2 Einleitung

2.1 Biologie und Pathogenese der Gattung Legionella

Legionellen sind aquatische, Gram-negative Stäbchenbakterien mit einer unipolaren Flagelle, die sich in ihrem natürlichen Habitat intrazellulär in Protozoen vermehren können. Gelangen sie jedoch in künstliche Wassersysteme wie z. B. Klimaanlagen, Schwimmbäder, Luftbefeuchter oder Inhalations- und Beamtungsgeräte, so kann ihre Konzentration pro Liter Wasser aufgrund der meist höheren Temperaturen von 30 bis 50°C um ein vielfaches gesteigert werden und bis 10⁶ Bakterien/Liter betragen (Lück und Helbig, 1997). Bei älteren oder immungeschwächten Menschen kann die Inhalation solcher mit Legionellen kontaminierter Aerosole zu einer atypischen Form der Pneumonie führen. Da somit diese Infektionskrankheit eng mit der Technisierung der Umwelt zusammenhängt und fast nur aufgrund dieser technischer Vektoren eine ausreichende Bakterienlast erreicht werden kann, wurde *Legionella pneumophila* erst 1977 als humanpathogener Keim beschrieben (McDade et al., 1977). Zuvor erkrankten 1976 beim jährlichen Treffen der "American Legion" 182 Teilnehmer, von denen 29 verstarben.

Eine Legionella-Infektion kann in zwei unterschiedlichen Formen verlaufen. Die schon erwähnte Legionärskrankheit geht nach einer Inkubationszeit von zwei bis zehn Tagen mit plötzlich einsetzendem hohem Fieber, Schüttelfrost und einer Pneumonie einher. Ohne Behandlung führt sie in 10-34% der Fälle zum Tod des Patienten (Susa et al., 1997). Zur Therapie eignen sich membrangängige Antibiotika wie Erythromycin, Rifampicin und Ciprofloxacin (Lück und Helbig 1997). Besondere Risikopersonen sind vor allem ältere Menschen, Raucher, Alkoholkranke sowie Immunsupprimierte und Transplantationspatienten. Eine zweite Form der Legionella-Infektion stellt das Pontiacfieber dar. Hierbei handelt es sich um eine Erkrankung mit grippeähnlichen Symptomen, die jedoch selbstlimitierend und nicht letal ist. In Europa werden im Durchschnitt pro Jahr 4,5 Fälle auf eine Million Einwohner gemeldet (Winiecka-Krusnell et al., 1999). Die Zahl der tatsächlichen Infektionen wird mit 8000-12000 Fällen in Deutschland jedoch weit höher geschätzt (Lück und Helbig, 1997).

Die Gattung *Legionella* umfasst mittlerweile 42 Arten (Winn, 1999), sowie zusätzlich mindestens 12 Legionella Like Ameobal Pathogens (LLAP) (Adeleke et al., 1996), die sich nicht oder nur schwer auf künstlichen Medien anziehen lassen, aber im Grunde dieselbe Physiologie wie Legionellen aufweisen. Aus dem gesamten Spektrum konnten 19 Arten als humanpathogen beschrieben werden. Allerdings ist in 80% aller Fälle *L. pneumophila* der

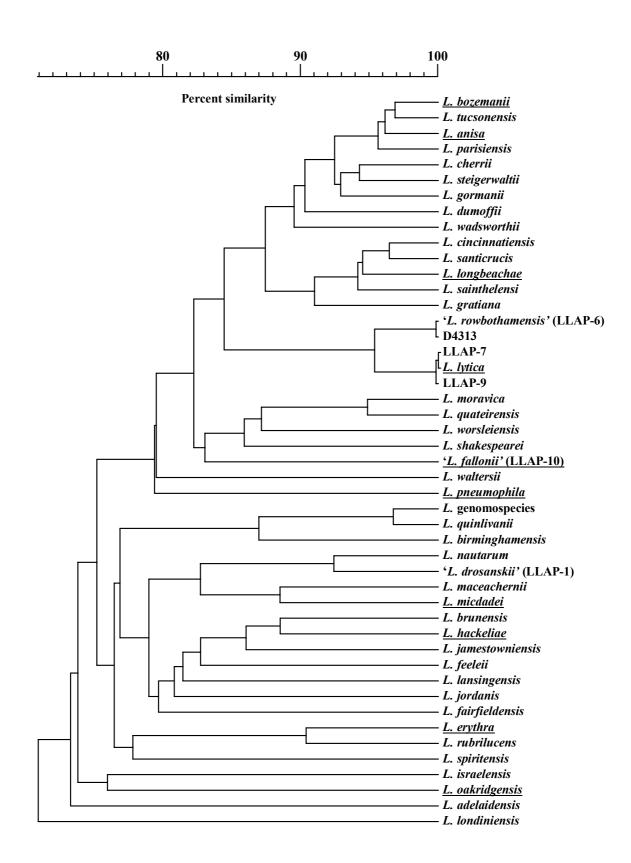


Abbildung 2-1: *Legionella* Stammbaum erstellt aufgrund der mip-Sequenz (nach Adeleke et al., 2001) Die in dieser Arbeit verwendeten phylogenetisch unterschiedlichen Legionellen-Stämme sind unterstrichen.

Erreger der Legionärskrankheit, wobei hier wiederum 95% auf die Serogruppe 1 entfallen (Abu Kwaik et al., 1998). Weitere Arten, die relativ häufig einen Ausbruch der Krankheit verursachen sind *L. micdadei, L. bozemanii* und *L. longbeachae* (Atlas et al., 1999). Allerdings konnte z. B. *L. anisa* aus dem infizierten Gewebe eines Patienten nur nach einer Amöbenpassage auf künstlichen Medien kultiviert werden (La Scola et al., 2001). Daher könnte es sein, dass der Anteil an nicht-*pneumophila* Erregern in der Praxis etwas höher liegt aber aufgrund der schlechteren Kultivierbarkeit mit der Standarddiagnostik weniger häufig erfasst wird. Das parasitäre Vorliegen des ubiquitären Umweltkeimes *Legionella* in Süßwasserprotozoen wird als Voraussetzung dafür gesehen, dass sich die Bakterien während des Krankheitsverlaufes intrazellulär in humanen Alveolarmakrophagen vermehren. Dieses duale Wirtssystem galt lange Zeit als spezifisches Merkmal für Legionellen. In der Zwischenzeit kennt man jedoch weitere pathogene Bakterien, die innerhalb von Protozoen überleben (siehe Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1 Bakterienspezies mit dualem Wirtssystem

Bakterien Spezies	Protozoenwirt	Art der Interaktion	Referenz
Mycobacterium avium	Acanthamoeba ssp.	Replikation in Amöben, Überleben in Zysten	Steinert et al., 1998
Mycobacterium leprae	Acanthamoeba ssp.	Amöben dienen evtl. als Reservoir	Jadin et al., 1987
Vibrio cholerae	Acanthamoeba ssp. Naegleria ssp.	Amöben erhöhen Überlebensrate in künstlichem Mikrokosmos	Thom et al., 1992
Pseduomonas aeruginosa	Acanthamoeba ssp.	Pseudomonaden als natürliche Parasiten von Amöben	Michel et al., 1995
Listeria monocytogenes	Acanthamoeba ssp.	intrazelluläre Replikation	Ly et al., 1990
Francisella tularensis	T. pyriformis A. palestinensis	Intrazelluläre Replikation, Quelle für endemische Bakterien im Gewässer	Gustafsson et al., 1989
Helicobacter pylori	A. castellanii	Replikation in Amöben	Wieniecka-Krusnell, 2002

Die Bedeutung von Amöben für die *Legionella*-Pathogenese wird dadurch unterstrichen, dass Patienten häufig gleichzeitig Antikörper gegen Legionellen und auch Amöben entwickeln und man daher von einer Koinfektion ausgehen kann (Winiecka-Krusnell et al., 1999). Bei Acanthamoeben konnte weiterhin beobachtet werden, dass kurz vor der Enzystierung der Amöben Bakterien-haltige Vesikel freigesetzt werden können. Bis zu 200 Legionellen sind in

diesen Vesikeln von der Membran myelinartig eingeschlossen. Durch die Inhalation dieser Partikel wird eine hohe lokale Infektionsdosis erreicht und im Meerschweinchen eine Pneumonie ausgelöst (Berk et al., 1998). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass intrazellulär in Amöben gewachsene Legionellen Säugerzellen sehr viel besser infizieren als Legionellen die auf künstlichen Medien angezogen wurden (Cirillo et al., 1994). Außerdem konnte im Tiermodell bei einer Koinfektion mit *L. pneumophila* und *H. vermiformis* eine verstärkte Letalität der Mäuse im Vergleich zur Infektion mit Legionellen alleine beobachtet werden (Brieland et al., 1997).

2.2 Vorkommen von Legionellen in der Umwelt

Legionellen sind Keime mit außerordentlich hohen Nährstoffansprüchen. Sie sind weder fermentativ noch saccharolytisch und nutzen fast ausschließlich Aminosäuren als alleinige Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle. Daher überleben Legionellen im Süßwasser nur aufgrund ihrer Assoziation mit anderen Mikroorganismen, die die benötigten Wachstumsfaktoren zur Verfügung stellen. Legionellen können als regelmäßiger Bestandteil von Biofilmen aus Gewässern (Fields, 1996, Grimm et al., 2001) und sogar aus Grundwasser (Riffard et al., 2001) isoliert werden. Es wurde jedoch postuliert, dass ohne die gleichzeitige Anwesenheit von Protozoen in diesen Biofilmen kein Wachstum stattfindet und die Legionellen darin ausschließlich persistieren (Murga et al., 2001, Abu Kwaik et al., 1998).

Weiterhin ist für *L. pneumophila* ein "viable but non culturable" (VBNC)-Stadium bekannt. Legionellen in diesem Stadium wachsen nicht mehr auf künstlichen Medien, können aber nach Kokultivierung mit *A. castellanii* wieder reaktiviert und physiologisch aktiv werden. Eventuell können die Legionellen in diesem Stadium nährstoffarme Zeiten überdauern (Steinert at al., 1997).

Bislang wurden für *L. pneumophila* 13 Amöbenspezies sowie 3 Ciliaten aus der Gattung *Tetrahymena* als geeignete Wirte beschrieben (Fields, 1996). Dabei stellt *Acanthamoeba* mit fünf Spezies die größte Gattung dar, gefolgt von *Naegleria* mit vier Spezies. Allerdings kann das ganze Amöbenspektrum nicht von jeder einzelnen *Legionella*-Art als Wirt genutzt werden. Während *L. pneumophila* sich in nahezu allen Amöben vermehren kann, weisen weniger virulente Stämme ein eingeschränktes Wirtsspektrum auf. So vermehrt sich *L. anisa* zwar in *A. castellanii* nicht aber in Naeglerien oder Echinamoeben.

Das intrazelluläre Vorliegen dient den Legionellen nicht nur als Nahrungsgrundlage sondern gleichzeitig als Schutz vor widrigen Umweltbedingungen. Desinfektionsmittel besitzen eine größere Wirksamkeit bei künstlich angezogen extrazellulären Legionellen im Vergleich zu

intrazellulär in Amöben vorliegenden Bakterien. So sind intrazelluläre Legionellen 1000-mal resistenter gegenüber Antibiotika und Bioziden (Brown und Barker, 1999) und überleben sogar eine Behandlung mit 50 mg/Liter freiem Chlor (Kilvington et al., 1990). Werden kontaminierte Wassersysteme mit einer subletalen Dosis an Chlor behandelt, so stimuliert dies die Enzystierung der Amöben und gewährleistet auf diese Weise sogar einen erhöhten Schutz der intrazellulären Legionellen vor Desinfektionsmitteln und Temperaturen bis 80°C (Mathers et al., 1996).

2.3 Aufnahmemechanismen von Legionellen in Protozoen- und Säugerwirtszellen

Die initiale Aufnahme von *Legionella* in die verschiedenen Wirtszellsysteme weist je nach System beachtliche Unterschiede auf. Dagegen scheint die nachfolgende intrazelluläre Replikation in Protozoen- und Säugerzellen wahrscheinlich nach demselben Mechanismus abzulaufen (siehe 2.4).

In humanen Makrophagen kann das von *omp*S kodierte <u>major outer membrane protein</u> MOMP an die Komplementfaktoren C3b und C3bi binden. Das bakterielle Porin wird dadurch modifiziert, bindet an die Komplementrezeptoren CR1 und CR3 und wird anschließend phagozytiert (Payne, 1987). Außerdem ist nach Opsonisierung mit spezifischen *Legionella*-Antikörpern die Aufnahme über den Fc-Rezeptor möglich (Husmann, 1992). Weiterhin gibt es Komplement-unabhängige Phagozytosemechanismen, die z. B. in Abwesenheit von Komplementkomponenten während in vitro Infektionsversuchen eine Rolle spielen.

Eine Besonderheit von Legionellen stellt die Möglichkeit der Aufnahme in die Wirtszelle über "coiling" Phagozytose dar. Im Gegensatz zum konventionellen "zipper" Mechanismus windet sich hier nur ein Pseudopodium mehrmals um das Bakterium und schließt es in ein Phagosom aus mehreren Membranschichten ein (Horwitz, 1984). Es wurde postuliert, dass durch coiling entstandene Phagosomen einem reduzierten "oxidativen burst" ausgesetzt sind und daher die eingeschlossenen Bakterien eine höhere Überlebensrate aufweisen als die über den Fc-Rezeptor aufgenommenen, von denen nur ca. 50% überleben (Shuman et al., 1998). In primären Mausmakrophagen konnte kürzlich gezeigt werden, dass Legionellen nicht phagozytiert sonder makropinozytiert werden. Dabei entsteht zunächst für ca. fünf Minuten eine Bakterien-haltige Vakuole mit weit abstehender Membran und relativ großem Volumen. Innerhalb kurzer Zeit tritt dann ein Volumenverlust ein. Die Membran liegt daraufhin eng an den Bakterien an. Dieser Zustand ist dann vergleichbar mit einem über Phagozytose entstandenen, neu gebildeten Phagosom, das noch nicht weiter gereift ist (Watarai et al.,

2001). Allen diesen unterschiedlichen Mechanismen ist jedoch die Abhängigkeit vom Mikrofilamentsystem der Wirtszelle gemeinsam. Die Aufnahme der Bakterien kann daher mit dem spezifischen Inhibitor der Aktinpolymerisation, Cytochalasin D, gehemmt werden (Eliott und Winn, 1986, King et al., 1991, Harb et al., 1998).

Im Protozoenwirt H. vermiformis erfolgt die Aufnahme von Legionellen dagegen unabhängig vom Mikrofilamentsystem und Cytochalasin D. Es handelt sich hier um eine Form der Rezeptor-vermittelten Endozytose, die mit Methylamin unterbunden werden kann (King et al., 1991). Als Rezeptor dient ein Galaktose/N-Acetylglucosamin inhibierbares 170 kDa Lektin, das nach Bindung der Bakterien rasch dephosphoryliert wird (Venkatamaran et al., 1997). Dieses Lektin zeigt Homologie zu einem 170 kDa Protein von Echinamoeba histolyticum und die extrazellulären Domänen weisen Ähnlichkeiten zu CR1- und β-Integrinen von Säugern auf. Die Aufnahme von L. pneumophila über diesen Rezeptor ist abhängig von der Proteinbiosynthese der Wirtszelle, die eventuell durch die Dephosphorylierung des Rezeptors modifiziert werden könnte. Die Aufnahmemechanismen innerhalb der verschiedenen Protozoenwirte sind allerdings sehr divers. So wird bei Acanthamoeba polyphaga der erwähnte Rezeptor nicht verwendet und die Invasion von Legionellen in diese Wirtszelle ist wie bei humanen Monozyten unabhängig von der Proteinsynthese und kann somit nicht durch Cycloheximid inhibiert werden (Harb et al., 1998). Bei A. castellanii konnte dagegen in Anwesenheit von Cycloheximid eine 50% Reduktion der Invasionsrate beobachtet werden (Köhler, 2000 b). Demzufolge zeigen sogar nah verwandte Arten wie A. castellanii und A. polyphaga eine Heterogenität in den vorhandenen Aufnahmemechanismen (Harb et al., 1998). Eventuell besitzt A. castellanii die meisten unterschiedlichen Internalisierungsmöglichkeiten, da Inhibitoren wie Methylamin und Cycloheximid aber auch Cytochalasin D Invasionsvermindernde Wirkung besitzen, aber im Gegensatz zu H. vermiformis nie einen vollständigen Rückgang der Invasionsrate zeigen. Dafür spricht außerdem die synergistische Wirkung von Cycloheximid und Cytochalasin D (Köhler, 2000 b).

Auf Seiten der humanen Wirtszellen konnte die Beteiligung von Tyrosin-Kinasen und Proteinkinase C am Aufnahmeprozess der Legionellen nachgewiesen werden. Durch die Aktivität dieser Enzyme wurden insgesamt 9 Wirtszellproteine phosphoryliert. Allerdings entspricht diese Aktivität dem normalen Phagozytoseprozess und ist somit nicht mit der Virulenz assoziiert (Coxon et al., 1998). Im Gegensatz dazu konnte in einer neueren Studie gezeigt werden, dass durch die Inhibierung der Phospatidylinsitol-3-Kinase durch Wortmannin zwar die Invasion von avirulenten *Legionella*-Mutanten und *E. coli* unterbunden wird, aber nicht die Aufnahme von *L. pneumophila* (Khelef et al., 2001).

In *H. vermiformis* konnte nach der Bindung der Legionellen an den Lektin-Rezeptor die Dephosphorylierung von Zytoskelettproteinen wie Paxillin, Vinculin und pp125^{FAK} gezeigt werden (Venkataraman et al., 1998). Außerdem werden schon allein nach Kontakt der Amöben mit *L. pneumophila* 33 Wirtsproteine verstärkt exprimiert, wovon 12 Proteine in nicht infizierten Amöben nicht nachgewiesen werden konnten und die restlichen Proteine in geringer Menge vorlagen. Weitere 11 Proteine wurden durch eine Bindung von *Legionella* reprimiert. Hier konnte eine eindeutige Korrelation mit der Virulenz gezeigt werden, da diese veränderte Proteinexpression nur bei lebenden und nicht bei toten Legionellen beobachtet werden konnte (Abu Kwaik et al., 1994).

2.4 Intrazelluläre Replikation von Legionellen

Nach der Aufnahme von Legionellen durch die Wirtszelle liegen die Bakterien in einem Phagosom vor, dass weder angesäuert wird noch mit Lysosomen fusioniert (Horwitz und Maxfield, 1984, Swanson und Isberg, 1996, Roy et al., 1998). Im weiteren Verlauf wird durch L. pneumophila die Anlagerung von ER-Vesikeln und Mitochondrien ans Phagosom initiiert (Swanson und Isberg, 1995). Außerdem ändern sich sowohl die Dicke sowie die Lipidzusammensetzung der Membran dramatisch. Das frühe Phagosom ist von der Plasmamembran umgeben. Diese ist aufgrund des Reichtums an Cholesterinen, Sphingo- und Glycolipden relativ dick (72Å). Nach 15 bis 30 Minuten ähnelt die Membran in der Dicke (62 Å) eher den Cholesterin-armen Membranen der Mitochondrien und des ERs (Tilney et al., 2001). Nach sechs Stunden verschwinden die Phagosomen-assoziierten ER-Vesikel und werden durch Ribosomen ersetzt. Dann erst beginnt die eigentliche Replikationsphase der Legionellen, die ungefähr 10 bis 14 Stunden andauert. Nachdem ungefähr fünf Legionellen im Phagosom vorliegen beginnt das Phagosom mit Lysosomen zu fusionieren und der pH fällt ab. Nach 18 Stunden besitzen ca. 70% der Phagosomen lysosomale Marker. In diesem sauren Kompartiment vermehren sich nun die Legionellen bis zur Lyse der Wirtszellen (Sturgill-Koszycki et al., 2000). Mit der Umgestaltung des ER-ähnlichen Phagosoms in ein Phagolysosom geht ein starker Wechsel des Legionellen-Phänotyps einher. Man spricht daher auch vom biphasischen Lebenszyklus der Legionellen. Die Transmissionsform besitzt maximale Virulenz und verhält sich wie Bakterien aus der postexponentiellen Phase bei Anzucht in Flüssigkultur. Diese Bakterien sind motil um neue Wirte besiedeln zu können, besitzen osmotische Stressresistenz um in der Umwelt besser zu überleben, zeigen zytotoxische Wirkung aufgrund eines Poren-bildenden Proteines und exprimieren Faktoren, die die Phagosomenreifung im nächsten Wirt zunächst unterbinden und damit die

intrazelluläre Replikation erlauben (Vogel und Isberg, 1999, Byrne und Swanson, 1998, Bachmann und Swanson, 2001). Während der intrazellulären Replikation ist der Phänotyp dieser Legionellen dagegen eher dem Phänotyp von Bakterien aus der exponentiellen Phase in Flüssigkultur vergleichbar. Die Flagelle wird nicht exprimiert, die Bakterien sind Natriumresistent, nicht zytotoxisch und nur in geringem Ausmaß dazu in der Lage, die Phagolysosomfusion im nächsten Wirt zu inhibieren. Ein vergleichbarer Lebenszyklus liegt auch bei weiteren pathogenen Erregern vor wie z. B. *Coxiella burnetii*. Dieser obligat intrazelluläre Erreger des Q-Fiebers ist eng verwandt mit der Gattung *Legionella* und liegt morphologisch entweder in der virulenten Transmissionsform, der Sporen-ähnlichen sogenannten "small cell variant" vor oder in der repliaktiven Form der "large cell variant" (Wiebe et al., 1972, McCaul et al., 1982).

Wie die Umwandlung von der vegetativen Form in die Transmissionsform erfolgt ist noch nicht vollständig geklärt. Es wurde eine Beteiligung von ppGpp (Guanosin 3'5'bispyrophosphat) postuliert (Hammer und Swanson, 1999). Dieser "second messenger" reichert sich bei Aminosäuremangel in der post-exponentiellen Phase in der Bakterienzelle an. In E. coli aktiviert ppGpp in der stationären Phase den alternativen Sigma-Faktor RpoS, wodurch die Stressresistenz zunimmt. Da eine Legionella rpoS-Mutante in Acanthamoeben ein attenuiertes Wachstum zeigt (Hales und Shuman, 1999), wurde in Analogie zu E. coli die Regulation der Wachstumsphasen-abhängigen Modulation des Phänotyps durch ppGpp angenommen. Die weitere Integration des "second messenger" Signals könnte dabei durch das Zweikomponenten System LetA/LetS erfolgen (Hammer et al., 2002). Gegen die Beteiligung von ppGpp an der Regulation spricht allerdings, dass die *rpo*S-Mutante keinen Effekt in HL60-Zellen aufweist (Hales und Shuman, 1999). Weiterhin wurde eine Deletionsmutante der ppGpp-Synthethase RelA hergestellt mit der gezeigt werden konnte, dass ppGpp zwar regulatorischen Einfluss auf die Pigmentproduktion und die Expression der Flagelle in der stationären Phase ausübt, aber nicht mit der Ausbildung der maximalen Virulenz durch das dot/icm System korreliert ist. Das intrazelluläre Wachstum war somit weder in HL60-Zellen noch in Acanthamoeben beeinträchtigt. RpoS besitzt daher nur für solche Virulenzdeterminanten, die nicht zum dot/icm-System gehören, eine Bedeutung als Transkriptionsfaktor (Zusman et al., 2002).

Die vorliegenden Studien zur Etablierung einer *Legionella*-spezifischen Replikationsvakuole bezogen sich durchgängig auf *L. pneumophila*. Es kann jedoch nicht davon ausgegangen werden, dass dieser Ablauf bei allen *Legionella*-Arten auf dieselbe Weise erfolgt. In einer Studie wurde z. B. die Ultrastruktur von *L. micdadei*-Phagosomen untersucht. Dabei konnte

beobachtet werden, dass in der frühen Phase zwar Mitochondrien und Vesikel zum Phagosom rekrutiert werden. Es kommt aber zu keinem Zeitpunkt zu einer Assoziation mit Ribosomen wie dies bei *L. pneumophila* der Fall ist (Gao et al., 1999). Weiterhin konnte die Rekrutierung des <u>ADP-Ribosylierungsfaktors</u> ARF1 in die phagosomale Membran bei *L. pneumophila* beobachtet werden. Dieses GTP-binde-Protein ist ein Schlüsselregulator des Vesikeltransports vom Golgi-Apparat in Richtung ER. ARF1 wird mittels des von *L. pneumophila* sekretierten Proteins RalF zum Phagosom rekrutiert. RalF wirkt als Guanosin-Austauschfaktor und bewirkt dadurch die Aktivierung von ARF1. Das *ral*F-Gen ist spezifisch für die Art *L. pneumophila* und kommt dort in fast allen Serogruppen vor, konnte aber nicht in weiteren humanpathogenen Stämmen wie *L. micdadei*, *L. longbeachae* oder *L. bozemanii* nachgewiesen werden (Nagai et al., 2002). Eine Anreicherung von ARF1 in den Phagosomen dieser *Legionella*-Arten wird daher nicht erwartet. Eine Deletionsmutante von *ral*F hat jedoch keinerlei Auswirkungen auf das intrazelluläre Überleben der Bakterien.

2.5 Lyse der Wirtszellen durch Legionellen

Protozoen und humanen Wirtszellsystemen gemeinsam ist die nekrotische Lyse der Zellen durch die Poren-bildende Aktivität eines bislang unbekannten Legionella-Toxins. So zeigen z. B. sogenannte *rib* (release of intracellular bacteria) Mutanten eine unveränderte intrazelluläre Replikation, werden aber aus den Wirtszellen nicht mehr freigesetzt (Gao et al., 2000). Die Freisetzung der Bakterien könnte zusätzlich rein physikalisch durch die starke Motilität der Legionellen in der Vakuole zu Beginn der stationären Phase unterstützt werden (Byrne und Swanson, 1998). Darüber hinaus lassen sich weitere unspezifische Wirkungen durch die Anhäufung zytotoxischer Stoffwechselprodukte wie NH₃ nachweisen (Rowbothom, 1986). In Säugerzellen konnte außerdem eine Kontakt-abhängige Induktion der Nekrose beobachtete werden. Dabei werden die Zellen wiederum mit Hilfe einer inserierten Pore lysiert, und zwar allein durch das extrazelluläre Vorliegen von L. pneumophila. Dazu wird allerdings eine extrem hohe MOI (multiplicity of infection) benötigt, die in vivo wahrscheinlich nur am Ende einer Infektion erreicht werden könnte (Husmann und Johnson, 1994, Kirby et al., 1998). Desweiteren konnte in Säugerzellen die Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose) durch L. pneumophila gezeigt werden (Müller et al., 1996). Apoptotische Zellen lassen sich schon kurz nach Beginn der Infektion nachweisen. Die Induktion ist daher unabhängig von der Replikation der Legionellen (Hägele et al., 1998). Außerdem konnte von Seiten der Wirtszelle eine Beteiligung der Caspase 3 an der Regulation dieser Prozesse nachgewiesen

werden (Gao und Abu Kwaik 1999). Dieser Weg der Signaltransduktion wird auch bei einer Induktion der Apoptose durch *L. longbeachae* aktiviert (Higa et al., 2002).

2.6 Virulenzfaktoren von Legionellen

2.6.1 Sekretionssysteme und ihre Effektormoleküle

Der größte zusammenhängende Virulenzlokus in *L. pneumophila* besteht aus den *dot/icm* Genen. Diese 24 Gene sind auf zwei Regionen mit jeweils 20 kB verteilt und werden in 9 Operons transkribiert (Segal et al., 1998, Vogel et al., 1998). Davon besitzen 14 Gene Homologie zu den Tra/Trb-Proteinen des IncI Plasmids Col1b-P9, die während der Konjugation den Austausch der Plasmid DNA über ein Typ IV Sekretionssystem ermöglichen. Einige pathogene Bakterien benutzen diese Art der Sekretion allerdings für den Transport von Virulenzfaktoren in die Wirtszellen wie z. B. *Agrobacterium tumefaciens, Brucella suis, Helicobacter pylori* oder *Bordetella pertussis* (Swanson und Hammer, 2000). Bei *L. pneumophila* kommt es über dieses System zur Sekretion von Effektormolekülen, die die Phagolysosomfusion inhibieren. Daher verhindern Mutationen in dieser Region eine intrazelluläre Vermehrung von Legionellen in ihren Wirtszellen. Weiterhin ist die Sekretion über das *dot/icm*-System für die Induktion der Apoptose in humanen Makrophagen notwendig (Zink et al., 2002).

Um Funktion der sekretierten Effektorproteine zu ergründen, wurden vor allem die Gene ohne Homologie zum Transportapparat untersucht. So konnte gezeigt werden, dass DotA in die phagosomale Membran inseriert und dort die Ausbildung einer Pore bewirkt (Kirby et al., 1998, Kirby und Isberg, 1998). Die Phagosomenreifung kann in einer entsprechenden DotA-Mutante nicht mehr inhibiert werden und die Bakterien werden somit verdaut (Roy et al., 1997, 1998). In neueren Studien wurden außerdem beobachtet, dass DotA in der Lage ist ringförmige Komplexe auf der Oberfläche zu bilden. Im Kulturüberstand konnte intaktes DotA allerdings nur nach Deletion der Zink-Metalloprotease Msp nachgewiesen werden (Nagai und Roy, 2001). Für die löslichen *icm*-Genprodukte konnte eine Interaktion von IcmQ mit IcmR bzw. IcmS mit IcmW nachgewiesen werden (Coers et al., 2000). IcmR besitzt dabei eine typische Chaperone-Aktivität (Duménil und Isberg 2001). Für IcmX konnte die Sekretion in den Kulturüberstand nachgewiesen werden (Mathews und Roy 2000) ebenso wie für RalF (siehe auch 2.4) (Nagai et al., 2002). Eine Deletionsmutante von RalF hatte jedoch keine Auswirkungen auf die intrazelluläre Vermehrungsrate. DotH und DotO bilden in der post-exponentiellen Phase faserförmige Strukturen auf der Oberfläche von intrazellulär

gewachsenen Legionellen. Diese Struktur könnte eine Rolle bei der Aufnahme in einen neuen Wirt oder bei der Kontakt-abhängigen Zytotoxiziät spielen. Die tatsächliche Funktion ist aber noch nicht bekannt (Watarai et al., 2001). Bei IcmT handelt es sich um ein multifunktionelles Protein, das einerseits eine Komponente des Transportapparates darstellt, andererseits aber im C-Terminus eine Poren-bildende Aktivität besitzt. Rib-Mutanten, die sich zwar intrazellulär vermehren aber nicht mehr aus den Wirtszellen freigesetzt werden können, weisen Punktmutationen im C-Terminus des *icm*T-Genproduktes auf (Molmeret et al., 2002).

Abschließend lässt sich sagen, dass viele Faktoren des *dot/icm*-System zusammen wirken und vor allem in der frühen Infektionsphase von Bedeutung sind, um eine *Legionella*-spezifische Replikationsvakuole zu etablieren. Für die eigentliche intrazelluläre Replikation sind sie nicht mehr notwendig. So vermehrt sich z. B. eine *dot*A Deletionsmutante normal, wenn sie im selben Phagosom wie der WT vorliegt und dadurch die Phagolysosomfusion in dem gemeinsamen Kompartiment verhindert wurde (Mathews und Roy 2000). Liegt die DotA-Mutante mit dem WT zwar innerhalb einer Wirtszelle, jedoch in zwei getrennten Phagosomen vor, so wird sie verdaut. Die sekretierten Effektormoleküle wirken somit nur in eis und nicht in trans. Die Phagosomenreifung aller anderen Vesikel in der Zelle verläuft damit trotz einer Infektion mit *Legionella* ungestört weiter (Coers et al., 1999). Es konnte jedoch aber auch gezeigt werden, dass das *dot/icm*-System alleine nicht ausreicht, um die Replikationsvakuole vollständig vom endosomalen Weg abzukoppeln. Mindestens ein weitere unabhängiger Faktor mit Resistenz gegenüber einer Formaldehydbehandlung ist dazu notwendig (Joshi et al., 2001).

Ein zweites Typ IV Sekretionssystem weist Homologie zu Systemen für den konjugativen Transport des RSF 1010 Plasmids auf. Es umfasst 11 Gene (lvh, <u>Legionella vir homologues</u>) und besitzt keinerlei Bedeutung für die Virulenz.

Im Gegensatz zum lvh-Lokus konnte eine Beteiligung von Typ II Sekretionssystem an der Virulenz gezeigt werden. PilD ist ein Peptidase, die sowohl eine Funktion in der Typ IV-Pilusbiogenese als auch in der Typ II Sekretion besitzt. Eine entsprechende Mutante zeigt ein vermindertes intrazelluläres Wachstum in Protozoen und humanen Makrophagen (Liles et al., 1999). Da eine Pilin-Mutante nur Effekte auf die Adhärenz ausübte (Stone und Abu Kwaik 1998), konnte die Abhängigkeit der intrazellulären Replikationsrate alleine von der Sekretion über Typ II nachgewiesen werden. Zu den sekretierten Enzymen gehören unter anderem die Zink-Metalloprotease Msp, Phospholipase A, eine saure Phosphatase, Protease und Lipase (Aragon et al., 2001, Rossier et al., 2001). Gereinigtes Msp reicht aus, um im Meerschweinchenmodell Lungenschäden zu erzeugen, wie sie während der

Legionärskrankheit auftreten. Eine entsprechende Mutante zeigt in Acanthamoeben allerdings keine veränderte Replikation (Moffat et al., 1994, Szeto und Shuman 1990). Phospholipase A (PLA) und Lysophospholipase A (LPLA) können die Phospholipide des sogenannten Lungensurfactants in freie Fettsäuren und zytotoxisch wirkendes Lysophophatidylcholin spalten (Flieger et al., 2000a, b). Allerdings konnten in der Menge der sekretierten PLA bzw. LPLA keine Unterschiede zwischen virulenten und avirulenten Legionellen nachgewiesen werden (Flieger et al., 2001). Ebenso hatten die Deletionsmutante der sauren Phosphatase keine Auswirkungen auf die intrazelluläre Vermehrung (Aragon et al., 2001). Daher lässt sich zusammenfassend sagen, dass das Typ II Sekretionssystems an der Ausbildung der Virulenz beteiligt ist, welche sekretierten Protein dabei eine Rolle spielen ist nach wie vor ungewiss. Weiterhin gibt es in L. pneumophila sowie in den anderen humanpathogenen Stämmen ein rtxA-Toxin (repeats in toxin). Im Mausmodell weist die entsprechende Mutante ein attenuiertes Verhalten auf. Eine Beteiligung an der Kontakt-abhängigen Zytotoxizität konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, obwohl Homologie zu anderen Poren-bildende Toxinen besteht. RtxA trägt eher zur optimalen Invasion in die Wirtszellen und zur Etablierung des Legionella-spezifischen Phagosoms bei. Es könnte sich also um ein multifunktionelles Protein handeln, dessen genaue Wirkungsweise noch nicht vollständig geklärt ist (Cirillo et al., 2002, 2001).

2.6.2 Oberflächenstrukturen

Das *Legionella* LPS weist eine ungewöhnlich hohe Hydrophobizität auf, die durch die verzweigten Fettsäuren am Lipid A und die Substitution freier Hydroxylgruppen bewirkt wird (Knierel et al., 1994, Zähringer et al., 1995). Diese Beschaffenheit könnte für die Übertragung in Aersolen oder die Bildung von Biofilmen von Bedeutung sein (Helbig et al., 1995, Zähringer et al., 1995). Außerdem konnte für das LPS eine Phasenvariation festgestellt werden. Während der Expression des virulenten LPS ist eine 30 kB Region im Chromosom lokalisiert. Nach der Excision repliziert dieser Bereich als "high copy" Plasmid und avirulentes LPS erscheint auf der Oberfläche. Seltsamerweise wird diese Variation in Richtung der avirulenten Phase während der Replikation im Tiermodell induziert (Lüneberg et al., 2001).

Die Flagelle wird nach Erreichen der stationären Phase auf der Oberfläche der Legionellen exprimiert. Die Expression wird dabei durch den alternativen Faktor σ^{28} reguliert (Heuner et al., 1995, 1999, Byrne und Swanson 1989). Die Flagelle ist dabei vor allem zu Beginn der Infektion von Bedeutung. So konnte bei einer *fla*A-negativen Mutante während der ersten

Stunden eine verringerte Invasion in *A. castellanii* und HL60-Zellen nachgewiesen werden (Dietrich et al., 2000).

Als eines der immundominaten Proteine konnte außerdem das Hitzeschockprotein Hsp60 ausgemacht werden (Garduno et al., 1998). Durch die für ein Hitzeschockprotein ungewöhnliche Lokalisierung auf der Oberfläche wird eine Funktion als Lipochaperon postuliert, wodurch die Membran stabilisiert werden könnte. Außerdem konnten Unterschiede in der Hsp60-Expression zwischen virulenten und avirulenten Legionellen detektiert werden und damit eine Beteiligung an der Adhärenz und Invasion in HeLa-Epithelzellen nachgewiesen werden (Hoffmann und Garduno, 1999).

Ein weiteres Oberflächenprotein ist das 24 kDa große Mip (macrophage infectivity potentiator), das außerdem während der Infektion in die phagosomale Membran inseriert (Helbig et al., 2001). Dieses Enzym kommt als Dimer vor und besitzt Peptidyl-Prolyl-Isomerase-Aktivität. Die Dimerisierung ist vor allem für die erfolgreiche Infektion monozellulärer Wirtszellsysteme von Bedeutung. Im Meerschweinchen ist jedoch sowohl die Dimerisierung als auch die Enzymaktivität der Isomerase für die vollständige Ausbildung der Virulenz notwendig (Köhler, 2000).

Spezifisch für *L. pneumophila* ist das 16 kDa Oberflächenprotein (*pneumophila*-specific <u>o</u>uter <u>membrane protein</u>) POM, das als Adhäsin wirken könnte und an der initialen Aufnahme von *L. pneumophila* beteiligt ist (Steudel, 2001).

2.6.3 Eisenaufnahmesysteme und weitere Virulenz-assoziierte Faktoren

Die intrazelluläre Replikation der Legionellen ist abhängig von der Eisenverfügbarkeit. In einem Eisen reduzierten Milieu, wie es in Monozyten ohne Transferrinrezeptor vorkommt, können sich diese Bakterien daher nicht vermehren (Byrd und Horwitz, 2000). Die Eisenaufnahmesysteme werden über Fur (Ferric uptake regulation) reguliert. Ist genügend Eisen in der Zelle, so sind die entsprechenden Gene reprimiert. FrgA stellt ein solches Eisenreguliertes Protein dar. Es besitzt Homologie zur Aerobactin-Synthese von *E. coli* (Hickey und Cianciotto, 1997). Desweiteren konnte die Beteiligung eines atypischen Siderophores, dem Legiobactin, einer Methyltransferase (*iraA*), eines putativen Eisenpeptidtransporter (*iraB*) sowie ein inneren Membranprotein für die Cytochrom C Biogenese (*ccmC*) nachgewiesen werden (Liles et al., 2000, Pope et al., 1996, Viswanathan et al., 2000, 2001).

Über die Analyse ausschließlich intrazellulär exprimierter Gene erhofft man sich weiteren Aufschluss über die an einer Infektion beteiligten Virulenzfaktoren. Auf diese Weise wurde

ein weiterer *L. pneumophila* spezifischer Faktor detektiert, der an das *mip*-Gen angrenzt. Bei einer Deletion dieser ligA-Determinante lässt sich verminderte Zytotoxizität, Motilität und Flagellierung beobachten. Es könnte sich also um einen weiteren Regulator handeln, der den Übergang von der Replikations- in die Transmissionsform kontrolliert (Fettes et al., 2000).

Enzyme, die eine erhöhte Stresstoleranz verleihen, sind ebenfalls für das intrazelluläre Überleben notwendig. Daher werden z. B. das "global stress protein" GspA oder Superoxiddismutasen während des Vorliegens im Wirt benötigt (Abu Kwaik und Engelberg 1994, Amemura-Maekawa et al., 1996).

Weitere Virulenzgene konnten durch Transposonmutagenese identifiziert werden, deren genaue Funktion bislang jedoch nicht genauer charakterisiert ist. Dabei handelt es sich um *pmi* Loci, die sowohl für die Infektion von Makrophagen als auch für Amöben von Bedeutung sind (protozoa and macrophage infectivity) (Gao et al., 1997). Mutationen in den *mil* (macropahge infectivity loci) Loci weisen ausschließlich Defekte in Säugerwirtszellen auf und zeigen in Protozoen eine wildtypische Vermehrung (Gao et al., 1998).

2.7 Wirtszellmodelle für die Analyse von Legionella-Infektion

Die unterschiedlichen Virulenzdeterminanten der Legionellen können unter anderem in verschiedenen axenisch kultivierbaren Protozoen untersucht werden. Dies kommt dem natürlichen Wirt-Parasit-Verhältnis am nächsten. Da jedoch axenisch kultivierbare Amöben immer auch Mutationen aufweisen und meist eine erhöhte Pinozytoserate zeigen, kann man Artefakte trotz allem nicht ganz sicher ausschließen. Aufgrund der leichten Kultivierbarkeit kommen in der *Legionella*-Forschung hauptsächlich *A. castellanii, A. polyphaga* sowie *H. vermiformis* zum Einsatz. In Amöben scheint das intrazelluläre Wachstum restriktiver zu sein als in humanen Zelllinien. So konnte für einige *Legionella*-Mutanten (z. B. *rpo*S, *lsp*GH) zwar ein normales Wachstum in humanen Makrophagen-Zelllinien beobachtet werden, die Replikation in Amöben war jedoch deutlich beeinträchtigt (Hales und Shuman 1999a, b). Es gibt jedoch auch den umgekehrten Fall, in dem sich *Legionella*-Mutanten nicht in Monozyten, aber trotz allem in Amöben vermehren können (z. B. *mil*) (Gao et al., 1998).

Für die Untersuchung der Interaktion von Legionellen mit Säugerzellen stehen 14 verschiedene Makrophagen- und Epithelzelllinien zur Verfügung (Fields, 1996). Legionellen sind dabei in der Lage sowohl Lungenmakrophagen als auch Typ I und II Epithelzellen des respiratorischen Traktes als Wirt zu nutzen. Allerdings werden während einer *Legionella* Infektion hauptsächlich Alveolarmakrophagen besiedelt (Lück und Helbig 1997). Bei Interaktion eines Virulenzfaktors mit der extrazellulären Matrix oder der Modulation der

Zytokinproduktion stoßen die zellulären Wirtsmodelle allerdings an Grenzen. So konnte für das Mip-Protein eine eindeutige Funktion der PPIase-Aktivität zwar im Tiermodell nachgewiesen werden, nicht aber in monozellulären Systemen (Köhler, 2000).

Im Meerschweinchenmodell führt eine Infektion mit Legionellen zu Gewichtsverlust, starkem Fieber und Lungenschäden. Bei Infektion über ein Bakterien-haltiges Aerosol reichen 10² Bakterien aus, um den Tod des Tieres herbeizuführen. Über den intraperitonealen Weg werden 10⁶ Bakterien benötigt (Berendt et al., 1980, Barkerville et al., 1983). Die Infektion entspricht dem akuten Verlauf einer Infektion des Menschen. Dieses Modell ist deshalb am besten geeignet um z. B. die Wirksamkeit neuer Medikamente zu testen (Edelstein et al., 2001a, b). Da für Meerschweinchen allerdings keine kommerziellen Tests zur Quantifizierung von Zytokinen vorhanden sind, wurden die Arbeiten zur Immunmodulation durch L. pneumophila mit infizierten Mäusen durchgeführt. Dieses Modell ist umstritten, da nur ein einziger Inzuchtstamm überhaupt für eine Legionella Infektion empfänglich ist, alle anderen sind von Natur aus resistent. Im betreffenden A/J-Stamm befindet sich eine rezessive Mutation in der lgn1 Region, in der die murinen Homolgen zu dem neuronalen Apopotoseinhibitor NAIP kodiert sind. Der Level an NAIP mRNA ist in A/J Stämmen sehr gering. Es wurde daher spekuliert, dass L. pneumophila Apoptose induzieren muss, um überhaupt eine Infektion von Makrophagen zu ermöglichen (Swanson und Hammer 2000, Diez et al., 2000). In den A/J-Mäusen vermehren sich die Bakterien zwei Tage lang in der Lunge und können auch in Milz und Blut nachgewiesen werden. Danach findet meist ein Abbau der Legionellen statt und die Bakterienzahl sinkt nach und nach gegen null (Tateda et al., 2001). Mit Hilfe des Mausmodells konnte die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine wie IFN-γ, TNF-α, IL1β und IL6 nachgewiesen werden (Susa et al., 1998). Eine Hemmung der TNF-α-Produktion durch spezifische anti-TNF-α-Antikörper (Skerett et al., 1997), den Phosphodiesteraseinhibitor Pentoxifyllin oder über IL10 (Park et al., 1996) führt zu einer verminderten Immunabwehr und verhindert die Elimination aus der Lunge des Wirtes.

Die hier vorgestellten Modelle sind entweder nur mit relativ großem Aufwand oder überhaupt nicht genetisch manipulierbar. Daher bleibt die Untersuchung der an der Infektion beteiligten Wirtsfaktoren weitgehend auf die Zytokinantwort beschränkt. In dieser Arbeit sollte deshalb ein weiteres Modell etabliert werden, das es ermöglicht, die *Legionella*-Wirt-Interaktion von der Seite des Wirtes aus näher zu charakterisieren. In jüngerer Zeit wurden etwa bei der Infektion des manipulierbareren Wirtes *Drosophila melanogaster* mit gram-negativen Bakterien die Beteiligung von Toll-ähnlichen Rezeptoren an der angeborenen Immunität nachgewiesen (Michel et al., 2001). Außerdem wird der Nematode *Caenorhabditis elegans*

für das Screenen großer Mengen humanpathogener Bakterien nach avirulenten Mutanten verwendet (Aballay et al., 2002). Für *Legionella* Infektionen scheint die Verwendung einer manipulierbaren Amöbe am besten geeignet zu sein. Daher soll im weiteren die Myxamöbe *Dictyostelium discoideum* kurz beschrieben werden.

2.8 Allgemeine Charakteristika von Dictyostelium discoideum

Seit ungefähr 60 Jahren ist *Dictyostelium discoideum* Gegenstand der biologischen Forschung (Bonner., 1944). Bei *Dictyostelium* handelt es sich um eine Bodenamöbe, die unter Nahrungsmangel einen Differenzierungsprozess einleiten kann. Während dieses Prozesses aggregieren zunächst bis zu 10⁵ einzellige Trophozoiten, wobei cAMP als chemotaktisches Signal wirkt. Im weiteren Verlauf entsteht das wurmförmige "Slug-Stadium", das sich entlang von Temperaturgradienten und anhand der Phototaxis bewegen kann. Während der Bewegung des "Slugs" wird ständig eine extrazelluläre Matrix gebildet, die auf der Oberfläche zurückbleibt. Daher stammt die umgangssprachliche Bezeichnung zellulärer Schleimpilz. Unter geeigneten Bedingungen findet eine weitere Differenzierung statt. Im Endstadium besteht der fertige Fruchtkörper aus einem Stiel mit abgestorbenen Zellen und dem Sporenkopf. Die Sporen sind resistent gegen Hitze und Austrocknung und keimen unter besseren Bedingungen zu neuen Trophozoiten aus, wodurch der Lebenszyklus von vorne beginnt (Mutzel, 1995).

Innerhalb dieses Lebenszyklusses bestehen viele Parallelen zu humanen Zellen. So finden sich dieselben Chemotaxismechanismen bei Lymphozyten, Motilität und Phagozytose entsprechen humanen Makrophagen und die Differenzierungsprozesse und Musterbildung gleichen in vielen Dingen denen von Säugerzellen während der Entwicklung. (Kay und Williams 1999). Häufig standen daher solche Mechanismen im Mittelpunkt der Forschung wie sie in vergleichbarer Weise in höheren Eukaryonten zu finden sind. Aufgrund der relativ anspruchslosen und billigen Kultivierbarkeit von *Dictyostelium* wurden diese Mechanismen dann in diesem Organismus untersucht.

Diese Ähnlichkeit zu höheren Eukaryonten unterscheidet *Dictyostelium* deutlich von anderen Einzellern. Allein in der Hefe stehen molekularbiologisch genauso viele Methoden zur Verfügung wie für *Dictyostelium*, aber da sie weder motil noch phagozytotisch aktiv ist, kann sie nicht als Modell für Makrophagen herangezogen werden. Erleichtert wird die genetische Manipulierbarkeit von *Dictyostelium* durch das haploide Genom. Die 34 MB sind auf 6 Chromosomen verteilt und die Sequenz wird noch in diesem Jahr vollständig zur Verfügung stehen. Viele Signaltransduktionswege sind in der Zwischenzeit gut verstanden. Außerdem

erlauben verschiedene molekularbiologische Methoden sowohl die Herstellung von Deletions-, Insertions-, als auch Überexpressionsmutanten. (Manstein et al., 1995, Sutoh, 1993, Nellen et al., 1985). Ferner stehen cDNA-Banken zur Komplementation zufälliger Mutanten bereit. Antisense RNA-Techniken sind ebfalls verbreitet (Rupper und Cardelli, 2001).

Dictyostelium ist daher der am besten untersuchte Einzeller und somit als Wirtszellamöbe für die Untersuchung der *Legionella*-Amöben-Interaktion besonders geeignet.

2.9 Biochemie der Phagozytose

Dictyostelium besitzt gegenüber humanen Makrophagen eine zwei- bis dreifach erhöhte Phagozytoserate. Zur Untersuchung phagozytotischer Prozesse ist diese Amöbe deshalb gut geeignet, da sich die molekularen Mechanismen sich zwischen Mensch und Amöbe nur in wenigen Details unterscheiden.

Die Phagozytose von Partikeln kann grob in vier Phasen eingeteilt werden. Nach der Bindung eines Partikels an den entsprechenden Rezeptor im ersten Schritt wird dieser im zweiten Schritt aktiviert und aufgrund der folgenden Signaltransduktion das Zytoskelett umorganisiert. Die dritte Phase besteht aus der Pseudopodienbildung und der Internalisierung des neu gebildeten Vesikels. Im letzten Schritt verschwindet die Aktinhülle vom Phagosom (Rupper und Cardelli, 2001).

In *Dictyostelium* kennt man bisher einen noch nicht näher charakterisierten Glukosebindenden Rezeptor. Außerdem wurde ein nicht-spezifischer Rezeptor postuliert, bei dem es sich um die "contact site B" (csB) handeln könnte, sowie ein 130 kDa Glykoprotein. Der letztendliche Beweis für eine tatsächliche Rezeptorfunktion letztgenannter Proteine steht aber noch aus (Vogel et al., 1980, Chadwick et al., 1984, Chia et al., 1989). Nach erfolgreicher Bindung an den Rezeptor wird ein "phagocytic cup" gebildet. Neben der Akkumulation von F-Aktin unterhalb der Plasmamembran wirken hier zahlreiche Aktin-bindende Proteine, mit oftmals redundanter Funktion, zusammen. So konnte z. B. für das Aktin-quervernetzende Protein ABP-120 eine Beteiligung an der Regulation der Phagozytose nachgewiesen werden (Cox et al., 1996). Membranankerproteine mit zusätzlicher Aktinbindestelle übertragen die extrazellulär generierten Signale auf die Plasmamembran. So zeigen beispielweise Talinnegative Zellen sowohl eine verminderte Phagozytoserate als auch geringere Zell-Substrat-Adhäsion (Niewohner et al., 1997). Intrazellulär wird die Phagozytose vor allen Dingen von Multifunktionsenzymen reguliert. So bindet Scar gleichzeitig an globuläre-Aktin-Speicherproteine, filamentöses F-Aktin, kleine G-Proteine, Phosphoinositide und den arp2/3

Komplex (Mullins et al., 2000). Auf diese Weise wird eine Plattform bereitgestellt, um die extrazellulären Signale zu integrieren. Eine Scar-Nullmutante wirkt sich dementsprechend in einer Reduktion der Phagozytoserate um 70% aus (Rupper und Cardelli, 2001).

Kleine G-Proteine besitzen jedoch nicht nur eine Funktion für die Regulierung von Scar. Rab und ARF-GTPasen sind z. B. auf endosomalen Vesikeln lokalisiert. Obwohl die Vesikelreifung zeitlich gesehen nach der Phagozytose erfolgt, scheinen diese, den Vesikeltransport regulierenden Proteine in manchen Zellen auch für die Bildung des "phagocytic cup" unerlässlich zu sein. Die Rekrutierung dieser Vesikel an den Ort der Phagozytose erklärt auch die Schnelligkeit des Reifungsprozesses (Armstrong, 2000, Hackman et al., 1998, Cox et al., 2000). Um das eingestülpte Vesikel vollkommen von der Plasmamembran zu trennen, muss eine relativ große Kraft aufgewendet werden. Hier kommen molekulare Motoren zum Einsatz. In *Dictyostelium* gibt es allein 14 Klassen unkonventioneller Myosine, die daran teilhaben könnten. Bei einer Myosin K-Mutante konnte auch eine Reduktion der Phagozytoserate um 30% festgestellt werden. Andere Myosine sind in geringerem Ausmaß an den Regulationsprozessen beteiligt (Schwarz et al., 2000, Jung et al., 1996).

2.10 Biochemie des endozytischen Pathways

Die auf die Phagozytose folgende Phagosomenreifung zeichnet sich durch mehrere Membranfusions-Vorgänge ab, die nur in einer bestimmten Richtung ablaufen können. Nach dem Verlust der Aktinhülle erfolgt eine rasche Ansäuerung des Phagosoms innerhalb von Sekunden (Maniak, 1999). Dann folgen vollständige Fusionsereignisse mit frühen und späten Endosomen. In einem letzten Schritt wird durch wiederkehrende, unvollständige Fusionsereignisse ("kiss-and-run-Hypothese") das Phagolysosom gebildet (Desjardins et al., 1995, Duclos und Dejardins 2000). Jedes dieser Stadien ist durch besondere Proteine gekennzeichnet, die Auskunft über den Reifungszustand des Phagosoms geben können. So findet man z. B. die GTPase Rab5 und das EEA1 (early endosomal antigen) nur auf frühen Phagosomen (Desjardins et al., 1994a, b). Diese Proteine werden rasch recycelt und die darauf folgenden späten Endosomen sind gekennzeichnet durch die Anwesenheit von Rab7, Mannose-6-Phosphat-Rezeptor und LAMP1 und 2 (lysosome associated membrane proteins). In beiden Stadien werden die Fusionsvorgänge jeweils von den Rab-Proteinen reguliert. Phagolysosomen schließlich weisen keine Rab-Proteine mehr auf, ihre Membran ist aber reich an integrierten LAMPs. Auch die Reifung zum Phagolysosom verläuft in Dictyostelium in zwei Phasen. Ungefähr drei Minuten nach der Internalisierung des Phagosoms erfolgt die Fusion mit Protease-reichen Lysosomen. Diesen Proteinen gemeinsam ist ein N-

Acetylglucosaminrest an einem Serin. Nach dem Recycling der Proteasen häufen sich nach 15 Minuten saure Hydrolasen wie α-Mannosidase und β-Glukosidase an, die ein Mannose-6-Phosphat als Erkennungssequenz aufweisen. Die zeitliche Überlappung der Proteasen und Hydrolasen ist dabei sehr gering (Souza et al., 1997). Andere lysosomale Proteine wie LimpA oder die vATPase sind dagegen über längere Zeit auf der phagosomalen Membran angereichert (Rezabek et al., 1997, Rupper et al., 1998). Nach ungefähr einer Stunde ist der Verdauungsvorgang abgeschlossen. Das post-lysosomale Kompartiment erreicht wieder einen nahezu neutralen pH-Wert und nicht verdauliche Partikel werden in der Folge exozytiert (Maniak 1999).

2.11 Modifizierung des endozytischen Pathways durch pathogene Bakterien

Bis vor kurzem wurden intrazelluläre, pathogene Bakterien in drei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe bestand aus Bakterien wie Shigella oder Listeria, die das Phagosom zu einem frühen Zeitpunkt verlassen (High et al., 1992, Smith et al., 1995). Sie liegen dann frei im Zytoplasma vor, wo die intrazelluläre Replikation stattfindet. Die zweite Gruppe umfasste Mikroorganismen, die in einem reifen Phagolysosom vorliegen und einen sauren pH-Wert für die Replikation benötigen wie z. B. Coxiella burnetii (Baca et al., 1994). Die dritte Gruppe schließlich enthielt Bakterien, die die Phagolysosomfusion inhibieren. In der Zwischenzeit stellt sich dies allerdings sehr viel differenzierter dar. Da die Reifung eines Phagolysosoms ein mehrstufiger Prozess ist, gibt es Bakterien, die zu ganz unterschiedlichen Zeitpunkten in diese Reifung eingreifen. So liegt daher jede Bakterienart in einem für sie spezifischen Kompartiment vor. Sogar L. monocytogenes modifiziert das frühe Phagosom, obwohl das Bakterium anschließend im Zytoplasma vorliegt. Die Rekrutierung von Rab5 in die phagosomale Membran verzögert den Reifungsprozess, so dass genügend Zeit vorhanden ist, um aus dem Phagosom auszubrechen (Pizzaro-Cerdá et al., 2002). Mycobacterium tuberculosis hält die Reifung des Phagosoms in einem frühen Stadium an. Die Replikationsvakuole enthält die typischen Marker der frühen Endosomen wie EEA1, Rab5 und den Transferrin-Rezeptor. Das Phagosom wird außerdem kaum angesäuert, da der Einbau der vATPase unterbunden wird (Russel, 2001). Salmonella liegt dagegen in einem ungewöhnlichen späten Phagosom vor. Charakteristisch hierfür ist ein saurer pH-Wert, sowie die Marker LAMP1 und Rab7. Allerdings fehlen weitere Marker für späte Endosomen wie der Mannose-6-Phosphatrezeptor (Steele-Mortimer et al., 1999). Andere Parasiten koppeln ihre Replikationsvakuole vollständig vom endozytischen Weg ab. Dies ist der Fall für Toxoplasma gondii. Schon während der Phagozytose werden hier alle Proteine des Wirtes aus

der Vesikelmembran verdrängt, so dass eine Fusion mit Endosomen nicht mehr stattfinden kann (Mordue und Sibley, 1999). Bei *Legionella* schließlich findet man eine Vakuole, die zunächst mit glatten Vesikeln und Mitochondrien assoziiert ist, dann aber zu einem späteren Zeitpunkt mit LAMP1 und weiteren lysosomalen Markern in einem sauren Kompartiment vorliegt (Sturgill-Koszycki und Swanson, 2000).

Die nähere Untersuchung dieser Interaktion zwischen intrazellulären Bakterien und ihren Wirten werden in der Zukunft zu einem besseren Verstehen pathogenetischer Vorgänge beitragen.

2.12 Zielsetzung dieser Arbeit

Protozoen stellen in der Umwelt das Hauptreservoir für Legionellen dar. Trotz allem ist für die Wirt-Bakterien Interaktion auf Seiten der Amöben wesentlich weniger bekannt als auf Seiten der humanen Wirtszellen. Deshalb sollte zunächst untersucht werden, ob bei zehn phylogenetisch verschiedenen *Legionella*-Stämmen eine Wirtsspezifität für bestimmte Amöben Spezies zu finden ist.

Im Zuge dieser Versuche sollte weiterhin *Dictyostelium discoideum* als neues Wirtszellmodell etabliert werden. Dazu sollte zunächst der Nachweis für eine intrazelluläre Vermehrung der Legionellen erbracht werden. Zusätzliches Augenmerk wurde außerdem auf das Vorhandensein typischer *Legionella* Pathogenitätsmechanismen gerichtet, wie z. B. die Verhinderung der Ansäuerung in der *Legionella*-Vakuole sowie die Inhibition der Phagolysosomfusion.

Da es sich bei *Dictyostelium* um eine haploide, genetisch manipulierbare Amöbe handelt, wurde dieses Modellsystem verwendet, um die bei einer *Legionella*-Infektion benötigten Wirtsfaktoren zu untersuchen. Dabei sollten zunächst spezifische *Dictyostelium*-Mutanten auf eine Veränderung hinsichtlich der intrazellulären Vermehrungsrate von Legionellen überprüft werden.

Weiterhin sollte eine Methode entwickelt werden, mit der Bakterien-haltige Phagosomen aus einer Zellsuspension aufgereinigt werden können. Die Überprüfung des Phagosomenproteoms kann über solche Wirtsproteine, die zur Replikationsvakuole rekrutiert werden, näheren Aufschluss geben. Da man bislang nur einen einzigen, ins *Legionella*-Phagosom integrierten Wirtsfaktor kennt, erhofft man sich durch die Erforschung weiterer Faktoren ein besseres Verständnis des intrazellulären Lebenszyklusses der Gattung *Legionella*.