-N-Acetylneuraminsäuresynthase)	+	+	-	-	+	+	+
24 (N-Acetylneuraminsäure kondensierendes Enzym)	+	+	+	+	+	+	-
9 (ORF 24 Homolog)	+	+	-	+	+	-	+

Tabelle 3 zeigt das Expressionsmuster der acht untersuchten ORFs, die an der LPS-Biosynthese beteiligt sind. Dabei wird deutlich, dass die LPS-Biosynthese einer Regulation unterlag, wenn die Bakterien intrazellulär in MM6-Zellen replizierten. Die zwei homologen ORFs 24 und 9 (N-Acetylneuraminsäure kondensierende Enzyme) zeigten ein voneinander abweichendes Expressionsverhalten - ORF 24 war während eines kompletten Infektionszyklusses aktiv, wohingegen eine Aktivität von ORF 9 lediglich zwischen fünf und 17 Stunden eines Infektionszyklusses nachgewiesen werden konnte. Die restlichen sechs Gene konnten hinsichtlich ihres Expressionsmusters in zwei Gruppen eingeteilt werden: die erste Gruppe, bestehend aus ORFs 4 und 5 (ABC-Transporter des LPS O-Antigens), ORF 8 (Methyltransferase) und ORF 23 (N-Acetylglucosamin-2-epimerase), waren während der Phagozytose und frühen Infektionsstadien (1-4 h) inaktiv. Nach fünf Stunden erlangten sie wieder volle Aktivität, die bis zum Ende der Infektion anhielt. Die zweite Gruppe an Genen war im Gegensatz zu Gruppe 1 länger inaktiv und erlangte ihre volle Aktivität auch mit leichter Verzögerung. So waren ORF 22 (Acetyltransferase) und ORF 25 (CMP-N-Acetylneuraminsäuresynthase) während der ersten acht Stunden der Infektion herunterreguliert und konnten erst nach neun Stunden für den verbleibenden Infektionszyklus detektiert werden. Während des Wachstums in künstlichen Medien (BCYE α -Agar und BYE-Bouillon) unterlag die LPS-Biosynthese keiner Regulation.

3.4 Intrazelluläre Vermehrung LPS-reduzierter Legionellen

Abbildung 35 zeigt Vermehrungskurven von Legionellen, die nach vier bzw. 24 Stunden aus Wirtszellen isoliert und zur Infektion frischer MM-Zellen verwendet wurden und entweder kaum (LPS-reduzierte) bzw. viel (LPS-exponierende) LPS synthetisierten. Dies konnte zuvor an aus Wirtszellen isolierten Legionellen

mittels LPS-Immungoldmarkierungen gezeigt werden (siehe Abb. 16 und 19). Während sich LPS-exponierende Legionellen normal vermehrten, waren Legionellen, die einen drastisch reduzierten Gehalt an LPS aufwiesen, nicht in der Lage, intrazellulär zu replizieren.

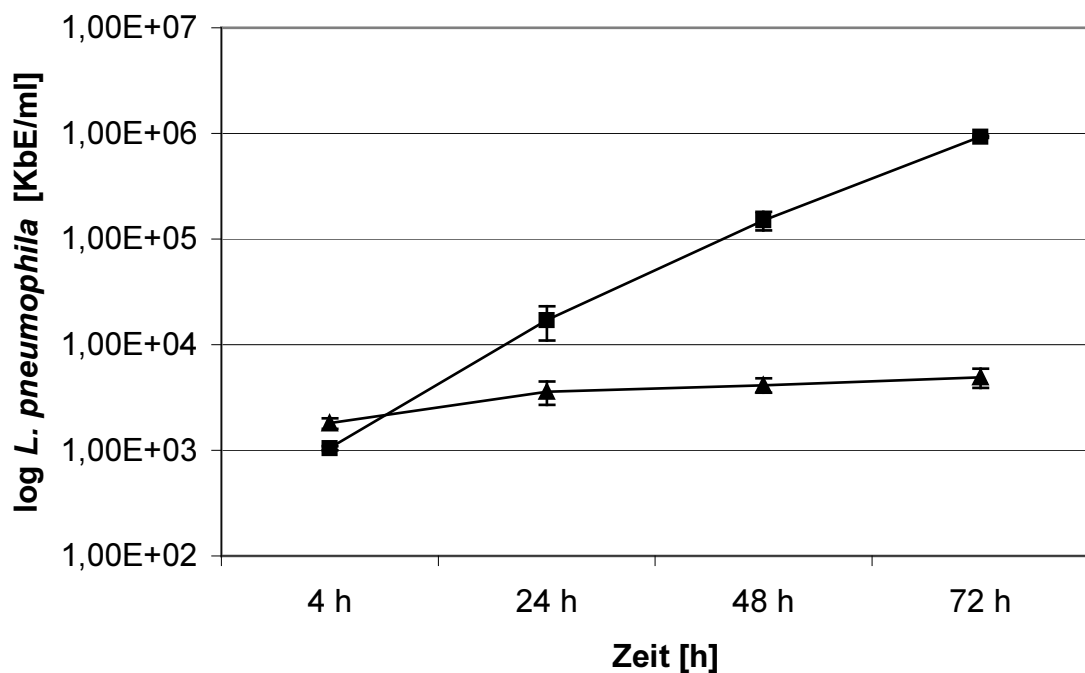


Abb. 35: Intrazelluläre Replikation LPS-reduzierter (▲) und LPS-exponierender (■) Legionellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei verschiedenen voneinander unabhängigen Experimenten.

3.5 Quantitativer Nachweis von Legionellen im Infektionsüberstand

Um zu ermitteln, ob Legionellen zwischen erstem und zweiten Replikationszyklus ihre Wirtszellen verlassen, wurden die Keimzahlen in Infektionsüberständen ermittelt. Nicht phagozytierte Legionellen wurden nach

zwei Stunden durch Gentamicin abgetötet und infizierte MM6-Zellen für weitere zwölf Stunden inkubiert. Eine mechanische Lyse der Wirtszellen erfolgte nicht, d. h. es wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nur die Legionellen ausplattiert, die sich im Infektionsüberstand befanden. Abbildung 36 zeigt, dass zwischen acht und 14 Stunden nicht wesentlich mehr Legionellen extrazellulär vorliegen als nach der Behandlung mit Gentamicin.

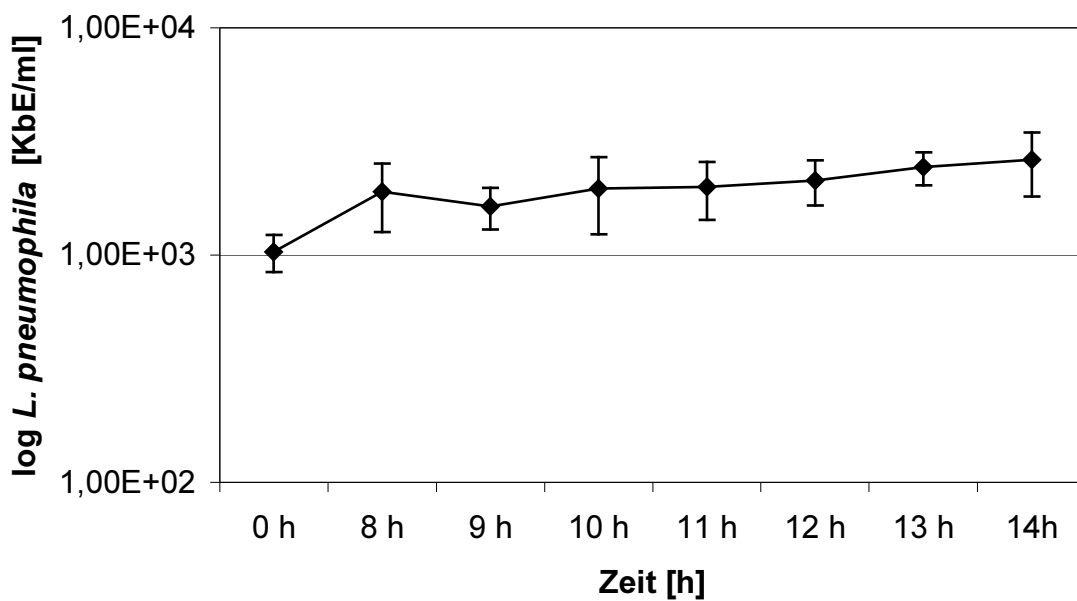


Abb. 36: Keimzahlen von *L. pneumophila* im Infektionsüberstand. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen dreier verschiedener Experimente.

Kapitel 4 Diskussion

Im Vergleich zu den Lipopolysacchariden anderer gram-negativer Bakterien weist das LPS von *L. pneumophila* Sg 1 keine klassische Endotoxinkapazität auf (Neumeister et al., 1998) und ist auch nicht zwingend an der Phagozytose beteiligt (Weissgerber et al., 2003). Diese Phänomene könnten auf die grundlegend geänderte Struktur dieses Moleküls zurückzuführen sein, da es sich durch gesteigerte Hydrophobizität, als auch durch enorme Mengen an ungewöhnlich langen Fettsäuren auszeichnet (Zähringer et al., 1995). Es wurde bisher noch nie untersucht, ob dieses LPS während des intrazellulären Wachstums in Monozyten mit Phagosomenmembranen interagiert und/oder intrazellulär prozessiert wird. Um derartige Fragen beantworten zu können, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen in Kombination mit "pre-embedding" Immunogold-Markierungen durchgeführt. Da sich dabei eine Ablösung des LPS von internalisierten Bakterien zeigte, dienten nachfolgende Expressionsanalysen mit Hilfe von RT-PCR der Untersuchung einer intrazellulär regulierten LPS-Biosynthese. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war es, die zeitlichen Abläufe aufzuklären, denen die Rekrutierung des ER an *L. pneumophila* enthaltende Phagosomen während eines kompletten Infektionszyklusses unterliegt, da hierfür bis dato nur spärliche Daten vorliegen.

Um Proben elektronenmikroskopischen Studien zugänglich machen zu können, werden diese fixiert, kontrastiert, entwässert und in Eponharze (Epon, Araldit)

eingebettet. Von eingebetteten Proben werden anschließend Ultradünnschnitte angefertigt, welche im Elektronenmikroskop untersucht werden. Eine gute und kontrastreiche Strukturhaltung erfordert eine starke Fixierung der Proben, was allerdings mit schlechter Antigenerhaltung einhergeht, da die Epitope währenddessen durch Schrumpfungs- oder Auswaschungsprozesse zum Großteil ihre räumliche Struktur ändern und damit nicht mehr bzw. bedeutend schlechter von Antikörpern erkannt werden können. Auch können Antikörper nicht sonderlich gut in die klassischen Einbettharze eindringen und damit schlecht zu ihrem Epitop vordringen. Vor einigen Jahren wurden Methacrylatharze (Unicryl, Lowicryl K4M) entwickelt, die es ermöglichen, Antigenmarkierungen am Ultradünnschnitt, also nach Fixierung und Einbettung der Proben, vorzunehmen. Allerdings ist der Einsatz von Methacrylaten mit erheblichem technischen und arbeitsintensiven Aufwand bei der Probenvorbereitung verbunden. Fixierung und Entwässerung müssen bei tiefen Temperaturen (-50°C) erfolgen, wie auch das Auspolymerisieren der Harze unter UV-Licht. Auch wenn der Antigenerhalt bedeutend besser ist als bei herkömmlichen Einbettungen, so muss man bei Tieftemperatureinbettungen mit Einbußen der Gewebsstrukturen rechnen.

Die Antigenmarkierung kann also grundsätzlich auf zwei Wegen, dem „pre-embedding“ und dem „post-embedding“, erfolgen. Dabei beziehen sich die Vorsilben „pre-“ und „post-“ auf den Zeitpunkt, zu dem die Markierung stattfindet – vor oder nach Fixierung und Einbettung der Proben. Im Vorfeld determinieren mehrere Gesichtspunkte die für den jeweiligen Versuch angebrachte Methode: zu untersuchenden Antigene, eingesetzte Antikörper und experimentelle Gesichtspunkte. Für die Markierung von Oberflächenantigenen bietet sich die „pre-embedding“ Methode an. Die Markierung ist sehr spezifisch, da überschüssige Antikörper während der Versuchsdurchführung gewegewaschen werden. Außerdem liegen die Epitope als intakte native Einheiten vor und werden damit leicht von den entsprechenden Antikörpern erkannt. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Kontrastierung und die Fixierung sich der Markierung anschließen und somit beide Aspekte hinsichtlich Struktur- und

Antigenerhaltung vereint werden können. Die „post-embedding“ Methode eignet sich für die Markierung intrazellulärer Antigene. Da sich hierbei die Markierung der Fixierung und der Einbettung anschließt, darf das Gewebe nur schwach fixiert und ausschließlich bei tiefen Temperaturen eingebettet werden. Hält man diese Bedingungen ein, so ist eine gute Antigenerhaltung gewährleistet, wohingegen die Struktur der Proben größtenteils nicht gut erhalten bleibt. Des Weiteren kann es äußerst diffizil sein, die richtigen Konzentrationen an Antikörpern zu finden und es braucht großes interpretatorisches Können, die Markierung als spezifisch ansehen zu können. Beiden Methoden sind zwei elementare physikalische Grenzen gesetzt – die Schnittebene und die exakte Antigenlokalisierung. Beide Faktoren spielen bei der Interpretation von Ergebnissen eine wichtige Rolle. Bei der Auswertung von „pre-embedding“-Schnitten ist es vom Zufall abhängig, die Schnittebene untersucht zu haben, in der die Goldpartikel liegen. Bei der Auswertung von „post-embedding“-Schnitten ist es vom Zufall abhängig, die Schnittebene untersucht zu haben, in der die Epitope liegen. Man muss also stets bedenken, dass mehr Antigene vorliegen könnten als mit der Markierung erfasst worden sind. Da Antigenmarkierungen mit Primär- und Sekundärantikörpern durchgeführt werden, ist zusätzlich zu berücksichtigen, dass der Abstand zwischen Antigen und Goldpartikel circa 10 bis 15 nm beträgt. Deshalb lässt sich nicht restlos klären, wo genau die jeweiligen Antigene lokalisiert sind. Besonders kritisch ist dies bei membranständigen Antigenen, die entweder membranassoziiert oder membranintegriert vorliegen können.

In der vorliegenden Arbeit waren sowohl Struktur- als auch Antigenerhaltung von großer Bedeutung. Zur Markierung des LPS bot sich die „pre-embedding“ Methode an, da es sich um ein Oberflächenmolekül handelt. Allerdings bietet sich hierbei nur einmal die Möglichkeit der Antigenmarkierung und erfasst somit nur Phagozytose und sehr frühe Infektionsstadien. Um auch die LPS-Verteilung während späterer Infektionsstadien erfassen zu können, wurden zusätzlich Einbettungen gemäß dem „post-embedding“ durchgeführt. Allerdings lieferte

dies keine befriedigenden Ergebnisse, da die Einbußen bei der Strukturhaltung immens waren.

LPS-markierte Legionellen wurden um circa eine logarithmische Einheit besser phagozytiert als nichtmarkierte Bakterien. Dies ist aller Wahrscheinlichkeit nach auf eine F_c -vermittelte Phagozytose zurückzuführen. Der F_c -Rezeptor erkennt das F_c -Stück von Antikörpern auf markierten Legionellen. Die intrazelluläre Vermehrungsrate wurde durch die Markierung nicht beeinflusst, so dass diese Methode als Grundlage dafür genommen werden konnte, die intrazelluläre Prozessierung des LPS mittels „pre-embedding“ zu untersuchen.

MM6-Zellen wurden mit *L. pneumophila* Sg 1 infiziert, deren LPS zuvor immunogold-markiert worden war. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben für elektronenmikroskopische Untersuchungen aufgearbeitet, welche Aufschluss über die Verteilung des LPS in den Wirtszellen geben sollten.

Unsere Ergebnisse zeigen sowohl eine Ablösung des LPS von Bakterienoberflächen, eine Ansammlung des LPS in Fusionszonen zwischen Einzelphagosomen, die Ansammlung des LPS an inneren Phagosomenmembranen, als auch den Transport des LPS in zytoplasmatische Kompartimente der Wirtszellen. Dabei wurde das LPS entweder als frei vorliegendes Molekül oder innerhalb vesikulärer Strukturen prozessiert. Aufgrund möglicher Protease-Aktivitäten der Wirtszellen war es anfangs unklar, ob es sich bei dieser Prozessierung um den Transport von LPS oder um enzymatisch abgespaltene Antikörper-Konjugate handelte. Deshalb wurde den Medien ein Protease-Inhibitor-Mix zugegeben, welcher aus Aprotinin (Hemmung von Serinproteasen), Bestatin (Hemmung von Aminopeptidasen), Leupeptin (Hemmung von Serin- und Zysteinproteasen), E-64 (Hemmung von Zysteinproteasen) und Pepstatin A (Hemmung saurer Proteasen) besteht. Die Durchführung von Infektionen in inhibitorhaltigem Medium lieferte die selben Ergebnisse hinsichtlich der LPS-Ablösung. Dies wurde als eindeutiger Hinweis darauf verstanden, dass Teile des LPS und nicht Antikörper-Konjugate in den

Phagosomen prozessiert wurden. Ob das gesamte LPS-Molekül oder nur Teile dessen (Lipid A, Kernregion oder O-spezifische Seitenkette) prozessiert werden, ist allerdings unklar, da vom Hersteller des anti-LPS Antikörpers keine Angaben über das Epitop gemacht werden konnten.

B: Bakterium

1: Lipid A

2: Innere Kernzone

3: Äußere Kernzone

4: O-spezifische

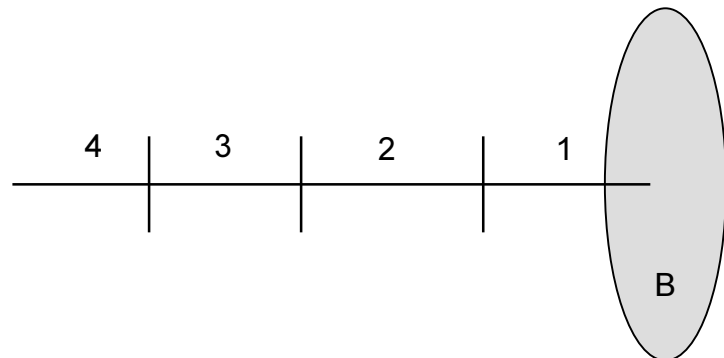


Abb. 37: Schematischer Aufbau eines LPS

Abbildung 37 zeigt den schematischen Aufbau eines Lipopolysaccharids. Dabei ist allein das Lipid A für die Auslösung bakterieller Sepsis oder septischen Schocks verantwortlich (Glauser et al. 1991). Es erscheint deshalb einleuchtend, dass Gram-negative Bakterien Teile des LPS abspalten müssen, um das Lipid A exponieren zu können. Es ist bekannt, dass LPS und andere Zellwandbestandteile abgegeben werden, wenn sich Bakterien teilen oder absterben (Hellman et al. 2000, Rietschel et al. 1994). Darüber hinaus konnte für viele Gram-negative Bakterien gezeigt werden, dass sie Membranvesikel abstoßen, die periplasmatische Komponenten, aber auch Membranbestandteile enthalten und damit eine hohe biologische Aktivität aufweisen (Mayrand und Holt 1988, Kadurugamuwa und Beveridge 1996). Das LPS virulenter und avirulenter *Burkholderia pseudomallei* ist ebenso in Kulturüberständen nachzuweisen (Anuntagool et al. 2000) wie das LPS von *Neisseria meningitidis* (Mirlashari et al. 2002). Hierbei enthalten Membranvesikel von *Neisseria meningitidis* circa 6% LPS gemessen am Proteingehalt (Mirlashari et al. 2001). Der LPS-Gehalt Pertussistoxin enthaltender Mizellen von *Bordatella pertussis*

beträgt sogar etwa 18% (m/m) (Perera et al. 1987). Auch *Pseudomonas aeruginosa* sezerniert Membranvesikel in Kulturüberstände, deren Hauptkomponenten LPS, Membranproteine und Enzyme sind (Kadurugamuwa und Beveridge 1995, 1997). Das LPS von internalisierten *Salmonella typhimurium*-Bakterien wird aus den Phagosomen heraustransportiert und kann im gesamten Zytosol der Wirtszellen nachgewiesen werden (Garcia-del Portillo et al. 1997). Dieser Prozess ist dem von *Mycobacterium tuberculosis* sehr ähnlich, denn dieses Bakterium gibt Lipoarabinomannan enthaltende Vesikel in das Zytoplasma seiner Wirtszellen ab (Xu et al. 1994). Aber nicht nur Bakterien, sondern auch Eukaryonten, wie beispielsweise *Plasmodium falciparum* prozessieren bioaktive Bestandteile in ihre Zielzellen (Stenzel und Kara, 1989). Hinsichtlich des von uns gezeigten LPS-Transports reiht sich *L. pneumophila* in die Gruppe intrazellulärerer Organismen ein, die gezielt Antigene in Wirtszellen prozessieren.

Überraschenderweise löste sich das LPS von gammabestrahlten *Legionella* Bakterien in der selben Weise wie bei lebendigen Bakterien ab und sammelte sich ebenso an den inneren Phagosomenmembranen an. Es ist deshalb anzunehmen, dass der Ablösevorgang des LPS als ein von der Wirtszelle induzierter Prozess anzusehen ist, der ab dem Zeitpunkt der Internalisierung der Bakterien beginnt.

Im Vergleich zum LPS von *Salmonella (S.) typhimurium* zeigt das *L. pneumophila*-LPS eine tausendfach reduzierte Endotoxinaktivität (Neumeister et al. 1998). Des Weiteren ruft es auch keine klassische Shwartzman-Reaktion hervor. Aufgrund der geänderten Struktur wäre es denkbar, dass diesem LPS eine andere Funktion zukommt als die eines klassischen Endotoxins. Der hohe Gehalt an ungewöhnlich langen Fettsäuren wäre beispielsweise eine Grundvoraussetzung für eine Integration in Lipiddoppelschichten von Zellmembranen. Unsere Ergebnisse zeigten eine Ansammlung von LPS an den inneren Phagosomenmembranen. Ob es sich dabei aber um Assoziation oder Integration handelt, bleibt unklar, da zwischen Goldpartikeln und Epitop

aufgrund der Markierung mit zwei IgG-Antikörpern circa 10-15 nm Abstand liegen. Da aber LPS auch im Zytosol der Wirtszellen nachgewiesen werden konnte, muss eine Interaktion zwischen LPS und Phagosomenmembranen vorausgesetzt werden.

Mittels „post-embedding“ Immunogoldmarkierungen konnte nachgewiesen werden, dass enorme Mengen an LPS von *S. typhimurium* während der ersten sechs Stunden permanent im Zytosol vorliegen (Garcia-del Portillo et al. 1997). Dies setzt voraus, dass das LPS permanent synthetisiert wird, denn es erscheint unrealistisch, dass im Zytosol vorliegendes LPS in einem dynamischen System wie einer Zelle stets am selben Ort verweilt. Unsere Ergebnisse zeigen, dass das *L. pneumophila*-LPS sehr selten im Zytoplasma zu finden war. Dies wurde als Hinweis auf eine nicht-permanente LPS-Synthese gewertet. So wiesen Legionellen, die nach fünf Stunden aus Wirtszellen isoliert worden waren, im Vergleich zu agaradaptierten Legionellen deutlich reduzierte Mengen an LPS auf. Zwischen fünf und sechs Stunden stieg der Gehalt an LPS wieder sprunghaft an. Dies war auch bei Legionellen, die nach zwölf und 24 Stunden aus Wirtszellen isoliert worden waren, der Fall.

Es ist bekannt, dass *L. pneumophila* ein virulenzassoziiertes Epitop nur phasenweise exprimiert (Lüneberg et al. 1998). Es wäre theoretisch möglich, dass auch das Epitop des von uns verwendeten anti-LPS Antikörpers nach fünf Stunden nicht exprimiert würde. Dies hätte zur Folge, dass vorliegendes LPS nicht vom verwendeten Antikörper erkannt werden könnte. Aus diesem Grund wurde die LPS-Synthese auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR näher untersucht. Als Vorlage für die Primergestaltung dienten bereits veröffentlichte Gensequenzen mehrerer an der LPS-Synthese beteiligten Enzyme (Lüneberg et al. 2000). Unsere Ergebnisse der Expressionsanalyse zeigen, dass intrazellulär replizierende Legionellen keines der untersuchten Gene (Orf 4, 5, 8, 22, 23, 24 und 25) während der ersten vier Stunden exprimierten. Bei diesen Genen handelt es sich um Enzyme, die wahrscheinlich wesentlich am Aufbau des LPS beteiligt sind. Orf 4 und Orf 5 fungieren als ABC-Transporter für das

LPS O-Antigen und sind demnach an der Synthese der O-spezifischen Seitenkette beteiligt. Orf 8 weist Homologien zu bakteriellen Zylopropan-Fettsäure Synthetasen auf und greift wahrscheinlich an der Lipid A Synthese ein. Orf 22 kodiert aller Wahrscheinlichkeit nach für eine Azetyltransferase und könnte demzufolge an der Synthese des Oligosaccharids der Kernzone beteiligt sein, welches enorme Mengen an Azetylgruppen aufweist (Zähringer et al. 1995). Orf 23 trägt als N-Azylglucosamin-Epimerase zur Synthese des O-Antigens bei, indem sie N-Azetyl-Glucosamin in N-Azetyl-Mannosamin umwandelt, welches ein Vorläufer der Sialinsäure ist, der wiederum die Legionaminsäure strukturell sehr ähnlich ist. Orf 24 ist ebenfalls an der Synthese des O-Antigens beteiligt, indem N-Azetyl-Mannosamin und Phosphoenolpyruvat zu Sialinsäure kondensiert werden. Orf 25 überführt Sialinsäure in die aktivierte Form (CMP-N-Azetyl-Neuraminsäure), welche nachfolgend zu Polysialinsäure verknüpft wird. Es schien uns daher unwahrscheinlich, dass während der ersten vier Stunden ein vollständiges LPS synthetisiert würde. Zwischen fünf und acht Stunden wurden bereits fünf der sieben untersuchten Gene exprimiert, bis zwischen neun und 25 Stunden alle Gene aktiv waren. Somit basierten die mit Immunogoldmarkierungen festgestellten unterschiedlichen LPS-Mengen nicht auf Epitopänderungen, sondern auf einer regulierten De- und Resynthese des LPS.

Unsere elektronenmikroskopischen Studien zeigen nach fünf Stunden drastisch reduzierte Mengen an LPS, obwohl zu diesem Zeitpunkt fünf der sieben Gene aktiv waren. Dies ist eher auf die zeitliche Verschiebung zwischen Genexpression, Protein-(Enzym-)synthese und Produkt-(LPS-)synthese zurückzuführen als auf die Möglichkeit, dass die Aktivität von nur fünf Genen nicht ausreicht, um das Epitop für den Antikörper zu synthetisieren. Denn nach sechs Stunden war das Expressionsmuster nicht verändert, allerdings wiesen Legionellen enorme Mengen an LPS auf. Berücksichtigt werden muss hierbei allerdings, dass die anderen von Lüneberg et al. (2000) sequenzierten und hinsichtlich ihrer Funktion charakterisierten zehn Gene nicht untersucht wurden. Des Weiteren wurden noch weitere zehn Sequenzen ermittelt, wobei diesen

keine genauen Funktionen zugewiesen werden konnten. Neben den bisher erwähnten sieben Genen wurde noch ein Weiteres untersucht – Orf 9, ein Homolog zu Orf 24. Orf 9 stimmt in seiner Sequenz zu 25% mit SiaC in *Neisseria meningitidis* Serogruppe B überein, ein Gen welches in diesen Mikroorganismen am Aufbau des kapselbildenden Polysaccharids beteiligt ist (Masson und Holbein 1983, Ganguli et al. 1994). Noch ist unklar, weshalb im Genom von *L. pneumophila* zwei zueinander homologe Gene vorliegen. Unsere Ergebnisse zeigen aber, dass sie während einer Infektion unterschiedlich exprimiert wurden. Während Orf 24 zwischen einer und 25 Stunden durchgehend aktiv war, wurde Orf 9 lediglich zwischen fünf und 18 Stunden exprimiert. Zu sehr späten Zeitpunkten (30 h) hingegen war Orf 9 aktiv, nicht aber Orf 24. Eine bis dato mögliche Erklärung könnte sein, dass Orf 9 während der Vermehrungszyklen (~6-7 h bzw. ~12-14 h) unterstützend auf Orf 24 wirkt. Neben Orf 9 waren auch Orf 4, Orf 23 und Orf 25 nach 30 Stunden aktiv. Es ist anzunehmen, dass diese der Reinfektion neuer Wirtszellen dienen.

Da vom Hersteller des anti-LPS Antikörpers keine Angaben über das Epitop gemacht werden konnten, lassen sich anhand der oben beschriebenen Enzymfunktionen eventuell indirekt Rückschlüsse darüber ziehen, welcher Teil bzw. welche Teile des LPS gesheddet werden. Da neben Orf 4, Orf 5, Orf 22, Orf 23, Orf 24 und Orf 25, welche an der Synthese von Kernregion und O-spezifischer Seitenkette beteiligt sind, auch Orf 8, der in die Lipid A-Synthese involviert ist, während der ersten vier Stunden nicht exprimiert wurde, wäre es unter Umständen möglich, dass sich das gesamte LPS von internalisierten Bakterien ablöst.

Für den Mip (macrophage infectivity potentiator)-Promotor konnte gezeigt werden, dass dieser sofort nach Internalisierung in den Bakterien abgeschaltet und erst nach circa 20 Stunden, also kurz vor dem Verlassen der Wirtszellen, wieder aktiviert wird (Wieland et al. 2002). Die Expression von Mip unterliegt

also einer Regulation, wenn Legionellen intrazellulär replizieren, so wie dies auch der Fall für die LPS-Synthese der Fall war.

Kürzlich konnte anhand fluoreszenzmikroskopischer Studien gezeigt werden, dass zwei Epitope des *L. pneumophila*-LPS während intrazellulären Wachstums in *Acanthamoeba castellanii* unterschiedlich exprimiert werden (Helbig et al. 2003). Ein virulenzassoziiertes Epitop konnte während 20 Stunden nachgewiesen werden, wohingegen dies für ein niedermolekulares Epitop lediglich während der ersten acht Stunden möglich war. Wurden Bakterien in Flüssigmedium kultiviert, so war das virulenzassoziierte Epitop wieder während 20 Stunden nachweisbar. Allerdings konnte das niedermolekulare Epitop in nur circa 20% der Bakterien nachgewiesen werden. Auch unsere Ergebnisse zeigen während extrazellulären Wachstums der Bakterien in künstlichen Medien wie BCYE α -Agar oder BYE-Bouillon im Vergleich zu intrazellulär replizierenden Legionellen ein geändertes Genexpressionsmuster. Während die LPS-Synthese während intrazellulären Wachstums reguliert war, wurden die acht untersuchten Gene während extrazellulären Wachstums über 25 Stunden hinweg permanent exprimiert. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Regulation der LPS-Synthese und intrazelluläres Wachstum eng miteinander assoziiert sind. Unklar bleibt allerdings, warum die LPS-Synthese gerade zu frühen Infektionsstadien (1-4 h) weitgehend unterbunden wird. Während dieser Zeit war das Phagosom von *L. pneumophila* auch nur lose mit Vesikeln oder ER der Wirtszellen assoziiert, wie unsere elektronenmikroskopischen Studien zeigen. Erst nach fünf Stunden wurde das Phagosom sehr eng von rauem ER umschlossen. Zu diesem Zeitpunkt setzte auch die Expression des Großteils der von uns untersuchten und an der LPS-Synthese beteiligten Gene ein. Da währenddessen normalerweise Phagosomenreifung und Degradationsprozesse ablaufen, wäre es denkbar, dass *L. pneumophila* das LPS-Shedding dafür nutzt, weitgehend unerkannt zu bleiben. Zusätzlich wäre es denkbar, dass das abgelöste LPS mit Phagosomenmembranen, an denen es sich unmittelbar nach

dem Zeitpunkt ansammelt, derart interagiert, dass deren Rigidität verändert und dadurch die Fusion mit Endo- und Lysosomen blockiert wird.

Der bereits erwähnte lockere Kontakt zwischen Phagosomen und ER während der ersten vier Stunden wurde nach fünf Stunden äußerst eng, d. h. Phagosomen wurden nahezu vollkommen von jeweils einem Tubulus des rauen ER umschlossen. Auffällig war, dass sich dabei die Ribosomen nur auf den der Phagosomen zugewandten Membranen des ER befanden. Bereits eine Stunde später (6 h) waren die Ribosomen ausschließlich auf den Phagosomenmembranen nachzuweisen. Tilney et al. (2001) konnten anhand biochemischer und elektronenmikroskopischer Arbeiten zeigen, dass die ursprüngliche Plasmamembran des *L. pneumophila*-Phagosoms in eine ER-Membran umgewandelt wird. Dies könnte als grundlegende Voraussetzung für das „Überspringen“ der Ribosomen gesehen werden, wenngleich die dafür verantwortlichen Faktoren bis dato nicht bekannt sind. Normalerweise reguliert der „signal recognition particle“ (SRP) die Assoziation zwischen ER-Membranen mit Ribosomen (Lauring et al. 1995). RaIF, ein ARF/GTPase Austauschfaktor, wird von *L. pneumophila* über den Dot/Icm Sekretionsapparat in Wirtszellen sezerniert und ist essentiell für die Lokalisierung von ARF1 auf den Phagosomen, einem GTP bindenden Protein, welches den Transport zwischen ER und Golgi-Apparat steuert (Nagai et al. 2002). Es wäre denkbar, dass SRP durch ähnliche Mechanismen an die in ER-Membran umgewandelte Phagosomenmembran gebunden wird und damit das „Überspringen“ der Ribosomen einleitet.

Ein weiteres Phänomen, welches nach sechs Stunden zu verzeichnen ist, war die Assoziation von intraphagosomalen Legionellen mit Calnexin. Calnexin ist ein membranständiges Protein der ER-Membran und fungiert dort als Chaperon. Des weiteren übernimmt Calnexin die Funktion eines Kofaktors bei der korrekten Faltung des MHC-Klasse I-Komplexes (Degen und Williams 1991). Dieser besteht aus beta-2-Mikroglobulin, zu präsentierendem Peptid und einer schweren Kette (Williams et al. 2002), welche vor der eigentlichen Antigenpräsentation mit

Calnexin assoziiert ist (Degen und Williams 1991). Zwar ist der MHC-Klasse I-Komplex an der Präsentation viraler Antigene beteiligt, doch konnte anhand früherer Studien mittels FACS-Analysen gezeigt werden, dass die Präsentation des MHC-Klasse II-Komplexes durch *L. pneumophila* nicht reguliert wurde, wohingegen der MHC-Klasse I-Komplex nach 24 und 48 Stunden deutlich herunterreguliert war (mündliche Mitteilung von Frau Faigle).

Weiterhin konnte durch fluoreszenzmikroskopische Arbeiten gezeigt werden, dass intrazelluläre *L. pneumophila* nach 24 Stunden mit Calnexin kolokalisiert waren (Gerhardt et al. 2000). Der enge Kontakt zwischen Phagosomen und ER nach fünf und sechs Stunden war für uns Ausgangspunkt, intrazelluläre Legionellen zu diesen Zeitpunkten zu isolieren und gegen Calnexin immunogoldzumarkieren. Nach fünf Stunden, der Zeitpunkt, zu dem Phagosomen noch keinen Kontakt mit Ribosomen hatten, war kein Calnexin auf den Bakterien nachzuweisen. Nach sechs Stunden hingegen, der Zeitpunkt, zu dem Phagosomenmembranen mit Ribosomen besetzt waren, wiesen Bakterien eine Assoziation mit diesem Protein auf. Erste Versuche mittels Westernblotting in unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die Bindung zwischen Calnexin und Bakterienoberflächen sehr spezifisch ist. Dies könnte darauf hindeuten, dass Calnexin unter Umständen aktiv von intraphagosomalen Legionellen rekrutiert wird, wenngleich Calnexin auch passiv während des „Überspringens“ von Ribosomen mitgerissen und in das Lumen der Phagosomen prozessiert werden könnte. Mit dem Zeitpunkt, zu dem ihre Membranen mit Ribosomen besetzt waren (6 h), waren die Phagosomen mit aufgeblähtem glatten ER assoziiert. Diese Aufblähung könnte auf das Fehlen von Calnexin in Membranen des rauen ER zurückzuführen sein. Neben der vorher beschriebenen Funktionen regelt Calnexin nämlich auch den Kalziumhaushalt des ER. Fehlt Calnexin, so könnte die Homöostase zwischen zytoplasmatischer und luminaler Kalziumkonzentration gestört sein, was ein Anschwellen des ER-Lumens zur Folge hätte. Ein derartiges Erscheinungsbild manifestiert sich in zahlreichen pathologischen Befunden (Szabadkai et al., 2003). Es ist nicht ungewöhnlich, dass Wirtszellproteine auf intrazellulären Legionellen gefunden werden können. Auf Legionellen, die in Amöben repliziert hatten, konnte ein mit

der äußeren Membran assoziiertes, 15 kDa großes Amöbenprotein nachgewiesen werden, dessen Funktion aber nicht näher charakterisiert wurde (Barker et al. 1993).

Die Assoziation mit dilatiertem glatten ER blieb für drei Stunden (6-8 h) bestehen, wohingegen die Phagosomen nach neun bis zwölf Stunden keinen bzw. sehr losen Kontakt mit dem ER aufwiesen. Diese Phase initialisierte einen zweiten Zyklus der ER-Rekrutierung, der mit dem ersten Zyklus hinsichtlich Dauer und zeitlichen Abläufen identisch war und sich lediglich durch einen dauerhaften Ribosomenbesatz der Phagosomenmembranen von ihm unterschied. Mit Beenden dieses zweiten Zyklusses verloren Phagosomen zuerst den Kontakt mit ER und nachfolgend auch den mit Ribosomen. Nach circa 20 Stunden begannen Wirtszellen und Phagosomen zu degradieren, so dass der Großteil der Bakterien extrazellulär vorlag. Bis dato ist unklar, weshalb die Rekrutierung des ER biphasisch abläuft. Es wäre aber möglich, dass sie mit der intrazellulären Replikation in Zusammenhang steht. Die Generationszeit von intrazellulären Legionellen beträgt circa sechs bis sieben Stunden. Geht man davon aus, dass sich *L. pneumophila* nach circa sieben und 14 Stunden teilt, so ist auffällig, dass die Phagosomen zu diesen Zeitpunkten mit aufgeblähtem glatten ER assoziiert und mit Ribosomen besetzt waren. Diesen Gegebenheiten ging stets der enge Kontakt mit ER-Tubuli voraus. Es wäre also anzunehmen, dass ein initialer Kontakt mit rauem ER und eine Translokation von Ribosomen für die Bakterien essentielle Faktoren sind, die ihre Vermehrung gewährleisten.

Legionellen können keine Kohlenstoffverbindungen zur Energiegewinnung nutzen und sind auf verfügbare Aminosäuren angewiesen. Ein sehr hypothetischer Ansatz, einen Zusammenhang zwischen Ribosomenbesatz und intrazellulärer Vermehrung herzustellen, wäre, dass Ribosomen die synthetisierte Peptidkette in das phagosomale Lumen sezernieren, wo sie einer enzymatischen Aufspaltung in Aminosäuren unterworfen wird. Es wird darüber diskutiert, ob dabei Cathepsine der Wirtszelle daran beteiligt werden (Dorn et al. 2002), da bis jetzt noch nicht

gezeigt werden konnte, dass *L. pneumophila* extrazelluläre Proteasen im Phagosom sezerniert.

Legionellen werden nach Beendigung eines Infektionszyklusses aus degradierten Wirtszellen freigesetzt, so dass sie in neue Zellen eindringen und dort einen neuen Infektionszyklus beginnen können. Da nicht klar ist, ob Legionellen auch schon zu früheren Zeitpunkten ihre alten Wirtszellen verlassen und in neue, bereits infizierte Zellen, eindringen, könnte man annehmen, es handle sich hinsichtlich der ER-Rekrutierung nicht um zwei nacheinander ablaufende Zyklen sondern um parallel verlaufende Zyklen. Dies kann aber aufgrund mehrerer Ergebnisse ausgeschlossen werden: würden Legionellen zu beliebigen Zeitpunkten ihre alten Wirtszellen verlassen und in neue, bereits infizierte Zellen eindringen, so müssten in zahlreichen MM6-Zellen Erst- bzw. sämtliche mögliche Kombinationen aus Erst- und Reinfektionsstadien zu sehen gewesen sein. Dies war aber nicht der Fall. Des Weiteren ergaben die Ermittlungen der Keimzahlen im Infektionsüberstand, dass zwar circa 2×10^3 extrazellulär vorliegende Legionellen nachzuweisen waren, diese Anzahl den Anfangsgehalt von etwa $9,2 \times 10^2$ aber nicht wesentlich überstieg. Die Tatsache, dass der Gehalt extrazellulärer Legionellen zwischen acht und 14 Stunden weitgehend konstant blieb, bestätigt die Annahme, dass infizierte MM6-Zellen kein zweites Mal oder gar öfter infiziert werden. Des Weiteren hat sich gezeigt, dass nur circa jeder hundertste uninferierte Makrophage extrazelluläre Legionellen phagozytiert. Derart geringe Keimzahlen, wie circa 1×10^3 und das mäßige Phagozytoseverhalten deuten zusätzlich darauf hin, dass die ER-Rekrutierung biphasisch abläuft.

γ -bestrahlte Legionellen waren zu keinem Zeitpunkt der Infektion mit ER assoziiert. Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei der ER-Rekrutierung im Gegensatz zum LPS-Shedding nicht um einen von der Wirtszelle induzierten Prozess handelt, sondern vielmehr um einen, der von internalisierten Bakterien getriggert wird. Aufgrund unserer bisher vorgestellten Ergebnisse wurde deutlich, dass Legionellen während der ersten vier Stunden ihr LPS abgaben und nach fünf

Stunden deutlich reduzierte Mengen an LPS aufwiesen. Nach 24 Stunden hingegen konnten enorme Mengen an LPS nachgewiesen werden. Deshalb wurden intrazelluläre Bakterien nach circa vier und 24 Stunden aus Wirtszellen isoliert und für Infektionen frischer MM6-Zellen verwendet. Es wurde deutlich, dass zwar beide Legionellen-„Typen“ mit gleicher Rate phagozytiert wurden, wenngleich nur die Legionellen, die nach 24 Stunden isoliert worden waren, zur intrazellulären Replikation befähigt waren. Auch wenn diese Assays aus Zeitmangel bisher nur zwei Mal durchgeführt werden konnten, könnten sie erste Hinweise darauf geben, dass dem LPS eventuell eine essentielle Funktion für die intrazelluläre Vermehrung zukommt. Es wäre denkbar, dass Legionellen, die kein bzw. kaum LPS besitzen, leicht von Enzymen (z. B. frei vorliegenden Esterasen) der Wirtszellen angegriffen werden, da sie nicht mehr im Besitz ihres hydrophoben „Schutzschildes“ sind. Es wäre aber auch denkbar, dass die Phagosomenmembranen unverändert, d. h. nicht mit LPS assoziiert sind und somit mit Endo- und Lysosomen fusionieren und damit die Degradation internalisierter Legionellen einleiten können.

Kapitel 4 Zusammenfassung

Da das LPS von *L. pneumophila* Sg 1, dem Haupterreger von Legionellose, keine klassische Endotoxinfunktion aufweist und einen ungewöhnlichen strukturellen Aufbau hat, übernimmt dieses Molekül mit großer Wahrscheinlichkeit andere Funktionen, wie beispielsweise Interaktion mit Wirtszellmembranen während einer Infektion, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit herausgearbeitet werden sollten. Ein weiteres Ziel war es, die zeitlichen Abläufe, denen die Rekrutierung von ER und Ribosomen zu *L. pneumophila*-Phagosomen unterliegt, genauer zu untersuchen, da hierfür bis dato nur spärliche Daten vorliegen. Die Prozessierung des LPS, die Erfassung des LPS-Gehaltes und die Assoziation von Legionellen mit Calnexin wurden mittels Immunogoldmarkierungen und Elektronenmikroskopie dargestellt, zur Erfassung der LPS-Synthese dienten RT-PCR Studien mit acht daran beteiligten Genen. Die Untersuchung der Assoziation von Phagosomen und Wirtszellorganellen erfolgte mit konventioneller Elektronenmikroskopie.

Vereinigt man die Ergebnisse der verschiedenen Methodenblöcke, so zeigt es sich, dass bestimmte Zeitpunkte bzw. bestimmte Phasen während einer Infektion besonders herausstechen:

- 0-4 h: Das LPS löst sich von internalisierten Legionellen ab und sammelt sich an inneren Phagosomenmembranen.
Sieben der acht Gene sind inaktiv.
Phagosomen sind nicht bzw. sehr lose mit ER assoziiert und nicht mit Ribosomen besetzt.
 - 5 h: Isolierte intrazelluläre Legionellen weisen drastisch reduzierte Mengen an LPS auf.
Bakterien sind nicht mit Calnexin assoziiert.
Sechs der acht Gene sind wieder aktiv.
Phagosomen werden von jeweils einem Tubulus des rauhen ER umschlossen, sind aber nicht mit Ribosomen besetzt.
 - 6-8 h: Isolierte intrazelluläre Legionellen weisen große Mengen an LPS auf (dieser Versuch wurde nur nach sechs Stunden durchgeführt).
Isolierte intrazelluläre Legionellen sind mit Calnexin assoziiert (dieser Versuch wurde nur nach sechs Stunden durchgeführt).
Sechs der acht Gene sind wieder aktiv.
Phagosomen sind mit aufgeblähtem glatten ER assoziiert und ab diesem Zeitpunkt für die verbleibende Infektion komplett mit Ribosomen besetzt.
 - 9-12 h: Isolierte intrazelluläre Legionellen weisen große Mengen an LPS auf (dieser Versuch wurde nur nach zwölf Stunden durchgeführt).
Alle acht Gene sind aktiv.
Phagosomen sind nicht bzw. sehr lose mit ER assoziiert, aber komplett mit Ribosomen besetzt.
 - 13 h: Alle acht Gene sind aktiv.
Phagosomen sind mit aufgeblähtem glatten ER assoziiert und vollständig mit Ribosomen besetzt.
 - 14-16 h: Alle acht Gene sind aktiv.
Phagosomen sind nicht bzw. sehr lose mit ER assoziiert, aber komplett mit Ribosomen besetzt.
-

- 17-24 h: Isolierte intrazelluläre Legionellen weisen große Mengen an LPS auf (dieser Versuch wurde nur nach 24 Stunden durchgeführt). Ein Gen wird nicht mehr exprimiert, die restlichen sieben Gene bleiben aktiv.
Phagosomen verlieren zuerst den Kontakt mit ER und nachfolgend auch den mit Ribosomen.

Des Weiteren zeigte sich, dass die LPS-Synthese nur einer Regulation unterlag, wenn Legionellen intrazellulär replizierten. Von γ -bestrahlten Legionellen löste sich das LPS in gleicher Weise wie bei lebendigen Legionellen ab, allerdings waren die Phagosomen γ -bestrahlter Legionellen zu keinem Zeitpunkt der Infektion mit ER assoziiert. Diese zwei Prozesse sind demnach unterschiedlich zu werten: während es sich beim LPS-Shedding wohl um einen von der Wirtszelle induzierten Prozess handelt, ist die Assoziation der Phagosomen mit dem ER und Ribosomen wahrscheinlich ein von internalisierten Bakterien getriggert Vorgang. Ob das LPS nach dem Ablösen in Phagosomenmembranen integriert oder nur mit diesen assoziiert ist, lässt sich mit elektronenmikroskopischen Techniken allerdings nicht eindeutig klären. Da sich Legionellen, die sehr wenig LPS exponieren, in Wirtszellen nicht vermehren konnten, kommt dem LPS mit Sicherheit eine essentielle Funktion für das intrazelluläre Überleben zu. Außerdem zeigte sich, dass nach circa zwei Stunden einzelne Phagosomen zu größeren Phagosomen fusionierten und sich das LPS durchgängig in den Fusionszonen nachweisen ließ. Auch dies unterstützt die eben genannte These.

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurden, könnten in weiteren Projekten folgende Aspekte bearbeitet werden:

- Identifizierung und Charakterisierung des Calnexin-Liganden von *L. pneumophila*
 - Biochemischer bzw. biophysikalischer Nachweis der LPS-Integration in Phagosomenmembranen
 - Konstruktion diverser überlebensfähiger LPS-knockout Mutanten
 - Phagozytose- und Replikationsassays mit LPS-knockout Mutanten
 - Fluoreszenzmikroskopische Studien hinsichtlich der Endo- und Lysosomfusion mit LPS-knockout Mutanten enthaltenden Phagosomen
-

Kapitel 7 Literatur

Abu Kwaik Y: The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic reticulum. *Appl Environ Microbiol* **62**; 2022-2028 (1996)

Alli OA, Gao LY, Pedersen LL, Zink S, Radulic M, Doric M, Abu Kwaik Y: Temporal pore formation-mediated egress from macrophages and alveolar epithelial cells by *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **68**; 6431-6440 (2000)

Anuntagool N, Panichakul T, Aramsri P, Sirisinha S: Shedding of lipopolysaccharide and 200-kDa surface antigen during the in vitro growth of virulent Ara⁻ and avirulent Ara⁺ *Burholderia pseudomallei*. *Acta Tropica* **74**; 221-228 (2000)

Andrews HL, Vogel JP, Isberg RR: Identification of linked *Legionella pneumophila* genes essential for intracellular growth and evasion of the endocytic pathway. *Infect Immun* **66**; 950-958 (1998)

Bachman MA und Swanson MS: RpoS co-operates with other factors to induce *Legionella pneumophila* virulence in the stationary phase. *Mol Microbiol* **40**; 1201-1214 (2001)

Bandyopadhyay P, Byrne B, Chan Y, Swanson MS, Steinman HM: *Legionella pneumophila* catalase-peroxidases are required for proper trafficking and growth in primary macrophages. *Infect Immun* **71**; 4526-4535 (2003)

- Barker J**, Lambert PA, Brown MRW: Influence of intra-amoebic and other growth conditions on the surface properties of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **61**; 3503-3510 (1993)
- Bellinger-Kawahara C** und Horwitz MA: 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 (1990)
- Berger KH** und Isberg RR: Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* **7**; 7-19 (1993)
- Berger KH**, Merriam JJ, Isberg RR: Altered intracellular targeting properties associated with mutations in the *Legionella pneumophila dotA* gene. *Mol Microbiol* **14**; 809-822 (1994)
- Byrne B** und Swanson MS: Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. *Infect Immun* **66**; 3029-3034 (1998)
- Cashel M**, Gentry DR, Hernandez VJ, Vinella D: The stringent response. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* : Cellular and Molecular Biology. Neidhardt FC (ed.). Washington DC:American Society for Microbiology Press; 1458-1496
- Cabezón E**, Sastre JI, de la Cruz F: Genetic evidence of a coupling role for the TraG protein family in bacterial conjugation. *Mol Gen Genet* **254**; 400-406 (1997)
- Cianciotto NP**, Eisenstein BI, Mody CH, Toews GB, Engleberg NC: A *Legionella pneumophila* gene encoding a species-specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection. *Infect Immun* **57**, 1255-1262 (1989)
- Cianciotto NP**, Eisenstein BI, Mody CH, Engleberg NC: A mutation in the *mip* gene results in an attenuation of *Legionella pneumophila* virulence. *J Infect Dis* **162**; 121-126 (1990)
- Cianciotto N.**: Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. *Int J Med Microbiol* **291**; 311-343 (2001)
-

- Cianciotto NP** und Fields BS: *Legionella pneumophila mip* gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages. Proc Natl Acad Sci USA **89**; 5188-5191 (1992)
- Clemens DL**, Lee BY, Horwitz MA: Deviant expression of Rab5 on phagosomes containing the intracellular pathogens *Mycobacterium tuberculosis* and *Legionella pneumophila* is associated with altered phagosomal fate. Infect Immun **68**; 2671-2684 (2000a)
- Clemens DL**, Lee BY, Horwitz MA: *Mycobacterium tuberculosis* and *Legionella pneumophila* phagosomes exhibit arrested maturation despite acquisition of Rab7. Infect Immun **68**; 5154-5166 (2000b)
- Coers J**, Kagan JC, Matthews M, Nagai H, Zuckman DM, Roy CR: Identification of lcm protein complexes that play distinct roles in the biogenesis of an organelle permissive for *Legionella pneumophila* intracellular growth. Mol Microbiol **38**; 719-736 (2000)
- Conover GM**, Derre I, Vogel JP, Isberg RR: The *Legionella pneumophila* LidA protein: a translocated substrate of the Dot/lcm system associated with maintenance of bacterial integrity. Mol Microbiol **48**; 305-321 (2003)
- Degen E** und Williams DB: Participation of a novel 88-kD protein in the biogenesis of murine class I histocompatibility molecules. J Cell Biol **112**; 1099-1015 (1991)
- de Ory F**: Evaluation of a new ELISA (Bartels) for detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine. Enferm Infecc Microbiol Clin **20**; 106-109 (2002)
- Den Boer JW**, Yzerman EP, Schellekens J, Lettinga KD, Boshuizen HC, Van Steenberghe JE, Bosman A, Van den Hof S, Van Vliet HA, Peeters MF, Van Ketel RJ, Speelman P, Kool JL, Conyn-Van Spaendonck MA: A large outbreak of Legionnaires' disease at a flower show, the Netherlands, 1999. Emerg Infect Dis **8**; 37-43 (2002)
- Dietrich C**, Heuner K, Brand BC, Hacker J, Steinert M: Flagellum of *Legionella pneumophila* positively affects the early phase of infection of eukaryotic host cells. Infect Immun **69**; 2116-2122 (2001)
-

- Dorn BR**, Dunn WA Jr, Progulske-Fox A: Bacterial interactions with the autophagic pathway. *Cell Microbiol* **4**; 1-10 (2002)
- Dowling JN**, Saha AK, Glew RH: Virulence factors of the family Legionellaceae. *Microbiol Rev* **56**; 32-60 (1992)
- Edelstein PH**: Comparative study of selective media for isolation of *Legionella pneumophila* from potable water. *J Clin Microbiol* **16**; 697-699 (1982)
- Edelstein PH**, Hu B, Higa F, Edelstein MA: *lvgA*, a novel *Legionella pneumophila* virulence factor. *Infect Immun* **71**; 2394-2403 (2003)
- Feeley JC**, Gibson RJ, Gorman GW, Langford NC, Rasheed JK, Mackel DC, Baine WB: Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* **10**; 437-441 (1979)
- Fernandez RC**, Logan SM, Lee SH, Hoffman PS: Elevated levels of *Legionella pneumophila* stress protein Hsp60 early in infection of human monocytes and L929 cells correlate with virulence. *Infect Immun* **64**; 1968-1976 (1996)
- File TM Jr** und Tan JS: Community-acquired pneumonia. The changing picture. *Postgrad Med* **92**; 197-198, 201-208, 211-214 (1992)
- Fischer G**, Bang H, Ludwig B, Mann K, Hacker J: Mip protein of *Legionella pneumophila* exhibits peptidyl-prolyl-cis/trans isomerase (PPIase) activity. *Mol Microbiol* **6**; 1375-1383 (1992)
- Fratti RA**, Chua J, Deretic V: Cellubrevin alterations and *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest. *J Biol Chem* **277**; 17320-17326 (2002)
- Friis-Moller A**, Rechnitzer C, Black FT, Collins MT, Lind K, Aalund O: Prevalence of Legionnaires' disease in pneumonia patients admitted to a Danish department of infectious diseases. *Scand J Infect Dis* **18**; 321-328 (1986)
- Fumarola D** und Pece S: Multiple organ involvement by *Legionella pneumophila*: pathogenic mechanisms. *Eur J Epidemiol* **8**; 142-143 (1992)
- Gabay JE**, Blake M, Niles WD, Horwitz MA: Purification of *Legionella pneumophila* major outer membrane protein and demonstration that it is a porin. *J Bacteriol* **162**; 85-91 (1985)
-

- Ganguli S**, Zapata G, Wallis T, Reid C, Boulnois G, Vann WF, Roberts IS: Molecular cloning and analysis of genes for sialic acid synthesis in *Neisseria meningitidis* group B and purification of the meningococcal CMP-NeuNAc synthetase enzyme. *J Bacteriol* **176**; 4583-4589 (1994)
- Gao LY**, Harb OS, Abu Kwaik Y: Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa. *Infect Immun* **65**; 4738-4746 (1997)
- Gao LY**, Stone BJ, Brieland JK, Abu Kwaik Y: Different fates of *Legionella pneumophila* *pmi* and *mil* mutants within macrophages and alveolar epithelial cells. *Microb Pathog* **25**; 291-306 (1998)
- Garcia-del Portillo F**, Stein MA, Finlay BB: Release of lipopolysaccharide from intracellular compartments containing *Salmonella typhimurium* to vesicles of the host epithelial cell. *Infect Immun* **65**; 24-34 (1997)
- Garduño RA**, Faulkner G, Trevors MA, Vats N, Hoffman PS: Immunolocalization of Hsp60 in *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol* **180**; 505-513 (1998a)
- Garduño RA**, Garduño E, Hoffman PS: Surface-associated hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model. *Infect Immun* **66**; 4602-4610 (1998b)
- Garduño RA**, Garduño E, Hiltz M, Hoffman PS: Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms. *Infect Immun* **70**; 6273-6283 (2002)
- Gerhardt H**, Walz MJ, Faigle M, Northoff H, Wolburg H, Neumeister B: Localization of *Legionella* bacteria within ribosome-studded phagosomes is not restricted to *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiol Lett* **192**; 145-152 (2000)
- Girard R**, Pedron T, Uematsu S, Balloy V, Chignard M, Akira S, Chaby R: Lipopolysaccharides from *Legionella* and *Rhizobium* stimulate mouse bone marrow granulocytes via Toll-like receptor 2. *J Cell Sci* **116**; 293-302 (2003)
- Glauser MP**, Zanetti G, Baumgartner JD, Cohen J: Septic shock; pathogenesis. *Lancet* **338**; 732-736 (1991)
-

- Hammer BK** und Swanson MS: Co-ordination of *Legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp. *Mol Microbiol* **33**; 721-731 (1999)
- Hammer BK**, Tateda ES, Swanson MS: A two-component regulator induces the transmission phenotype of stationary-phase *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* **44**; 107-118 (2002)
- Hasan Z**, Schlax C, Kuhn L, Lefkovits I, Young D, Thole J, Pieters J: Isolation and characterization of the mycobacterial phagosome: segregation from the endosomal/lysosomal pathway. *Mol Microbiol* **24**; 545-553 (1997)
- Helbig JH**, Engelstädter T, Maiwald M, Uldum SA, Witzleb W, Lück PC: Diagnostic relevance of the detection of *Legionella* DNA in urine samples by the polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **18**; 716-722 (1999)
- Helbig JH**, Witt M, Jacobs E, Lück PC: Phase variation of a *Legionella pneumophila* serogroup 1 common lipopolysaccharide component during intraphagosomal replication inside amoebal and human cells. *IJMM* **293**; 177 (2003)
- Helbig JH**, Lück PC, Steinert M, Jacobs E, Witt M: Immunolocalization of the Mip protein of intracellularly and extracellularly grown *Legionella pneumophila*. *Lett Appl Microbiol* **32**; 83-88 (2001)
- Hellman J**, Loisel PM, Tehan MM, Allaire JE, Boyle LA, Kurnick JT, Andrews DM, Sik KK, Warren HS: Outer membrane protein A, peptidoglycan-associated lipoprotein, and murein lipoprotein are released by *Escherichia coli* bacteria into serum. *Infect Immun* **68**; 2566-2572 (2000)
- Hervas JA**, Lopez P, de la Fuente A, Alomar P: Multiple organ system failure in an infant with *Legionella* infection. *Pediatr Infect Dis J* **7**; 671-673 (1988)
- Heuner K**, Brand BC, Hacker J: The expression of the flagellum of *Legionella pneumophila* is modulated by different environmental factors. *FEMS Microbiol Lett* **175**; 69-77 (1999)
- Heuner K**, Steinert M: The flagellum of *Legionella pneumophila* and its link to the expression of the virulent phenotype. *Int J Med Microbiol* **293**; 133-143 (2003)
-

Hilbi H, Segal G, Shuman HA: *lcm/dot*-dependent upregulation of phagocytosis by *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* **42**; 603-617 (2001)

Hoffman PS, Pine L, Bell S: Production of superoxide and hydrogen peroxide in medium used to culture *Legionella pneumophila*: catalytic decomposition by charcoal. *Appl Environ Microbiol* **45**; 784-791 (1983)

Horwitz MA: Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *J Exp Med* **15**; 1319-1331 (1983)

Horwitz MA und Maxfield FR: *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *J Cell Biol* **99**; 1936-1943 (1984)

Johnson JT, Yu VL, Best MG, Vickers RM, Goetz A, Wagner R, Wicker H, Woo A: Nosocomial legionellosis in surgical patients with head-and-neck cancer: implications for epidemiological reservoir and mode of transmission. *Lancet* **2**; 298-300 (1985)

Kadurugamuwa JL und Beveridge TJ: Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J Bacteriol* **177**; 3998-4008 (1995)

Kadurugamuwa JL und Beveridge TJ: Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics. *J Bacteriol* **178**; 2767-74 (1996)

Kadurugamuwa JL und Beveridge TJ: Natural release of virulence factors in membrane vesicles by *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of aminoglycoside antibiotics on their release. *J Antimicrob Chemother* **40**; 615-21 (1997)

Kagan JC und Roy CR: *Legionella* phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites. *Nat Cell Biol* **4**; 945-954 (2002)

Katz SM und Hashemi S: Electron microscopic examination of the inflammatory response to *Legionella pneumophila* in guinea pigs. *Lab Invest* **46**; 24-32 (1982)

Kirby JE, Vogel JP, Andrews HL, Isberg RR: Evidence for pore-forming ability by *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* **27**; 323-336 (1998)

- Knirel YA**, Rietschel ET, Marre R, Zähringer U: The structure of the O-specific chain of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. Eur J Biochem **221**; 239-245 (1994)
- Köhler R**, Fanghanel J, König B, Lüneberg E, Frosch M, Rahfeld JU, Hilgenfeld R, Fischer G, Hacker J, Steinert M: Biochemical and functional analyses of the Mip protein: influence of the N-terminal half and of peptidylprolyl isomerase activity on the virulence of *Legionella pneumophila*. Infect Immun **71**; 4389-4397 (2003)
- Köhler RB**, Zimmerman SE, Wilson E, Allen SD, Edelstein PH, Wheat LJ, White A: Rapid radioimmunoassay diagnosis of Legionnaires' disease: detection and partial characterization of urinary antigen. Ann Intern Med **94**; 601-605 (1981)
- Lauring B**, Kreibich G, Weidmann M: The intrinsic ability of ribosomes to bind to endoplasmic reticulum membranes is regulated by signal recognition particle and nascent-polypeptide-associated complex. Proc Natl Acad Sci USA **92**; 9435-9439 (1995)
- Lettinga KD**, Florquin S, Speelman P, van Ketel R, van der Poll T, Verbon A: Toll-like receptor 4 is not involved in host defense against pulmonary *Legionella pneumophila* infection in a mouse model. J Infect Dis **168**; 570-573 (2002)
- Lührmann A**, Streker K, Schuttfort A, Daniels JJ, Haas A: *Afipia felis* induces uptake by macrophages directly into a nonendocytic compartment. Proc Natl Acad Sci USA **98**; 7271-7276 (2001)
- Lüneberg E**, Zähringer U, Knirel YA, Steinmann D, Hartmann M, Steinmetz I, Rohde M, Kohl J, Frosch M: Phase-variable expression of lipopolysaccharide contributes to the virulence of *Legionella pneumophila*. J Exp Med **188**; 49-60 (1998)
- Lüneberg E**, Zetzmann N, Alber D, Knirel YA, Kooistra O, Zähringer U, Frosch M: Cloning and functional characterization of a 30 kb gene locus required for lipopolysaccharide biosynthesis in *Legionella pneumophila*. Int J Med Microbiol **290**; 37-49 (2000)
-

Macfarlane JT, Finch RG, Laverick A, Macrae AD: Pittsburgh pneumonia agent and legionellosis in Nottingham. *Br Med J (Clin Res Ed)*. **283**; 1222 (1981)

Marra A, Blander SJ, Horwitz MA, Shuman HA: Identification of a *Legionella pneumophila* locus required for intracellular multiplication in human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**; 6907-9611 (1992)

Masson L und Holbein BE: Physiology of sialic acid capsular polysaccharide synthesis in serogroup B *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* **154**; 728-736 (1983)

Matthews M und Roy CR: Identification and subcellular localization of the *Legionella pneumophila* IcmX protein: a factor essential for establishment of a replicative organelle in eukaryotic host cells. *Infect Immun* **68**; 3971-3982 (2000)

Mayrand D und Holt SC: Biological activities of outer membrane vesicles. *Can J Microbiol* **35**; 607-613 (1988)

Mills SD und Finlay BB: Isolation and characterization of *Salmonella typhimurium* and *Yersinia pseudotuberculosis*-containing phagosomes from infected mouse macrophages: *Y. pseudotuberculosis* traffics to terminal lysosomes where they are degraded. *Eur J Cell Biol* **77**; 35-47 (1998)

Mirlashari MR, Hoiby EA, Holst J, Lyberg T: Outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*: effects on cytokine production in human whole blood. *Cytokine* **13**; 91-97 (2001)

Mirlashari MR, Hoiby EA, Holst J, Lyberg T: Outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. *APMIS* **110**; 193-204 (2002)

Molmeret M, Alli OA, Zink S, Flieger A, Cianciotto NP, Kwaik YA: *icmT* is essential for pore formation-mediated egress of *Legionella pneumophila* from mammalian and protozoan cells. *Infect Immun* **70**; 69-78 (2002)

Molmeret M, Zink SD, Han L, Abu-Zant A, Asari R, Bitar DM, Abu Kwaik Y: Activation of caspase-3 by the Dot/Icm virulence system is essential for arrested biogenesis of the *Legionella*-containing phagosome. *Cell Microbiol* **6**; 33-48 (2004)

- Molofsky AB** und Swanson MS: *Legionella pneumophila* CsrA is a pivotal repressor of transmission traits and activator of replication. *Mol Microbiol* **50**; 445-461 (2003)
- Monforte R**, Marco F, Estruch R, Campo E: Multiple organ involvement by *Legionella pneumophila* in a fatal case of Legionnaires' disease. *J Infect Dis* **159**; 809 (1989)
- Muder RR**, Yu VL, McClure JK, Kroboth FJ, Kominos SD, Lumish RM: Nosocomial Legionnaires' disease uncovered in a prospective pneumonia study. *JAMA* **249**; 3184-3188 (1983)
- Nagai H** und Roy CR: The DotA protein from *Legionella pneumophila* is secreted by a novel process that requires the Dot/Icm transporter. *EMBO J* **20**; 5962-5970 (2001)
- Nagai H**, Kagan JC, Zhu X, Kahn RA, Roy CR: A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on *Legionella* phagosomes. *Science* **295**; 679-682 (2002)
- Neumeister B**: Legionelleninfektionen-Epidemiologie, Diagnostik, Klinik und Pathogenese. *Clin Lab* **42**; 715-729 (1996)
- Neumeister B**, Faigle M, Sommer M, Zähringer U, Stelter F, Menzel R, Schutt C, Northoff H: Low endotoxic potential of *Legionella pneumophila* lipopolysaccharide due to failure of interaction with the monocyte lipopolysaccharide receptor CD14. *Infect Immun* **66**; 4151-4157 (1998)
- Neumeister B**, Faigle M, Lauber K, Northoff H, Wesselborg S: *Legionella pneumophila* induces apoptosis via the mitochondrial death pathway. *Microbiology* **148**; 3639-3650 (2002)
- Pasculle AW**, Feeley JC, Gibson RJ, Cordes LG, Myerowitz RL, Patton CM, Gorman GW, Carmack CL, Ezzell JW, Dowling JN: Pittsburgh pneumonia agent: direct isolation from human lung tissue. *J Infect Dis* **141**; 727-732 (1980)
- Payne NR** und Horwitz MA: Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors. *J Exp Med* **166**; 1377-1389 (1987)
-

Perera VY, Wardlaw AC, Freer JH: Release of pertussis toxin and its interaction with outer-membrane antigens. *J Gen Microbiol* **133**; 2427-2435 (1987)

Purcell M und Shuman HA: The *Legionella pneumophila icmGCDJBF* genes are required for killing of human macrophages. *Infect Immun* **66**; 2245-2255 (1998)

Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Ulmer AJ, Holst O, Brade H, Schmidt G, Mamat U, Grimmecke HD, Kusumoto S, Zähringer U: The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity. *Immunobiol* **187**; 169-190 (1993)

Rossier O, Starkenburg SR, Cianciotto NP: *Legionella pneumophila* type II protein secretion promotes virulence in the A/J mouse model of Legionnaires' disease pneumonia. *Infect Immun* **72**; 310-321 (2004)

Roy CR und Isberg RR: Topology of *Legionella pneumophila* DotA: an inner membrane protein required for replication in macrophages. *Infect Immun* **65**; 571-578 (1997)

Roy CR, Berger KH, Isberg RR: *Legionella pneumophila* DotA protein is required for early phagosome trafficking decisions that occur within minutes of bacterial uptake. *Mol Microbiol* **28**; 663-674 (1998)

Roy CR und Tilney LG: The road less traveled: transport of *Legionella* to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **158**; 415-419 (2002)

Ruf B, Schurmann D, Horbach I, Fehrenbach FJ, Pohle HD: The incidence of *legionella* pneumonia: a 1-year prospective study in a large community hospital. *Lung* **167**; 11-22 (1989)

Sadosky AB, Wiater LA, Shuman HA: Identification of *Legionella pneumophila* genes required for growth within and killing of human macrophages. *Infect Immun* **61**; 5361-5373 (1993)

Sedgwick AK und Tilton RC: Identification of *Legionella pneumophila* by latex agglutination. *J Clin Microbiol* **17**; 365-368 (1983)

Segal G und Shuman HA: Characterization of a new region required for macrophage killing by *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **65**; 5057-5066 (1997)

- Segal G**, Purcell M, Shuman HA: Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome. Proc Natl Acad Sci USA **95**; 1669-1674 (1998)
- Stenzel DJ** und Kara UA: Sorting of malarial antigens into vesicular compartments within the host cell cytoplasm as demonstrated by immunoelectron microscopy. Eur J Cell Biol **49**; 311-318 (1989)
- Stone BJ**, Brier A, Kwaik YA: The *Legionella pneumophila prp* locus; required during infection of macrophages and amoebae. Microb Pathog **27**; 369-376 (1999)
- Sturgill-Koszycki S**, Swanson MS: *Legionella pneumophila* replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. J Exp Med **192**; 1261-1272 (2000)
- Swanson MS** und Isberg RR: Formation of the *Legionella pneumophila* replicative phagosome. Infect Agents Dis **2**; 224-226 (1993)
- Swanson MS** und Isberg RR: Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic reticulum. Infect Immun **63**; 3609-3620 (1995)
- Szabackai G**, Chami M, Pinton P, Rizzuto R: Modulation of calcium homeostasis by the endoplasmic reticulum in health and disease. In Eggleton P. und Michalak M. Calreticulin 21 ff (2003)
- Tilney LG**, Harb OS, Connelly PS, Robinson CG, Roy CR: How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. J Cell Sci **114**; 4637-4650 (2001)
- Via LE**, Deretic D, Ulmer RJ, Hibler NS, Huber LA, Deretic V: Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. J Biol Chem **272**; 13326-13331 (1997)
- Viswanathan VK**, Edelstein PH, Pope CD, Cianciotto NP: The *Legionella pneumophila iraAB* locus is required for iron assimilation, intracellular infection, and virulence. Infect Immun **68**; 1069-1079 (2000)
-

- Vogel JP**, Andrews HL, Wong SK, Isberg RR: Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science* **279**; 873-876 (1998)
- Waanders H**, Dik H, Meinders AE: *Legionella* pneumonia complicated by adult respiratory distress syndrome. *Neth J Med* **38**; 159-166 (1991)
- Watarai M**, Andrews HL, Isberg RR: Formation of a fibrous structure on the surface of *Legionella pneumophila* associated with exposure of DotH and DotO proteins after intracellular growth. *Mol Microbiol* **29**; 313-329 (2001)
- Weissgerber P**, Faigle M, Northoff H, Neumeister B: Investigation of mechanisms involved in phagocytosis of *Legionella pneumophila* by human cells. *FEMS Microbiol Lett* **219**; 173-179 (2003)
- White A**, Kohler RB, Wheat LJ, Sathapatayavongs B, Winn WC Jr, Girod JC, Edelstein PH: Rapid diagnosis of Legionnaires' disease. *Trans Am Clin Climatol Assoc* **93**; 50-62 (1981)
- Wiater LA**, Dunn K, Maxfield FR, Shuman HA: Early events in phagosome establishment are required for intracellular survival of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **66**; 4450-4460 (1998)
- Wieland H**, Faigle M, Lang F, Northoff H, Neumeister B: Regulation of the *Legionella mip*-promotor during infection of human monocytes. *FEMS Microbiol Lett* **212**; 127-132 (2002)
- Williams A**, Peh CA, Elliott T: The cell biology of MHC class I antigen presentation. *Tissue Antigens* **59**; 3-17 (2002)
- Xu S**, Cooper A, Sturgill-Koszycki S, van Heyningen T, Chatterjee D, Orme I, Allen P, Russell DG: Intracellular trafficking in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*-infected macrophages. *J Immunol* **153**; 2568-78 (1994)
- Zähringer U**, Knirel YA, Lindner B, Helbig JH, Sonesson A, Marre R, Rietschel ET: The lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1 (strain Philadelphia): chemical structure and biological significance. *Bacterial Endotoxins: Lipopolysaccharides From Genes to Therapy*; 113-139 (1995)
- Ziegler-Heitbrock HW**, Thiel E, Futterer A, Herzog V, Wirtz A, Riethmüller G: Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int J Cancer* **41**; 456-461 (1988)
-

Zink SD, Pedersen L, Cianciotto NP, Abu-Kwaik Y: The Dot/Icm type IV secretion system of *Legionella pneumophila* is essential for the induction of apoptosis in human macrophages. *Infect Immun* **70**; 1657-1663 (2002)

Zuckman DM, Hung JB, Roy CR: Pore-forming activity is not sufficient for *Legionella pneumophila* phagosome trafficking and intracellular growth. *Mol Microbiol* **32**; 990-1001 (1999)

LEBENS LAUF

ANGABEN ZUR PERSON

- Geboren am 05. Juli 1974 in Göppingen
- Nationalität deutsch
- Familienstand ledig

AUSBILDUNG

1981–1984 Silcher-Grundschule **Eislingen**

1984 - 1994 Hohenstaufen-Gymnasium **Göppingen**

- Abschluss Allgemeine Hochschulreife (Note 2,5)

1994 - 2001 Universität Hohenheim **Stuttgart**

- Abschluss Diplom Lebensmittelingenieurin (Note 2,4)
- Durchführung der Diplomarbeit „Starterkulturen für die Erzeugung streichfähiger Rohwürste mit dem Potential zur Erhöhung der Produktsicherheit“ am Institut für Lebensmittelmikrobiologie in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. W. P. Hammes (Note 1,3)
- Zusatzfach „Qualitätsmanagement gemäß DIN ISO. 9000 ff.“

2001 - 2004 Eberhard Karls Universität **Tübingen**

- Promotionsarbeit „*Legionella pneumophila* – intrazelluläre *de novo* LPS-Synthese und Assoziation des Phagosoms mit dem endoplasmatischen Retikulum während der intrazellulären Vermehrung in humanen Monozyten“ in der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. med. B. Neumeister, Abt. f. Transfusionsmedizin in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. H. Wolburg, Inst. f. Pathologie
- Währenddessen Stipendiatin des Graduiertenkollegs „Infektionsbiologie“ an der Fakultät für Biologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. F. Götz
- Vorträge:
 - “Intrazelluläre Mechanismen bei Legionellen-Infektionen.“ Statusseminar Gkl München „Infektion und Immunität“ und Gkl Tübingen „Infektionsbiologie“. 07. – 09. 12. 2001, Herrsching
 - “Detection of *Legionella pneumophila* in MM6-cells by immunogold-techniques.“ Statusseminar Gkl München „Infektion und Immunität“ und Gkl Tübingen „Infektionsbiologie“. 21. – 23. 06. 2002, Hirschegg
 - “Intracellular processing of *Legionella pneumophila* LPS in human monocytes.“ 55. DGHM-Tagung. 28. 09. – 01. 10. 2003, Dresden
- Veröffentlichungen:
 - “Intracellular processing of *L. pneumophila* LPS during multiplication within human monocytes” (Eingereicht bei Cellular Microbiology)

