

Untersuchung der *Legionella*-Infektion in der genetisch
manipulierbaren Amöbe *Dictyostelium discoideum*

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Marcela Fajardo-Moser
aus Santafé de Bogotá

Würzburg, 2006

Eingereicht am: _____

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr.

1. Gutachter: PD Dr. Michael Steinert

2. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Kreft

Tag des Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation

„Untersuchung der *Legionella*-Infektion in der genetisch
manipulierbaren Amöbe *Dictyostelium discoideum*“

in allen Teilen selbstständig angefertigt und keine anderen als die genannten Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Weiterhin versichere ich, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe bisher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, September 2006

Marcela Fajardo-Moser

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Jörg Hacker danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Molekulare Infektionsbiologie und für sein stetes Interesse am Fortgang und Erfolg dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn PD Dr. Michael Steinert, der während meiner Arbeit und bei der Erstellung des Manuskripts immer regen Anteil genommen hat. Seine fachliche und persönliche Unterstützung hat entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Kreft danke ich für die freundliche Übernahme der Zweitbegutachtung dieser Arbeit.

Bei Prof. Dr. Günther Gerisch, Prof. Dr. Michael Schleicher, Prof. Dr. Angelika Noegel und Prof. Dr. Salvatore Bozzaro bedanke ich mich für die Bereitstellung der *Dictyostelium*-Mutanten.

Allen Mitarbeitern des Institutes und vor allem den Kollegen im „*Legionella*-Labor“ danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Bei Silke Killinger und Anne Urvat möchte ich mich für ihre Unterstützung bei den Infektionsversuchen bedanken. Hilde Merkert und Arthur Altenhöfer danke ich für ihre Hilfe bei allen möglichen technischen Fragen. Christine Hambrecht und Johannes Schnitzer danke ich für ihre fleißige Suche nach Rechtschreibfehlern.

Der größte Dank kommt allerdings meiner Familie zu. Insbesondere meinem Mann Frank bin ich für seine Geduld, sein Verständnis und seinen Zuspruch von Herzen dankbar.

De todo corazón quiero agradecerle a mi madre todo el apoyo, la ayuda y la comprensión me ha brindado durante toda mi carrera y por estar siempre a mi lado a pesar de la distancia.

Para mis padres

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	1
SUMMARY	3
EINLEITUNG	5
1 Legionärskrankheit	6
2 Pontiac Fieber	7
3 Immunantwort des Wirtes	7
4 Natürliche Lebensräume der Gattung <i>Legionella</i>.....	8
5 Aufnahmemechanismen von <i>Legionella</i>	10
5.1 Virulenzfaktoren für die Aufnahme in die Wirtszelle.....	12
6 Intrazelluläre Replikation von <i>Legionella</i>.....	13
6.1 Pathogenitätsfaktoren für die Replikation von <i>Legionella</i>	15
6.1.1 Sekretionssysteme und extrazelluläre Virulenzfaktoren.....	15
6.1.2 Proteine der äußeren Membran.....	17
6.1.3 Mechanismen der Eisenaufnahme in <i>Legionella</i>	18
6.1.4 Stressantwort und weitere Virulenzassoziierte Loci.....	19
7 Lyse des Wirtes durch <i>Legionella</i>	20
8 <i>Dictyostelium discoideum</i> als Modellsystem für die <i>Legionella</i>-Infektion.....	22
9 Aufnahmemechanismen von <i>D. discoideum</i>	25
10 Phagosombiogenese in <i>D. discoideum</i>	27
11 Calreticulin und Calnexin: Kalzium-bindende Proteine im ER.....	28
12 Kalzium als sekundärer Botenstoff der Zelle.....	30
13 Zielsetzung der Arbeit.....	32
MATERIAL UND METHODEN	33
1 Bakterienstämme, Wirtszellen und <i>Dictyostelium</i>-Mutanten.....	34
1.1 Bakterienstämme.....	34
1.2 Wirtszellen.....	35
1.3 <i>Dictyostelium</i> AX2-Mutanten	35
1.4 GFP-transformierte <i>Dictyostelium</i> AX2-Mutanten	36

2	Antikörper, Vektoren, Oligonukleotide und Größenmarker.....	36
2.1	Antikörper.....	37
2.2	Vektoren.....	37
2.3	Oligonukleotide.....	37
2.4	Größenmarker.....	37
3	Chemikalien.....	38
3.1	Inhibitoren.....	38
4	Geräte.....	39
5	Flüssigmedien und Nährboden für die Anzucht der Bakterienstämme.....	40
5.1	Konservierung der Bakterienstämme.....	41
6	Zellbiologische Methoden.....	41
6.1	Anzucht von <i>D. discoideum</i>	41
6.2	Konservierung von <i>D. discoideum</i> -Sporen und Trophozoiten.....	41
6.3	Kultivierung und Konservierung von <i>A. castellanii</i>	42
6.4	Kultivierung und Konservierung der humanen Makrophagenzelllinie U937.....	42
6.5	In der Zellkultur verwendete Medien und Puffer.....	43
6.6	Bestimmung der Zellvitalität.....	44
7	Infektion von <i>D. discoideum</i>.....	44
7.1	Quantifizierung der Phagozytoserate durch Bestimmung des CFU-Wertes.....	44
7.2	Quantifizierung der Phagozytoserate durch FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting).....	45
7.3	Quantifizierung der intrazellulären Vermehrung mittels CFU-Wert-Bestimmung...	45
8	Infektion von U937 - Zellen.....	46
8.1	Quantifizierung der Phagozytoserate durch Bestimmung des CFU-Wertes.....	46
8.2	Quantifizierung der Phagozytoserate durch FACS-Analyse.....	46
8.3	Quantifizierung der intrazellulären Vermehrung mittels Bestimmung des CFU-Wertes.....	47
9	Infektion von <i>A. castellanii</i>.....	47
9.1	Quantifizierung der intrazellulären Vermehrung mittels CFU-Wert-Bestimmung...	47
10	Proteinbiochemische Methoden.....	48
10.1	Präparation von Gesamtzellproteinlysat.....	48
10.2	Bestimmung der Proteinmenge nach Lowry.....	49
10.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	49
10.4	Coomasie-Färbung von Proteinen.....	51
10.5	Westernblot.....	51
10.6	Antikörper-Reaktion.....	52
11	Molekularbiologische Methoden.....	53
11.1	Präparation von Plasmid-DNA.....	53
11.2	Horizontale-Gelelektrophorese.....	54
11.3	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	55
11.4	Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen.....	55
11.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	55

11.6	Ligation von Vektor- und Insert-DNA	57
11.7	CaCl ₂ -Transformation von <i>E. coli</i>	57
11.8	Elektroporation	58
12	Mikroskopische Methoden	58
12.1	Transmission Elektronenmikroskopie	58
12.1.1	Fixierung der Proben	58
12.1.2	Dehydratation und Kunstharzeinbettung	59
12.1.3	Präparation der Ultradünnschnitte	59
12.2	Konfokale „Laser-Scanning“ Mikroskopie	60
12.2.1	Beobachtung vitaler Zellen mittels der Agar-Overlay-Methode	60
13	Bestimmung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration	61
13.1	Beladung von <i>Dictyostelium</i> -Zellen mit Fura-2-dextran.....	61
13.2	Beladung von U937-Zellen mit Fura-2-Acetoxy-methylester	62
13.3	Beladung von U937-Zellen mit Fluo-4-AM	63
ERGEBNISSE		65
1	<i>Dictyostelium discoideum</i> als Wirtszellsystem für <i>Legionella</i>	66
1.1	Bestimmung der optimalen Infektionsbedingungen.....	66
1.1.1	Vergleich der <i>L. pneumophila</i> -Infektion in verschiedenen Wirtszellsystemen	67
1.2	<i>D. discoideum</i> als Modellsystem für LLAP-Stämme.....	69
1.2.1	Untersuchung der intrazellulären Vermehrung von LLAPs in <i>Dictyostelium</i> -Zellen mittels Elektronenmikroskopie	70
1.3	Zusammenfassung.....	73
2	Untersuchung der Aufnahmemechanismen von <i>L. pneumophila</i> in <i>D. discoideum</i> ..	74
2.1	Einfluss des Aktinzytoskelettes auf die Aufnahme von <i>Legionella</i>	74
2.2	Charakterisierung der Signalübertragungswege während der <i>Legionella</i> -Infektion ..	76
2.2.1	Die Phospholipase C Aktivität ist für die Phagozytose von <i>Legionella</i> erforderlich.....	76
2.2.2	Ca ²⁺ -abhängige Aufnahme von <i>L. pneumophila</i> in <i>D. discoideum</i>	78
2.2.3	Die Phagozytose von <i>L. pneumophila</i> findet unabhängig von der PI 3-Kinase-Aktivität statt	80
2.2.4	Die Tyrosinkinase-Aktivität beeinflusst die Aufnahme von <i>Legionella</i> in <i>Dictyostelium</i>	81
2.3	Vergleich des Aufnahmeprozesses in <i>D. discoideum</i> und U937-Zellen.....	82
2.4	Analyse der Expression Tyrosin-phosphorylierter Proteine während der Aufnahme von <i>L. pneumophila</i>	84
2.5	Zusammenfassung.....	87
3	Untersuchung der <i>Legionella</i>-Infektion durch den Einsatz spezifischer <i>D. discoideum</i> Mutanten	88
3.1	Einfluss aktinbindender Proteine auf die Phagozytose von <i>Legionella</i> in <i>Dictyostelium</i>	88
3.2	Einfluss von Zytoskelett-Proteinen auf die intrazelluläre Vermehrung von <i>Legionella</i> in <i>D. discoideum</i>	91
3.3	Einfluss verschiedener Regulationsproteine auf die Phagozytose von <i>Legionella</i> in <i>Dictyostelium</i>	93
3.3.1	G-Protein-vermittelte Signalgebung ist an der Aufnahme von <i>Legionella</i> beteiligt....	93

3.2.2	Einfluss von Ca ²⁺ -bindenden Proteine auf die Aufnahme von <i>Legionella</i>	95
3.4	Einfluss verschiedener Regulationsproteine auf die intrazelluläre Vermehrung von <i>Legionella</i> in <i>D. discoideum</i>	97
3.5	Zusammenfassung.....	99
4	Lokalisierung verschiedener GFP-markierter Proteine während der <i>Legionella</i>-Infektion.....	100
4.1	Zusammenfassung.....	107
5	Untersuchung der Ca²⁺-abhängigen Signaltransduktion während der Aufnahme von <i>L. pneumophila</i>.....	107
5.1	Einfluss verschiedener Virulenzfaktoren von <i>Legionella</i> auf die Ca ²⁺ -Signaltransduktion.....	113
5.2	Hemmung der Ca ²⁺ -Signaltransduktion in U937-Zellen durch <i>Mycobacterium avium</i>	116
1.3	Zusammenfassung.....	117
DISKUSSION.....		118
1	<i>D. discoideum</i> als Modellsystem für die <i>Legionella</i> -Infektion	119
2	Die Aufnahme von <i>L. pneumophila</i> in <i>D. discoideum</i> ist ein Aktin-abhängiger Prozess.....	122
3	Die Phagozytose von <i>Legionella</i> wird über den PLC-Pathway reguliert.....	129
4	Die Ca ²⁺ -Signaltransduktion ist unentbehrlich für die Aufnahme von <i>Legionella pneumophila</i>	133
5	Calreticulin und Calnexin sind an der Aufnahme und intrazellulären Vermehrung von <i>Legionella</i> beteiligt.....	135
LITERATURVERZEICHNIS.....		140
ANHANG.....		163
1.	Abkürzungen	164
2.	Publikationen.....	166
3.	Tagungsbeiträge.....	166
4.	Lebenslauf	167

ZUSAMMENFASSUNG

Das Gram-negative Bakterium *Legionella pneumophila*, der Erreger der Legionärskrankheit, ist ein fakultativ intrazelluläres Pathogen von Protozoen und humanen Phagozyten. Nach der Aufnahme befindet sich das Bakterium innerhalb einer spezialisierten Vakuole, die weder angesäuert wird noch mit Lysosomen fusioniert. Viele der Virulenzfaktoren von *Legionella*, die eine Kolonisierung des Wirtes und eine Umwandlung des Phagosoms ermöglichen, konnten in den letzten Jahren aufgeklärt werden. Die Wirtszellfaktoren, die für eine erfolgreiche Infektion benötigt werden, sind dagegen noch weitgehend unbekannt. Das gut charakterisierte Amöbenmodell, *Dictyostelium discoideum*, hat sich für die Untersuchung der *Legionella*-Wirt-Interaktion als gut geeignet erwiesen. In der vorliegenden Arbeit konnten durch den Einsatz von zellulären Inhibitoren, definierten *Dictyostelium*-Mutanten und intrazellulären Kalziummessungen, neue Erkenntnisse über den zellulären Verlauf der *Legionella*-Infektion gewonnen werden.

Die pharmakologische Störung des Aktinzytoskeletts der Wirtszelle führt zu einer signifikanten Reduktion in der Aufnahme der Legionellen. Eine verminderte Phagozytoserate der Bakterien in *Dictyostelium*-Zellen, bei denen die aktinbindenden Proteine α -Aktinin/ABP120, ASP56/CAP, Coronin, DAip1, LimC/LimD oder Villidin fehlen, bestätigt die Notwendigkeit der Aktinfilamente für die Phagozytose von *Legionella*. Darüber hinaus konnte in lebenden *Dictyostelium*-Zellen eine spezifische Akkumulierung von GFP-markierten Coronin an den „phagocytic cups“ nachgewiesen werden. Ferner sind α -Aktinin/ABP120, LimC/LimD und Villidin an der intrazellulären Vermehrung von *L. pneumophila* beteiligt.

Die Reorganisation des Zytoskeletts wird bei der konventionellen Phagozytose in *D. discoideum* über das Phospholipase C (PLC)-Signaltransduktionssystem reguliert. Dabei führt die Bindung eines extrazellulären Signalmoleküls an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor zur Aktivierung des heterotrimeren G-Proteins, das wiederum PLC stimuliert. Die darauf folgende Spaltung von PIP₂ in IP₃ und DAG führt letztendlich zu einer Entleerung der Ca²⁺-Speicher aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER). Die Hemmung der PLC durch U73122 und Neomycinsulfat führt in den *Dictyostelium*-Zellen zu einer starken Verringerung in der Phagozytoserate von *Legionella*. Ein deutlicher Aufnahmedefekt in einer G-Protein-Mutante von *D. discoideum* belegt ebenfalls, dass die Internalisierung von *Legionella* von der PLC-Signalkaskade abhängig ist.

Mehrere Studien haben bereits bestätigt, dass die Vermehrung der Bakterien in einer ER-assoziierten Organelle stattfindet. Der Zeitpunkt der ersten Interaktion mit ER-Bestandteilen

bleibt allerdings umstritten. Das lösliche Protein Calreticulin (CRT) und das Transmembranprotein Calnexin (CNX) sind ubiquitäre Ca^{2+} -bindende Chaperone des ERs. In dieser Arbeit wurde die Beteiligung beider Proteine an der *Legionella*-Infektion näher charakterisiert. CNX- und CRT-*Dictyostelium*-knock-out-Mutanten weisen einen *Legionella*-spezifischen Aufnahmedefekt auf. Darüber hinaus sind beide Proteine für die intrazelluläre Replikation der Bakterien notwendig. Um die Dynamik des ERs während der *Legionella*-Infektion zu untersuchen, wurden im konfokalen Mikroskop Bilderreihen von *Dictyostelium*-Zellen aufgenommen, die CNX-GFP oder GFP-CRT exprimieren. Beide Proteine werden spezifisch zu den „phagocytic cups“ rekrutiert und umhüllen anschließend das *Legionella*-Phagosom während der gesamten Dauer der Infektion.

Das ER stellt die wichtigste Ca^{2+} -Quelle für die zelluläre Ca^{2+} -Signalgebung dar. Änderungen in der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration dienen der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse. In dieser Arbeit wurde die Rolle der Ca^{2+} -Signalgebung während der *Legionella*-Infektion charakterisiert. Die Zugabe von extrazellulären und intrazellulären Ca^{2+} -Chelatoren zu den *Dictyostelium*-Zellen führt zu einer dosisabhängigen Abnahme der Phagozytoserate der Bakterien. Die Entleerung der Ca^{2+} -Speicher mit Thapsigargin führt zum gleichen Ergebnis.

Die Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ während der Aufnahme von *L. pneumophila* in U937-Zellen zeigte, dass bereits der erste Kontakt der Bakterien mit den Zellen ein transientes Ca^{2+} -Signal induziert. Weniger virulente *Legionella*-Stämme wie *L. hackeliae*, sowie *Escherichia coli* und *Salmonella* sp. sind ebenfalls in der Lage eine Ca^{2+} -Mobilisierung hervorzurufen, so dass es sich nicht um ein *L. pneumophila* spezifisches Signal handelt. Jedoch ist die Präsenz der Bakterien für die Ca^{2+} -Signalgebung notwendig, da weder PBS noch CaCl_2 , oder andere unspezifische Einflüsse eine Ca^{2+} -Erhöhung herbeiführen können. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Aufnahme von *L. pneumophila* in *D. discoideum* über konventionelle Phagozytose stattfindet, wobei das Aktinzytoskelett der Zelle, G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren und das PLC-Signaltransduktionssystem von Bedeutung sind. Die ER-Proteine CNX und CRT sind sowohl für die Aufnahme, als auch für die intrazelluläre Vermehrung der Bakterien notwendig. Die mikroskopische Beobachtung der GFP-markierten Proteine ergab, dass das ER bereits an den frühen Ereignissen der Infektion beteiligt ist. Die Phagozytose der Bakterien wird überdies durch Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reguliert.

SUMMARY

The Gram-negative bacterium *Legionella pneumophila*, the causative agent of Legionnaires' disease, is a facultative intracellular pathogen of protozoa and human phagocytes. After being uptaken the bacterium resides within a specialized vacuole that does not acidify or fuse with lysosomes. Virulence factors of *Legionella* that permit the colonization of the host and the transformation of the phagosome into the specialized vacuole, have been analysed in recent years. In contrast, most of the host cell factors needed for the establishment of the infection are still unknown. The best-characterized amoeba Modell, *Dictyostelium discoideum*, has proven to be suitable for the analysis of the *Legionella*-host interactions. By the use of specific cellular inhibitors, *Dictyostelium*-mutants and intracellular Ca^{2+} -measurements, new insights into the course of the *Legionella*-infection have been herein obtained.

The pharmacological disruption of the actin filaments of the host cell leads to a significant reduction of bacterial uptake. A decreased internalization of the bacteria by *Dictyostelium* cells lacking the actin-binding proteins α -actinin/ABP120, ASP56/CAP, coronin, DAip1, LimC/LimD or villidin, confirms the necessity of actin filaments during *Legionella* uptake. A further proof of the actin-mediated entry of *L. pneumophila* was found in the observation of Coronin-GFP localization in living *Dictyostelium* cells. The protein accumulated in the phagocytic cups. Furthermore, α -actinin/ABP120, LimC/LimD and villidin are involved in the intracellular replication of *L. pneumophila*.

During conventional phagocytosis by *D. discoideum* the reorganization of the cytoskeleton is regulated by the phospholipase C (PLC) signaling pathway. The engagement of a G-protein-coupled receptor by an extracellular signal molecule leads to the activation of the heterotrimeric G-protein, which itself stimulates the PLC. The activated PLC hydrolyses PIP_2 into IP_3 and DAG, which finally leads to a depletion of the endoplasmic reticulum (ER) Ca^{2+} stores. The inhibition of PLC by the compounds U73122 and neomycin sulphate in *Dictyostelium* cells leads to a strong decrease in the phagocytosis of *Legionella*. Moreover a severe phagocytosis defect in a G-protein *Dictyostelium*-mutant strongly supports the idea of a PLC-dependent uptake of *Legionella*.

Several studies already confirmed the replication of *L. pneumophila* within an ER-derived organelle. The timepoint of the first interaction of the phagosome with the ER remains controversial. This question was addressed by examining the role of the luminal ER-protein calreticulin (CRT) and the transmembrane ER-protein calnexin (CNX) during *Legionella*

infection. Both CNX and CRT-minus cells showed a severe reduction in *L. pneumophila* uptake. Furthermore it could be proven that both proteins are necessary for intracellular growth of *Legionella*.

In order to further examine the dynamics of the ER during the *Legionella* infection, confocal microscopy of living *Dictyostelium* cells expressing CNX-GFP or GFP-CRT was performed. Both proteins are specifically enriched at the binding sites of the bacteria and decorate the *Legionella* phagosome during the entire infection period.

The ER is the most important Ca^{2+} source of the cell. Changes in the cytosolic Ca^{2+} levels are known to regulate several cellular processes. Therefore the role of Ca^{2+} during *Legionella* infection was characterized. The addition of extracellular and intracellular Ca^{2+} chelators to *Dictyostelium* cells lead to a dose-dependent reduction in bacterial uptake. The depletion of intracellular Ca^{2+} stores by the addition of Thapsigargin also resulted in a decrease of bacterial uptake. Measurements of the intracellular calcium concentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ during *Legionella* uptake in U937-cells revealed that the contact of bacteria with the cell surface is sufficient to induce a transient Ca^{2+} signal. However, this signal is not *L. pneumophila* specific since less virulent *Legionella* strains such as *L. hackeliae*, as well as *E. coli* and *Salmonella* sp., are also able to induce a Ca^{2+} mobilization. The presence of bacteria is necessary for Ca^{2+} signaling since neither PBS nor CaCl_2 , or other external influence promote an elevation of intracellular Ca^{2+} .

Taken together these results demonstrate that conventional phagocytosis is used for internalization of *L. pneumophila* in *D. discoideum*, whereby actin filaments, G-protein-coupled-receptors and the PLC signal transduction pathway are engaged. The ER proteins CNX and CRT participate both in uptake and replication of the bacteria. The microscopic observation of the GFP-labelled proteins proved that the ER is already involved in the early events of the infection. Last but not least, bacterial uptake in *D. discoideum* as well as in human macrophages is regulated by changes in the intracellular Ca^{2+} concentration.

EINLEITUNG

1 Legionärskrankheit

Die Legionärskrankheit wurde erstmalig 1976, nach dem Ausbruch einer Lungenentzündung bei zahlreichen Teilnehmern der American Legion Convention in Philadelphia, beschrieben [Mc Dade *et al.*, 1977]. Es handelt sich dabei um eine atypische Form schwerer Pneumonie, die jedoch oft unerkannt bleibt. Allein in den USA erkranken jedes Jahr zwischen 8.000 und 18.000 Menschen an Legionellose [Marston *et al.*, 1997, Blackburn *et al.*, 2004], in Deutschland wird die Zahl der Erkrankungen auf ca. 500 - 1000 p.a. geschätzt [Robert Koch Institut, 2005]. Bei den Erkrankten handelt es sich häufig um Kinder, Ältere, Raucher, Immungeschwächte- oder Transplantations-Patienten. Somit ist *Legionella* ein klassisch opportunistisches Pathogen [Swanson und Hammer, 2000]. Da die Zahl der Menschen in den Risikogruppen ständig zunimmt, ist auch *Legionella* zu einem wachsenden Gesundheitsproblem geworden.

Die Infektion erfolgt durch Inhalation von Aerosolen, die mit Legionellen kontaminiert sind. Als Quellen für diese Aerosole sind in der Hauptsache Anlagen der modernen Wasserversorgung und Kühl- bzw. Belüftungssysteme identifiziert worden [Nguyen *et al.*, 2006]. Vor allem Krankenhäuser sind typische Risikozonen. Hier weisen mit *Legionella* infizierte Patienten eine deutlich höhere Sterblichkeitsrate auf [Seenivasan *et al.*, 2005]. Im Sinne der Prävention müssen Bereiche wie Intensivstationen regelmäßig kontrolliert und mit Hilfe von Chlorierung, Hitze oder Kupfer-Silber-Ionisierung desinfiziert werden [Rohr *et al.*, 1999].

Nach 2 - 10 Tagen Inkubationszeit treten die typischen Krankheitssymptome wie Husten, Muskelschmerzen, Unbehagen, Schüttelfrost, Fieber und gastro-intestinale Beschwerden auf. Im weiteren Verlauf kann sich eine Alveolitis und Bronchiolitis entwickeln. Auch schwere Lungenschäden und Infiltrationen der Lunge können beobachtet werden. 5% - 25% aller adäquat behandelten Fälle weltweit haben einen tödlichen Verlauf [Mykietiuk *et al.*, 2005]. Eine Übertragung von Mensch zu Mensch kann nach heutigem Kenntnisstand ausgeschlossen werden.

Obwohl seit der ersten Entdeckung mittlerweile 50 verschiedene Spezies von Legionellen sowie zusätzlich mindestens 12 *Legionella* Like *Amoeba* Pathogens (LLAP) beschrieben worden sind [Adeleke *et al.*, 2001; Wullings und van der Kooij, 2006], ist *Legionella pneumophila* in 79% der Fälle der isolierte Erreger [Fields *et al.*, 2002]. Allerdings wurde bereits die Hälfte aller Spezies mit der Legionärskrankheit in Verbindung gebracht.

Routinemäßig und im Rahmen einer ersten Diagnose können *Legionella*-Antigene in Urinproben festgestellt werden. Mittels dieser Methode ist jedoch ausschließlich *L. pneumophila* eindeutig

identifizierbar. Als derzeit beste und effektivste Methode für den Nachweis anderer Spezies hat sich die PCR in Verbindung mit der obigen Vorgehensweise erwiesen. Sind PCR Tests nicht möglich gilt die Kombination: Nachweis von Antigenen im Urin und Kultivierung von Bakterien aus Proben der unteren Atemwege, als geeignete Alternative [Murdoch, 2003].

In der jüngsten Vergangenheit hat sich der Einsatz von Fluorochinolonen, Makrolid-Antibiotika und Rifampicin zur Therapie infizierter Patienten als sehr effektiv bewährt [Stout *et al.*, 1998; Edelstein *et al.*, 2001; Garbino *et al.*, 2004].

2 Pontiac Fieber

Eine andere Form der Legionellose ist das Pontiac Fieber. Im Gegensatz zur Legionärskrankheit ist diese selbstlimitierend und führt nicht zu einer Lungenentzündung [Kaufmann *et al.*, 1981]. Trotz der hohen Infektionsrate sind keine komplexen Krankheitsverläufe oder Todesfälle bekannt [Fields *et al.*, 2001].

Nach einer kurzen Inkubationszeit von nur 6 - 48 Stunden treten grippeähnliche Symptome auf. Obwohl die Patienten Antikörper gegen *L. pneumophila* aufweisen, konnten bislang keine Bakterien isoliert werden. Grund hierfür könnten Legionellen sein, die sich im so genannten VBNC-Stadium (viable bt not culturable) befinden [Steinert *et al.*, 2002].

Andererseits kann das Krankheitsbild die Folge einer Hypersensivität zu zellulären Komponenten der Bakterien oder eine überhöhte Immunreaktion gegen das Pathogen sein. Auch bakterielle Toxine könnten die Ursache hierfür sein [Swanson und Hammer, 2000].

3 Immunantwort des Wirtes

Zelluläre Immunität ist im Zusammenwirken mit Zytokinen und Chemokinen für die Abwehr der Infektion mit *Legionella* notwendig [Neidl und Roy, 2004]. Dabei ist die Produktion von Th1-Zytokinen, insbesondere Interferon Gamma (IFN- γ), Interleukin 12 (IL-12) und Interleukin 18 (IL-18) unentbehrlich für die Ausbildung einer protektiven Immunantwort [Yoshizawa *et al.*, 2005]. Die Beseitigung der Bakterien aus der Lunge erfordert die Aktivierung von Makrophagen und Monozyten durch das endogene IFN- γ [Friedman *et al.*, 2002; Neidl und Roy, 2004]. Aktivierte Makrophagen können die Bakterien nicht vernichten, beschränken jedoch das intrazelluläre Wachstum von *Legionella*, u. a. durch die Reduktion der intrazellulären Eisen-Vorräte. Hierfür wird die Expression des Transferrin-Rezeptors auf der Oberfläche der Phagozyten verringert, wodurch weniger Eisen im inneren der Zelle für die

Vermehrung der Bakterien zur Verfügung steht [Byrd und Horwitz, 2000]. Das von Makrophagen, Natural Killer (NK) Zellen und Dendritische Zellen (DZ) produzierte IL-12 fördert nicht nur die Th1-Klonbildung und die IFN- γ -Produktion, sondern unterdrückt auch Th2-Klone und ihre entsprechenden Zytokine [Neidl and Roy, 2004]. Matsunaga *et al.* [2001] haben gezeigt, dass virulente *L. pneumophila* in der Lage sind die Produktion von IL-12 in Makrophagen zu unterdrücken und somit eine effektive Immunantwort zu verhindern. Th2-Zytokine, insbesondere IL-10, fördern das Wachstum von *L. pneumophila*, selbst in IFN- γ -aktivierten Makrophagen [Park und Skerrett, 1996; Yoshizawa *et al.*, 2005].

Eine durch Th1-gewichtete Antwort könnte die erhöhte Anfälligkeit von älteren Personen und Rauchern gegenüber der Legionelleninfektion erklären. Zigarettenrauch verhindert die Produktion von IFN- γ und TNF- α , was eine erhöhte intrazelluläre Vermehrung der Bakterien in Makrophagen ermöglicht [Matsunaga *et al.*, 2002]. Ebenso ist im Alter die T-Zell-Aktivierung erheblich eingeschränkt und das Zytokinmuster scheint sich von einer Th1- zu einer Th2-Antwort zu verschieben [Plackett *et al.*, 2004].

Im Gegensatz zur zellulären Immunität scheint eine humorale Immunantwort nicht von Bedeutung für die Abwehr der *Legionella*-Infektion zu sein. Obwohl die Bakterien unverzüglich den Bestandteil C3 des Komplements binden, widersteht *Legionella* der Lyse durch dasselbe [Horwitz, 1983]. Des Weiteren werden mit spezifischen Antikörpern oder Komplementfaktoren opsonisierte Bakterien unmittelbar von Polymorphonuklear-Zellen (PMN) aufgenommen aber nicht getötet [Swanson und Hammer, 2000]. Anti-*Legionella* Antikörper können in immunkompetenten Wirten lediglich die Lebensfähigkeit extrazellulärer Legionellen reduzieren und die Phagozytoserate mittels eines Komplement-unabhängigen Mechanismus erhöhen [Brieland *et al.*, 2000].

4 Natürliche Lebensräume der Gattung *Legionella*

Legionellen kommen weltweit in verschiedenen Süßwasserhabitaten vor. Eine Ausnahme bildet *L. longbeachae*, welches auch aus dem Erdreich isoliert werden konnte [Steele *et al.*, 1990]. Legionellen sind gram-negative, unipolar begeißelten, stäbchenförmige Bakterien. Sie sind weder fermentativ noch saccharolytisch und benötigen Cystein für ihr Wachstum. Dieser Aminosäurebedarf kann jedoch nicht vom Süßwasser gedeckt werden. So können Legionellen nur als Parasiten von frei lebenden Protozoen überleben [Winiecka-Krusnell und Linder, 2001]. Bislang sind 15 Amöben-Spezies sowie 2 Zilliaten-Spezies als Wirte für *Legionella* identifiziert worden [Fields *et al.*, 2002].

In ihrem natürlichen Lebensraum wird *L. pneumophila* von Protozoen, insbesondere Amöben, verbreitet. Protozoen, die für eine Infektion mit *Legionella* anfällig sind, kontaminieren Trinkwasser und hierbei insbesondere Warmwasserspeicher [Guerrieri *et al.*, 2005]. Die Legionellen können innerhalb der Amöben selbst bei ungünstigen Bedingungen wie hohen Temperaturen oder Chlorierung überleben [Donlan *et al.*, 2005]. Zudem können Legionellen die sich in einem physiologisch inaktiven Stadium befinden (VBNC), durch die Kokultivierung mit *Acanthamoeba castellanii* wieder belebt werden [Steinert *et al.*, 1997].

Amöben haben vermutlich zur Entwicklung von *L. pneumophila* als opportunistisches Pathogen der alveolaren Makrophagen beigetragen. Der Lebenszyklus der Legionellen in den Amöben gleicht daher dem Verlauf, der auch in Makrophagen beobachtet werden kann [Molofsky und Swanson, 2004]. Protozoen dienen möglicherweise auch als Vehikel für die Übertragung von Legionellen auf den Menschen [Greub und Raoult, 2004].

Mäuse, die mit einer Mixtur von Bakterien und Amöben geimpft wurden, entwickeln eine schwerere Erkrankung als solche, die nur mit *L. pneumophila* oder *Hartmannella vermiformis* infiziert wurden [Cirillo *et al.* 1999]. Weiterhin ermöglichen die Amöben eine Erhöhung der bakteriellen Zytotoxinmenge in der Lunge [Swanson und Hammer, 2000]. Nach dem Wachstum in Protozoen ist *L. pneumophila* auch deutlich resistenter gegenüber Bioziden und Antibiotika [Barker *et al.*, 1995; Sturgill-Koszycki und Swanson 2000], invasiver für Zellen von Säugetieren und virulenter in Mäusen [Cirillo *et al.*, 1994; Garduno *et al.*, 2002].

Als weitere ökologische Nische für *Legionella* sind Biofilme identifiziert worden, die nicht nur in der Natur, sondern auch in medizinischen und zahntechnischen Vorrichtungen vorkommen [Kuiper *et al.* 2004]. Das komplexe Nahrungsangebot innerhalb dieser Mikrobengemeinschaft ermöglicht das Überleben der Legionellen und wahrscheinlich auch ihre Vermehrung. Darüber hinaus zeigen die Bakterien in den Biofilmen eine erhöhte Resistenz gegenüber Bioziden und Chlorierung, womit ihr Überleben auch bei ungünstigen Umweltbedingungen ermöglicht wird [Borella *et al.*, 2005].

Die erhöhte Resistenz von Biofilmen gegenüber Biozide hat mehrere Ursachen. Zum einen schränkt die Exopolymermatrix des Biofilms die Diffusion großer Moleküle ein und bindet antimikrobielle Substanzen [Lewis, 2001]. Des Weiteren bieten die negativ geladenen Exopolysaccharide den Zellen effektiven Schutz vor positiv geladenen Bioziden, indem sie diese an sich binden [Maira-Litrán *et al.*, 2000].

5 Aufnahmemechanismen von *Legionella*

Viele der Virulenzfaktoren von *Legionella*, die eine Infektion in Säugerzellen ermöglichen, sind vermutlich während der Interaktion der Bakterien mit Protozoen in der Umwelt entstanden [Brüggemann *et al.*, 2006]. Jedoch sind in den verschiedenen Wirtszellsystemen unterschiedliche Aufnahmemechanismen beobachtet worden.

L. pneumophila adhärert an ihre Wirtszellen über einen Typ IV Pilus, deren Wirtsrezeptor noch nicht identifiziert worden ist [Stone und Abu Kwaik, 1999; Rossier *et al.*, 2004]. Die nachfolgende Aufnahme der Bakterien erfolgt entweder über konventionelle Phagozytose oder über eine spezielle Art der Phagozytose, die sog. „coiling phagocytosis“ [Horwitz, 1984b; Bozue und Johnson, 1996]. Im Gegensatz zur konventionellen, symmetrischen Phagozytose umhüllt bei der „coiling phagocytosis“ ein einzelnes Pseudopodium mehrmals das Bakterium und schließt es am Ende des Prozesses in einem Phagosom aus mehreren Membranschichten ein. Diese Art der Invasion hat allerdings keinerlei Bedeutung für die intrazelluläre Vermehrung von *L. pneumophila*, da avirulente oder durch Hitze getötete Legionellen ebenfalls über „coiling Phagozytose“ aufgenommen werden können [Horwitz, 1987]. Darüber hinaus erfolgt die Internalisierung anderer virulenter *Legionella*-Spezies, wie *L. micdadei*, ausschließlich über konventionelle Phagozytose [Molmeret *et al.*, 2004].

Die Phagozytose von *Legionella* in humanen Monozyten ist zum Teil komplementabhängig. In Gegenwart von Serum binden die Komplementfaktoren C3b und C3bi an die 28 kDa Untereinheit des MOMP Proteins (major outer membrane protein) von *L. pneumophila* [Bellinger-Kawahara und Horwitz, 1990]. Das modifizierte Protein bindet wiederum an die Komplementrezeptoren CR1 (CD35) und CR3 (CD116/CD18) auf der Wirtszelloberfläche [Payne und Horwitz, 1987]. Spezifische Antikörper gegen CR1 und CR3 können die Bindung nicht opzonisierter Bakterien an Monozyten nicht unterbinden, was auf eine Beteiligung anderer noch nicht identifizierter Rezeptoren hindeutet [Gibson *et al.*, 1994; Molmeret *et al.*, 2004]. Die Aufnahme der Legionellen über Komplementrezeptoren hat einen negativen Einfluss auf die antimikrobiellen Mechanismen der Wirtszelle, wie dem „oxidativen burst“ [Jacob *et al.*, 1994]. Die Internalisierung der Bakterien über Fc-Rezeptoren scheint dagegen die Phagolysosom-Bildung positiv zu beeinflussen, da nur 50% aller auf diesem Weg aufgenommenen Bakterien intrazellulär überleben [Shuman *et al.*, 1998]. Sowohl virulente als auch avirulente Legionellen, die in humane Monozyten über den CR3-Rezeptor aufgenommen werden, aktivieren die Tyrosin Kinasen (TK) und die PKC [Coxon *et al.*, 1998]. In Makrophagen können jedoch nur virulente Legionellen die Phosphorylierung eines 76 kDa Proteins induzieren, was eine Beteiligung dieses Signals an den Infektionsprozess

vermuten lässt [Yamamoto *et al.*, 1992]. Der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) Signalweg hat keinen Einfluss auf die Aufnahme virulenter *L. pneumophila* in Makrophagen. Die Phagozytose avirulenter *Legionella*-Mutanten und *E.coli* wird dagegen durch die Zugabe des PI3K-Inhibitors Wortmannin verhindert [Khelef *et al.*, 2001].

Im Protozoenwirt *H. vermiformis* kann mit Hilfe von Methylamin, ein Inhibitor der Rezeptor-vermittelten Endozytose, die Internalisierung der Legionellen vollständig unterbunden werden [King *et al.*, 1991]. Als Rezeptor ist ein Gal/GalNAc 170-kDa Lektin identifiziert worden, welches direkt nach der Bindung der Bakterien Tyrosin-dephosphoryliert wird [Venkataraman *et al.*, 1998]. Demzufolge wird die Aufnahme der Bakterien durch die Zugabe der monovalenten Zucker Galaktose und Galaktose/N-Acetylglucosamin vollständig blockiert.

Die Phagozytose von *Legionella* in einem anderen Protozoenwirt, *Acanthamoeba polyphaga*, wird dagegen durch diese Zucker nur teilweise verhindert. Darüber hinaus wird bei der Infektion in *Acanthamoeba* nur eine geringfügige Dephosphorylierung eines 170-kDa Proteins beobachtet [Harb *et al.*, 1998]. Dies deutet darauf hin, dass *A. polyphaga* einen anderen Rezeptor oder einen ähnlichen Rezeptor mit niedrigerer Affinität besitzt, an welcher *Legionella* während der Anfangsphase der Interaktion bindet [Harb *et al.*, 1998].

Die erfolgreiche Phagozytose von *L. pneumophila* in *H. vermiformis* ist von der Synthese neuer Wirtsproteine abhängig. In *A. polyphaga* hat die Inhibition der Proteinsynthese dagegen keinerlei Auswirkung auf die Aufnahme der Bakterien [Abu Kwaik *et al.*, 1994; Harb *et al.*, 1998].

In Säugerzellen ist die Aufnahme der Legionellen vom Mikrofilamentsystem der Wirtszelle abhängig. Die Inhibierung der Aktinpolymerisation mit Hilfe von Cytochalasin D verhindert die Aufnahme der Bakterien in Makrophagen und Monozyten [Elliot und Winn, 1986; King *et al.*, 1991; Coxon *et al.*, 1998]. Im Protozoenwirt wurde dagegen eine Aktin-unabhängige Phagozytose postuliert [King *et al.*, 1991; Moffat und Tompkins, 1992; Köhler *et al.*, 2000]. In dieser Arbeit und auch in einer kürzlich erschienenen Studie von Lu und Clarke [2005] konnte dagegen gezeigt werden, dass die Phagozytose von *L. pneumophila* in der sozialen Amöbe *D. discoideum* das Aktinzytoskelett der Wirtszelle benötigt. Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind möglicherweise auf eine zu niedrige Dosierung der Inhibitoren in früheren Studien zurückzuführen. Denn Protozoen haben in der Umwelt extrem effiziente Pumpen entwickelt, die eine schnelle Beseitigung von Schadstoffen aus dem Zellinneren ermöglichen. Ein alternativer Aufnahmeweg von *L. pneumophila* ist in A/J Mausmakrophagen beobachtet worden. Hier erfolgt die Aufnahme der Bakterien, abhängig vom Dot (defective organelle trafficking)/Icm (intracellular multiplication)-Proteinsekretionssystem, durch einen Mechanismus

ähnlich der Makropinozytose. Dabei befinden sich die Bakterien gleich nach der Aufnahme vorübergehend in einer Vakuole mit großem Volumen und weit abstehender Membran. Bereits wenige Minuten später verliert die Vakuole an Volumen und die Membran liegt daraufhin eng an den Bakterien an. In diesem Zustand ähnelt die Vakuole eines durch Phagozytose entstandenem unreifen Phagosoms. Dieser Prozess wird durch den *LgnI* Locus kontrolliert und findet gleich nach dem ersten Kontakt der Bakterien mit der Plasmamembran statt [Watarai *et al.*, 2001b]. Auch in humanen Makrophagen werden die Anfangsstadien der Interaktion zwischen *L. pneumophila* und der Wirtszelle über das Dot/Icm-Sekretionssystem geregelt. Somit ist dieser der erste bekannte Fall von einem Typ IV Sekretions-system, welches die Aufnahme in professionelle Phagozyten fördert [Hilbi *et al.*, 2001]. Der Bedarf des Dot/Icm-Sekretionssystems für die Internalisierung von *Legionella* kann jedoch umgangen werden, indem die Bakterien einer Ers (enhanced resistance to stress)-Behandlung unterzogen werden [Bandyopadhyay *et al.*, 2004]. Hierfür werden die Bakterien über Nacht in PBS inkubiert, wodurch sie resistenter gegenüber Säure, H₂O₂ und Antibiotika werden.

In einer Studie von Yan *et al.* [2004] wurde eine Beteiligung des eukaryotischen Hitze-Schock-Proteins (Hsp) 90 an der Aufnahme von *L. pneumophila* in *A. castelanii* und Mausmakropahgen beobachtet. Die genaue Rolle des Proteins bleibt allerdings noch unklar.

Trotz der entscheidenden Unterschiede in der Aufnahme ist die anschließende intrazelluläre Vermehrung in Protozoen- und Säugerwirtszellen beinahe identisch (Abb. 2).

5.1 Virulenzfaktoren für die Aufnahme in die Wirtszelle

Die Expression eines Typ IV Pilus, auch CAP (competence and adherence associated pili) genannt, ermöglicht die Adhäsion der Legionellen an die Wirtszelle [Stone und Abu Kwaik, 1999]. Die Deletion des *pilE_L* Gens hat eine Reduktion von mehr als 50% in der Adhärenz von *L. pneumophila* an *A. polyphaga* und humanen Wirtszellen zur Folge, jedoch aber keinen Einfluss auf die intrazelluläre Vermehrung der Bakterien [Stone und Abu Kwaik, 1999; Rossier und Cianciotto, 2001]. In vivo zeigen *pilE_L* und *pilQ* Mutanten nur einen geringfügigen Invasions-defekt im Vergleich zu Wildtyp-Bakterien [Rossier *et al.*, 2004].

Das 60kDa Hsp60 von *Legionella* trägt ebenfalls zur Invasion von Epithelzellen bei. Auch die Zytokinproduktion in Makrophagen wird vom Hsp60 positiv beeinflusst [Retzlaff *et al.*, 1996; Garduño *et al.*, 1998]. Die Expression von Hsp60 wird *in vitro* von H₂O₂, Hitze und osmotischem Schock induziert [Hoffman *et al.*, 1989]. Spezifisch für *L. pneumophila* ist die

Beteiligung des 25kDa MOMP-Proteins (major outer membrane protein) an der Rezeptor-vermittelten Aufnahme der Bakterien [Krinos *et al.*, 1999].

Eine weitere prominente Oberflächenstruktur von *Legionella* ist die Flagelle. Diese wird während der postexponentiellen Wachstumsphase der Legionellen exprimiert und dient der Invasion neuer Wirtszellen [Heuner *et al.*, 1995; Byrne und Swanson, 1998]. Die Flagelle ist jedoch nicht an der intrazellulären Vermehrung der Bakterien beteiligt [Dietrich *et al.*, 2001]. Die Expression des Flagellin-Gens hängt von der Inkubationstemperatur, Aminosäuregehalt, Viskosität und Osmolarität des Mediums ab [Ott *et al.*, 1991; Heuner *et al.*, 1999, 2002].

Weiterhin sind verschiedene genetische Loci identifiziert worden, die für die Invasion der Wirtszelle von Bedeutung sind. Die *enh* Gene (enhanced entry) werden für die Aufnahme der Legionellen in Epithelzellen und Monozyten benötigt [Cirillo *et al.*, 2000]. Das *rtxA* (repeats in structural toxin) Gen von *L. pneumophila* beeinflusst sowohl die Aufnahme der Bakterien in humane und Mausmakrophagen als auch in *A. castellanii*. Darüber hinaus spielt das *rtxA*-Gen eine wichtige Rolle bei der intrazelluläre Vermehrung der Bakterien in allen drei Wirten [Cirillo *et al.*, 2001, 2002]. Kürzlich wurde auch das *lpnE* (L. pneumophila entry) Gen als Pathogenitätsfaktor von *L. pneumophila* in Epithelzellen und humanen Monozyten identifiziert [Newton *et al.*, 2006].

6 Intrazelluläre Replikation von *Legionella*

Nach der Aufnahme befindet sich *L. pneumophila* innerhalb eines unreifen Phagosoms, das weder angesäuert wird noch mit Lysosomen fusioniert. Weiterhin ist das *Legionella*-Phagosom, bereits wenige Minuten nach Beginn der Infektion, mit zahlreichen Wirtsorganellen wie Sekretionsvesikeln und Mitochondrien assoziiert. In den späteren Phasen der Infektion werden die Mitochondrien durch Membran-assoziierte Ribosomen ersetzt [Horwitz und Maxfield, 1984a; Tilney *et al.*, 2001]. Die Rekrutierung der Sekretionsvesikel ist der erste Schritt für die Fusion des *Legionella*-Phagosoms mit dem ER der Wirtszelle [Robinson und Roy, 2006]. Die genaue Bedeutung dieser Assoziation ist allerdings noch unklar. Die Fusion mit dem ER könnte der Zufuhr von Peptiden und Nährstoffen zum Lumen des Phagosoms dienen [Robinson und Roy, 2006]. In diesem Zusammenhang wurde postuliert, dass *L. pneumophila* womöglich den Autophagie-Mechanismus der Wirtszelle in Anspruch nimmt, wodurch Stoffwechselprodukte oder Wirtszellproteine abgebaut werden, die zur Versorgung des replikativen Phagosoms benutzt werden könnten [Swanson und Isberg, 1995; Swanson und Hammer, 2000; Dorn *et al.*, 2002].

In *D. discoideum* konnte nachgewiesen werden, dass die Makroautophagie-Maschinerie der Wirtszelle entbehrlich für die intrazelluläre Vermehrung von *L. pneumophila* ist [Otto *et al.*, 2004]. Kürzlich wurde berichtet, dass in Makrophagen der Autophagie-Mechanismus, direkt nach Beginn der Infektion, als Barriere gegenüber den eindringenden Bakterien aktiviert wird [Amer und Swanson, 2005].

Unentbehrlich für die Biogenese des *Legionella*-spezifischen Phagosoms, ist das von den Legionellen ausgebildete Dot/Icm-Proteinsekretionssystem, welches den Bakterien ermöglicht Effektorproteine in die Wirtszelle zu injizieren [Vogel *et al.*, 1998; Nagai *et al.*, 2002; Luo und Isberg, 2004; Robinson und Roy, 2006].

Nach einer lag-Phase von 3 - 6 Stunden findet die Vermehrung der Bakterien in der ER-umgebenen Vakuole statt [Shuman *et al.*, 1998]. Etwa 16-18 Stunden nach Beginn der Infektion, wenn sich mehr als vier Bakterien innerhalb des Phagosoms befinden, bekommt dieses einen endozytischen Charakter, der für die weitere Vermehrung der Bakterien von Bedeutung ist [Sturgill-Koszycki und Swanson, 2000].

Neben der Umwandlung des Phagosoms in ein Phagolysosom, kann auch eine Veränderung des *Legionella*-Phänotyps nachgewiesen werden. Die zwei unterschiedlichen Phasen des intrazellulären Lebenszyklus von *Legionella*, wurden erstmalig bei der mikroskopischen Untersuchung infizierter Amöben beobachtet [Rowbotham, 1986]. Während der Replikationsphase sind die Bakterien Natrium-resistent, nicht zytotoxisch, produzieren keine Flagellen und sind nur beschränkt in der Lage die Phagolysosom-Bildung zu unterbinden [Byrne und Swanson, 1998, Bachman und Swanson, 2001]. Wenn das Nahrungsangebot innerhalb des Phagosoms zurückgeht, tritt *L. pneumophila* in eine aktive Transmissionsphase ein. In dieser zweiten Phase, zeigen die Legionellen eine Anzahl von Merkmalen, die auf eine maximale Virulenz hinweisen. Die Bakterien sind äußerst beweglich, zeigen Natrium-Sensibilität, Zytotoxizität, osmotische Stressresistenz, und die Fähigkeit der Phagolysosom-Fusion zu entgehen [Byrne und Swanson, 1998; Hammer und Swanson, 1999; Hammer *et al.*, 2002].

Der biphasische Lebenszyklus der Legionellen wird über ein komplexes Netzwerk alternativer Sigmafaktoren und post-transkriptionaler Regulatoren kontrolliert. Während der Replikationsphase, unterdrückt der globale Repressor CsrA die Expression der Virulenzmerkmale der Bakterien und fördert das Wachstum (Abb. 1) [Bachman und Swanson, 2001; Fettes *et al.*, 2001; Molofsky und Swanson, 2003]. Die Produktion der Flagelle, die Hemmung der Phagolysosom-Fusion und die Zytotoxizität werden inhibiert, indem CsrA die flagellaren Sigma-Faktoren FliA, FleQ und/oder RpoN reprimiert [Fettes *et al.*, 2001; Hammer *et al.*, 2002., Heuner *et al.*, 2002; Molofsky and Swanson, 2004; Molofsky *et al.*, 2005].

Der Aminosäuremangel während der post-exponentiellen Wachstumsphase der Bakterien, wird vom ribosomalen Enzym RelA erkannt, welches die Produktion von ppGpp (Guanosin 3'5'-bispyrophosphat), einem sekundären Botenstoff, anregt. Als Antwort auf das erhöhte ppGpp Niveau wird das Zwei-Komponenten-system LetA/LetS, der alternative Sigmafaktor RpoS und möglicherweise das flagellare Regulon RpoN aktiviert, die gemeinsam die Expression der Virulenzmerkmale induzieren (Abb. 1) [Bachman und Swanson, 2001; Bitar *et al.*, 2004; Bachman und Swanson, 2004]. Zuletzt wurde jedoch berichtet, dass in primären humanen Makrophagen RelA für die intrazelluläre Vermehrung der Bakterien entbehrlich sei [Abu-Zant *et al.*, 2006].

Die post-transkriptionale Repression der Gene der Transmissionsphase durch CsrA wird vom aktiven LetA aufgehoben indem es die Produktion *csrB*-ähnlicher RNAs induziert, welche an CsrA binden [Romeo, 1998]. Ferner könnten RpoS, RpoN und FliA die Transkription von Regulatoren der Gene der Transmissionsphase aktivieren [Molofsky und Swanson, 2004].

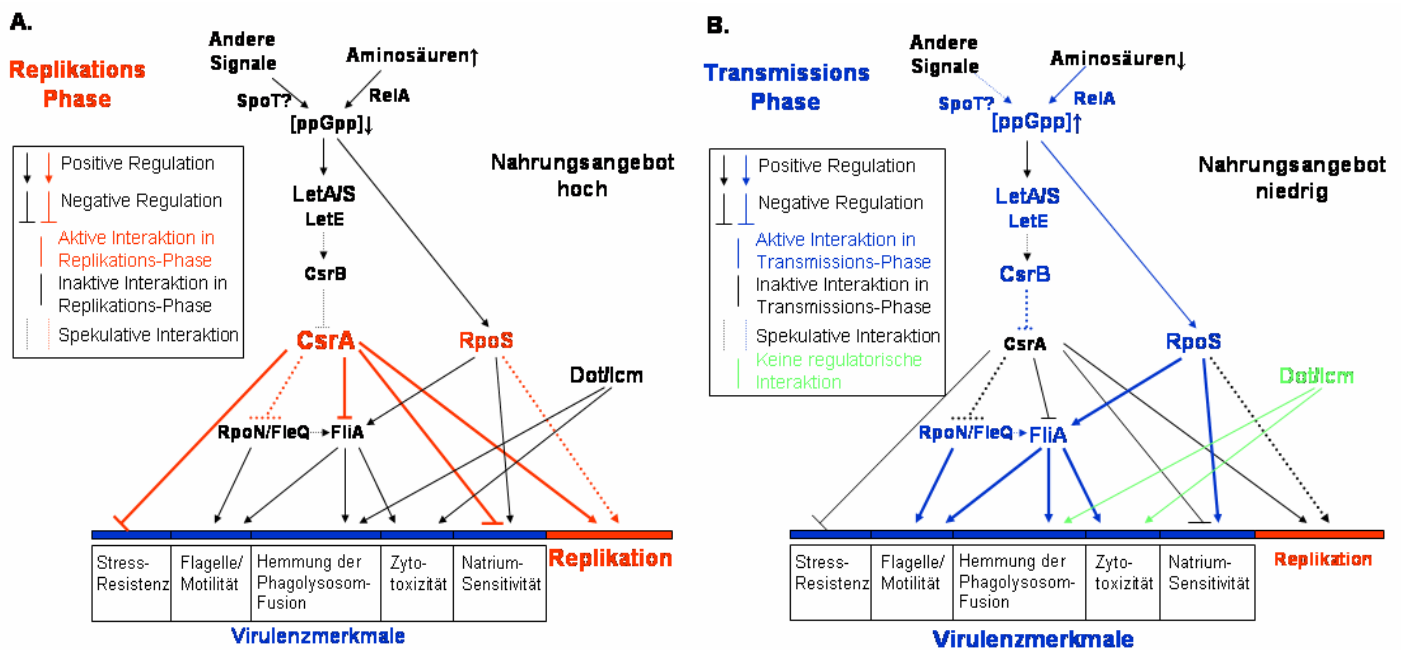


Abb.1 Schematische Darstellung des Regulations-Netzwerks des biphasischen Lebenszyklus von *Legionella* (modifiziert nach Molofsky und Swanson, 2002).

6.1 Pathogenitätsfaktoren für die Replikation von *Legionella*

6.1.1 Sekretionssysteme und extrazelluläre Virulenzfaktoren

Die Sekretion von Proteinen trägt zur Virulenz pathogener Bakterien bei. Die Absonderung von Toxinen oder die Injektion bakterieller Faktoren ins Wirtszellzytoplasma ermöglichen die

Modulation eukaryontischer Zellfunktionen. Die Produkte der 25 *dot/icm* Gene bilden ein spezialisiertes Sekretionssystem aus, welches Proteine vom *Legionella*-Zytosol ins Wirtszell-Zytoplasma transportieren kann [Segal *et al.*, 1998, Nagai *et al.*, 2002]. Das Dot/Icm-System gehört zur Familie der Typ IV Sekretionssysteme, die für den Transfer von genetischem Material während der bakteriellen Konjugation verantwortlich sind [Christie und Vogel, 2000]. Das Dot-Icm-System stellt eines der wichtigsten Pathogenitätsfaktoren von *Legionella* dar [Molmeret *et al.*, 2004]. Es hat einen positiven Einfluss auf die Aufnahme von *L. pneumophila* [Hilbi *et al.*, 2001; Watarai *et al.*, 2001b], nimmt an der Bildung des *Legionella*-spezifischen-Phagosoms teil [Tilney *et al.*, 2001, Robinson und Roy, 2006] und ermöglicht die Lyse des Wirts am Ende der Infektion mittels der Poren-bildenden Aktivität und/oder Apoptose [Kirby *et al.*, 1998; Zink *et al.*, 2002; Abu-Zant *et al.*, 2005].

Die Funktion der Dot/Icm Proteine ist bis auf einige Ausnahmen noch ungeklärt. Das DotB Protein besitzt ATPase Aktivität und könnte die Energie für den Sekretionsapparat liefern [Sexton und Vogel, 2004]. Die DotH und DotO Proteine befinden sich nach dem intrazellulären Wachstum in Makrophagen auf der Oberfläche von *L. pneumophila* und könnten für den Austritt der Bakterien aus dem Phagosom und für den Beginn einer neuen Infektion von Bedeutung sein [Watarai *et al.*, 2001a]. Das DotL Protein ist an der Regulation des Dot/Icm-Sekretionssystems beteiligt und trägt zur Überlebensfähigkeit von *L. pneumophila* bei [Buscher *et al.*, 2005]. Das IcmX Protein ist erforderlich für die Biogenese der replikativen Vakuole [Matthews und Roy, 2000]. Die IcmS und IcmW Proteine sind Bestandteile eines Komplexes, welches die Proteinsekretion unterstützt und die Phagosomenreifung unterbindet [Coers *et al.*, 2000; Nagai und Roy, 2001]. Der C-Terminus des IcmT Proteins ist für die Bildung von Poren in der Wirtzellmembran und für die Induktion der Lungenentzündung *in vivo* erforderlich [Molmeret *et al.*, 2002].

In den letzten Jahren konnte ebenfalls eine Reihe möglicher Effektorproteine charakterisiert werden. Eines davon ist das *L. pneumophila*-Protein RalF, einen Austauschfaktor für die Wirtszell-GTPase ARF1 (ADP-ribosylierender Faktor) [Nagai *et al.*, 2002, 2005]. Die GTPase ARF1 reguliert normalerweise den Transport von früh-sekretierenden Vesikeln zwischen ER und Golgi. Das RalF Protein wird über das Dot/Icm-Sekretionssystem eingeschleust und führt zur Bindung von ARF1 an das Phagosom. Jüngst konnte nachgewiesen werden, dass ARF wesentlich für die Fusion der ER-Membranen mit der *Legionella*-spezifischen-Vakuole ist [Robinson und Roy, 2006]. Allerdings kommt das *ralF*-Gen nur im Genom von *L. pneumophila* vor und konnte in keiner anderen *Legionella*-Spezies nachgewiesen werden [Nagai *et al.*, 2002]. Weitere Substrate des Dot/Icm Systems sind das

LidA Protein, von Bedeutung für die Rekrutierung von ER-Vesikeln während der Phagosom-Biogenese, und die Sid, Vip, WipA und YlfA Proteine, deren genaue biochemische Aktivitäten jedoch noch unbekannt sind [Conover *et al.*, 2003; Luo and Isberg, 2004; Campodonico *et al.*, 2005; Derre und Isberg, 2005; Ninio *et al.*, 2005; Brüggemann *et al.*, 2006].

Zusätzlich verfügt *L. pneumophila* über ein Typ II Sekretionssystem [Liles *et al.*, 1998], welches von der Aktivität der Prepilin-Peptidase (PilD) abhängig ist [Liles *et al.*, 1999; Aragon *et al.*, 2000; Rossier und Cianciotto, 2001]. Mutationen innerhalb der *lsp* (*Legionella* secretion pathway) Gene, die für das Sekretionssystem kodieren, vermindern die Fähigkeit von *L. pneumophila* Makrophagen und Protozoen zu infizieren [Hales und Shuman, 1999b; Rossier und Cianciotto, 2001; Rossier *et al.*, 2004]. Mehrere Abbauenzyme, unter anderem eine RNase, eine Zink-Metalloprotease (Msp), mono-, di- und Triacylglycerol-Lipasen, eine Phospholipase A (PLA), eine Lysophospholipase A (LPLA), zwei saure Phosphatasen und eine *p*-Nitrophenyl-Phosphorylcholin-Hydrolase, werden über das Typ II Sekretionssystem transportiert [Moffat *et al.*, 1994a; Liles *et al.*, 1999; Flieger *et al.*, 2000a, 2000b, 2001b; Aragon *et al.*, 2000, 2001; Rossier *et al.*, 2004].

Zuletzt wurde das putative Typ I Sekretionssystem LSS (*Legionella* secretion system), in *L. pneumophila* identifiziert [Jacobi und Heuner, 2003]. Typ I Sekretionssysteme dienen dem Transport Poren-bildender RTX-Toxine, die für die Anhaftung an der Wirtszelle und für die Oberflächen-assoziierte Zytotoxizität von Bedeutung sind [Lally *et al.*, 1997]. Die Substrate des LSS-Systems sind noch nicht bekannt, obgleich ein RTX-Protein in *L. pneumophila* beschrieben worden ist [Jacobi und Heuner, 2003; Cirillo *et al.*, 2002]. Das RtxA-Protein ist an der Aufnahme und intrazellulärer Replikation von *L. pneumophila* in Monozyten und Protozoen beteiligt [Cirillo *et al.*, 2001, 2002].

6.1.2 Proteine der äußeren Membran

Das Lipopolysaccharid (LPS) von *L. pneumophila* ist ein Immunogen, welches mit den klassischen und alternativen Komplement-Signalwegen interagieren kann [Mintz *et al.*, 1992]. Das Lipid A zeigt endotoxische Aktivität, die jedoch im Vergleich zu anderen gram-negativen Bakterien schwächer ausfällt. Verantwortlich dafür könnte die geringe Affinität des Lipids A für den CD-14 Rezeptor auf der Makrophagenoberfläche sein. [Schramek *et al.*, 1982; Neumeister *et al.*, 1998]. Die durch die Deletion des *rcp*-Gens verursachte Veränderung des Lipids A, verringert die Fähigkeit von *Legionella*, kationischen Peptiden zu widerstehen und Wirtszellen zu infizieren [Robey *et al.*, 2001]. Bei *L. pneumophila* Serogruppe (Sg) 1 konnte

eine phasenvariable Expression des LPS nachgewiesen werden [Lüneberg *et al.*, 1998]. Der molekulare Mechanismus der Phasenvariation wird einem 30 kb instabilen genetischen Element zugeschrieben, das sich in einer konservierten Region des Chromosoms des virulenten Wildtyps (WT) befindet. Die avirulente LPS-Phase tritt nach der „Excision“ des 30 kb Elements aus dem Chromosom ein, welches sich dann als „high copy“ Plasmid repliziert [Lüneberg *et al.*, 2001]. Der avirulente Phänotyp tritt während der Replikation im TierModell und nach der Inkubation in Serum häufiger auf [Lüneberg *et al.*, 2001].

Weiterhin befindet sich auf der Oberfläche von extrazellulär wachsenden Legionellen das 24 kDa Mip Protein (macrophage infectivity potentiator) [Helbig *et al.*, 2001]. Es gehört zu der Enzymfamilie der FK-506-bindenden Proteine und weist Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase (PPIase)-Aktivität auf [Fischer *et al.*, 1992]. Die Mip-Expression ist für die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella* in Protozoen und Säugerzellen erforderlich, obgleich der Wirkungsmechanismus des Proteins noch unklar ist [Cianciotto and Fields, 1992; Wintermeyer *et al.*, 1995]. Die homodimere Form des Mip Proteins ist insbesondere für die Infektion monozellulärer Wirtssysteme von Bedeutung [Köhler *et al.*, 2000], während die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella* im TierModell sowohl die Dimerisierung als auch die PPIase-Aktivität erfordert [Köhler *et al.*, 2003].

Darüber hinaus ist das Oberflächenprotein LvgA an der *L. pneumophila*-Infektion im TierModell beteiligt. Die *lvga*-Mutanten weisen im MeerschweinchenModell eine reduzierte Virulenz auf. Die erhöhte Empfindlichkeit der *lvga*-Mutante gegenüber β -Defensine könnte die Ursache für den attenuierten Phänotyp sein [Edelstein *et al.*, 2003].

6.1.3 Mechanismen der Eisenaufnahme in *Legionella*

Eisen wird für die intra- und extrazelluläre Vermehrung von *Legionella* benötigt [Hickey und Cianciotto, 1997; Byrd und Horwitz, 2000]. Mehrere sekretierte und zellassozierte Proteine tragen zur Eisenaufnahme während der *Legionella*-Infektion bei.

L. pneumophila besitzt zwei interne Fe^{3+} -Reduktasen, ist jedoch nicht in der Lage das Laktoferrin oder Transferrin des Wirtes zu benutzen [Poch und Johnson, 1993; James *et al.*, 1997]. Hämehaltige Substanzen können dagegen von den Bakterien gebunden und als Eisenquellen in Anspruch genommen werden [O'Connell *et al.*, 1996].

Darüber hinaus sondern Legionellen einen atypischen Siderophoren (Legionbactin) ab, dessen Expression von der Wachstumsphase der Bakterien abhängig ist [Liles *et al.*, 2000]. Genetische Homologe von Hydroxamat-Siderophoren (Pneumobactin), an der Infektion in

Makrophagen beteiligt, sowie Pyoverdinin-Siderophore sind ebenfalls in *L. pneumophila* identifiziert worden [Hickey und Cianciotto, 1994, 1997].

Die Methyltransferase *iraA*, ein putatives Eisentransportsystem (*iraB*), sowie ein membraninternes Cytochrom C Biogenesensystem (*ccmC*) sind für den Fe^{3+} -Erbwerb und die intrazelluläre Replikation erforderlich [Viswanathan *et al.*, 2000, 2002]. Die für den Eisenerwerb zuständigen Gene werden vom Transkriptionsfaktor Fur (Ferric uptake regulation), in Abhängigkeit vom intrazellulären Eisenniveau der Wirtszelle, reguliert [Hickey und Cianciotto, 1997]. Zu dem Fur-regulierten Genen gehört auch das *frgA*, welches für ein Homolog der Aerobactin-Synthetasen *IucA* und *IucC* von *E. coli* kodiert. Mutationen im *frgA* Gen führen zu einer 80% Reduktion der intrazellulären Replikation von *L. pneumophila* in U937-Zellen [Hickey und Cianciotto, 1997]. Weiterhin konnte eine Beteiligung des *feoAB* Locus von *L. pneumophila* im Fe^{2+} -Transport und an der intra- und extrazellulären Replikation nachgewiesen werden [Robey und Cianciotto, 2002].

6.1.4 Stressantwort und weitere Virulenzassoziierte Loci

Eine erhöhte Stresstoleranz ist für die intrazelluläre Vermehrung der Legionellen von Bedeutung. *L. pneumophila* besitzt zwei Katalase-Peroxidasen, die sich im Periplasma (*KatA*) und im Zytoplasma (*KatB*) der Bakterien befinden. Diese werden für die Erhaltung eines niedrigen H_2O_2 -Niveaus in der Zelle benötigt und sind von Bedeutung für die Infektion in Makrophagen [Bandyopadhyay und Steinman, 2000; Bandyopadhyay *et al.*, 2003]. Die periplasmatische Kupfer-Zink Superoxiddismutase (SOD) erhöht die Resistenz der Bakterien gegenüber toxischen Superoxid-Anionen, die jedoch keinen Einfluss auf die Replikation haben [St John und Steinman, 1996].

Weiterhin werden als Stressantwort während des Vorliegens im Wirt die *HtrA*, *LigA* (*Legionella pneumophila infectivity gene*) und *GspA* (*Global stress protein*) Proteine induziert, welche die intrazelluläre Vermehrung der Bakterien fördern [Abu Kwaik *et al.*, 1997; Fettes *et al.*, 2000; Pedersen *et al.*, 2001].

Die Herstellung von Transposon-Mutanten in *L. pneumophila* ermöglichte die Identifizierung weiterer virulenzassoziierte Gene. Mutationen im *pmi*-Loci (*protozoa and macrophage infectivity*) haben Defekte in der Adhärenz und Replikation von *Legionella* in Makrophagen und Protozoen zur Folge [Gao *et al.*, 1998b]. Die *mil* Gene (*macrophage infectivity loci*) sind dagegen nur an der Infektion in Makrophagen beteiligt [Gao *et al.*, 1998a]. Zudem fördert das *eml*-Loci (*early stage macrophage-induce locus*) die Einrichtung der replikativen Vakuole [Abu Kwaik und Pederson, 1996; Cirillo *et al.*, 2000].

7 Lyse des Wirtes durch *Legionella*

Ein fundamentaler Schritt im Lebenszyklus intrazellulärer Pathogene ist ihre Fähigkeit, die Wirtszelle nach der intrazellulären Vermehrung zu lysieren und diese zu verlassen. Die auf diesem Wege freigesetzten Bakterien können andere Zellen im gleichen Wirt infizieren oder auf einen neuen, entsprechend anfälligen Wirt übertragen werden.

Die Mechanismen der Zytolyse der Wirtszelle und der Freisetzung der Legionellen sind im Detail nicht bekannt. Es wird angenommen, dass die physikalische und metabolische Belastung, die durch die Präsenz einer hohen Anzahl von intrazellulären Bakterien entsteht, ausreicht, um die Wirtszellen zu zerstören [Alli *et al.*, 2000]. Andererseits könnte *L. pneumophila* Toxine produzieren, die die Membranen der Wirtszellen lysieren, um von einer nährstoffarmen Vakuole zu entkommen [Swanson und Hammer, 2000]. Zwei Zytotoxine von *L. pneumophila*, die auf Blutagarplatten hämolytische Aktivität zeigen, sind beschrieben worden: ein als Legiolysin bezeichnetes 39-kDa Protein und das 38-kDa Msp (Major secretion protein), eine Zink-Metalloprotease, die zytotoxische und proteolytische Aktivität aufweist [Quinn und Tompkins, 1989].

Im Rahmen einer hohen Anzahl von Bakterien, zeigt *L. pneumophila* auch eine kontakt-abhängige Zytotoxizität [Husmann und Johnson, 1994]. Diese löst eine Nekrose aus, die zu einer osmotischen Lyse des Wirtes führt. Der Vorgang wird durch die Bildung von < 3 nm großen Poren in den Membranen der Wirtszelle eingeleitet [Kirby *et al.*, 1998]. Nur Bakterien, die sich in der postexponentiellen Wachstumsphase befinden, zeigen diese poren-bildende Aktivität, welche vom Dot/Icm-Sekretionssystem abhängig ist [Gao und Abu Kwaik, 2000]. Eine Punktmutation im *icmT* Gen von *L. pneumophila* ist verantwortlich für die Entstehung einer Gruppe von Mutanten, die so genannten *rib* (release of intracellular bacteria) Mutanten, die eine normale intrazelluläre Vermehrung aufweisen, jedoch nicht in der Lage sind die Wirtszelle zu verlassen [Alli *et al.*, 2000; Molmeret *et al.*, 2002]

Die Gruppe um Abu Kwaik hat postuliert, dass die „egress pore“ am Ende der intrazellulären Wachstumsphase in die Membran des Phagosoms eingebracht wird und deren Zerstörung auslöst [Molmeret and Abu Kwaik, 2002; Molmeret *et al.*, 2004b]. Nach dem Austritt der Bakterien in das Zytoplasma wird die Pore auch in den zytoplasmatischen Organellen und die Plasmamembran injiziert. Die Zerstörung der Struktur und Funktionalität der Organellen, sowie die Auflösung der Plasmamembran bewirken die Lyse der Wirtszelle und den Austritt der Bakterien aus derselben [Molmeret and Abu Kwaik, 2002].

Die durch die Poren-bildende Aktivität hervorgerufene Zytolyse der Zelle ist wahrscheinlich die einzige Möglichkeit der Legionellen, den Protozoen-Wirt zu verlassen, da programmierter Zelltod bei Amöben bislang nicht beobachtet werden konnte [Gao und Abu Kwaik, 2000, Molmeret *et al.*, 2004b].

Im Gegensatz zum einphasigen Mechanismus der Lyse in Protozoen, ist bei Säugerwirtszellen eine zweiphasige Zerstörung durch *Legionella* beobachtet worden. In der ersten Phase, die bereits zu einem früheren Zeitpunkt der Infektion stattfinden kann, induzieren die Legionellen den programmierten Zelltod (Apoptose) in Makrophagen, Monozyten und alveolaren Epithelzellen [Hägele *et al.*, 1998; Gao und Abu Kwaik, 1999, Walz *et al.*, 2000]. Die zweite Phase ist durch eine schnell verlaufende Nekrose am Ende der postexponentiellen Wachstumsphase gekennzeichnet [Byrne und Swanson, 1998; Gao und Abu Kwaik, 1999], die ebenfalls im Protozoen-Wirt beobachtet werden kann.

Die Mechanismen der *Legionella*-assoziierten Apoptose sind nicht vollständig geklärt. Die Fähigkeit Apoptose zu induzieren ist unabhängig von der Wachstumsphase der Bakterien. Allerdings ist eine hohe Anzahl von Bakterien für die Induktion des Zelltods erforderlich [Gao und Abu Kwaik, 1999a]. Weiterhin wird die Anhaftung der Bakterien an der Wirtszelle für die Induktion der Apoptose vorausgesetzt. Die intrazelluläre Vermehrung der Bakterien oder die Synthese von Proteinen ist dagegen nicht erforderlich [Hägele *et al.*, 1998; Gao und Abu Kwaik, 1999a; Walz *et al.*, 2000].

Darüber hinaus korreliert die Fähigkeit Apoptose zu induzieren mit der Virulenz der einzelnen *Legionella*-Spezies. Spezies, die häufiger mit Fällen menschlicher Erkrankung assoziiert werden, wie z.B. *L. pneumophila* und *L. longbeachae*, können Apoptose auslösen, während andere Spezies, die mit der Erkrankung weniger in Verbindung gebracht werden, wie z. B. *L. gormanii*, dazu nicht in der Lage sind [Walz *et al.*, 2000].

Die Induktion der Apoptose bei der *Legionella*-Infektion erfolgt ausschließlich über die Aktivierung der Caspase-3 [Gao und Abu Kwaik, 1999a]. Eine Erhöhung des zytoplasmatischen Niveaus an Zytochrom *c* während der *Legionella* induzierten Apoptose in MM6-Zellen, ließ eine Aktivierung der Caspase-3 über den immanenten „mitochondrialen pathway“ vermuten [Neumeister *et al.*, 2002]. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Induktion der Apoptose durch *Legionella* unabhängig vom immanenten und externen Signalübertragungsweg erfolgt, und vielmehr die Beteiligung des Dot/Icm Sekretions-systems erfordert [Zink *et al.*, 2002; Molmeret *et al.*, 2004a].

In Abb. 2 ist die Infektion von *L. pneumophila* in Protozoen und humanen Phagozyten zusammenfassend dargestellt.

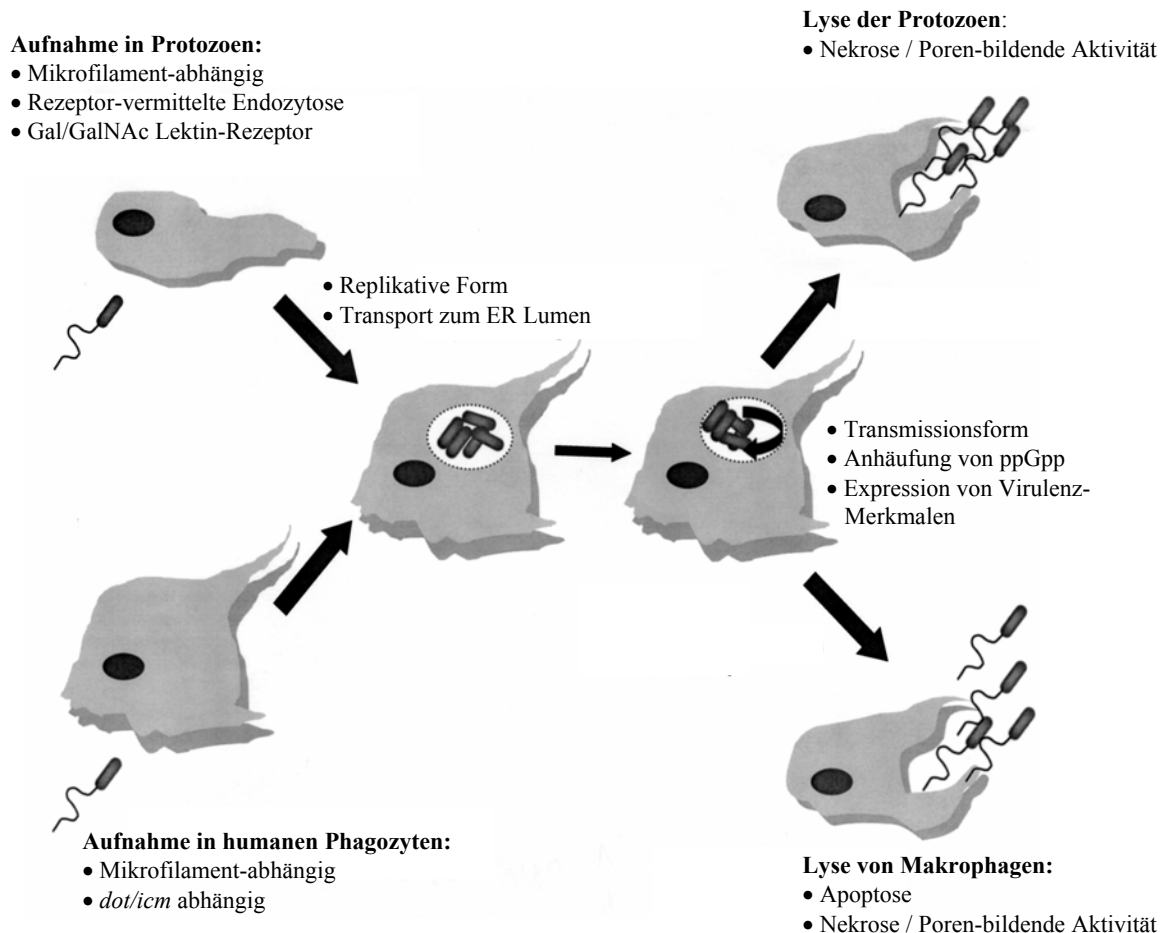


Abb. 2 Intrazellulärer Lebenszyklus von *L. pneumophila* in Protozoa und humane Phagozyten (modifiziert nach Fields *et al.*, 2002).

8 *Dictyostelium discoideum* als Modellsystem für die *Legionella*-Infektion

Für die Untersuchung der *Legionella*-Infektion stehen aufgrund ihrer Fähigkeit, sowohl Protozoen, Ciliaten als auch Säugetierzellen zu infizieren, zahlreiche Wirtssysteme zur Verfügung. Dieses bemerkenswert breite Wirtsspektrum deutet auf sehr effiziente oder mehrere Infektionsmechanismen der Legionellen hin [Fields, 1996].

In ihrer natürlichen Umgebung kommen Legionellen als Parasiten freilebender Amöben vor. Daher sind diese als Modellsystem gut geeignet, nicht zuletzt wegen der einfachen Kultivierbarkeit der Zellen. Jedoch weisen axenisch gewachsene Amöben eine hohe Mutationsrate auf und sind genetisch nicht manipulierbar. Eine eindeutige Identifizierung der an der Infektion beteiligten Wirtsfaktoren ist deshalb nur schwer möglich.

Weiterhin besteht die Möglichkeit die *Legionella*-Wirt-Interaktion in humanen Zelllinien zu charakterisieren. *In vitro* infizieren die Legionellen Monozyten, Makrophagen und

Epithelzellen [Daisy *et al.*, 1981; Pearlman *et al.*, 1988], *in vivo* kolonisieren sie jedoch hauptsächlich Alveolar-Makrophagen [Winn und Myerowitz, 1981]. Viele der bereits gewonnenen Erkenntnisse über die Mechanismen der *Legionella*-Infektion sind aus der Arbeit mit diesen Modellen entstanden. Jedoch beschränkt sich auch hier die Untersuchung auf bakterielle Faktoren, da die genetische Manipulation des Wirtes bislang nur beschränkt möglich ist. Darüber hinaus ist die Arbeit mit primären Makrophagen zeitaufwendig und nur schwer reproduzierbar [Yan und Cirillo, 2004].

Der Einsatz genetisch zugänglicher Wirtssysteme ermöglicht die Entwicklung neuer Strategien für die Untersuchung der Wirt-Pathogen-Interaktion [Strauss, 2000]. Die soziale Amöbe *D. discoideum* ist ein solcher Modellorganismus, der sich für die Untersuchung der *Legionella*-Infektion als geeignet erwiesen hat. Die intrazelluläre Vermehrung von *L. pneumophila* zeigt einen vergleichbaren Verlauf in *D. discoideum* und humanen Makrophagen. Darüber hinaus ist die *Legionella*-Infektion in beiden Wirtssystemen vom Dot/Icm-Sekretionsystem abhängig [Hägele *et al.*, 2000; Solomon und Isberg, 2000].

Aus der Verwendung von *D. discoideum* als Wirtssystem ergeben sich mehrere Vorteile. Die Amöben können mit wenig Aufwand in großen Mengen kultiviert und bearbeitet werden. Die erzielten Ergebnisse zeigen eine hohe Reproduzierbarkeit und es stehen zahlreiche molekularbiologische Methoden zur Verfügung, welche die Isolierung spezifischer *Dictyostelium*-Mutanten ermöglichen [Uyeda und Yumura, 2000]. Zudem besitzt *Dictyostelium* ein haploides Genom, so dass die entstandenen Mutationen nicht durch zusätzliche Allele verdeckt werden. Die kleine Größe des Genoms (≈ 34 Mb), auf 6 Chromosomen verteilt, und die geringe Menge nichtkodierender Sequenzen erlauben die Sättigung des Genoms mit Mutationen [Cox *et al.*, 1990; Loomis *et al.*, 1995].

Der einzigartige Lebenszyklus von *D. discoideum* (Abb. 3) ermöglicht die Untersuchung zellulärer Prozesse wie Phagozytose, Zytokinese, Motilität, Chemotaxis und Zelldifferenzierung, die in anderen genetisch manipulierbaren Modellorganismen abwesend oder weniger zugänglich sind [Kay und Williams, 1999].

Bei ausreichender Verfügbarkeit an Nahrung wächst *D. discoideum* als Einzeller. Die Aufnahme von Bakterien durch die freilebenden Amöben ähnelt der Phagozytose in humanen Makrophagen, die für die Immunabwehr und die Antigenpräsentation von Bedeutung sind [Cohen *et al.*, 1994]. Bei Nahrungsmangel schließen sich bis zu 10^5 Zellen zu einem multizellulären Organismus, mit unterschiedlich differenzierten Zelltypen, zusammen. Dies führt über verschiedene Entwicklungsstadien schließlich zur Ausbildung eines Fruchtkörpers mit Sporenzellen. Die Sporen sind darauf ausgerichtet langanhaltende Perioden ungünstiger

Umweltbedingungen zu überdauern, und unter besseren Bedingungen wieder als Einzeller auszukeimen [Xu *et al.*, 2004]. Die Signaltransduktion während des Differenzierungsprozesses erfolgt über cAMP, das zum einen als intrazellulärer Mediator der Signalübertragung [Aubry und Firtel, 1999] und zum anderen als extrazelluläres Morphogen und Chemoattraktans dient [Saran *et al.*, 2002].

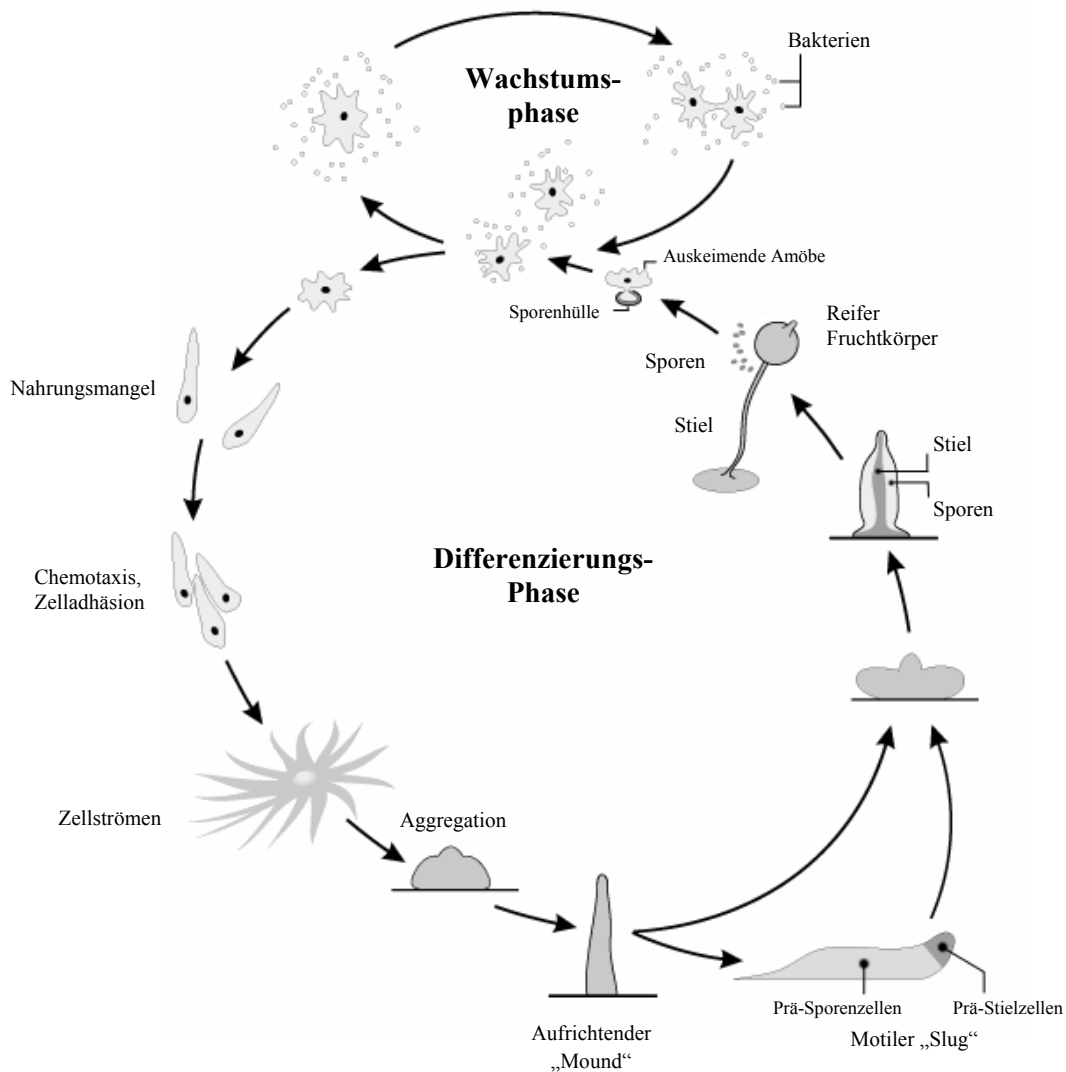


Abb. 2 Lebenszyklus von *D. discoideum* (modifiziert nach Nellen, www.uni-kassel.de/fb19/genetics). Während der Wachstumsphase befinden sich die Dictyostelien im Trophozysten-Stadium. Kurz nach Beginn der Hungerphase kommt es zur Aggregation der Zellen. Dies führt nach etwa 5 Stunden zu sichtbaren Zellströmen entlang des cAMP-Gradienten [Siegert und Weijer, 1992]. Bei zunehmender Zelldichte im Aggregationszentrum bildet sich nach ca. 10 Stunden ein dreidimensionaler „Mound“, der einem multizellulären Organismus entspricht. Das weitere Aufrichten führt zur Ausbildung eines motilen „Slugs“ der von einer extrazellulären Matrix umgeben wird ($t = 15-17$ h). Ein weiterer Anstieg der extrazellulären cAMP-Konzentration bewirkt die Differenzierung in Prä-Stiel- und Prä-Sporenzellen [Meili und Firtel, 2003]. Die Abnahme der cAMP-Konzentration an der „Slug“-Spitze löst schließlich die Kulmination und die damit einhergehende terminale Differenzierung zu Stielzellen und Sporen aus ($t = 24$ h), wodurch ein reifer Fruchtkörper mit langem Stiel und Sporenkopf (Sorus) entsteht [Bretschneider *et al.*, 1999].

9 Aufnahmemechanismen von *D. discoideum*

Die meisten eukaryontischen Zellen sind in der Lage Flüssigkeit (Pinozytose) und Festkörper (Phagozytose) aus der extrazellulären Umgebung aufzunehmen. Die Pinozytose dient der Internalisierung von Nährstoffen, Antigenen, Wachstumsfaktoren und wiederverwendbaren Rezeptoren und ist in den meisten Fällen Clathrin-abhängig [Hirst und Robinson, 1998; Johannes und Lamaze, 2002]. Die Phagozytose dagegen ist ein Clathrin-unabhängiger, Aktin-abhängiger Prozess [Greenberg und Grinstein, 2002]. Obgleich mehrere Zellarten phagozytische Fähigkeiten besitzen, gelten nur einige Zellen des Immunsystems, wie z. B. Neutrophile, Makrophagen und Monozyten, als professionelle Phagozyten [Djaldetti *et al.*, 2002]. Auch *Dictyostelium*-Zellen sind sehr effiziente Phagozyten, mit einer dreifach höheren Phagozytoserate als die von humanen Makrophagen [Maniak, 2002].

Die Phagozytose beginnt mit der Bindung der Partikel an die Rezeptoren auf der Oberfläche der phagozytischen Zellen und die dadurch eingeleitete Signalübertragungskaskade. Die Signale lösen eine Aktin-Polymerisation aus, die zur Ausbreitung der Zellenmembran um die Partikel führt. Diese werden anschließend in Form von Phagosomen internalisiert und fusionieren später mit den Lysosomen [Aderem und Underhill, 1999].

Bislang sind in *D. discoideum* drei an der Phagozytose beteiligte Rezeptoren bekannt, die jedoch nicht vollständig charakterisiert sind. Ein Lektin, welches die Bindung von Bakterien und anderen Partikeln über Glukoseüberreste vermittelt, ein unspezifischer Rezeptor verantwortlich für die Bindung von Festkörpern über hydrophobe Interaktionen und ein 130 kDa Glykoprotein, möglicherweise ein „bona fide“ Rezeptor [Vogel *et al.*, 1980; Chia, 1996; Chia *et al.*, 2005]. Mit Hilfe von Antikörpern gegen das Kohäsions-Molekül csB (c̄ontact s̄ites B) konnte die über den unspezifischen Rezeptor vermittelte Phagozytose unterbunden werden [Chadwick *et al.*, 1984]. Jedoch interagieren diese Antikörper auch mit Kohlenhydrat-Epitopen von Proteinen der Plasmamembran, so dass die Identität des Rezeptors nach wie vor ungewiss ist [Chia und Luna, 1989]. Darüber hinaus konnte die Beteiligung des Phg1p-Proteins und des SadA-Adhäsionsmoleküls an der Phagozytose von Latex-beads oder *E. coli* nachgewiesen werden [Cornillon *et al.*, 2000; Fey *et al.*, 2002; Benghezal *et al.*, 2003].

Nach der Bindung der Partikel an den Rezeptor, wird das Aktinzytoskelett zu einem „phagocytic cup“ umgestaltet (Abb. 4). Die Reorganisation des Zytoskeletts wird über heterotrimere G-Proteine reguliert, unabhängig vom verwendeten Rezeptor [Peracino *et al.*, 1998]. Weiterhin werden kleine GTPasen der Rho- und Ras-Familien in die Regulation des

phagozytischen Prozesses miteinbezogen [Seastone *et al.*, 1999; Dumontier *et al.*, 2000; Wilkins and Insall, 2001; Rivero und Somesh, 2002].

Die Rekrutierung der Wiskott-Aldrich-Syndromproteine (WASp) oder ihre Familienmitglieder *N-WASp* und *WAVE/Scar* durch kleine GTPasen leitet die Reorganisation des Aktinzytoskeletts ein [Mullins und Machesky, 2000]. Mutationen des *scar*-Gens in *D. discoideum* haben eine Reduktion von mehr als 50% der zellularen Aktinfilamente (F-Aktin) und verringerte Phagozytoseraten zur Folge [Seastone *et al.*, 2001]. Das C-terminale Ende des *scar*-Moleküls interagiert mit dem aktinbindenden-Protein Profilin und dem Arp2/3 Komplex. Beide sind an der Geschwindigkeitsregelung der Filamentbildung beteiligt; Profilin indem es einen Komplex mit globulärem Aktin (G-Aktin) bildet, und der Arp2/3 Komplex durch die Nukleation von Verzweigungen an bereits bestehenden Aktinfilamenten [Insall *et al.*, 2001; Janssen und Schleicher, 2001; Seastone *et al.*, 2001].

Das F-Aktin sammelt sich unterhalb der Plasmamembran an, wo es zur Bildung des „phagocytic cups“ und zur Internalisierung der Partikel beiträgt [Maniak *et al.*, 1995; Hacker *et al.*, 1997]. Beide Prozesse sind mit einem großen Energieaufwand verbunden, der von den molekularen Motoren des Myosins abhängig ist. Folglich bewirken Mutationen in den *myoK* und *myoI* Genen eine Reduktion der Phagozytoserate von 30%, beziehungsweise 80% [Titus, 1999].

Zahlreiche Protein-Protein-Wechselwirkungen sind erforderlich, damit das Zytoskelett zu jedem Zeitpunkt die notwendige Form annehmen kann. Proteine die Aktin-Monomere binden, verlangsamen die Aktinpolymerisation durch den Entzug des G-Aktins aus dem Gleichgewicht [Haugwitz *et al.*, 1994; Gottwald *et al.*, 1996].

Der Aufbau und Erhalt des Filamentnetzwerks ist vom aktinbündelnden Protein Fimbrin und dem quervernetzenden Protein α -Aktinin abhängig [Noegel *et al.*, 1987; De Arruda *et al.*, 1990]. Das Membran-assoziierte Protein Comitin stellt eine Verbindung zwischen dem Aktinzytoskelett und den Membranen des Golgi-Apparates her. Das Plasmamembran-assoziierte Talin interagiert mit Integrinen und stabilisiert den „phagocytic cup“ [Weiner *et al.*, 1993; Niewöhner *et al.*, 1997; Martel *et al.*, 2001]. Die CAP-Proteine binden an das (+)-Ende der Aktinfilamente und verhindern so ihre Verlängerung [Zelicof *et al.*, 1996]. Andere Proteine wie DAip1 bewirken die Fragmentierung von Aktinfilamenten [Konzok *et al.*, 1999]. Coronin und der Gelierungsfaktor ABP-120 ko-lokalisieren mit F-Aktin am „phagocytic cup“ und sind für dessen Bildung erforderlich [Maniak *et al.*, 1995; Cox *et al.*, 1996].

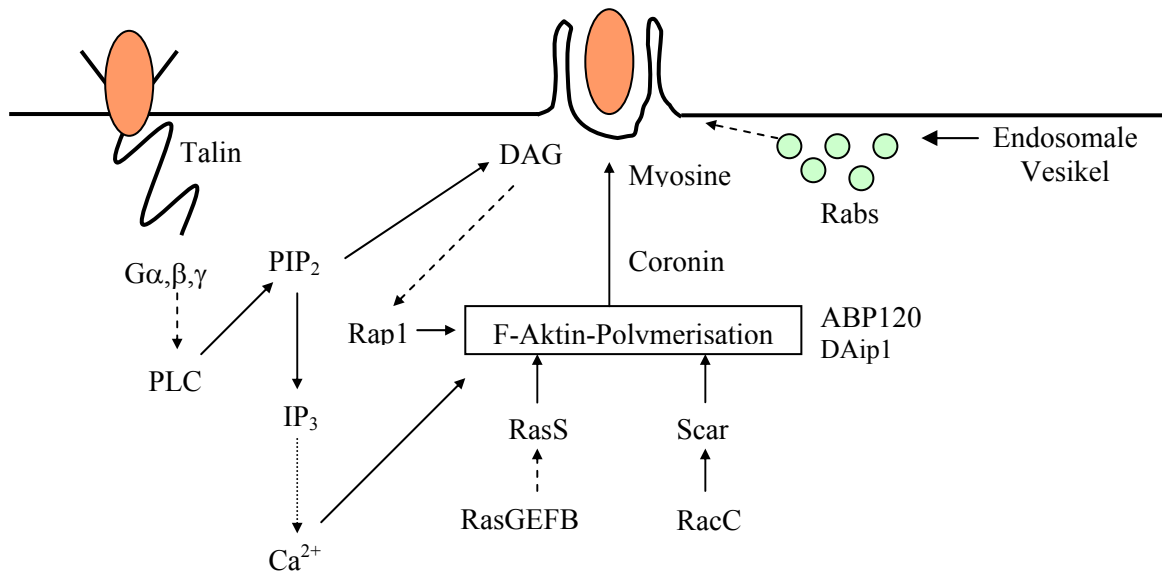


Abb. 4 Regulation der Phagozytose in *D. discoideum* (modifiziert nach Cardelli, 2001). Die angezeigten Proteine nehmen, räumlich und zeitlich geordnet, an der Bildung und Erhaltung der Aktinfilamente teil. Die Funktion der einzelnen Proteinen wird im Text erklärt.

10 Phagosombiogenese in *D. discoideum*

Die Phagosomenreifung in *D. discoideum* kann in drei Phasen eingeteilt werden: Das frühe Phagosom, das saure Phagolysosom und das späte, nicht-saure Multipartikel-Phagosom [Duhon und Cardelli, 2002].

Gleich nach seiner Entstehung ähnelt die Begrenzungsmembran des Phagosoms der Plasmamembran, sein flüssiger Inhalt entstammt dem extrazellulären Medium. Dieses frühe Phagosom zeigt keinerlei bakterizide Fähigkeiten [Rezabek *et al.*, 1997]. Nach einer Minute werden Aktinfilamente und aktinbindende Proteine von der Phagosomoberfläche entfernt, so dass das Phagosom imstande ist, mit dem endolysosomalen System zu interagieren [Rauchenberger *et al.*, 1997; Rupper *et al.*, 2001a].

Die Entwicklung des Phagosoms zum Phagolysosom zeichnet sich durch mehrere Membranfusions-Vorgänge aus, die nur in einer bestimmten Reihenfolge ablaufen können [Desjardins *et al.*, 1994]. Auskunft über den Reifegrad des Phagosoms geben Markerproteine, welche die einzelnen Vorgänge charakterisieren. So können frühe Phagosomen durch die Anwesenheit vom EEA1 (early endosome antigen 1), die Ras-verwandte GTPase Rab5 und von Transferrin-Rezeptoren erkannt werden [Pitt *et al.*, 1992; Garin *et al.*, 2001].

Zeitgleich oder kurz nach dem Verlust der Aktinhülle wird das Lumen des Phagosoms mit Hilfe von lysosomalen Enzymen und der Protonen-pumpenden vakuolären ATPase (V-ATPase) innerhalb von Sekunden angesäuert [Clarke *et al.*, 2002; Maniak, 2003]. Dieses saure Phagosom verliert die Markerproteine des frühen Phagosoms, die durch Rab 7, Rab 9, Mannose-6-Phosphat-Rezeptor und LAMPs (lysosomal-associated membrane proteins) ersetzt werden [Via *et al.*, 1997]. Die entfernten Markerproteine werden recycelt und zur Plasmamembran zurücktransportiert [Aguado-Velasco und Bretcher, 1999]. Die Rab7- und Rab9-GTPasen sind an der zeitversetzten Rekrutierung der lysosomalen Enzyme am Phagosom beteiligt [Buczynski *et al.*, 1997; Rupper *et al.*, 2001b]. Innerhalb der ersten drei min nach der Entstehung des Phagosoms werden Cystein-Proteasen rekrutiert, die durch einen GlcNAc-1-P-Rest modifiziert sind. Diese werden nach 15 min recycelt und durch lysosomale Hydrolasen ersetzt, die eine Man-6-P-OCH₃ Erkennungssequenz tragen [Souza *et al.*, 1997]. Der pH des sauren Phagolysosoms beträgt 4,5 - 5,5 und dient, neben dem Abbau der Inhalte des Phagosoms, der Regulation der Fusionsvorgänge [Rupper *et al.*, 2001b]. Nach ungefähr 30 min wird der pH des Lumens neutralisiert, was für die optimale Leistung der Enzyme von Bedeutung sein könnte [Padh *et al.*, 1993; Jankowski und Grinstein, 2002]. Im Anschluss wird die V-ATPase von der Endosomenmembran entfernt und für ihre weitere Verwendung bei der Ansäuerung von frühen Endosomen recycelt [Clarke *et al.*, 2002]. In diesem Stadium sind die Phagosomen in der Lage homotypische Fusionen durchzuführen, wodurch mehrere kleine Phagosomen zu einem einzelnen, großen Phagosom fusionieren [de Chastellier und Thilo, 1997].

Das späte, nicht saure Phagosom, wird anschließend durch die Interaktion mit Proteinen des Zytoskeletts, wie Coronin, Scar und dem Arp2/3 Komplex mit Aktinfilamenten umhüllt [Rauchenberger *et al.*, 1997; Seastone *et al.*, 2001]. Durch die Exozytose werden unverdauliche Partikel sowie lysosomale-Enzyme ins extrazelluläre Medium abgesondert [Dimond *et al.*, 1981].

11 Calreticulin und Calnexin: Kalzium-bindende Proteine im ER

Das endoplasmatische Reticulum (ER) ist die größte Membranorganelle der Eukaryontenzellen. Dort erfolgt die Synthese von Membranlipiden, Membran- und Sekretionsproteinen. Darüber hinaus befindet sich im ER eine umfangreiche Ansammlung molekularer Chaperone, die den Aufbau und Modifizierung neu synthetisierter Proteine ermöglichen.

Zudem dient das ER als metabolisch wichtigste Ca^{2+} -Quelle der Zelle [Meldolesi und Pozzan, 1998].

Das 64 kDa Transmembran-Protein Calnexin (CNX) und das 46 kDa lumenale Protein Calreticulin (CRT) sind Ca^{2+} -bindende Chaperone des ERs, verantwortlich für die korrekte Faltung neu synthetisierter Glykoproteine [Trombetta und Helenius, 1998; Parodi, 2000].

Innerhalb des Qualitätskontrollprozesses im ER nehmen CNX und CRT am Glukosylation-/Deglukosylationzyklus teil [Trombetta und Parodi, 2003]. In der zentralen Domäne von CNX und in der Prolin-reichen P-Dömäne von CRT befinden sich Lektin-Bindungsstellen, die mono-glukosilierte Glykane, in einer Ca^{2+} -abhängigen Weise, erkennen [High *et al.*, 2000]. Im Lumen des ERs sind neu synthetisierte Glykoproteine mit $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Oligosacchariden assoziiert. Zwei von den drei Glukose-Einheiten werden von den Glucosidasen I und II entfernt, so dass die Glykoproteine an CNX und CRT binden und bei ihrer Faltung unterstützt werden können [Ellgaard und Helenius, 2001]. Die Bindung der Proteine findet durch einen einheitlichen Mechanismus statt. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Lokalisation im ER, werden von CNX und CRT jedoch verschiedene Glykoproteingruppen gebunden, [Danilczyk *et al.*, 2000]. Korrekt gefaltete Glykoproteine verlassen den Zyklus und werden aus dem ER ausgeführt. Fehlerhaft gefaltete Proteine werden dagegen von der UDP-Glukose-Glykoprotein-Glukosyl-Transferase erneut glukosyliert und nehmen nochmals an dem Glukosylation-/Deglukosylationzyklus teil.

Die Interaktion von CNX und CRT mit neu synthetisierter Glykoproteine erfolgt jedoch nicht ausschließlich über ihre Lektin-Bindungsstelle. Diese Chaperone können zusätzlich an hydrophobe Polypeptidsegmente binden und native von nicht-nativen Proteinen unterscheiden. Die Rolle von Kalzium bei dieser Interaktion ist allerdings noch ungeklärt [Saito *et al.*, 1999].

Die Aufgaben von CRT in der Zelle beschränken sich jedoch nicht auf ihre Chaperon-Funktion im ER (Abb. 4). CRT kann durch einen Ca^{2+} -abhängigen Mechanismus mit anderen ER-Chaperonen interagieren und dessen Funktion regulieren [Corbett *et al.*, 1999]. Darüber hinaus beeinflusst CRT, durch die Regulation des $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Rezeptors und der sarcoplasmatischen/ endoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase (SERCA 2), die Ca^{2+} -Speicherkapazität des ERs und folglich die Ca^{2+} -Homeostase der Zelle [John *et al.*, 1998]. Die Entleerung der Ca^{2+} -Speicher im ER führt zu einer Erhöhung der freien zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und anschließend zu einem Einstrom von extrazellulärem Kalzium in die Zelle [Berridge *et al.*, 2000; Berridge, 2002]. Weiterhin ist CRT indirekt an der Genexpression und der Zelladhäsion beteiligt. Dies erfolgt entweder über die Modulation von Adhäsion-assoziierten Molekülen oder durch Änderungen in der Integrin-abhängigen Ca^{2+} -Signalgebung, oder

beides [Coppolino *et al.*, 1997; Michalak *et al.*, 1999]. So nimmt CRT an einem Signalnetz innerhalb des ER-Lumens teil, welches vermutlich durch Änderungen der freien $[Ca^{2+}]_{ER}$ reguliert wird [Corbett und Michalak, 2000; Michalak *et al.*, 2002].

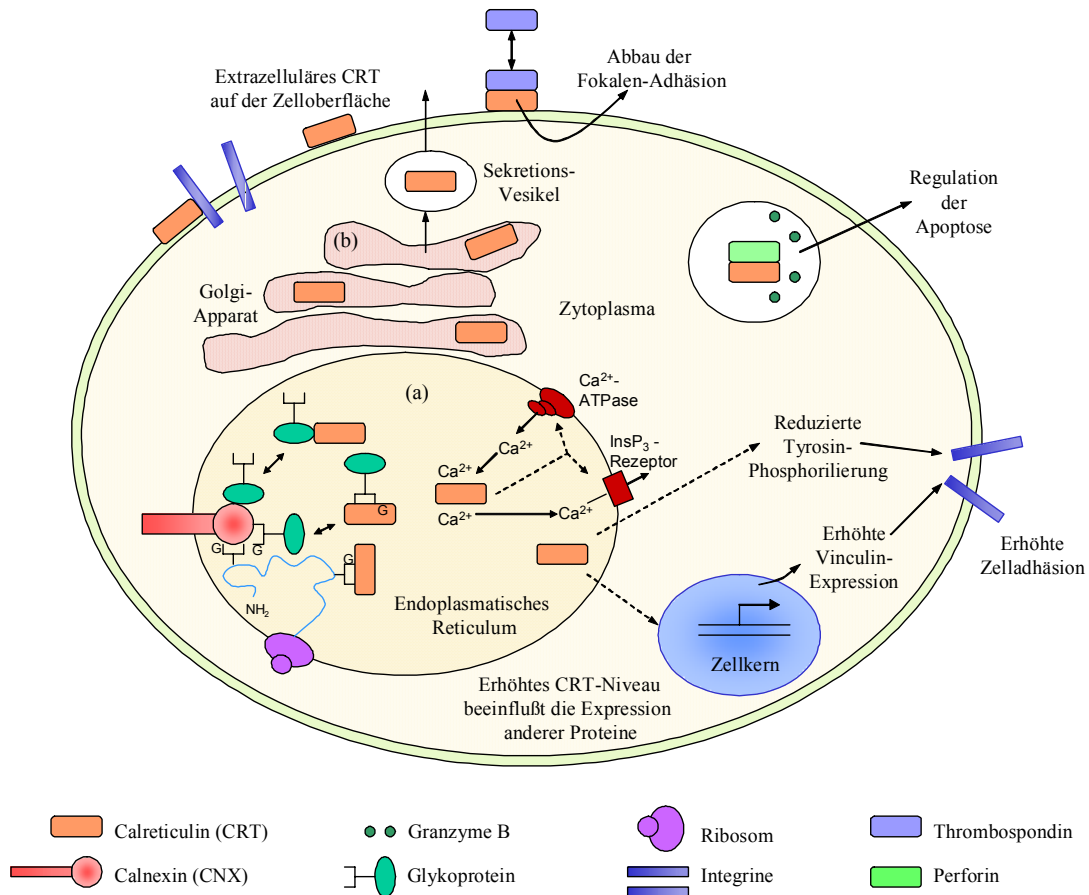


Abb. 4 Funktion und zelluläre Lokalisation von Calreticulin und Calnexin (modifiziert nach Johnson *et al.*, 2001). (a) CRT und CNX agieren im ER als molekulare Chaperone für neu synthetisierte und ungefaltete Glykoproteine. Darüber hinaus beeinflusst CRT die Ca^{2+} -Speicherkapazität des ERs durch die Interaktion mit dem $InsP_3$ -Rezeptor und der SERCA2-ATPase. (b) CRT wird vom ER zur Zelloberfläche, vermutlich mit Hilfe des „secretory pathways“, transferiert, wo es an der Zelladhäsion beteiligt ist.

12 Kalzium als sekundärer Botenstoff der Zelle

Kalzium ist einer der wichtigsten sekundären Botenstoffe aller bekannten Lebensformen, der u.a. an der Regulation von Enzymaktivitäten, Zellstoffwechsel, Zellteilung, Proteinsynthese, Genexpression und Apoptose mitwirkt [Berridge *et al.*, 2000]. In Eukaryontenzellen beträgt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) 10^{-7} mol/l⁻¹, und ist damit 1.000 - 10.000-fach niedriger als im extrazellulären Medium. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Homeostase wird von der Zelle aktiv aufrechterhalten, wobei transiente Erhöhungen der $[Ca^{2+}]_i$ als Signale dienen. Die

Antwort der Zelle auf diese Signale kann innerhalb weniger Sekunden oder über einen längeren Zeitraum erfolgen [Bootman *et al.*, 2001].

Mehrere Mechanismen tragen zur Erhaltung der niedrigen $[Ca^{2+}]_i$ bei. Na^{2+}/Ca^{2+} -Austauscher auf der Zelloberfläche können, angetrieben durch den Einstrom von Na^+ entlang seines chemischen und elektrischen Gradienten, freies Ca^{2+} aus der Zelle befördern. Das Gleichgewicht der Na^+ -Ionen wird wiederum von der Na^+/K^+ -ATPase kontrolliert.

Darüber hinaus sind das endoplasmatische Reticulum (ER) und die Mitochondrien als wichtige Ca^{2+} -Speicher der Zelle an der Ca^{2+} -Signalgebung beteiligt [Rutter und Rizzuto, 2000]. Die exakte Steuerung der Ca^{2+} -Freisetzung aus diesen Organellen erfolgt über eine Vielzahl von Ca^{2+} -Transport- und Speicherproteinen und durch die Kontrolle der Ca^{2+} -Konzentration im ER- und Mitochondrien-Lumen [Jouaville *et al.*, 1998; Hajnoczky *et al.*, 2002]. Das Ausmaß des Ca^{2+} -Transports durch die ER-Membran hängt in erster Linie von der freien Ca^{2+} -Konzentration innerhalb des ERs ($[Ca^{2+}]_{ER}$) ab, welche die Tätigkeit der $InsP_3$ -Rezeptoren moduliert [Clapham, 1995]. Zusätzlich regulieren Änderungen der $[Ca^{2+}]_{ER}$ die Ca^{2+} -Permeabilität der speichergesteuerten Ca^{2+} -Kanäle (SOC) der Plasmamembran. Die Diffusion eines löslichen „Calcium-Influx-Faktors“ (CIF) oder eine direkte physikalische Kopplung zwischen den SOC-Kanälen und den $InsP_3$ -Rezeptoren könnte für die Aktivierung der Ca^{2+} -Kanäle verantwortlich sein [Kiselyov *et al.*, 1998; Smani *et al.*, 2004].

Neben ihrer Funktion in der Signalgebung beeinflusst die Ca^{2+} -Konzentration innerhalb des ER-Lumens und der mitochondrialen Matrix auch viele andere Aufgaben dieser Organellen. Die Aktivität einiger residenter ER-Chaperone wird über Änderungen der $[Ca^{2+}]_{ER}$ moduliert, wodurch indirekt die Verarbeitung, Sortierung und Absonderung von Glykoproteinen reguliert wird [Corbett *et al.*, 1999]. In den Mitochondrien steuert die Ca^{2+} -Konzentration die Tätigkeit einiger Dehydrogenasen, wodurch der Zellmetabolismus mit der Ca^{2+} -Signalgebung verknüpft ist [Hajnoczky *et al.*, 1995; Robb-Gaspers *et al.*, 1998]. Die mitochondriale Dekodierung der Ca^{2+} -Signale ermöglicht die schnelle Antwort der Zellen auf eine Zunahme der Energienachfrage, kann jedoch durch begleitende apoptotische Anreize auch zu einem „Todessignal“ umgewandelt werden [Duchen, 2000].

Weiterhin kommt Kalzium eine zentrale Bedeutung bei der Induktion der antimikrobiellen Abwehr professioneller Phagozyten zu. Die $[Ca^{2+}]_i$ wird nach der Aktivierung der Rezeptoren auf der Zelloberfläche erhöht und trägt während der Phagozytose zur Reorganisation des Aktinzytoskeletts bei [Majeed *et al.*, 1998]. Darüber hinaus ist die Ca^{2+} -Signalgebung essentiell für die Synthese von toxischen Produkten während des „oxidativen burst“, für die

Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) und Zytokinen der Entzündungsreaktion, wie TNF- α [Denlinger *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 1996].

13 Zielsetzung der Arbeit

Viele der Virulenzfaktoren und Infektionsmechanismen von *L. pneumophila* konnten in den letzten Jahren aufgeklärt werden. Jedoch sind viele an der Infektion beteiligten Wirtsfaktoren mangels geeigneter WirtszellModelle bislang nur unzureichend charakterisiert.

In der vorliegenden Arbeit sollten durch die gezielte pharmakologische Hemmung und den Einsatz der genetisch manipulierbaren Bodenamoöbe *D. discoideum*, Wirtsproteine und Signaltransduktionswege identifiziert werden, die an der Phagozytose und intrazellulären Vermehrung von *Legionella* beteiligt sind.

Für den Einsatz von *D. discoideum* als neues Wirtszellsystem für *Legionella* müssen im voraus die Infektionsbedingungen standardisiert werden. Dabei ist von besonderer Bedeutung die optimale Größe des Inokulums zu bestimmen, da zu viele Bakterien die Überlebensfähigkeit der Amöben beeinträchtigen, während zu wenige zu einer nicht ausreichenden Phagozytoserate führen. Ebenso garantiert eine geeignete Infektionszeit eine möglichst hohe Aufnahmerate der Bakterien.

Die Spezifität der zu untersuchenden Mechanismen sollte durch den Vergleich der *L. pneumophila* Infektion mit anderen *Legionella*-Spezies und *E. coli* bestimmt werden. Dabei werden sowohl virulente als auch avirulente *Legionella*-Stämme untersucht.

Die genaue Rolle verschiedener Wirtsproteine bei der *Legionella*-Infektion sollte mit Hilfe von gut charakterisierten *Dictyostelium*-Mutanten untersucht werden. Im Gegensatz zu andere Untersuchungsmethoden, wie zum Beispiel Mikroskopie, führt der Einsatz von Mutanten zu einer klaren Aussage über die Rolle des zu untersuchenden Proteins. Darüber hinaus stehen auch *Dictyostelium*-Zellen zur Verfügung bei denen Zytoskelett-, Golgi- und ER-Proteine mit dem Markerprotein GFP fusioniert sind. Dies ermöglicht die in-vivo Analyse der Lokalisierung und Funktion dieser Proteine während der *Legionella*-Infektion in *D. discoideum*.

Aufgrund der großen Bedeutung von Kalzium als sekundärer Botenstoff bei zahlreichen Zellsignalwegen, sollte der Zusammenhang zwischen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration und der Aufnahme von *L. pneumophila* untersucht werden.

MATERIAL UND METHODEN

1 Bakterienstämme, Wirtszellen und *Dictyostelium*-Mutanten

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen und Wirtszellen sind in den Tabellen 1 - 4 aufgeführt.

1.1 Bakterienstämme

Tabelle 1. Verwendete Bakterienstämme, Wachstumsbedingungen und Referenz/Herkunft.

Stamm	Medium und Wachstumstemperatur	Referenz/Herkunft
<i>E. coli</i> K12 DH5 α	LB, 37°C	Bethesda, Research
<i>E. coli</i> K12 DH5 α pBC(<i>gpf</i>)P _{mip}	LB + 25 μ g/ml Chloramphenicol, 37°C	Köhler <i>et al.</i> , 2000
<i>E. coli</i> K12 DH5 α pDsRed	LB + 50 μ g/ml Ampicillin, 37°C	CLONTECH
<i>Klebsiella aerogenes</i>	SM, 37°C	M. Schleicher, LMU München
<i>L. pneumophila</i> Corby, Sg1	BCYE, 37°C	Jepras <i>et al.</i> , 1985
<i>L. pneumophila</i> Nr.6, Sg1	BCYE, 37°C	D. Jonas, Freiburg
<i>L. pneumophila</i> PhilI JR 32	BCYE, 37°C	Sadosky <i>et al.</i> , 1993
<i>L. micdadei</i>	BCYE, 37°C	ATCC 33218
LLAP 10	BCYE, 30°C	CDC Atlanta, USA
LLAP K62	BCYE + α -Ketoglutarat, 30°C	Michel <i>et al.</i> , 1998
LLAP K86	BCYE + α -Ketoglutarat, 30°C	Michel <i>et al.</i> , 1998
<i>L. pneumophila</i> Corby (pRK10(pBC(<i>gpf</i>)P _{mip}))	BCYE + 25 μ g/ml Chloramphenicol, 37°C	Köhler <i>et al.</i> , 2000
<i>L. pneumophila</i> Nr. 6, Sg1 (pRK10(pBC(<i>gpf</i>)P _{mip}))	BCYE, 37°C + 5% CO ₂	S. Jacobi, Universität Würzburg
<i>L. micdadei</i> (pRK10(pBC(<i>gpf</i>)P _{mip}))	BCYE + 25 μ g/ml Chloramphenicol, 37°C	Diese Arbeit
<i>L. pneumophila</i> PhilI JR32 LELA3118 (<i>dotA</i> 3118:Tn903dIII <i>lacZ</i>)	BCYE, 37°C	Sadosky <i>et al.</i> , 1993
<i>L. pneumophila</i> Corby KH3 <i>flaA</i> -Mutante	BCYE + 25 μ g/ml Kanamycin, 37°C	Heuner <i>et al.</i> , 1995
<i>L. pneumophila</i> Corby KH <i>fliA</i> 12	BCYE + 25 μ g/ml Kanamycin, 37°C	Heuner <i>et al.</i> , 2002
<i>L. pneumophila</i> PhilI (L1) <i>lig A</i> -Mutante	BCYE + 25 μ g/ml Kanamycin, 37°C	Fettes <i>et al.</i> , 2000
<i>L. pneumophila</i> PhilI JR32 <i>mip</i> -Mutante	BCYE + 25 μ g/ml Chloramphenicol, 37°C	Wintermeyer <i>et al.</i> , 1995
LLAP 10 (pRK10(pBC(<i>gpf</i>)P _{mip}))	BCYE + 25 μ g/ml Chloramphenicol, 30°C	Diese Arbeit
<i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>avium</i> Chester	Middlebrook-7H11, 37°C	ATCC 35713
<i>Salmonella typhimurium</i> C17	LB, 37°C	Schlecht <i>et al.</i> , 1980

1.2 Wirtszellen

Tabelle 2. Verwendete Wirtszellen, Wachstumsbedingungen und Referenz/Herkunft.

Stamm	Medium und Wachstumstemp.	Referenz/Herkunft
<i>Dictyostelium discoideum</i> AX2	HL5, 23°C	M. Schleicher, LMU München
U937	RPMI + 10% FCS, 37°C und 5% CO ₂	DSMZ, ACC 5 Sundström <i>et al.</i> , 1976
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	PYG, RT	R. Michel, Koblenz

1.3 *Dictyostelium* AX2-Mutanten

Tabelle 3. Verwendete *Dictyostelium* AX2-Mutanten, Wachstumsbedingungen, Charakteristika und Referenz.

Mutante	Medium und Wachstumstemperatur	Charakteristika	Referenz
AB (PKA-R ⁻)	HL5 + 100 µg/ml G418, 23°C	Defekt in cAMP Bindung, keine Regulation der C-Untereinheit	Harwood <i>et al.</i> , 1992
AGHR (αA ⁻ / ABP-120 ⁻)	HL5 + 10 µg/ml G418, 23°C	Reduziertes Wachstum bei 15 -20°C, Pinozytose, Motilität, Gen-expression und Morphogenese beeinträchtigt	Rivero <i>et al.</i> , 1996
ASP56/CAP Homolog	HL5 + 1,5 µg/ml Blastocidin, 23°C	Veränderte Zellmorphologie, geringe Motilität, Zytokinese- und Endozytose-Defekt	Noegel <i>et al.</i> , 1999
Calnexin ⁻	HL5 + 10 µg/ml Blastocidin, 23°C	Geringer Phagozytose-Defekt	Müller-T. <i>et al.</i> , 2001
Calreticulin ⁻	HL-5 + 10 µg/ml Blastocidin, 23°C	Leichte Reduktion der Phagozytoserate	Müller-T. <i>et al.</i> , 2001
Comitin ⁻	HL5 + 4 µg/ml B Blastocidin, 23°C	Reduzierte osmotische Stress-Resistenz, beschränkte Aufnahme von <i>E. coli</i> und Hefe	Weiner <i>et al.</i> , 1993
Coronin ⁻	HL5 + 10 µg/ml G418, 23°C	Stark reduzierte Aufnahmerate (> 40%)	Maniak <i>et al.</i> , 1995
Daip1 ⁻	HL5 + 10 µg/ml Blastocidin, 23°C	Fehlerhaftes Wachstum, verminderte Beweglichkeit, Phagozytose und Makropinozytose	Konzok <i>et al.</i> , 1999
Coronin ⁻ / Daip1 ⁻	HL5 + 10 µg/ml G418 7,5 µg/ml Blastocidin, 23°C	Schwerer Defekt in Wachstum und Phagozytose	Müller-T., unveröffentlicht
HSB1 (PiaA ⁻)	HL5, 23°C	Reduzierte Chemotaxis, verzögerter Differenzierungs-Prozess, keine Adenylyl-Zyklase Aktivierung	Chen <i>et al.</i> , 1997
Lim C ⁻	HL5 + 1,5 µg/ml Blastocidin, 23°C	Reduziertes Wachstum bei hohen Temperaturen (27°C).	Khurana <i>et al.</i> , 2002
LimD ⁻	HL5 + 1,5 µg/ml Blastocidin, 23°C	Reduziertes Wachstum bei hohen Temperaturen (27°C), unregelmäßige Zellform, reduzierte chemotaktische Motilität	Khurana <i>et al.</i> , 2002

LimC ⁻ /D ⁻	HL5 + 4 µg/ml G418, 1,5 µg/ml Blasticidin, 23°C	Kein Wachstum bei erhöhten Temp. (27°C), reduzierte Toleranz gegenüber osmotischem Schock.	Khurana <i>et al.</i> , 2002
LW6 (Gβ ⁻)	HL5, 23°C	Defekte Phagozytose, Chemotaxis und Entwicklung	Peracino <i>et al.</i> , 1998
Myc2 (Gα2 ⁻)	HL5, 23°C	Keine Bildung von Fruchtkörpern	Endl <i>et al.</i> , 1996
Synexin	HL5 + 10 µg/ml G418, 23°C	Reduziertes Wachstum, Motilität und Chemotaxis bei niedrigem Ca ²⁺ - Niveau	Döring <i>et al.</i> , 1995
Villidin ⁻	HL5 + 1,5 µg/ml Blasticidin, 23°C	Verringerte Motilität während der Differenzierungsphase, reduzierte Phototaxis	Gloss <i>et al.</i> , 2003
YakA ⁻	HL5 + 20 µg/ml G418, 23°C	Keine Expression von cAMP- Rezeptoren, keine Einleitung des Differenzierungsprozesses, keine Aktin-Polymerisation und cGMP Anhäufung	Souza <i>et al.</i> , 1998

1.4 GFP-transformierte *Dictyostelium* AX2-Mutanten

Tabelle 4. Verwendete GFP-Fusionsproteine, Wachstumsbedingungen, Zelluläre Lokalisation und Referenz.

GFP-Fusionsprotein	Wachstumsbedingungen der Stämme	Zelluläre Lokalisation	Referenz
α-actinin-GFP	HL5 + 10 µg/ml G418, 23°C	Aktin Zytoskelett	Schleicher, unveröffentlicht
Arp3-GFP	HL5 + 20 µg/ml G418, 23°C	Zytoplasma, angereichert in kortikalen Regionen	Insall <i>et al.</i> , 2001
Coronin-GFP	HL5 + 10 µg/ml G418, 23°C	Aktinreiche Strukturen	Maniak <i>et al.</i> , 1995
Calnexin-GFP	HL5 + 10 µg/ml G418, 23°C	Membrane des Endoplasma-tischen Retikulums (ER)	Müller-T. <i>et al.</i> , 2001
Calreticulin-GFP	HL5 + 10 µg/ml G418, 23°C	Lumen des ERs	Müller-T. <i>et al.</i> , 2001
Tubulin-GFP	HL5 + 10 µg/ml G418, 23°C	Mikrotubuli	Neujahr <i>et al.</i> , 1998
Golgesin-GFP	HL5 + 10 µg/ml G418, 23°C	Membran des Golgi- Apparates	Schneider <i>et al.</i> , 2000

2 Antikörper, Vektoren, Oligonukleotide und Größenmarker

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper, Vektoren, Oligonukleotide und Größenmarker sind in den Tabellen 5 - 8 aufgeführt.

2.1 Antikörper

Tabelle 5. Verwendete Antikörper, Spezifität und Referenz/Herkunft.

Antikörperbezeichnung	Spezifität	Referenz/Herkunft
Maus-monoklonal 2125	α -Hsp 60 von <i>Legionella</i> , Genus-spezifisch	E. Lüneberg, Würzburg
Maus-monoklonal IgG	Anti-Phosphotyrosine Klon 4G10	Upstate, Biomol
Kaninchen-Anti-Maus, HRP konjugiert	Sekundärantikörper	Dako, Dianova

2.2 Vektoren

Tabelle 6. Verwendete Vektoren, Charakteristika und Referenz/ Herkunft.

Vektor	Charakteristika	Referenz/Herkunft
pGEMTeasy	A_p^r ; lacZ-Gen; P_{lac}	Promega, Heidelberg
pBC KS+	C_m^r ; lacZ-Gen; T7, T3 Promoter	Stratagene, La Jolla, California

2.3 Oligonukleotide

Tabelle 7. Verwendete Oligonukleotidprimer

Bezeichnung	DNA-Sequenz
DsRed-f-KpnI	5' <u>GGT ACC</u> GGT CGC CAC CAT GAG G 3'
DsRed-r-XbaI	5' <u>TCT AGA</u> GTC GC GCC GCT AAA G 3'

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firma MWG. Unterstrichene Sequenzbereiche enthalten eingeführte Schnittstellen für Restriktionsenzyme.

2.4 Größenmarker

Tabelle 8. Verwendete DNA und Protein-Größenstandards

a) 1kB-Leiter von Gibco

Fragment	Größe in kB
1	10
2	8,0
3	6,0
4	5,0
5	4,0
6	3,5
7	3,0
8	2,5
9	2,0
10	1,5
11	1,0
12	0,75
13	0,5
14	0,25

b) „Rainbow coloured protein molecular weight marker RPN 800“ von Amersham

Proteingröße in kDa	Farbe
250	Blau
160	Rot
105	Grün
75	Gelb
50	Purpur
35	Blau
30	Orange
25	Grün
15	Blau
10	Rot

3 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Becton Dickinson, Boehringer Ingelheim, Difco, Fluka, Gibco BRL, NEB, Quiagen, BioRad und Merck bezogen. Die verwendeten Inhibitoren wurden von den Firmen Sigma, Calbiochem und ICN Biomedicals bezogen und sind in der Tabelle 9 aufgeführt.

3.1 Inhibitoren

Tabelle 9. Verwendete Inhibitoren, Zielmolekül, Lösungsmittel und benutzte Konzentration

Substanz (IC ₅₀ in µM)	Wirkort	Lösungsmittel und benutzte Konzentration
BAPTA-AM	Intrazelluläres Ca ²⁺	DMSO, 50 - 1000 µM
Calphostin C (0,05 / >50)	Proteinkinase C (PKC)/ Protein-kinase A (PKA)	DMSO, 0,01 - 10 µM
Colchicin	Mikrotubuli	H ₂ O _{dest.} , 10 - 500 µM
Cycloheximid	Proteinbiosynthese	Ethanol, 10 - 100 µg/ml
Cytochalasin A	Aktinpolymerisation	DMSO, 0,5 - 10 µM
Genistein (50)	Tyrosinkinase (TK)	DMSO, 1 - 500 µM
EDTA	Extrazelluläres Ca ²⁺ und Mg ²⁺	H ₂ O _{dest.} , 1 - 1000 µM
EGTA	Extrazelluläres Ca ²⁺	H ₂ O _{dest.} , 1 - 1000 µM
H-89 (K _i 48 nM)	PKA	DMSO, 1 - 500 nM
Latrunculin A (0,2)	Aktinfilamente	DMSO, 0,01 - 1 µg/ml
LY294002 (1,5)	PI 3-Kinasen	DMSO, 1 - 100 µM
Methylamin	Rezeptor-vermittelte Endozytose	H ₂ O _{dest.} , 10 - 500 µM
Neomycin Sulfat (1 - 10)	Phospholipase C (PLC)	H ₂ O _{dest.} , 0,1 - 100 µM
Staurosporin (K _i 7 nM/ K _i 8,5 nM/ K _i 0,7 nM / K _i 70 nM)	PKA / PKG / PKC / TK.	DMSO, 0,1 - 100 nM
Suramin	G-Proteine	H ₂ O _{dest.} , 0,5 - 5 µM
Thapsigargin (30 nM)	ER-Ca ²⁺ -ATPase (SERCA)	DMSO, 1 - 200 nM
U73122 (1 - 2,1)	PLC	DMSO, 0,5 - 100 µM
U73343	Inaktives U73122-Analogon	DMSO, 0,5 - 50 µM
Wortmannin (0,005)	PI 3-Kinasen	DMSO, 1 - 100 nM
W7 (25)	Calmodulin	DMSO, 1 - 100 µM

4 Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10. Verwendete Geräte und Hersteller

Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage	Chyo JL 180
Autoklaven	Fedegari FOM/B50 Fedegari Teknomara 9191E
Brutschränke	Heraeus B5050E, Memmert Tv40b
Cleanbench	Nunc Microflow 50726
Durchflusszytometer (FACScan)	FACSCalibur, Becton Dickinson
Elektrophoresekammern	Pharmacia, BioRad
Elektronenmikroskop	Zeiss EM 10
Elektroporator	Bio Rad, Gene Pulser Transfection
Elektrotransfer-Apparatur	Mini Trans-Blot Cell, BioRad
Entwicklermaschine	Agfa, Curex 60
Eismaschine	Scotsman AF 20
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Axiolab 50W Hochdruck Quecksilberlampe Zeiss Axiovert 50W Hochdruck Quecksilberlampe Zeiss Filtersets 00 und 10
Gefrierschrank -20°C	Privileg Senator
Gefrierschrank -80°C	REVCO
Geldokumentation	Gel Doc 2000, BioRad
Gelelektrophorese-Apparatur	BioRad, Pharmacia, BioRad
Grobwaage	Chyo MP 3000
Konfokales-Laser-scanning-Mikroskop	Zeiss, LSM 500 mit Axiovert 100M Mikroskop Zeiss IM Mikroskop, 100× Ultrafluar NA 1.25 Objektiv
Magnetrührer	Sorvall RT 600
Mikrowellenofen	Moulinex
Netzgeräte	Consort E452, Pharmacia, BioRad Power Pac 300
Pipetten	Gilson, Eppendorf
PCR-Thermocycler	Biometra, T3 Thermocycler
pH-Meter	WTW pH 523
Photometer	Unicam 8625, Pharmacia
Schüttler	Innova TM 4300, Bühler
Thermoblock	Eppendorf Thermostat 5320, Liebisch
Tischzentrifuge	Eppendorf 5415 C
UV-Transilluminator	Appligene, Frankreich
Vortexer	GLW
Zentrifugen	J2-21 Kühlzentrifuge, Rotoren JA, Beckmann JA 20, Heraeus

5 Flüssigmedien und Nährboden für die Anzucht der Bakterienstämme

LB-Medium für die Anzucht von *E. coli*

10 g/l	Caseinhydrolysat
5 g/l	Hefeextrakt
5 g/l	NaCl

Für die Herstellung von Agarplatten 15g/l Agar zugeben.

SM-Agar für die Anzucht von *K. aerogenes*

10 g/l	Bacto Pepton (Difco)
10 g/l	Glucose
1 g/l	Hefeextrakt
1 g/l	MgSO ₄
2,2 g/l	KH ₂ PO ₄
1,3 g/l	K ₂ HPO ₄
0,3 g/l	Kobaltchlorid
15 g/l	Agar

BCYE-Agar für die Anzucht von *Legionella*-Stämmen

5 g/l	ACES
10 g/l	Hefeextrakt

In 900 ml H₂O_{dest.} lösen, pH mit 10 N KOH auf 6,9 einstellen.

Anschließend folgendes zugeben:

2 g/l	Aktivkohle
15 g/l	Agar

Agar auf ca. 40°C abkühlen lassen und sterilfiltriert folgendes zugeben:

0,4 g/l	Cystein (gelöst in 10ml H ₂ O _{dest.})
0,25 g/l	Fe(III)NO ₃ (gelöst in 10ml H ₂ O _{dest.})

AYE-Flüssigmedium für die Anzucht von *Legionella*-Stämmen

5 g/l	ACES
10 g/l	Hefeextrakt

In 1 l H₂O_{dest.} lösen, pH mit 10N KOH auf 6,9 einstellen.

Nach den Autoklavieren sterilfiltriert folgendes zugeben:

0,4 g/l	Cystein (gelöst in 10ml H ₂ O _{dest.})
0,25 g/l	Fe(III)NO ₃ (gelöst in 10ml H ₂ O _{dest.})

Middlebrook-7H9 Medium für die Anzucht von *Mycobacterium avium*

4,7 g	Middlebrook 7H9 broth
2 ml	Glycerin

In 900 ml H₂O_{dest.} lösen.

Nach den Autoklavieren steril folgendes zugeben:

100 ml	Bacto Middlebrook ADC Enrichment
--------	----------------------------------

5.1 Konservierung der Bakterienstämme

Die Bakterien werden in Flüssigmedium bis zu einer optischen Dichte von 0,1 - 0,4 (OD₆₀₀) kultiviert. Für das langfristige Aufbewahren der Zellen werden zu 1 ml Bakterien-Suspension 500 µl 70%iger Glycerin zugegeben und in 0,5 ml Aliquots bei -80°C gelagert.

Für die Bestimmung der Lebendkeimzahl der eingefrorenen Bakterien, wird ein Aliquot auf Eis aufgetaut und serielle Verdünnungen der Bakteriensuspension werden auf Agarplatten ausgestrichen.

6 Zellbiologische Methoden

6.1 Anzucht von *D. discoideum*

Zur Anzucht und kurzzeitigen Lagerung (bis etwa 14 Tage) werden *D. discoideum*-Zellen in 75 cm² Zellkulturflächen mit 10 ml HL5-Medium bei 21°C kultiviert, wobei das Medium alle 2 - 4 Tage durch neues ersetzt werden sollte. Um bakterielle Kontaminationen vorzubeugen, können 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zum Medium gegeben werden. Ein Aliquot dieser adhäsiv angezogenen Zellen kann für die Herstellung einer Schüttelkultur benutzt werden.

Für die Anzucht der Amöben in Schüttelkultur werden 300 ml HL5-Medium in einem 11-Erlenmeyerkolben gegeben und mit einer Mindestzahl von 5×10^4 Zellen/ml angeimpft. Die Zellen werden 3 - 4 Tage bei 21°C und 150 Upm inkubiert. Die Zelldichte der Amöben-suspension wird mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthalkammer bestimmt. Die *D. discoideum*-Mutanten werden durch die Zugabe von Geneticin (G418) und Blasticidin S zum Zellkulturmedium selektioniert.

6.2 Konservierung von *D. discoideum*-Sporen und Trophozoiten

In Schüttelkultur angezogene *Dictyostelium*-Zellen werden bei 1000 Upm für 5 min pelletiert und zweimal mit Soerensen-Puffer gewaschen um restliches HL5-Medium zu entfernen. Das Zellpellet wird anschließend in 2 - 5 ml Soerensen Puffer resuspendiert und auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. Je 200 µl der Zellsuspension werden auf Soerensen-Platten ausgestrichen und 2 - 3 Tage bei 21°C inkubiert. Die ausgebildeten Fruchtkörper werden mit Soerensen-Puffer von der Platte abgeschwemmt und je 1 ml Suspension in Kryoröhrchen gegeben. Diese werden ÜN bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff umgelagert. Zum Ansetzen einer Vorkultur wird die Sporensuspension rasch aufgetaut und in

eine Gewebeschale mit 10 ml HL5-Medium überführt. Nach 4 - 5 Tagen Wachstum kann die Vorkultur für maximal zwei Wochen bei 4°C gelagert werden.

Einige der *D. discoideum*-Mutanten weisen eine fehlerhafte Entwicklung auf und sind dadurch nicht in der Lage Fruchtkörper zu bilden. In solchen Fällen müssen die Trophozoiten konserviert werden. Zu diesem Zweck werden axenisch gewachsene Zellen durch Zentrifugation pelletiert und mit HL5-Medium auf eine Dichte von $1 - 2 \times 10^7$ Zellen/ml eingestellt. Die Zellen werden auf Eis gelegt und 2% v/v DMSO wird tropfenweise zu den Zellen gegeben. 1 ml Aliquots werden auf Kryoröhrchen verteilt und in flüssigen Stickstoff gelagert. Die toxische Wirkung des DMSOs wird beim Auftauen durch schnelles Waschen der Zellen verhindert.

6.3 Kultivierung und Konservierung von *A. castellanii*

Die Anzucht der Amöben erfolgt in 75 cm² Zellkulturflaschen, bei RT und ohne Licht. Alle 7 - 10 Tage können die Zellen neu subkultiviert werden, indem 20 ml frisches Medium mit 0,5 ml der Amöbensuspension angeimpft werden. Für die langfristige Lagerung können Acanthamöben in einem 1:1 Gemisch aus Glycerin und der Zellsuspension bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff konserviert werden.

6.4 Kultivierung und Konservierung der humanen Makrophagenzelllinie U937

Humane Makrophagen werden in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Als Nährmedium dient RPMI, angereichert mit 2mM Glutamin und 10% fötales Kälberserum (FCS). Die Zugabe von 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zum Medium verhindert die Kontamination durch Bakterien. Alle 2 - 3 Tage werden die U937-Zellen subkultiviert, indem 20 ml frisches, vorgewärmtes (37°C) RPMI-Medium mit 200 µl einer alten U937-Kultur angeimpft werden.

Für die Konservierung der U937-Zellen wird eine 3 - 4 Tage alte Kultur bei 800 Upm für 5 min zentrifugiert und mit RPMI-Medium auf eine Dichte von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. Die Zellen werden auf Eis gestellt und Einfriermedium (RPMI-Medium mit 20% FCS und 10% DMSO) wird im Verhältnis 1:1 tropfenweise zu der Zellsuspension gegeben. Je 1 ml Aliquots werden auf Kryoröhrchen verteilt und für zwei Stunden bei -20°C gelagert. Anschließend werden die Zellen bei -80°C über Nacht eingefroren und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff gelagert. Die toxische Wirkung des DMSOs beim Auftauen wird durch

schnelles Waschen der Zellen mit vorgewärmtem RPMI-Medium verhindert. Die aufgetauten Zellen werden dann in einer 75 cm² Zellkulturflasche mit 20 ml RPMI-Medium gegeben und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

6.5 In der Zellkultur verwendete Medien und Puffer

HL5-Medium für die Anzucht von *Dictyostelium*-Zellen

14,3 g/l	Proteose Pepton
7,15 g/l	Hefeextrakt
5,4 g/l	Glukose
1,28 g/l	Na ₂ HPO ₄
0,49 g/l	KH ₂ PO ₄

In 1 l H₂O_{dest.} lösen, pH mit 10 N KOH auf 7,5 einstellen.

50× Soerensen-Puffer

99,86 g/l	KH ₂ PO ₄
17,8 g/l	Na ₂ HPO ₄

In 1 l H₂O_{dest.} lösen, pH mit 10 N KOH auf 6,0 einstellen.

Soerensen-Agar für die Anzucht von *Dictyostelium*-Sporen

15 g/l	Agar
--------	------

In 1 l 1× Soerensen Puffer lösen.

PYG-Medium für die Kultivierung von Acanthamoeben

1 g	Trinatriumcitrat
20 g	Proteose Pepton
1 g	Hefeextrakt
10 ml	0,4 M MgSO ₄
10 ml	0,005 M (NH ₄) ₂ FeII(SO ₄) ₂ × 6 H ₂ O
10 ml	0,25 M KH ₂ PO ₄
10 ml	0,25 M Na ₂ HPO ₄
8 ml	0,05 M CaCl ₂

In 950 ml H₂O_{dest.} lösen.

Nach dem Autoklavieren steril folgendes zugeben:

18 g	Glukose (gelöst in 50ml H ₂ O _{dest.})
------	---

Amöben-Puffer

48 ml	Lösungen (siehe PYG-Medium)
1 g	Tri-Natriumcitrat

In 1 l H₂O_{dest.} lösen.

10× PBS-Puffer

80 g NaCl
12,5 g Na₂HPO₄ × 2 H₂O
2 g KCl
2 g KH₂PO₄

In 1 l H₂O_{dest.} lösen, pH mit 1 N HCl auf 7,2 einstellen.

6.6 Bestimmung der Zellvitalität

Die Bestimmung der Vitalität der Zellen erfolgt durch die Trypan-Blau-Exklusions-Methode. Hierfür wird ein Aliquot der Zellsuspension mit einer 0,1%igen Trypan-Blau-Lösung im Verhältnis 1:1 gemischt und mit dem Lichtmikroskop ausgewertet. Vitale Zellen sind nicht mit Trypan-Blau anfärbbar und erscheinen durchsichtig, tote Zellen hingegen werden dunkelblau angefärbt.

7 Infektion von *D. discoideum*

7.1 Quantifizierung der Phagozytoserate durch Bestimmung des CFU-Wertes

Axenisch gewachsene *Dictyostelium*-Zellen werden durch Zentrifugation (1000 Upm, 5 min) pelletiert und mit Infektionsmedium (HL5-Medium:Soerensen-Puffer im Verhältnis 1:1) auf eine Dichte von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Je 1 ml Zellsuspension werden in die Behälter einer 24-, „well“-Schale gegeben. Die Amöben werden mit einer definierten Anzahl Bakterien (MOI 10-100) infiziert und für 2 - 4 Stunden bei 24,5°C inkubiert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wird eine Gentamicinbehandlung durchgeführt, um die extrazellulären Bakterien abzutöten. Hierfür wird das Infektionsmedium durch 1 ml Soerensen-Puffer, versetzt mit 100 µg/ml Gentamicin, ausgewechselt. Anschließend werden die Zellen für eine weitere Stunde bei 23°C inkubiert. Die abgetöteten Bakterien und das Antibiotikum werden durch dreimaliges Waschen mit Soerensen-Puffer entfernt. Am Ende werden die *Dictyostelium*-Zellen durch die Zugabe von 1 ml eiskaltem Wasser osmotisch lysiert und die intrazellulären Bakterien freigesetzt. Serielle Verdünnungen der Bakteriensuspension werden auf Agarplatten ausgestrichen und die Anzahl der aufgenommenen Bakterien so ermittelt.

7.2 Quantifizierung der Phagozytoserate durch FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting)

Axenisch gewachsene *Dictyostelium*-Zellen werden wie unter 7.1 beschrieben geerntet und 1 ml/„well“ Zellsuspension werden in einer 24-„well“-Schale gegeben. Für die FACS-Analysen werden die Amöben mit grün-fluoreszierenden GFP-markierten Bakterien infiziert und für 2 - 4 Stunden bei 24,5°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen mehrmals mit Soerensen-Puffer gewaschen, um extrazellulär anhaftende Bakterien vollständig zu entfernen. Anschließend werden die 24-„well“-Schalen für 10 - 15 min auf Eis gestellt, um die adhärennten Amöben abzulösen. Die Zellsuspension wird in FACS-Röhrchen überführt und die Anzahl der infizierten Amöben, mit Hilfe der von den intrazellulären Bakterien ausgehenden grünen Fluoreszenz, am Durchflusszytometer ermittelt. Diese wird im optischen System des Durchflusszytometers in elektrische Impulse umgewandelt und von Sensoren erfasst. Die gemessenen Ereignisse können mit dem Cell Quest Programm ausgewertet und einzeln in Form eines Histogramms oder gegeneinander im Dot Plot aufgetragen werden.

7.3 Quantifizierung der intrazellulären Vermehrung mittels CFU-Wert-Bestimmung

Eine 3 - 4 Tage alte *Dictyostelium*-Kultur wird zentrifugiert (1000 Upm, 5 min) und das Zellpellet mit Infektionsmedium auf 1×10^6 Amöben/ml eingestellt. 5ml der Zellsuspension werden in eine 25cm² Zellkulturflasche gegeben und mit den Bakterien im Verhältnis 1:10 oder 1:50 infiziert. Nach drei Stunden Koinkubation bei 24,5°C werden die extrazellulären Bakterien mit einer einstündigen Gentamicinbehandlung (100 µg/ml) abgetötet. Mit Hilfe von mehreren Waschschritten mit Soerensen-Puffer werden die extrazellulären Bakterien sowie das Antibiotikum entfernt. 5ml frisches Infektionsmedium werden schließlich in die Flasche gegeben. Durch Klopfen der Flasche werden die Amöben vom Flaschenboden abgelöst und ein 300 µl Aliquot wird aus der Flasche entnommen. Die anschließende Zentrifugation (14000 Upm, 2 min) der Zellsuspension ermöglicht die Lyse der Amöben. Die freigesetzten Bakterien werden auf BCYE-Agarplatten angezogen. Der Zeitpunkt der ersten Entnahme aus der Zellkulturflasche wird als Zeitpunkt Null des Infektionsverlaufs definiert. Nach 24, 48, 72 und 96 Stunden werden weitere Aliquots entnommen und auf dieselbe Weise bearbeitet.

8 Infektion von U937 - Zellen

8.1 Quantifizierung der Phagozytoserate durch Bestimmung des CFU-Wertes

U937-Zellen, die in Suspension angezogen werden, zeigen geringe phagozytische Fähigkeiten. Erst durch die Zugabe von Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA) setzt der Differenzierungsprozess ein und die Zellen entwickeln sich zu Makrophagen. 2 - 3 Tage vor der Infektion werden die U937-Zellen durch Zentrifugation (800 Upm, 5 min) pelletiert und mit RPMI-Medium auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Je 1 ml der Zellsuspension wird in die Näpfe einer 24-, „well“-Schale gegeben und mit 1 μ l 10 nM PMA versetzt. Anschließend werden die Zellen für 48 - 72 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Der Abschluss des Differenzierungsprozesses ist mikroskopisch nachweisbar. Die Zellen sind adhärent, zeigen eine veränderte Form und haben Pseudopodien gebildet. Das überschüssige PMA wird durch dreimaliges Waschen mit warmen $1 \times$ PBS-Puffer entfernt.

Die Makrophagen werden mit den Bakterien im Verhältnis 1:1 oder 1:10 infiziert und für 2 - 3 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die extrazellulären Bakterien mit einer einstündigen Gentamicinbehandlung (100 μ g/ml) abgetötet und durch vorsichtiges Waschen mit warmen $1 \times$ PBS-Puffer entfernt. Schließlich wird 1 ml eiskaltes, destilliertes Wasser zu den Zellen gegeben, um die Makrophagen zu zerstören und die Bakterien freizusetzen. Serielle Verdünnungen der Bakteriensuspension werden auf Agarplatten ausgestrichen.

8.2 Quantifizierung der Phagozytoserate durch FACS-Analyse

Die in Suspension wachsenden U937-Zellen werden wie unter 8.1 beschrieben differenziert und mit grün-fluoreszierenden GFP-markierten Bakterien infiziert. Nach 2 - 3 Stunden Inkubationszeit werden die Zellen dreimal mit $1 \times$ PBS-Puffer gewaschen, um extrazelluläre Bakterien zu entfernen und anschließend für 30 Minuten mit Trypsin-EDTA bei 37°C inkubiert, um die adhärenen Zellen abzulösen. Schließlich wird die Zellsuspension in FACS-Röhrchen überführt und die Anzahl der infizierten Makrophagen am Durchflusszytometer bestimmt.

8.3 Quantifizierung der intrazellulären Vermehrung mittels Bestimmung des CFU-Wertes

Differenzierte U937-Zellen (siehe Kap. 8.1) werden in die Behälter einer 24-, „well“-Schale mit den Bakterien im Verhältnis 1:10 oder 1:50 infiziert und für 2 - 3 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die nicht aufgenommenen Bakterien werden nach Ablauf der Inkubationszeit mit einer einstündigen Gentamicinbehandlung (100 µg/ml) abgetötet und durch Waschen mit warmen 1 × PBS-Puffer entfernt. Frisches, vorgewärmtes (37°C) RPMI-Medium wird in die Behälter gegeben und die Schale wird während des gesamten Infektionsverlaufs bei 37°C inkubiert.

Für die Bestimmung der intrazellulären Vermehrung zu einem bestimmten Zeitpunkt der Infektion wird der Inhalt eines Behälters in einen 2 ml Eppendorfröhrchen überführt. Die am Boden anhaftenden Makrophagen werden durch die Zugabe von 1 ml eiskaltem, destilliertem Wasser osmotisch lysiert und ebenfalls in die 2 ml Eppendorfröhrchen gegeben. Anschließend wird die Suspension vermischt und 200 µl davon auf eine Agarplatte ausgestrichen. Für die Herstellung serieller Verdünnungen werden 100 µl der Bakteriensuspension entnommen und mit 900 µl destilliertes Wasser vermischt. Die Bestimmung der intrazellulären Vermehrung zu einem anderen Zeitpunkt der Infektion erfolgt auf gleiche Weise, indem der Inhalt eines anderen Behälters zeitversetzt entnommen und wie schon beschrieben verarbeitet wird.

9 Infektion von *A. castellanii*

9.1 Quantifizierung der intrazellulären Vermehrung mittels CFU-Wert-Bestimmung

Die adhärent wachsenden Amöben werden durch Klopfen vom Flaschenboden abgelöst, pelletiert (800 Upm, 5 min) und mit Infektionsmedium (PYG-Medium:Amöben-Puffer im Verhältnis 1:1) auf 5×10^5 Amöben/ml eingestellt. Je 5 ml der Amöbensuspension werden in 25 cm² Zellkulturflaschen verteilt und mit den Bakterien im Verhältnis 1:10 infiziert. Nach 2 - 3 Stunden Inkubation bei 37°C werden die extrazellulären Bakterien mit einer einstündigen Gentamicinbehandlung (100 µg/ml) abgetötet. Durch mehrmaliges Waschen mit Amöben-Puffer werden die extrazellulären Bakterien sowie das Antibiotikum entfernt. Danach werden die Amöben durch Klopfen der Flasche vom Flaschenboden abgelöst und ein 300 µl Aliquot wird aus der Flasche entnommen. Die anschließende Zentrifugation (14000 Upm, 2 min) der Zell-suspension ermöglicht die Lyse der Amöben. Die freigesetzten Bakterien werden auf BCYE-Agarplatten gezüchtet. Der Zeitpunkt der ersten Entnahme aus der Zellkulturflasche

wird als Zeitpunkt Null des Infektionsverlaufs definiert. Nach 24, 48, 72 und 96 Stunden werden weitere Aliquots entnommen und auf gleiche Weise bearbeitet.

10 Proteinbiochemische Methoden

10.1 Präparation von Gesamtzellproteinlysat

Für die Gewinnung von Gesamtzellproteinen wird eine *Dictyostelium*-Kultur zentrifugiert (800 Upm, 6 min) und mit Soerensen-Puffer auf eine Dichte von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt (mit RPMI auf 2×10^6 Zellen/ml für U937-Zellen). Jeweils 10 ml der Zellsuspension werden in 20×100 mm Gewebekulturschalen gegeben und mit Bakterien im Verhältnis 1:100 infiziert. Die Schalen werden bei 24°C (37°C + 5% CO₂ für U937-Zellen) für mehrere definierte Zeiträume (5, 10, 15, 30, 60 und 120 min) inkubiert. Nach dem Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen einmal mit kaltem Soerensen-Puffer (PBS-Puffer für U937-Zellen) gewaschen, um restliches Medium und extrazelluläre Bakterien vollständig zu entfernen. Anschließend werden die Schalen auf Eis gelegt und der Waschpuffer durch 1 ml RIPA-Puffer ersetzt. Mit Hilfe eines Zellschabers werden die Zellen vom Plattenboden abgelöst und in ein 2 ml Eppendorfröhrchen überführt. Die Flüssigkeit wird mehrmals durch eine dünne Kanüle gezogen, um die Proteine von der DNA zu trennen. Anschließend werden 200 µl Sephadex dazugegeben und die Proben für 5 Minuten durchmischt. Nach 20 min Zentrifugation bei 13000 Upm wird der klare Überstand entnommen und in 1,5 ml Eppendorfröhrchen gegeben. Die isolierten Proteine können nun gelelektrophoretisch aufgetrennt oder bei -80°C gelagert werden.

RIPA-Puffer

5 ml	10% Triton X-100
2,5 ml	1 M HEPES pH 7,5
1,5 ml	5 N NaCl
5 ml	100% Glycerol
7,5 µl	1 M MgCl ₂
0,5 ml	100 mM EGTA
2 ml	250 mM Natriumpyrophosphat
0,5 g	Deoxycholic-Säure
0,25 ml	20% SDS (tropfenweise zugeben)
In 49 ml H ₂ O _{dest.}	lösen.

Wenn die Lösung klar ist folgendes zugeben:

0,5 ml	100 mM Natrium-Orthovanadat (tropfenweise zugeben)
1 Tablette	EDTA free complete

10.2 Bestimmung der Proteinmenge nach Lowry

Der Proteingehalt einer Lösung wird spektrophotometrisch mit einem BioRad D_C-Protein Assay Kit bestimmt (modifiziert nach Lowry *et al.*, 1951). Diese Methode wird bei Proben angewendet die bis zu 1% ionische oder nichtionische Detergenzien enthalten.

Zwei Reaktionen ermöglichen die Bestimmung der Proteinmenge: Erstens die Bildung eines blau-violetten Komplexes durch die Bindung der Peptide an Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung. Und zweitens die Entstehung eines blauen Endprodukts als Folge der Reduktion von Heteropolysäuren (enthalten im Folin-Phenol) durch aromatische Aminosäuren unter der Bindung von Mischoxiden. Für die Berechnung der Proteinkonzentration wird eine Eichgerade mittels der Verdünnung einer 1 mg/ml bovinen Serumalbumin (BSA)-Stammlösung erstellt.

Zu 60 µl Probe oder BSA-Standard werden 100 µl Gebrauchslösung A und 800 µl Reagenz B zugegeben, gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Der nun entstandene farbige Komplex ist nur für eine kurze Zeit stabil. Daher müssen die Proben innerhalb einer Stunde im Photometer bei $\lambda=750$ nm gegen den Leerwert gemessen werden.

Reagenz A

0,1 mol/l	NaOH
2%	Na ₂ CO ₃

Reagenz B

1%	CuSO ₄ × 5 H ₂ O
1%	KNa-Tartrat × 4 H ₂ O

Reagenz S

Folin-Phenol-Reagenz mit H₂O_{dest.} im Verhältnis 1:1

Gebrauchslösung A

1000 µl	Reagenz A
20 µl	Reagenz S

10.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wird eine diskontinuierliche vertikale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli [1970] verwendet. Zu diesem Zweck werden die Proteine durch die Zugabe von SDS denaturiert und negativ geladen, dabei ist die negative Ladung der Masse des Proteins proportional. Der SDS-Protein Komplex wandert im Gel in Richtung Anode, wobei kleine Proteine eine höhere Geschwindigkeit aufweisen.

Die Elektrophoreseapparatur wird nach den Angaben des Herstellers vorbereitet und aufgebaut (BioRad-Mini-ProteanII Cell). Die Polyacrylamid-Endkonzentration im Trenngel variiert je nach Fragestellung und beträgt 8% für die Auftrennung von Gesamtzellproteinen. Die Trenngellösung wird zwischen den Glasplatten bis ca. 2 cm unterhalb der oberen Glaskante gegossen und mit Wasser überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu bilden. Nach dem Ende der Polymerisation wird das Wasser entfernt, die Sammelgellösung eingefüllt, und der Gelkamm luftblasenfrei eingesetzt. Nach weiteren 30 min werden die Gele in die Elektrophoresekammer überführt und mit 1 × SDS-Elektrophorese-Puffer überdeckt. Die Geltaschen werden mit einer Spritze ausgespült und mit den Proben beladen. Diese werden im Voraus mit 5 × Laemmli-Puffer gemischt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Der Elektrophoreselauf erfolgt bei 60 Volt für ca. 15 min bis die Proben das Trenngel erreicht haben. Anschließend werden die Proteine bei 80 Volt aufgetrennt bis die Bromphenolblaufront aus der unteren Gelkante austritt. Die aufgetrennten Proteine können nun mit Coomassie-Blue gefärbt oder für Westernblot verwendet werden.

Acrylamid Stammlösung (30% w/v)

30%	Acrylamid
8%	N,N-Methylen-bis-Acrylamid

8% Trenngel

2,13 ml	Acrylamid Stammlösung
2 ml	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
3,87 ml	H ₂ O _{dest.}
80 µl	10% SDS
40 µl	10% APS
5 µl	TEMED

5% Sammelgel

1,33 ml	Acrylamid Stammlösung
2 ml	0,5M Tris/HCl, pH8,8
4,37 ml	H ₂ O _{dest.}
80 µl	10% SDS
40 µl	10% APS
5 µl	TEMED

10× SDS-Elektrophorese-puffer

30g	0,5 M Tris/HCl
144,4g	3,84 M Glycin
10g	SDS

In 1 l H₂O_{dest.} lösen.

5× Laemmli-Puffer

1,1 g	SDS
0,41 g	EDTA
0,17 g	NaH ₂ PO ₄ × 2H ₂ O
1,1 ml	β-Mercaptoethanol
0,2%	Bromophenolblau
50%	Glycerin

Mit H₂O_{dest.} auf 10ml auffüllen, pH mit NaOH auf pH 7,2.

10.4 Coomassie-Färbung von Proteinen

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden im Gel mit Coomassie-Blue R-250 gefärbt. Dazu wird das Gel für 1 - 2 Stunden bei RT und leichtem Schwenken in der Färbelösung inkubiert und anschließend in Entfärbelösung eingelegt. Für die vollständige Entfärbung des Hintergrunds muss die Entfärbelösung mehrmals ausgetauscht werden. Die Gele können in Folie eingeschweißt und mit Wasser bedeckt bei 4°C gelagert werden.

Färbelösung

454 ml	Methanol/Ethanol*
92 ml	100% Essigsäure
2,5g	Coomassie Blue R-250

In 1 l H₂O_{bidest.} lösen.

Entfärbelösung

75 ml	Methanol/Ethanol*
50 ml	100% Essigsäure

In 1 l H₂O_{bidest.} lösen.

*aufgrund der Toxizität von Methanol kann auch Ethanol verwendet werden.

10.5 Westernblot

Das Westernblot-Verfahren ermöglicht den immunologischen Nachweis von Proteinen. Diese werden nach der Auftrennung im SDS-PAGE vom Polyacrylamidgel elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran transferiert. Um den Transfer kleinerer Proteine zu gewährleisten wird die Tank-Blot-Methode verwendet.

Das SDS-Polyacrylamidgel wird nach dem Gellauf in dem auf 4°C vorgekühltem Transfer-Puffer für 10 min geschwenkt, um die beim Transfer störende Salze zu entfernen. 2 Whatman-3MM-Papiere werden auf Gelgröße zurechtgeschnitten und ebenfalls mit gekühltem Transfer-Puffer getränkt. Eine PVDF-Membran, die ebenfalls der Gelgröße entspricht, wird nacheinander für jeweils 1 min in Methanol, H₂O_{dest.} und Transfer-Puffer

äquibriert. Der Blot wird aufgebaut indem die Membran und das Gel zwischen den Whatman-Papieren und zwei Polstern in die nicht leitende Plastikkassette gelegt wird. Die Kassette wird anschließend in dem Plastikbehälter zwischen den Elektroden platziert und mit Transfer-Puffer bedeckt. Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgt bei 100 V und 250 mA für 90 min. Die Vorkühlung des Transferpuffers, sowie das Setzen der Tank-Blot-Apparatur in ein Eisbad dienen dem Abfangen der während des Transfers entstehenden Wärme. Der Endpunkt des Transfers kann mit Hilfe des Größenmarkers festgestellt werden. Die bunten Banden des Markers sind nach einem erfolgreichen Proteintransfer auf der PVDF-Membran sichtbar.

Transfer-Puffer (Towbin-Puffer)

3,03g	Tris
14,4g	Glycine
200ml	Methanol

In 1 l H₂O_{bidest.} lösen, pH auf 8,1 - 8,5 einstellen.

Bei Bedarf können 10 ml 10% SDS zugegeben werden.

10.6 Antikörper-Reaktion

Nach dem Transfer werden die noch freien Bereiche der PVDF-Membran abgesättigt, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern. Die Membran wird mit 1 - 3% Milchpulver in TBST oder mit 1 - 2% BSA in TBST für 1 Stunde bei RT oder ÜN bei 4°C inkubiert. Anschließend wird der primäre Antikörper 1:1000 verdünnt zugegeben und die Membran für 1 - 2 Stunden bei RT oder ÜN bei 4°C inkubiert. Der primäre Antikörper wird abgenommen und kann erneut verwendet werden. Die Membran wird dreimal für jeweils 10 min mit 1× TBST gewaschen, um den restlichen Antikörper zu entfernen. Als sekundärer Antikörper wird ein Kaninchen-Anti-Maus IgG (gekoppelt mit Meerrettichperoxidase) 1:1000 verdünnt verwendet. Dieser wird für 1 - 2 Stunden auf die Membran gegeben und bei RaumTemp. inkubiert. Anschließend wird die Membran dreimal 15 min mit 1 × TBST gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen.

Für den Nachweis der Protein-Antikörperkomplexe wird der Enhanced-Chemilumineszenz-Kit (ECL) verwendet. Dafür werden gleiche Teile der Detektionslösung A (H₂O₂) und B (Luminol) gemischt und die Membran für 1 min damit überschichtet. Die Meerrettichperoxidase spaltet das Wasserstoffperoxid in Wasser und Oxidationen, die das Luminol oxidieren; dabei entsteht blaues Licht. Die Chemilumineszenz wird von einem Autoradiographiefilm erfasst, welcher anschließend entwickelt werden kann.

1 × TBST-Lösung

6,55 g	50 mM Tris/HCl, pH 7,5
8,77 g	150 mM NaCl
0,5 ml	0,05% Tween 80

In 1 l H₂O_{bidest.} lösen.

11 Molekularbiologische Methoden

11.1 Präparation von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wird der „Mini Plasmid Purification Kit“ der Firma Qiagen verwendet. Bei dieser Methode werden die Zellen alkalisch lysiert und die freigesetzte Plasmid-DNA wird mit Hilfe einer Säulenmatrix (Anionentauscher) isoliert. Von dem gewünschten Bakterienstamm wird eine 3 ml Übernachtskultur zentrifugiert (1000 Upm, 5 min) und das Zellpellet in 300 µl Resuspensionspuffer (P1) aufgenommen. Anschließend werden 300 µl Lysepuffer (P2) zugegeben, vorsichtig durchmischt und für 5 Minuten bei RT inkubiert. 300 µl gekühlter Neutralisationspuffer (P3) werden hinzugegeben, erneut vermischt und 15 min auf Eis inkubiert. Aufgrund des erhöhten Salzgehalts und der Kälte kommt es zum Ausfallen der denaturierten Proteine und anderer Zellbestandteile. Die Probe wird bei 14000 Upm für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die leichtere Plasmid-DNA befindet, wird vorsichtig abgenommen und in eine mit 1 ml QBT-Puffer äquilibrierte Qiagen-tip 20 Säule gegeben. Die an der Säulenmatrix gebundene DNA wird dreimal mit jeweils 1 ml QC-Puffer gewaschen und durch Elution mit 800 µl QF-Puffer von der Säule abgelöst. Nun wird die im Eluat enthaltene Plasmid-DNA mit 0,7 VT Isopropanol bei RT ausgefällt und bei 13000 Upm für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird zur Entfernung von Salzen mit 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (13000 Upm, 5min) und nach dem Trocknen in 50 - 200 µl TE-Puffer oder H₂O_{bidest.} aufgenommen.

Resuspensionspuffer P1, pH 8,0

50 mM	Tris/HCl
10 mM	EDTA
100 µg/ml	RNAaseA

Lysepuffer P2

200 mM	NaOH (Pellets)
1% (w/v)	SDS

Neutralisationspuffer P3, pH 5,5

3 M Kaliumacetat

Waschpuffer QC, pH 7,0

1 M NaCl

50 mM MOPS

15% (v/v) Ethanol (99,8%)

Elutionspuffer QF

50 mM Tris/HCl

15% (v/v) Ethanol (99,8%)

1,25 M NaCl

11.2 Horizontale-Gelelektrophorese

Lineare DNA-Fragmente können aufgrund ihrer negativen Ladung der Größe nach in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Innerhalb bestimmter Größenbereiche ist die Mobilität linearer DNA-Fragmenten dem Logarithmus ihres Molekulargewichts proportional [Sambrook und Gething, 1989]. Die dafür verwendeten Gele enthalten je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente 0,8 - 2% w/v Agarose in 1 × TAE-Puffer. Die Agarose wird durch Aufkochen in den TAE-Puffer gelöst und nach dem Abkühlen auf ca. 50°C in eine Plexiglaswanne gegossen. Mit Hilfe eines Kamms werden die Taschen für die Proben angelegt. Das Gel wird nach dem Erkalten der Agarose in die Elektrophorese Apparatur eingespannt und mit 1 × TAE-Puffer bedeckt. Die Proben werden vor dem Auftragen auf das Gel mit 10 × Proben-Puffer gemischt. Die Gelelektrophorese wird bei einer Spannung von 80 - 100 V für 1 - 2 Stunden durchgeführt. Die DNA-Fragmente werden durch Inkubieren des Geles für 15 min in eine Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml in TAE Puffer) gefärbt und mit einem Transilluminator durch Bestrahlung der Wellenlänge 312nm sichtbar gemacht. Die Größe der Fragmente wird über den Vergleich mit einem DNA-Größenmarker bestimmt.

50 × TAE Puffer

242 g Tris

57,1 ml Eisessig

100 ml 0,5M EDTA, pH 8,0

In 1 l H₂O_{bidest.} lösen.

10 × Proben-Puffer

0,25% (w/v) Bromophenolblau

0,25% (w/v) Xylencyanol

1,5% (w/v) Ficoll 400

In 1 l H₂O_{bidest.} lösen.

11.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Isolierung der DNA-Fragmente aus Agarosegelen wird der „Qiaquick Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen verwendet. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist dem mitgelieferten Handbuch zu entnehmen. Die unter UV-Bestrahlung sichtbar gemachte DNA-Bande wird aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Eppendorfröhrchen überführt. Das Gelstück wird gewogen und mit 3 VT NaI-Puffer versetzt. Der Ansatz wird für 10 min bei 56°C inkubiert und durchmischt. Sobald es vollständig flüssig ist, werden 5 µl Glasmilch dazugegeben und 5 - 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird die Probe für 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert und das Glasmilch-Pellet wird dreimal mit jeweils 200 µl Wasch-Puffer (NewWash) gewaschen. Schließlich werden 15 µl H₂O_{bidest.} zugegeben und 2 min bei 56°C inkubiert. Durch Zentrifugation (13000 Upm, 1 min) wird die DNA aus der Glasmilch eluiert.

11.4 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Sequenzen innerhalb der Stränge eines DNA-Moleküls in die sie schneiden können. So entstehen mehrere DNA-Fragmente, die je nach Enzym stumpfe (blunt ends) oder überhängende Ende (sticky ends) aufweisen. Die Spaltung des DNAs erfolgt in Ansätzen von 50 µl Gesamtvolumen. Die Enzymmenge richtet sich nach der eingesetzten DNA-Menge. Die Inkubationsdauer und Temperatur werden vom Hersteller angegeben. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 1/10 VT Proben-Puffer gestoppt.

Restriktionsansatz

0,5 - 1 µg	DNA
1/10	Restriktions-Puffer
1/10 VT	RNase-Lösung (10mg/ml)
1-5 U	Restriktionsenzym

11.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion [Mullis *et al.*, 1986] ermöglicht die exponentielle Amplifizierung bestimmter DNA-Abschnitte. Die eingesetzten Oligonukleotide (Primer) dienen in dieser Reaktion als Startermoleküle. Der Abschnitt, den die Primer

beidseitig flankieren, wird in jedem Zyklus der Reaktion mit Hilfe der thermostabilen Taq-DNA-Polymerase verdoppelt. Der Zyklus selber besteht aus drei Schritten:

- 1) Hitzedenaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94°C, dabei wird die DNA in Einzelstränge aufgespaltet.
- 2) Anlagerung der Primer („Annealing“) an die DNA-Einzelstränge bei einer primer-spezifischen Temperatur.
- 3) Synthese des komplementären DNA-Doppelstranges (Extension) bei der optimalen ArbeitsTemp. der DNA-Polymerase (72 - 75°C).

Die Einzelschritte der Reaktion werden in bis zu 40 aufeinanderfolgenden Zyklen wiederholt. Eine Denaturierungsphase von 3 min wird den Zyklen vorangestellt, um sicherzustellen, dass die gesamte DNA in einzelsträngiger Form vorliegt. Am Ende der PCR wird eine Extensionsphase von 5 - 10 min durchgeführt, damit alle PCR-Produkte vervollständigt werden können.

Die Wahl der richtigen Anlagerungstemperatur ist für das Ergebnis der Reaktion entscheidend. Wird sie zu niedrig gewählt, treten durch unspezifische Bindungen Nebenprodukte auf. Ist die Temperatur hingegen zu hoch, besteht die Möglichkeit, dass die Bindung des Primers an den DNA-Strang unterbunden wird, und somit keine PCR-Produkte entstehen. Die maximal zu wählenden Anlagerungstemperaturen werden nach der folgenden Formel berechnet:

$$T_m^{\circ}\text{C} = [4^{\circ}\text{C} \times (\text{G} + \text{C-Gehalt}) + 2^{\circ}\text{C} \times (\text{A} + \text{T-Genalt})]$$

Oberhalb dieser Anlagerungstemperatur „schmelzen“ die Primer und eine Bindung an das DNA ist nicht mehr gewährleistet. Die optimale Temperatur muss für jede Zielsequenz empirisch ermittelt werden. Die PCR-Ansätze werden in 50 µl Gesamtvolumen durchgeführt und es werden 30 - 40 Zyklen durchlaufen.

Komponenten eines PCR-Ansatzes:

1 µl	Template-DNA (25 ng)
1 µl	Primer A (10 pmol/µl)
1 µl	Primer B (10 pmol/µl)
4 µl	dNTP-Mix (je 2,5 mM)
5 µl	10 x PCR-Puffer
0,2 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
37,8 µl	Wasser

PCR-Puffer, pH 8,8

67 mM	Tris HCl
2 mM	MgCl ₂
16 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
170 µg/ml	BSA
16 mM	DTT

11.6 Ligation von Vektor- und Insert-DNA

Als Klonierungsvektor wurde das „pGEM-T Easy Vektor System“ der Firma Promega verwendet. Der Vektor liegt in linearisierter Form vor und trägt 3'-Tymidin-Überhänge. Diese verhindern die Religation des Vektors und ermöglichen die effiziente Ligation von PCR-Produkten die am 5'-Ende einen überhängenden Adeninrest tragen. Die multiple Klonierungs-Stelle des Vektors liegt in der α -Peptid Region des β -Galactosidase Enzyms, was eine einfache Blau/Weiß Selektion auf IPTG/X-Gal-Indikatorplatten ermöglicht. Weiterhin wurde der pBC KS+ Vektor für die Expression der GFP- und RFP-Proteine in *Legionella* benutzt. Für die Ligation werden der pBC-Vektor und der Insert-DNA mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten und mit Hilfe der T4-Ligase verbunden, die sowohl stumpfe als auch überhängende Enden erkennt. Die Selbstzirkulation des Vektors wird durch den Einsatz überschüssiger DNA-Fragmente verringert. Für die Ligationsreaktion werden entsprechende Volumina von Vektor und Insert-DNA gemischt, 4 μ l 5 \times Ligasepuffer, 1 μ l T4-Ligase und die entsprechende Menge $H_2O_{bidest.}$ zugegeben, so dass ein Gesamtvolumen von 20 μ l nicht überschritten wird. Der Ansatz wird ÜN bei 14°C im Wasserbad inkubiert.

11.7 CaCl₂-Transformation von *E. coli*

Das Einbringen von fremder DNA in die Zelle ist nur möglich in Bakterien, die sich im natürlichen Kompetenzstadium befinden. Die Herstellung kompetenter *E. coli* erfolgt mittels der CaCl₂-Methode. Hierfür werden 200 ml LB-Medium mit 500 μ l einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,7 bei 37°C im Inkubationsschüttler angezogen. Die Kultur wird dann für 10 min auf Eis gestellt und anschließend in einer Kühlzentrifuge (4000 Upm, 10 min, 4°C) pelletiert. Das Zellpellet wird in 100 ml eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Zellen werden in 10 ml 100 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen und für 30 min auf Eis gestellt. Während der Inkubation in der Kälte erreichen die Bakterien das Kompetenzstadium. Die Zellsuspension wird noch einmal zentrifugiert und das Zellpellet in 2 ml CaCl₂-Lösung aufgenommen. Die kompetenten Zellen können dann sofort verwendet werden oder mit Glycerin versetzt (Endkonzentration 25%) in 250 μ l Aliquots bei -80°C gelagert werden. Für die Transformation wird eine Aliquot kompetente Zelle auf Eis aufgetaut, mit dem Ligationsansatz gemischt und für 30 - 45 min auf bei 4°C inkubiert. Die Aufnahme der DNA in die Zelle erfolgt durch einen Hitzeschock bei dem die Zellen für 90 sec auf 42°C erhitzt und erneut für 5 min auf Eis gestellt werden. Der Transformationsansatz wird dann in 1ml LB-

Medium aufgenommen und für 1 - 2 Stunden bei 37°C geschüttelt. Anschließend werden die Zellen zentrifugiert und der Überstand bis auf 100 µl verworfen. In der verbleibenden Flüssigkeit werden die Bakterien resuspendiert und auf Selektionsplatten ausgestrichen.

11.8 Elektroporation

Eine weitere Methode für die Transformation von Bakterien ist die Elektroporation. Dabei werden die Zellen kurzzeitig einem elektrischen Feld ausgesetzt, welches in der Membran Poren entstehen lässt, durch welche DNA-Moleküle ins Zellinnere gelangen.

Für die Anzucht elektrokompenter Zellen werden die Legionellen auf BCYE-Platten ausgestrichen und für 24 - 48 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. *E. coli* werden in flüssigem LB-Medium ÜN bei 37°C angezogen. Die Legionellen werden mit 10% Glycerin abgeschwemmt und auf eine OD₆₀₀ von 0,6 - 0,8 eingestellt. Die ÜN-Kultur von *E. coli* wird abzentrifugiert (4000 Upm, 10 min) und mit 10% Glycerin bis zur selben OD₆₀₀ verdünnt. Anschließend wird das Volumen der Bakteriensuspension durch drei aufeinanderfolgende Waschschrte mit H₂O_{dest.} reduziert (100%, 50%, 10%). Zuletzt werden die Zellen in 200 µl 10% Glycerin aufgenommen und in 40 µl Aliquots bei -80°C gelagert. Für die Elektroporation werden die Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 1 - 20 µl DNA gemischt. Anschließend wird die Suspension in 4°C temperierte Elektroporationsküvetten pipettiert und einem Feld von 1,7 kV ausgesetzt. Weiterhin sind folgende Bedingungen für die Elektroporation erforderlich: 25 µFD Kapazität (Gene Pulser), 200 Ω Widerstand (Pulse Controller) und 0,2 cm Elektrodenabstand. Gleich nach der Elektroporation werden 1 ml AYE-Bouillon bzw. LB-Medium zu den Zellen gegeben und für 2 - 6 Stunden bei 37°C im Rotationsschüttler inkubiert. Die Ansätze werden anschließend auf Selektionsplatten ausgestrichen und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Erhaltene Klone werden zur weiteren Analyse vereinzelt auf frische Selektionsplatten ausgestrichen.

12 Mikroskopische Methoden

12.1 Transmission Elektronenmikroskopie

12.1.1 Fixierung der Proben

Axenisch gewachsene *Dictyostelium*-Zellen werden durch Zentrifugation (1000 Upm, 5 min) pelletiert und mit Infektionsmedium (HL5-Medium:Soerensen-Puffer im Verhältnis 1:1) auf eine Dichte von 5×10^5 Zellen/ml eingestellt. In die Kammer einer 24-,„well“-Schale werden

runde Deckgläser gelegt und mit 1ml der Zellsuspension überschichtet. Die Zellen werden anschließend mit den Bakterien infiziert und für 24, 48 und 72 Stunden bei 24,5°C inkubiert. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit werden die Deckgläser mit Hilfe einer Uhrmacher-Pinzette aus den Behältern entnommen und für 2 Stunden bei RT mit einer 0,5 × Karnovsky Lösung fixiert. Der Fixans wird durch einen kurzen Waschschrift mit Wasser entfernt und die Deckgläser mit 25% Glutaraldehyd bedeckt. Nach 15 Minuten Inkubation bei RT werden die Deckgläser mit 0,2 M Cacodylatpuffer gewaschen und mit 2% Osmiumtetroxid überschichtet. Nach weiteren 15 Minuten werden die Gläser erneut mit 0,2M Cacodylatpuffer ausgespült und über Nacht bei 4°C in Cacodylatpuffer gelagert.

1× Karnovsky Fixans, pH 7,2

1 g	Paraformaldehyd	(in 12,5 ml H ₂ O durch erhitzen gelöst)
20µl	1 N NaOH	(klärt die Lösung)

Auf RT abkühlen lassen und folgendes zugeben:

5 ml	25% Glutaraldehyd
7,5 ml	0,2 M Cacodylatpuffer

Für die Arbeitslösung wird der Fixans mit 0,1 M Cacodylatpuffer verdünnt.

12.1.2 Dehydration und Kunstharzeinbettung

Die Proben werden bei RT in je 1 ml einer aufsteigende Ethanolreihe (1× 70%, 1×80%, 1×90%, 1×96% und 2×100%) für jeweils 10 Minuten entwässert. Die vollständige Dehydrierung der Proben erfolgt nach der zweimaligen Inkubation in Propylenoxid (jeweils 10 - 15 Minuten). Für die Kunstharzeinbettung wird eine Vierkomponentenmischung verwendet, die sich durch eine geringe Viskosität, hohe Penetrationsgeschwindigkeit, gute Schneidbarkeit und große Stabilität auszeichnet. Die entwässerten Proben werden für mindestens 2 Stunden in einer 1:1 Propylenoxid:Epon Mischung gelegt, bevor sie für weitere 2 - 4 Stunden in reinem Epon aufgenommen werden. Gelatine kapseln werden mit Epon gefüllt und auf die Deckgläser gepresst. Die Proben werden zum Auspolymerisieren des Epons für 2 Tage bei 60°C im Trockenschrank gelegt.

12.1.3 Präparation der Ultradünnschnitte

Die Deckgläser werden im flüssigen Stickstoff abgesprengt und von den auspolymerisierten Proben werden Ultradünnschnitte (80-100 nm) angefertigt (Diamantmesser „Ultracut E“). Die Schnitte werden unter Chloroformdampf gespreitet und auf Trägernetzen (Kupfer, 300

mesh) aufgefangen. Anschließend werden die Ultradünnschnitte 3 Minuten mit 2% Uranylacetat kontrastiert, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gewaschen und für weitere 3 Minuten mit 0,3% Bleicitrat (pH 12) nachkontrastiert. Schließlich werden die Trägernetzchen erneut mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gewaschen und an der Luft getrocknet.

12.2 Konfokale „Laser-Scanning“ Mikroskopie

Beim CLSM (confocal laser scanning microscope) handelt es sich um ein inverses Lichtmikroskop, an welches eine LSM-Einheit (bestehend aus einem Laser- und einem Scanner-Modul) gekoppelt ist. Das CLSM ermöglicht die dreidimensionale Untersuchung biologischer Objekte unter der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen. Mit Hilfe verschiedener Laser können mehrere dünne optische Schnitte durch ein vitales biologisches Objekt gelegt und anhand digitaler Aufbereitung zu einer 3D-Struktur rekonstruiert werden. Die aus den Präparaten ausgehende Fluoreszenz wird wellenlängenspezifisch diskriminiert und erfasst. Im Gegensatz zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie entsteht beim CLSM nur eine geringe Hintergrund-Fluoreszenz, was eine hochauflösende Abbildung der untersuchten Objekte ermöglicht.

12.2.1 Beobachtung vitaler Zellen mittels der Agar-Overlay-Methode

Dictyostelium-Zellen bewegen sich mit einer Geschwindigkeit von bis zu $1 \mu\text{m}/\text{sec}$ was die *in vivo* Beobachtung der Zellen erschwert. Andererseits befinden sich die verschiedene Zellstrukturen nicht auf derselben Ebene und können dadurch nur teilweise beobachtet werden. Eine Methode der Fixierung vitaler Zellen ist die Agar-Overlay-Methode [Yumura *et al.*, 1984]. Die zu untersuchenden Zellen werden unter einer dünnen Agarschicht gelegt, was ihre Bewegung erschwert und sie auf eine Ebene zusammendrückt. Für die Herstellung der Agarschichten werden 3 g Seakem-Agarose mit 100 ml Soerensen-Puffer gemischt und durch Erhitzen gelöst. 1 ml der warmen Lösung wird, möglichst luftblasenfrei, zwischen zwei Objektträger gegeben, die durch zwei Deckgläser voneinander getrennt sind. Nach dem Abkühlen der Agarose entsteht eine Schicht mit der Stärke der Deckgläser. Diese wird in kleine Stücke geschnitten (ca. $1 \times 1 \text{ cm}$), die in einer Petrischale mit Soerensen-Puffer, bei 4°C gelagert werden können.

Für die Beobachtung der Zellen werden axenisch gewachsene, GFP-transformierte *Dictyostelien* zentrifugiert (1000 Upm, 5 min) und mit Infektionsmedium (HL5-Medium:Soerensen-Puffer im Verhältnis 1:5) auf 5×10^5 Zellen/ml eingestellt. Je 5 ml der Zellsuspension werden in 25 cm^2

Zellkulturflaschen gegeben und bei 23°C gelagert. Der geringe Anteil an HL5-Medium dient der Reduktion der Hintergrund-Fluoreszenz während der Mikroskopie. 50×50 mm Deckgläser werden mit Ethanol gereinigt und mit 3 mm hohen PVC Ringen versehen. Diese werden mit Vaseline oder Zentrifugenfett an der Glasoberfläche befestigt. 3 ml der Amöbensuspension werden auf die Deckgläser gegeben und 5 min bei RT inkubiert um die Adhäsion der Zellen zu ermöglichen. Anschließend werden die Amöben mit Bakterien im Verhältnis 1:10 oder 1:50 infiziert und für definierte Zeiträume bei 24°C inkubiert. Eine uninfizierte Probe der Zellsuspension ermöglicht die Beobachtung der GFP-Fusionproteine im Ruhezustand. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird eine dünne Agarschicht auf den Zellen gelegt und das umliegende Medium vorsichtig abgenommen. Die Zellen können nun für 40 - 60 min am Mikroskop beobachtet werden. Längere Beobachtungszeiten sind bei dieser Methode nicht möglich, da die Zellen nach einiger Zeit mangels Sauerstoff absterben.

13 Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration

Die intrazelluläre Kalziumkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ spielt bei der Kontrolle zellulärer Abläufe eine zentrale Rolle. Viele zelluläre Vorgänge werden durch Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ direkt gesteuert. Diese Veränderungen können mit Hilfe von Indikatorfarbstoffen und Computergestützter Bildanalyse untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Fura-2 und Fluoro-4 als Kalziumindikatoren verwendet.

13.1 Beladung von *Dictyostelium*-Zellen mit Fura-2-dextran

Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 [Grynkiewicz *et al*, 1985] arbeitet nach dem Prinzip der Zwei-Wellenlängen-Anregungsfluorochrome. Die Absorptionseigenschaften des Fura-2-Farbstoffs ändern sich durch die Komplexbildung mit Ca^{2+} . Die Fluoreszenz des ungebundenen Farbstoffs und diejenige des mit Ca^{2+} -gebundenen Farbstoffs, können aufgrund der unterschiedlichen Exzitationsmaxima bei zwei Wellenlängen (380 nm/340 nm) getrennt aufgezeichnet werden. Durch Anregung bei zwei verschiedenen Wellenlängen lässt sich die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unabhängig der Farbstoffkonzentration bestimmen. Dadurch werden Messfehler durch Ausbleichen des Farbstoffs oder Konzentrationsschwankungen verhindert. Darüber hinaus ermöglicht das Fura-2-Molekül, dank ihres hohen Absorptionskoeffizients, die Erfassung geringer $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Schwankungen. Das Fura-2 Molekül besitzt fünf negative Ladungen und kann daher die Zellmembran nicht durchdringen. *Dictyostelium*-Zellen können mit Hilfe des

Elektroporationsverfahrens mit dem Indikator beladen werden. Dafür werden 50 μl einer Zellsuspension (2×10^7 Zellen/ml) 5 min bei 1000 Upm zentrifugiert und das Zellpellet wird in 20 μl eiskalter Fura-2-dextran Beladungslösung aufgenommen. Die Elektroporation wird bei 850 V, 200 Ω und 3 μF durchgeführt. Anschließend werden 80 μl 5 mM MgCl_2 zugegeben und die Zellen für 10 min auf Eis gestellt. Nach einem Waschschrift mit 100 μl H5-Puffer, werden 10 μl der Zellsuspension auf ein Deckglas gegeben und für 10 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert, um die Anhaftung der Zellen an das Glas zu ermöglichen. Anschließend werden die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Veränderungen am Mikroskop untersucht. Für die Anregung des Indikatorfarbstoffes wird monochromatisches Licht hoher Intensität benötigt. Das Einsetzen einer rechnergesteuerten Xenon-Lichtquelle ermöglicht den Wechsel, innerhalb weniger Millisekunden, zwischen den zwei Anregungswellenlängen. Alle 10 Sekunden wird die Emmission bei 510 nm für den freien und den an Ca^{2+} -gebundenen Farbstoff gemessen. Nach 50 - 70 Sekunden werden die Bakterien auf den Zellen vorsichtig pipetiert, und die Messungen werden fortgesetzt. Die aktuelle $[\text{Ca}^{2+}]_i$ errechnet sich aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten des freien und des gebunden Farbstoffs. Die Kalziumkonzentration wird graphisch gegenüber der Zeit dargestellt.

Fura-2-dextran Beladungslösung

6 μl	10 mM Fura-2-dextran
5 μl	10mM CaCl_2
35 μl	1 \times Soerensen Puffer

H5 Puffer, pH 7,0

5 mM	HEPES
5 mM	KCl

13.2 Beladung von U937-Zellen mit Fura-2-Acetoxy-methylester

Das Fura-2-Acetoxy-methylester (Fura-2-AM) ist ein ungeladenes, lipophiles Molekül, welches die Zellmembran leicht passiert. Im Zytosol spalten die zelleigenen Esterasen die Acetoxy-methylgruppe, und der Indikator wird in die membranimpermeable Variante umgewandelt, so dass er im Zytoplasma gefangen bleibt. Die Zugabe von Pluronic F-127, ein nichtionisches Agens, unterstützt die Löslichkeit des Farbstoffs in physiologischen Lösungen. Die Sequestrierung des Indikators in die Organelle, wird durch die Zugabe von Probenecid (p-[Dipropylsulfamoyl] benzoylsäure), ein Inhibitor der zellulären Transportsysteme für organische Anionen, verhindert.

Die in Suspension wachsende U937-Zellen werden durch Zentrifugation pelletiert (800 Upm, 5min) und mit vorgewärmten RPMI-Medium auf eine Dichte von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. Je 500 μ l der Zellsuspension werden in die Behälter einer Lab-Tek 4-, „well“-Kammer mit Borosilikatglasboden der Firma Nunc gegeben und wie unter 8.1. beschrieben zu Makrophagen differenziert. Für die Kalziummessungen wird das Medium aus den Behältern entnommen und durch vorgewärmtes RPMI-Medium ohne FCS ersetzt. 10 μ l Fura-2-AM Beladungslösung werden dazugegeben und die Kammer für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen vorsichtig zweimal mit warmem PBS-Puffer gewaschen und für weitere 60 Minuten bei 37°C inkubiert, um die Hydrolyse des Esters zu gewähren. Die Zellen sollen keiner Lichteinstrahlung ausgesetzt werden, um das Ausbleichen des Farbstoffes zu vermeiden. Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ durch die Zugabe von Bakterien werden wie unter 13.1. beschrieben am Mikroskop gemessen. Die Aufnahme eines Hintergrundwertes für die 340 und 380 nm Bilder ermöglicht die Korrektur der Fluoreszenzintensitäten durch den Abzug der Hintergrund-Fluoreszenz.

Fura-2-AM Beladungslösung

2,5 μ M	Fura-2-AM (2 mM in DMSO)	(Endkonzentration)
0.02%	Pluronic F-127 (12,5% in DMSO)	(Endkonzentration)
1 mM	Probenecid	(Endkonzentration)

13.3 Beladung von U937-Zellen mit Fluo-4-AM

Der Fluo-4-Fluoreszenzfarbstoff wird mit sichtbarem Licht angeregt, und hat mehrere Vorteile gegenüber UV-Kalziumindikatoren. Zum einem haben die Zellen in der Emmisionsregion des Fluo-4-Indikators eine geringere Autofluoreszenz und es entstehen weniger Hintergrundartefakte und andererseits weist sichtbares Licht eine niedrigere Zytotoxizität als UV-Licht auf. Das Absorptionsmaximum des Fluo-4-Indikators liegt bei 506 nm, das Emmisionsmaximum bei 526 nm und es wird mit Hilfe eines Argonlasers bei 488 nm angeregt. Die Fluoreszenz des Fluo-4-Farbstoffs erhöht sich 40 - 200-mal durch die Bindung an Ca^{2+} , was eine Erfassung geringer Ca^{2+} -Schwankungen ermöglicht. Ratiometrische Messungen sind mit Fluo-4 nicht möglich, sodass Messfehler durch Ausbleichen des Farbstoffs oder Konzentrationsschwankungen entstehen können. Quantitative Messungen des Ca^{2+} -Anstiegs sind daher nur beschränkt möglich und sollten durch den Einsatz anderer Indikatoren bestätigt werden. Für die Beladung der U937-Zellen wird die zellpermeable Form (AM) des Farbstoffs benutzt.

Die in Suspension wachsende U937-Zellen werden durch Zentrifugation pelletiert (800 Upm, 5min) und mit vorgewärmten RPMI-Medium auf eine Dichte von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Je 500 μ l der Zellsuspension werden in die Behälter einer Lab-Tek 4-, „well“-Kammer mit Borosilikatglasboden der Firma Nunc gegeben und wie unter 8.1. beschrieben zu Makrophagen differenziert. Für die Kalziummessungen wird das Medium aus den Behältern entnommen und durch vorgewärmtes RPMI-Medium ohne FCS ersetzt. 5 μ l Fluo-4-AM Beladungslösung werden dazugegeben und die Kammer für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen vorsichtig zweimal mit warmen PBS-Puffer gewaschen und für weitere 60 Minuten bei 37°C inkubiert, um die Hydrolyse des Esters zu gewähren. Die Lichtbestrahlung der Zellen soll bis zum Zeitpunkt der Messung streng vermieden werden. Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ durch die Zugabe von Bakterien werden am CLSM gemessen. Die Auswertung der Kalziummessungen erfolgt mit Hilfe der LSM5 Image Software der Firma Zeiss.

Fluo-4-AM Beladungslösung

5 μ M	Fluo-4-AM (5 mM in 0,02%DMSO)	(Endkonzentration)
0.02%	Pluronic F-127 (12,5% in DMSO)	(Endkonzentration)
1 mM	Probenecid	(Endkonzentration)

ERGEBNISSE

1 *Dictyostelium discoideum* als Wirtszellsystem für *Legionella*

Genetisch zugängliche Modellorganismen ermöglichen die Erforschung von Wirtszellfaktoren, die an der Infektion pathogener Mikroorganismen beteiligt sind. Für die Untersuchung der *Legionella*-Wirt-Interaktion hat sich der Einsatz der genetisch manipulierbaren Bodenamoöbe *D. discoideum* als vorteilhaft erwiesen [Hägele *et al.*, 2000; Solomon und Isberg, 2000]. Wichtige zelluläre Vorgänge, wie die Phagozytose und die Phagosombiogenese, werden in *Dictyostelium* seit Jahren untersucht. Darüber hinaus steht eine Vielzahl gut charakterisierter Mutanten zur Verfügung, die Auskunft über die Rolle verschiedener Wirtsproteine bei der *Legionella*-Infektion geben können.

Voraussetzung für den Einsatz eines neuen Wirtsystems ist die Standardisierung der Infektionsbedingungen. In dieser Arbeit wurde als Infektionsmedium eine Mischung aus HL5-Medium und Soerensenpuffer im Verhältnis 1:1 verwendet [Hägele *et al.*, 2000]. Um die Vitalität der *Dictyostelium*-Zellen zu gewährleisten wurde die Infektion mit den Legionellen bei 24,5°C durchgeführt. Weitere wichtige Parameter wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht.

1.1 Bestimmung der optimalen Infektionsbedingungen

Die Aufnahmerate von *D. discoideum* kann durch die Zugabe einer großen Anzahl von Bakterien positiv beeinflusst werden. Allerdings wird dadurch auch die kontakt-abhängige Zytotoxizität erhöht und folglich die Vitalität der Wirtszellen beeinträchtigt. Die Bestimmung der maximalen Größe des Inokulums erfolgte mit Hilfe der Trypan-Blau-Exklusion-Methode. Die Infektion der Amöben mit *L. pneumophila* Corby bis zu einer MOI (multiplicity of infektion) von 50 hat keinen Einfluss auf die Vitalität der *Dictyostelium*-Zellen (0,012% ± 0,0023 tote Zellen; n = 1000). Bei einer MOI von 100 werden 1,45% ± 0,245 der Wirtszellen lysiert, jedoch ohne Folgen für den Gesamtverlauf der Infektion. Ab einer MOI von 200 erhöht sich die Anzahl der toten Amöben proportional zur Bakterienmenge (MOI 200 = 3,46% ± 0,052; MOI 500 = 5,21% ± 0,092). Die Zugabe von 1000 Bakterien/Zelle bewirkt die Lyse von mehr als 10% aller vorhandenen Wirtszellen (11,52% ± 0,142) und ist daher ungeeignet für die Durchführung der Infektion.

In einigen Wirtszellsystemen, wie *A. castellanii*, führt das Aushungern der Zellen, durch deren Inkubation in Puffer, zu einer Erhöhung der Phagozytoserate. Die Inkubation der *Dictyostelium*-Zellen in Soerensen-Puffer führt dagegen zu keiner signifikanten Erhöhung in der Aufnahmerate von *Legionella*. So beträgt die Phagozytoserate der Amöben nach einer

Stunde Inkubationszeit in Puffer $99,65\% \pm 7,095$ ($n=12$); nach 3 Stunden Nahrungsentzug werden $102,18\% \pm 2,713$ ($n=12$) Bakterien aufgenommen im Vergleich zur Kontrolle; nach 5 Stunden Inkubation in Soerensen Puffer beträgt die Phagozytoserate der *Dictyostelium*-Zellen $93,83\% \pm 3,762$ ($n = 12$). Lediglich nach 2 Stunden Inkubation in Soerensen-Puffer konnte eine geringe Verbesserung der Aufnahme beobachtet werden ($112,34\% \pm 6,297$). Die Vorinkubation der Amöben für 8 Stunden in Puffer bewirkt dagegen eine signifikante Reduktion der Phagozytoserate ($68,63\% \pm 4,315$; $p = 0,0012$, gepaarter, zweiseitiger *t*-test). Grund dafür könnte der Übergang eines Teils der Zellen in die Differenzierungsphase sein.

Die Phagozytoserate von *D. discoideum* wurde auch in Abhängigkeit von der Inkubationszeit untersucht (Abb. 1). In den ersten 60 min der Infektion mit *L. pneumophila* Corby werden nur $5,73\% \pm 4,672$ (MOI 100) der Bakterien aufgenommen. Nach 2 Stunden Inkubation verdoppelt sich die Anzahl der phagozytierten Bakterien ($13,20\% \pm 5,693$, MOI 100) und bleibt für weitere 60 min relativ konstant. So werden nach 2½ Stunden $14,20 \pm 6,458$ Bakterien aufgenommen (MOI 100) und nach 3 Stunden $15,45\% \pm 8,247$ (MOI 100). Demzufolge müssen die Amöben mindestens 2 Stunden mit den Bakterien kokubiert werden, um eine ausreichende Anzahl infizierter Zellen zu erhalten.

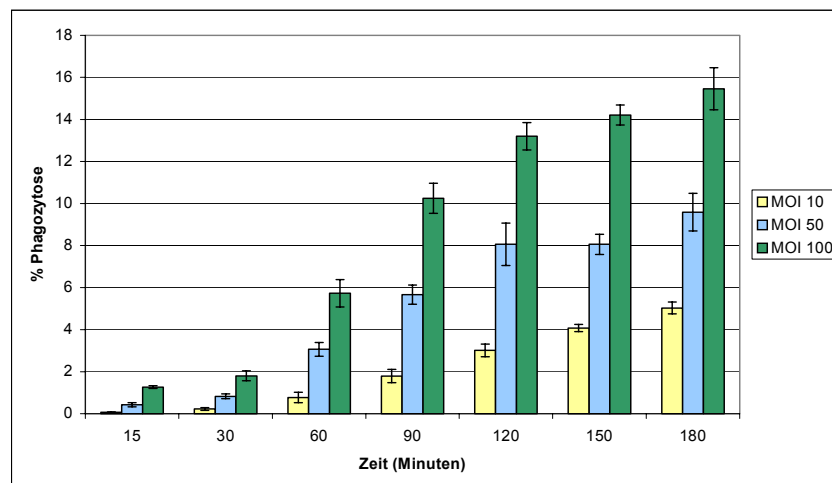


Abb. 1 Prozentualer Anteil der mit *L. pneumophila* Corby infizierten *Dictyostelium*-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der MOI. Die dargestellten Daten sind der Mittelwert dreier voneinander unabhängiger Experimente; die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der jeweiligen Messwerte.

1.1.1 Vergleich der *L. pneumophila*-Infektion in verschiedenen Wirtszellsystemen

Die Infektion von *L. pneumophila* Corby in *D. discoideum* zeigt einen ähnlichen Verlauf wie in *A. castellanii* oder humanen Makrophagen, obgleich die Invasions- und Vermehrungseffizienz im *Dictyostelium*-System deutlich niedriger sind (Abb. 2a, b). 3 Stunden nach Beginn der Infektion mit *L. pneumophila* beträgt die Phagozytoserate von *D. discoideum* $15,45\% \pm 6,475$ (MOI

100). Demgegenüber weisen nach derselben Inkubationszeit $27,90\% \pm 7,209$ (MOI 100) *A. castellanii* beziehungsweise $35,56\% \pm 10,557$ (MOI 100) aller U937 Zellen intrazelluläre Bakterien auf (Abb. 2a).

Innerhalb der ersten 8 - 10 Stunden nach der Aufnahme in *D. discoideum* findet eine mäßige Vermehrung von *L. pneumophila* Corby statt. Anschließend wird ein Teil der Bakterien abgebaut und nach 24 Stunden sind weniger Bakterien als im Ausgangsinokulum vorhanden. Ab diesem Zeitpunkt setzt das Wachstum wieder ein und nach 72 Stunden werden 2 log-Stufen Vermehrung erreicht. In U937-Zellen wird kein Abfall der Kolonienzahlen nach 24 Stunden beobachtet. Im Gegensatz zu *Dictyostelium* vermehren sich die Legionellen in den ersten 24 Stunden um mehr als 2 Zehnerpotenzen. Nach 72 Stunden können in den U937-Zellen 4 log-Stufen Wachstum nachgewiesen werden. In *A. castellanii* tritt die Replikation der Bakterien ebenfalls gleich nach Beginn der Infektion ein und nimmt bis 72 Stunden p.i. Infektion um mehr als 3 log-Stufen zu (Abb. 2b).

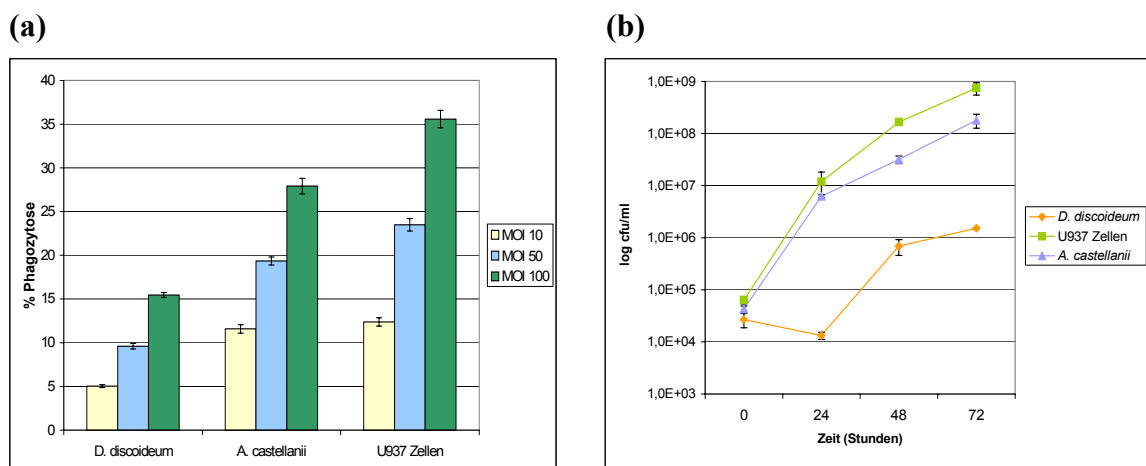


Abb. 2. (a) Prozentualer Anteil der mit *L. pneumophila* Corby infizierten Wirtszellen nach 3 Stunden Inkubation und bei verschiedenen MOIs. (b) Infektionskinetik von *L. pneumophila* Corby in drei verschiedenen Wirtszellen über eine Infektionsdauer von 72 Stunden. Die Zellen wurden mit einer MOI von 50 infiziert. Die Infektion in U937 Zellen und *A. castellanii* wurde bei 37°C durchgeführt. Die Inkubationstemperatur für *D. discoideum* war 24,5°C. Die dargestellten Daten sind der Mittelwert dreier voneinander unabhängiger Experimente, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der jeweiligen Messwerte

Der *Legionella*-Infektion in *D. discoideum* und U937-Zellen ist die Abhängigkeit vom Dot/Icm System gemeinsam. Demzufolge findet in keiner der beiden Wirtssysteme eine Vermehrung der *Legionella dotA*-Mutante statt (Abb. 3). Nach 48 Stunden Infektion sind sowohl in U937-Zellen als auch in *D. discoideum* fast alle *dotA*-Mutanten abgebaut worden, wobei in den Amöben der Abbau der Bakterien schneller erfolgt. Der *Legionella*-Wildtyp (WT) vermehrt sich dagegen um mehr als 2 beziehungsweise 3 Zehnerpotenzen.

Im Gegensatz zur Vermehrung findet die Aufnahme von *L. pneumophila* in U937-Zellen unabhängig vom Dot/Icm-System statt. So zeigen *dotA*-Mutanten und WT-Zellen keine signifikante Unterschiede in der Phagozytoserate [Berger *et al.*, 1994; Roy *et al.*, 1998]. In *D. discoideum* wird Aufnahme der Legionellen von der *dotA*-Mutation beeinträchtigt. Folglich beträgt die Phagozytoserate der Mutanten nach drei Stunden Inkubationszeit $62,18\% \pm 5,411$ im Vergleich zum WT ($p = 0,0096$, gepaarter, zweiseitiger *t*-test).

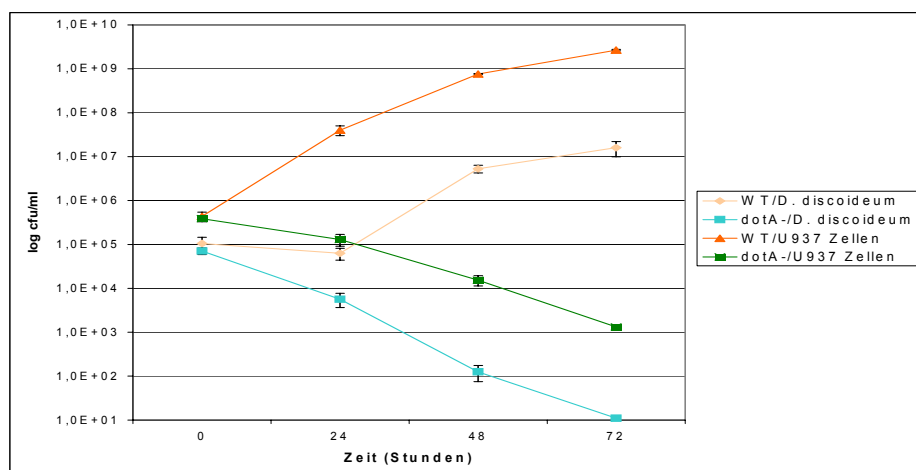


Abb 3 Infektionskinetik der *L. pneumophila* Phill JR32 (WT) und der *dotA*-Mutante in *D. discoideum* und U937-Zellen über eine Infektionsdauer von 72 Stunden. Die Zellen wurden mit einer MOI von 10 infiziert. Die dargestellten Daten sind der Mittelwert dreier voneinander unabhängiger Experimente. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der jeweiligen Messwerte.

1.2 *D. discoideum* als Modellsystem für LLAP-Stämme

Legionella-like amoebal pathogens (LLAPs) sind zum Teil nicht kultivierbare gram-negative Stäbchenbakterien. Die Bezeichnung entstammt der 99%igen Homologie in den 16S rRNA Sequenzen von LLAPs und *Legionella* sp. und dem ähnlichen Infektionsverlauf in Amöben [Hookey *et al.*, 1995; Birtles *et al.*, 1996]. LLAPs werden aus denselben Quellen isoliert, die mit Ausbrüchen der Legionärskrankheit in Verbindung gebracht werden [Adeleke *et al.*, 2001]. 19% aller, wegen atypischer Pneumonie im Krankenhaus behandelten Patienten, weisen Antikörper gegen mindestens einen LLAP-Stamm auf, ohne dass parallel eine Infektion mit einer bekannten *Legionella* Spezies nachgewiesen werden konnte [McNally *et al.*, 2000]. Jedoch ist die genetische und biochemische Charakterisierung der isolierten Stämme aufgrund deren mangelnden Kultivierbarkeit nur schwer möglich.

Die Infektion von *D. discoideum* mit drei verschiedenen LLAP-Stämmen sollte Aufschluss über den Infektionsmechanismus dieser Bakterien geben (Abb. 4).

Alle drei untersuchten LLAP-Stämme sind in der Lage *Dictyostelium*-Zellen zu infizieren und sich intrazellulär zu vermehren. Das für die *L. pneumophila*-Infektion in *D. discoideum* charakteristische Absinken der Bakterienanzahl 24 Stunden nach Beginn der Infektion, konnte bei den LLAPs nicht beobachtet werden. 72 Stunden nach Beginn der Infektion werden bei LLAP K62 und LLAP K86 2,5 log-Stufen Wachstum erreicht. LLAP10 weist im selben Zeitraum eine Vermehrung von ca. 3 Zehnerpotenzen auf.

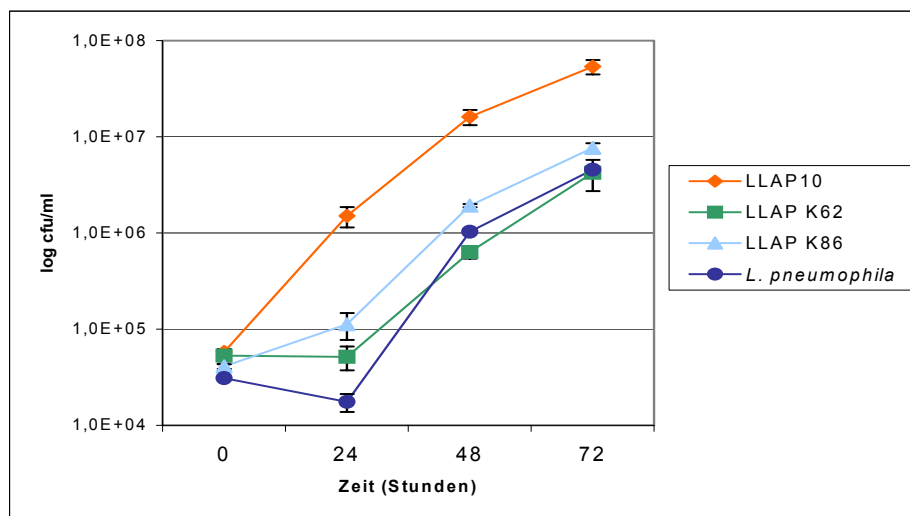


Abb 4. Infektionskinetik von drei verschiedenen LLAP Stämme in *D. discoideum* über eine Infektionsdauer von 72 Stunden. Die Zellen wurden mit einer MOI von 50 infiziert. Die dargestellten Daten sind der Mittelwert dreier unabhängiger Experimente, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der jeweiligen Messwerte

1.2.1 Untersuchung der intrazellulären Vermehrung von LLAPs in *Dictyostelium*-Zellen mittels Elektronenmikroskopie

Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden die morphologischen Eigenschaften und die intrazelluläre Lokalisierung der verschiedenen LLAP-Stämme in *D. discoideum* untersucht und mit der *L. pneumophila*-Infektion verglichen.

48 Stunden nach Beginn der Infektion mit *L. pneumophila* Corby befinden sich zahlreiche Bakterien innerhalb einer einzelnen Vakuole im Zytoplasma der *Dictyostelium*-Zelle. Dort findet durch binäre Teilung die Replikation der Bakterien statt. Eine einzelne umgrenzende Membran, die das gesamte Kompartiment umhüllt, kann deutlich beobachtet werden (Abb.5). Weiterhin sind zahlreiche Mitochondrien in der Umgebung des Phagosoms erkennbar. Zu diesem Zeitpunkt der Infektion mit *L. pneumophila* befinden sich die Bakterien ausschliesslich innerhalb einer Vakuole die mit dem ER assoziiert ist.



Abb. 5 Elektronenmikroskopische Aufnahme einer mit *L. pneumophila* infizierten *Dictyostelium*-Zelle (MOI 50) 48 h nach Beginn der Infektion. Die sich teilenden Bakterien sowie die umgrenzende Membran der Replikationsvakuole sind deutlich erkennbar (Pfeile).

Bei der Infektion mit LLAP10 in *D. discoideum* können im Zytoplasma der Zelle Vakuolen nachgewiesen werden, in welchen die Replikation der Bakterien stattfindet (Abb. 6). Diese Vakuolen sind in der Lage, homotypische Fusionen durchzuführen, da zu späteren Zeitpunkten einzelne, größere Vakuolen innerhalb der Wirtszelle beobachtet werden können. Der Verlauf der Infektion von LLAP10 in *Dictyostelium*, weist keine morphologischen Unterschiede zu dem von *L. pneumophila* Corby auf, obgleich bei LLAP10 eine höhere Invasionseffizienz beobachtet werden kann.



Abb. 6 Elektronenmikroskopische Aufnahme einer mit LLAP10 infizierten *Dictyostelium*-Zelle (MOI 50) 48 h nach Beginn der Infektion. Die Bakterien befinden sich im Zytoplasma der Zelle innerhalb von Vakuolen, mit einer oder mehreren Bakterien (Pfeile).

Bei der Untersuchung der intrazellulären Replikation von LLAP K86 und LLAP K62 in *D. discoideum* konnten beachtliche Unterschiede im Vergleich zu *L. pneumophila* und LLAP 10 beobachtet werden.

48 Stunden nach Beginn der Infektion mit LLAP K86 und LLAP K62 befindet sich eine Vielzahl von Bakterien frei im Zytoplasol der *Dictyostelium*-Zellen. Die einzelnen Bakterien weisen eine dicke, eng anliegende Membran auf (Abb. 7 und 8). Eine einzelne Vakuole innerhalb der Zelle, wie von der *L. pneumophila*-Infektion bekannt, konnte in keinem Fall nachgewiesen werden. Die Vermehrung der Bakterien findet demnach durch binäre Teilung im Zytoplasma der *Dictyostelium*-Zelle statt. Weiterhin konnten weder Mitochondrien noch Ribosomen in der näheren Umgebung der Bakterien nachgewiesen werden. Eindeutige morphologische Unterschiede zwischen LLAP K86 und LLAP K62 konnten jedoch nicht nachgewiesen werden.

Die große morphologische Ähnlichkeit der Kolonien verschiedener LLAP-Stämme verhindert ihre Identifizierung auf makroskopischer Ebene. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass die Stämme aufgrund ihrer intrazellulären Lokalisierung voneinander unterschieden werden können.

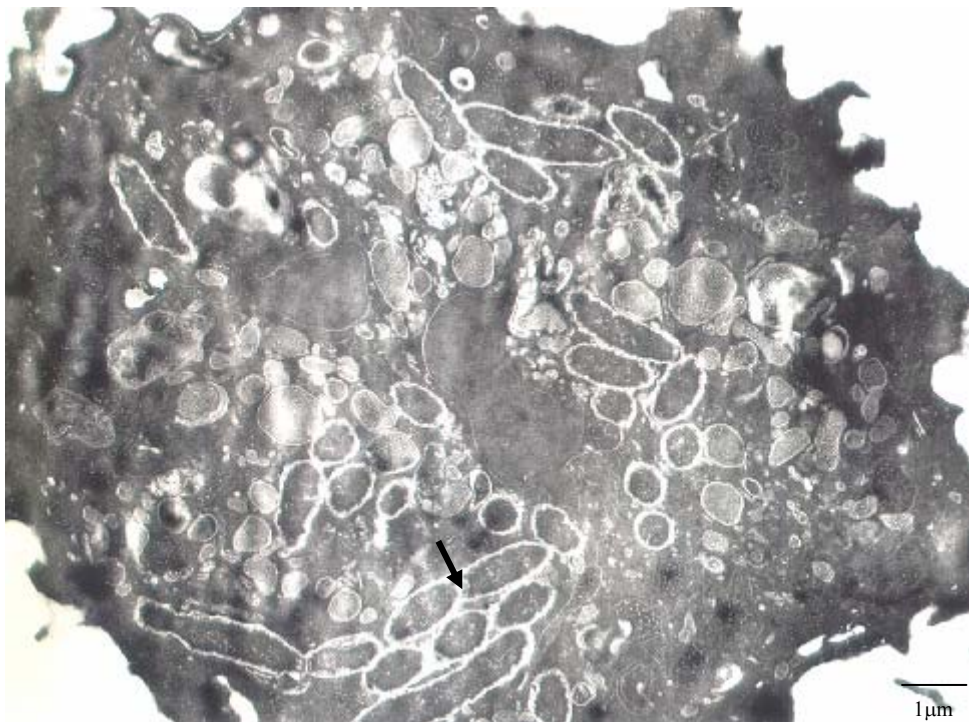


Abb. 7 Elektronenmikroskopische Aufnahme einer mit LLAPK86 infizierten *Dictyostelium*-Zelle (MOI 50), 48 h nach Beginn der Infektion. Einzelne oder Gruppen von Bakterien können innerhalb zytoplasmatischer „Lakunen“ beobachtet werden. Sich teilende Bakterien sind deutlich erkennbar (Pfeil).

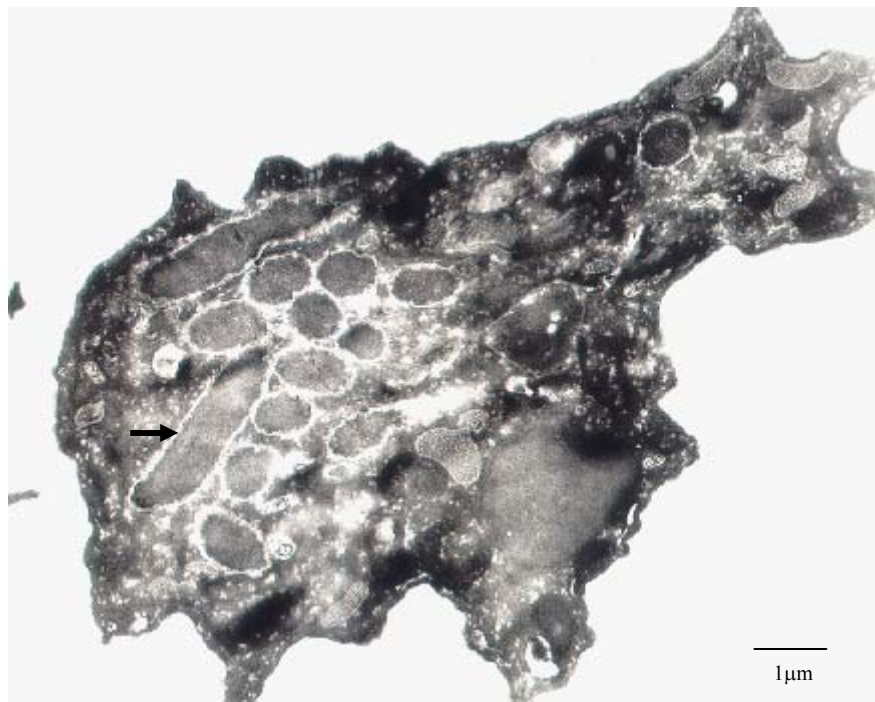


Abb. 8 Elektronenmikroskopische Aufnahme einer mit LLAPK62 infizierten *Dictyostelium*-Zelle (MOI 50) 48 h nach Beginn der Infektion. Die einzelnen Bakterien sind im Zytoplasma der *Dictyostelium*-Zelle deutlich erkennbar (Pfeil).

1.3 Zusammenfassung

Die Infektionskinetik von *L. pneumophila* Corby in *D. discoideum* entspricht im allgemeinen der in U937-Zellen oder *A. castellanii*, weist jedoch auch einige Unterschiede auf. 24 Stunden nach Beginn der Infektion kann eine Abnahme der Bakterienzahl in *D. discoideum* beobachtet werden, jedoch nicht in den U937-Zellen oder *A. castellanii*. Darüber hinaus erreichen die Legionellen 72 Stunden nach Beginn der Infektion in *Dictyostelium* 2-log Stufen Vermehrung, in *A. castellanii* und U937-Zellen sind es dagegen 3, beziehungsweise 4-log-Stufen Wachstum.

L. pneumophila dotA-Mutanten werden in *D. discoideum* schlechter als in U937-Zellen aufgenommen. 24 Stunden nach Beginn der Infektion werden die Mutanten in beiden Wirten abgebaut.

Die LLAP-Stämme LLAP10, LLAPK62 und LLAPK86 sind in der Lage, *Dictyostelium*-Zellen zu infizieren und sich intrazellulär zu vermehren. Allerdings können unterschiedliche intrazelluläre Lokalisierungen beobachtet werden. Anstatt in einem einzelnen replikativen Phagosom, wie *L. pneumophila* oder LLAP10, befinden sich LLAP K86 und K62 isoliert, von Membranstrukturen umhüllt, im Zellzytoplasma.

2 Untersuchung der Aufnahmemechanismen von *L. pneumophila* in *D. discoideum*

Zur Klärung der Aufnahmemechanismen und Signaltransduktionswege, die der *Legionella*-Infektion in *D. discoideum* zugrunde liegen, wurde der Einfluss spezifischer Inhibitoren auf die phagozytotische Aktivität der Amöben untersucht. Der Vergleich mit der Aufnahme von *E. coli* sollte Auskunft über die Spezifität der Mechanismen geben. Hierfür wurden die *Dictyostelium*-Zellen 15 - 30 min mit verschiedenen Inhibitoren inkubiert und anschließend für 3 Stunden mit *L. pneumophila* Corby oder *E. coli* infiziert. Die Substanzen befanden sich während der gesamten Inkubationszeit im Infektionsmedium. Die Anzahl infizierter Amöben wurde im Durchflusszytometer und mittels CFU-Wert-Bestimmung ermittelt.

2.1 Einfluss des Aktinzytoskelettes auf die Aufnahme von *Legionella*

Die Phagozytose von *Legionella* in humanen Makrophagen ist vom Mikrofilamentsystem der Zelle abhängig. [King *et al.*, 1991]. Frühere Untersuchungen zeigten, dass die Aktinpolymerisation keinen Einfluss auf die Aufnahme der Bakterien in *H. vermiformis* und *A. polyphaga* hat [King *et al.*, 1991; Moffat und Thompkins, 1992; Köhler *et al.*, 2000]. In einer neueren Arbeit [Lu und Clarke, 2005] und auch unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass in *D. discoideum* die Aufnahme der Bakterien vom Mikrofilamentsystem der Zelle abhängig ist. So bewirkt das Cytochalasin D-Isomer Cytochalasin A, im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle, eine von der Konzentration abhängige, signifikante Reduktion der Internalisierung von *L. pneumophila* Corby in *D. discoideum* (Tab. 1). Auch die Depolymerisation bereits vorhandener Aktinfilamente, durch Latrunculin A hervorgerufen, reduziert die Phagozytoserate der Bakterien in einer konzentrationsabhängigen Weise (Tab. 1).

Methylamin, ein Inhibitor der Rezeptor-vermittelten-Endozytose, verhindert vollständig die Aufnahme von *Legionella* in *H. vermiformis* und zum Teil die in *A. polyphaga* [King *et al.*, 1991; Köhler *et al.*, 2000]. Niedrige Konzentrationen dieses Inhibitors haben keinen Einfluss auf die Aufnahme von *L. pneumophila* in *D. discoideum*. 200 μ M Methylamin führen jedoch zu einer signifikanten Reduktion der Phagozytoserate von *Legionella* (Tab.1).

Die Proteinbiosynthese des Wirtes, von Bedeutung für die Aufnahme der Legionellen in *H. vermiformis*, trägt nicht zur Phagozytose in *D. discoideum* bei, was durch den Einsatz von Cycloheximid nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus konnte durch die Zugabe von Colchicin, ein Inhibitor der Mikrotubuli-Polymerisation, eine vom Mikrotubuli-Netzwerk der *Dictyostelium*-Zelle unabhängige Aufnahme der Legionellen beobachtet werden (Tab. 1).

Der Aufnahme von *L. pneumophila* und *E. coli* in *D. discoideum* ist die Abhängigkeit vom Aktinzytoskelett der Zelle gemeinsam (Tab. 1). An der Aufnahme von *E. coli* ist allerdings auch die Rezeptor-vermittelte Endozytose beteiligt, was durch die signifikante Reduktion der Phagozytoserate durch Methylamin nachgewiesen werden konnte. Analog zu der Aufnahme von *L. pneumophila*, ist die Proteinbiosynthese des Wirtes und das Mikrotubuli-Netzwerk der Zelle für die Phagozytose von *E. coli* in die *Dictyostelium*-Zellen nicht erforderlich (Tab.1). Für die Darstellung der Daten wurde die Phagozytoserate der unbehandelten Kontrolle auf 100% angesetzt.

Tabelle 1 Durch Inhibitoren verursachte Effekte auf die Phagozytoserate von *L. pneumophila* Corby und *E. coli* in *D. discoideum*.

Inhibitor	Konzentration (µM)	Phagozytoserate(% im Vergleich zur Kontrolle)		Student's gepaarter zweiseitiger t-test (p < 0,05; n = 12)	
		<i>L. pneumophila</i>	<i>E. coli</i>		
Cytochalasin A	1	69,24 ± 8,13	71,31 ± 9,11	0,028	0,041
	3	43,91 ± 6,24	55,49 ± 6,72	0,046	0,002
	5	39,15 ± 9,01	39,78 ± 5,34	0,037	0,001
	10	11,24 ± 3,22	20,17 ± 5,44	0,005	0,013
Latrunculin A	0,05 µg/ml	74,36 ± 7,38	65,43 ± 7,29	0,048	0,045
	0,1 µg/ml	66,86 ± 7,26	51,99 ± 10,21	0,023	0,008
	0,5 µg/ml	46,38 ± 11,09	28,22 ± 4,91	0,003	0,002
	1 µg/ml	29,02 ± 4,34	12,78 ± 6,46	0,007	0,001
Methylamin	10	92,66 ± 7,52	87,51 ± 3,38	0,226	0,150
	50	89,76 ± 5,11	76,53 ± 8,67	0,319	0,009
	100	81,97 ± 9,04	64,75 ± 11,76	0,087	0,043
	200	72,51 ± 6,23	55,72 ± 6,32	0,038	0,034
Cycloheximid	10 µg/ml	111,39 ± 3,49	96,47 ± 7,15	0,233	0,348
	30 µg/ml	109,67 ± 9,41	98,92 ± 5,87	0,249	0,443
	50 µg/ml	103,03 ± 5,88	100,5 ± 8,48	0,799	0,935
	100 µg/ml	98,83 ± 6,47	93,37 ± 9,63	0,917	0,520
Colchicine	50	104,79 ± 2,88	99,69 ± 9,21	0,242	0,885
	100	97,46 ± 2,34	102,67 ± 7,11	0,659	0,648
	300	90,32 ± 10,77	101,17 ± 4,87	0,289	0,982
	500	88,91 ± 4,23	97,82 ± 3,86	0,287	0,521

Die dargestellten Daten entsprechen der prozentualen Phagozytoserate der mit den angegebenen Inhibitoren behandelten *Dictyostelium*-Zellen im Vergleich zu einer nicht behandelten Kontrolle. Die *Dictyostelium*-Zellen wurden mit den Bakterien im Verhältnis 1:50 infiziert. Es werden nur die Ergebnisse der CFU-Wert Bestimmung dargestellt, da diese genau mit denen der FACS- Analysen korrelieren.

2.2 Charakterisierung der Signalübertragungswege während der *Legionella*-Infektion

Die Interaktion bakterieller Liganden mit den Rezeptoren auf der Oberfläche der Wirtszellen löst eine Reihe von Signalen aus, die zur Reorganisation des Aktinzytoskeletts und der nachfolgenden Internalisierung der Bakterien führt. Die Signalübertragungswege, die der Aufnahme von *L. pneumophila* in *D. discoideum* zugrunde liegen wurden durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren charakterisiert.

Die Inhibitoren wurden 15 - 30 min vor Beginn der Infektion zu den *Dictyostelium*-Zellen gegeben. Anschließend wurden die Amöben mit *L. pneumophila* Corby oder *E. coli* infiziert. Nach 3 Stunden Inkubationszeit wurde die Phagozytoserate mit Hilfe von FACS-Analysen und der Bestimmung der CFU-Werte quantifiziert.

2.2.1 Die Phospholipase C Aktivität ist für die Phagozytose von *Legionella* erforderlich

Die Bindung eines extrazellulären Signalmoleküls an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor in der Plasmamembran der Zelle führt zu der Aktivierung des Rezeptors. Daraus folgt die Dissoziation der α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins. Das aktivierte G-Protein stimuliert wiederum eine Phosphoinositid-spezifische Phospholipase C (PLC), die sogenannte Phospholipase C- β , die innerhalb von Sekunden das PI-Biphosphat (PIP₂) in Inositoltrisphosphat (IP₃) und DAG spaltet. Die wasserlöslichen IP₃-Molekülen diffundieren ins Zytosol und binden an den IP₃-abhängigen Ca²⁺-Kanälen des ERs, wodurch die Ca²⁺-Speicher des ERs entleert werden [Selbie und Hill, 1998]. Das fettlösliche DAG verbleibt in der Plasmamembran und aktiviert die Ca²⁺- und DAG-abhängigen Isoformen der Proteinkinase C (PKC), die durch die Phosphorylierung von Zellproteinen an zahlreichen intrazellulären Regulationsmechanismen beteiligt sind.

Die Hemmung der PLC durch U73122 bewirkt eine starke Reduktion der Phagozytoserate von *Legionella* und *E. coli* in den *Dictyostelium*-Zellen (Tab. 2). Die Abnahme in der Phagozytoserate ist proportional zu der Konzentration des Inhibitors, was für eine spezifische Inhibition der PLC spricht. Weiterhin wurden unspezifische Effekte durch die Zugabe von U73343, einem inaktiven strukturellen Analogon von U73122, ausgeschlossen. Darüber hinaus sollte festgestellt werden, ob es sich bei der gehemmten PLC um die spezifische PLC- β handelt. Neomycinsulfat inhibiert die Aktivität der PLC- β durch seine Bindung an PIP₂, wodurch dem Enzym das Substrat entzogen wird. Die signifikante Reduktion in der Phagozytoserate von *L. pneumophila* und *E. coli* in der Gegenwart dieses Inhibitors weist auf

die wichtige Rolle dieses Enzyms bei der Aufnahme der Bakterien hin (Tab.2). Die Konzentrationsabhängige Inhibition der Aufnahme schließt toxische Effekte der Substanz aus. Die durch DAG aktivierten Isoformen von PKC, eine Familie der Serin-/Threoninkinasen, sind in Makrophagen für die frühen Ereignissen im Phagozytoseprozess verantwortlich. Folglich wird durch die Hemmung von PKC die Bildung von Aktinfilamenten an den Bindungsstellen der Bakterien unterbunden [Allen und Aderem, 1996; Breton und Descoteaux, 2000]. Bislang ist jedoch kein Inhibitor bekannt, der spezifisch nur die PKC hemmt. Vielmehr zeigen alle Inhibitoren Nebenreaktionen mit verwandten Enzymen, vor allem mit anderen Proteinkinasen [Davies *et al.*, 2000].

Ein weitverbreiteter PKC Inhibitor ist Calphostin C, welches DAG an die Bindungs-Domänen für Proteine bindet [Kobayashi *et al.*, 1989]. Bei niedrigen Konzentrationen zeigt Calphostin C eine relativ hohe Spezifität für PKC. Weiterhin wurde der PKA-, PKC- und PKG-Inhibitor Staurosporin eingesetzt, um die Rolle anderer Proteinkinasen zu untersuchen. Calphostin C hemmt die Aufnahme, sowohl von *Legionella* als auch von *E. coli*, in einer konzentrationsabhängigen Weise (Tab. 2). Die von Staurosporin hervorgerufenen Effekte bei der Aufnahme beider Bakterien korrelieren mit denen von Calphostin C (Tab. 2). Allerdings befindet sich der IC₅₀ aller Proteinkinasen im selben Konzentrationsbereich, so dass sich die Beteiligung der PKC an den Aufnahmeprozess, aufgrund der Unspezifität der Inhibitoren, nicht mit absoluter Sicherheit feststellen lässt. Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte auf die PKA-Aktivität zurückzuführen sind, wurde schließlich der selektive und potente PKA Inhibitor H-89 verwendet. Die Phagozytose von *L. pneumophila* wird durch H-89 Konzentrationen über 50 nm signifikant reduziert (Tab. 2). Bei der Aufnahme von *E. coli* konnten dagegen keinerlei Effekte beobachtet werden.

Für die Darstellung der Daten wurde die Phagozytoserate der unbehandelten Kontrolle auf 100% angesetzt.

Tabelle 2 Durch Inhibitoren verursachte Effekte auf die Phagozytoserate von *L. pneumophila* Corby und *E. coli* in *D. discoideum*.

Inhibitor	Konzentration (µM)	Phagozytoserate (% im Vergleich zur Kontrolle)		Student's gepaarter zweiseitiger t-test (p < 0,05; n = 12)	
		<i>L. pneumophila</i>	<i>E. coli</i>		
Calphostin C	0,05	74,38 ± 9,10	90,32 ± 11,06	0,043	0,066
	0,1	60,65 ± 1,24	77,16 ± 10,24	0,004	0,029
	0,5	53,22 ± 7,09	65,38 ± 8,34	0,015	0,016
	1	42,74 ± 4,12	51,66 ± 7,95	0,008	0,005

H-89	0,01	94,11 ± 10,61	104,75 ± 8,37	0,117	0,498
	0,025	80,49 ± 9,22	101,19 ± 7,82	0,092	0,247
	0,05	67,01 ± 7,69	96,38 ± 6,92	0,008	0,570
	0,1	61,53 ± 5,21	92,03 ± 11,17	0,016	0,093
Neomycin-sulfat	1	70,26 ± 6,21	83,09 ± 6,62	0,053	0,098
	5	24,92 ± 10,40	67,38 ± 8,64	0,002	0,045
	10	17,24 ± 9,53	50,16 ± 3,89	0,007	0,012
	50	6,13 ± 1,86	32,14 ± 6,74	0,001	0,009
Staurosporine	0,001	78,32 ± 7,82	91,04 ± 5,92	0,072	0,167
	0,003	76,19 ± 2,76	83,21 ± 4,77	0,048	0,073
	0,007	50,54 ± 3,79	62,48 ± 6,09	0,006	0,009
	0,01	44,54 ± 6,13	56,90 ± 2,41	0,003	0,012
Suramin	0,5	106,45 ± 9,45	103,33 ± 12,73	0,704	0,833
	1	118,16 ± 12,34	96,84 ± 9,03	0,279	0,612
	2	102,25 ± 8,22	99,01 ± 9,23	0,564	0,854
	5	105,64 ± 10,25	98,62 ± 8,35	0,683	0,399
U73122	0,5	83,76 ± 4,38	78,61 ± 3,26	0,061	0,018
	1	76,49 ± 3,15	54,47 ± 6,24	0,032	0,008
	5	49,12 ± 4,56	38,26 ± 5,92	0,004	0,0002
	10	35,32 ± 2,16	18,13 ± 2,67	0,010	0,0003
U73343	0,5	102,07 ± 7,35	103,21 ± 7,42	0,877	0,767
	1	99,81 ± 6,46	111,62 ± 6,78	0,852	0,339
	5	100,15 ± 7,81	96,81 ± 9,85	0,994	0,490
	10	101,78 ± 5,29	100,67 ± 8,45	0,862	0,977

Die dargestellten Daten entsprechen der prozentualen Phagozytoserate der mit den angegebenen Inhibitoren behandelten *Dictyostelium*-Zellen, im Vergleich zu einer nicht behandelten Kontrolle. Die *Dictyostelium*-Zellen wurden mit den Bakterien im Verhältnis 1:50 infiziert. Es werden nur die Ergebnisse der CFU-Wert Bestimmung dargestellt, da diese genau mit denen der FACS- Analysen korrelieren.

2.2.2 Ca²⁺-abhängige Aufnahme von *L. pneumophila* in *D. discoideum*

Erhöhungen der [Ca²⁺]_i sind mit der Fcγ-vermittelten Phagozytose in Makrophagen in Verbindung gebracht worden [Greenberg *et al.*, 1991; Myers und Swanson, 2002]. Darüber hinaus ist eine transiente Erhöhung der [Ca²⁺]_i für die optimale Partikel-Aufnahme in humane Neutrophile erforderlich [Della Bianca *et al.*, 1993]. Auch in *D. discoideum* ist Ca²⁺ von Bedeutung für die Regulation der Phagozytose [Peracino *et al.*, 1998; Seastone *et al.*, 1999]. Durch den Einsatz von U73122 konnte nachgewiesen werden, dass die Produkte der PLC-Spaltung IP₃ und DAG, an der Regulation der Phagozytose beteiligt sind (siehe 2.2.1). Das IP₃-Molekül bindet an die IP₃-Rezeptoren im ER, wodurch Ca²⁺ im Zytosol der Zelle

freigesetzt wird. Der Einsatz des intrazellulären Ca^{2+} -Chelatbildners BAPTA-AM sollte Auskunft über die Rolle dieser transienten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Erhöhungen bei der Regulation der Phagozytose in *D. discoideum* geben. Wie in Tab. 3 dargestellt, bewirkt BAPTA-AM, in Abhängigkeit von der Konzentration, eine signifikante Abnahme in der Phagozytose von *Legionella* und *E. coli*. Die durch IP_3 -vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung ist demzufolge für die Regulation der Phagozytose in *Dictyostelium* von Bedeutung. Weiterhin konnte durch die Zugabe von Thapsigargin, ein irreversibler Inhibitor der SERCA-ATPase, das ER als Quelle für die Ca^{2+} -Signalgebung während der Phagozytose nachgewiesen werden. Die durch Thapsigargin hervorgerufene artifizielle Entleerung der Ca^{2+} -Speicher des ERs, hat einen negativen Einfluss auf die phagozytotische Aktivität in *D. discoideum* (Tab. 3).

Durch den Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} ins Zytosol der Zelle werden langanhaltende Ca^{2+} -Signale vermittelt [Berridge, 2000]. Diese dienen u.a. der klonalen Expansion und der Differenzierung von T-Lymphozyten während der Immunantwort [Premack und Gardner, 1994]. In *D. discoideum* wird die Aufnahme von Hefepartikeln von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beeinflusst [Yuan *et al.*, 2001]. Die Zugabe zum Infektionsmedium einer hohen EDTA-Konzentration (≥ 500 mM), einem extrazellulären $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Chelatbildner, führt zu einer signifikanten Reduktion der Aufnahme von *Legionella* und *E. coli* (Tab. 3). Um zu klären, welcher dieser zweiwertigen Kationen für diese Effekte verantwortlich ist, wurde zusätzlich der spezifische extrazelluläre Ca^{2+} -Binder EGTA verwendet. Im selben Konzentrationsbereich bewirkt auch EGTA eine Abnahme der Phagozytoserate beider Bakterien, was für die Bedeutung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration an der Regulation der Phagozytose spricht.

Calmodulin ist ein vielseitiger, intrazellulärer Ca^{2+} -Rezeptor, der viele verschiedene Ca^{2+} -regulierte Prozesse vermittelt. Viele Membranproteine, wie die Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase, und Enzyme, wie die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Serin/Threonin Proteinkinase (CaM-Kinase), werden durch Ca^{2+} /Calmodulin reguliert. W7 inhibiert die Ca^{2+} /Calmodulin-Aktivität durch die spezifische Bindung an Calmodulin. Die Regulation der Aufnahme von *L. pneumophila* in *D. discoideum* findet unabhängig von der Ca^{2+} /Calmodulin Aktivität statt, denn auch $100\mu\text{M}$ W7 zeigen keinen Einfluss auf die Phagozytose dieser Bakterien (Tab. 3). Die Phagozytose von *E. coli* bleibt ebenfalls von W7 unbeeinflusst.

Für die Darstellung der Daten wurde die Phagozytoserate der Kontrolle auf 100% angesetzt.

Tabelle 3 Durch Inhibitoren verursachte Effekte auf die Phagozytoserate von *L. pneumophila* Corby und *E. coli* in *D. discoideum*.

Inhibitor	Konzentration (µM)	Phagozytoserate(% im Vergleich zur Kontrolle)		Student´s gepaarter zweiseitiger t-test ($p < 0,05$; n = 12)	
		<i>L. pneumophila</i>	<i>E. coli</i>		
BAPTA-AM	50	63,74 ± 9,61	74,60 ± 7,27	0,045	0,061
	100	54,54 ± 7,94	61,98 ± 5,89	0,024	0,036
	200	45,67 ± 13,3	44,23 ± 7,67	0,009	0,007
	500	36,15 ± 10,18	39,73 ± 8,22	0,012	0,006
EDTA	10	104,56 ± 5,69	99,21 ± 2,36	0,623	0,822
	50	101,52 ± 7,49	96,49 ± 4,29	0,572	0,253
	500	84,20 ± 8,73	71,05 ± 1,75	0,102	0,014
	1000	61,53 ± 3,76	63,78 ± 5,89	0,023	0,041
EGTA	10	97,63 ± 5,31	101,22 ± 8,09	0,672	0,829
	50	92,51 ± 7,28	89,24 ± 6,55	0,279	0,061
	500	63,66 ± 6,59	70,41 ± 3,47	0,015	0,041
	1000	57,36 ± 2,11	66,02 ± 4,54	0,007	0,011
Thapsigargin	0,01	76,92 ± 3,70	79,27 ± 5,11	0,038	0,095
	0,05	67,31 ± 6,14	66,40 ± 8,70	0,004	0,019
	0,1	68,57 ± 4,67	59,23 ± 7,92	0,032	0,026
	0,2	41,23 ± 3,59	50,11 ± 7,63	0,008	0,006
W7	10	101,55 ± 5,98	99,84 ± 3,76	0,803	0,688
	25	103,04 ± 5,68	104,23 ± 5,31	0,500	0,318
	50	93,04 ± 3,99	96,32 ± 6,63	0,512	0,671
	100	91,52 ± 4,02	97,75 ± 3,95	0,484	0,201

Die dargestellten Daten entsprechen der prozentualen Phagozytoserate der mit den angegebenen Inhibitoren behandelten *Dictyostelium*-Zellen, im Vergleich zu einer nicht behandelten Kontrolle. Die *Dictyostelium*-Zellen wurden mit den Bakterien im Verhältnis 1:50 infiziert. Es werden nur die Ergebnisse der CFU-Wert Bestimmung dargestellt, da diese genau mit denen der FACS- Analysen korrelieren.

2.2.3 Die Phagozytose von *L. pneumophila* findet unabhängig von der PI 3-Kinase-Aktivität statt

PI3-Kinasen katalysieren die Phosphorylierung von PI(4,5)P₂ zu PI(3,4,5)P₃, ein Phospholipid, das an der Rekrutierung von Signalmolekülen wie die AKT/PKB Kinase beteiligt ist [Wymann *et al.*, 2003]. In humanen Makrophagen führt die pharmakologische Inhibition der PI3-Kinasen zu einer vollständigen Hemmung der Aufnahme IgG- und Komplement-opzonisierter Bakterien [Cox *et al.*, 1999; Araki *et al.*, 2003]. Die PI3-Kinase Aktivität ist nicht für die Aktin-abhängige Bildung des „phagocytic cups“ verantwortlich, sondern für die Membranextensions- und Fusionsvorgänge die zur Internalisierung der anhaftenden Partikel führen [Cox *et al.*, 1999]. Darüber hinaus sind PI3-Kinasen für die

Regulation der Makropinozytose in *D. discoideum* unentbehrlich [Cardelli, 2001]. In humanen Monozyten sind PI 3-Kinasen an der Aufnahme avirulenter Legionellen oder *E. coli* beteiligt, haben jedoch keinen Einfluss auf die Phagozytose virulenter Legionellen [Khelef *et al.*, 2001].

Die Zugabe von Wortmannin, einen Inhibitor von PI3-/PI4-Kinasen, weist keinen signifikanten Einfluss auf die Aufnahme von *L. pneumophila* in *D. discoideum* auf (Abb. 9). Im Gegensatz zu humanen Monozyten findet in *D. discoideum* die Phagozytose von *E. coli* ebenfalls unabhängig von den PI3-Kinasen statt. Auch der Einsatz von LY294002, ein weiterer spezifischer Inhibitor der PI3-Kinase blieb ohne Wirkung auf die Phagozytose beider Bakterien (Abb. 9).

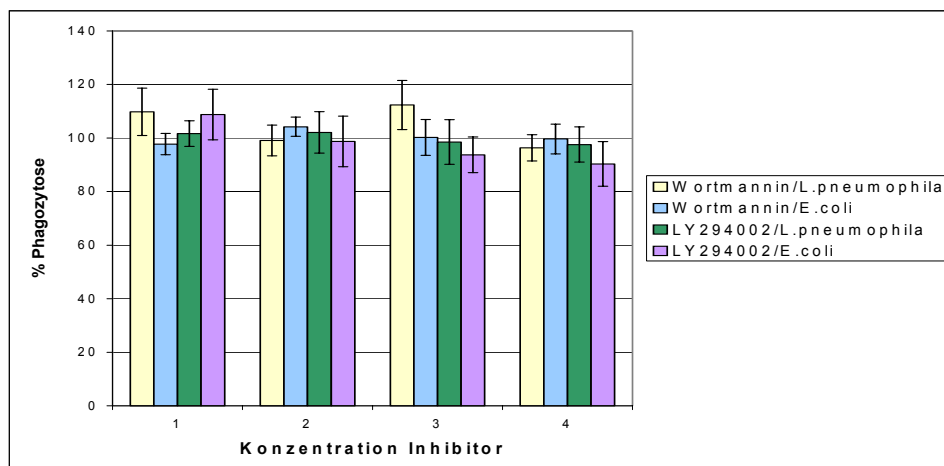


Abb. 9 Prozentuale Phagozytoserate der *Dictyostelium*-Zellen nach drei Stunden Inkubation mit *L. pneumophila* Corby oder *E. coli* (MOI 50). Die Phagozytoserate der nicht behandelten Negativ-Kontrolle wurde mit 100% angesetzt. Die Zellen wurden in Gegenwart von jeweils 1(1), 10 (2), 50 (3), 100 (4) nM Wortmannin und 1(1), 10 (2), 50 (3), 100 (4) μ M LY294002 mit den Bakterien inkubiert. Die dargestellten Daten sind der Mittelwert dreier voneinander unabhängiger Experimente; die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der jeweiligen Messwerte.

2.2.4 Die Tyrosinkinase-Aktivität beeinflusst die Aufnahme von *Legionella* in *Dictyostelium*

In Makrophagen induziert die Aufnahme opsonisierter Bakterien über Fc γ -Rezeptoren die Protein-Tyrosinkinase-Aktivität der Zellen [Greenberg, 1995; Sanchez-Mejorada und Rosales, 1998]. Auch die Aufnahme von *L. pneumophila* in verschiedenen Wirtszellsystemen ist mit der Tyrosin-Phosphorylierung von Wirtsproteinen in Verbindung gebracht worden [Yamamoto *et al.*, 1992; Coxon *et al.*, 1998; Susa und Marre, 1999]. In *D. discoideum* konnte bislang kein Zusammenhang zwischen der Tyrosin-Phosphorylierungs-Kaskade und der Phagozytose nachgewiesen werden [Seastone *et al.*, 1999].

Der Einfluss der Tyrosin-Phosphorylierung von *Dictyostelium*-Wirtsproteinen während der Aufnahme von *L. pneumophila* und *E. coli* wurde mit Hilfe von Genistein, einen Inhibitor der Protein-Tyrosinkinasen, untersucht. Genistein-Konzentrationen weit unterhalb der IC_{50} führen zu einer deutlichen Reduktion der Phagozytose von *L. pneumophila*, was die Bedeutung dieses Signalweges beim Aufnahmeprozess dieser Bakterien hervorhebt (Abb. 10). Demgegenüber bleibt die Aufnahme von *E. coli* in den *Dictyostelium*-Zellen von Genistein unbeeinflusst (Abb.10).

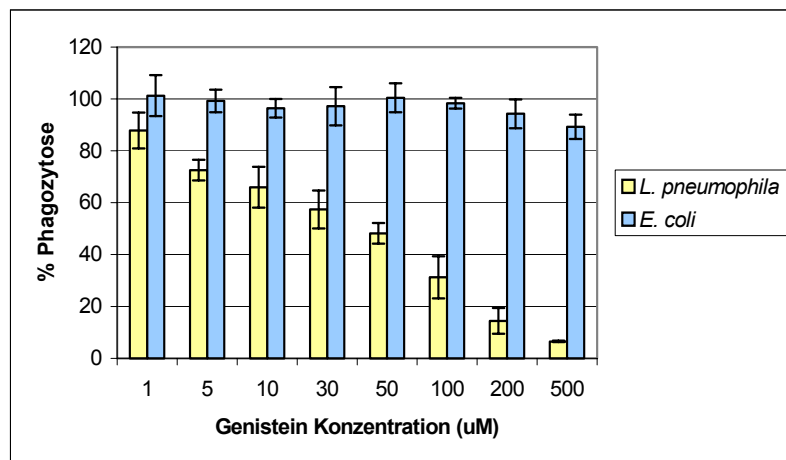


Abb. 10 Prozentuale Phagozytoserate der *Dictyostelium*-Zellen nach drei Stunden Inkubation mit verschiedene Genistein-Konzentrationen. *L. pneumophila* Corby oder *E. coli* wurden im Verhältnis 50:1 zu den Zellen gegeben. Die Phagozytoserate der nicht behandelten Negativ-Kontrolle wurde auf 100% angesetzt. Die dargestellten Daten sind der Mittelwert dreier unabhängiger Experimente; die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der jeweiligen Messwerte.

2.3 Vergleich des Aufnahmeprozesses in *D. discoideum* und U937-Zellen

Die zuvor für die Untersuchung der Phagozytose in *D. discoideum* verwendeten Inhibitoren wurden zusätzlich für die Charakterisierung der Aufnahme von *L. pneumophila* und *E. coli* in U937-Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden ebenfalls für 15 - 30 min mit den Inhibitoren präinkubiert und anschließend für 3 Stunden mit *L. pneumophila* Corby oder *E. coli* infiziert. In Tab. 4 sind die Ergebnisse der Phagozytoseexperimente auf der Basis einer repräsentativen Konzentration der jeweils verwendeten Inhibitoren zusammengefasst.

Die Internalisierung von *L. pneumophila* und *E. coli* in U937-Zellen ist ein Aktin-abhängiger Prozess. Demzufolge führt die Hemmung der Aktinpolymerisation, durch Cytochalasin A, und die Depolymerisation bestehender Aktinfilamente, mittels Latrunculin A, zu einem signifikanten Rückgang der Phagozytoserate. Im Gegensatz zum *Dictyostelium*-Modell, wird für die Aufnahme beider Bakterien in U937-Zellen ein intaktes Mikrotubuli-Netzwerk benötigt. Die

Zugabe von Colchicin hat eine konzentrationsabhängige Reduktion der phagozytotischen Aktivität zur Folge. Die Proteinbiosynthese des Wirtes und die Rezeptor-vermittelte Endozytose sind für den Aufnahmeprozess in U937-Zellen entbehrlich.

Die Abhängigkeit von der PLC-Aktivität für die Regulation der Phagozytose ist den *Dictyostelium*- und U937-Zellen gemeinsam. Folglich bewirkt die Zugabe von U73122 und Neomycinsulfat eine deutliche Abnahme der Internalisierung, sowohl von *Legionella* als auch von *E. coli*. Die mangelnde Wirkung von Suramin auf die Phagozytoserate, deutet auf eine von den heterotrimeren G-Proteinen unabhängige Aktivierung von PLC hin. Allerdings konnten auch bei den U937-Zellen starke Nebenwirkungen des Inhibitors beobachtet werden, weshalb der genaue Einfluss des Inhibitors nach wie vor ungewiss ist. Bewiesen werden konnte dagegen die Notwendigkeit von Ca^{2+} für die Regulation der Phagozytose in den U937-Zellen. Durch den Einsatz von intra- und extrazellulären Ca^{2+} -Chelatbildner (BAPTA-AM, EDTA und EGTA) konnte eine konzentrationsabhängige Reduktion der Phagozytoserate beider Bakterien nachgewiesen werden. Wobei die Wirkung von EDTA und EGTA in U937-Zellen stärker als in *D. discoideum* ist. Das ER dient auch in der Makrophagenzelllinie als Ca^{2+} -Quelle für die Ca^{2+} -Signalgebung, was durch die Zugabe von Thapsigargin nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus ist die Regulation der Phagozytose in den U937-Zellen, im Gegensatz zu *D. discoideum*, von der Ca^{2+} /Calmodulin Aktivität abhängig.

Die Hemmung der PKC durch Calphostin C und Staurosporin resultiert in einer Reduktion von 55% beziehungsweise 41% der Invasionsrate von *L. pneumophila* Corby. Der Effekt ist jedoch nicht *Legionella*-spezifisch, denn ähnliche Ergebnisse konnten bei der Aufnahme von *E. coli* beobachtet werden. Der Rückgang in der Phagozytoserate, verursacht durch die oben genannten Inhibitoren, ist ausschließlich auf die PKC Aktivität zurückzuführen. Dies kann anhand des abwesenden Einfluss von H-89 auf die Phagozytose von *Legionella* oder *E. coli* nachgewiesen werden.

Wie in der Literatur beschrieben [Khelef *et al.*, 2001] kann die Phagozytose von *E. coli* mit Wortmannin und LY294002 unterbunden werden. Die Aufnahme von *L. pneumophila* ist im Gegensatz dazu unabhängig von der PI 3-Kinase-Aktivität.

Obgleich die im Versuch verwendete Legionellen nicht IgG-opsonisiert worden sind, trägt die Tyrosin-Protein-Phosphorylierung zu der Phagozytose dieser Bakterien bei. Die Inkubation der U937-Zellen mit Genistein, reduziert die Aufnahme von *L. pneumophila* in einer konzentrationsabhängigen Weise. Die Aufnahme von *E. coli* wird, wie im *Dictyostelium*-Modell, von Genistein nicht beeinträchtigt.

Tabelle 4 Durch Inhibitoren verursachten Effekte auf die Phagozytoserate von *L. pneumophila* Corby und *E. coli* in U937-Zellen

Inhibitor	Konzentration (μM)	Phagozytoserate (% im Vergleich zu Kontrolle)	
		<i>L. pneumophila</i>	<i>E. coli</i>
BAPTA AM	200	68,13 \pm 4,79*	71,85 \pm 6,09*
Calphostin C	0,5	45,21 \pm 9,7*	37,87 \pm 9,94*
Colchicin	100	69,24 \pm 7,82*	22,68 \pm 11,09*
Cycloheximid	50	99,68 \pm 8,60	97,23 \pm 3,24
Cytochalasin A	5	21,14 \pm 5,98*	17,24 \pm 4,55*
EDTA	500	49,13 \pm 10,16*	55,72 \pm 5,09*
EGTA	500	61,21 \pm 4,23*	59,70 \pm 8,66*
Genistein	100	54,13 \pm 6,75*	79,12 \pm 7,91
H89	0,05	92,74 \pm 8,99	84,76 \pm 6,32
Latrunculin A	0,1 $\mu\text{g/ml}$	34,01 \pm 6,34*	23,43 \pm 9,62*
LY 294002	50	102,1 \pm 7,73	43,22 \pm 12,87*
Methylamin	100	94,39 \pm 9,11	95,76 \pm 4,39
Neomycin Sulfat	5	44,62 \pm 7,38*	9,31 \pm 1,05*
Staurosporin	0,01	59,22 \pm 4,18*	52,03 \pm 9,82*
Suramin	5	107,12 \pm 9,15	101,92 \pm 15,56
Thapsigargin	0,1	54,53 \pm 12,1*	56,12 \pm 7,56*
U73122	5	32,33 \pm 5,6*	12,13 \pm 2,34*
U73343	5	99,01 \pm 7,21	102,26 \pm 6,11
Wortmannin	1	109,8 \pm 8,86	38,14 \pm 4,61*
W7	50	70,08 \pm 11,28*	67,23 \pm 7,86*

Die dargestellten Daten entsprechen der prozentualen Phagozytoserate der mit den angegebenen Inhibitoren behandelten U937-Zellen, im Vergleich zu einer nicht behandelten Kontrolle. Die U937-Zellen wurden für 3 Stunden mit *L. pneumophila* Corby und *E. coli* (MOI 50) infiziert. Es werden nur die Ergebnisse der CFU-Wert Bestimmung dargestellt, da diese genau mit denen der FACS-Analysen korrelieren. Die Sternchen kennzeichnen die Inhibitoren mit einem signifikanten Einfluss auf die Phagozytose der Bakterien (Student's gepaarter, zweiseitiger *t*-test; $p = 0,05$, $n = 12$).

2.4 Analyse der Expression Tyrosin-phosphorylierter Proteine während der Aufnahme von *L. pneumophila*

Die Ergebnisse der Phagozytoseversuche mit Genistein demonstrieren eine spezifische Beteiligung der Tyrosin-Protein-Phosphorylierung an der Regulation der Aufnahme von *L. pneumophila*. Die Untersuchung der Expression Tyrosin-phosphorylierter Proteine mittels SDS-PAGE und Westernblot zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion mit *L. pneumophila* sollte der näheren Charakterisierung dieses Signalweges dienen. Hierfür wurden *Dictyostelium*- und U937-Zellen für 5, 15, 30, 60 und 120 min mit *L. pneumophila* Corby oder *E. coli* koinkubiert. Nach der Entfernung der extrazellulären Bakterien wurden die Gesamtzellproteine isoliert (siehe Material und Methoden

Kap. 10). Diese wurden mittels eindimensionaler SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Westernblot-Transfer mit einem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper behandelt. Bei der Analyse des Phosphorylierungsmusters konnten überraschenderweise keine Unterschiede zwischen *L. pneumophila* und *E. coli* beobachtet werden (Abb. 11). Darüber hinaus werden innerhalb der ersten 120 Minuten der Infektion sowohl bei den infizierten Zellen als auch bei der uninfizierten Kontrolle dieselben Proteine phosphoryliert. Die Präinkubation der Amöben für 6 Stunden in Soerensen-Puffer führt zu einer Reduktion der metabolischen-Aktivität der Zellen. Jedoch konnten auch in diesen Zellen keine Unterschiede zwischen der Kontrolle und den infizierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 12).

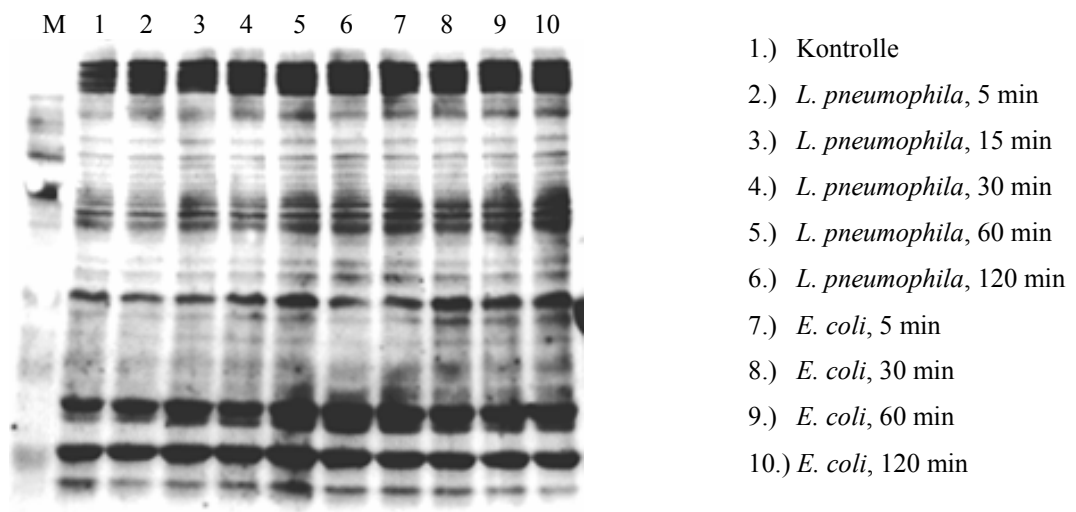


Abb. 11 Westernblotanalyse der Gesamtzellproteine von *D. discoideum* nach der Inkubation mit *L. pneumophila* Corby oder *E. coli* für verschiedene Zeiträume. Die Zellen der Kontrolle wurden nicht mit den Bakterien infiziert, aber sonst in gleicher Weise wie die anderen Proben behandelt. Zu sehen ist der Phosphorylierungsmuster der Gesamtzellproteine.

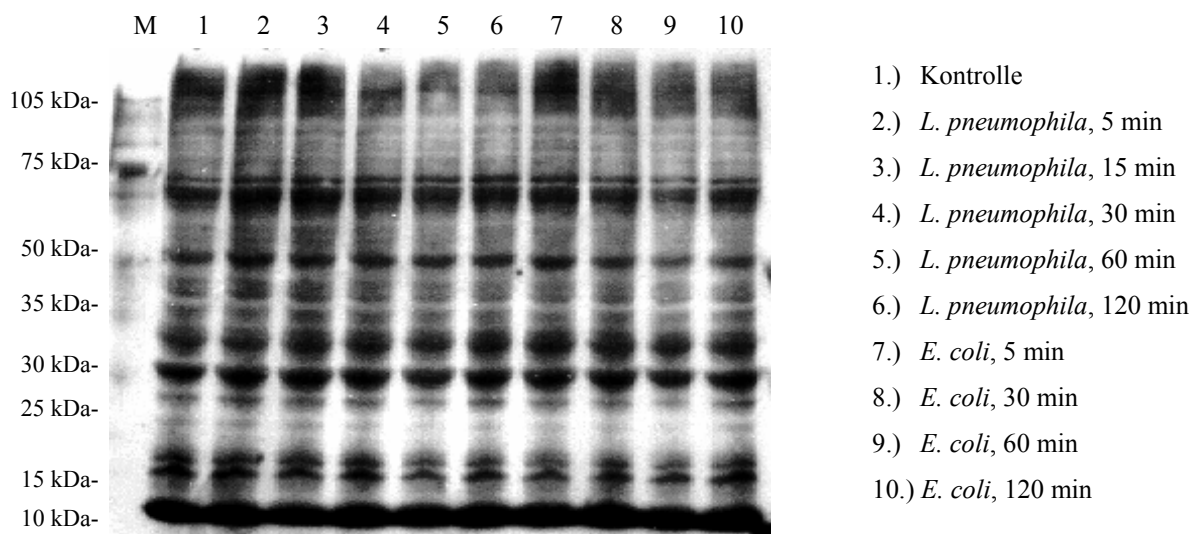


Abb. 12 Westernblot-Analyse der Gesamtzellproteine von *D. discoideum* nach der Inkubation mit *L. pneumophila* Corby oder *E. coli* für verschieden Zeiträume. Die *Dictyostelium*-Zellen wurden 6 Stunden vor der Infektion in Soerensen-Puffer inkubiert. Die Zellen der Kontrolle wurden nicht mit den Bakterien infiziert, aber sonst in gleicher Weise wie die anderen Proben behandelt. Zu sehen ist das Phosphorylierungsmuster der Gesamtzellproteine.

In U937-Zellen können unterschiedliche Phosphoproteinbanden für *E. coli* und *L. pneumophila* beobachtet werden, die wiederum Unterschiede zu dem Muster der Kontrolle aufweisen (Abb. 13). In der unbehandelten Kontrolle (Spuren 1 und 10) können 2 deutlich phosphorylierte Banden im 30 kDa Bereich und 4 schwache Phosphoproteinbanden (ca. 100-kDa, 60-kDa, 48-kDa und 33-kDa) beobachtet werden. Nach 5 min Inkubation mit *L. pneumophila* (Spur 2) werden die in der Kontrolle bereits vorhandenen Proteine stark phosphoryliert und zusätzlich 7 weitere Proteine exprimiert (ca. 90-kDa, 85-kDa, 75-kDa, 35-kDa, 28-kDa, 26-kDa und 15-kDa). Nach 15 min Koinkubation mit *Legionella* (Spur 3) kommen keine weiteren Banden dazu und die bereits vorhandenen werden wieder schwächer phosphoryliert. 30 min nach Beginn der Infektion mit *L. pneumophila* können bei den U937-Zellen mehrere Vorgänge beobachtet werden (Spur 6). Das 35-kDa und das 15-kDa Protein werden dephosphoryliert. Weiterhin werden das 28-kDa Protein und die Proteine, die auch in der Kontrolle vorkommen, wieder stärker exprimiert. Nach 60 min Infektion mit *L. pneumophila* Corby (Spur 9) ähnelt das Phosphorylierungsmuster den von 15 min nach Beginn der Infektion, wobei die 35-kDa Phosphoproteinbande weiter dephosphoryliert wird. Das Phosphorylierungsmuster der U937-Zellen 5 und 15 min nach der Zugabe von *E. coli* (Spuren 4 und 5) weist dagegen keine Unterschiede zu dem der unbehandelten Kontrolle auf. 30 und 60 min nach Beginn der Infektion mit *E. coli* (Spuren 8 und 9) werden die bereits vorhandenen Phosphoproteinbanden stärker exprimiert, es kommen jedoch keine weiteren Banden dazu.

In U937-Zellen konnten 7 für *L. pneumophila* spezifischen Proteinbanden beobachtet werden, die bereits 5 min nach Beginn der Infektion Tyrosin-phosphoryliert werden. Zwei davon, 35-kDa und 15 kDa, werden im Laufe der Infektion dephosphoryliert

Dieses Phosphorylierungsprofil konnte jedoch nicht in gleicher Form reproduziert werden. In weiteren Westernblot-Analysen konnte die 15-kDa Bande nicht beobachtet werden. Weiterhin wurde keine Dephosphorylierung der 35-kDa Bande festgestellt. Allerdings haben alle durchgeführten Analysen Unterschiede zwischen der Kontrolle und der mit *L. pneumophila* infizierten Zellen gezeigt. Die am stärksten Tyrosin-phosphorylierten Proteine konnten in allen Fällen 5 min nach Beginn der Infektion nachgewiesen werden. Zudem konnte die ca. 8-kDa Phosphoproteinbande eindeutig als *Legionella* spezifisch identifiziert werden.

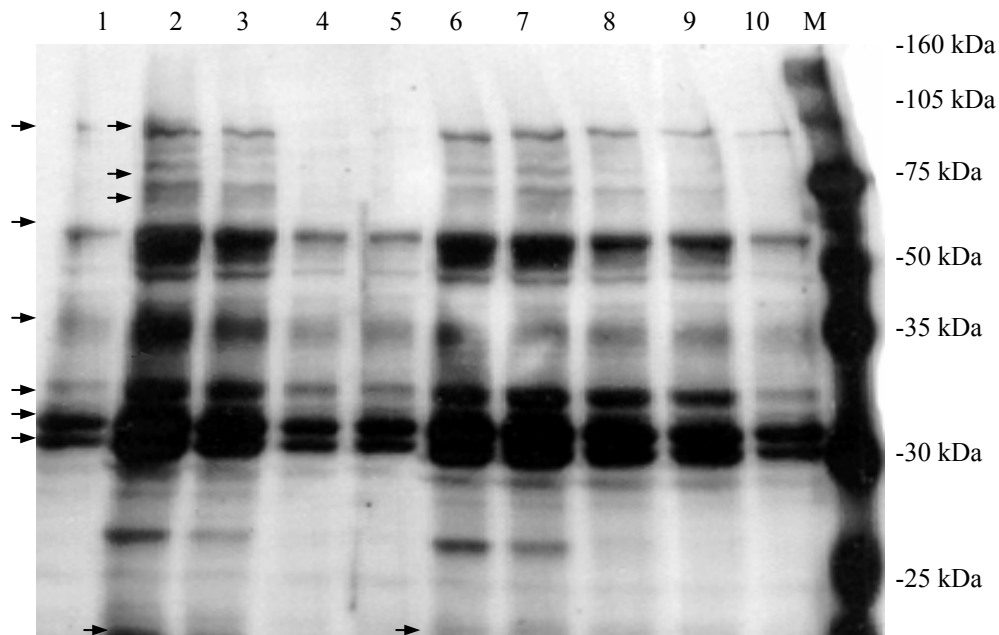


Abb. 13 Westernblot-Analyse der Gesamtzellproteine von U937-Zellen nach der Inkubation mit *L. pneumophila* Corby oder *E. coli* für verschiedene Zeiträume. Die Zellen der Kontrolle wurden nicht mit den Bakterien infiziert, aber sonst in gleicherweise wie die anderen Proben behandelt. Die Proben wurden wie folgt aufgetragen: 1.) Kontrolle; 2.) *L. pneumophila*, 5 min; 3.) *L. pneumophila*, 15 min; 4.) *L. pneumophila*, 30 min; 5.) *L. pneumophila*, 60 min; 6.) *L. pneumophila*, 120 min; 7.) *E. coli*, 5 min; 8.) *E. coli*, 30 min; 9.) *E. coli*, 60 min; 10.) *E. coli*, 120 min.

2.5 Zusammenfassung

In U937-Zellen und *D. discoideum* findet die Aufnahme von *L. pneumophila* und *E. coli* abhängig vom Aktinzytoskelett statt. So führt die Zugabe der Aktininhibitoren Cytochalasin A und Latrunculin A zu einem signifikanten Rückgang in der Phagozytoserate der Bakterien. Die Synthese neuer Wirtsproteine ist dagegen nicht von Bedeutung für die Phagozytose in *Dictyostelium*- und U937-Zellen. Im *Dictyostelium*-Modell verläuft ausschliesslich die Aufnahme von *E. coli* über Rezeptor-vermittelte Endozytose. Unterschiedlich ist die Bedeutung der Mikrotubuli für die Aufnahme in den zwei Wirten. Die Phagozytose in *D. discoideum* erfolgt unabhängig von Mikrotubuli Netzwerk. Dieser wird dagegen für die Aufnahme der Bakterien in den U937 Zellen benötigt. In beiden Wirtszellsystemen ist die Regulation der Phagozytose von der PLC-Signalkaskade abhängig. Folglich sind die Aktivierung der PKC und die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ für die Internalisierung der Bakterien erforderlich. Sowohl das extrazelluläre Medium als auch die Ca^{2+} -Speicher des ERs dienen als Ca^{2+} -Quelle für die Ca^{2+} -Signalgebung während des Aufnahmeprozesses. Spezifisch für *Legionella* in beiden Systemen ist die Tyrosin-Phosphorylierung von Wirtsproteinen. Jedoch konnten in der Westernblot-Analyse von *D. discoideum* und U937-Zellen

Gesamtzellproteinen, die an der Tyrosin-phosphorylierungs-Kaskade beteiligter Proteine, nicht eindeutig identifiziert werden.

In der folgenden Tabelle sind die Untersuchten Wirtszellfaktoren und dessen Beteiligung an der Aufnahme von *Legionella* und *E. coli* zusammengefasst.

Tabelle 5. Wirtszellfaktoren beteiligt an der Phagozytose von *Legionella* und *E. coli* in *D. discoideum* und U937-Zellen

Wirtszellfaktor	<i>D. discoideum</i>		U937-Zellen	
	<i>L. pneumophila</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. pneumophila</i>	<i>E. coli</i>
Aktinzytoskelett	+	+	+	+
Mikrotubuli	-	-	+	+
PLC	+	+	+	+
PKC	+	+	+	+
PKA	(+)	-	-	-
Ca ²⁺	+	+	+	+
PI ₃ K	-	-	-	+
PTK	+	-	+	-

3 Untersuchung der *Legionella*-Infektion durch den Einsatz spezifischer *D. discoideum* Mutanten

Viele zelluläre Prozesse werden in der genetisch manipulierbaren Amöbe *D. discoideum* seit Jahren untersucht. Demzufolge steht eine große Anzahl verschiedener Mutanten zur Verfügung, die eine genaue Charakterisierung der an der *Legionella*-Infektion beteiligter Wirtspoteine ermöglichen. Aktinbindende Proteine, die an der Reorganisation des Zytoskeletts teilnehmen, sowie Regulationsproteine, die für die Signaltransduktion in der Zelle verantwortlich sind, wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf die *Legionella*-Infektion untersucht.

3.1 Einfluss aktinbindender Proteine auf die Phagozytose von *Legionella* in *Dictyostelium*

Der Bildung des „phagocytic cups“ und der nachfolgende Internalisierung der anhaftenden Bakterien, liegt die Reorganisation des Aktinzytoskeletts zugrunde. Eine Vielzahl aktinbindender

Proteine nimmt an der Regulation dieses Prozesses teil. Durch den Einsatz spezifischer Knock-out Mutanten wurde die Beteiligung einiger dieser Proteine an der Aufnahme von *E. coli*, LLAP10 und *L. pneumophila* untersucht. Hierfür wurden die Mutanten und die Wildtypzellen für 3 Stunden mit den Bakterien infiziert und anschließend die Phagozytoserate mittels FACS-Analysen und CFU-Wert Bestimmung ermittelt.

In *D. discoideum* tragen die quervernetzenden Proteine α -Aktinin und der 120-kDa „gelation“-Faktor (ABP120) zum Aufbau und Erhalt des Aktinfilament-Netzwerkes bei [Noegel *et al.*, 1987; Cox *et al.*, 1996]. Beide Proteine sind im Zytoplasma der Zelle verteilt, wobei der ABP120 mit dem „phagocytic cup“ ko-lokalisiert, während α -Aktinin mit der Phagosommembran assoziiert [Furukawa und Fehheimer, 1997]. Eine Doppelnull-Mutante beider Proteine, AGHR2, weist ein verlangsamtes Wachstum in Schüttelkultur auf. Darüber hinaus ist die Phagozytose von *E. coli* in diesen Zellen stark beeinträchtigt [Rivero *et al.*, 1996]. Wie in der Literatur beschrieben beträgt die Phagozytoserate nach 3 Stunden Koinkubation mit *E. coli* nur 39, 91 % im Vergleich zum Wildtyp (Tab. 5). Die Aufnahme von *L. pneumophila* und LLAP10 ist in der Mutante ebenfalls um mehr als 40% reduziert.

Das ASP56/CAP ist ein PIP₂ reguliertes, G-Aktin sequestrierendes Protein, was im Zytoplasma und an den vorderen und hinteren Endregionen der Plasmamembran angereichert wird [Gottwald *et al.*, 1996]. Die Deletion des ASP56/CAP-Proteins hat sich als letal erwiesen, so dass die Untersuchung der Funktion dieses Protein anhand dessen Unterexpression durchgeführt worden ist. Die Mutaten weisen eine Reduktion von 30% in der Pinozytoserate auf, was das Wachstum der Zellen auf künstlichen Medien beeinträchtigt. Die Phagozytose bleibt dagegen von der niedrigen ASP56/CAP Expression unbeeinflusst [Noegel *et al.*, 1999]. Die Aufnahme von *L. pneumophila* und LLAP10 ist überraschenderweise in der ASP56-Mutante, im Vergleich zum Wildtyp, um 38% beziehungsweise 55% reduziert (Tab. 5). Demgegenüber weist die Aufnahme von *E. coli* in der Mutante keine Unterschiede zum Wildtyp auf.

Das bifunktionale, F-Aktin-bindende Protein Comitín, stellt eine Verbindung zwischen dem Aktinzytoskelett und den Membranen des Golgi-Apparates her [Weiner *et al.*, 1993]. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass Comitín angereichert in der Membran früher Phagosomen vorgefunden wird [Schreiner *et al.*, 2002]. In der Comitín-Mutante konnte keine Veränderung in der Aufnahme von LLAP10 beobachtet werden (Tab. 5). Werden Comitín-Mutanten dagegen mit *L. pneumophila* Corby infiziert, können nach 3 Stunden Inkubationszeit wesentlich mehr intrazelluläre Bakterien als im Wildtyp nachgewiesen werden. Auffälligerweise wird die Phagozytose von *E. coli* von der Comitín-Mutation

nachteilig beeinflusst, da eine signifikante Reduktion in der Aufnahme dieser Bakterien beobachtet werden kann.

Weiterhin ist das aktinassozierte Protein Coronin an der Aufnahme in *Dictyostelium* beteiligt. Coronin-Mutanten weisen schwere Phagozytose- und Makropinozytose-Defekte auf, die u. a. zu einem verlangsamten Wachstum der Zellen führen [Maniak *et al.*, 1995; Hacker *et al.*, 1997]. Eine Reduktion der Phagozytoserate von mehr als 30% konnte ebenfalls bei der Aufnahme von *L. pneumophila*, LLAP10 und *E. coli* beobachtet werden (Tab. 5).

Das 64 kDa Protein DAip1 akkumuliert am dynamischen Regionen des Zellkortex, wo es an der Regulation der Aktin-Depolymerisation teilnimmt [Konzok *et al.*, 1999]. DAip1-null Zellen weisen ein vermindertes Wachstum auf Bakterienrasen auf, was auf einem Defekt in der Bildung des „phagocytic cups“ zurückzuführen ist. Folglich werden in den DAip1-Mutanten, Hefepartikel 74% schlechter aufgenommen als im Wildtyp. Dieser Aufnahmedefekt wird auch bei *L. pneumophila* deutlich, dessen Phagozytose im Vergleich zum Wildtyp um mehr als 35% reduziert ist (Tab. 5). Es handelt sich dabei allerdings um einen allgemeinen Aufnahmedefekt denn auch LLAP10 und *E. coli* weisen verminderte Aufnahmeraten auf. Eine Doppelnul-Mutante von Coronin und DAip1 zeigt erwartungsgemäß einen ausgeprägten Rückgang in der Aufnahme aller Bakterien (Tab. 5).

LIM-Proteine befinden sich in *D. discoideum* im Zellkortex, wo sie der Zellmotilität und der Chemotaxis dienen [Chien *et al.*, 2000]. Weiterhin ist DdLim mit der Rezeptor-vermittelten Rac1-Signalgebung, die zur Aktinpolymerisation in Lamellipodia führt, in Verbindung gebracht worden [Prassler *et al.*, 1998]. LimC und LimD sind F-Aktinbindende Proteine, die zur Erhaltung der Stabilität des kortikalen Aktinzytoskeletts beitragen. Darüber hinaus konnten beide Proteine angereichert im „phagocytic cup“ beobachtet werden. Jedoch weisen Lim C-, Lim D- und LimC-/D-Mutanten keine signifikanten Phagozytosedefekt auf [Khurana *et al.*, 2002]. Wie in Tab. 5 dargestellt konnte in dieser Arbeit bei den Lim C- und Lim D-Mutanten ebenfalls keine Veränderung der phagozytotischen Aktivität beobachtet werden. Die Doppelnul-Mutante dagegen zeigt eine für die Gattung *Legionella* spezifische Reduktion der Phagozytoserate. Sowohl *L. pneumophila* Corby als auch LLAP10 werden in der LimC/D-Mutante ca. 50% schlechter aufgenommen als durch den Wildtyp.

Das kürzlich in *Dictyostelium* entdeckte F-Aktinbindende Protein Villidin, liegt sowohl zytosolisch als auch Zytoskelett und Membran-assoziert vor. Die Deletion des *villidin*-Gens, führt zu keiner signifikanten Veränderungen des Phänotyps, was auf eine Redundanz der Funktionen von Zytoskelett-Proteinen zurückzuführen ist [Gloss *et al.*, 2003]. Nach 3 Stunden Koinkubation der Villidin-Mutanten mit *E. coli*, konnte keine Veränderung der

Aufnahmerate der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden (Tab. 5). Demgegenüber wird bei der phagozytischen Aufnahme von *L. pneumophila* Corby und LLAP10 eine deutliche Reduktion beobachtet.

Tabelle 6 Phagozytoserate von *L. pneumophila* Corby, LLAP10 und *E. coli* in verschiedene Zytoskelett-Mutanten von *D. discoideum*

Mutante	Phagozytoserate (% im Vergleich zu Kontrolle)		
	<i>L. pneumophila</i>	LLAP 10	<i>E. coli</i>
AGHR2	55,71 ± 2,61*	60,05 ± 7,23*	39,91 ± 15,7*
ASP56 ⁻	62,98 ± 9,6*	45,09 ± 10,68*	97,71 ± 6,09
Comitin ⁻	118,24 ± 8,14*	109,21 ± 9,37	81,10 ± 7,29*
Coronin ⁻	63,98 ± 11,6*	66,38 ± 4,36*	46,98 ± 4,67*
Daip1 ⁻	63,75 ± 4,23*	51,97 ± 9,69*	54,38 ± 8,24*
Coronin ⁻ / Daip1 ⁻	42,32 ± 6,91*	50,67 ± 3,03*	35,22 ± 10,12*
LimC ⁻	84,82 ± 4,99	87,38 ± 7,71	99,44 ± 9,12
LimD ⁻	82,54 ± 11,4	89,59 ± 6,41	97,26 ± 11,0
LimC ⁻ /D ⁻	51,01 ± 5,4*	45,84 ± 5,41*	89,88 ± 10,1
Villidin ⁻	50,07 ± 8,28*	49,59 ± 8,33*	99,76 ± 7,59

Die dargestellten Daten entsprechen der prozentualen Phagozytoserate der *Dictyostelium*-Mutanten im Vergleich zum AX2-Wildtyp, dessen Phagozytoserate auf 100% angesetzt worden ist. Die *Dictyostelium*-Zellen wurden für 3 Stunden mit *L. pneumophila* Corby, LLAP10 und *E. coli* (MOI 50) infiziert. Es werden nur die Ergebnisse der CFU-Wert Bestimmung dargestellt, da diese genau mit denen der FACS-Analysen korrelieren. Die Sternchen kennzeichnen die Mutanten mit einem signifikanten Einfluss auf die Phagozytose der Bakterien (Student's gepaarter, zweiseitiger *t*-test; $p = 0,05$, $n = 12$).

3.2 Einfluss von Zytoskelett-Proteinen auf die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella* in *D. discoideum*

Die verschiedenen Zytoskelett-Mutanten wurden auch hinsichtlich ihres Einflusses auf die intrazelluläre Replikation von *Legionella* untersucht. Hierfür wurden die *Dictyostelium*-Zellen für drei Stunden mit *L. pneumophila* Corby infiziert. Die nicht aufgenommenen extrazellulären Bakterien wurden mit einer Gentamicin-Behandlung abgetötet. Die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella* wurde anschließend 72 Stunden beobachtet.

Mehrere Untersuchungen der Phagosombiogenese in *D. discoideum* haben gezeigt, dass am Ende der Phagosomreifung das späte nicht saure Phagosom durch die Interaktion mit Proteinen des Zytoskeletts, wie Coronin, Scar und dem Arp2/3 Komplex von Aktinfilamenten umhüllt wird [Rauchenberger *et al.*, 1997; Seastone *et al.*, 2001].

Bei der Infektion der AGHR2 Doppelnulmutante mit *Legionella* konnte festgestellt werden, dass die Stabilität des Mikrofilament-Netzwerkes von Bedeutung für die intrazelluläre Vermehrung der Bakterien ist (Abb. 14). Denn obwohl eine leichte Vermehrung innerhalb der ersten 48 Stunden beobachtet werden kann, sind nach 72 Stunden Infektion weniger intrazelluläre Bakterien als im Ausgangsinokulum vorhanden.

Die Vermehrung von *L. pneumophila* in den LimC- und LimD-Mutanten weist keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Wildtyp auf. In der Doppelnulmutante wird dagegen die Replikation der Bakterien fast vollständig unterbunden (Abb. 14). Darüber hinaus konnte eine Beteiligung des Zytoskeletts-Proteins Villidin an der intrazellulären Vermehrung von *Legionella* nachgewiesen werden (Abb. 14). Bei den obengenannten Mutanten konnte eine eindeutige Korrelation zwischen einem Aufnahmefekt und einer Beeinträchtigung der intrazellulären Vermehrung festgestellt werden.

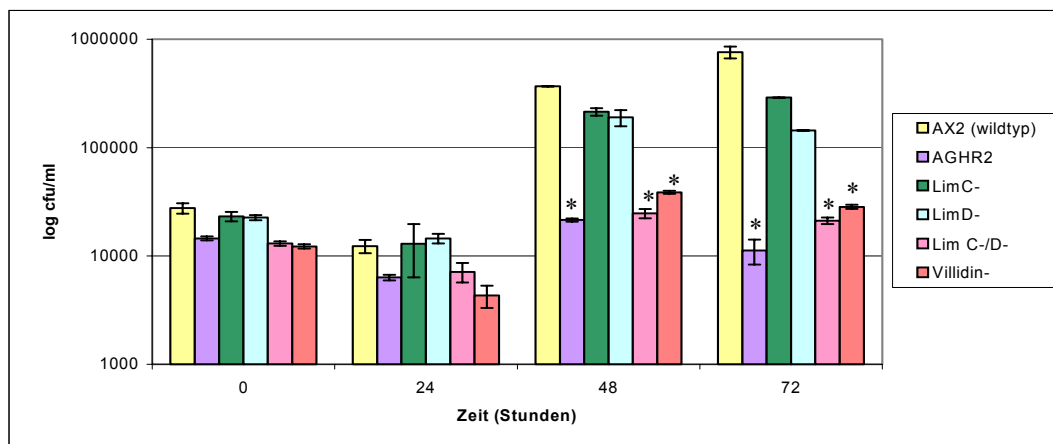


Abb. 14 Infektionskinetik von *L. pneumophila* Corby in verschiedenen *Dictyostelium*-Zytoskelett-Mutanten. Die Infektionsdauer betrug 72 Stunden. Die Zellen wurden mit einer MOI von 50 infiziert. Die dargestellten Daten sind der Mittelwert dreier voneinander unabhängiger Experimente. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der jeweiligen Messwerte. Die Sternchen kennzeichnen die Mutanten mit einem signifikanten Einfluss auf die intrazelluläre Replikation der Bakterien (Student's gepaarter, zweiseitiger *t*-test; $p = 0,05$; $n = 12$).

In der ASP56/CAP-Mutante wird dagegen die intrazelluläre Vermehrung der Bakterien vom Aufnahmefekt nicht beeinflusst. Obgleich die Phagozytoserate in der Mutante um mehr als 35% reduziert ist, weist die Bakterienzahl 72 Stunden nach Beginn der Infektion keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 15). Eine ähnliche Infektionskinetik konnte bei der *Legionella*-Infektion in der Coronin und der Coronin/DAip Doppelmutante nachgewiesen werden, wo der Aufnahmefekt nicht im Zusammenhang mit der intrazellulären Replikation der Bakterien steht (Abb. 15). So findet in beiden Mutanten nach 72 Stunden Infektion eine Vermehrung von 3 log-Stufen statt. Weiterhin hat die

Deletion des *comitin*-Gens einen positiven Einfluss sowohl auf die Aufnahme als auch auf die Replikation der Legionellen. Demnach werden nach 72 Stunden Infektion höhere Kolonienzahlen in der Mutante als im Wildtyp erreicht (Abb. 15). Das F-Aktin fragmentierende Protein DAip1 ist sowohl an der Phagozytose als auch an der intrazellulären Vermehrung von *L. pneumophila* beteiligt. Nach 48 und 72 Stunden Infektion in der DAip1-Mutante kann eine signifikante Reduktion der Kolonienzahlen im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden (Abb. 15).

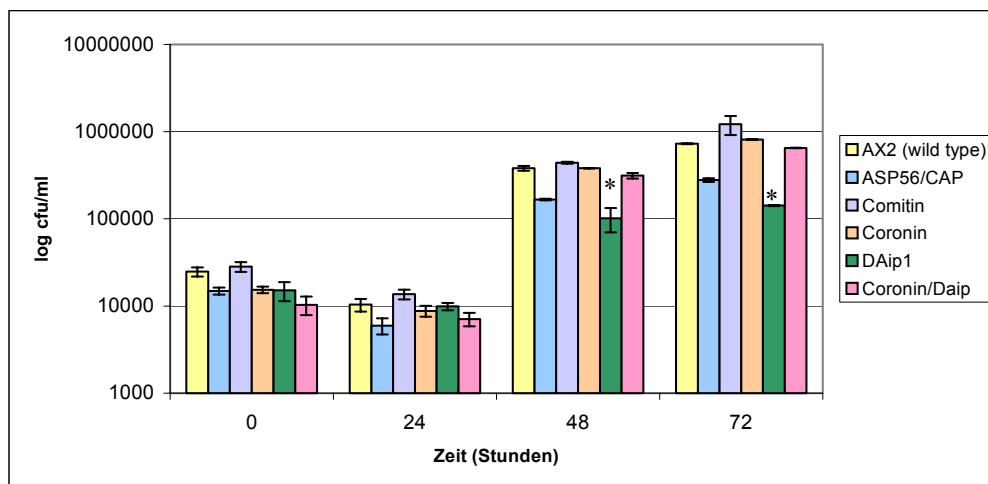


Abb. 15 Infektionskinetik von *L. pneumophila* Corby in verschiedenen *Dictyostelium*-Zytoskelett-Mutanten über eine Infektionsdauer von 72 Stunden. Die Zellen wurden mit einer MOI von 50 infiziert. Die dargestellten Daten sind der Mittelwert dreier voneinander unabhängiger Experimente. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der jeweiligen Messwerte. Die Sternchen kennzeichnen die Mutanten mit einem signifikanten Einfluss auf die intrazelluläre Replikation der Bakterien (Student's gepaarter, zweiseitiger *t*-test; $p = 0,05$, $n = 12$).

3.3 Einfluss verschiedener Regulationsproteine auf die Phagozytose von *Legionella* in *Dictyostelium*

3.3.1 G-Protein-vermittelte Signalgebung ist an der Aufnahme von *Legionella* beteiligt

Heterotrimere G-Proteine sind ein Bindeglied zwischen den Rezeptoren auf der Zelloberfläche und den, an der Signaltransduktion beteiligten Enzymen der Plasma-membran. Sie bestehen aus einer katalytischen α -Untereinheit und regulatorischen β - und γ -Untereinheiten. Die Aktivierung des Rezeptors durch einen extrazellulären Liganden führt zur Bindung von GTP und zur Dissoziation der α -Untereinheit von den regulatorischen Untereinheiten [Offermanns, 2003]. In *D. discoideum* sind bislang 11 verschiedene α -Untereinheiten, eine $G\beta$ -Untereinheit und eine $G\gamma$ -Untereinheit isoliert worden [van Es und Devreotes, 1999]. Folglich führt die Deletion der $G\beta$ -Untereinheit zu einem nicht

funktionalen G-Protein [Jin *et al.*, 1998]. G β -Mutanten weisen einen Chemotaxis- und Entwicklungsdefekt, und ein verlangsamtes Wachstum auf Bakterienrasen auf. Letzteres beruht auf die Unfähigkeit der Mutanten das Aktinzytoskelett zu einem „phagocytic cup“ zu reorganisieren [Peracino *et al.*, 1998]. In der Abb. 16 ist deutlich zu erkennen, dass G β -Mutanten (LW6) nach drei Stunden Infektion mit *L. pneumophila* Corby 61,66% weniger Bakterien aufnehmen können als der Wildtyp. Die Phagozytose von LLAP10 zeigt mit einer um ca. 80% reduzierten Aufnahme den stärksten Defekt, der sich jedoch nicht auf die Gattung *Legionella* beschränkt, denn auch *E. coli* werden in der Mutante 57,41% schlechter aufgenommen als im Wildtyp. Die Deletion der α 2-Untereinheit (Myc2) hat dagegen keinen Einfluss auf die phagozytotische Aktivität von *D. discoideum* (Abb. 16).

PiaA ist ein 130-kDa zytosolisches Protein, beteiligt an der G-Protein vermittelten Signalgebung [Chen *et al.*, 1997]. Es dient der Adenylatzyklase (ACA) Regulation, die als Antwort auf extrazelluläre Signale, wie Hormone oder Chemokine, jeweils stimuliert oder inhibiert wird [Gilman, 1987; Linder und Schultz, 2003]. In *Candida albicans* ist die ACA-vermittelte Signalgebung unentbehrlich für das Wachstum der Hyphen und die Virulenz [Rocha *et al.*, 2001]. In *D. discoideum* tragen sie zur Regulation des Differenzierungsprozesses bei [Kriebel und Parent, 2004]. Eine Beteiligung der ACA an der Phagozytose ist bislang nicht beschrieben worden. Nach drei Stunden Infektion der PiaA-Mutante (HSB1) mit *L. pneumophila* Corby konnte eine signifikante Reduktion der Phagozytoserate im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden (Abb. 16). Es handelt sich hierbei um einen spezifischen Defekt in der Aufnahme von *L. pneumophila*, da eine Beeinträchtigung der Aufnahme der anderen Bakterien ausgeschlossen werden konnte.

Die Aktivierung der ACA bewirkt einen Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration, was wiederum zu der Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) führt. Diese hoch konservierte Proteinkinase phosphoryliert eine Vielzahl von Proteinen, um so ihre Funktion zu regulieren [Loomis, 1998]. Im Ruhezustand wird das Protein, durch die Assoziation der regulatorischen Untereinheit (PKA-R) mit der katalytischen Untereinheit (PKA-C), inaktiviert. Eine intrazelluläre cAMP-Konzentration höher als 100nM führt zur Aktivierung der PKA. In *D. discoideum* ist die Aktivierung von PKA unentbehrlich für den Übergang der Zellen in die Differenzierungsphase [Pupillo *et al.*, 1992; Primpke *et al.*, 2000]. Um die Rolle der PKA bei der Phagozytose zu untersuchen wurde eine PKA-R Mutante, die nicht in der Lage ist cAMP zu binden, mit *L. pneumophila*, LLAP10 und *E. coli* infiziert. Eine

Beteiligung der PKA bei der Phagozytose dieser Bakterien konnte jedoch ausgeschlossen werden (Abb. 16).

Bei der Untersuchung der G-Protein-vermittelten-Signalgebung konnte eine Mutante isoliert werden, die einen ähnlichen Phänotyp wie die G β -Mutante aufweist. Der beobachtete Phänotyp ist auf die Deletion des *yakA*-Gens, ein *Dictyostelium*-Homolog der Dyrk-Kinasen von Säugerzellen, zurückzuführen [Souza *et al.*, 1998; van Es *et al.*, 2001]. Die YakA-Mutanten, wie G β -Mutanten, sind nicht in der Lage den Differenzierungsprozess einzuleiten und bilden nur kleine Kolonien auf Bakterienrasen [van Es *et al.*, 2001]. YakA-Mutanten nehmen nach drei Stunden Koinkubation mit *L. pneumophila* und *E. coli* 49,69% beziehungsweise 55,40% weniger Bakterien auf als der Wildtyp. Dies entspricht der Phagozytoserate von G β -Mutanten. Bei der Infektion der YakA-Mutante mit LLAP10 wird eine signifikante Reduktion der Phagozytoserate beobachtet, die jedoch geringer als bei der G β -Mutante ausfällt (Abb. 16).

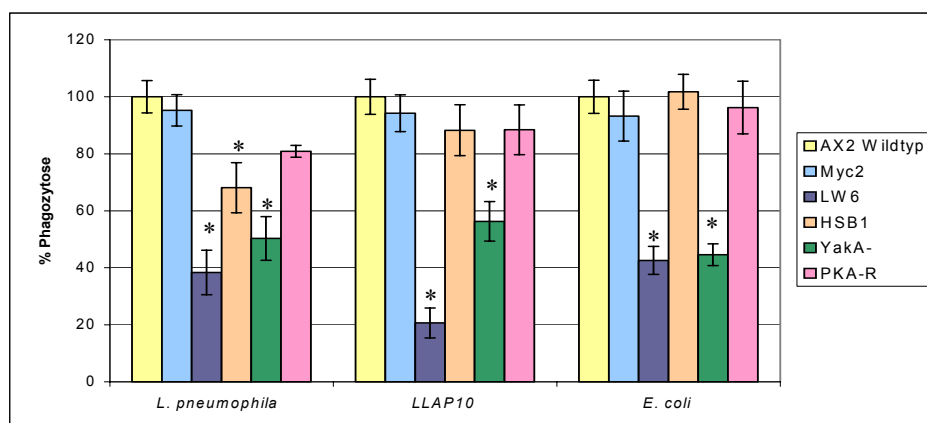


Abb. 16 Prozentuale Phagozytoserate der *Dictyostelium*-Mutanten nach drei Stunden Inkubation mit *L. pneumophila* Corby, LLAP10 oder *E. coli*. Die Bakterien wurden im Verhältnis 50:1 zu den Zellen gegeben. Die Phagozytoserate des Wildtyps wurde mit 100% angesetzt. Die dargestellten Daten sind der Mittelwert dreier unabhängiger Experimente; die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der jeweiligen Messwerte. Die Sternchen kennzeichnen die Mutanten mit einem signifikanten Einfluss auf die Phagozytose der Bakterien (Student's gepaarter, zweiseitiger *t*-test; $p = 0,05$, $n = 12$).

3.2.2 Einfluss von Ca²⁺-bindenden Proteine auf die Aufnahme von *Legionella*

Änderungen in der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration dienen der Regulation mehrerer zellulärer Prozesse, wie Wachstum, Phagozytose oder Apoptose. Dabei stellt das ER die wichtigste Ca²⁺-Quelle für die Ca²⁺-Signalgebung dar. Die exakte Steuerung der Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER erfolgt über eine Vielzahl von Ca²⁺-Transport- und Speicherproteinen [Hajnoczky *et al.*, 2000]. Calreticulin (CRT) und Calnexin (CNX) sind ubiquitäre Ca²⁺-Speicher-Proteine des ERs, die als molekulare Chaperone zur korrekten Faltung von Glykoproteinen beitragen [Ritter und Helenius,

2000]. Darüber hinaus reguliert CRT die Ca^{2+} -Speicherkapazität des ERs und folglich die Ca^{2+} -Homeostase der Zelle [Michalak *et al.*, 1998a].

Die Deletion des *cnx*-Gens *CNE1* in *Saccharomyces cerevisiae* führt zu einer erhöhten Sekretion unreifer Glykoproteine [Arima *et al.*, 1998]. In *Schizosaccharomyces pombe* ist das CNX-Homolog unentbehrlich für die Überlebensfähigkeit der Zellen [Parlati *et al.*, 1995]. Die Deletion des *crt*-Gens ist im Mausembryo ebenfalls letal [Mesaeli *et al.*, 1999]. In *D. discoideum* weist die individuelle Deletion der *cnx*- oder *crt*-Gene keinen veränderten Phänotyp auf. Bei der Doppelnull-Mutante beider Proteine konnte dagegen eine deutlich reduzierte Phagozytoserate beobachtet werden [Müller-Taubenberger *et al.*, 2001].

Bei der Infektion der CNX- und CRT-Mutanten mit *E. coli* konnte, wie in der Literatur beschrieben, keine signifikante Veränderung der Phagozytoserate im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden (Abb. 17). Bei der Aufnahme von *L. pneumophila* konnte hingegen ein *Legionella*-spezifischer Defekt bei den einzelnen Mutanten nachgewiesen werden. Nach drei Stunden Infektion mit *L. pneumophila* werden in der CNX-Mutante 33,61% weniger Bakterien internalisiert als im Wildtyp. Auch die Phagozytoserate von LLAP10 weist eine Reduktion von 44,38% auf. In der CRT-Mutante ist die Beeinträchtigung der phagozytischen Aktivität noch deutlicher zu erkennen. Nach drei Stunden Inkubation mit *L. pneumophila* Corby werden im Vergleich zum Wildtyp nur 43,34% der Bakterien aufgenommen. Die Phagozytose von LLAP10 wird in der CRT-Mutante fast vollständig unterbunden (Abb. 17).

Synexin ist ein weiteres Ca^{2+} -bindendes Protein, welches zur Familie der strukturell verwandte Annexine gehört. Annexine sind in der Lage in Gegenwart von Ca^{2+} saure bzw. anionische Phospholipide zu binden [Raynal und Pollard, 1994]. Weiterhin besitzt Synexin eine spannungsregulierte Ca^{2+} -Kanalaktivität *in vitro*, wodurch die Ca^{2+} -Homeostase der Zelle beeinflusst werden kann [Gerke und Moss, 2002]. Die Deletion des *synexin*-Gens hat auf dem ersten Blick keinerlei Auswirkungen auf den Phänotyp der *Dictyostelium*-Zellen. Wird jedoch das extrazelluläre Medium mit 1 - 3 mM EGTA versetzt, kann eine signifikante Reduktion im Wachstum, in der Sekretion von Enzymen und in der Motilität der Synexin-minus Zellen beobachtet werden [Döring *et al.*, 1995].

Wie in der Abb. 17 dargestellt, wird die Phagozytose von *E. coli* von der Deletion des *synexin*-Gens nicht beeinflusst. Auch die Aufnahme von *L. pneumophila* zeigt keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Wildtyp. Bei der Aufnahme von LLAP10 konnte hingegen eine Reduktion von 31,22% beobachtet werden.

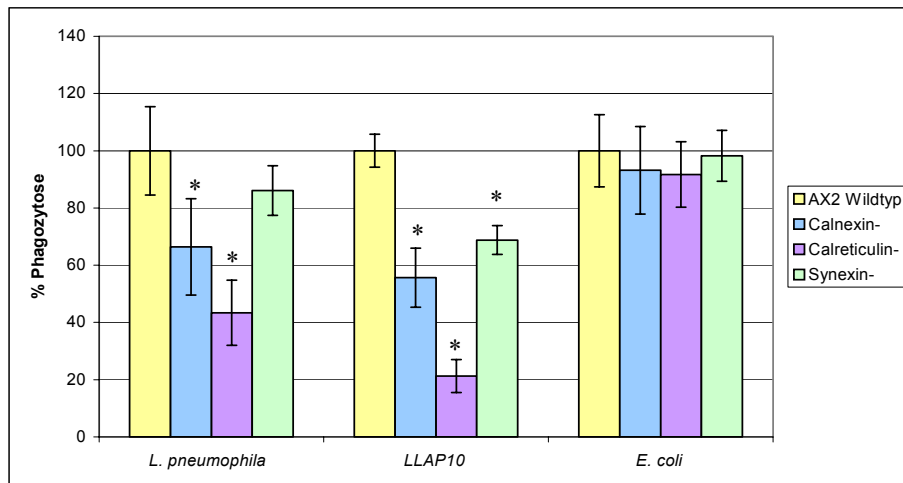


Abb. 17 Prozentuale Phagozytoserate der *Dictyostelium*-Mutanten nach drei Stunden Inkubation mit *L. pneumophila* Corby, LLAP10 oder *E. coli*. Die Bakterien wurden im Verhältnis 50:1 zu den Zellen gegeben. Die Phagozytoserate des Wildtyps wurde mit 100% angesetzt. Die dargestellten Daten sind der Mittelwert dreier unabhängiger Experimente; die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der jeweiligen Messwerte. Die Sternchen kennzeichnen die Mutanten mit einem signifikanten Einfluss auf die Phagozytose der Bakterien (Student's gepaarter, zweiseitiger *t*-test; $p = 0,05$, $n = 12$).

3.4 Einfluss verschiedener Regulationsproteine auf die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella* in *D. discoideum*

Bei der Messung der Phagozytoserate konnte deutlich gezeigt werden, dass die G-Protein-vermittelte Signalgebung für die Aufnahme von *L. pneumophila* erforderlich ist (siehe 3.2.1). Die Untersuchung der *Legionella*-Infektion in der LW6-Mutante zeigt, dass ein funktionsfähiges G-Protein auch für die intrazelluläre Vermehrung der Bakterien von Bedeutung ist (Abb. 18). Die intrazelluläre Replikation der Bakterien wird in den LW6-Mutanten unterbunden, obgleich kein Abbau der Bakterien stattfindet. So entspricht die Bakterienanzahl 72 Stunden nach Beginn der Infektion der Bakterienanzahl des Ausgangsinokulums. Eine Beteiligung der $\alpha 2$ -Untereinheit der G-Proteine, der PiaA- und der YakA-Proteine auf die intrazelluläre Replikation von *L. pneumophila* konnte hingegen ausgeschlossen werden. Nach 72 Stunden Infektion kann in allen drei Mutanten eine Vermehrungsrate von ca. 2 log-Stufen nachgewiesen werden (Abb. 18).

Die Aktivität der cAMP-abhängigen PKA ermöglicht den Eintritt der *Dictyostelium*-Zellen in die Differenzierungsphase. Überraschenderweise ist die PKA-Aktivität auch für die späte Infektion von *L. pneumophila* in *D. discoideum* von Bedeutung. Die Legionellen können sich bis 48 Stunden nach Beginn der Infektion in der PKA-R- Mutante vermehren, werden jedoch innerhalb der nächsten 24 Stunden von Wirt abgebaut (Abb. 18).

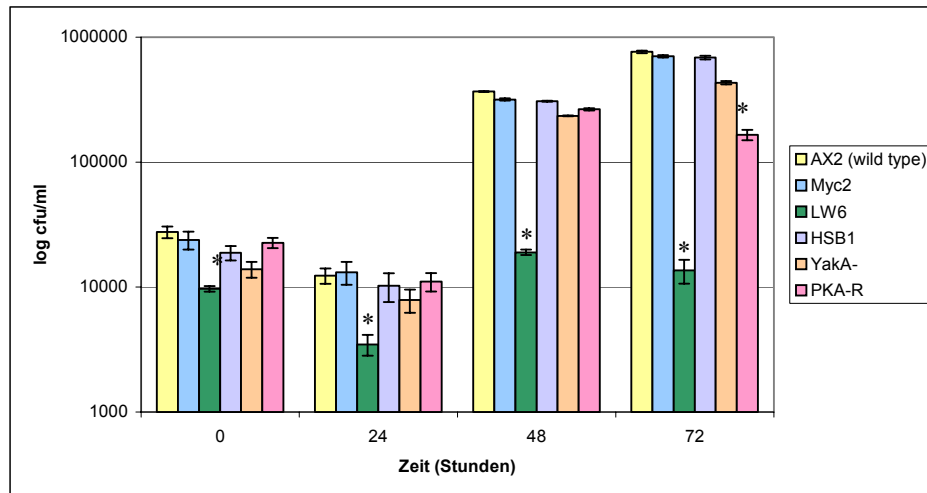


Abb. 18 Infektionskinetik von *L. pneumophila* Corby in verschiedenen *Dictyostelium*-Mutanten über eine Infektionsdauer von 72 Stunden. Die Zellen wurden mit einer MOI von 50 infiziert. Die dargestellten Daten sind der Mittelwert dreier voneinander unabhängiger Experimente. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der jeweiligen Messwerte. Die Sternchen kennzeichnen die Mutanten mit einem signifikanten Einfluss auf die intrazelluläre Replikation der Bakterien (Student's gepaarter, zweiseitiger *t*-test; $p = 0,05$, $n = 12$).

Fünf Minuten nach Beginn der Infektion in Makrophagen wird das *Legionella*-Phagosom vom Bestandteilen des RER und zahlreichen Mitochondrien umgeben [Horwitz, 1983; Tilney *et al.*, 2001]. Roy und Kollegen haben postuliert, dass *Legionella* mit Hilfe des Dot/Icm Sekretionssystems eine Strategie entwickelt hat, um in das ER-Lumen einzudringen und somit die Phagolysosom-Fusion zu unterbinden [Kagan und Roy, 2002; Roy und Tilney, 2002].

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass sowohl das lumenale ER-Protein Calreticulin, als auch das Transmembranprotein Calnexin, für die intrazelluläre Replikation von *Legionella* notwendig sind. Bereits 24 Stunden nach Beginn der Infektion mit *L. pneumophila* Corby, kann eine signifikante Reduktion der Bakterienanzahl in der CRT-Mutante beobachtet werden (Abb. 19). 72 Stunden Post-Infektion beträgt die Vermehrungsrate der Bakterien lediglich eine halbe log-Stufe. In der CNX-Mutante tritt der Wachstumsdefekt erst 48 Stunden nach Beginn der Infektion auf, und führt zu einer signifikanten Reduktion der Kolonienzahlen im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 19).

Eine Beeinträchtigung der späten Phase der Infektion mit *L. pneumophila* Corby kann bei der Synexin-Mutante beobachtet werden. Folglich tritt eine signifikante Reduktion in der Anzahl der Bakterien erst 72 Stunden nach Beginn der Infektion auf (Abb. 19)

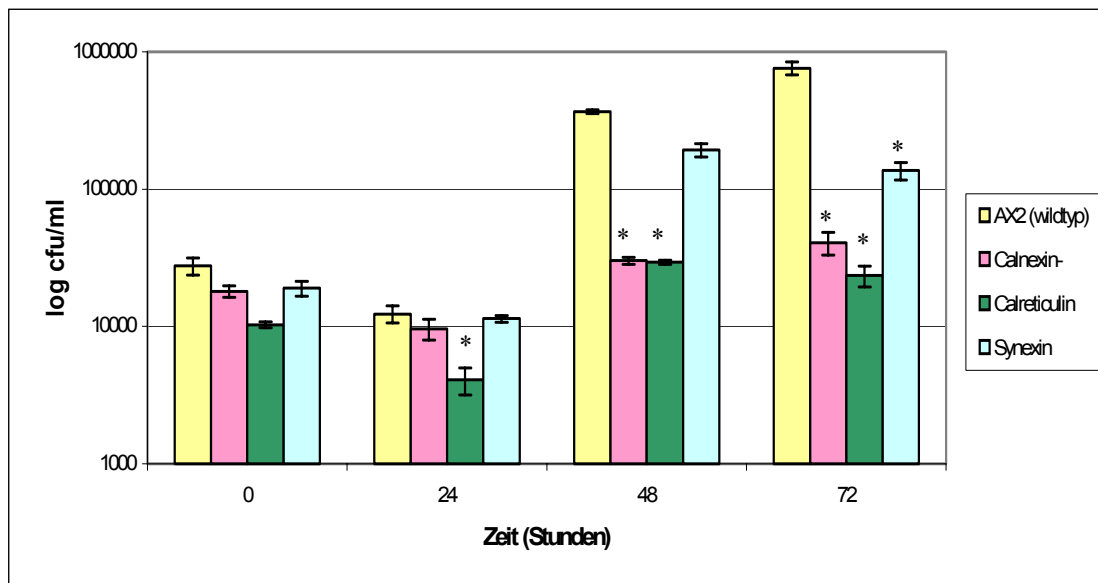


Abb. 19 Infektionskinetik von *L. pneumophila* Corby in verschiedenen *Dictyostelium*-Mutanten über eine Infektionsdauer von 72 Stunden. Die Zellen wurden mit einer MOI von 50 infiziert. Die dargestellten Daten sind der Mittelwert dreier voneinander unabhängiger Experimente. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der jeweiligen Messwerte. Die Sternchen kennzeichnen die Mutanten mit einem signifikanten Einfluss auf die intrazelluläre Replikation der Bakterien (Student's gepaarter, zweiseitiger *t*-test; $p = 0,05$, $n = 12$).

3.5 Zusammenfassung

Der Einfluss der verschiedene Zytoskelett- und Regulationsproteine auf die Infektion von *L. pneumophila* Corby in *D. discoideum* wird in der Tabelle 6 zusammengefasst. Hierfür wurde der Verlauf der Infektion in drei Phasen aufgeteilt. Die Aufnahme entspricht dem 0-Stunden-Wert der Infektion. Beim intrazellulären Wachstum wurde der Zeitraum zwischen 24 und 48 Stunden berücksichtigt und bei der späten Infektion handelt es sich um die intrazelluläre Replikation der Bakterien 48 - 72 Stunden nach Beginn der Infektion. Das + kennzeichnet die Mutanten mit einem signifikanten Einfluss auf die jeweilige Phase der Infektion (Student's gepaarter, zweiseitiger *t*-test; $p = 0,05$, $n = 12$).

Tabelle 6 Zusammenfassung der Effekte verschiedener *Dictyostelium* AX2 Zytoskelett- und Regulationsmutanten auf die Infektion von *L. pneumophila* Corby.

Mutante	Phase 1: Aufnahme	Phase 2: Intrazelluläres Wachstum	Phase 3: Späte Infektion
AB (PKA-R)	-	-	+
AGHR	+	+	+
ASP56/CAP	+	-	-
Calnexin ⁻	+	+	+
Calreticulin ⁻	+	+	+

Comitin ⁻	+	-	-
Coronin ⁻	+	-	-
Coronin / Daip1 ⁻	+	-	-
Daip1 ⁻	+	-	-
HSB 1 (PiaA ⁻)	+	-	-
LimC ⁻	-	-	-
LimD ⁻	-	-	-
LimC ⁻ /D ⁻	+	+	+
LW6 (Gβ ⁻)	+	+/-	-
Myc2 (Gα ⁻)	-	-	-
Synexin ⁻	-	-	+
Villidin ⁻	+	+	+
YakA ⁻	+	-	-

4 Lokalisierung verschiedener GFP-markierter Proteine während der *Legionella*-Infektion

Die Analyse der Aufnahme und intrazellulären Vermehrung von *L. pneumophila* in gut charakterisierten *Dictyostelium*-Mutanten konnte Aufschluss über die Beteiligung einiger Zytoskelett- und Regulationsproteine am Infektionsprozess geben. Die Fusionierung einiger dieser Proteine mit dem Markerprotein GFP (green fluorescent protein), ermöglicht zudem ihre *in vivo* Visualisierung. Dieses nützliche zellbiologische Werkzeug, wurde in dieser Arbeit für die Untersuchung der Expression und Lokalisierung von Wirtsproteinen während der *Legionella*-Infektion in *D. discoideum* eingesetzt.

Aus der Literatur ist bekannt, dass während der Phagozytose von Hefepartikeln in *D. discoideum* eine deutliche Anreicherung von Coronin an den „phagocytic cups“ stattfindet [Maniak *et al.*, 1995]. Das Protein wird gleich nach dem ersten Kontakt der Partikel mit der Zelle zu den „phagocytic cups“ rekrutiert und nach der Internalisierung schnell vom Phagosom entfernt.

Bei der Infektion von *L. pneumophila* Corby in *D. discoideum* konnte ebenfalls eine starke Anreicherung von Coronin-GFP an den Bindungsstellen der Bakterien beobachtet werden (Abb. 20). Anschließend, und in Analogie zum Verlauf der Phagozytose von Hefepartikeln, wird das Protein innerhalb kurzer Zeit von Phagosom abgetrennt. Eine Anreicherung des Proteins im *Legionella*-Phagosom konnte nicht beobachtet werden.

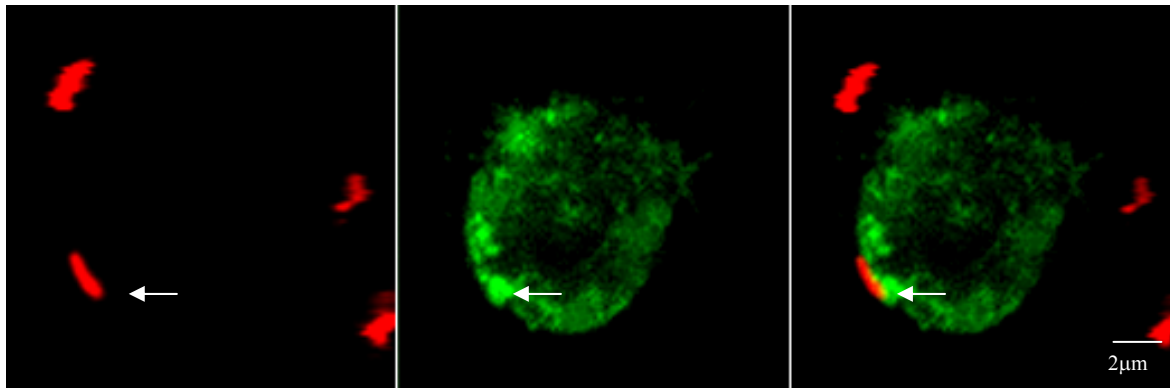


Abb. 20 Assoziation des Coronin-GFP Proteins mit *L. pneumophila*. Die *Dictyostelium*-Zellen, welche Coronin-GFP exprimieren wurden mit *L. pneumophila* Corby infiziert (MOI = 10). Nach 30 min Infektion wurden die Zellen im Konfokalen Laser-Scanning Mikroskop beobachtet. Das linke Bild zeigt die rote Fluoreszenz der mit Rhodamin-gefärbten Legionellen. Das mittlere Bild zeigt die grüne Fluoreszenz des GFP-markierten Coronins, und das rechte Bild zeigt eine Zusammenführung beider Bilder.

Innerhalb der Zelle ermöglicht das Mikrotubuli-Netzwerk die organisierte Bewegung von Vesikeln. Die Mikrotubuli, bestehend aus Tubulin-Dimeren, werden ständig polymerisiert und depolymerisiert, um den kontinuierlichen Vesikeltransport im Zellinneren durchführen zu können. Die zellpermeable Substanz Colchicin inhibiert die Mikrotubuli-Polymerisation indem es fest an den Tubulin-Dimeren bindet. Die durch Colchicin hervorgerufene Destabilisierung der Mikrotubuli hatte jedoch keinen Einfluss auf die Phagozytose von *Legionella* in *D. discoideum* (siehe 2.1). Die Untersuchung der *L. pneumophila* Infektion in einer Tubulin-GFP exprimierende *Dictyostelium*-Zelle sollte dieses Ergebnis bestätigen.

Wie erwartet konnte weder beim ersten Kontakt der Bakterien mit der Zelle, noch bei der Bildung des „phagocytic cups“ eine Beteiligung der Mikrotubuli nachgewiesen werden (Abb. 21). Demgegenüber konnte im weiteren Verlauf der Infektion eine Kolo-kalisation von Tubulin mit dem *Legionella*-Phagosom beobachtet werden.

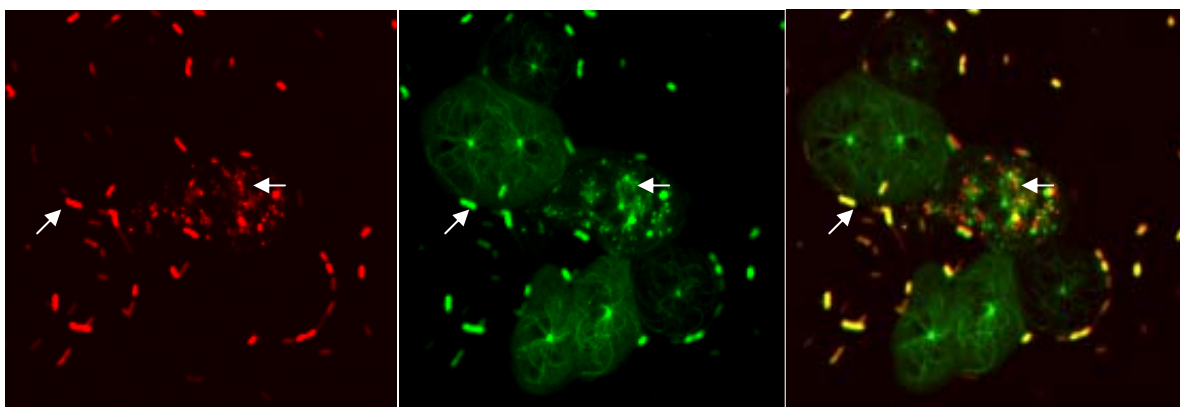


Abb. 21 Infektion von Tubulin-GFP exprimierenden *Dictyostelium*-Zellen mit *L. pneumophila* Corby. Die Zellen wurden mit Bakterien im Verhältnis 1:10 infiziert. Nach 1 Stunde Inkubation wurden die Zellen im Konfokalen Laser-Scanning Mikroskop beobachtet. Das linke Bild zeigt die rote Fluoreszenz der mit Rhodamin-gefärbten Bakterien. Das mittlere Bild zeigt die grüne Fluoreszenz des GFP-markierten Tubulins und das rechte Bild zeigt die Zusammenführung beider Bilder.

Unentbehrlich für das Überleben von *L. pneumophila* in ihren eukaryotischen Wirten ist die Umwandlung des Phagosoms in einer spezialisierten Vakuole, die sich der Phagolysosomen-Fusion entzieht. Wesentlich hierfür ist die Assoziation des *Legionella*-Phagosoms mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER) der Wirtszelle [Kagan und Roy, 2002; Robinson und Roy, 2006]. Der Zeitpunkt der ersten Interaktion mit dem ER während der Infektion bleibt allerdings umstritten [Kagan und Roy, 2002; Derré und Isberg, 2004].

In Makrophagen tragen die ER-Membranen möglicherweise zur konventionellen Phagozytose bei [Gagnon *et al.*, 2002]. In *D. discoideum* sind die ER-Proteine Calreticulin (CRT) und Calnexin (CNX) an der Bildung des „phagocytic cups“ beteiligt [Müller-Taubenberger *et al.*, 2001]. Die Deletion dieser Proteine führt ausserdem zu einer signifikanten Reduktion in der Aufnahmerate von *L. pneumophila* (siehe 3.5). Die Fusion der ER-Chaperone CNX und CRT mit dem Markerprotein GFP ermöglicht die Untersuchung der Dynamik des ERs während der Phagozytose von *Legionella*. Hierfür wurden im konfokalen Mikroskop Bilderreihen von *Dictyostelium*-Zellen aufgenommen, die CNX-GFP oder GFP-CRT exprimieren.

In Abb. 22A kann in den Phasenkontrastaufnahmen die Bildung des „phagocytic cups“ beobachtet werden. Dabei erstrecken sich Pseudopodien um das Bakterium, die es schliesslich komplett umhüllen. Abb. 22B zeigt die dazugehörigen Fluoreszenzbilder von GFP-markierten CNX. Das Protein wird spezifisch in die „outgrowing arms“ akkumuliert.

Eine ähnliche Dynamik zeigt das GFP-markierte CRT während der Aufnahme von *L. pneumophila*. Gezeigt wird die Phagozytose des Bakteriums in der Phasenkontrastbildserie (Abb 22C) und die spezifische Rekrutierung des grün-fluoreszierenden Proteins im „phagocytic cup“ (Abb 22D).

Müller Taubenberger *et al.* [2001] konnten ausserdem feststellen, dass bei der Internalisierung von Hefepartikeln oder *E. coli* die Assoziation des Phagosoms mit dem ER nur vorübergehend ist. Bereits 30 Sekunden nach der Aufnahme der Partikel konnten die ER-Proteine nicht mehr in der Nähe des Phagosoms nachgewiesen werden. Zu späteren Zeitpunkten fanden nur kurzfristige Assoziationen des Phagosoms mit dem GFP-markierten Proteinen statt.

Zur Kontrolle wurde in dieser Arbeit ebenfalls die Lokalisierung von CRT und CNX bei der Internalisierung von *E. coli* untersucht (Abb. 23A und C). Wie in der Literatur beschrieben nehmen beide Proteine an der Bildung des „phagocytic cups“ teil. Innerhalb kürzester Zeit werden jedoch beide Proteine vom Phagosom entfernt.

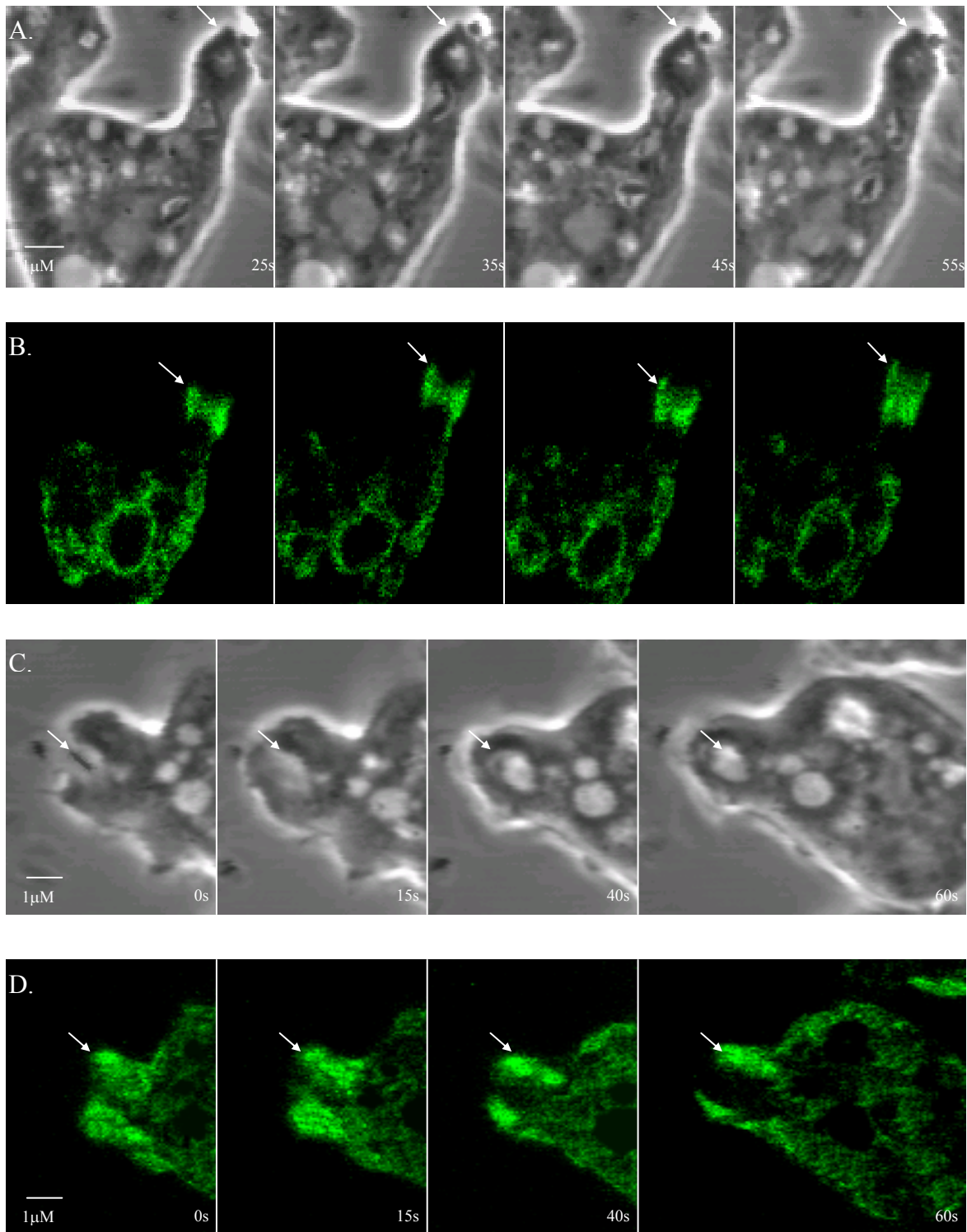


Abb. 22 Assoziation von CNX-GFP und CRT-GFP mit dem „phagocytic cup“ während der Aufnahme von *L. pneumophila* Corby. Die *Dictyostelium*-Zellen wurden mit den Bakterien im Verhältnis 1:10 infiziert. Die Zellen wurden gleich nach der Zugabe der Bakterien am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop beobachtet. Die Bilder wurden alle 10 oder 15 Sekunden aufgenommen. Die Phasenkontrastaufnahmen zeigen die Bildung des „phagocytic cups“ und die Fluoreszenzbilder der GFP-markierter Proteine zeigen die spezifische Rekrutierung der Proteine zu den „outgrowing arms“.

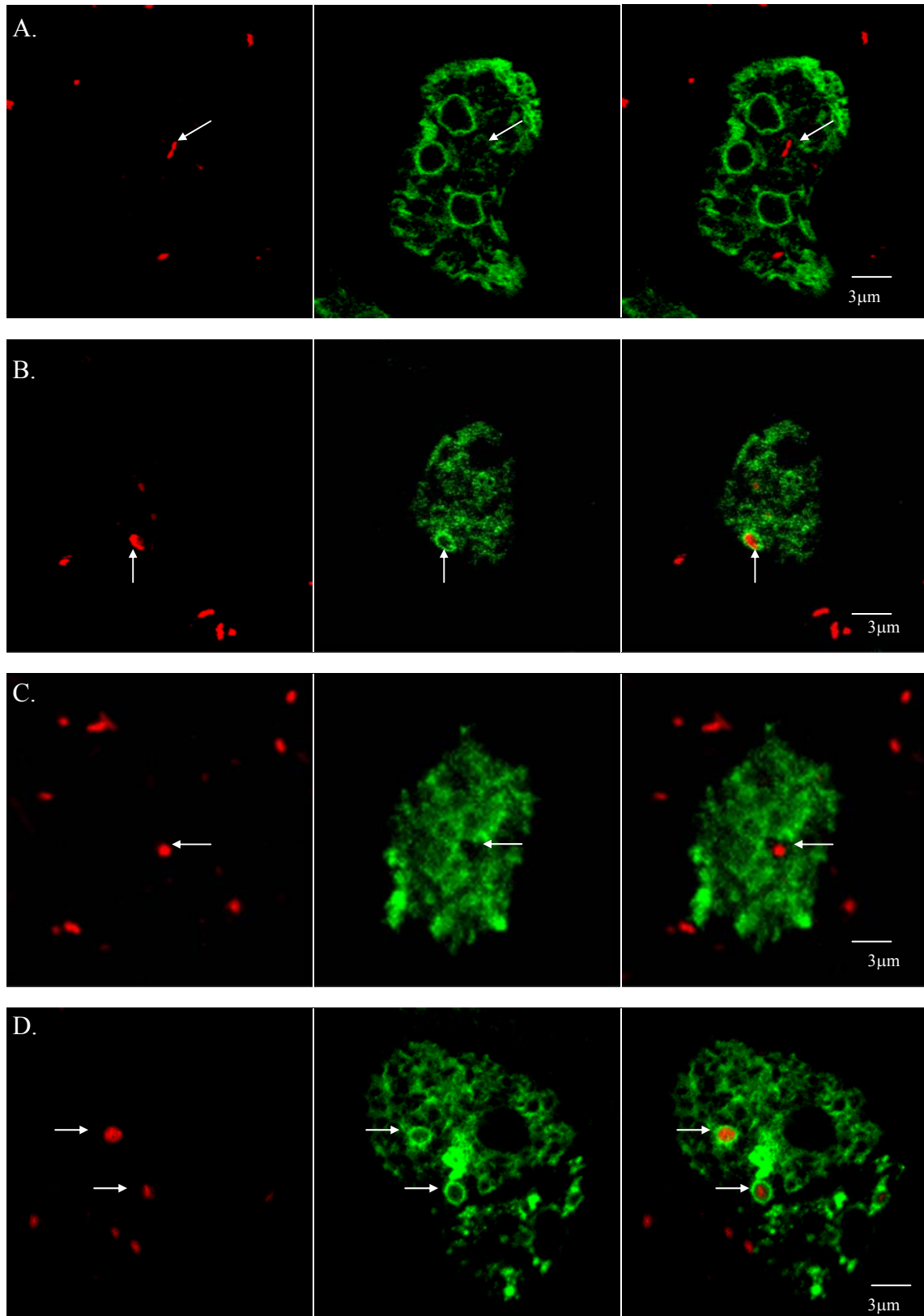


Abb. 23 Assoziation der CNX-GFP (B) und CRT-GFP (D) Proteine mit dem *L. pneumophila*-Phagosom. Die GFP-markierten *Dictyostelium*-Zellen wurden mit *L. pneumophila* Corby und *E. coli* im Verhältnis 1:10 infiziert. Das linke Bild zeigt die rote Fluoreszenz der mit Rhodamin-gefärbten Bakterien. Das mittlere Bild zeigt die grüne Fluoreszenz des GFP-markierten Proteins, und das rechte Bild zeigt die Zusammenführung beider Bilder. Abb. 23 A und C zeigt die Infektion der *Dictyostelium*-Zellen mit *E. coli*. Abb. 23 B und D zeigt die Infektion mit *L. pneumophila*. Hier kann eine Assoziation beider Proteine mit dem *Legionella*-Phagosom beobachtet werden.

Abb. 23A zeigt eine CNX-GFP exprimierende *Dictyostelium*-Zelle 30 min nach der Zugabe von *E. coli*. Wie bereits erwähnt besteht keine Assoziation des Proteins mit dem *E. coli*-Phagosom. Dasselbe Ergebnis ergab die Beobachtung des Phagosoms in einer CRT-GFP exprimierenden *Dictyostelium*-Zelle (Abb. 23).

Im Gegensatz dazu besteht bei der Infektion mit *L. pneumophila* Corby eine dauerhafte Assoziation von CNX und CRT mit dem Phagosom. Abb 23 zeigt ein *Legionella*-Phagosom, das 30 min nach Beginn der Infektion vollständig von CNX-GFP umhüllt wird. Auch während der Vermehrung der Bakterien bleibt das Protein mit dem Phagosom assoziiert. Die Untersuchung einer CRT-GFP exprimierenden *Dictyostelium*-Zelle zum selben Zeitpunkt beweist, dass alle aufgenommenen Bakterien sich in Phagosomen befinden die mit dem ER-Lumen verbunden sind (Abb 23A,B,C,D).

Die Beteiligung des ERs an der *Legionella*-Infektion wurde durch die Quantifizierung der mit CNX-GFP oder CRT-GFP assoziierten Phagosomen über einen längeren Zeitraum verfolgt (Abb. 24).

Gleich nach der Zugabe von *L. pneumophila* zu den *Dictyostelium*-Zellen wurden im konfokalen Mikroskop Bilderreihen aufgenommen und jede Stunde mindestens 40 Phagosomen auf ihre Assoziation mit den ER-Proteinen untersucht.

In den ersten 60 min Koinkubation nimmt CRT bei 77% der beobachteten Zellen an der Aufnahme der Bakterien teil. Im selben Zeitraum beteiligt sich CNX in 65% der Fälle an der Bildung des „phagocytic cups“. Es handelt sich dabei um eine dauerhafte Assoziation der ER-Proteine mit dem *Legionella*-Phagosom, die auch 12 Stunden nach Beginn der Infektion nachgewiesen werden kann. Zu diesem Zeitpunkt werden durchschnittlich 86% aller beobachteten Phagosomen von CRT und ca. 71% von CNX umhüllt.

Bei der Phagozytose von *E. coli* in *D. discoideum* konnte bei ca. 90% der Zellen eine Rekrutierung der ER-Proteine zu den „phagocytic cups“ nachgewiesen werden. Die Assoziation mit dem *E. coli*-Phagosom findet jedoch fast ausschliesslich während der Aufnahme statt. Eine langanhaltende Verbindung von CRT oder CNX mit dem *E. coli*-Phagosom konnte in keinem Fall beobachtet werden. Durch die Abnahme der Bakterien im extrazellulären Medium nimmt auch die phagozytische Aktivität der *Dictyostelium*-Zellen ab. Nach 5 Stunden Koinkubation konnten keine ER-Proteine in der Nähe des *E. coli*-Phagosoms nachgewiesen werden (Abb. 24).

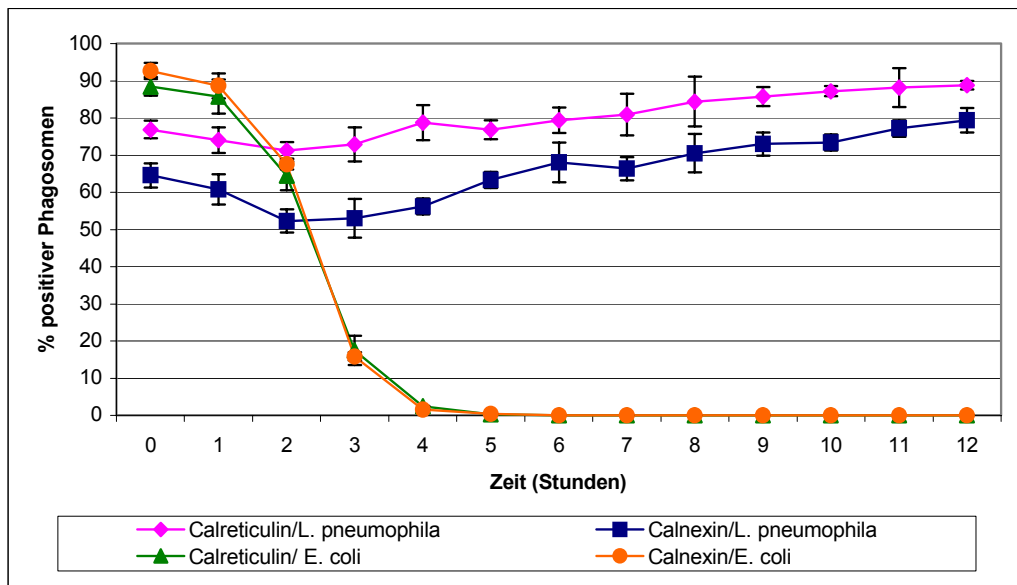


Abb. 24 Anzahl der mit CRT oder CNX assoziierten *Legionella*- oder *E. coli*-Phagosomen im Verlauf der Infektion. Die Bakterien wurden im Verhältnis 10:1 zu den Zellen gegeben. Die dargestellten Daten sind der Mittelwert dreier voneinander unabhängiger Experimente in denen mindestens 40 Phagosomen für jede Bedingung und Zeitpunkt gezählt wurden. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der jeweiligen Messwerte.

Unmittelbar nach der Aufnahme werden zu den *Legionella*-Phagosomen frühe Sekretionsvesikeln rekrutiert die normalerweise zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat zirkulieren. Die Assoziation der ER-Proteine mit dem *Legionella*-Phagosom konnte bereits nachgewiesen werden. Nun sollte die GFP-Markierung des Membranproteins Golvesin Auskunft über die Rolle des Golgi-Apparates bei der *Legionella*-Infektion geben. In den *Dictyostelium*-Zellen assoziiert Golvesin sowohl mit den Membranen des Golgi-Apparates als auch mit Post-Golgi Vesikeln. Verantwortlich für diese Assoziation ist eine interne hydrophobe Abfolge von 24 Aminosäureresten. Bei der konventionellen Phagozytose wird Golvesin innerhalb der ersten 10 min nach Internalisierung der Partikel zu den Membranen von Endosomen rekrutiert. Das Protein bleibt auch während der Ansäuerung des Kompartiments an den Endosomen haften [Schneider *et al.*, 2000].

Bei der Infektion von Golvesin-GFP-exprimierende *Dictyostelium*-Zellen mit *L. pneumophila* Corby konnte das Protein weder an den Bindungsstellen der Bakterien noch an den *Legionella*-Phagosomen nachgewiesen werden. Eine Veränderung der zellulären Verteilung des Proteins nach der Zugabe der Bakterien konnte in keinem Fall beobachtet werden (Abb. 25).

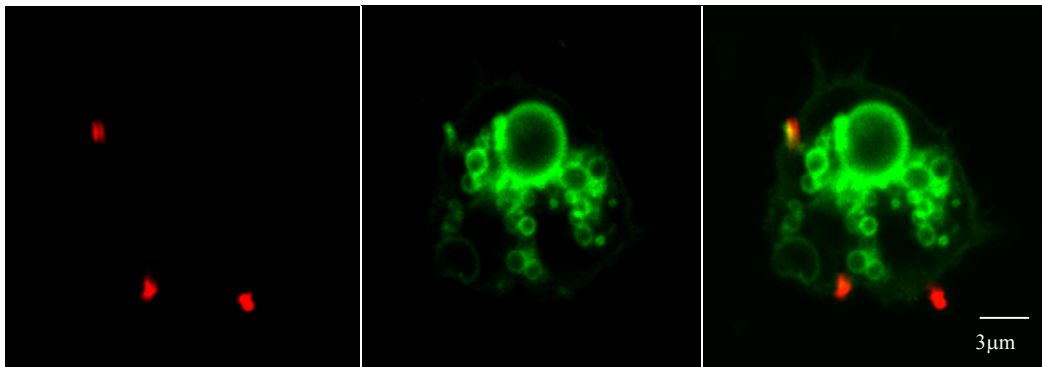


Abb. 25 Mikroskopische Aufnahme einer mit *L. pneumophila* Corby infizierten Golgivesin-GFP *Dictyostelium*-Zelle. Die Zellen wurden mit einer MOI von 10 infiziert und gleich nach der Zugabe der Bakterien im Konfokalen Laser-Scanning Mikroskop beobachtet. Das linke Bild zeigt die rote Fluoreszenz der mit Rhodamin-gefärbten Bakterien. Das mittlere Bild zeigt die grüne Fluoreszenz des GFP-markierten Golgivesins und das rechte Bild zeigt die Zusammenführung beider Bilder. Eine Assoziation der Bakterien mit dem GFP-markierten Protein wurde nicht beobachtet.

4.1 Zusammenfassung

Die Möglichkeit der Fusionierung von Wirtsproteinen mit dem Markerprotein GFP ermöglicht die *in vivo* Untersuchung der *Legionella*-Infektion im Modellorganismus *D. discoideum*. So können lebende Zellen über einen längeren Zeitraum am konfokalen Mikroskop beobachtet und die Lokalisierung der verschiedenen Proteine während der Infektion erforscht werden. Mittels der GFP-Markierung konnte in dieser Arbeit die Beteiligung des Aktinbindenden Proteins Coronin an der Aufnahme von *L. pneumophila* nachgewiesen werden. Auch der Transport vom *Legionella*-Phagosom innerhalb der Zelle mit Hilfe der Mikrotubuli konnte beobachtet werden. Die ER-Proteine CNX und CRT werden bereits bei der Bildung des „phagocytic cups“ zu den Bindungsstellen der Bakterien rekrutiert und sind dauerhaft mit dem *Legionella*-Phagosom assoziiert. Eine Assoziation von Golgi-Bestandteilen mit den Phagosomen von *L. pneumophila* fand dagegen nicht statt.

5 Untersuchung der Ca^{2+} -abhängigen Signaltransduktion während der Aufnahme von *L. pneumophila*

Mehrere zelluläre Vorgänge, von der Phagozytose bis zum Zelltod, sind von der Ca^{2+} -Signalgebung abhängig. Dabei sind schon geringe Erhöhungen der intrazellulären Kalziumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) ausreichend, um in der Zelle ein Signal auszulösen. Auch pathogene Mikroorganismen bedienen sich dieses sensiblen Signalsystems, um ihre Wirte zu kolonisieren wie z.B. *Mycobacterium tuberculosis* [Malik *et al.*, 2003]. So können beispielweise bakterielle Toxine eine Zunahme der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bewirken, um so einen Effekt beim Wirt herbeizuführen. Unabhängig von den Toxinen können Pathogene Ca^{2+} -Signale induzieren, die zu einer Neuordnung des Zytoskeletts führen, um so

die Bindung und Internalisierung der Bakterien zu fördern. Auf der anderen Seite kann die Suppression der Ca^{2+} -Signaltransduktion das angeborene Immunsystem so manipulieren, dass die durch den „oxidativen burst“ hervorgerufene Abtötung von phagozytierten Bakterien verhindert wird [Tran Van Nhieu *et al.*, 2004].

Die Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher führt in *D. discoideum* oder humanen Makrophagen zu einer signifikanten Reduktion in der Aufnahmerate von *L. pneumophila* (siehe 2.2.2). Eine durch EDTA, EGTA oder BAPTA AM hervorgerufene Abnahme der extra- oder intrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]$ wirkt sich ebenfalls negativ auf die Phagozytose der Bakterien aus. Über Fluoreszenzmessungen mit dem Ca^{2+} -Indikator Fura-2 kann eine quantitative Aussage über die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ einzelner Zellen gewonnen werden. Die Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Fura-2 beladenen *Dictyostelium*-Zellen sollte Auskunft über die Rolle der Ca^{2+} -Signaltransduktion während der Aufnahme von *Legionella* geben. Die *Dictyostelium*-Zellen wurden wie in Material und Methoden beschrieben (siehe 13.1) mit Fura-2-Dextran elektroporiert und 60 Sekunden nach Beginn der Messung mit den Bakterien infiziert. Hierfür wurden $20\mu\text{l}$ einer 5×10^5 cfu/ml Bakteriensuspension vorsichtig zu den Zellen gegeben. Eine Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ konnte jedoch bei keiner der Messungen beobachtet werden. Eine Erhöhung der Bakterienmenge, sowie die Vorinkubation der Bakterien mit Anti-*Legionella* Antikörper oder Serum konnte ebenfalls keine Ca^{2+} -Mobilisierung hervorrufen. Zur Kontrolle wurde die Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach der Zugabe von Thapsigargin oder dem Calcium Ionophor A23187 gemessen. Zu diesem Zweck wurden 50 oder 60 Sekunden nach Beginn der Messung $2\mu\text{l}$ $1\mu\text{M}$ A23187 bzw. $2\mu\text{l}$ $0,2\mu\text{M}$ Thapsigargin tropfenweise zu den Zellen gegeben. In beiden Fällen konnte gleich nach der Zugabe der Substanzen ein langanhaltender Ca^{2+} -Einstrom ins Zellzytosol beobachtet werden (Abb. 26).

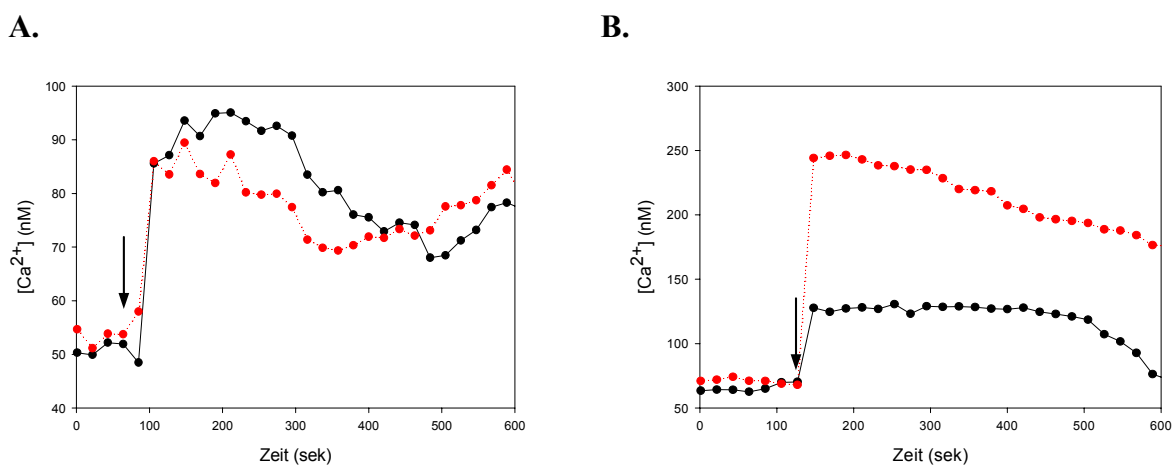


Abb. 26 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Messung von Fura-2-Dextran beladenen *Dictyostelium*-Zellen. (A.) Ca^{2+} -Mobilisierung nach der Zugabe von $2\mu\text{l}$ $1\mu\text{M}$ A23187. (B.) Ca^{2+} -Anstieg nach der Speicherentleerung mit $2\mu\text{l}$ $0,2\mu\text{M}$ Thapsigargin. Jede Kurve entspricht der Messung einer einzelnen Zelle über die Zeit. Zum bezeichneten Zeitpunkt (Pfeil) wurde Thapsigargin zu den Zellen gegeben.

Die Inhibitorversuche haben gezeigt, dass die Abhängigkeit der Phagozytose von der Ca^{2+} -Signalgebung den *Dictyostelium*-Zellen und den humanen Makrophagen gemeinsam ist. So wurden die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Messungen ebenfalls in Fura-2-AM beladenen U937-Zellen durchgeführt. Abb. 27 zeigt als Beispiel die parallele Einzelmessung von neun adhärennten U937-Zellen, die mit *L. pneumophila* Corby infiziert wurden. 30 Sekunden nach Beginn der Messungen wurde die Legionellensuspension tropfenweise auf die Zellen gegeben. Unmittelbar nach der Zugabe der Bakterien konnte eine starke Ca^{2+} -Mobilisierung beobachtet werden, die sich über einen Zeitraum von ungefähr 60 Sekunden erstreckte.

Die lichtmikroskopische Untersuchung der U937-Zellen am Ende der Messung ergab, dass sich die Bakterien zwar in unmittelbarer Nähe der Zellen befanden, jedoch nicht von diesen aufgenommen wurden. Folglich ist der Oberflächenkontakt zwischen *Legionella* und der Wirtszelle ausreichend, um ein transientes Ca^{2+} -Signal auszulösen.

Die basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Werte und die durch Legionellen induzierten Kalziumerhöhungen sind für jede Zelle individuell. Jedoch reagierte die Mehrheit der Zellen zeitgleich auf die Zugabe der Bakterien. Die Basalwerte der gemessenen Zellen liegen zwischen ca. 20 und 150nM und die Ca^{2+} -Erhöhung beträgt 100 - 500% des Basalwertes. Die Darstellung der Ergebnisse in Form von Falschfarbenbildern ermöglicht eine deutlichere Beobachtung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Veränderung. Die blaue Farbe stellt die basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dar. Die rote Farbe zeigt die maximale Ca^{2+} -Mobilisierung.

Für die Quantifizierung des Ca^{2+} -Signals ist von besonderer Bedeutung eine durch Artefakte erzeugte Fluoreszenz auszuschliessen. Der Fura-2 Indikator arbeitet nach dem Prinzip der Zwei-Wellenlängen-Anregungsfluorochrome. Dies ermöglicht die getrennte Aufzeichnung der Fluoreszenz des ungebundenen Farbstoffs und des mit Ca^{2+} -gebundenen Farbstoffs. Der ungebundene Farbstoff hat ein Exzitationsmaximum bei 380nm, während der mit Ca^{2+} -gebundene Farbstoff bei 340nm die maximale Exzitation aufweist. Die Fluoreszenz wird nun getrennt bei den zwei Wellenlängen aufgenommen, wodurch Messfehler, auch solche die durch Ausbleichen des Farbstoffs oder Konzentrationsschwankungen entstehen, verhindert werden.

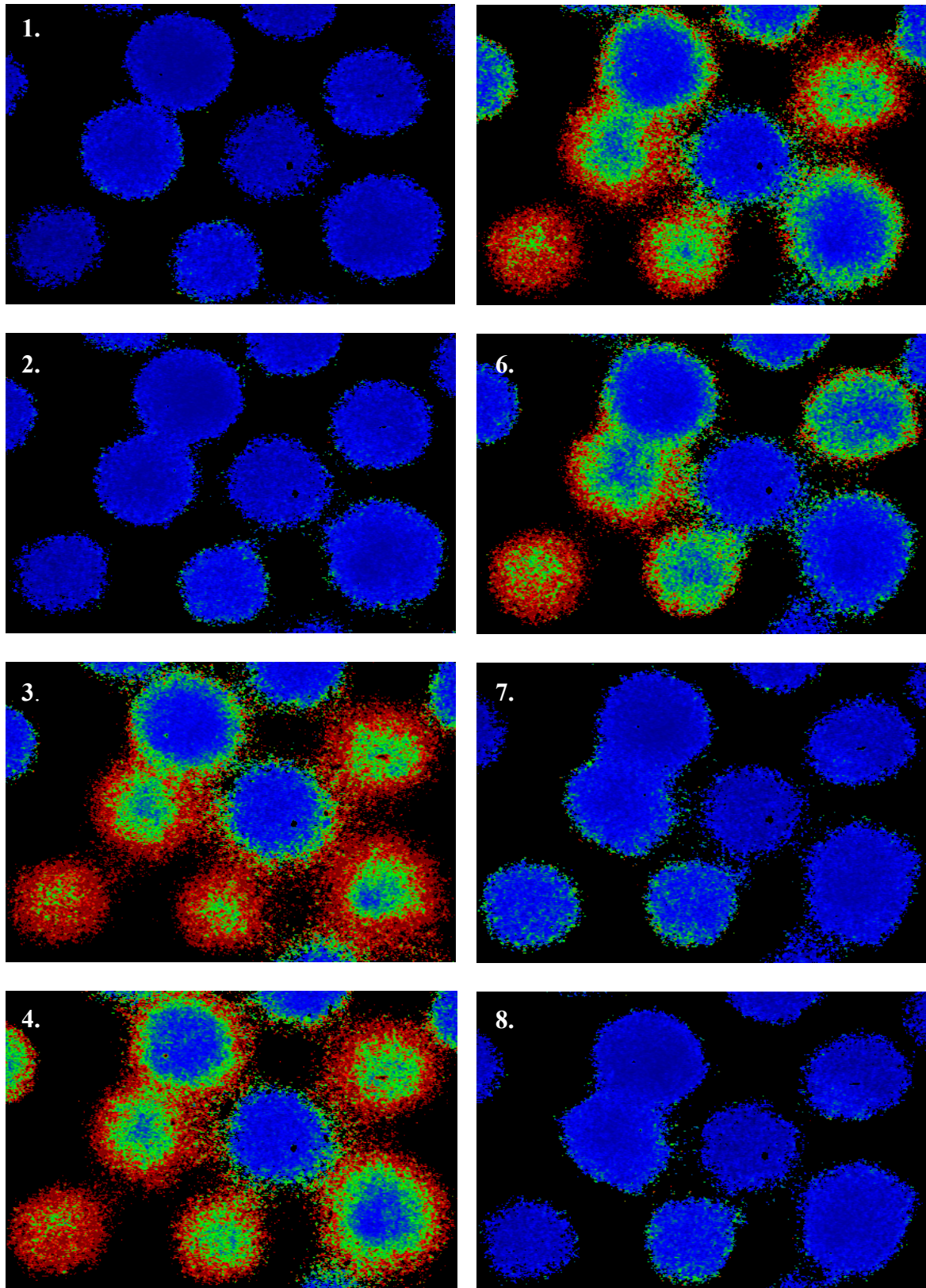


Abb. 27 $[Ca^{2+}]_i$ -Messung von Fura-2-AM beladene U937-Zellen. Die Bilder wurden in Zeitintervallen von 15 Sekunden aufgenommen. Im Intervall zwischen Bild 2 und 3 wurden $20\mu\text{l}$ einer 5×10^5 cfu/ml Bakteriensuspension von *L. pneumophila* Corby zu den Zellen gegeben. Die Bildpaare wurden wie in Material und Methoden beschrieben aufgenommen und digitalisiert. Die R340/380-Ergebnisbilder sind in Falschfarben dargestellt. Die blaue Farbe stellt die basale $[Ca^{2+}]_i$ dar. Die rote Farbe zeigt die maximale Ca^{2+} -Mobilisierung.

Abb. 28 stellt die Ca^{2+} -Messung zwei adhärenter U937-Zellen dar. Direkt nach der Zugabe der Bakterien kann bei 340nm eine Erhöhung der Fluoreszenz, und folglich der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, nachgewiesen werden. Zeitgleich findet bei 380nm eine Reduktion der Fluoreszenz statt, die mit einer Abnahme des ungebundenen Farbstoffs korreliert. Die Ratio 340nm/380nm zeigt eine deutliche Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ als Antwort auf die Zugabe der Legionellen.

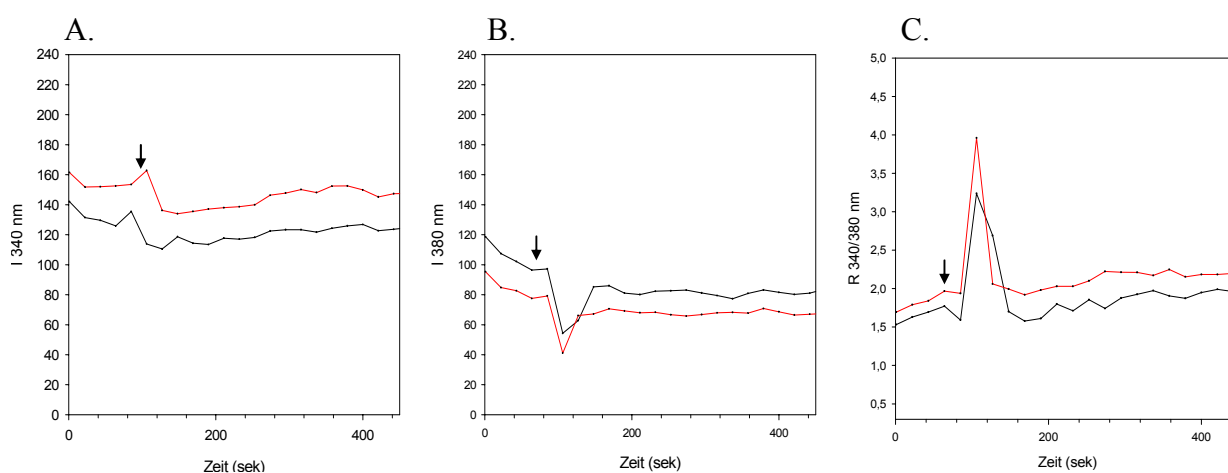


Abb. 28 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ - Erhöhung in Fura-2-AM beladenen U937-Zellen. Die Messungen wurden in Zeitintervallen von 15 Sekunden durchgeführt. Der Zeitpunkt der Zugabe von $20\mu\text{l}$ einer 5×10^5 cfu/ml Zellsuspension von *L. pneumophila* Corby wird von den Pfeilen angezeigt. Abb. 28A zeigt die Zunahme von Ca^{2+} gebundenen Farbstoff bei 340nm. Die Zunahme der Fluoreszenz findet gleich nach der Zugabe der Bakterien statt. Dementsprechend nimmt bei der Messung bei 380nm die Fluoreszenz des ungebundenen Farbstoffs ab, da weniger ungebundener Farbstoff vorhanden ist. Die Ration 340/380 zeigt nun eine deutliche Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Bei der Untersuchung der Ca^{2+} -Signaltransduktion in *Borrelia burgdorferi* konnte festgestellt werden, dass eine Ca^{2+} -Mobilisierung im Wirt ausschließlich in Gegenwart von Serum stattfindet [Suhonen *et al.*, 2000]. Unter diesem Aspekt wurde als Ansatz geprüft, inwiefern Komplement- oder Fc-Rezeptoren für die Ca^{2+} -Signalgebung während der *Legionella*-Infektion verantwortlich sind. Dazu wurden die Bakterien 30 Minuten vor Beginn der Ca^{2+} -Messungen entweder mit Serum oder anti-*Legionella* Antikörper inkubiert. Abb 29A zeigt die Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in der Negativ-Kontrolle. Hierfür wurden die U937-Zellen weder mit Serum noch mit Antikörpern vorinkubiert. Es kann deutlich beobachtet werden, dass gleich nach der Zugabe der Bakterien eine Ca^{2+} -Mobilisierung stattfindet. Abb. 29B und C. zeigen, dass ein Ca^{2+} -Signal ebenfalls in der Gegenwart von Serum bzw. Antikörpern induziert werden kann, was auf eine Beteiligung

von Komplement- und Fc-Rezeptoren an der Signaltransduktion hindeutet. So nehmen an der Ca^{2+} -Signaltransduktion während der *Legionella*-Infektion, Komplement-, Fc-Rezeptoren, sowie andere unspezifische Rezeptoren teil. Bei der Quantifizierung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ konnte jedoch festgestellt werden, dass die Zugabe von Serum zu einer signifikant höheren Ca^{2+} -Mobilisierung führt (Abb. 29D).

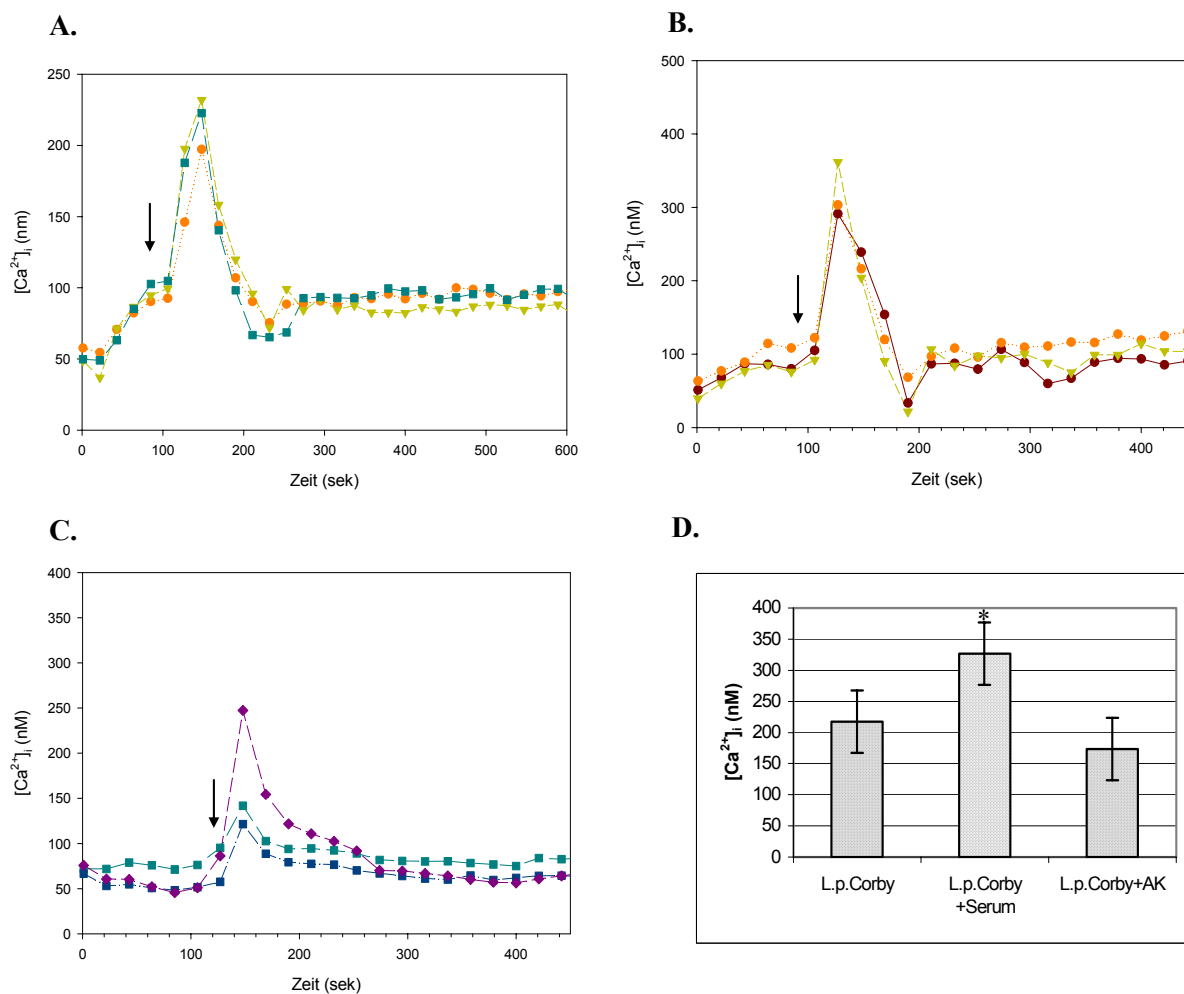


Abb. 29 Fluorometrische Messungen von Fura-2-AM beladene U937-Zellen. (A.) Transientes Ca^{2+} -Signal nach der Zugabe von *Legionella*. Zum bezeichneten Zeitpunkt (Pfeil) wurden $20\mu\text{l}$ einer 5×10^5 cfu/ml *L. pneumophila* Corby-Suspension zu den Zellen gegeben. Die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kann unmittelbar nach der Zugabe der Bakterien beobachtet werden. Die Daten wurden in Zeitintervallen von 15 Sekunden gesammelt. Gezeigt sind die Daten eines repräsentativen Versuchs (von 6 Experimenten). (B.) Die Bakterien wurden für 30 min bei 37°C mit Serum inkubiert. Auch in diesen Fall konnte nach der Zugabe der Bakterien ein Ca^{2+} -Signal nachgewiesen werden. (C.) *L. pneumophila* Corby, die vor der Infektion mit anti-*Legionella*-Antikörper behandelt werden, sind ebenfalls in der Lage bei U937-Zellen intrazellulären Ca^{2+} zu mobilisieren. (D.) Dargestellt sind die Mittelwerte aller durchgeführten Messungen, wobei mindestens 100 Zellen bei jeder Messung untersucht worden sind. Das Sternchen kennzeichnet eine signifikante Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Student's gepaarter, zweiseitiger t -test; $p = 0,05$). Die dargestellten Messungen wurden ebenfalls mit dem Indikator Fluoro-4 durchgeführt.

5.1 Einfluss verschiedener Virulenzfaktoren von *Legionella* auf die Ca^{2+} -Signaltransduktion

Die Flagelle trägt zur Pathogenität von *L. pneumophila* bei, indem sie den Kontakt zum Wirt fördert und die Invasionskapazität der Bakterien erhöht [Dietrich *et al.*, 2001]. Die Deletion der größten Untereinheit FlaA führt zu einem aflagellierten Phänotyp. Da es sich bei der Flagelle um eine prominente Oberflächenstruktur handelt, liegt es Nahe anzunehmen, dass diese an der Ca^{2+} -Signaltransduktion beteiligt sein könnte. Bei der Infektion von U937-Zellen mit der *L. pneumophila flaA*-Mutante konnte jedoch keine Beteiligung der Flagelle bei der Ca^{2+} -Mobilisierung im Wirt nachgewiesen werden (Abb. 30A.).

L. pneumophila benötigt den flagellaren Sigmafaktor FliA nicht nur für den Aufbau des flagellaren Filaments und die Motilität, sondern auch für die kontaktabhängigen Zytotoxizität, die Umgehung der Phagosom-Fusion in Makrophagen und für die Vermehrung in *D. discoideum* [Hammer *et al.*, 2002; Heuner *et al.*, 2002]. Die Deletion des *fliA*-Gens hat jedoch keinerlei Auswirkung auf die Fähigkeit der Bakterien in den U937-Zellen ein Ca^{2+} -Signal zu induzieren (Abb. 30 B.).

Ferner wurde untersucht, ob das *ligA*-Gen (*L. pneumophila* infectivity gene A) zu der Mobilisierung von intrazellulärem Kalzium in den U937-Zellen beiträgt. *LigA*-Mutanten zeigen eine reduzierte Zytotoxizität in humanen Monozyten und eine geringere hämolytische Aktivität. Ein besonderes Merkmal dieser Mutanten ist deren Unfähigkeit sich in *A. castellanii* zu vermehren [Fettes *et al.*, 2000]. Abb 30 C. zeigt das *L. pneumophila ligA*-Mutanten ebenfalls in der Lage sind eine Ca^{2+} -Antwort im Wirt auszulösen.

Das *Legionella* Oberflächenprotein Mip wird für die Vermehrung der Bakterien in Protozoen und humanen Zelllinien benötigt. Die Beteiligung von Mip an der Ca^{2+} -Signaltransduktion während der Aufnahme von *Legionella* in U937-Zellen konnte jedoch ausgeschlossen werden, da die Zugabe von *L. pneumophila mip*-Mutanten zu einer signifikanten Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in den U937-Zellen führt (Abb. 30 D.).

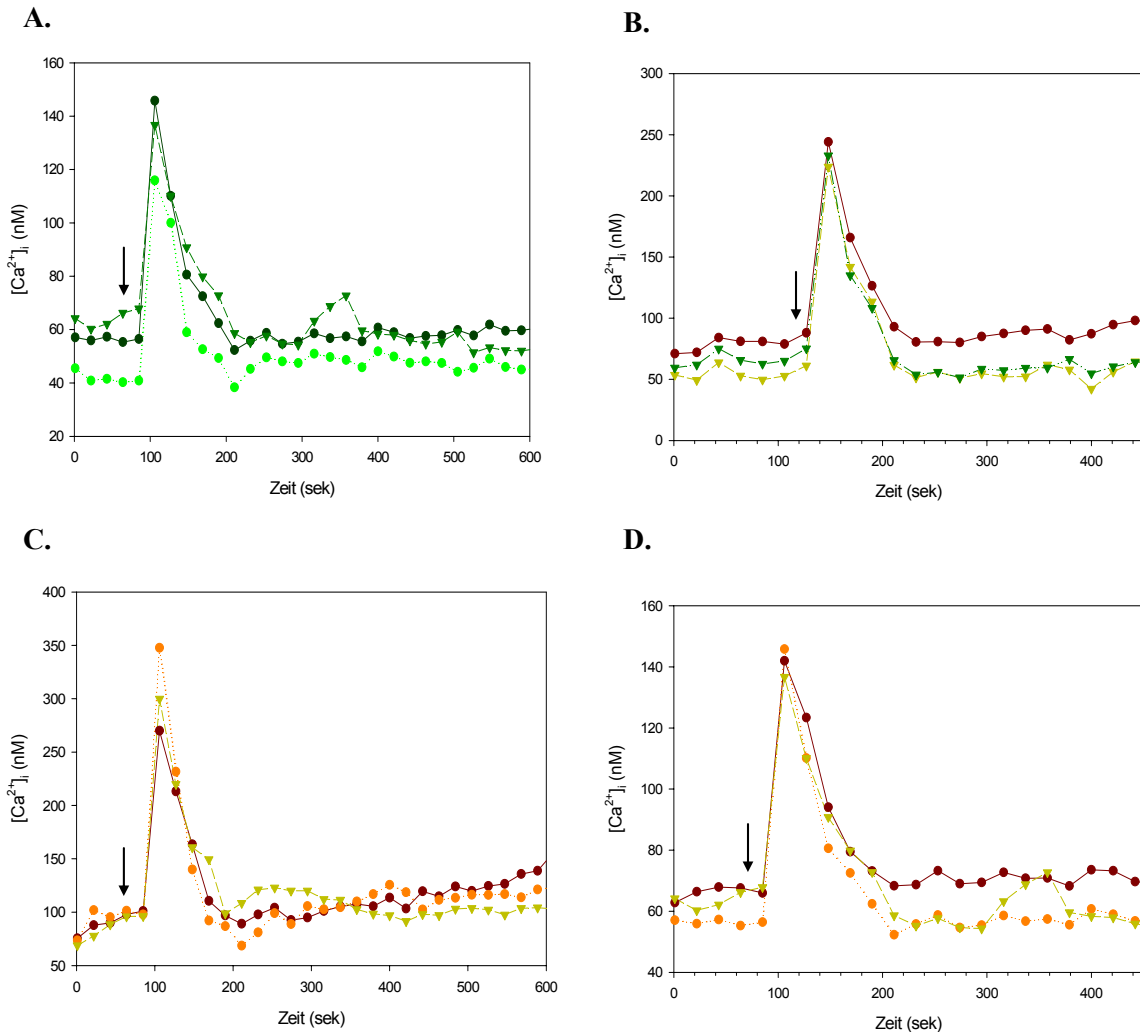


Abb. 30 $[Ca^{2+}]_i$ -Messung von Fura-2-AM beladenen U937-Zellen. Alle 15 Sekunden wurden Daten gesammelt. Der Zeitpunkt der Zugabe von $20\mu\text{l}$ einer 5×10^5 cfu/ml Bakteriensuspension wird von den Pfeilen angezeigt. Die dargestellten Kurven sind repräsentativ für alle durchgeführten Messungen bei denen mindestens 100 Zellen, mit den jeweiligen *Legionella*-Mutanten infiziert, untersucht worden sind. (A.) Ca^{2+} -Antwort auf die Zugabe der *L. pneumophila flaA*-Mutante. (B.) Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach dem Kontakt der Zellen mit der *L. pneumophila fliA*-Mutante. (C.) Ca^{2+} -Mobilisierung nach der Zugabe einer *L. pneumophila ligA*-Mutante. (D.) Ca^{2+} -Antwort auf die Zugabe der *L. pneumophila mip*-Mutante. Die Messungen wurden ebenfalls mit dem Indikator Fluoro-4 durchgeführt.

Ein nächster Ansatz zur Feststellung der Spezifität des beobachteten Ca^{2+} -Signals war, die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ während der Infektion von U937-Zellen mit anderen *Legionella*-Stämmen, wie *L. hackeliae* oder LLAP10, sowie mit *E. coli* und *Salmonella enterica*.

Der nicht pathogene *L. hackeliae* ist ebenfalls in der Lage eine Ca^{2+} -Mobilisierung in den Wirtszellen herbeizuführen. Der gemessene Ca^{2+} -Anstieg fällt allerdings geringer aus als bei *L. pneumophila* Corby (Abb. 31 A.). Die Infektion der U937-Zellen mit LLAP10 hat auch eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ zur Folge (Abb. 31 B.). Interessanterweise bewirkt die

Zugabe von *E. coli* den höchsten gemessenen Ca^{2+} -Anstieg in den U937-Zellen (Abb. 31C). Der Kontakt der Zellen mit dem intrazellulären Pathogen *Salmonella enterica* sv. Typhimurium führt ebenso zu einer Erhöhung der intrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Abb. 31D). Zusammenfassend ist demnach festzustellen, dass die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in den U937-Zellen nicht *Legionella*-spezifisch ist, und auch unabhängig von der Virulenz der Bakterien stattfindet.

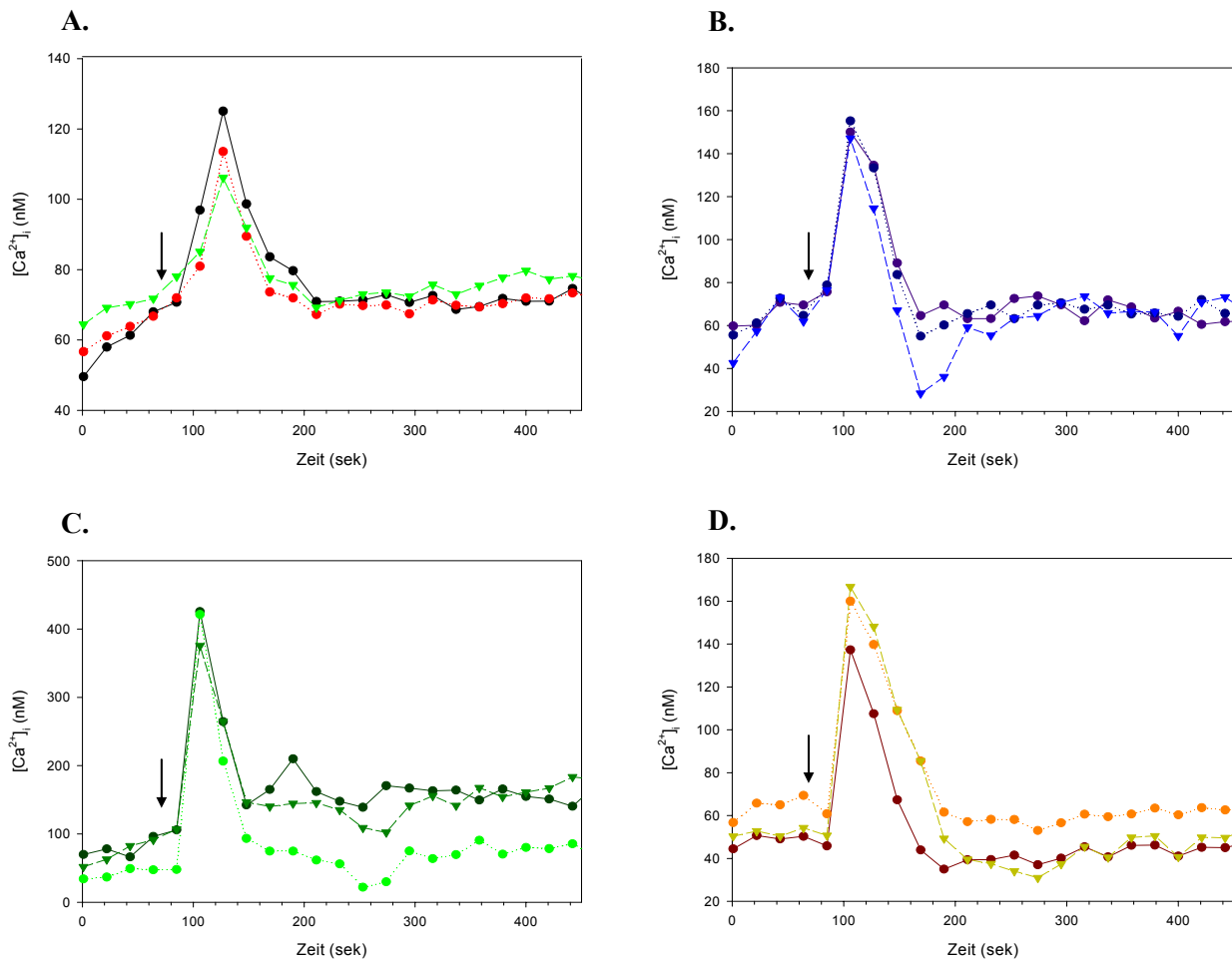


Abb. 31 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Messung von Fura-2-AM beladenen, adhärenen U937-Zellen. Die Daten wurden in Zeitintervallen von 15 Sekunden gesammelt. Der Zeitpunkt der Zugabe von $20\mu\text{l}$ einer 5×10^5 cfu/ml Bakteriensuspension wird von den Pfeilen angezeigt. Die dargestellten Kurven sind repräsentativ für alle durchgeführten Messungen bei denen mindestens 100 Zellen untersucht worden sind. (A.) Ca^{2+} -Antwort auf die Zugabe von *L. hackeliae*. (B.) Ca^{2+} -Signal nach dem Kontakt der Zellen mit LLAP10. (C.) Ca^{2+} -Mobilisierung nach der Zugabe von *E. coli* DH5 α . (D.) Ca^{2+} -Antwort auf die Zugabe von *Salmonella enterica* sv. Typhimurium. Die Messungen wurden ebenfalls mit dem Indikator Fluoro-4 durchgeführt.

Mehrere Kontrollen wurden durchgeführt, um sicherzustellen dass es sich bei der beobachteten Ca^{2+} -Mobilisierung nicht um unspezifische Signale handelt. Die Zugabe von PBS oder CaCl_2 zu den U937-Zellen während der Messung führte in keinem Fall zu

einer Veränderung $[Ca^{2+}]_i$. Ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ als Antwort der Zellen auf unspezifische Reize konnte somit ausgeschlossen werden. Darüber hinaus führte die wiederholte Zugabe von *L. pneumophila* zu einem späteren Zeitpunkt der Messung zu einem erneuten Ca^{2+} -Signal (Abb. 32).

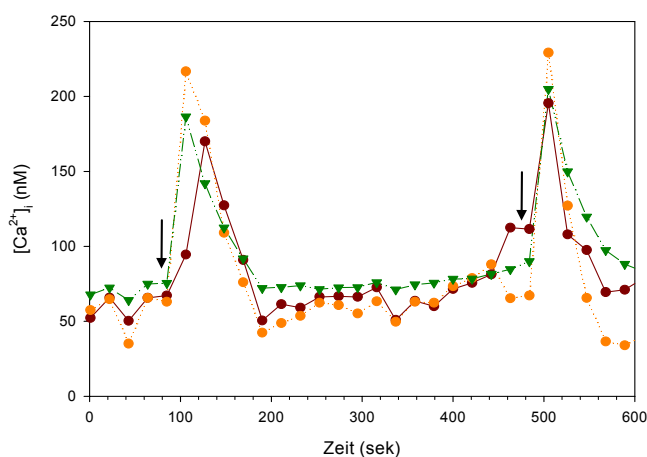


Abb. 32 $[Ca^{2+}]_i$ -Messung von Fura-2-AM beladenen U937-Zellen. Die Daten wurden in Zeitintervallen von 15 Sekunden gesammelt. Der Zeitpunkt der Zugabe von $20\mu\text{l}$ einer 5×10^5 cfu/ml *L. pneumophila* Corby-Suspension wird von den Pfeilen angezeigt. Die Ca^{2+} -Mobilisierung findet jedes Mal unmittelbar nach der Zugabe der Bakterien statt. Die dargestellten Kurven sind repräsentativ für alle durchgeführten Messungen bei denen mindestens 100 Zellen zweimal mit den Bakterien infiziert worden sind. Die Messungen wurden ebenfalls mit dem Indikator Fluoro-4 durchgeführt

5.2 Hemmung der Ca^{2+} -Signaltransduktion in U937-Zellen durch *Mycobacterium avium*

Antimikrobielle Abwehrmechanismen, wie die oxidative Abtötung, die Stickstoffoxid-Produktion und die Synthese pro-entzündlicher Zytokine sind in humane Makrophagen von der Ca^{2+} -Signaltransduktion abhängig [Malik *et al.*, 2000]. Das intrazelluläre Pathogen *Mycobacterium tuberculosis* entkommt der Abwehr in Makrophagen u. a. durch die Hemmung der Ca^{2+} -Signalgebung. Die Umkehrung der Signalblockade, durch die pharmakologische Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ führt überdies zu einer vermehrten Phagosomreifung [Malik *et al.*, 2000; 2001].

Die Beteiligung der Ca^{2+} -Signalgebung an der Aufnahme von *L. pneumophila* konnte in dieser Arbeit bereits nachgewiesen werden. Nun sollte als Kontrolle die Hemmung der Ca^{2+} -Signaltransduktion durch *Mycobacterium* in U937-Zellen untersucht werden.

Wie in Abb. 33A dargestellt, konnte nach der Zugabe von *Mycobacterium avium* zu den U937-Zellen keine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beobachtet werden. Eine spätere Zugabe von *L. pneumophila* Corby zu den selben Zellen führt dagegen zu einem transienten Ca^{2+} -Signal. Bei der gleichzeitigen Zugabe von *M. avium* und *L. pneumophila* Corby zu den U937-Zellen kann in einem Teil der Zellen eine Ca^{2+} -Mobilisierung nachgewiesen werden (Abb. 33 B.)

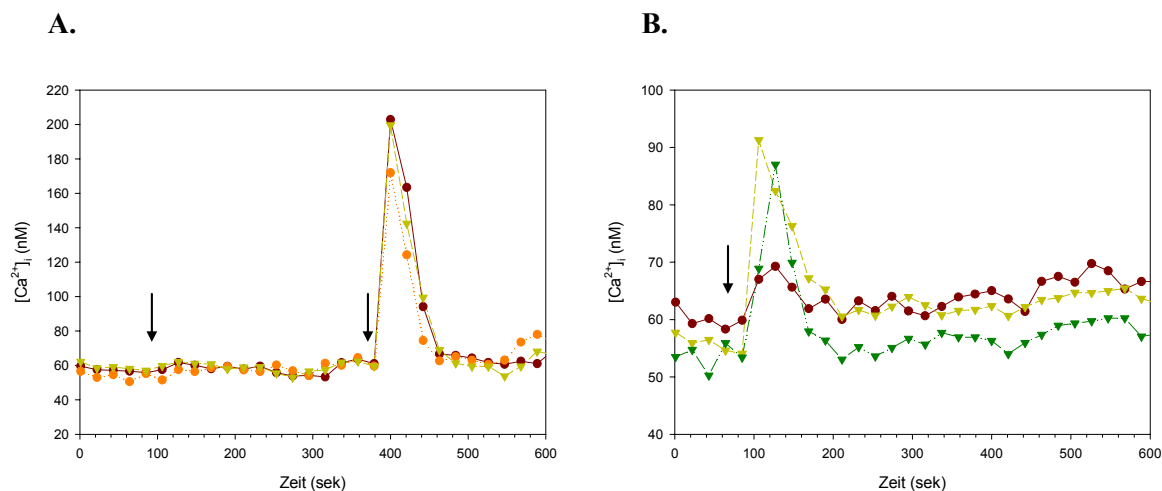


Abb. 33 $[Ca^{2+}]_i$ -Messung von Fura-2-AM beladenen U937-Zellen. Die Daten wurden in Zeitintervallen von 15 Sekunden gesammelt. Der Zeitpunkt der Zugabe von $20\mu\text{l}$ einer 5×10^5 cfu/ml Bakteriensuspension wird von den Pfeilen angezeigt. (A.) Nach der Zugabe von *M. avium* kann keine Ca^{2+} -Mobilisierung nachgewiesen werden (erster Pfeil). Die nachfolgende Zugabe von *L. pneumophila* Corby führt zu einem Ca^{2+} -Signal unmittelbar nach der Zugabe der Bakterien. (B.) Ca^{2+} -Signal nach dem Kontakt der Zellen mit *M. avium* und *L. pneumophila* Corby. Die dargestellten Kurven sind repräsentativ für alle durchgeführten Messungen bei denen mindestens 100 Zellen für jeden Zustand untersucht worden sind. Die Messungen wurden mit den Fluoro-4 Indikator durchgeführt.

1.3 Zusammenfassung

Die Notwendigkeit von Ca^{2+} für die Aufnahme von *L. pneumophila* in *D. discoideum* und humanen Makrophagen konnte durch den Einsatz von EDTA, EGTA und BAPTA-AM nachgewiesen werden. Die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ des Wirtes während der *Legionella*-Infektion sollte die bereits gewonnenen Erkenntnisse erweitern. Die Fluoreszenzmessungen mit den Ca^{2+} -Indikatoren Fura-2 und Fluoro-4 ermöglichen eine quantitative Aussage über die $[Ca^{2+}]_i$ einzelner Zellen. Mit dieser Methode konnte bei den *Dictyostelium*-Zellen jedoch keine Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ nach der Zugabe von *L. pneumophila* nachgewiesen werden. Bei den U937-Zellen dagegen führte der Kontakt mit den Bakterien zu einem transienten Ca^{2+} -Signal. Dieser war aber nicht *L. pneumophila* vorbehalten, denn auch wenig virulente *Legionella*-Stämme wie *L. hackeliae*, sowie *E. coli* und *Salmonella*, eine Ca^{2+} -Mobilisierung herbeiführen können. Voraussetzung für die Ca^{2+} -Signalgebung ist allerdings die Präsenz von Bakterien, da weder PBS noch $CaCl_2$, oder andere externe Einflüsse eine Ca^{2+} -Erhöhung herbeiführen können. Bei der Infektion der U937-Zellen mit *M. avium* konnte eine spezifische Hemmung der Ca^{2+} -Signaltransduktion nachgewiesen werden.

DISKUSSION

1 *D. discoideum* als Modellsystem für die *Legionella*-Infektion

Zahlreiche zelluläre Prozesse sind an der Wirt-Pathogen Interaktion beteiligt. Die Erforschung dieser komplexen Wechselbeziehung erfordert daher den Einsatz eines weiten Spektrums an Modellorganismen und analytischer Methoden [Pradel und Ewbank, 2004]. Für die Untersuchung der *Legionella*-Infektion können mehrere Amöbenspezies, sowie humane Zelllinien, als Wirtssysteme in Anspruch genommen werden. Insbesondere humane Makrophagen sind bislang bei einem Grossteil der Arbeiten eingesetzt worden. Allerdings ist die Arbeit mit Säugertierzellen teuer und zeitaufwendig. Die natürlichen Protozoenwirte *A. castellanii* und *H. vermiformis* können zwar mit weniger Aufwand in großen Mengen im Labor kultiviert werden, sind jedoch nur schwer genetisch manipulierbar. Daher ist die Analyse von Wirtsfaktoren in diesen Modellen nur beschränkt möglich. Hägele *et al.* und Salomon *et al.* konnten vor wenigen Jahren die haploide Bodenamöbe *D. discoideum* als Wirtssystem für *L. pneumophila* etablieren. Da viele bakterielle Virulenzmechanismen möglicherweise während der Interaktion der Bakterien mit Protozoen in der Umwelt entstanden sind, eignen sich Amöben besonders gut für die Untersuchung der *Legionella*-Infektion. Die Möglichkeit der genetischen Manipulation und die gut charakterisierten Zellprozesse machen zudem *D. discoideum* zum geeigneten Wirt für die Untersuchung der *Legionella*-Infektion. In dieser Arbeit wurden die Infektionsbedingungen für *L. pneumophila* in *D. discoideum* standardisiert und ein Vergleich mit bekannten Modellsystemen vorgenommen. Darüber hinaus wurde *D. discoideum* für die Untersuchung der Infektion weiterer *Legionella*-Stämme eingesetzt.

Obwohl es sich bei den *Dictyostelium*-Zellen um sehr effiziente Phagozyten handelt, sind nach 3 Stunden Koinkubation 12% bzw. 20% weniger Zellen mit *Legionella* infiziert, als bei *A. castellanii* oder humanen Makrophagen. Möglicherweise sind die Legionellen nur beschränkt in der Lage an den *Dictyostelium*-Zellen zu adhäreren, was zu einer geringeren Phagozytoserate führen kann [Lu und Clarke, 2005]. Eine andere Erklärung könnte sein, dass es sich bei *Dictyostelium* nicht um einen natürlichen Wirt der Legionellen handelt [Grimm *et al.*, 2001]. Weiterhin wird in *D. discoideum* ein Teil der Bakterien innerhalb der ersten 24 Stunden abgebaut, was nach 96 Stunden zu einer deutlich geringeren Vermehrung der Bakterien führt. Das Aushungern der *Dictyostelium*-Zellen vor der Infektion sowie eine Erhöhung der MOI führten nicht zu einem Anstieg der Phagozytoserate, sodass alle weiteren Versuche mit unbehandelten Zellen durchgeführt wurden. Die Amöben wurden mit den Legionellen im Verhältnis 1:10 oder 1:50 infiziert.

Die Standardisierung der Infektionsbedingungen, die eine möglichst hohe Phagozytoserate der Bakterien in den *Dictyostelium*-Zellen garantiert, ist Voraussetzung für die Durchführung der Phagozytoseversuche. Denn nur wenn ausreichend Bakterien von den Amöben aufgenommen werden, können die Effekte der Inhibitoren genau beobachtet werden. Ebenso ist die Analyse der verschiedenen Wirtsmutationen nur möglich, wenn genügend Legionellen internalisiert werden und sich anschließend ausreichend vermehren.

Bezüglich des Vergleichs mit bekannten Wirtsmodellen konnte ein ähnlicher Ablauf der *L. pneumophila*-Infektion in *D. discoideum*, *A. castellanii* und humanen Makrophagen beobachtet werden. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass das Dot/Icm-System sowohl für die Aufnahme in *D. discoideum* als auch in humanen Makrophagen von Bedeutung ist. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die zellulären Vorgänge, die sich während der Infektion von *Legionella* in *D. discoideum* ereignen, in ähnlicher Weise in den natürlichen Wirten stattfinden. Ein weiterer Beweis für die Eignung von *D. discoideum* als Wirtsmodell ergab sich aus der Untersuchung der Infektion mit anderen pathogenen Mikroorganismen. Bei der Infektion von *D. discoideum* mit *Pseudomonas aeruginosa* oder *Mycobacterium marinum*, stimmte ebenfalls der Infektionsverlauf mit dem in humanen Makrophagen überein [Cosson *et al.*, 2002; Pukatzi *et al.*, 2002; Solomon *et al.*, 2003].

Das *Dictyostelium*-Modell wurde in dieser Arbeit für die Untersuchung der Infektion verschiedener *Legionella*-Stämme eingesetzt. Die *Legionella*-like amoebal pathogens (LLAPs) wurden zum ersten Mal 1956, als obligat intrazelluläre Parasiten von frei lebenden Amöben beschrieben [Drozanski, 1956]. Ähnlich wie Legionellen, konnten diese die Lyse des Wirtes herbeiführen. Seitdem konnten mehrere LLAP-Stämme aus Umweltquellen isoliert werden, unter anderem LLAP-6, LLAP-10 und LLAP-12, die drei neue *Legionella*-Spezies, *L. rowbothamii*, *L. fallonii*, and *L. drancourtii* darstellen [Adeleke *et al.*, 2001]. Seit der Isolierung von LLAP-3 (*L. lytica*) aus dem Sputum eines an Pneumonie erkrankten Patienten [Fry *et al.*, 1991], gibt es zahlreiche Beweise dafür, dass LLAP-Stämme für mindestens 19% aller klinischen Fälle der atypischen Pneumonie verantwortlich sind [McNally *et al.*, 2000].

LLAP-Stämme können in der Regel nur sehr schlecht oder gar nicht auf BCYE-Agar kultiviert werden. Diese Eigenschaft dient der Unterscheidung zwischen den LLAPs und andere *Legionella* sp. Es war auch die mangelnde Kultivierbarkeit der LLAP-Stämme die zu der Erkenntnis führte, dass LLAPs neuartige Erreger atypischer Pneumonie sind [Marrie *et al.*, 2001]. So zeigten einige Patienten die typischen Krankheitszeichen einer *Legionella*-Infektion, ohne dass die Isolierung des Erregers möglich war. In solchen Fällen sind Protozoen

für die Diagnose neuer Erreger (emerging agents) von großer Bedeutung [Greub und Raoult, 2004].

In dieser Arbeit wurde die Infektion von LLAP10, LLAPK62 und LLAPK86 in *D. discoideum* untersucht. Hinsichtlich der Aufnahme konnten keine Unterschiede zwischen den LLAP-Stämmen und *L. pneumophila* nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf der Infektion zeigen die LLAP-Stämme eine höhere Vermehrungsrate. Dies ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass die LLAP-Stämme, im Gegensatz zu *L. pneumophila*, nach 24 Stunden nicht von den *Dictyostelium*-Zellen abgebaut werden. Dies gilt insbesondere für LLAP10 und LLAPK86, die nach 24 Stunden eine bzw. eine halbe log-Stufe Vermehrung zeigen. Allerdings wird die Vermehrung von *L. pneumophila* durch die niedrige Infektionstemperatur (24,5°C) negativ beeinflusst, während die LLAP-Stämme bei RT optimal wachsen können.

Ferner zeigten elektronenmikroskopische Aufnahmen infizierter *Dictyostelium*-Zellen weitere Unterschiede zwischen den drei untersuchten LLAP-Stämmen. Während sich *L. pneumophila* und LLAP10 innerhalb eines RER-umgebenen Phagosoms vermehren, befinden sich LLAPK62 und LLAPK86 frei im Zytoplasma der Zelle. Eine Assoziation dieser Bakterien mit dem ER der Wirtszelle konnte in keinem Fall nachgewiesen werden. Im natürlichen Wirt *Acanthamoeba sp.* konnten diese LLAP-Stämme ebenfalls frei im Zytoplasma der Zelle beobachtet werden [Skriwan *et al.*, 2002].

Mehrere Studien haben bereits gezeigt, dass die Assoziation des *Legionella*-Phagosoms mit dem ER der Wirtszelle für die Hemmung der Phagosomreifung von Bedeutung ist [Tilney *et al.*, 2001; Kagan und Roy, 2002; Robinson und Roy, 2006]. Bei LLAPK62 und LLAPK86 verhindert deren zytoplasmatische Lokalisierung den Abbau der Bakterien durch lysosomale Enzyme, die normalerweise im Phagolysosom vorgefunden werden [Michel *et al.*, 1998]. Andere pathogene Mikroorganismen, wie *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* oder *Rickettsia sp.* zerstören das frühe Phagosom, um sich dann ebenfalls im Zytoplasma der Wirtszelle zu vermehren [Goebel und Kuhn, 2000]. Für die Lyse der Vakuole ist bei *L. monocytogenes* ein poren-bildendes Zytolysin und zwei Phospholipasen verantwortlich. Eine temperaturabhängige, Plasmid-vermittelte hämolytische Aktivität korreliert im Falle von *Shigella* mit der Lyse der Phagosomenmembran [Sansone *et al.*, 1986]. Da für Legionellen mehrere Abbauenzyme, unter anderem eine Phospholipase A und eine Lysophospholipase A [Flieger *et al.*, 2000a, 2001a], sowie ein poren-bildendes RTX-Toxin [Cirillo *et al.*, 2002] beschrieben worden sind, könnten diese von LLAPK62 und LLAPK86 möglicherweise für die Befreiung aus dem Phagosom eingesetzt werden. Innerhalb des Zytoplasmas aktivieren *Listeria monocytogenes*, *Shigella sp.* und *Rickettsia sp.* verschiedene Komponenten des

zellulären Aktinzytoskeletts, um Aktinschwänze auf der Oberfläche der Bakterien zu bilden. Der Zusammenbau dieser Aktinstrukturen liefert die nötige Energie um die Bakterien innerhalb des Zytoplasmas zu bewegen [Goldberg, 2001]. Ob die LLAPs im Zytoplasma der *Dictyostelium*-Zellen ebenfalls mit dem Aktinzytoskelett interagieren ist noch unerforscht. Weitere Untersuchungen sind erforderlich um die Zerstörung des Phagosoms, sowie die intrazelluläre Vermehrung und Lyse des Wirtes durch LLAPK62 und LLAPK86 näher zu charakterisieren. Besonders interessant ist jedoch die Tatsache, dass so unterschiedliche Infektionsmechanismen bei Mitgliedern des gleichen Genus vorkommen, die mehr als 90% Kongruenz in den 16S RNA Sequenzen aufweisen [Adeleke *et al.*, 1996].

2 Die Aufnahme von *L. pneumophila* in *D. discoideum* ist ein Aktin-abhängiger Prozess

Der Einsatz spezifischer zellulärer Inhibitoren hat sich für die Untersuchung der Aufnahmemechanismen von *L. pneumophila* in verschiedenen Wirten als geeignet erwiesen. Obgleich die intrazelluläre Replikation der Legionellen in Protozoen und Säugerzellen keine beachtlichen Unterschiede aufweist, sind mehrere verschiedene Mechanismen für die initiale Aufnahme der Bakterien beschrieben worden. Im natürlichen Wirt *H. vermiformis* verhindert die Hemmung der Rezeptor-vermittelten Endozytose durch Methylamin die Aufnahme der Bakterien [King *et al.*, 1991; Moffat und Tompkins, 1992]. In Säugetierzellen werden die Legionellen durch Phagozytose aufgenommen, abhängig von der Aktinmaschinerie der Zelle [King *et al.*, 1991; Cirillo *et al.*, 1999].

Mit Hilfe eines pharmakologischen Ansatzes wurde in dieser Arbeit die Aufnahme von *Legionella* in *D. discoideum* charakterisiert. Auch die Aufnahme der Bakterien in der Makrophagenzelllinie U937 wurde mittels Inhibitoren untersucht und mit *Dictyostelium* verglichen. Darüber hinaus diente der Vergleich mit der Aufnahme eines avirulenten *E. coli* Stammes in beiden Wirten der Aufklärung *Legionella*-spezifischer Mechanismen.

Die Depolymerisation der Aktinfilamente durch die Zugabe von Cytochalasin A oder Latrunculin A führt in *D. discoideum* zu einer Dosis-abhängigen Reduktion in der Internalisierung von *L. pneumophila*. Die Zugabe von 100mM Methylamin hat dagegen keinen Einfluss auf die Aufnahme der Bakterien. Der Aufnahmemechanismus von *Legionella* in *D. discoideum* ähnelt somit der Internalisierung in humanen Makrophagen und Monozyten [Elliot und Winn, 1986; King *et al.*, 1991; Cirillo *et al.*, 1999].

In einer kürzlich erschienenen Studie konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass die Aufnahme von *L. pneumophila* in *D. discoideum* vom Mikrofilamentsystem der Zelle abhängig ist [Lu und Clarke, 2005]. Allerdings beschränkt sich auch diese Arbeit auf die Untersuchung der Aufnahme auf pharmakologischer Ebene. In der vorliegenden Arbeit wird mit Hilfe des *Dictyostelium*-Modells zum ersten Mal eine Untersuchung der Aufnahme-mechanismen von *Legionella* auf genetischer Ebene vorgenommen. Hierfür wurden Infektionsversuche in gut charakterisierten Zytoskelett-Mutanten durchgeführt.

Mehrere Studien haben bereits bewiesen, dass endozytische Prozesse, wie Phagozytose und Makropinozytose in *D. discoideum* und humanen Makrophagen vergleichbare Mechanismen aufweisen, insbesondere was die Beteiligung von Aktin an den frühen Ereignissen der Phagosombildung angeht [Cardelli, 2001; Rupper und Cardelli, 2001].

Der Beginn der Phagozytose kann in vier Schritte unterteilt werden: Bindung der Partikel, Bildung des „phagocytic cups“, Schließung des „phagocytic cups“ (Bildung des Phagosoms) und Internalisierung des Phagosoms [Ishikawa *et al.*, 2003]. Die notwendige Veränderung des Zytoskeletts für die Durchführung der verschiedenen Schritte wird durch eine Vielzahl aktinbindender Proteine reguliert. Entsprechend ihrer Funktion werden diese Proteine in Gruppen zusammengefasst (Abb. 34).

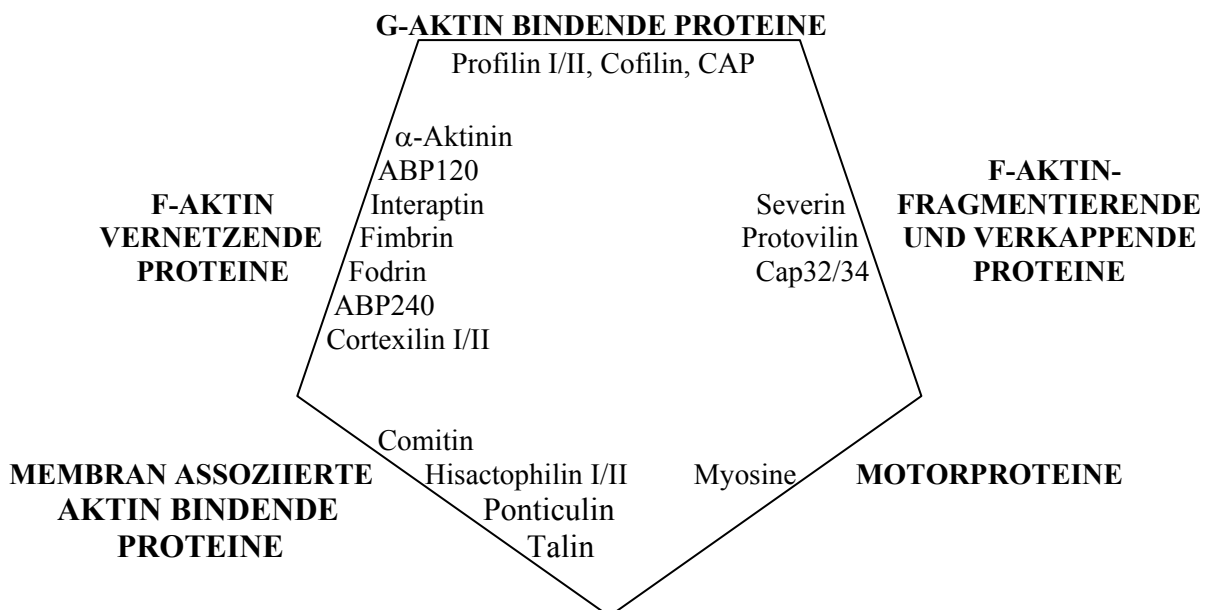


Abb. 34 Schematische Übersicht aktinbindender Proteine aus *D. discoideum* und ihre Interaktion mit dem Mikrofilamentsystem (modifiziertes Schema nach Eichinger *et al.*, 1999).

Um die Rolle des Aktinzytoskeletts während der Aufnahme von *Legionella* in *D. discoideum* genauer zu charakterisieren, wurden einige spezifische *Dictyostelium*-Mutanten aus den verschiedenen Proteingruppen ausgewählt und in Infektionsversuchen analysiert. Die Aufnahme eines avirulenten *E. coli*-Stammes wurde parallel zu *L. pneumophila* untersucht, um Pathogen-spezifische Faktoren zu identifizieren.

Die G-Aktinbindenden Proteine verhindern eine vollständige Aktin-Polymerisation, indem sie einen Komplex mit globulärem Aktin bilden und es so dem Gleichgewicht entziehen. Es entsteht ein Vorrat an unpolymerisierten Aktin in der Zelle, welches für den schnellen Umbau des Mikrofilamentsystems benutzt werden kann [Toshima *et al.*, 2005]. Das zu dieser Gruppe gehörende CAP-Protein ist von Bedeutung für die Pinozytose, hat jedoch keinerlei Einfluss auf die Phagozytose in *D. discoideum* [Noegel *et al.*, 1999].

Infektionsversuche mit *L. pneumophila* in einer *Dictyostelium*-CAP-Mutante haben jedoch gezeigt, dass die Aufnahme der Bakterien von der Funktion des Proteins abhängig ist. Aufgrund der geringeren Adhärenz der Legionellen an den *Dictyostelium*-Zellen, ist möglicherweise bei der Aufnahme von *Legionella* eine schnelle Reorganisation des Mikrofilamentssystems erforderlich. So könnte eine Erhöhung der Phagozytoserate herbeigeführt werden. Bei der Phagozytose apathogener Bakterien, die zur Nahrungsaufnahme dient, ist eine schnelle Aktin-Polymerisation jedoch überflüssig und würde womöglich zu einem unnötigen Energieverbrauch führen.

Die F-Aktin vernetzenden Proteine beeinflussen die räumliche Anordnung der Aktinfilamente. Dazu zählen Proteine die eine parallele Anordnung der Filamente bewirken oder solche die eine dreidimensionale Anordnung des Aktin-Netzwerkes herbeiführen und stabilisieren [Rivero *et al.*, 1999]. Die Funktion der verschiedenen quervernetzenden Proteine ist in vielen Fällen redundant. So führt in *D. discoideum* die einzelne Deletion von α -Aktinin oder 120-kDa „gelation“-Faktor (ABP120) zu keinem veränderten Phänotyp [Schleicher *et al.*, 1988; Cox *et al.*, 1996]. Die gleichzeitige Deletion beider Proteine führt dagegen zu einem verlangsamten Wachstum, einer reduzierten pinozytotischen Aktivität, einer Reduktion der Zellgröße, sowie zu einer fehlerhaften Morphogenese [Rivero *et al.*, 1999]. Auch die Aufnahme von *L. pneumophila* ist in der Doppelmutante stark beeinträchtigt. Darüber hinaus zeigt sich nach 72 Stunden Koinkubation mit *Legionella* eine deutlich reduzierte intrazelluläre Vermehrung der Bakterien. Der Phagozytosedefekt könnte auf die verringerte Motilität der Mutante zurückzuführen sein. Jedoch konnte die Zugabe einer grossen Bakterienmenge (MOI 100) diesen Defekt nicht ausgleichen. So ist vermutlich die durch die Mutationen hervorgerufene Instabilität des Zytoskeletts, die Ursache für die geringere Phagozytoserate. Zusätzlich zur

reduzierten Aufnahme könnte auch das Fehlen der Interaktion von α -Aktinin mit der phagosomalen Membran in den Mutanten verantwortlich für die mangelnde intrazelluläre Vermehrung sein [Furukawa und Fehheimer, 1997].

F-Aktin-verkappende und fragmentierende Proteine kontrollieren die Anzahl und Länge der Filamente. Die F-Aktin-verkappenden Proteine binden in der Regel an das schnell wachsende Plus-Ende der Aktinfilamente und verhindern so die spontane Anlagerung weiterer Aktin-Untereinheiten. Zu den verkappenden Proteinen zählen z.B. das heterodimere Protein Cap32/34 aus *D. discoideum* [Haus *et al.*, 1993], sowie das in höheren Eukaryonten vorkommende Gelsolin. Letzteres verfügt zusätzlich über F-Aktin-fragmentierende Aktivität [Azuma *et al.*, 1995]. Proteine, die sowohl fragmentierende als auch verkappende Aktivität besitzen, und auf der Ebene der Primärstruktur Homologie zu Gelsolin aufweisen, werden in der Gelsolin-Familie zusammengefasst. Das kürzlich in *Dictyostelium* entdeckte Protein Villidin gehört aufgrund seiner Eigenschaften, intrazellulären Lokalisation und Homologie zu Gelsolin ebenfalls zur Gelsolin-Familie [Gloss *et al.*, 2003]. Bei der Charakterisierung einer Villidin-minus Mutante konnte eine intakte Pino- und Phagozytose nachgewiesen werden. Auch die in dieser Arbeit durchgeführten Phagozytoseversuche mit *E. coli* zeigten keine Unterschiede zwischen der Villidin Mutante und dem AX2-Wildtyp. Die Phagozytose von *L. pneumophila* ist dagegen von der Funktion des Proteins abhängig. Die Deletion des Proteins führt zu einem 50%igen Rückgang in der Aufnahme der Bakterien. Eine mögliche Erklärung für den Aufnahmedefekt der Mutante findet sich in der Fähigkeit von Villidin, Aktinfilamente Ca^{2+} -Abhängig zu fragmentieren. In Gegenwart von Ca^{2+} wird durch eine Konformationsänderung in der C-terminalen Hälfte, die Aktin-Bindungsstelle in der N-terminalen Hälfte exponiert, womit die Fragmentierungsfunktion aktiviert wird. PIP_2 hemmt wiederum die Fragmentierungsaktivität durch die Dissoziation des Proteins am Plus-Ende des Filaments (Entkappungsmechanismus) [van Troys *et al.*, 1996]. Die aufeinander folgenden Fragmentierungs- und Entkappungszyklen beeinflussen die Geschwindigkeit der Aktin-Polymerisation. Die Deletion von Villidin führt zu einer verlangsamten Reorganisation des Aktinzytoskeletts, was sich negativ auf die Aufnahmerate der Bakterien auswirkt. Darüber hinaus akkumuliert Villidin an Membranen früher Phagosomen und trägt möglicherweise zu deren Bildung bei [Gloss *et al.*, 2003]. So dass neben dem Aufnahme-defekt, eine fehlerhafte Phagosombildung für die schlechte intrazelluläre Vermehrung der Bakterien verantwortlich sein könnte.

Das Membran-assoziierte aktinbindende Protein Comitín kolokalisiert mit Vesikel- und Golgi-Membranen in *Dictyostelium* und Säugetierzellen. In-vitro Experimente haben gezeigt,

dass es eine Mannose-spezifische Lektin-Aktivität besitzt [Skriwan *et al.*, 2002]. In Infektionsversuchen mit *L. pneumophila* führte die Deletion von Comitin zu einer verbesserten Aufnahme der Bakterien. Die Internalisierung von *E. coli* wird dagegen durch das Fehlen des Proteins negativ beeinflusst. So scheint Comitin an der natürlichen Abwehr der *Dictyostelium*-Zellen beteiligt zu sein. Die Fähigkeit des Proteins Vesikel-Membranen über Mannose-Reste an das Zytoskelett zu binden, könnte die Eigenschaften dieser Kompartimente verändern, und so die Aufnahme der Legionellen beeinflussen [Skriwan *et al.*, 2002; Schreiner *et al.*, 2002]. Einige aktinbindende Proteine werden aufgrund ihrer Vielzahl an Aufgaben nicht über die Aktininteraktion klassifiziert. Zu dieser Gruppe gehört das hochkonservierte Protein Coronin. In *D. discoideum* akkumuliert Coronin an Stellen von dynamischem Aktin-Aufbau [Goode *et al.*, 1999]. Die Deletion des Proteins hat in den Amöben Defekte in der Phagozytose, Pinozytose, Migration und Zytokinese zur Folge [Maniak *et al.*, 1995; Rauchenberger *et al.*, 1997]. Isoformen von Coronin tragen in Säugetierzellen zur Reorganisation der Plasmamembran und Phagosom-Biogenese bei [de Hostos, 1999]. Bei der Untersuchung der *Mycobacterium*-Infektion in Makrophagen konnte nachgewiesen werden, dass das humane Coronin-Homolog TACO das Überleben der Bakterien im Phagosom positiv beeinflusst [Ferrari *et al.*, 1999]. Die Analyse der Aufnahme von *Legionella* in *Dictyostelium*-Coronin-minus Zellen hat gezeigt, dass die Internalisierung der Bakterien von der Deletion des Proteins beeinträchtigt wird. Bei der in-vivo Beobachtung der intrazellulären Verteilung des GFP-markierten Coronins, konnte in dieser Arbeit eine spezifische Akkumulation des Proteins an den "phagocytic cups" beobachtet werden. Das Protein kann jedoch kurz nach der Aufnahme nicht mehr in der Nähe des frühen Phagosoms nachgewiesen werden. Dies korreliert mit der Beobachtung, dass die intrazelluläre Vermehrung von *L. pneumophila* in der Coronin-Mutante intakt bleibt. Da *Mycobacterium marinum* ebenfalls eine unveränderte Vermehrung in Coronin-minus Zellen aufweist [Solomon *et al.*, 2003], scheint die Funktion des Proteins in *Dictyostelium* und Säugetierzellen unterschiedlich zu sein.

Das *D. discoideum* DAip1 Protein gehört wie Coronin zur Familie der „WD-repeat“ Proteine [Neer *et al.*, 1994]. Diese Proteine bilden eine Propeller-Struktur aus, wodurch Bindungsstellen zum Vorschein kommen, die an dem Aufbau makromolekularer Komplexe teilnehmen. DAip1-minus Zellen zeigen Defekte, sowohl in der Makropinozytose als auch in der Phagozytose [Konzok *et al.*, 1999]. Unsere Untersuchungen konnten ebenfalls einen unspezifischen Aufnahmedefekt in der DAip1-Mutante nachweisen, da sowohl *Legionella* als auch *E. coli* in der Mutante schlechter aufgenommen werden. Die Beteiligung des Proteins an

der Regulation der Aktin-Depolymerisation ist möglicherweise für den Aufnahmedefekt verantwortlich

Mehrere zelluläre Proteine besitzen eine Reihe hochkonservierter Proteinbindender Module, die Protein-Protein Interaktionen ermöglichen und so eine wichtige Rolle bei verschiedenen zellulären Prozessen spielen. Die LIM-Proteine besitzen konservierte LIM-Module, dessen Bindung zu anderen Proteinen ihrer subzellulären Verteilung und Aktivität beeinflussen [Khurana *et al.*, 2002]. Die *Dictyostelium* LimC- und LimD-Proteine besitzen eine bzw. zwei solcher Domänen. Die Fusion von LimC und LimD mit dem Markerprotein GFP hat gezeigt, dass beide Proteine an den „phagocytic cups“ akkumulieren und innerhalb von 24 - 48 Stunden allmählich vom Phagosom abgetrennt werden. Darüber hinaus binden beide Proteine an F-Aktin in-vitro. Die Analyse von LimC und LimD-minus Zellen zeigte keine Veränderung des Wachstums oder der Phagozytose von *E. coli* [Khurana *et al.*, 2002]. Die Infektion der einzelnen Mutanten mit *L. pneumophila* zeigte ebenfalls keine Veränderung in der Aufnahme der Bakterien. Eine Doppelmutante beider Proteine konnte dagegen nur halb so viele Bakterien internalisieren wie der dazugehörige Wildtyp. Die funktionelle Redundanz der LimC- und LimD-Proteine ist eine mögliche Erklärung hierfür. Darüber hinaus zeigte der Vergleich mit der Internalisierung von *E. coli*, dass der beobachtete Aufnahmedefekt *Legionella*-spezifisch ist. Die Beteiligung der Lim-Proteine an der Rac1-Signalgebung, die zur Aktin-Polymerisation in Lamellipodien führt, ist möglicherweise für die Aufnahme der Legionellen notwendig. Weiterhin ist die intrazelluläre Vermehrung der Bakterien in der Doppelmutante signifikant reduziert. Da sowohl LimC als auch LimD mit dem frühen Phagosom assoziieren, tragen sie vermutlich zur Bildung der *Legionella*-spezifischen Vakuole bei.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Aufnahme von *Legionella* in *D. discoideum* über konventionelle Phagozytose stattfindet. Unsere Arbeit liefert im Gegensatz zu vorherigen Studien sowohl einen pharmakologischen als auch einen genetischen Beweis hierfür. Die Notwendigkeit des Aktinzytoskeletts für die Aufnahme der Legionellen in den *Dictyostelium*-Zellen wurde in dieser Arbeit ebenfalls bestätigt. Frühere Studien, die eine Aktin-unabhängige Aufnahme von Legionellen in Protozoen postulierten [King *et al.*, 1991; Moffat und Tompkins, 1992; Köhler *et al.*, 2000], basieren, wie bereits von Lu und Clarke [2005] vermutet, auf einer fehlerhaften Dosierung der Inhibitoren.

Spezifisch für die Internalisierung von *Legionella* ist die Notwendigkeit einer schnellen Reorganisation des Mikrofilamentsystems. Die Legionellen werden von den *Dictyostelium*-Zellen wesentlich schlechter aufgenommen als z.B. *E. coli*. Eine schlechte Adhärenz der

Bakterien an der Oberfläche der Amöben könnte die Ursache hierfür sein [Lu und Clarke, 2005]. Die schnelle Reorganisation des Zytoskeletts ermöglicht eine schnelle Bildung des „phagozytic cups“, was zu einer Erhöhung der Phagozytoserate beitragen könnte. Da Legionellen in der Umwelt nur als Parasiten von frei lebenden Amöben existieren können, sichert die erhöhte Aufnahme der Bakterien deren Überleben. Darüber hinaus korreliert eine hohe Phagozytoserate mit einer höheren intrazellulären Vermehrung der Bakterien. Es ist daher anzunehmen, dass Legionellen mit Hilfe des Dot/Icm-Systems Effektorproteine in die Wirtszellen injizieren, die eine Erhöhung der Phagozytoserate herbeiführen. Jedoch konnte bislang nicht nachgewiesen werden, dass die Legionellen in der Lage sind, ihre Internalisierung aktiv zu induzieren.

In Abb. 35 wird die Beteiligung der verschiedenen aktinbindenden Proteine an der Infektion mit *Legionella* zusammengefasst.

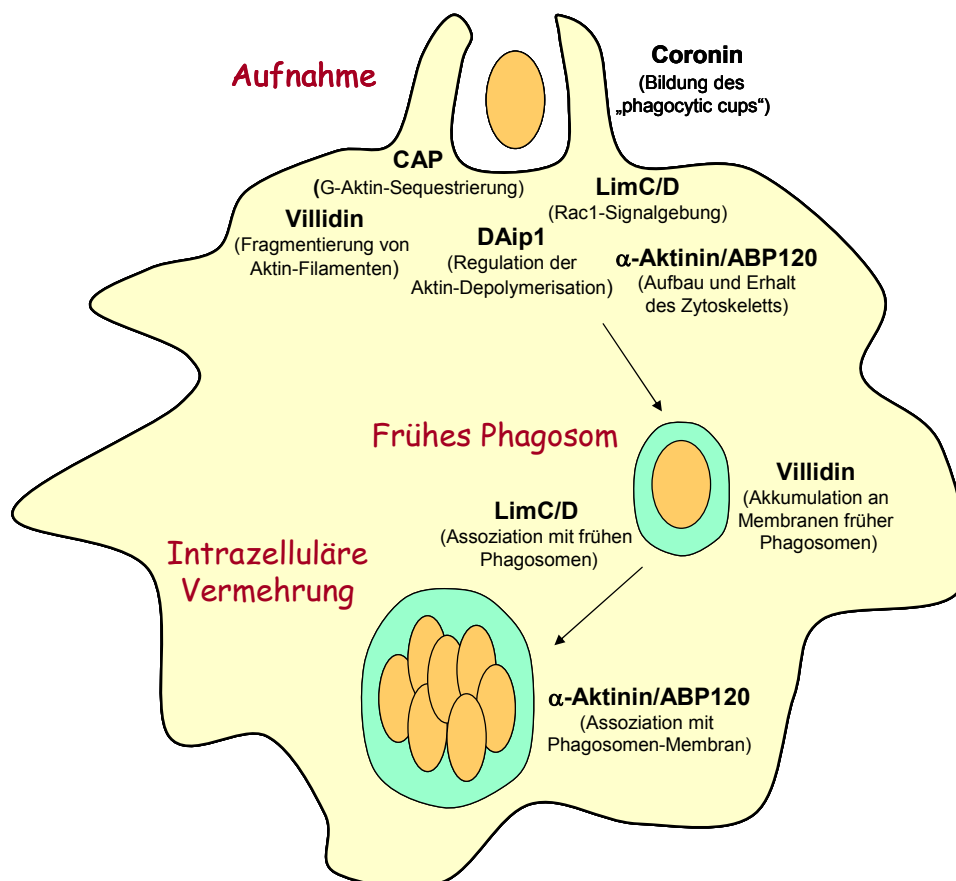


Abb. 35 Schematische Übersicht der an der *Legionella*-Infektion beteiligten aktinbindenden Proteine aus *D. discoideum*.

3 Die Phagozytose von *Legionella* wird über den PLC-Pathway reguliert

In *Dictyostelium* und Säugetierzellen geht der Beginn der Phagozytose mit der Bindung der Partikel an der Oberfläche der Phagozyten einher. Bei der Phagozytose von Bakterien interagieren bakterielle Liganden (Zellmembran assoziierte oder ins Medium abgesonderte Faktoren) mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche [Belyi, 2002]. Durch die Aktivierung eines Rezeptors wird eine Signalübertragungskaskade ausgelöst, die letztlich zur Umgestaltung des Aktinzytoskeletts führt. Bei den bislang in *D. discoideum* bekannten Rezeptoren für bakterielle Liganden, einem Lektin, einem unspezifischen Rezeptor und einem 130 kDa Glykoprotein, handelt es sich möglicherweise um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren [Peracino *et al.*, 1998]. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren gehören zur Superfamilie der heptahelikalen Transmembranproteine. Sie besitzen eine extrazelluläre oder transmembranäre Bindungsdomäne für einen Agonisten. Das G-Protein bindet an Aminosäuren der zweiten und dritten intrazellulären Schleife. Die Bindung von spezifischen extrazellulären Liganden induziert eine Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch dieser aktiviert wird [Hofmann und Ernst, 2001]. Der so aktivierte Rezeptor kann dann auf der Innenseite der Zellmembran interagierende heterotrimere G-Proteine durch Nukleotidaustauschkatalyse aktivieren. Die abdissoziierten Untereinheiten des G-Proteins sind für die Signaltransduktion verantwortlich [Offermanns, 2003]. Im weiteren Verlauf der Signalkaskade aktivieren die Untereinheiten verschiedene Enzyme der Plasmamembran, u.a. die Adenylylcyclasen, Guanylatcyclasen, PI3-Kinasen und Phospholipase C [Aderem, 2003; Belyi, 2002]. Die aktivierte Adenylylcyclase (ACA) ist in der Lage den intrazellulären Mediator cAMP zu bilden. Zielmoleküle von cAMP sind u.a. die cAMP-abhängige Protein-Kinase (PKA), zyklische Ionen-Kanäle und die Rap1 regulierende Guanin-Austauschfaktoren Epac1 und Epac2 [Kopperud *et al.*, 2003]. PI3-Kinasen katalysieren die Phosphorylierung der D3-Position des Inositol-Ringes von Phosphatidylinositol (PI), PI(4)P und PI(4,5)P₂ und werden über mehrere Tyrosin-Kinase-Rezeptoren aktiviert [Toker und Cantley, 1997]. Die Phosphoinositid-spezifische Phospholipase C (PLC) ermöglicht die Spaltung des PI-Biphosphats (PIP₂) in Inositoltrisphosphat (IP₃) und DAG, zwei wichtige Botenstoffe, die der Freisetzung von Ca²⁺ aus dem ER bzw. der Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) dienen [Underhill und Ozinsky, 2002]. Die Beteiligung von Ca²⁺ an der Regulation der Phagozytose in Säugetierzellen und *D. discoideum* ist bereits in mehrere Studien bewiesen worden. Auch in dieser Arbeit wurde die Rolle von Kalzium an der Regulation der Aufnahme von *Legionella* untersucht und wird im nächsten Abschnitt im Detail diskutiert.

Die Signalkaskaden der an G-Protein gekoppelte Rezeptoren werden in Abb. 36 schematisch dargestellt.

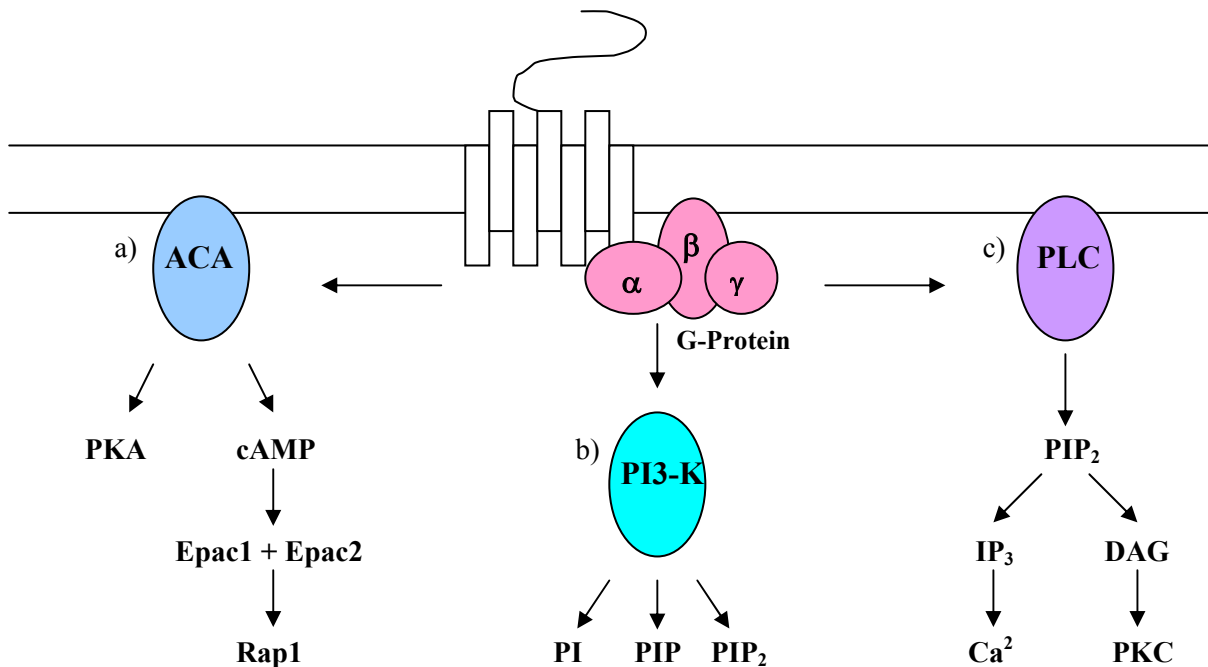


Abb. 36 a) Aktivierte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren stimulieren die Adenylylcyclase (ACA) der Plasmamembran, die daraufhin cAMP bildet. Das cAMP interagiert mit dem Guanin-Austauschfaktoren Epac1 und Epac2, verantwortlich für die Regulation von Rap1, ein Regulator des Aktinzytoskeletts. b) PI3-Kinasen (PI3-K) katalysieren die Phosphorylierung der D3-Position des Inositol-Ringes von Phosphatidylinositol (PI), PI(4)P und PI(4,5)P₂. c) Die aktivierte Phospholipase C (PLC) katalysiert die Hydrolyse des in der Plasmamembran vorkommendes PIP₂ in IP₃ und DAG. Während DAG die Proteinkinase C (PKC) aktiviert, mobilisiert IP₃ die Ca²⁺-Freisetzung aus den Speichern des ERs (modifiziert nach Selbie und Hill, 1998).

Mittels zellulärer Inhibitoren und *Dictyostelium*-Mutanten, wurden in dieser Arbeit die bei der Aufnahme von *Legionella* beteiligten Rezeptoren und Signalkaskaden näher charakterisiert.

D. discoideum besitzt 11 verschiedene α-Untereinheiten und nur eine große Gβ-Untereinheit [van Es und Devreotes, 1999]. Die Deletion der Gβ-Untereinheit führt demzufolge zu einem nicht funktionalen G-protein [Jin *et al.*, 1998]. Der von *Legionella* während der Aufnahme beanspruchte Rezeptor ist bislang noch nicht bekannt. Um feststellen zu können, ob G-Protein gekoppelte Rezeptoren an der Aufnahme von Legionellen beteiligt sind, wurde die Internalisierung der Bakterien in einer *Dictyostelium* Gβ-Mutante untersucht. Die extreme Reduktion der Phagozytoserate in der Mutante beweist die Notwendigkeit von G-Protein gekoppelte Rezeptoren für die Aufnahme von *L. pneumophila*. Peracino *et al.* [1998] konnten

feststellen, dass der Phagozytosedefekt in der G β -Mutante nicht auf einer defizienten Bindung der Bakterien an der Zelloberfläche beruht, sondern auf der Unfähigkeit der Zellen einen „phagocytic cup“ auszubilden.

Das zytosolische Protein PiaA dient der Adenylylcyclase-Regulation und ist somit an der G-Protein vermittelten Signalgebung beteiligt [Chen *et al.*, 1997; Lindner und Schultz, 2003]. Die Analyse der Aufnahme von *L. pneumophila* in einer *Dictyostelium* PiaA-Mutante zeigt eine signifikante Reduktion in der Phagozytose der Bakterien im Vergleich zum Wildtyp. Die unveränderte Aufnahme von *E. coli* in der PiaA-Mutante deutet auf einen *Legionella*-spezifischen Defekt hin. Demzufolge ist auch der intrazelluläre Mediator cAMP von Bedeutung für die Internalisierung von *Legionella* in *D. discoideum*. Die unveränderte Aufnahme der Bakterien in einer *Dictyostelium* PKA-Mutante belegt, dass während der Phagozytose von *L. pneumophila* nicht PKA als Zielmolekül von cAMP dient. Vorausgehende Studien haben gezeigt, dass in *D. discoideum* Rap1 die Phagozytose positiv reguliert, während es die Makropinozytose unterdrückt [Seastone *et al.*, 1999]. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um die Rolle von Epac1 und Epac2 an der Phagozytose von *Legionella* endgültig aufzuklären.

In humanen Makrophagen sind PI3-Kinasen unentbehrlich für die FcR-vermittelte Phagozytose [Ninomiya *et al.*, 1994]. Das Enzym nimmt nicht an der Bindung der Partikel oder an der Bildung des „phagocytic cups“ teil, sondern ermöglicht die Membranextension und die Bildung des frühen Phagosoms [Araki *et al.*, 1996; Cox *et al.*, 1999]. In *D. discoideum* ist das von der PI3-Kinase erzeugte PI(3,4,5)P₃ notwendig für die Makropinozytose, hat jedoch keinerlei Einfluss auf die Phagozytose [Buczynski *et al.*, 1997; Cardelli, 2001]. Die unveränderte Aufnahme von *L. pneumophila* in Gegenwart von den PI3-Kinase spezifischen Inhibitoren Wortmannin und LY294002, ist ein weiterer Beweis dafür, dass die Legionellen in den Amöben über Phagozytose aufgenommen werden. In humanen Monozyten erfolgt die Aufnahme von *Legionella* ebenfalls unabhängig von der Aktivität der PI3-Kinasen [Khelef *et al.*, 2001]

Sowohl in humanen Makrophagen als auch in *D. discoideum* ist die Phagozytose von der Aktivität der PLC abhängig [Peracino *et al.*, 1998; Seastone *et al.*, 1999; Botelho *et al.*, 2000]. Dementsprechend führt die Hemmung der PLC durch den spezifischen Inhibitor U73122 zu einer drastischen Reduktion der Phagozytoserate von *Legionella* in *D. discoideum*. Der Einsatz eines weiteren Inhibitors der PLC- β , Neomycinsulfat, bestätigte die Notwendigkeit des Enzyms für die Aufnahme der Bakterien. In humanen Makrophagen ist vermutet worden, dass der Rückgang der Phagozytose nach der Hemmung der PLC auf die fehlende

Aktivierung der PKC zurückzuführen ist [Botelho *et al.*, 2000]. Um festzustellen ob dieses auch bei der Aufnahme von *Legionella* der Fall ist, wurden Infektionsversuche in der Gegenwart von den PKC-Inhibitoren Calphostin C und Staurosporin durchgeführt. In beiden Fällen konnte eine Reduktion der Aufnahme von Legionellen beobachtet werden. Das wichtigste Substrat der PKC, das myristoylierte Alanin-reiche C Kinase Substrat (MARCKS), ist an der Regulation der Aktinstruktur in der Plasmamembran beteiligt. Darüber hinaus wird MARCKS während der Phagozytose schnell phosphoryliert und akkumuliert am frühen Phagosom, mit einer ähnlichen Kinetik wie F-Aktin [Aderem und Underhill, 1999]. So ist MARCKS ein möglicher Regulator der Aktinstruktur während der Aufnahme von *Legionella*. Ein weiterer Signaltransduktionsweg in Eukaryontenzellen ist die Phosphorylierungskaskade von Signalproteinen. Dabei werden in der Regel Serine, Threonine und Tyrosine phosphoryliert [Bliska und Falkow, 1993]. Tyrosinkinase-Inhibitoren blockieren in humanen Makrophagen die Fc γ -Rezeptor vermittelte Phagozytose [Allen und Aderem, 1996]. Auch die Aufnahme von *Legionella* in humanen Monozyten geht mit der Phosphorylierung verschiedener Wirt- und Bakterienproteine einher. Darüber hinaus zeigten Immunoblot-Analysen unterschiedliche Phosphorylierungsmuster zwischen virulenten und avirulenten Legionellen [Coxon *et al.*, 1998]. Die Phosphorylierung findet innerhalb der ersten 15 min Infektion statt, wodurch eine Beteiligung an den frühen Ereignissen der Phagozytose vermutet werden kann. Bei der Internalisierung von *L. pneumophila* in humanen Fibroblasten der Lunge konnte ebenfalls die Phosphorylierung mehrerer Proteine beobachtet werden [Susa und Marre, 1999]. Im Gegensatz dazu wird bei der Aufnahme von *Legionella* in *H. vermiformis* und *A. polyphaga* der 170-kDa Lektinrezeptor Tyrosin-dephosphoryliert [Harb *et al.*, 1998; Venkatamaran *et al.*, 1998]. In *D. discoideum* findet die Internalisierung von Partikeln ohne die Tyrosinkinase-Aktivität statt [Seastone *et al.*, 1999].

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe des Tyrosinkinase-Inhibitors Genistein, die Beteiligung des Enzyms an der Aufnahme von *Legionella* untersucht. Im Gegensatz zur konventionellen Phagozytose ist die Aktivität der Tyrosinkinasen notwendig für die Aufnahme der Legionellen in *D. discoideum*. Infektionsversuche mit *E. coli* zeigten, dass der beobachtete Effekt des Inhibitors auf die Aufnahme von *Legionella* beschränkt ist. Die Untersuchung der Expression Tyrosin-phosphorylierter Proteine mittels SDS-PAGE und Westernblot zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion mit *L. pneumophila* führte jedoch zu keiner eindeutigen Identifizierung phosphorylierter Proteine. So sind weitere Untersuchungen notwendig, insbesondere mittels 2D-Gelelektrophorese, um eine eindeutige Charakterisierung dieses Signalweges zu erreichen.

4 Die Ca^{2+} -Signaltransduktion ist unentbehrlich für die Aufnahme von *Legionella pneumophila*

Ca^{2+} ist vor cAMP der häufigste intrazelluläre Mediator der Zelle. Zahlreiche zelluläre Prozesse werden über Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) reguliert. Die Aktivierung des „respiratory burst“, die Stickstoffoxid-Produktion, die Sekretion antimikrobieller Granula und die Synthese proentzündlicher Mediatoren geht in professionellen Phagozyten mit einer Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ einher [Denlinger *et al.*, 1996; Tapper, 1996; Kim-Park *et al.*, 1997]. Eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, herbeigeführt durch die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER-Speichern, ist während der Fc γ -vermittelten Phagozytose in Makrophagen beobachtet worden [Myers und Swanson, 2002]. In *D. discoideum* führt die Limitierung von intra- und extrazellulären Ca^{2+} zu einer Hemmung der Phagozytose [Peracino *et al.*, 1998; Yuan *et al.*, 2001].

In dieser Arbeit wurde die Ca^{2+} -vermittelte Signaltransduktion während der Aufnahme von *Legionella* in *D. discoideum* und humanen Makrophagen näher charakterisiert. Die Bindung des im extrazellulären Medium verfügbaren Ca^{2+} durch EGTA und EDTA, führt zu einer signifikanten Reduktion der Aufnahme von Legionellen in *D. discoideum* und U937-Zellen. Der gleiche Effekt wird bei der Aufnahme von *E. coli* in Gegenwart beider Chelatbildner beobachtet. So ist die Verfügbarkeit von Ca^{2+} im extrazellulären Medium, sowohl in *D. discoideum* als auch in humanen Makrophagen von Bedeutung für die konventionelle Phagozytose. Der Ca^{2+} -Einstrom von aussen ins Innere der Zelle findet über Speicher-gesteuerte Ca^{2+} -Känele der Plasmamembran statt [Parekh, 2006]. Dies bedeutet, dass durch den Füllungsstatus der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher, der Ca^{2+} -Einstrom von aussen in die Zelle reguliert wird (kapazitativer Ca^{2+} -Einstrom). Das ER stellt die wichtigste Ca^{2+} -Quelle für die Ca^{2+} -Signalgebung dar. In dieser Arbeit konnte bewiesen werden, dass die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER, herbeigeführt durch IP_3 , für die Aufnahme von *L. pneumophila* erforderlich ist. Die Notwendigkeit von extrazellulärem Ca^{2+} für das Wiederauffüllen der Speicher im ER erklärt die Effekte von EDTA und EGTA. Um dieses Ergebnis zu bestätigen wurden die intrazellulären Speicher mit Hilfe von Ca^{2+} -ATPase-Blockern entleert. Dabei wird durch die Hemmung der Sarkoplasmatischen/Endoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase (SERCA) die Wiederaufnahme des freien intrazellulären Ca^{2+} in die ER-Speicher unterbunden. Sowohl in *D. discoideum* als auch in humanen Makrophagen führt die Hemmung der SERCA durch Thapsigargin zu einer Dosis-abhängigen Reduktion in der Aufnahme von *Legionella* und *E. coli*. Eine weitere Möglichkeit die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher allmählich zu entleeren ist

die Zugabe von intrazellulärem Chelatbildner, wie z.B. BAPTA-AM. Die Substanz bindet das freie intrazelluläre Ca^{2+} , welches dann durch Ca^{2+} aus den Speichern ersetzt wird. Nach einigen Minuten sind die Speicher leer und der kapazitative Ca^{2+} -Einstrom wird aktiviert. Auch in diesem Fall bewirkt BAPTA-AM eine drastische Reduktion in der Aufnahme der Bakterien.

Das für die Aufnahme von *Legionella* notwendige Ca^{2+} -Signal, sollte mit Hilfe von intrazellulären Ca^{2+} -Messungen näher charakterisiert werden. Hierfür wurden die *Dictyostelium*-Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-Dextran elektroporiert und anschließend mit den Legionellen infiziert. Die Fähigkeit der Zellen, als Antwort auf einen extrazellulären Stimuli, Ca^{2+} zu mobilisieren wurde durch die Zugabe von Thapsigargin und den Kalzium-Ionophor A23187 überprüft. Beide Substanzen bewirken einen starken, lang anhaltenden Ca^{2+} -Einstrom ins Zellzytosol. Bei der Zugabe von *L. pneumophila* konnte jedoch keine Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nachgewiesen werden. Möglicherweise ist das von *L. pneumophila* induzierte Ca^{2+} -Signal zu schwach oder findet nur lokal statt, sodass die Empfindlichkeit des Indikators nicht ausreicht um es zu ermitteln. Auch eine Sequestrierung des Fura-2-Indikators in zelluläre Kompartimente könnte die Ursache für das fehlende Signal sein [Simpson, 2006]. Die UV-Bestrahlung während der Messung kann unter Umständen den Verfall des Fura-2-Indikators herbeiführen. Dabei entsteht eine fluoreszierende Substanz, die jedoch nicht mit Ca^{2+} interagiert, und so zu fehlerhaften Messungen führt [Becker und Fay, 1987]. Um die Nachteile des Fura-2-Indikators zu umgehen, könnten die intrazellulären Ca^{2+} -Messungen mit Hilfe von GFP-basierte Ca^{2+} -Indikatoren durchgeführt werden, die eine weit höhere Empfindlichkeit aufweisen [Simpson, 2006].

In humanen Makrophagen dagegen war es möglich, mit Hilfe des Fura-2 Indikators die Ca^{2+} -Signaltransduktion während der Aufnahme von *Legionella* zu untersuchen. Unmittelbar nach der Zugabe der Bakterien zu den Fura-2-beladenen Makrophagen fand eine signifikante Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ statt. Dabei war die Bindung der Bakterien an der Oberfläche der Wirtszellen ausreichend, um ein Ca^{2+} -Signal auszulösen. Dies korreliert mit der Beobachtung, dass bakterielle Liganden der Legionellen mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der Wirtszelle interagieren. Die freigesetzten Untereinheiten des G-Proteins induzieren die Aktivierung der PLC und folglich die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER.

Eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was bislang in humanen Makrophagen mit der Fc γ -vermittelten Phagozytose in Verbindung gebracht worden [Greenberg *et al.*, 1991; Edberg *et al.*, 1995].

Um festzustellen, ob auch dieses für die Aufnahme von *Legionella* in Makrophagen zutrifft, wurden die Bakterien vor der Zugabe zu den Zellen für 30 min mit anti-*Legionella* Antikörper

opsonisiert. Ein langanhaltendes Ca^{2+} -Signal konnte auch in diesem Fall beobachtet werden. Jedoch führte die Inkubation der Bakterien mit Serum zum selben Ergebnis, sodass bei der Aufnahme von *Legionella* in U937-Zellen die Opsonisierung der Bakterien entbehrlich für die Ca^{2+} -Signaltransduktion ist. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass bekannte Virulenzfaktoren von *L. pneumophila*, wie die Flagelle und das Mip-Protein, sowie das *ligA*-Gen, nicht für die Aktivierung des Rezeptors und die nachfolgende Ca^{2+} -Signaltransduktion verantwortlich sind. Da der erste Kontakt der Legionellen mit der Wirtszelle über einen Typ IV Pilus erfolgt [Stone und Abu Kwaik, 1999; Rossier *et al.*, 2004], ist dieser möglicherweise für die Interaktion mit dem G-Protein gekoppelten Rezeptor verantwortlich. Die Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ während der Infektion mit einer Typ IV Pilus-Mutante oder eine Hsp60-Mutane könnte der Klärung dieser Frage dienen. Die Durchführung der Messungen mit apathogenen *Legionella*-Stämmen, sowie *E. coli* und *Salmonella* zeigt, dass auch andere Bakterien den selben Signaltransduktionsweg während der Aufnahme in humane Makrophagen in Anspruch nehmen.

5 Calreticulin und Calnexin sind an der Aufnahme und intrazellulären Vermehrung von *Legionella* beteiligt

Die Phagozytose und anschließende Phagolysosom-Bildung dient der Abtötung und dem Abbau pathogener Mikroorganismen. Jedoch haben einige intrazelluläre Pathogene Strategien entwickelt, um den für sie tödlichen Transport zum Lysosom zu unterbinden und so das Überleben und die Vermehrung innerhalb des Wirtes zu ermöglichen [Duclos und Desjardins, 2000]. Aufgrund ihrer Strategie und Lokalisierung innerhalb der Wirtszelle können diese Pathogene in vier Gruppen eingeteilt werden (siehe Tabelle 7) [Scott *et al.*, 2003].

Tabelle 7. Überlebensstrategien intrazellulärer Pathogene [Scott *et al.*, 2003].

Strategie	Pathogen	Mechanismus	Referenz
Hemmung der Phagosomreifung	<i>Salmonella enterica</i> sv. Typhimurium	-Inhibition der Vesikelfusion durch SpiC -Umgestaltung der <i>Salmonella</i> -Vakuole durch SifA	Beuzon <i>et al.</i> , 2000 Brummell <i>et al.</i> , 2002 Ruiz-Albert <i>et al.</i> , 2002 Uchiya <i>et al.</i> , 1999
	<i>Mycobacterium</i> sp.	-Modulation der SNARE-Proteine -Hemmung der Rekrutierung von EEA1 durch ManLAM	Fratti <i>et al.</i> , 2001 Fratti <i>et al.</i> , 2002 Perskvist <i>et al.</i> , 2002

Hemmung der Phagosom-reifung	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-Porine (PorB) machen die Phagosomenmembran durchlässig und hemmen die Reifung	Lorenzen <i>et al.</i> , 2000 Mosleh <i>et al.</i> , 1998
	<i>Leishmania donovani</i>	-Keine Aktin-Depolymerisation des Phagosoms -Hemmung der Phagosom-Lysosom Fusion durch Lipophosphoglycan (LPG)	Holm <i>et al.</i> , 2001 Dermine <i>et al.</i> , 2000 Scianimanico <i>et al.</i> , 1999
Zerstörung des Phagosoms und Vermehrung im Zytoplasma	<i>Shigella flexneri</i>	-Zerstörung des Phagosoms durch IcsB, IpaB und IpaC	Allaoui <i>et al.</i> , 1992 Page <i>et al.</i> , 1999
	<i>Listeria monocytogenes</i>	-Listeriolysin O durchdringt und zerstört das Phagosom -Sekretion von PI-PLC ins Wirtszytoplasma zerstört das Phagosom	Gaillard <i>et al.</i> , 1987 Goldfine <i>et al.</i> , 2000 Portnoy <i>et al.</i> , 2002
	<i>Rickettsia prowazekii</i>	-Sekretierte Phospholipase-A2 destabilisiert das Phagosom	Walker <i>et al.</i> , 2001
	<i>Trypanosoma cruzi</i>	-Direkte Rekrutierung der Lysosomen nach der Invasion -Lyse der Vakuole durch Tc-Tox	Andrews, 1993 Wilkowsky <i>et al.</i> , 2002
Bildung eines spezialisierten Kompartiments	<i>Chlamydia trachomatis</i>	-Bildung einer durchlässigen Inklusion-Vakuole	Hackstadt <i>et al.</i> , 1996 Grieshaber <i>et al.</i> , 2002
	<i>Legionella pneumophila</i>	-Bildung eines RER-assoziierten Phagosoms, vermittelt durch das Dot/Icm-System	Tilney <i>et al.</i> , 2001 Nagai <i>et al.</i> , 2002 Robinson and Roy, 2006
	<i>Afpia felis</i>	-Gelangt direkt nach der Aufnahme in ein nicht-endozytisches Kompartiment	Luhrmann <i>et al.</i> , 2001
	<i>Toxoplasma gondii</i>	-Bildung einer nicht-endozytischen Vakuole, die mit Mitochondrien und ER assoziiert	Mordue <i>et al.</i> , 1999 Carruthers, 2002
Vermehrung im sauren Phagosom	<i>Coxiella burnettii</i>	-Bildung eines reifen Phagolysosoms, -niedriger pH erforderlich für die Vermehrung	Baca <i>et al.</i> , 1994 Heinzen <i>et al.</i> , 1996 Beron <i>et al.</i> , 2002

L. pneumophila wandelt das Phagosom in eine spezialisierte Vakuole um, die keinen endozytischen Charakter hat und kaum angesäuert wird [Horwitz, 1983]. Die für die Umwandlung des Phagosoms notwendigen Vorgänge finden unmittelbar nach der Aufnahme der Bakterien statt. Bereits 5 min nach Beginn der Infektion wird das *Legionella*-Phagosom von Wirtszellorganellen umgeben, wie Mitochondrien, Vesikel und RER [Swanson und Isberg, 1995]. Obwohl die Bedeutung dieser Assoziationen nicht ganz geklärt ist, sind

Legionella-Mutanten, die dazu nicht in der Lage sind, unfähig sich intrazellulär zu vermehren [Tilney *et al.*, 2001]. Bei den Vesikeln handelt es sich um frühe Sekretionsvesikel, die beim Verlassen des ERs zu den Phagosomen rekrutiert werden. Effektormoleküle, injiziert durch das Dot/Icm-System, sind möglicherweise für diesen Vorgang zuständig [Kagan und Roy, 2002; Robinson und Roy, 2006]. Der genaue Zeitpunkt der ersten Interaktion von Bestandteilen des ERs mit dem *Legionella*-Phagosom ist allerdings sehr umstritten.

Die Extension der Plasmamembran, erforderlich für die Bildung des „phagocytic cups“, bedarf einer extrem großen Membranmenge. Da professionelle Phagozyten in der Lage sind, Partikel zu internalisieren die größer sind als der eigene Zellumfang, wäre es unmöglich diese Partikel nur mit Plasmamembran zu umhüllen. Es werden somit andere Membranquellen für die Phagozytose benötigt. Mehrere Studien haben bereits gezeigt, dass in Makrophagen das ER als Membranquelle für die Bildung des „phagocytic cups“ dient [Garin *et al.*, 2001; Gagnon *et al.*, 2002; Desjardins, 2003; Jutras und Desjardins, 2005; Hatsuzawa *et al.*, 2006]. Darüber hinaus werden viele der Proteine die sich auf der Oberfläche der Phagosomen befinden, z.B. Bestandteile des MHC-I- Komplexes, im ER synthetisiert [Jutras und Desjardins, 2005]. Eine ER-vermittelte Phagozytose ist jedoch nicht ausschließlich in Zellen des Immunsystems beobachtet worden. Auch in *D. discoideum* ist eine Beteiligung der ER-Proteine Calreticulin (CRT) und Calnexin (CNX) an der Bildung des „phagocytic cups“ beobachtet worden [Müller-Taubenberger *et al.*, 2001].

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von CRT- und CNX-GFP exprimierenden *Dictyostelium*-Zellen, sowie CRT- und CNX-minus Zellen, die Beteiligung des ERs an der Aufnahme und intrazelluläre Vermehrung von *L. pneumophila* untersucht.

Im Konfokalen Laser-Scanning Mikroskop wurden Bilderreihen (siehe Ergebnisse Kap. 4) von lebenden *Dictyostelium*-Zellen aufgenommen, die GFP-fusionierte-CRT- und GFP-fusionierte-CNX-Proteine exprimieren. Dabei konnte festgestellt werden, dass beide Proteine in den „outgrowing arms“ des „phagocytic cups“ akkumulieren und somit an dessen Bildung teilnehmen.

Diese Beobachtungen stimmen mit denen von Derre und Isberg [2004] überein, die eine Rekrutierung von Calnexin zum *Legionella*-Phagosom innerhalb der ersten 15 min Infektion beobachten konnten. Die Gruppe um Craig Roy konnte dagegen eine Assoziation des ERs mit dem *Legionella*-Phagosom erst nach einer Stunde Infektion nachweisen [Robinson und Roy, 2006]. Auch in einer kürzlich erschienenen Studie von Lu und Clarke [2005] wird eine direkte Beteiligung des ERs an der Phagozytose der Bakterien in *D. discoideum*

ausgeschlossen. Diese Ergebnisse basieren jedoch ausschließlich auf mikroskopischen Untersuchungen.

In der vorliegenden Arbeit wird zum ersten Mal neben der mikroskopischen auch eine genetische Analyse der Beteiligung von ER-Proteinen an der Phagozytose von *Legionella* vorgenommen. Infektionsversuche haben gezeigt, dass bei der Aufnahme von *L. pneumophila* in der CNX-Mutante 33,61% weniger Bakterien internalisiert wurden, als im Wildtyp. In der CRT-Mutante ist die Beeinträchtigung der phagozytischen Aktivität noch deutlicher, da im Vergleich zum Wildtyp nur 43,34% der Bakterien aufgenommen werden. Eine bereits existierende CRT/CNX Doppelmutante wurde nicht untersucht, da diese aufgrund neuer spontaner Mutationen einen veränderten Phänotyp aufwies. Jedoch konnte gezeigt werden, dass beide Proteine für die Aufnahme der Bakterien in *D. discoideum* notwendig sind. Möglicherweise ist die Ca^{2+} -Speicherkapazität von CNX und CRT verantwortlich für den beobachteten Effekt. Müller-Taubenberger *et al.*, haben postuliert, dass CRT und CNX in der Lage sind, die Ca^{2+} -Homeostase in der zytosplasmatischen Umgebung des „phagocytic cups“ zu beeinflussen. Diese Hypothese korreliert mit unserer Beobachtung, dass der Ca^{2+} -Signalweg für die Aufnahme der Legionellen von Bedeutung ist. Weiterhin sind CRT und CNX Ca^{2+} -bindende Chaperone des ERs verantwortlich für die korrekte Faltung neu synthetisierter Glykoproteine [Trombetta und Helenius, 1998; Parodi, 2000]. Wirtsproteine die an der *Legionella*-Infektion beteiligt sind, könnten eventuell von der Chaperon-Aktivität von CNX und CRT abhängig sein.

In dieser Arbeit konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass sowohl CRT als auch CNX für die intrazelluläre Replikation von *Legionella* notwendig sind. Bereits 24 Stunden nach Beginn der Infektion mit *Legionella* kann in der CRT-Mutante eine verminderte intrazelluläre Vermehrung der Bakterien beobachtet werden. Nach 72 Stunden Infektion beträgt die Vermehrungsrate der Bakterien lediglich eine halbe log-Stufe im Vergleich zu 2-3 log-Stufen Vermehrung im Wildtyp. In der CNX-Mutante tritt der Wachstumsdefekt erst nach 48 Stunden Infektion auf, und führt zu einer signifikanten Reduktion der Kolonienzahlen im Vergleich zum Wildtyp. Die Reduktion der Phagozytoserate in den Mutanten könnte eine mögliche Erklärung für die schlechte intrazelluläre Vermehrung der Bakterien sein.

Diese Ergebnisse liefern zum ersten Mal einen genetischen Beweis für die Beteiligung von ER-Bestandteilen an der Phagozytose von *Legionella* in *D. discoideum*. Somit wurde ein wichtiger Beitrag zur Aufklärung der komplexen Interaktion zwischen *Legionella* und dem ER der Wirtszelle geleistet.

In Abb. 37 werden die an der *Legionella*-Infektion beteiligten Wirtszellproteine und Zellsignalwege zusammengefasst.

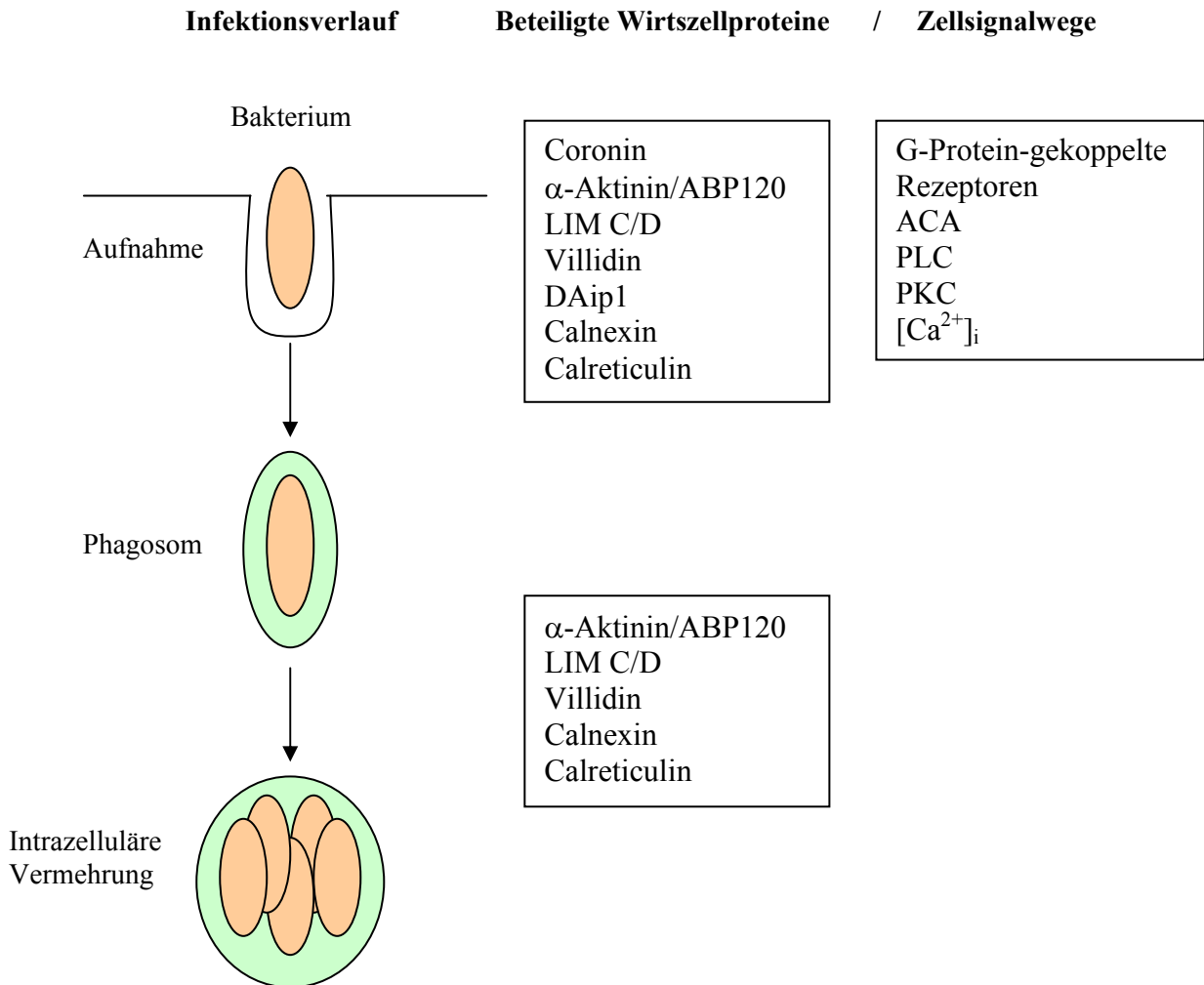


Abb. 37 Schematische Übersicht der Wirtszellproteine und Zellsignalwege die an der *Legionella*-Infektion in *D. discoideum* beteiligt sind.

LITERATURVERZEICHNIS

Abu Kwaik Y, Fields BS, Engleberg NC. Protein expression by the protozoan *Hartmannella vermiformis* upon contact with its bacterial parasite *Legionella pneumophila*. *Infect Immun.* **1994**; 62(5):1860-6.

Abu Kwaik Y, Pederson LL. The use of differential display-PCR to isolate and characterize a *Legionella pneumophila* locus induced during the intracellular infection of macrophages. *Mol Microbiol.* **1996**; 21(3):543-56.

Abu Kwaik Y, Gao LY, Harb OS, Stone BJ. Transcriptional regulation of the macrophage-induced gene (*gspA*) of *Legionella pneumophila* and phenotypic characterization of a null mutant. *Mol Microbiol.* **1997**; 24(3):629-42.

Abu-Zant A, Santic M, Molmeret M, Jones S, Helbig J, Abu Kwaik Y. Incomplete activation of macrophage apoptosis during intracellular replication of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun.* **2005**; 73(9):5339-49.

Abu-Zant A, Asare R, Graham JE, Abu Kwaik Y. Role for RpoS but not RelA of *Legionella pneumophila* in modulation of Phagosome biogenesis and adaptation to the phagosomal microenvironment. *Infect Immun.* **2006**; 74(5):3021-6.

Adeleke A, Pruckler J, Benson R, Rowbotham T, Halablab M, Fields B. *Legionella*-like amebal pathogens-phylogenetic status and possible role in respiratory disease. *Emerg Infect Dis.* **1996**; 2(3):225-30.

Adeleke AA, Fields BS, Benson RF, Daneshvar MI, Pruckler JM, Ratcliff RM, Harrison TG, Weyant RS, Birtles RJ, Raoult D, Halablab MA. *Legionella drozanskii* sp. nov., *Legionella rowbothamii* sp. nov. and *Legionella fallonii* sp. nov.: three unusual new *Legionella* species. *Int J Syst Evol Microbiol.* **2001**; 51:1151-1160.

Aderem A. Phagocytosis and the inflammatory response. *J Infect Dis.* **2003**; 187(2):340-5.

Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol.* **1999**; 17:593-623.

Allen LA, Aderem A. Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J Exp Med.* **1996**; 184(2):627-37.

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.* **2000**; 68(11):6431-40.

Aguado-Velasco C, Bretscher MS. Circulation of the plasma membrane in *Dictyostelium*. *Mol Biol Cell.* **1999**; 10(12):4419-27.

Amer AO, Swanson MS. Autophagy is an immediate macrophage response to *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol.* **2005**; 7(6):765-78.

Aragon V, Kurtz S, Flieger A, Neumeister B, Cianciotto NP. Secreted enzymatic activities of wild-type and *pilD*-deficient *Legionella pneumophila*. *Infect Immun.* **2000**; 68(4):1855-63.

Aragon V, Kurtz S, Cianciotto NP. *Legionella pneumophila* major acid phosphatase and its role in intracellular infection. *Infect Immun.* **2001**; 69(1):177-85.

Araki N, Hatae T, Furukawa A, Swanson JA. Phosphoinositide-3-kinase-independent contractile activities associated with Fc γ -receptor-mediated phagocytosis and macropinocytosis in macrophages. *J Cell Sci.* **2003**; 116(2):247-57.

Arima H, Kinoshita T, Ibrahim HR, Azakami H, Kato A. Enhanced secretion of hydrophobic peptide fused lysozyme by the introduction of N-glycosylation signal and the disruption of calnexin gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **1998**; 440(1-2):89-92.

Aubry L, Firtel R. Integration of signaling networks that regulate *Dictyostelium* differentiation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **1999**; 15:469-517.

Azuma T, Witke W, Stossel TP, Hartwig JH, Kwiatkowski DJ. Gelsolin is a downstream effector of rac for fibroblast motility. *EMBO J.* **1998**; 17(5):1362-70.

Bachman MA, Swanson MS. RpoS co-operates with other factors to induce *Legionella pneumophila* virulence in the stationary phase. *Mol Microbiol.* **2001**; 40(5):1201-14.

Bachman MA, Swanson MS. The LetE protein enhances expression of multiple LetA/LetS-dependent transmission traits by *Legionella pneumophila*. *Infect Immun.* **2004**; 72(6):3284-93.

Bandyopadhyay P, Steinman HM. Catalase-peroxidases of *Legionella pneumophila*: cloning of the katA gene and studies of KatA function. *J Bacteriol.* **2000**; 182(23):6679-86.

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.* **2003**; 71(8):4526-35.

Bandyopadhyay P, Xiao H, Coleman H, Price-Whelan A, Steinman HM. Icm/Dot-Independent entry of *Legionella pneumophila* into Amoeba and Macrophage hosts. *Infect Immun.* **2004**; 72(8):4541-51.

Barker J, Scaife H, Brown MR. Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of *Legionella pneumophila*. *Antimicrob Agents Chemother.* **1995**; 39(12):2684-8.

Bellinger-Kawahara C, 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.* **1990**; 172(4):1201-10.

Belyi IF. Actin machinery of phagocytic cells: universal target for bacterial attack. *Microsc Res Tech.* **2002**; 57(6):432-40.

Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. Signal transduction. The calcium entry pas de deux. *Science.* **2000**; 287(5458):1604-5.

Berridge MJ. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium.* **2002**; 32(5-6):235-49.

Birtles RJ, Rowbotham TJ, Raoult D, Harrison TG. Phylogenetic diversity of intra-amoebal legionellae as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison. *Microbiology.* **1996**; 142 (12):3525-30.

Bitar DM, Molmeret M, Abu Kwaik Y. Molecular and cell biology of *Legionella pneumophila*. *Int J Med Microbiol.* **2004**; 293(7-8):519-27.

Bitar DM, Molmeret M, Abu Kwaik Y. Structure-function analysis of the C-terminus of IcmT of *Legionella pneumophila* in pore formation-mediated egress from macrophages. *FEMS.* **2005**; 242:177-184.

Blackburn BG, Craun GF, Yoder JS, Hill V, Calderon RL, Chen N, Lee SH, Levy DA, Beach MJ. Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with drinking water-United States, 2001-2002. *MMWR Surveill Summ.* **2004**; 53(8):23-45.

Bliska JB, Falkow S. The role of host tyrosine phosphorylation in bacterial pathogenesis. *Trends Genet.* **1993**; 9(3):85-9.

Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, Travers M, Tovey SC, Seo JT, Berridge MJ, Ciccolini F, Lipp P. Calcium signalling--an overview. *Semin Cell Dev Biol.* **2001**; 12(1):3-10.

Botelho RJ, Teruel M, Dierckman R, Anderson R, Wells A, York JD, Meyer T, Grinstein S. Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis. *J Cell Biol.* **2000**; 151(7):1353-68.

Borella P, Guerrieri E, Marchesi I, Bondi M, Messi P. Water ecology of *Legionella* and protozoan: environmental and public health perspectives. *Biotechnol Annu Rev.* **2005**; 11:355-80.

Bozue JA, Johnson W. Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infect Immun.* **1996**; 64(2):668-73.

Breton A, Descoteaux A. Protein kinase C-alpha participates in Fc gammaR-mediated phagocytosis in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* **2000**; 276(2):472-6.

Bretschneider T, Vasiev B, Weijer CJ. A Modell for *Dictyostelium* slug movement. *J Theor Biol.* **1999**; 199(2):125-36.

Brieland JK, Engleberg NC, Huffnagle GB, Remick DG, Fantone JC. Host pathogen interactions in Legionnaires' disease: lessons learned from a murine animal Modell. *Immunopharmacology* **2000**; 48(3):249-52.

Brüggemann H, Cazalet C, Buchrieser C. Adaptation of *Legionella pneumophila* to the host environment: role of protein secretion, effectors and eukaryotic-like proteins. *Curr Opin Microbiol.* **2006**; 9(1):86-94.

Brüggemann H, Hagman A, Jules M, Sismeiro O, Dillies MA, Gouyette C, Kunst F, Steinert M, Heuner K, Coppee JY, Buchrieser C. Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol.* **2006**; 8(8):1228-40.

Buczynski G, Bush J, Zhang L, Rodriguez-Paris J, Cardelli J. Evidence for a recycling role for Rab7 in regulating a late step in endocytosis and in retention of lysosomal enzymes in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Biol Cell.* **1997**; 8(7):1343-60.

Buscher BA, Conover GM, Miller JL, Vogel SA, Meyers SN, Isberg RR, Vogel JP. The DotL protein, a member of the TraG-coupling protein family, is essential for Viability of *Legionella pneumophila* strain Lp02. *J Bacteriol.* **2005**; 187(9):2927-38.

Byrd TF, Horwitz MA. Aberrantly low transferrin receptor expression on human monocytes is associated with nonpermissiveness for *Legionella pneumophila* growth. *J Infect Dis.* **2000**; 181(4):1394-400.

Byrne B, Swanson MS. Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. *Infect Immun.* **1998**; 66(7):3029-34.

Campononico EM, Chesnel L, Roy CR. A yeast genetic system for the identification and characterization of substrate proteins transferred into host cells by the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system. *Mol Microbiol.* **2005**; 56(4):918-33.

Cardelli J. Phagocytosis and macropinocytosis in *Dictyostelium*: phosphoinositide-based processes, biochemically distinct. *Traffic.* **2001**; 2(5):311-20.

Chadwick CM, Ellison JE, Garrod DR. Dual role for *Dictyostelium* contact site B in phagocytosis and developmental size regulation. *Nature.* **1984**; 16-22;307(5952):646-7.

Chen MY, Long Y, Devreotes PN. A novel cytosolic regulator, Pianissimo, is required for chemoattractant receptor and G protein-mediated activation of the 12 transmembrane domain adenylyl cyclase in *Dictyostelium*. *Genes Dev.* **1997**; 11(23):3218-31.

Chia CP, Luna EJ. Phagocytosis in *Dictyostelium discoideum* is inhibited by antibodies directed primarily against common carbohydrate epitopes of a major cell-surface plasma membrane glycoprotein. *Exp Cell Res.* **1989**; 181(1):11-26.

Chia CP. A 130-kDa Plasma Membrane Glycoprotein Involved in *Dictyostelium* Phagocytosis. *Exp Cell Res.* **1996**; 227 (2):182-189.

Chien S, Chung CY, Sukumaran S, Osborne N, Lee S, Ellsworth C, McNally JG, Firtel RA. The *Dictyostelium* LIM domain-containing protein LIM2 is essential for proper chemotaxis and morphogenesis. *Mol Biol Cell.* **2000**; 11(4):1275-91.

Christie PJ, Vogel JP. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol.* **2000**; 8(8):354-60.

Cianciotto NP, Fields BS. *Legionella pneumophila* mip gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1992**; 89(11):5188-91.

Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect Immun.* **1994**; 62(8):3254-61.

Cirillo JD, Cirillo SL, Yan L, Bermudez LE, Falkow S, Tompkins LS. Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun.* **1999**; 67(9):4427-34.

Cirillo SL, Lum J, Cirillo JD. Identification of novel loci involved in entry by *Legionella pneumophila*. *Microbiology.* **2000**; 146:1345-59.

Cirillo SL, Bermudez LE, El-Etr SH, Duhamel GE, Cirillo JD. *Legionella pneumophila* entry gene rtxA is involved in virulence. *Infect Immun.* **2001**; 69(1):508-17.

Cirillo SL, Yan L, Littman M, Samrakandi MM, Cirillo JD. Role of the *Legionella pneumophila* rtxA gene in amoebae. *Microbiology.* **2002**; 148(6):1667-77.

Clapham DE. Intracellular calcium. Replenishing the stores. *Nature.* **1995**; 375(6533):634-5.

Clarke M, Kohler J, Arana Q, Liu T, Heuser J, Gerisch G. Dynamics of the vacuolar H(+)-ATPase in the contractile vacuole complex and the endosomal pathway of *Dictyostelium* cells. *J Cell Sci.* **2002**; 115:2893-905.

Coers J, Kagan JC, Matthews M, Nagai H, Zuckman DM, Roy CR. Identification of Icm protein complexes that play distinct roles in the biogenesis of an organelle permissive for *Legionella pneumophila* intracellular growth. *Mol Microbiol.* **2000**; 38(4):719-36.

Cohen CJ, Bacon R, Clarke M, Joiner K, Mellman I. *Dictyostelium discoideum* mutants with conditional defects in phagocytosis. *J Cell Biol.* **1994**; 126(4):955-66.

Conover GM, Derre I, Vogel JP, Isberg RR. The *Legionella pneumophila* LidA protein: a translocated substrate of the Dot/Icm system associated with maintenance of bacterial integrity. *Mol Microbiol.* **2003**; 48(2):305-21.

Coppolino MG, Woodside MJ, Demaurex N, Grinstein S, St-Arnaud R, Dedhar S. Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion. *Nature.* **1997**; 386(6627):843-7.

Corbett EF, Oikawa K, Francois P, Tessier DC, Kay C, Bergeron JJ, Thomas DY, Krause KH, Michalak M. Ca²⁺ regulation of interactions between endoplasmic reticulum chaperones. *J Biol Chem.* **1999**; 274(10):6203-11.

Corbett EF, Michalak M. Calcium, a signaling molecule in the endoplasmic reticulum? *Trends Biochem Sci.* **2000**; 25(7):307-11.

Cornillon S, Pech E, Benghezal M, Ravanel K, Gaynor E, Letourneur F, Bruckert F, Cosson P. Phg1p is a nine-transmembrane protein superfamily member involved in *Dictyostelium* adhesion and phagocytosis. *J Biol Chem.* **2000**; 275(44):34287-92.

- Cosson P, Zulianello L, Join-Lambert O, Faurisson F, Gebbie L, Benghezal M, Van Delden C, Curty LK, Kohler T.** *Pseudomonas aeruginosa* virulence analyzed in a *Dictyostelium discoideum* host system. *J Bacteriol.* **2002**; 184(11):3027-33
- Cox EC, Vocke CD, Walter S, Gregg KY, Bain ES.** Electrophoretic karyotype for *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1990**; 87(21):8247-51.
- Cox D., Wessels D., Soll D. R., Hartwig J., Condeelis J.** Re-expression of ABP-120 rescues cytoskeletal, motility and phagocytosis defects in ABP-120-*Dictyostelium* mutants, *Mol Biol Cell* **1996**, 7:803-23.
- Cox D, Tseng CC, Bjekic G, Greenberg S.** A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. *J Biol Chem.* **1999**; 274(3):1240-7.
- Cox D, Lee DJ, Dale BM, Calafat J, Greenberg S.** A Rab 11-containing rapidly recycling compartment in macrophages that promotes phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **2000**; 97:680-85
- Coxon PY, Summersgill JT, Ramirez JA, Miller RD.** Signal transduction during *Legionella pneumophila* entry into human monocytes. *Infect Immun.* **1998**; 66(6):2905-13.
- Daisy J.A.; Benson C.E.; McKittrick J.; Friedman H.M.** Intracellular replication of *Legionella pneumophila*. *J. Infect. Dis.* **1981**; 143 (3):460-464.
- Danilczyk UG, Cohen-Doyle MF, Williams DB.** Functional relationship between calreticulin, calnexin, and the endoplasmic reticulum luminal domain of calnexin. *J Biol Chem.* **2000**; 275(17):13089-97.
- Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P.** Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* **2000**; 351: 95–105.
- De Arruda MV, Watson S, Lin CS, Leavitt J, Matsudaira P.** Fimbrin is a homologue of the cytoplasmic phosphoprotein plastin and has domains homologous with calmodulin and actin gelation proteins. *J Cell Biol.* **1990**; 111(3):1069-79.
- De Chastellier C, Thilo L.** Phagosome maturation and fusion with lysosomes in relation to surface property and size of the phagocytic particle. *Eur J Cell Biol.* **1997**; 74(1):49-62.
- De Hostos EL.** The coronin family of actin-associated proteins. *Trends Cell Biol.* **1999**; 9(9):345-50.
- Della Bianca V, Grzeskowiak M, Dusi S, Rossi F.** Transmembrane signaling pathways involved in phagocytosis and associated activation of NADPH oxidase mediated by Fc gamma Rs in human neutrophils *J Leukoc Biol.* **1993**; 53:427-438.
- Denlinger LC, Fisette PL, Garis KA, Kwon G, Vazquez-Torres A, Simon AD, Nguyen B, Proctor RA, Bertics PJ, Corbett JA.** Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by macrophage purinoreceptors and calcium. *J Biol Chem.* **1996**; 271(1):337-42.
- Derre I, Isberg RR.** *Legionella pneumophila* replication vacuole formation involves rapid recruitment of proteins of the early secretory system. *Infect Immun.* **2004**; 72(5):3048-53.
- Derre I, Isberg RR.** LidA, a translocated substrate of the *Legionella pneumophila* type IV secretion system, interferes with the early secretory pathway. *Infect Immun.* **2005**; 73(7):4370-80.
- Desjardins M, Celis JE, van Meer G, Dieplinger H, Jahraus A, Griffiths G, Huber LA.** Molecular characterization of phagosomes. *J Biol Chem.* **1994**; 269(51):32194-200.
- Desjardins M.** ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nat Rev Immunol.* **2003**; 3(4):280-91.
- 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.* **2001**; 69(4):2116-22.

Dimond RL, Burns RA, Jordan KB. Secretion of Lysosomal enzymes in the cellular slime mold, *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem.* **1981**; 256(13):6565-72.

Djaldetti M, Salman H, Bergman M, Djaldetti R, Bessler H. Phagocytosis-the mighty weapon of the silent warriors. *Microsc Res Tech.* **2002**; 57(6):421-31.

Donlan RM, Forster T, Murga R, Brown E, Lucas C, Carpenter J, Fields B. *Legionella pneumophila* associated with the protozoan *Hartmannella vermiformis* in a model multi-species biofilm has reduced susceptibility to disinfectants. *Biofouling.* **2005**; 21(1):1-7

Döring V, Veretout F, Albrecht R, Muhlbauer B, Schlatterer C, Schleicher M, Noegel AA. The in vivo role of annexin VII (synexin): characterization of an annexin VII-deficient *Dictyostelium* mutant indicates an involvement in Ca²⁺-regulated processes. *J Cell Sci.* **1995**; 108(5):2065-76.

Dorn BR, Dunn WA Jr, Progulske-Fox A. Bacterial interactions with the autophagic pathway. *Cell Microbiol.* **2002**; 4(1):1-10.

Drozanski W. Fatal bacterial infection in soil amoebae. *Acta Microbiol. Pol.* **1956**; 5:315-317.

Duclos S, Desjardins M. Subversion of a young phagosome: the survival strategies of intracellular pathogens. *Cell Microbiol.* **2000**; Oct;2(5):365-77.

Duchen MR. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol.* **2000**; 529 Pt 1:57-68.

Duhon D, Cardelli J. The regulation of phagosome maturation in *Dictyostelium*. *J Muscle Res Cell Motil.* **2002**; 23(7-8):803-8.

Dumontier M, Hocht P, Mintert U, Faix J. Rac1 GTPases control filopodia formation, cell motility, endocytosis, cytokinesis and development in *Dictyostelium*. *J Cell Sci.* **2000**; 113: 2253-2265.

Edberg JC, Lin CT, Lau D, Unkeless JC, Kimberly RP. The Ca²⁺ dependence of human Fc gamma receptor-initiated phagocytosis. *J Biol Chem.* **1995**; 270(38):22301-7.

Edelstein PH, Shinzato T, Edelstein MA. BMS-284756 (T-3811ME) a new fluoroquinolone: in vitro activity against *Legionella*, efficacy in a guinea pig Model of *L. pneumophila* pneumonia and pharmacokinetics in guinea pigs. *J Antimicrob Chemother.* **2001**; 48(5):667-75.

Edelstein PH, Hu B, Higa F, Edelstein MA. IvgA, a novel *Legionella pneumophila* virulence factor. *Infect Immun.* **2003**; 71(5):2394-403.

Eichinger L, Lee SS, Schleicher M. *Dictyostelium* as model system for studies of the actin cytoskeleton by molecular genetics. *Microsc Res Tech.* **1999**; 47(2):124-34.

Ellgaard L, Helenius A. ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr Opin Cell Biol.* **2001**; 13(4):431-437.

Elliott JA, Winn WC Jr. Treatment of alveolar macrophages with cytochalasin D inhibits uptake and subsequent growth of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun.* **1986**; 51(1):31-6.

Endl I, Konzok A, Nellen W. Antagonistic effects of signal transduction by intracellular and extracellular cAMP on gene regulation in *Dictyostelium*. *Mol Biol Cell.* **1996**; 7(1):17-24.

Ferrari G, Langen H, Naito M, Pieters, A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of *mycobacteria*. *Cell.* **1999**; 97(4):435-47.

Fettes PS, Susa M, Hacker J, Marre R. Characterization of the *Legionella pneumophila* gene IvgA. *Int J Med Microbiol.* **2000**; 290(3):239-50.

Fettes PS, Forsbach-Birk V, Lynch D, Marre R. Overexpression of a *Legionella pneumophila* homologue of the *E. coli* regulator *csrA* affects cell size, flagellation, and pigmentation. *Int J Med Microbiol.* **2001**; 291(5):353-60.

Fields BS. The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol.* **1996** 4(7):286-90.

Fields BS, Haupt T, Davis JP, Arduino MJ, Miller PH, Butler JC. Pontiac fever due to *Legionella micdadei* from a whirlpool spa: possible role of bacterial endotoxin. *J Infect Dis.* **2001**; 184(10):1289-92.

Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev.* **2002**;15(3):506-26.

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.* **1992**; 6(10):1375-83.

Flieger A, Gong S, Faigle M, Deeg M, Bartmann P, Neumeister B. Novel phospholipase A activity secreted by *Legionella* species. *J Bacteriol.* **2000a**; 182(5):1321-7.

Flieger A, Gongab S, Faigle M, Mayer HA, Kehrer U, Mussotter J, Bartmann P, Neumeister B. Phospholipase A secreted by *Legionella pneumophila* destroys alveolar surfactant phospholipids. *FEMS Microbiol Lett.* **2000b**; 188(2):129-33.

Flieger A, Gong S, Faigle M, Northoff H, Neumeister B. In vitro secretion kinetics of proteins from *Legionella pneumophila* in comparison to proteins from non-pneumophila species. *Microbiology.* **2001a**; 147(11):3127-34.

Flieger A, Gong S, Faigle M, Stevanovic S, Cianciotto NP, Neumeister B. Novel lysophospholipase A secreted by *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol.* **2001b**; 183(6):2121-4.

Friedman H, Yamamoto Y, Klein TW. *Legionella pneumophila* pathogenesis and immunity. *Semin Pediatr Infect Dis.* **2002**;13(4):273-9.

Fry NK, Rowbotham TJ, Saunders NA, Embley TM. Direct amplification and sequencing of the 16S ribosomal DNA of an intracellular *Legionella* species recovered by amebal enrichment from the sputum of a patient with pneumonia. *FEMS Microbiol. Lett.* **1991**; 83:165-168.

Furukawa R, Fechtmeier M. The structure, function, and assembly of actin filament bundles. *Int Rev Cytol.* **1997**; 175:29-90.

Gagnon E, Duclos S, Rondeau C, Chevet E, Cameron PH, Steele-Mortimer O, Paiement J, Bergeron JJ, Desjardins M. Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell.* **2002**; 110(1):119-31.

Gao LY, Harb OS, Kwaik YA. Identification of macrophage-specific infectivity loci (*mil*) of *Legionella pneumophila* that are not required for infectivity of protozoa. *Infect Immun.* **1998a**; 66(3):883-92.

Gao LY, Stone BJ, Brieland JK, Abu Kwaik Y. Different fates of *Legionella pneumophila* *pml* and *mil* mutants within macrophages and alveolar epithelial cells. *Microb Pathog.* **1998b**; 25(6):291-306.

Gao LY, Abu Kwaik Y. Activation of caspase 3 during *Legionella pneumophila*-induced apoptosis. *Infect Immun.* **1999**; 67(9):4886-94.

Gao LY, Kwaik YA. The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba polyphaga* by *Legionella pneumophila*. *Environ Microbiol.* **2000**; 2(1):79-90.

Garbino J, Bornand JE, Uckay I, Fonseca S, Sax H. Impact of positive legionella urinary antigen test on patient management and improvement of antibiotic use. *J Clin Pathol.* **2004**; 57(12):1302-1305.

- Garduño RA, Garduño E, Hoffman PS.** Surface-associated hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell Modell. *Infect Immun.* **1998**; 66(10):4602-10.
- Garduno RA, Garduno E, Hiltz M, Hoffman PS.** Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms. *Infect Immun.* **2002**; 70(11):6273-83.
- Garin J, Diez R, Kieffer S, Dermine JF, Duclos S, Gagnon E, Sadoul R, Rondeau C, Desjardins M.** The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol.* **2001**; 152(1):165-80.
- Gerke V, Moss SE.** Annexins: from structure to function. *Physiol Rev.* **2002**; 82(2):331-71.
- Gibson FC 3rd, Tzianabos AO, Rodgers FG.** Adherence of *Legionella pneumophila* to U-937 cells, guinea-pig alveolar macrophages, and MRC-5 cells by a novel, complement-independent binding mechanism. *Can J Microbiol.* **1994**; 40(10):865-72.
- Gilman AG.** G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem.* **1987**; 56:615-49.
- Gloss A, Rivero F, Khaire N, Muller R, Loomis WF, Schleicher M, Noegel AA.** Villidin, a novel WD-repeat and villin-related protein from *Dictyostelium*, is associated with membranes and the cytoskeleton. *Mol Biol Cell.* **2003**; 14(7):2716-27.
- Goebel W, Kuhn M.** Bacterial replication in the host cell cytosol. *Curr Opin Microbiol.* **2000**; 3(1):49-53.
- Goldberg MB.** Actin-based motility of intracellular microbial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev.* **2001**; 65(4): 595–626.
- Goode BL, Wong JJ, Butty AC, Peter M, McCormack AL, Yates JR, Drubin DG, Barnes G.** Coronin promotes the rapid assembly and cross-linking of actin filaments and may link the actin and microtubule cytoskeletons in yeast. *J Cell Biol.* **1999**; 144(1):83-98.
- Gottwald U, Brokamp R, Karakesisoglou I, Schleicher M, Noegel AA.** Identification of a cyclase-associated protein (CAP) homologue in *Dictyostelium discoideum* and characterization of its interaction with actin. *Mol Biol Cell.* **1996**; 7(2):261-72.
- Greenberg S, el Khoury J, di Virgilio F, Kaplan EM, Silverstein SC.** Ca²⁺-independent F-actin assembly and disassembly during Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages. *J. Cell Biol.* **1991**; 113:757-767.
- Greenberg S.** Signal transduction of phagocytosis. *Trends Cell Biol.* **1995**; 5(3):93-99.
- Greenberg S, Grinstein S.** Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol.* **2002**; 14(1):136-45.
- Greub G, Raoult D.** Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev.* **2004**; 17(2):413-433.
- Grimm D, Ludwig WF, Brandt BC, Michel R, Schleifer KH, Hacker J, Steinert M.** Development of 18S rRNA-targeted oligonucleotide probes for specific detection of *Hartmannella* and *Naegleria* in *Legionella*-positive environmental samples. *Syst Appl Microbiol.* **2001**; 24(1):76-82.
- Guerrieri E, Bondi M, Ciancio C, Borella P, Messi P.** Micro- and macromethod assays for the ecological study of *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiol Lett.* **2005**; 252(1):113-9.
- Hacker U, Albrecht R, Maniak M.** Fluid-phase uptake by macropinocytosis in *Dictyostelium*. *J Cell Sci.* **1997**; 110:105-12.
- Hägele S, Hacker J, Brand BC.** *Legionella pneumophila* kills human phagocytes but not protozoan host cells by inducing apoptotic cell death. *FEMS Microbiol Lett.* **1998**; 169(1):51-8.

Hägele S, Köhler R, Merkert H, Schleicher M, Hacker J, Steinert M. *Dictyostelium discoideum*: a new host Modell system for intracellular pathogens of the genus *Legionella*. Cell Microbiol. **2000**; 2(2):165-71.

Hajnoczky G, Robb-Gaspers LD, Seitz MB, Thomas AP. Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. Cell. **1995**; 82(3):415-424.

Hajnoczky G, Csordas G, Madesh M, Pacher P. The machinery of local Ca²⁺ signalling between sarco-endoplasmic reticulum and mitochondria. J Physiol. **2000**; 529(1):69-81.

Hajnoczky G, Csordas G, Yi M. Old players in a new role: mitochondria-associated membranes, VDAC, and ryanodine receptors as contributors to calcium signal propagation from endoplasmic reticulum to the mitochondria. Cell Calcium. **2002**; 32(5-6):363-77.

Hales LM, Shuman HA. *Legionella pneumophila* contains a type II general secretion pathway required for growth in amoebae as well as for secretion of the Msp protease. Infect Immun. **1999a**; 67(7):3662-6.

Hales LM, Shuman HA. The *Legionella pneumophila* rpoS gene is required for growth within *Acanthamoeba castellanii*. J Bacteriol. **1999b**; 181(16):4879-89.

Hammer BK, Swanson MS. Co-ordination of *legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp. Mol Microbiol. **1999**; 33(4):721-31.

Hammer BK, Tateda ES, Swanson MS. A two-component regulator induces the transmission phenotype of stationary-phase *Legionella pneumophila*. Mol Microbiol. **2002**; 44(1):107-18.

Harb OS, Venkataraman C, Haack BJ, Gao LY, Kwaik YA. Heterogeneity in the attachment and uptake mechanisms of the Legionnaires' disease bacterium, *Legionella pneumophila*, by protozoan hosts. Appl Environ Microbiol. **1998**; 64(1):126-32.

Harwood AJ, Hopper NA, Simon MN, Driscoll DM, Veron M, Williams JG. Culmination in *Dictyostelium* is regulated by the cAMP-dependent protein kinase. Cell. **1992**; 69(4):615-24.

Hatsuzawa K, Tamura T, Hashimoto H, Hashimoto H, Yokoya S, Miura M, Nagaya H, Wada I. Involvement of Syntaxin 18, an Endoplasmic Reticulum (ER)-localized SNARE Protein, in ER-mediated Phagocytosis. Mol Biol Cell. **2006**; 17(9):3964-77.

Haugwitz M, Noegel AA, Karakesisoglou J, Schleicher M. *Dictyostelium* amoebae that lack G-actin-sequestering profilins show defects in F-actin content, cytokinesis, and development. Cell. **1994**; 79(2):303-14.

Haus U, Trommler P, Fisher PR, Hartmann H, Lottspeich F, Noegel AA, Schleicher M. The heat shock cognate protein from *Dictyostelium* affects actin polymerization through interaction with the actin-binding protein cap32/34. EMBO J. **1993**; 12(10):3763-71.

Helbig JH, Luck PC, Steinert M, Jacobs E, Witt M. Immunolocalization of the Mip protein of intracellularly and extracellularly grown *Legionella pneumophila*. Lett Appl Microbiol. **2001**; Feb;32(2):83-8

Heuner K, Bender-Beck L, Brand BC, Luck PC, Mann KH, Marre R, Ott M, Hacker J. Cloning and genetic characterization of the flagellum subunit gene (flaA) of *Legionella pneumophila* serogroup 1. Infect Immun. **1995**; 63(7):2499-507.

Heuner K, Brand BC, Hacker J. The expression of the flagellum of *Legionella pneumophila* is modulated by different environmental factors. FEMS Microbiol Lett. **1999**; 175(1):69-77.

Heuner K, Dietrich C, Skriwan C, Steinert M, Hacker J. Influence of the alternative sigma(28) factor on virulence and flagellum expression of *Legionella pneumophila*. Infect Immun. **2002**; 70(3):1604-8.

Hickey EK, Cianciotto NP. Cloning and sequencing of the *Legionella pneumophila* fur gene. *Gene*. **1994**; 27;143(1):117-21.

Hickey EK, Cianciotto NP. An iron- and fur-repressed *Legionella pneumophila* gene that promotes intracellular infection and encodes a protein with similarity to the *Escherichia coli* aerobactin synthetases. *Infect Immun*. **1997**; 65(1):133-43.

High S, Lecomte FJ, Russell SJ, Abell BM, Oliver JD. Glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum: a tale of three chaperones? *FEBS Lett*. **2000**; 476(1-2):38-41.

Hilbi H, Segal G, Shuman HA. Icm/dot-dependent upregulation of phagocytosis by *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol*. **2001**; 42(3):603-17.

Hirst J, Robinson MS. Clathrin and adaptors. *Biochim Biophys Acta*. **1998**; 1404(1-2):173-93.

Hoffman PS, Butler CA, Quinn FD. Cloning and temperature-dependent expression in *Escherichia coli* of a *Legionella pneumophila* gene coding for a genus-common 60-kilodalton antigen. *Infect Immun*. **1989**; 57(6):1731-9.

Hookey JV, Birtles RJ, Saunders NA. Intergenic 16S rRNA gene (rDNA)-23S rDNA sequence length polymorphisms in members of the family Legionellaceae. *J Clin Microbiol*. **1995**; 33(9):2377-81.

Horwitz MA. Cell-mediated immunity in Legionnaires' disease. *J Clin Invest*. **1983**; 71(6):1686-97.

Horwitz MA, Maxfield FR. *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *J Cell Biol*. **1984a**; 99(6):1936-43.

Horwitz MA. Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. *Cell*. **1984b**; 36(1):27-33.

Horwitz MA. Characterization of avirulent mutant *Legionella pneumophila* that survive but do not multiply within human monocytes. *J Exp Med*. **1987**; 166(5):1310-28.

Insall R, Muller-Taubenberger A, Machesky L, Kohler J, Simmeth E, Atkinson SJ, Weber I, Gerisch G. Dynamics of the *Dictyostelium* Arp2/3 complex in endocytosis, cytokinesis, and chemotaxis. *Cell Motil Cytoskeleton*. **2001**; 50(3):115-28.

Ishikawa J, Okano J, Ohki K, Amagai A, Maeda Y, Miyata H. Phagocytosis of *Dictyostelium discoideum* studied by the particle-tracking method. *Exp Cell Res*. **2003**; 288(2):268-76.

Jacob T, Escallier JC, Sanguedolce MV, Chicheportiche C, Bongrand P, Capo C, Mege JL. *Legionella pneumophila* inhibits superoxide generation in human monocytes via the down-modulation of alpha and beta protein kinase C isotypes. *J Leukoc Biol*. **1994**; 55(3):310-2.

Jacobi S, Heuner K. Description of a putative type I secretion system in *Legionella pneumophila*. *Int J Med Microbiol*. **2003**; 293(5):349-58.

James BW, Mauchline WS, Dennis PJ, Keevil CW. A study of iron acquisition mechanisms of *Legionella pneumophila* grown in chemostat culture. *Curr Microbiol*. **1997**; 34(4):238-43.

Jankowski A, Grinstein S. Modulation of the cytosolic and phagosomal pH by the NADPH oxidase. *Antioxid Redox Signal*. **2002**; 4(1):61-8.

Janssen KP, Schleicher M. *Dictyostelium discoideum*: a genetic Modell system for the study of professional phagocytes. Profilin, phosphoinositides and the Imp gene family in *Dictyostelium*. *Biochim Biophys Acta*. **2001**; 1525(3):228-33.

Jepras RI, Fitzgeorge RB, Baskerville A. A comparison of virulence of two strains of *Legionella pneumophila* based on experimental aerosol infection of guinea-pigs. *J Hyg (Lond)*. **1985**; 95(1):29-38.

- Jin T, Amzel M, Devreotes PN, Wu L.** Selection of gbeta subunits with point mutations that fail to activate specific signaling pathways in vivo: dissecting cellular responses mediated by a heterotrimeric G protein in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Biol Cell*. **1998**; 9(10):2949-61.
- Johannes L, Lamaze C.** Clathrin-dependent or not: is it still the question? *Traffic*. **2002**; 3(7):443-51.
- John LM, Lechleiter JD, Camacho P.** Differential modulation of SERCA2 isoforms by calreticulin. *J Cell Biol*. **1998**; 142(4):963-73.
- Johnson K, Lory S.** Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* mutants with altered piliation. *J Bacteriol*. **1987**; 169(12):5663-7.
- Johnson S, Michalak M, Opas M, Eggleton P.** The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space. *Trends Cell Biol*. **2001**; 11(3):122-9.
- Jouaville LS, Ichas F, Mazat JP.** Modulation of cell calcium signals by mitochondria. *Mol Cell Biochem*. **1998**; 184(1-2):371-6.
- Jutras I, Desjardins M.** Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol*. **2005**; 21:511-27.
- Kagan JC, Roy CR.** *Legionella* phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites. *Nat Cell Biol*. **2002**; 4(12):945-54.
- Kaufmann AF, McDade JE, Patton CM, Bennett JV, Skaliy P, Feeley JC, Anderson DC, Potter ME, Newhouse VF, Gregg MB, Brachman PS.** Pontiac fever: isolation of the etiologic agent (*Legionella pneumophila*) and demonstration of its mode of transmission. *Am J Epidemiol*. **1981**; 114(3):337-47.
- Kay RR, Williams JG.** The *Dictyostelium* genome project: an invitation to species hopping. *Trends Genet*. **1999**; 15(8):294-7.
- Khelef N, Shuman HA, Maxfield FR.** Phagocytosis of wild-type *Legionella pneumophila* occurs through a wortmannin-insensitive pathway. *Infect Immun*. **2001**; 69(8):5157-61.
- Khurana B, Khurana T, Khaire N, Noegel AA.** Functions of LIM proteins in cell polarity and chemotactic motility. *EMBO J*. **2002**; 21(20):5331-42.
- Kim-Park WK, Moore MA, Hakki ZW, Kowolik MJ.** Activation of the neutrophil respiratory burst requires both intracellular and extracellular calcium. *Ann N Y Acad Sci*. **1997**; 832:394-404.
- King CH, Fields BS, Shotts EB Jr, White EH.** Effects of cytochalasin D and methylamine on intracellular growth of *Legionella pneumophila* in amoebae and human monocyte-like cells. *Infect Immun*. **1991**; 59(3):758-63
- Kirby JE, Vogel JP, Andrews HL, Isberg RR.** Evidence for pore-forming ability by *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol*. **1998**; 27(2):323-36.
- Kiselyov K, Xu X, Mozhayeva G, Kuo T, Pessah I, Mignery G, Zhu X, Birnbaumer L, Muallem S.** Functional interaction between InsP3 receptors and store-operated Htrp3 channels. *Nature*. **1998**; 396(6710):478-82.
- Knirel YA, Rietschel ET, Marre R, Zahringer U.** The structure of the O-specific chain of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. *Eur J Biochem*. **1994**; 221(1):239-45.
- Kobayashi E, Nakano H, Morimoto M, Tamaoki T.** Calphostin C (UCN-1028C), a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun*. **1989**; 159(2):548-53.

Köhler R, Bubert A, Goebel W, Steinert M, Hacker J, Bubert B. Expression and use of the green fluorescent protein as a reporter system in *Legionella pneumophila*. *Mol Gen Genet.* **2000**; 262(6):1060-9.

Köhler R, Fanghanel J, König B, Luneberg 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.* **2003**; 71(8):4389-97.

Konzok A, Weber I, Simmeth E, Hacker U, Maniak M, Müller-Taubenberger A. DAip1, a *Dictyostelium* homologue of the yeast actin-interacting protein 1, is involved in endocytosis, cytokinesis, and motility. *J Cell Biol.* **1999**; 146(2):453-64.

Kopperud R, Krakstad C, Selheim F, Døskeland SO. cAMP effector mechanisms. Novel twists for an 'old' signaling system. *FEBS Lett.* **2003**; 546(1):121-6.

Kriebel PW, Parent CA. Adenylyl cyclase expression and regulation during the differentiation of *Dictyostelium discoideum*. *IUBMB Life.* **2004**; 56(9):541-6.

Krinos C, High AS, Rodgers FG. Role of the 25 kDa major outer membrane protein of *Legionella pneumophila* in attachment to U-937 cells and its potential as a virulence factor for chick embryos. *J Appl Microbiol.* **1999**; 86(2):237-44.

Kuiper MW, Wullings BA, Akkermans AD, Beumer RR, van der Kooij D. Intracellular proliferation of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis* in aquatic biofilms grown on plasticized polyvinyl chloride. *Appl Environ Microbiol.* **2004**; 70(11):6826-33.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**; 227(5259):680-5.

Lally ET, Kieba IR, Sato A, Green CL, Rosenbloom J, Korostoff J, Wang JF, Shenker BJ, Ortlepp S, Robinson MK, Billings PC. RTX toxins recognize a beta2 integrin on the surface of human target cells. *J Biol Chem.* **1997**; 272(48):30463-9.

Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* **2001**; 45(4):999-1007.

Liles MR, Viswanathan VK, Cianciotto NP. Identification and temperature regulation of *Legionella pneumophila* genes involved in type IV pilus biogenesis and type II protein secretion. *Infect Immun.* **1998**; 66(4):1776-82.

Liles MR, Edelstein PH, Cianciotto NP. The prepilin peptidase is required for protein secretion by and the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol.* **1999**; 31(3):959-70

Liles MR, Scheel TA, Cianciotto NP. Discovery of a nonclassical siderophore, legiobactin, produced by strains of *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol.* **2000**; 182(3):749-57.

Linder JU, Schultz JE. The class III adenylyl cyclases: multi-purpose signalling modules. *Cell Signal.* **2003**; 15(12):1081-9.

Loomis WF, Welker D, Hughes J, Maghakian D, Kuspa A. Integrated maps of the chromosomes in *Dictyostelium discoideum*. *Genetics.* **1995**; 141(1):147-57.

Loomis WF. Role of PKA in the timing of developmental events in *Dictyostelium* cells. *Microbiol Mol Biol Rev.* **1998**; 62(3):684-94.

Lu H, Clarke M. Dynamic properties of *Legionella*-containing phagosomes in *Dictyostelium* amoebae. *Cell Microbiol.* **2005**; 7(7):995-1007.

Lüneberg E, Zahringer 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.* **1998**; 188(1):49-60.

Lüneberg E, Mayer B, Daryab N, Kooistra O, Zahringer U, Rohde M, Swanson J, Frosch M. Chromosomal insertion and excision of a 30 kb unstable genetic element is responsible for phase variation of lipopolysaccharide and other virulence determinants in *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol.* **2001**; 39(5):1259-71.

Luo ZQ, Isberg RR. Multiple substrates of the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system identified by interbacterial protein transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2004**; 20;101(3):841-6.

Maira-Litran T, Allison DG, Gilbert P. An evaluation of the potential of the multiple antibiotic resistance operon (*mar*) and the multidrug efflux pump *acrAB* to moderate resistance towards ciprofloxacin in *Escherichia coli* biofilms. *J Antimicrob Chemother.* **2000**; 45(6):789-95.

Majeed M, Perskvist N, Ernst JD, Orselius K, Stendahl O. Roles of calcium and annexins in phagocytosis and elimination of an attenuated strain of *Mycobacterium tuberculosis* in human neutrophils. *Microb Pathog.* **1998**; 24(5):309-20.

Malik ZA, Denning GM, Kusner DJ. Inhibition of Ca^{2+} signaling by *Mycobacterium tuberculosis* is associated with decreased phagosome-lysosome fusion and increased survival within human macrophages. *J Exp Med.* **2000**

Malik ZA, Iyer SS, Kusner DJ. *Mycobacterium tuberculosis* phagosomes exhibit altered calmodulin-dependent signal transduction: contribution to inhibition of phagosome-lysosome fusion and intracellular survival in human macrophages. *J Immunol.* **2001**;166(5):3392-401.

Malik ZA, Thompson CR, Hashimi S, Porter B, Iyer SS, Kusner DJ. Cutting edge: *Mycobacterium tuberculosis* blocks Ca^{2+} signaling and phagosome maturation in human macrophages via specific inhibition of sphingosine kinase. *J Immunol.* **2003**;170(6):2811-5.

Maniak M, Rauchenberger R, Albrecht R, Murphy J, Gerisch G. Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein Tag. *Cell.* **1995**; 83(6):915-24.

Maniak M. Conserved features of endocytosis in *Dictyostelium*. *Int Rev Cytol.* **2002**; 221:257-87.

Maniak M. Fusion and fission events in the endocytic pathway of *Dictyostelium*. *Traffic.* **2003**; 4(1):1-5.

Marrie TJ, Raoult D, La Scola B, Birtles RJ, de Carolis E. *Legionella*-like and other amoebal pathogens as agents of community-acquired pneumonia. *Emerg. Infect. Dis.* **2001**; 7:1026-1029.

Marston BJ, Plouffe JF, File TM Jr, Hackman BA, Salstrom SJ, Lipman HB, Kolczak MS, Breiman RF. Incidence of community-acquired pneumonia requiring hospitalization. Results of a population-based active surveillance Study in Ohio. The Community-Based Pneumonia Incidence Study Group. *Arch Intern Med.* **1997**;157(15):1709-18.

Martel V, Racaud-Sultan C, Dupe S, Marie C, Paulhe F, Galmiche A, Block MR, Albiges-Rizo C. Conformation, localization, and integrin binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides. *J Biol Chem.* **2001**; 276(24):21217-27

Matsunaga K, Klein TW, Newton C, Friedman H, Yamamoto Y. *Legionella pneumophila* suppresses interleukin-12 production by macrophages. *Infect Immun.* **2001**; 69(3):1929-33.

Matsunaga K, Klein TW, Friedman H, Yamamoto Y. Epigallocatechin gallate, a potential immunomodulatory agent of tea components, diminishes cigarette smoke condensate-induced suppression of anti-*Legionella pneumophila* activity and cytokine responses of alveolar macrophages. *Clin Diagn Lab Immunol.* **2002**; 9(4):864-71.

Matthews M, 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.* **2000**; 68(7):3971-82.

McDade, J. E., Shepard, C. C., Fraser D. W., Tsai T. R., Redus M. A., Dowdle W.R., Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med.* **1977**; 297:1197-1203.

McNally C, Hackman B, Fields BS, Plouffe JF. Potential importance of *Legionella* species as etiologies in community acquired pneumonia (CAP). *Diagn Microbiol Infect Dis.* **2000**; 38(2):79-82.

Meili R, Firtel RA. Follow the leader. *Dev Cell.* **2003**;4(3):291-3.

Meldolesi J, Pozzan T. The endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: a view from the lumen. *Trends Biochem Sci.* **1998**; 23(1):10-4.

Mesaeli N, Nakamura K, Zvaritch E, Dickie P, Dziak E, Krause KH, Opas M, MacLennan DH, Michalak M. Calreticulin is essential for cardiac development. *J Cell Biol.* **1999**; 144(5):857-68.

Michalak M, Corbett EF, Mesaeli N, Nakamura K, Opas M. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J.* **1999**; 344: 281-92.

Michalak M, Robert Parker JM, Opas M. Ca²⁺ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium.* **2002**; 32(5-6):269-78.

Michel R, Müller KD, Amman R, Schmid EN. *Legionella*-like slender rods multiplying within a strain of *Acanthamoeba* sp. isolated from drinking water. *Parasitol Res.* **1998**; 84:84-88.

Mintz CS, Schultz DR, Arnold PI, Johnson W. *Legionella pneumophila* lipopolysaccharide activates the classical complement pathway. *Infect Immun.* **1992**; 60(7):2769-76.

Moffat JF, Tompkins LS. A quantitative model of intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii*. *Infect Immun.* **1992**; 60(1):296-301.

Moffat JF, Black WJ, Tompkins LS. Further molecular characterization of the cloned *Legionella pneumophila* zinc metalloprotease. *Infect Immun.* **1994a**; 62(2):751-3.

Moffat JF, Edelstein PH, Regula DP Jr, Cirillo JD, Tompkins LS. Effects of an isogenic Zn-metalloprotease-deficient mutant of *Legionella pneumophila* in a guinea-pig pneumonia Modell. *Mol Microbiol.* **1994b**; 12(5):693-705.

Molmeret M, Abu Kwaik Y. How does *Legionella pneumophila* exit the host cell? *Trends Microbiol.* **2002a**; 10(6):258-60.

Molmeret M, Alli OA, Radulic M, Susa M, Doric M, Kwaik YA. The C-terminus of IcmT is essential for pore formation and for intracellular trafficking of *Legionella pneumophila* within *Acanthamoeba polyphaga*. *Mol Microbiol.* **2002b**; 43(5):1139-50.

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.* **2004a**; 6(1):33-48.

Molmeret M, Bitar DM, Han L, Abu Kwaik Y. Cell biology of the intracellular infection by *Legionella pneumophila*. *Microb Infect.* **2004b**; 6:129-139.

Molofsky AB, Swanson MS. *Legionella pneumophila* CsrA is a pivotal repressor of transmission traits and activator of replication. *Mol Microbiol.* **2003**; 50(2):445-61.

Molofsky AB, Swanson MS. Differentiate to thrive: Lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Mol Microbiol.* **2004**; 53(1):29-40.

Molofsky AB, Shetron-Rama LM, Swanson MS. Components of the *Legionella pneumophila* flagellar regulon contribute to multiple virulence traits, including lysosome avoidance and macrophage death. *Infect Immun.* **2005**; 73(9):5720-34.

- Müller-Taubenberger A, Lupas AN, Li H, Ecke M, Simmeth E, Gerisch G.** Calreticulin and calnexin in the endoplasmic reticulum are important for phagocytosis. *EMBO J.* **2001**; 20(23):6772-82.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H.** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **1986**; 51(1):263-73.
- Mullins RD, Machesky LM.** Actin assembly mediated by Arp2/3 complex and WASP family proteins. *Methods Enzymol.* **2000**; 325:214-37.
- Murdoch DR.** Diagnosis of Legionella infection. *Clin Infect Dis.* **2003**; 36(1):64-9.
- Mykietiuk A, Carratala J, Fernandez-Sabe N, Dorca J, Verdaguer R, Manresa F, Gudiol F.** Clinical outcomes for hospitalized patients with *Legionella pneumoniae* in the antigenuria era: the influence of levofloxacin therapy. *Clin Infect Dis.* **2005**; 40(6):794-9.
- Myers JT, Swanson JA.** Calcium spikes in activated macrophages during Fcγ receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol.* **2002**; 72(4):677-84.
- Nagai H, Roy CR.** The DotA protein from *Legionella pneumophila* is secreted by a novel process that requires the Dot/Icm transporter. *EMBO J.* **2001**; 20(21):5962-70.
- Nagai H, Kagan JC, Zhu X, Kahn RA, Roy CR.** A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on *Legionella* phagosomes. *Science.* **2002**; 295(5555):679-82.
- Nagai H, Cambrone ED, Kagan JC, Amor JC, Kahn RA, Roy CR.** A C-terminal translocation signal required for Dot/Icm-dependent delivery of the *Legionella* RalF protein to host cells. *PNAS.* **2005**; 102(3):826-831.
- Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R, Smith TF.** The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* **1994**; 371(6495):297-300.
- Neild AL, Roy CR.** Immunity to vacuolar pathogens: what can we learn from *Legionella*? *Cell Microbiol.* **2004**; 6(11):1011-8.
- Neujahr R, Albrecht R, Kohler J, Matzner M, Schwartz JM, Westphal M, Gerisch G.** Microtubule-mediated centrosome motility and the positioning of cleavage furrows in multinucleate myosin II-null cells. *J Cell Sci.* **1998**; 111 (9):1227-40.
- Neumeister B, Faigle M, Sommer M, Zahringer 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.* **1998**; 66(9):4151-7.
- Neumeister B, Faigle M, Lauber K, Northoff H, Wesselborg S.** *Legionella pneumophila* induces apoptosis via the mitochondrial death pathway. *Microbiology.* **2002**; 148(11):3639-50.
- Newton HJ, Sansom FM, Bennett-Wood V, Hartland EL.** Identification of *Legionella pneumophila*-specific genes by genomic subtractive hybridization with *Legionella micdadei* and identification of lpnE, a gene required for efficient host cell entry. *Infect Immun.* **2006**; 74(3):1683-91.
- Nguyen TM, Ilef D, Jarraud S, Rouil L, Campese C, Che D, Haeghebaert S, Ganiayre F, Marcel F, Etienne J, Desenclos JC.** A community-wide outbreak of legionnaires disease linked to industrial cooling towers-how far can contaminated aerosols spread? *J Infect Dis.* **2006**; 193(1):102-11.
- Niewohner J, Weber I, Maniak M, Müller-Taubenberger A, Gerisch G.** Talin-null cells of *Dictyostelium* are strongly defective in adhesion to particle and substrate surfaces and slightly impaired in cytokinesis. *J Cell Biol.* **1997**; 138(2):349-61.

- Ninio S, Zuckman-Cholon DM, Cambronne ED, Roy CR.** The *Legionella* IcmS-IcmW protein complex is important for Dot/Icm-mediated protein translocation. *Mol Microbiol.* **2005**; 55(3):912-26
- Ninomiya N, Hazeki K, Fukui Y, Seya T, Okada T, Hazeki O, Ui M.** Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in Fc gamma receptor signaling. *J Biol Chem.* **1994**; 269(36):22732-7.
- Noegel A, Witke W, Schleicher M.** Calcium-sensitive non-muscle alpha-actinin contains EF-hand structures and highly conserved regions. *FEBS Lett.* **1987**; 221(2):391-6.
- Noegel AA, Rivero F, Albrecht R, Janssen KP, Kohler J, Parent CA, Schleicher M.** Assessing the role of the ASP56/CAP homologue of *Dictyostelium discoideum* and the requirements for subcellular localization. *J Cell Sci.* **1999**; 112(19):3195-203.
- O'Connell WA, Hickey EK, Cianciotto NP.** A *Legionella pneumophila* gene that promotes hemin binding. *Infect Immun.* **1996**; 64(3):842-8.
- Offermanns S.** G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog Biophys Mol Biol.* **2003**; 83(2):101-30.
- Otto GP, Wu MY, Clarke M, Lu H, Anderson OR, Hilbi H, Shuman HA, Kessin RH.** Macroautophagy is dispensable for intracellular replication of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Microbiol.* **2004**; 51(1):63-72.
- Ott M, Messner P, Heesemann J, Marre R, Hacker J.** Temperature-dependent expression of flagella in *Legionella*. *J Gen Microbiol.* **1991**; 137 (Pt 8):1955-61.
- Padh H, Ha J, Lavasa M, Steck TL.** A post-lysosomal compartment in *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem.* **1993**; 268(9):6742-7.
- Parekh AB.** On the activation mechanism of store-operated calcium channels. *Pflugers Arch.* **2006**; Jun 21.
- Park DR, Skerrett SJ.** IL-10 enhances the growth of *Legionella pneumophila* in human mononuclear phagocytes and reverses the protective effect of IFN-gamma: differential responses of blood monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol.* **1996**; 157(6):2528-38.
- Parlati F, Dignard D, Bergeron JJ, Thomas DY.** The calnexin homologue *cnx1+* in *Schizosaccharomyces pombe*, is an essential gene which can be complemented by its soluble ER domain. *EMBO J.* **1995**; 14(13):3064-72.
- Parodi AJ.** Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation. *Biochem J.* **2000**; 348: 1-13.
- Payne NR, Horwitz MA.** Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors. *J Exp Med.* **1987**; 166(5):1377-89.
- Pearlman E., Jiwa A.H., Engleberg N.C., Eisenstein B.I.** Growth of *Legionella pneumophila* in a human macrophage-like (U937) cell line. *Microb Pathog.* **1988**; 5: 87-95.
- Pedersen LL, Radulic M, Doric M, Abu Kwaik Y.** HtrA homologue of *Legionella pneumophila*: an indispensable element for intracellular infection of mammalian but not protozoan cells. *Infect Immun.* **2001**; 69(4):2569-79.
- Peracino B, Borleis J, Jin T, Westphal M, Schwartz JM, Wu L, Bracco E, Gerisch G, Devreotes P, Bozzaro S.** G protein beta subunit-null mutants are impaired in phagocytosis and chemotaxis due to inappropriate regulation of the actin cytoskeleton. *J Cell Biol.* **1998**; 141(7):1529-37.
- Pitt A, Mayorga LS, Stahl PD, Schwartz AL.** Alterations in the protein composition of maturing phagosomes. *J Clin Invest.* **1992**; 90(5):1978-83.

- Plackett TP, Boehmer ED, Faunce DE, Kovacs EJ.** Aging and innate immune cells. *J Leukoc Biol.* **2004**; 76(2):291-9. Epub 2004 Mar 23.
- Pradel E, Ewbank JJ.** Genetic Modells in pathogenesis. *Annu Rev Genet.* **2004**; 38:347-63.
- Prassler J, Murr A, Stocker S, Faix J, Murphy J, Marriott G.** DdLIM is a cytoskeleton-associated protein involved in the protrusion of lamellipodia in *Dictyostelium*. *Mol Biol Cell.* **1998**; 9(3):545-59.
- Premack BA, Gardner P.** Properties of Ca currents activated by T cell receptor signaling. *Adv Exp Med Biol.* **1994**; 365:91-102.
- Poch MT, Johnson W.** Ferric reductases of *Legionella pneumophila*. *Biometals.* **1993**; 6(2):107-14.
- Pukatzki S, Kessin RH, Mekalanos JJ.** The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2002**; 99(5):3159-64.
- Pupillo M, Insall R, Pitt GS, Devreotes PN.** Multiple cyclic AMP receptors are linked to adenylyl cyclase in *Dictyostelium*. *Mol Biol Cell.* **1992**; 3(11):1229-34.
- Primpke G, Iassonidou V, Nellen W, Wetterauer B.** Role of cAMP-dependent protein kinase during growth and early development of *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol.* **2000**; 221(1):101-11.
- Rauchenberger R, Hacker U, Murphy J, Niewohner J, Maniak M.** Coronin and vacuolin identify consecutive stages of a late, actin-coated endocytic compartment in *Dictyostelium*. *Curr Biol.* **1997**; 7(3):215-8.
- Raynal P, Pollard HB.** Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *BBA* **1994**; 119:63-93.
- Retzlaff C, Yamamoto Y, Okubo S, Hoffman PS, Friedman H, Klein TW.** *Legionella pneumophila* heat-shock protein-induced increase of interleukin-1 beta mRNA involves protein kinase C signalling in macrophages. *Immunology.* **1996**; 89(2):281-8.
- Rezabek BL, Rodriguez-Paris JM, Cardelli JA, Chia CP.** Phagosomal proteins of *Dictyostelium discoideum*. *J Eukaryot Microbiol.* **1997**; 44(4):284-92.
- Ritter C, Helenius A.** Recognition of local glycoprotein misfolding by the ER folding sensor UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase. *Nat Struct Biol.* **2000**; 7(4):278-80.
- Rivero F, Koppel B, Peracino B, Bozzaro S, Siegert F, Weijer CJ, Schleicher M, Albrecht R, Noegel AA.** The role of the cortical cytoskeleton: F-actin crosslinking proteins protect against osmotic stress, ensure cell size, cell shape and motility, and contribute to phagocytosis and development. *J Cell Sci.* **1996**; 109(11):2679-91.
- Rivero F, Furukawa R, Fechheimer M, Noegel AA.** Three actin cross-linking proteins, the 34 kDa actin-bundling protein, alpha-actinin and gelation factor (ABP-120), have both unique and redundant roles in the growth and development of *Dictyostelium*. *J Cell Sci.* **1999**; 112(16):2737-51.
- Rivero F, Somesh BP.** Signal transduction pathways regulated by Rho GTPases in *Dictyostelium*. *J Muscle Res Cell Motil.* **2002**; 23(7-8):737-49.
- Robb-Gaspers LD, Rutter GA, Burnett P, Hajnoczky G, Denton RM, Thomas AP.** Coupling between cytosolic and mitochondrial calcium oscillations: role in the regulation of hepatic metabolism. *Biochim Biophys Acta.* **1998**; 1366(1-2):17-32.
- Robey M, O'Connell W, Cianciotto NP.** Identification of *Legionella pneumophila* rcp, a pagP-like gene that confers resistance to cationic antimicrobial peptides and promotes intracellular infection. *Infect Immun.* **2001**; 69(7):4276-86.

Robey M, Cianciotto NP. *Legionella pneumophila* feoAB promotes ferrous iron uptake and intracellular infection. *Infect Immun.* **2002**; 70(10):5659-69.

Robinson CG, Roy CR. Attachment and fusion of endoplasmic reticulum with vacuoles containing *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol.* **2006**;8(5):793-805.

Rohr U, Senger M, Selenka F, Turley R, Wilhelm M. Four years of experience with silver-copper ionization for control of *Legionella* in a German university hospital hot water plumbing system. *Clin Infect Dis.* **1999**; 29(6):1507-11.

Romeo T. Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol.* **1998**; 29(6):1321-30.

Rossier O, Cianciotto NP. Type II protein secretion is a subset of the PilD-dependent processes that facilitate intracellular infection by *Legionella pneumophila*. *Infect Immun.* **2001**; 69(4):2092-8.

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.* **2004**; 72(1):310-21.

Rowbotham TJ. Current views on the relationships between amoebae, Legionellae and man. *Isr J Med Sci.* **1986**; 22(9):678-89.

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.* **1998**; 28(3):663-74.

Roy CR, Tilney LG. The road less traveled: transport of *Legionella* to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* **2002**; 158(3):415-9.

Rupper A, Lee K, Knecht D, Cardelli J. Sequential activities of phosphoinositide 3-kinase, PKB/Akt, and Rab7 during macropinosome formation in *Dictyostelium*. *Mol Biol Cell.* **2001a**; 12(9):2813-24.

Rupper A, Cardelli J. Regulation of phagocytosis and endo-phagosomal trafficking pathways in *Dictyostelium discoideum*. *Biochim Biophys Acta.* **2001b**; 1525(3):205-16.

Rutter GA, Rizzuto R. Regulation of mitochondrial metabolism by ER Ca²⁺ release: an intimate connection. *Trends Biochem Sci.* **2000**; 25(5):215-21.

Sadosky AB, Wiater LA, Shuman HA. Identification of *Legionella pneumophila* genes required for growth within and killing of human macrophages. *Infect Immun.* **1993**; 61(12):5361-73.

Saito Y, Ihara Y, Leach MR, Cohen-Doyle MF, Williams DB. Calreticulin functions in vitro as a molecular chaperone for both glycosylated and non-glycosylated proteins. *EMBO J.* **1999**; 18(23):6718-29.

Sambrook J, Gething MJ. Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* **1989**;342(6247):224-5.

Sanchez-Mejorada G, Rosales C. Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. *J Leukoc Biol.* **1998**; 63(5):521-533.

Sansonetti PJ, Ryter A, Clerc P. Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysis. *Infect Immun.* **1986**; 51:461-469.

Saran S, Meima ME, Alvarez-Curto E, Weening KE, Rozen DE, Schaap P. cAMP signaling in *Dictyostelium*. Complexity of cAMP synthesis, degradation and detection. *J Muscle Res Cell Motil.* **2002**; 23(7-8):793-802.

Schlecht S, Fromme I, Ferber E, Muller W, Gmeiner J. Chemical and biological properties of revertants derived from a *Salmonella typhimurium* Rd1-mutant. *Zentralbl Bakteriell A.* **1980**; 247(1):50-63.

Schleicher M, Noegel A, Schwarz T, Wallraff E, Brink M, Faix J, Gerisch G, Isenberg G. A *Dictyostelium* mutant with severe defects in alpha-actinin: its characterization using cDNA probes and monoclonal antibodies. *J Cell Sci.* **1988**; 90(1):59-71.

Schneider N, Schwartz JM, Kohler J, Becker M, Schwarz H, Gerisch G. Golvesin-GFP fusions as distinct markers for Golgi and post-Golgi vesicles in *Dictyostelium* cells. *Biol Cell.* **2000**; 92(7):495-511

Schramek S, Kazar J, Bazovska S. Lipid A in *Legionella pneumophila*. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg [A].* **1982**; 252(3):401-4.

Schreiner T, Mohrs MR, Blau-Wasser R, von Krempelhuber A, Steinert M, Schleicher M, Noegel AA. Loss of the F-actin binding and vesicle-associated protein comitin leads to a phagocytosis defect. *Eukaryot Cell.* **2002**; 1(6):906-14.

Scott CC, Botelho RJ, Grinstein S. Phagosome maturation: a few bugs in the system. *J Membr Biol.* **2003**; 193(3):137-52.

Seastone DJ, Zhang L, Buczynski G, Rebstein P, Weeks G, Spiegelman G, Cardelli J. The small Mr Ras-like GTPase Rap1 and the phospholipase C pathway act to regulate phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Biol Cell.* **1999**; 10(2):393-406.

Seastone DJ, Harris E, Temesvari LA, Bear JE, Saxe CL, Cardelli J. The WASp-like protein scar regulates macropinocytosis, phagocytosis and endosomal membrane flow in *Dictyostelium*. *J Cell Sci.* **2001**; 114:2673-83.

Seenivasan MH, Yu VL, Muder RR. Legionnaires' disease in long-term care facilities: overview and proposed solutions. *J Am Geriatr Soc.* **2005**;53(5):875-80.

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 U S A.* **1998**; 95(4):1669-74.

Selbie LA, Hill SJ. G protein-coupled-receptor cross-talk: the fine-tuning of multiple receptor-signalling pathways. *Trends Pharmacol Sci.* **1998**; 19(3):87-93.

Sexton JA, Vogel JP. Regulation of hypercompetence in *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol.* **2004**; 186(12):3814-25.

Shuman HA, Purcell M, Segal G, Hales L, Wiater LA. Intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*: human pathogen or accidental tourist? *Curr Top Microbiol Immunol.* **1998**; 225:99-112.

Simpson AW. Fluorescent measurement of [Ca²⁺]_i: basic practical considerations. *Methods Mol Biol.* **2006**;312:3-36.

Skriwan C, Fajardo M, Hägele S, Horn M, Wagner M, Michel R, Krohne G, Schleicher M, Hacker J, Steinert M. Various bacterial pathogens and symbionts infect the amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Int J Med Microbiol.* **2002**; 291(8):615-24.

Smani T, Zakharov SI, Csutora P, Leno E, Trepakova ES, Bolotina VM. A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway. *Nat Cell Biol.* **2004**; 6(2):113-20.

Solomon JM, Isberg RR. Growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*: a novel system for genetic analysis of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol.* **2000**; 8(10):478-80.

Solomon JM, Leung GS, Isberg RR. Intracellular replication of *Mycobacterium marinum* within *Dictyostelium discoideum*: Efficient replication in the absence of Coronin. *Infect Immun.* **2003**; 71(6):3578-3586.

Souza GM, Mehta DP, Lammertz M, Rodriguez-Paris J, Wu R, Cardelli JA, Freeze HH. *Dictyostelium* lysosomal proteins with different sugar modifications sort to functionally distinct compartments. *J Cell Sci.* **1997**; 110 (Pt 18):2239-48.

Souza GM, Lu S, Kuspa A. YAKA, a protein kinase required for the transition from growth to development in *Dictyostelium*. *Development.* **1998**; 125(12):2291-302.

St John G, Steinman HM. Periplasmic copper-zinc superoxide dismutase of *Legionella pneumophila*: role in stationary-phase survival. *J Bacteriol.* **1996**; 178(6):1578-84.

Steele TW. Legionnaires' disease in South Australia, 1979-1988. *Med J Aust.* **1990**; 151(6):322, 325-6, 328.

Steinert M, Emody L, Amann R, Hacker J. Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol.* **1997**; 63(5):2047-53.

Steinert M, Hentschel U, Hacker J. *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiol Rev.* **2002**; 26(2):149-62.

Stone BJ, Kwaik YA. Natural competence for DNA transformation by *Legionella pneumophila* and its association with expression of type IV pili. *J Bacteriol.* **1999**; 181(5):1395-402.

Stout JE, Arnold B, Yu VL. Activity of azithromycin, clarithromycin, roxithromycin, dirithromycin, quinupristin/dalfopristin and erythromycin against *Legionella* species by intracellular susceptibility testing in HL-60 cells. *J Antimicrob Chemother.* **1998**; 41(2):289-91.

Sturgill-Koszycki S, Swanson MS. *Legionella pneumophila* replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. *J Exp Med.* **2000**; 192(9):1261-72.

Suhonen J, Hartiala K, Tuominen-Gustafsson H, Viljanen MK. *Borrelia burgdorferi*-induced oxidative burst, calcium mobilization, and phagocytosis of human neutrophils are complement dependent. *J Infect Dis.* **2000**; 181(1):195-202.

Sundstrom C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer.* **1976**; 17(5):565-77.

Susa M, Marre R. *Legionella pneumophila* invasion of MRC-5 cells induces tyrosine protein phosphorylation. *Infect Immun.* **1999**; 67(9):4490-8.

Swanson MS, Isberg RR. Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic reticulum. *Infect Immun.* **1995**; 63(9):3609-20.

Swanson MS, Hammer BK. *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu Rev Microbiol.* **2000**; 54:567-613

Tapper H. Out of the phagocyte or into its phagosome: signalling to secretion. *Eur J Haematol.* **1996**; 57(3):191-201.

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.* **2001**; 114(24):4637-50.

Titus MA. A class VII unconventional myosin is required for phagocytosis. *Curr Biol.* **1999**; 9(22):1297-303.

Toker A, Cantley LC. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature.* **1997**; 387(6634):673-6.

Toshima J, Toshima JY, Martin AC, Drubin DG. Phosphoregulation of Arp2/3-dependent actin assembly during receptor-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol.* **2005**; 7(3):246-54.

Tran Van Nhieu G, Clair C, Grompone G, Sansonetti P. Calcium signalling during cell interactions with bacterial pathogens. *Biol Cell.* **2004** ;96(1):93-101.

Trombetta ES, Helenius A. Lectins as chaperones in glycoprotein folding. *Curr Opin Struct Biol.* **1998**; 8(5):587-92.

Trombetta ES, Parodi AJ. Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **2003**; 19:649-76.

Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol.* **2002**;20:825-52.

Uyeda TQ, Yumura S. Molecular biological approaches to study myosin functions in cytokinesis of *Dictyostelium*. *Microsc Res Tech.* **2000**; 49(2):136-44.

Van Es S, Devreotes PN. Molecular basis of localized responses during chemotaxis in amoebae and leukocytes. *Cell Mol Life Sci.* **1999**; 55(10):1341-51.

Van Troys M, Dewitte D, Goethals M, Carlier MF, Vandekerckhove J, Ampe C. The actin binding site of thymosin beta 4 mapped by mutational analysis. *EMBO J.* **1996**; 15(2):201-10.

Venkataraman C, Gao LY, Bondada S, Kwaik YA. Identification of putative cytoskeletal protein homologues in the protozoan host *Hartmannella vermiformis* as substrates for induced tyrosine phosphatase activity upon attachment to the Legionnaires' disease bacterium, *Legionella pneumophila*. *J Exp Med.* **1998**; 188(3):505-14.

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.* **1997**; 272(20):13326-31

Viswanathan VK, Edelstein PH, Pope CD, Cianciotto NP. The *Legionella pneumophila* iraAB locus is required for iron assimilation, intracellular infection, and virulence. *Infect Immun.* **2000**; 68(3):1069-79.

Viswanathan VK, Kurtz S, Pedersen LL, Abu-Kwaik Y, Krcmarik K, Mody S, Cianciotto NP. The cytochrome c maturation locus of *Legionella pneumophila* promotes iron assimilation and intracellular infection and contains a strain-specific insertion sequence element. *Infect Immun.* **2002**; 70(4):1842-52.

Vogel G, Thilo L, Schwarz H, Steinhart R. Mechanism of phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*: phagocytosis is mediated by different recognition sites as disclosed by mutants with altered phagocytotic properties. *J Cell Biol.* **1980**; 86(2):456-65

Vogel JP, Andrews HL, Wong SK, Isberg RR. Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science.* **1998**; 279(5352):873-6.

Vogel JP, Isberg RR. Cell biology of *Legionella pneumophila*. *Curr Opin Microbiol.* **1999**; 2(1):30-4.

Walz JM, Gerhardt H, Faigle M, Wolburg H, Neumeister B. *Legionella* species of different human prevalence induce different rates of apoptosis in human monocytic cells. *APMIS.* **2000**; 108(6):398-408.

Watanabe N, Suzuki J, Kobayashi Y. Role of calcium in tumor necrosis factor-alpha production by activated macrophages. *J Biochem* **1996**; 120(6):1190-5.

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.* **2001a**; 39(2):313-29.

- Watarai M, Derre I, Kirby J, Growney JD, Dietrich WF, Isberg RR.** *Legionella pneumophila* is internalized by a macropinocytotic uptake pathway controlled by the Dot/Icm system and the mouse Lgn1 locus. *J Exp Med.* **2001b**; 194(8):1081-96.
- Weiner OH, Murphy J, Griffiths G, Schleicher M, Noegel AA.** The actin-binding protein comitin (p24) is a component of the Golgi apparatus. *J Cell Biol.* **1993**; 123(1):23-34.
- Wilkins A, Insall RH.** Small GTPases in *Dictyostelium*: lessons from a social amoeba. *Trends Genet.* **2001**; 17(1):41-48.
- Winn W.C., Myerowitz R.L.** The pathology of *Legionella* pneumonias. A review of 74 cases and the literature. *Hum. Pathol.* **1981**; 12: 401-422.
- Wintermeyer E, Ludwig B, Steinert M, Schmidt B, Fischer G, Hacker J.** Influence of site specifically altered Mip proteins on intracellular survival of *Legionella pneumophila* in eukaryotic cells. *Infect Immun.* **1995**; 63(12):4576-83.
- Wullings BA, van der Kooij D.** Occurrence and genetic diversity of uncultured *Legionella* spp. in drinking water treated at temperatures below 15 degrees C. *Appl Environ Microbiol.* **2006**; 72(1):157-66.
- Wymann MP, Zvelebil M, Laffargue M.** Phosphoinositide 3-kinase signalling--which way to target? *Trends Pharmacol Sci.* **2003**; 24(7):366-76.
- Xu Q, Ibarra M, Mahadeo D, Shaw C, Huang E, Kuspa A, Cotter D, Shaulsky G.** Transcriptional transitions during dictyostelium spore germination. *Eukaryot Cell.* **2004**; 3(5):1101-10.
- Yamamoto Y, Klein TW, Shinomiya H, Nakano M, Friedman H.** Infection of macrophages with *Legionella pneumophila* induces phosphorylation of a 76-kilodalton protein. *Infect Immun.* **1992**; 60(8):3452-5.
- Yan L, Cirillo JD.** Infection of murine macrophage cell lines by *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiol Lett.* **2004**; 230(1):147-52.
- Yan L, Cerny RL, Cirillo JD.** Evidence that hsp90 is involved in the altered interactions of *Acanthamoeba castellanii* variants with bacteria. *Eukaryot Cell.* **2004**; 3(3):567-78.
- Yoshizawa S, Tateda K, Matsumoto T, Gondaira F, Miyazaki S, Standiford TJ, Yamaguchi K.** *Legionella pneumophila* evades gamma interferon-mediated growth suppression through interleukin-10 induction in bone marrow-derived macrophages. *Infect Immun.* **2005**; 73(5):2709-17.
- Yuan A, Siu CH, Chia CP.** Calcium requirement for efficient phagocytosis by *Dictyostelium discoideum*. *Cell Calcium.* **2001**; 29(4):229-38.
- Yumura S, Mori H, Fukui Y.** Localization of actin and myosin for the study of ameboid movement in *Dictyostelium* using improved immunofluorescence. *J Cell Biol.* **1984**; 99(3):894-9.
- Zelicof A, Protopopov V, David D, Lin XY, Lustgarten V, Gerst JE.** Two separate functions are encoded by the carboxyl-terminal domains of the yeast cyclase-associated protein and its mammalian homologs. Dimerization and actin binding. *J Biol Chem.* **1996**; 271(30):18243-52.
- 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.* **2002**; 70(3):1657-63.

ANHANG

1. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AX	Axenisch
BCYE	Buffered charcoal yeast extract
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
Cm	Chloramphenicol
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfonamid
DNA	Desoxiribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ECL	Enhanced chemiluminescence
EM	Elektronenmikroskop
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alii (und andere)
EtOH	Ethanol
evtl.	Eventuell
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorting
FCS	Fötale Kälberserum
G 418	Geneticin 418
g	Gramm
h	Stunde(n)
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
l	Liter
LAMP	lysosom associated membrane protein
LB	Luria-Bertani
LLAP	<i>Legionella</i> like amoebal pathogen
Lsg.	Lösung
min.	Minute(n)
ml	Mililiter
MOI	Multiplicity of infection
NK	Negativkontrolle
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
p.i.	Post-Infektion
PI	Phosphatidylinositol
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-1,4,5-trisphosphat
PYG	Pepton-yeast extract-glucose broth
PYNFH	Pepton-yeast extract-nucleic acid- folic acid- hemin-broth
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Rounds per minute

RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec.	Sekunden
sp.	Spezies
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBST	Tris-Base-Saline-Tween
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethyldiamin
Temp	Temperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
u. a.	Unter anderem
ÜN	Über Nacht
v. a.	Vor allem
v/v	Volume/volume
vATPase	Vakuoläre ATPase
VBNC	Viable but non culturable
VDAC	Voltage dependant anion channel
W	Watt
w/v	weight/volume
z. B.	Zum Beispiel
z. T.	Zum Teil

2. Publikationen

- 1) **Steinert M., Hägele S., Skriwan C., Grimm D., Fajardo M., Heuner K., Schleicher M., Hentschel U., Ludwig W., Marre R., Hacker J.** Interaction of *Legionella pneumophila* with *Dictyostelium discoideum*, in Reinhard Marre *et al.*, (eds) *Legionella*. ASM, Washington D.C. **2002**; 161-164.
- 2) **Skriwan C., Fajardo M., Hägele S., Horn M., Wagner M., Michel R., Krohne G., Schleicher M., Hacker J., Steinert M.** Various bacterial pathogens and symbionts infect the amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Int J Med Microbiol.* **2002**; 291 (8): 615-624.
- 3) **Steinert M., Fajardo M., Wagner C., Heuner K., Hacker J.** *Dictyostelium discoideum*: a new Modell system for pathogen- and symbiont interaction. *Nova Acta Leopold.* **2004**; 88 (333), 79-84.
- 4) **Fajardo M., Schleicher M., Noegel A., Bozzaro S., Killinger S., Heuner K., Hacker J., Steinert M.** Calnexin, calreticulin and cytoskeleton-associated proteins modulate uptake and growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*. *Microbiol.* **2004**; 150:2825-2835.

3. Tagungsbeiträge

Fajardo M., Hägele S., Skriwan C., Schwager S., Schleicher M., Hacker J., Steinert M. *Dictyostelium discoideum* as a Host Modell System for *Legionella pneumophila* Infektion International *Dictyostelium* Conference, Juli 2001, San Diego - Kalifornien.

Fajardo M. Subcellular analysis and inhibitor studies of *Legionella* infected *Dictyostelium*-cells. Mini-Symposium, Wittenberg 2001.

Fajardo M. Signal transduction during uptake and intracellular replication of *L. pneumophila* in *D. discoideum*. Mini-Symposium, Kloster Banz 2002

Fajardo M., Gerisch G., Schleicher M., Noegel A., Bozzaro S., Heuner K., Hacker J., Steinert M. Signal transduction in *Dictyostelium* upon uptake of *Legionella pneumophila*. 54. DGHM-Tagung, Oktober 2002, Heidelberg.

4. Lebenslauf

Name	Marcela Fajardo-Moser
Geburtsdatum	19.04.1975
Geburtsort	Santafé de Bogotá (Kolumbien)
Familienstand	verheiratet, 1 Kind
Schulbildung:	
1981 - 1986	Grundschule, Colegio Andino (Deutsche Schule) in Bogotá
1986 - 1994	Gymnasium, Colegio Andino in Bogotá Abschluss: allgemeine Hochschulreife
Hochschulbildung:	
08.1994 - 06.1999	Studium der Biologie an der Los Andes Universität in Bogotá, Kolumbien. Studienschwerpunkte: Mikrobiologie, Molekularbiologie, Immunologie, Zellbiologie. Diplomarbeit beim Nationalen Zentrum für Kaffeeforschung, Chinchina-Kolumbien. Thema: „Morphologische, genetische und molekulare Variabilität von Stämmen des Pilzes <i>Cercospora coffeicola</i> “.
Promotion:	
05.2000 - 02.2004	Dissertation am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg. Thema: „Untersuchung der <i>Legionella</i> -Infektion in der genetisch manipulierbaren Amöbe <i>Dictyostelium discoideum</i> “. Stipendiatin der Bayerischen Forschungstiftung.
Beschäftigungsverhältnisse:	
01.1999 - 07.1999	Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei der Corporación CorpoGen in Bogotá-Kolumbien.
08.1999 - 04.2000	Koordination des Shrimp Diagnostik Labors am Center for Aquaculture Research CENIACUA in Tumaco-Kolumbien.
Seit 03.2004	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg, AG Moll.

Würzburg, September 2006