## 4.1.1 Untersuchung zur Spezifität der Legionella-Wirtszell-Interaktion

Bislang wurde noch nie ein größeres *Legionella*-Spektrum systematisch in unterschiedlichen Wirtszellen getestet. Daher wurden in dieser Arbeit zehn phylogenetisch verschiedene Stämme der Gattung *Legionella* ausgewählt und deren intrazelluläre Replikationsrate bestimmt. Darunter waren pathogene Vertreter wie *L. pneumophila*, einer der Hauptverursacher der Legionellose, *L. bozemanii*, bei dem es sich um ein Isolat aus einer Menschenlunge handelt, sowie der Stamm *L. micdadei*, der aus dem Blut eines Patienten gewonnen wurde. *L. longbeachae* tritt zwar in Europa nicht so häufig im Zusammenhang mit der Legionärskrankheit zu Tage, spielt aber in Australien eine große Rolle. Weiterhin wurden apathogene Stämme untersucht wie *L. erythra* oder *L. lytica* und *LLAP* 10 (*Legionella* Like Amoebal Pathogen). Letztere wachsen bei maximal 35°C und scheiden schon daher als Humanpathogene aus. *L. lytica* ist außerdem der einzige Vertreter der ausgewählten Stämme, der nicht in aquatischen Habitaten lebt sondern im Boden vorkommt.

Als Wirtszellen wurden neben der humanen Makrophagen-Zelllinie U937 ein Ciliat (*Tetrahymena pyriformis*) sowie vier Vertreter vom Stamm der Rhizopoda (Amöben) verwendet (*Acanthamoeba castellanii, Hartmannella vermiformis, Naegleria gruberi* und *Dictyostelium discoideum*). Bis auf *D. discoideum* war für alle Einzeller bekannt, dass sie als Wirte für Legionellen vorkommen können, jedoch waren sie oft nicht für eine größere Anzahl *Legionella* Spezies untersucht worden. In Kokultivierungsversuchen wurde daher die intrazelluläre Replikation von Legionellen mittels Bestimmung von CFU-Werten determiniert.

*L. hackeliae* ist ein Vertreter, der in keiner der verwendeten Wirtszellen in der Lage war sich zu vermehren (Tabellen 4.1 bis 4.3, Abb. 4.2). Nach 96 h Infektion konnten von anfangs ca. 10<sup>3</sup> CFU/ml bei *N. gruberi* keine Bakterien mehr nachgewiesen werden. Bei *D. discoideum* und *T. pyriformis* verbleiben am Ende der Infektion nur noch ca. 3 CFU/ml. Etwas langsamer erfolgte der Abbau in *A. castellanii* (44 CFU/ml), *H. vermiformis* (406 CFU/ml) sowie in U937-Zellen (392 CFU/ml), trotz allem nahm die Legionellenanzahl konstant ab.

Ganz ähnlich stellt sich der Infektionsverlauf bei *L. oakridgensis* dar. Hierbei handelt es sich um einen der wenigen unflagellierten Vertreter der Legionellen. Während einer 96 h Infektion in *Dictyostelium, Tetrahymena* und *Naegleria* nahm die Anzahl der detektierten Bakterien mit der Zeit drastisch ab. In *Acanthamoeba* und *Hartmannella* wurde dagegen nach 48 h ein

Tiefpunkt erreicht und die CFU nahmen dann wieder leicht zu, erreichten aber nie das Inokulum. Die Interpretation der Infektion der U937 Zellen gestaltet sich schwierig. In sechs verschiedenen Versuchen wurde *L. oakridgensis* dreimal abgebaut, zweimal blieb die Bakterienanzahl auf etwa der Höhe des Inokulums und zweimal wurde gutes Wachstum beobachtet. Da dieser Stamm schon aus Menschen isoliert wurde, müsste man ein Wachstum annehmen, allerdings konnte dies nur zweimal beobachtet werden.

Einige Vertreter vermehren sich nur in einer einzigen Amöbenspezies, werden aber andererseits in U937 nicht degradiert. *L. erythra* zeigt ein starkes Wachstum in *A. castellanii* über annähernd zwei log-Stufen, wird in allen anderen Protozoen aber rasch verdaut. In U937 nimmt die Zellzahl über 96 h um einen Faktor von ca. drei zu. Dies ist zwar kein starkes Wachstum, die Bakterien bewerkstelligen es aber sich über diesen Zeitraum zu etablieren ohne verdaut zu werden (siehe Abb. 4.1).

Die Anzahl der CFU's von *L. bozemanii* steigt sowohl bei der Infektion von *A. castellanii* als auch von U937 Zellen über 1,5 Zehnerpotenzen. In keinem der anderen Protozoen ist dagegen ein ausgeprägtes Wachstum zu erkennen. In *N. gruberi*, *D. discoideum* und *T. pyriformis* nimmt die Bakterienanzahl konstant ab. In *H. vermiformis* ist nach 24 h ein Tief erreicht, dessen Niveau bis zu 96 h post Infektion gehalten wird.



Abb. 4.1 Exemplarische Infektion von *Legionella erythra* in sechs verschiedenen Wirtszellsystemen über eine Infektionsdauer von 96 h. In Acanthamoeben findet nach anfänglicher Reduktion der CFU/ml eine Zunahme um 1,5 log-Stufen statt, bei U937 ist eine Steigerung um Faktor 3 zu beobachten. In allen anderen Protozoen werden die Legionellen abgebaut.

Andere Legionellenarten verhalten sich weniger spezifisch in Hinsicht auf die Wahl ihrer Wirte. *L. anisa* vermehrt sich sowohl in *A. castellanii* als auch in *H. vermiformis* um ca. 1,5 Zehnerpotenzen. Allerdings führt eine gute Vermehrungsrate in Acanthamoeben nicht unbedingt auch zu einem Wachstum in U937 Zellen. Dies konnte zwar bei *L. erythra* und *L. bozemanii* beobachtet werden, *L. anisa* wird in den Makrophagen aber ebenso verdaut wie in den weiteren Protozoen (siehe Tabelle 4.1 und 4.3). In Dictyostelien konnten nach 96 h Infektion keine *L. anisa*-Kolonien mehr nachgewiesen werden, in *N. gruberi* waren es nur noch wenige, während der Verdau in *T. pyriformis* etwas verlangsamt erfolgte.

Für *L. micdadei* war bekannt, dass sich diese *Legionella* Spezies in *A. castellanii, H. vermiformis* und U937 sehr stark repliziert. In diesen Versuchen konnte in den genannten Amöben allerdings nur eine Vermehrung über knapp eine Zehnerpotenz beobachtet werden. Auch die Verwendung mehrerer Stämme unterschiedlicher Herkunft ergab kein anderes Ergebnis. Der Infektionsverlauf in *N. gruberi* deckt sich mit den oben genannten Amöben. In dem Ciliaten *Tetrahymena* ist *L. micdadei* einer der Stämme, die sich am besten etablieren, allerdings ohne sich zu replizieren. In der Makrophagen-Zelllinie konnten die Ergebnisse nicht reproduziert werden. Die erwartete Zunahme der CFU's konnte nur in zwei von sechs Versuchen beobachtet werden, zweimal fand nur eine geringe Abnahme der ursprünglichen Bakterienzahl statt und weitere zweimal wurden die *L. micdadei* stark reduziert.

*L. longbeachae* vermehrt sich in *N. gruberi* außergewöhnlich gut. Der für die Infektion anderer Wirtszellen typische Abfall der Koloniezahlen 24 h nach Beginn der Infektion konnte hier nicht festgestellt werden. Die Bakterien vermehren sich um ca. 2 Zehnerpotenzen. Bei *A. castellanii* kann eine Zunahme um 1,5 Zehnerpotenzen beobachtet werden. In *H. vermiformis* zeigte sich eine konstante Abnahme der Bakterien, während in *T. pyriformis* und *D. discoideum* nach 72 h eine erneute und stetige Zunahme der Legionellen gezeigt werden konnte. Von einem guten Wachstum kann bei *T. pyriformis* allerdings erst 168 h Stunden nach Infektionsbeginn geredet werden. Neben LLAP 10 ist *L. longbeachae* der einzige getestete Keim, der sich während einer Kokultivierung in diesen Ciliaten durchsetzt.

*L. pneumophila* ist einer der virulentesten Vertreter der Gattung *Legionella*. Dementsprechend kann bis auf *T. pyriformis* in jeder Wirtszelle eine Vermehrung beobachtet werden. In *A. castellanii*, *H. vermiformis* und *N. gruberi* nimmt die Koloniezahl/ml schon nach 24 h post Infektion zu. Die Steigerung beträgt nach 48 h schon zwischen einer und zwei Zehnerpotenzen. Bei *D. discoideum* kann man dagegen nach 24 h zuerst eine Abnahme beobachten, nach 48 h ist das Ausgangsinokulum wieder erreicht und die CFU/ml nehmen dann bis 96 h um 1,5 log-Stufen zu. Der Infektionsverlauf in U937 ist dem in Dictyostelien

ähnlich, allerdings findet nach 72 h keine weitere Vermehrung der Legionellen mehr statt und es wird eine Gesamtzunahme von nur 0,5 Zehnerpotenzen erreicht. In früheren Versuchen am Institut wurde in U937-Zellen jedoch regelmäßig eine Zunahme der CFU-Werte um 1,5 - 2 log-Stufen beobachtet. In dieser Arbeit wurde aber in sechs unabhängigen Versuchen nie ein Wachstum von wenigstens einer log-Stufe erreicht. Dass es sich aber durchaus um virulente Legionellen handelte, konnte in Versuchen mit Naeglerien gezeigt werden. Bakterien aus demselben Vorrat zeigten dort eine Vermehrung von vier Zehnerpotenzen (siehe Abb. 4.2).

L. lytica wird zwar in T. pyriformis rasch abgebaut, gehört aber ansonsten neben L. pneumophila und LLAP 10 zu den Keimen, die in der Lage sind, sich in allen Amöben zu replizieren. In A. castellanii beginnt die Vermehrung schon nach 24 h und endet bei einer Steigerung der CFU/ml von 3 Zehnerpotenzen nach 72 h. Nach dieser Infektionsdauer ist eine Wirtszelllimitierung erreicht. Die Acanthamoeben sind entweder enzystiert oder wurden von den Legionellen lysiert. Die Legionellen könnten zu diesem Zeitpunkt möglicherweise in ein nicht kultivierbares VBNC-Stadium übergehen. Daher nimmt die beobachtete Koloniezahl von 72 h auf 96 h wieder ab. Bei N. gruberi und H. vermiformis sackt die Bakterienanzahl nach 24 h zunächst ab, nimmt aber dann denselben Verlauf wie in Acanthamoeben. Die Infektion in D. discoideum unterscheidet sich von den vorherigen dahingehend, dass auch nach 72 h noch eine Zunahme der CFU/ml festgestellt werden kann. Die Wirtszellen können in kein Zystenstadium übergehen und befinden sich in einem Medium, das noch eine geringe Vermehrung der Dictyostelien erlaubt. Daher kann eine Vermehrungsrate von über 3 Zehnerpotenzen festgestellt werden. Weiterhin konnte festgehalten werden, dass sich die Infektionstemperatur in diesem Fall nicht so stark auswirkt wie erwartet. D. discoideum erleidet bei über 26°C einen Hitzeschock, weshalb die Infektionen nicht bei 30°C durchgeführt werden konnten, sondern bei 23°C kokultiviert wurden. Die L. lytica-Infektion nimmt in D. discoideum zwar zunächst einen etwas langsameren Verlauf als z. B. in Acanthamoeben. Nach 72 h gleicht sich die Bakterienzahl jedoch in beiden Amöben an. In D. discoideum konnten die CFU-Werte von 72 h auf 96 h sogar nochmals gesteigert werden (Abb. 4.2), während in anderen Amöben nach 72 h ein Maximum erreicht ist. In U937-Makrophagen konnte keine Vermehrung beobachtet werden, da für L. lytica die maximale Kultivierungstemperatur bei 35°C liegt, humane Zellen aber bei 37°C inkubiert werden müssen. Die Legionellen halten sich über 72 h auf dem Niveau des Ausgangsinokulums. Danach nehmen die Koloniezahlen ab.

LLAP 10 vermehrt sich bei maximal 30°C. Daher konnte wie für *L. lytica* kein Wachstum in U937-Zellen beobachtet werden. Allerdings reagiert dieser Stamm noch sensitiver auf

Temperaturen von 37°C. Schon nach 24 h kann keine einzige Kolonie mehr nachgewiesen werden. Ansonsten ist LLAP 10 der einzige Stamm, der sich in allen getesteten Protozoen replizieren kann (Tabellen 4.1 bis 4.3). Die geringste Zunahme zeigt er in T. pyriformis. Dort ist ein Wachstum ähnlich wie bei L. longbeachae erst nach 168 h zu beobachten. Zu Beginn der Infektion sinken die Bakterienzahlen leicht ab, bleiben dann bis 96 h post Infektion ungefähr konstant und beginnen dann langsam wieder zu steigen. In allen anderen Amöben ist LLAP 10 derjenige Stamm, der am raschesten mit der Replikation beginnt. Allerdings werden am Ende der Infektion trotz einen längeren lag-Phase bei L. lytica oft höhere Koloniezahlen erreicht. Ein Absinken der CFU/ml nach 24 h, wie es bei anderen Legionellen oft beobachtet werden kann, war bei LLAP 10 nie festzustellen. Bei N. gruberi und A. castellanii sieht man z. B. schon nach einem Tag eine Erhöhung der Koloniezahlen um eine Zehnerpotenz. In Naeglerien nimmt dies während der Infektion auf über 3 Zehnerpotenzen zu, während bei A. castellanii nach 24 h die Wirtszelllimitierung erreicht ist und keine weitere Steigerung mehr beobachtet werden kann. In H. vermiformis und D. discoideum verlaufen die Infektionen etwas langsamer. In H. vermiformis findet die Anzahl der LLAP 10 Bakterien nach 72 h und einer Zunahme um zwei Zehnerpotenzen ein Maximum. Nach dieser Zeit sind die meisten Amöben enzystiert und der Infektionsverlauf damit beendet. In D. discoideum endet die Infektion nach 96 h mit einem Gesamtanstieg der Bakterienzahl um 3 log-Stufen.

Die auf den bisherigen Seiten dargestellten Ergebnisse finden sich zusammengefasst in den Tabellen 4.1 bis 4.3.

Aus Sicht der Wirtszellen stellen sich die Infektionen wie folgt dar. *Tetrahymena pyriformis* fällt durch die Zugehörigkeit zu den Ciliaten aus dem Rahmen der weiteren verwendeten Protozoen. Auch der Infektionsverlauf unterscheidet sich deutlich von dem der Amöben. Zum einen findet man kein gutes Wachstum von Legionellen, abgesehen von einem geringen Anstieg der Bakterienzahlen nach 7 Tagen bei Infektion mit *L. longbeachae* und LLAP 10. Zum anderen kann man jedoch auch keinen vollständigen Abbau der weiteren, sich nicht vermehrenden *Legionella*-Stämme finden, wie dies z. B. in Naegleria für *L. hackeliae* oder *L. anisa* typisch war (Abb. 4.2). Die CFU/ml sinken dagegen nur bis 72 h post Infektion und bleiben dann auf demselben Niveau.

In den humanen Wirtszellen konnten sich die auf niedrigere Wachstumstemperaturen beschränkten Arten LLAP 10 und *L. lytica* nicht replizieren. *L. anisa* und *L. hackeliae* wurden ebenso degradiert. Damit stellen diese Zellen nur für humanpathogene Arten wie z. B. *L. pneumophila, L. bozemanii* oder *L. micdadei* ein Wirtssystem dar. Im Allgemeinen traten bei U937-Versuchen Probleme mit der Replizierbarkeit der Ergebnisse auf. Die Daten von *L.* 

*longbeachae* und *L. oakridgensis* konnten nicht ausgewertet werden. Weiterhin wurde für *L. pneumophila* eine weit stärkere Vermehrung erwartet als tatsächlich gemessen wurde.

*Acanthamoeba castellanii* stellt für *Legionella* ein sehr gut geeignetes Wirtssystem dar. Außer *L. hackeliae* und *L. oakridgensis* waren alle anderen *Legionella*-Arten in der Lage, sich intrazellulär in *A. castellanii* zu replizieren. Nach 48 h in Amöbenpuffer sind allerdings die meisten Trophozoiten in ein Zystenstadium übergegangen. Daher wird ein Maximum der Bakterienzahl meist nach 72 h und nicht nach 96 h am Ende der Infektionszeit erzielt. Die Infektionen verlaufen meist sehr rasch, z. B. ist bei *L. lytica* nach 48 h eine Steigerung von 2 Zehnerpotenzen zu beobachten (Tabelle 4.1).

In *H. vermiformis* vermehren sich 5 Legionellenarten, eine weitere (*L. bozemanii*) wird bis zu 24 h post Infektion um einen halbe log-Stufe reduziert, hält dann aber das Niveau bis zum Ende der Infektion. Alle weiteren Arten werden degradiert. Die Enzystierung erfolgt bei *Hartmannella* nach ca. 3 Tagen, also 24 h später wie bei *A. castellanii*. Die maximale Steigerung der Koloniezahlen beträgt wieder 3 Zehnerpotenzen (*L. lytica*).

In *N. gruberi* werden 5 Stämme degradiert, *L. micdadei* hält sich auf der Höhe des Ausgangsinokulums und 4 Stämme (LLAP 10, *L. lytica, L. pneumophila , L. longbeachae*) vermehren sich (siehe Abb.4.2, Tabellen 4.1, 4.2, 4.3). Diese nehmen alle um mindestens 2 Zehnerpotenzen zu, *L. pneumophila* sogar um 4. Dies war das größte je beobachtete Wachstum in allen durchgeführten Versuchen. Dies rührt zum einen wahrscheinlich daher, dass es sich bei *Naegleria* um sehr große Amöben handelt und damit für die intrazelluläre Replikation der Bakterien eine größere Menge an Nährstoffen zur Verfügung steht als bei kleinen Amöben. Zum anderen haben die Legionellen mehr Platz und können sich häufiger teilen, bis die Zelle platzt. Außerdem sind nach 96 h post Infektion erst etwa die Hälfte der Wirtszellen enzystiert, während bei einer Infektion in den etwa gleich großen *A. castellanii* zu diesem Zeitpunkt nur noch einzelne Trophozoiten vorzufinden sind. Die Wirtszelllimitierung beginnt daher in einer *Naegleria*-Infektion später.

Bei *D. discoideum* handelt es sich wiederum um kleine Amöben. Der maximale Zuwachs von 3 Zehnerpotenzen wird von *L. lytica* und LLAP 10 erzielt. Bei *L. pneumophila* verläuft die Infektion wesentlich langsamer und endet bei einer Zunahme der Bakterienzahlen um 1,5 log-Stufen. *L. longbeachae* wird bis zu 72 h post Infektion reduziert, erreicht aber nach 96 h wieder ungefähr das Ausgangsinokulum. Alle anderen Stämme werden konstant degradiert. In *D. discoideum* vermehren sich also nur diejenigen Legionellen, die sich in mindestens zwei weiteren Amöben replizieren konnten. Für weniger virulente Stämme ist dieses System nicht geeignet (siehe Tabellen 4.1 bis 4.3 sowie Abb.4.2)



**Abb. 4.2:** Infektionskinetiken 10 verschiedener *Legionella*-Stämme in zwei verschiedenen Amöben. Abbildung 4.2 A) zeigt den Infektionsverlauf in *N. gruberi*. Man erkennt, dass sich über die Dauer von 96 h vier Stämme vermehren, einer unverändert bleibt und der Rest degradiert wird. In Teil B) ist eine Infektion in *D. discoideum* abgebildet. In dieser Amöbe sind weniger Arten in der Lage, sich intrazellulär zu replizieren, die Steigerung der CFU- Werte ist geringer und der Abbau der sich nicht vermehrenden Legionellen erfolgt schneller.

	Protozoenspezies					
Legionella-Stämme	A. castellanii	H. vermiformis	D. discoideum	T. pyriformis	N. gruberi	U 937
LLAP 10	‡	' <b>‡</b>	‡	+	+	ı
L. p. Corby	‡	‡	+		+	-/+
L. lytica	‡	‡	‡		+	·
L. anisa	+	+				·
L. longbeachae	+		0	+	++	ż
L. erythra	+					-/+
L. bozemanii	+	0				+
L. micdadei	-/+	-/+	·	0	i	0
L. hackeliae	·		·		·	ı
L. oakridgensis			·		·	i

Tabelle 4.1 Intrazelluläre Replikation und Wirtszellspezifität von Legionellen in verschiedenen Zellsystemen

Die Tabelle gibt Aufschluss über die Wirtszellspezifität der verschiedenen Legionella Spezies. Die Art der Interaktion wurde eingeteilt in intrazelluläres Wachstum (schwach bis sehr stark) bzw. intrazellulärer Abbau der Legionellen in den betreffenden Wirten.

+ + + 0 + 0
-------------

D. discoideum D. discoideum D. discoideum T. pyriformis T. pyriformis T. pyriformis T. pyriformis N. gruberi Rang 6 U 937 D. discoideum H. vermiformis D. discoideum T. pyriformis H. vermiformis (2 x log) A. castellanii (1,5 x log) T. pyriformis T. pyriformis T. pyriformis Rang 5 U 937 U 937 U 937 N. gruberi (2,5 x log) H. vermiformis D. discoideum D. discoideum D. discoideum N. gruberi N. gruberi N. gruberi Rang 4 U 937 A. castellanii (3 x log) H. vermiformis H. vermiformis T. pyriformis A. castellanii T. pyriformis A. castellanii N. gruberi N. gruberi Rang 3 H. vermiformis (3 x log) **D.** discoideum (3 x log) H. vermiformis<sup>1)</sup> H. vermiformis H. vermiformis H. vermiformis A. castellanii A. castellanii A. castellanü Rang 2 U 937 **Rangfolge der Wirtszellen D.** discoideum (3 x log) N. gruberi (3 x log) A. castellanü<sup>1)</sup> A. castellanü A. castellanii N. gruberi N. gruberi U 937 ? Rang 1 U 937 U 937 Legionella Spezies L. longbeachae L. oakridgensis L. bozemanü L. hackeliae L. micdadei L. p. Corby L. erythra LLAP 10 L. lytica L. anisa

Tabelle 4.2 Rangfolge der Wirtszellen bezüglich der Infektionen mit einer bestimmten Legionella Spezies

die die höchste Steigerung der CFU-Werte/ml erlauben, am weitesten links, diejenigen, in denen Legionellen am schnellsten degradiert werden ganz rechts. Mit <sup>1</sup> gekennzeichnete Wirtszellen unterscheiden sich in ihrer Rangfolge nicht signifikant. Mit "?" versehen sind Wirte, die in unabhängigen Versuchen z. T. widersrpüchliche Dargestellt ist die Rangfolge der Wirtszellen bei Infektion mit einer bestimmten Legionella-Spezies. Dies bedeutet, dass sich die betreffende Spezies am besten in der Wirtszelle auf Rang 1 vermehrt. Zellen, in denen sich die spezifischen Legionella Stämme replizieren sind fett gedruckt. In den nicht fett gedruckten Amöben findet kein Wachstum statt. Dabei werden Legionellen in Amöben mit höherer Rangnummer schneller abgebaut als in Amöben auf den vorhergehenden Rängen. Somit stehen diejenigen Wirtszellsysteme, Ergebnisse lieferten.

	Wirtszelle					
Rangfolge der	A. castellanii	H. vermiformis	D. discoideum	T. pyriformis	N. gruberi	U 937
<i>Legionella</i> Spezies						
Rang 1	LLAP 10	LLAP 10	LLAP 10	L. longbeachae	LLAP 10	L. bozemanii
Rang 2	L. lytica	L. lytica	L. lytica	LLAP 10	L. p. Corby	L. p. Corby
Rang 3	L. p. Corby	L. p. Corby	L. p. Corby	L. micdadei	L. lytica	L. oakridgensis
Rang 4	L. anisa	L. anisa	L. longbeachae	L. anisa	L. longbeachae	L. erythra
Rang 5	L. erythra	L. micdadei	L. erythra	L. p. Corby	L. micdadei	L. longbeachae
Rang 6	L. longbeachae	L. oakridgensis	L. bozemanii	L. bozemanii	L. oakridgensis	L. micdadei
Rang 7	L. bozemanii	L. bozemanii	L. oakridgensis	L. erythra	L. erythra	L. lytica
Rang 8	L. micdadei	L. erythra	L. micdadei	L. lytica	L. bozemanii	L. hackeliae
Rang 9	L. oakridgensis	L. longbeachae	L. hackeliae	L. oakridgensis	L. anisa	L. anisa
Rang 10	L. hackeliae	L. hackeliae	L. anisa	L. hackeliae	L. hackeliae	LLAP 10

Tabelle 4.3 Rangfolge der Legionella Spezies bezüglich der intrazelluläre Vermehrung in verschiedenen Wirten

Dargestellt ist die Rangfolge der Legionellen in den jeweiligen Wirtszellen. Sich intrazellulär vermehrende Legionellen sind fett gedruckt. Die Wachstumsrate nimmt von oben nach unten ab, somit vermehrt sich die entsprechende Legionellen Spezies auf Rang 1 in einer bestimmten Wirtszelle besser als diejenige auf Rang 2 und die Spezies auf Rang 10 wird schneller abgebaut als diejenige auf Rang 9.

#### 4.1.2 Zusammenfassung

Mittels Infektionsversuchen wurde ein Spektrum der Gattung *Legionella* zum ersten Mal systematisch in verschiedenen Protozoen getestet. Dabei zeigten vor allem die Umweltisolate *L. lytica* und LLAP 10 sowie der hochvirulente humanpathogene Vertreter *L. pneumophila* in allen Amöben ein gutes intrazelluläres Wachstum. *A. castellanii* stellt diejenige Amöbe dar, die den meisten der getesteten *Legionella*-Spezies eine intrazelluläre Replikation ermöglicht. In *H. vermiformis* und *N. gruberi* ist die Anzahl der sich replizierenden Spezies geringer. Im Gegensatz zu Amöben findet in dem Ciliaten *T. pyriformis* bei wenigen *Legionella*-Spezies ein geringes Wachstum statt, jedoch werden die sich nicht replizierenden Spezies auch nicht so schnell abgebaut, wie dies in den Amöben der Fall ist. Infektionsversuche mit humanen U937-Zellen lieferten in unabhängigen Versuchen z. T. Ergebnisse mit unterschiedlichen Tendenzen. Somit war die Interpretation der Ergebnisse schwierig und ein Vergleich mit den aus Amöben gewonnenen Resultaten nicht möglich.

### 4.2 Etablierung von Dictyostelium discoideum als neues Wirtszellsystem

#### 4.2.1 Wahl des Infektionsmediums

Ein Infektionsmedium muss gewährleisten, dass eine optimale Phagozytoserate der Bakterien erfolgt ohne dadurch die Wirtszellen zu sehr zu beeinträchtigen. Die Wirtszellen sollten sich darin zwar nicht mehr normal weitervermehren aber andererseits auch die Einstellung des Metabolismus durch Zystenbildung oder ähnliches verhindert werden.

Bei *A. castellanii* z. B. dient das Aussäen der Zellen in Amöbenpuffer dem Aushungern der Zellen. Dadurch wird eine optimale Phagozytoserate nach Zugabe von Bakterien erzielt. Allerdings bedingt dies gleichzeitig eine hohe Rate an enzystierten Amöben nach 48 h und damit einer Verkürzung der effektiven Infektionszeit. Da die Infektion von Acanthamoeben allerdings einen sehr raschen Verlauf nimmt, sind diese Bedingungen dort optimal.

*D. discoideum* Zellen wurden in einem Infektionsassay in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgebracht und die Vermehrungsrate von *L. pneumophila* in verschiedenen Medien getestet. Dabei ist Soerensen- oder Amöbenpuffer als Infektionsmedium ungeeignet, da bei *D. discoideum* unter Nahrungsmangel ein Differenzierungsprozess eingeleitet wird. Diese Differenzierung mündet bei Kultivierung auf Agarplatten in der Ausbildung eines Fruchtkörpers. Dieses Endstadium der Entwicklung kann in Flüssigkultur nicht gebildet

werden, die Zellen aggregieren jedoch nach ca. einem Tag, nehmen dabei eine lang gestreckte Form an und stellen die Phagozytose ein. Daher ist ein Puffer ohne jegliche Nährstoffe für Versuche mit einer Dauer von mehr als 24 Stunden nicht als Infektionsmedium geeignet.

Assay-Medium wird z. B für *H. vermiformis* verwendet und wurde ebenso getestet. Bei Dictyostelien kann hier allerdings ein starkes Amöbenwachstum beobachtet werden. Die Zellzahl/ml bleibt also nicht konstant und ist daher ebenfalls nicht besonders geeignet. Dasselbe gilt für die Infektion in HL5, dem Wachstumsmedium der Dictyostelien. Um das Wachstum der Amöben weitgehend zu reduzieren ohne die Differenzierung der Zellen zu bewirken, wurde dann eine Mischung aus Soerensenpuffer und HL5-Medium im Verhältnis 1:1 verwendet und die Infektionen darin durchgeführt. Eine Infektionskinetik in diesem Medium ist der Abbildung 4.2 zu entnehmen.

Um festzustellen, ob sich einzelne Komponenten negativ auf die Phagozytoserate auswirken, wurden im FACS-Gerät die Anzahl infizierter Zellen nach 5 h Infektion bestimmt. Ist bei der Bakterienaufnahme z. B. ein durch Glukose inhibierbarer Rezeptor beteiligt, so sollte durch die Anwesenheit von Glukose im Medium die Aufnahmerate verringert sein. Getestet wurde unverändertes HL5-Medium, HL5 ohne Pepton bzw. ohne Glukose, sowie Soerensenpuffer mit und ohne Glukose. Infiziert wurde mit dem GFP-markierten L. pneumophila Stamm Nr. 6, der eine höhere Aufnahmerate besitzt als L. pneumophila Corby und man daher Unterschiede zwischen den Medien besser feststellen kann. Dictyostelien, die Bakterien internalisiert haben bekommen dadurch eine grüne Fluoreszenz und deren Anzahl kann im Durchflusszytometer bestimmt werden. Dabei konnte in HL5 die höchste Phagozytoserate gemessen werden. Glukose hatte entgegen der erwarteten Ergebnisse einen positiven Einfluss auf die Aufnahme von Bakterien. Während in HL5 Medium 70 % der Zellen mit dem Stamm Nr. 6 infiziert waren, war der Anteil grün fluoreszierender Zellen ohne Glukose um 30% reduziert. Bei der Verwendung von Soerensenpuffer mit bzw. ohne Glukose kann eine Reduktion von 20% im Puffer ohne Glukose im Vergleich zum Puffer mit Glukose gemessen werden.



Abb. 4.3 Prozentualer Anteil mit L. p. Nr. 6 infizierter *Dictyostelium*-Zellen (MOI 100, 5h) in unterschiedlichen Infektionsmedien. Glukose und Pepton haben entgegen der Erwartung keinen negativen Effekt auf die Aufnahmerate.

## 4.2.2 Einfluss verschiedener Zucker auf die Invasionseffizienz

Bei *H. vermiformis* kennt man einen Gal/GalNAc Lectin Rezeptor, der durch die Anwesenheit von Galaktose im Medium, nicht aber von Mannose oder Glukose inhibiert wird. Galaktose vermindert somit die Menge der phagozytierten Legionellen (Venkatamaran et al., 1997). Die Dictyostelien wurden mit 100 mM des jeweiligen Zuckers in Soerensenpuffer für 30 min vorinkubiert und für 2 h mit GFP markierten *L. pneumophila* infiziert. Im Gegensatz zu *H. vermiformis* ließ sich keine hemmende Wirkung von Galaktose auf die Aufnahme von Legionellen nachweisen. Die Anzahl infizierter Zellen nahm in Anwesenheit von Galaktose sogar leicht zu von 16% auf ca. 20 %. In Anwesenheit von Mannose wurde die Phagozytoserate sogar um 50% gesteigert. Es wurden 32% infizierte Zellen gemessen. Daher spielt der oben genannte Rezeptor bei der Infektion von *D. discoideum* im Gegensatz zu *H. vermiformis* keine Rolle.



**Abb. 4.4:** Prozentualer Anteil mit *L. p.* Corby GF3 infizierter Dictyostelien (MOI 50, 2 h) nach Vorinkubation der Zellen mit verschiedenen Zuckern. Galaktose besitzt im *Dictyostelium*-Modell im Gegensatz zu *H. vermiformis* keine inhibierende Wirkung auf die Aufnahmerate.

# 4.2.3 Nachweis der intrazellulären Vermehrung von Legionellen in *Dictyostelium* mittels *In-situ*-Hybridisierung und Elektronenmikroskopie

Um auszuschließen, dass sich die Legionellen extrazellulär im Medium vermehren wurde die intrazelluläre Replikation mit mikroskopischen Methoden überprüft. Während einer Infektion mit LLAP 10 wurde jeweils nach 48 h und 72 h ein Aliqout entnommen und auf einen Objektträger aufgetropft, fixiert und hybridisiert. Im Fluoreszenzmikroskop waren nach 48 h einige wenige stark infizierte Dictyostelien zu sehen. Die Anzahl der infizierten Zellen nimmt mit der Zeit zu, da diese Zellen im weiteren Infektionsverlauf lysieren und die Legionellen somit frei gesetzt werden. Dadurch beginnt ein weiterer Infektionszyklus und neue Dictyostelien können infiziert werden. Daher findet man nach 72 h sowohl stark als auch frisch infizierte Zellen (siehe Abb. 4.5). Außerdem nimmt der Anteil an extrazellulären Bakterien zu, die nach 48 h post Infektion noch nicht detektierbar waren. Es beginnt sich damit auch eine Wirtszelllimitiertung abzuzeichnen.

Eine Infektion mit *L. pneumophila* wurde nach 48 h für die Elektronenmikroskopie fixiert. Diese Bakterien replizieren genauso intrazellulär jedoch langsamer als LLAP 10. Nach 48 h findet man einzelne Dictyostelien die eine Vakuole mit *Legionella pneumophila* besitzen (Abb. 4.6). Allerdings beschränkt sich die Größe der Vakuole auf maximal <sup>1</sup>/<sub>4</sub> des Zellvolumens. Es konnte keine Zelle beobachtet werden, die annähernd so viele Bakterien beinhaltete wie bei einer Infektion mit LLAP 10. Der Beginn eines zweiten Infektionszyklusses findet somit ebenfalls verzögert statt.



**Abb. 4.5:** *In-situ*-Hybridisierung LLAP 10 infizierter Dictyostelien mit der *Legionella*-spezifischen Sonde LEG705-Cy3. In A und B ist eine Infektion nach 48 h im Fluoreszenzkanal und im Phasenkontrast gezeigt. In C und D ist die Infektion 72 h nach Beginn aufgenommen. Die Zahl infizierter Amöben nimmt dabei mit der Zeit deutlich zu. Bei 72 h post Infektion treten erste extrazelluläre Bakterien auf. Größenmarker ca. 5 µm



**Abb. 4.6:** Elektronenmikroskopische Aufnahme einer *L. p.* Corby infizierten *Dictyostelium*-Zelle 48 h nach Beginn der Infektion (MOI 10). Die Replikationsvakuole mit sich teilenden Legionellen ist deutlich erkennbar. Weiterhin erkennt man zahlreiche Mitochondrien sowie den Kern mit der typischen Kernkappe, einer Region mit stark kondensiertem Chromatin. Größenmarker ca. 1 μm

# 4.2.4 Einfluss einer *Legionella*-Infektion auf die Entwicklung von *Dictyostelium* und die Ausbildung von Fruchtkörpern

In diesem Experiment wurde untersucht, ob infizierte Dictyostelien noch dazu fähig sind, den Entwicklungszyklus zu durchlaufen. Dafür wurden sie für 48 h mit L. pneumophila infiziert, die Amöben dann vorsichtig von den 24-well-Schalen abgelöst und auf Soerensenagar ausplattiert. Nach 24 h konnten die Fruchtkörper unter dem Binokular ausgezählt werden. Wurde mit einer MOI von 10 infiziert, so war die Anzahl der Fruchtkörper um ca. 23% gesunken. Aus den Elektronenmikroskopischen Versuchen war bekannt, dass zu diesem Zeitpunkt nur relativ wenige Wirtszellen infiziert sind und die bakterienhaltigen Phagosomen eine geringe Größe besitzen mit maximal ca. 50 Bakterien. Eine Kontrolle im Lichtmikroskop zeigt einige abgerundete Zellen, der Hauptanteil ist dagegen adhärent und damit fähig, die beobachteten 76,8%  $\pm$  12,7% Fruchtkörper zu bilden. Diese bestehen dann wahrscheinlich aus nicht oder nur schwach (max. 10 Bakterien) infizierten Dictyostelien. Wird eine MOI von 50 verwendet, so sieht man im Lichtmikroskop sehr viele abgerundete Zellen, die dadurch nicht mehr fähig zur amöboiden Bewegung sind und deshalb auch nicht aggregieren können. Man kann nur noch 12,9 % ± 8,1% gebildete Fruchtkörper im Vergleich zur Negativkontrolle detektieren. Dabei handelt es sich außerdem um "Minifruchtkörper", die weniger als halb so groß sind wie Fruchtkörper aus nicht infizierten Zellen. Im allgemeinen lässt sich sagen, dass es sich bei dieser Reduktion der Entwicklung zu mehrzelligen Aggregaten nicht um eine spezifische Hemmung der Signaltransduktionswege durch *Legionella* handelt sondern eher um eine generelle Schädigung der Wirtszelle

# 4.2.5 Untersuchungen zur *Legionella*-spezifischen Induktion der Apoptose in *D. discoideum* und *T. pyriformis*

L. pneumophila ist in Wirtszellen höherer Eukaryonten dazu in der Lage, schon nach sehr kurzer Infektionsdauer (30 min) den apoptotischen Zelltod zu induzieren. In A. castellanii konnte dagegen nur ein Absterben der Zellen durch nekrotische Vorgänge beobachtet werden (Hägele et al., 1998). Allerdings ist für die meisten Protozoen unter natürlichen Bedingungen nie eine Induktion der Apoptose beobachtet worden. Es konnte daher nicht abschließend beantworte werden, ob Legionellen diese Induktion prinzipiell nur in multizellulären Eukaryonten bewirken können, oder ob der dafür notwendige zelluläre Apparat in Amöben einfach nicht vorhanden ist. Eine der wenigen Ausnahmen bei Protozoen, bei denen Apoptose auftritt, sind Ereignisse während Entwicklungsvorgängen wie der Konjugation bei T. pyriformis und der Bildung von Fruchtkörpern bei D. discoideum. In Tetrahymena gibt es einen Kerndualismus. Der große Makronukleus ist zuständig für den normalen Metabolismus, während der Mikronukleus nur während der Konjugation eine Rolle spielt. Vor der Konjugation wird der Makronukleus via Apoptose degradiert (Mpoke und Wolfe, 1996) und die Konjugationspartner tauschen haploide Mikronuklei aus. Aus dem neu entstandenen diploiden Mikronukleus wird dann ein aktiver Makronukleus regeneriert. Im Gegensatz zu den multizellulären Eukaryonten ist also nur der Kern von den apoptotischen Vorgängen betroffen, die Zelle an sich bleibt erhalten. Bei D. discoideum sterben während des Entwicklungszyklusses die Stielzellen des Fruchtkörpers ab, wobei in der Literatur kontrovers diskutiert wird, ob es sich dabei wirklich um eine echte Apoptose handelt oder nur um einen sehr ähnlichen Prozess. Im Unterschied zu höheren Eukaryonten kann z. B. kein Schrumpfen des Zellvolumens beobachtet werden (Olie et al., 1998).

Neben der Spaltung der DNA in 200 bp Multimere und dem dadurch entstehenden typischen Strickleitermuster auf Agarosegelen gilt das Binden von Annexin V an die Zelloberfläche als ein sicherer Nachweis apoptotischer Zellen. Annexin V geht mit Phosphatidylserin einen Komplex ein und kann dann über den daran gekoppelten FITC-Farbstoff im Durchflusszytometer nachgewiesen werden. Phosphatidylserin kommt in gesunden Zellen nur auf der Innenseite einer Lipiddoppelschicht vor. Eines der ersten Ereignisse nach Induktion der Apoptose ist ein Wechsel dieses Lipides auf die Außenseite der Membran. Die Gegenfärbung mit Propidiumiodid erlaubt eine Unterscheidung von echten apoptotischen Zellen mit ausschließlich grüner Fluoreszenz und nekrotischen Zellen mit grüner und gleichzeitig roter Fluoreszenz. Propidiumiodid färbt tote Zellen, deren Membranintegrität verloren gegangen ist. Bei diesen Zellen bindet dann Annexin V ebenfalls an der Innenseite der Membran.

Bei der Analyse der Daten erfolgt eine Einteilung der Fluoreszenzintensitäten in vier Quadranten. Bei Zellen in dem Quadrant mit ausschließlich grüner Fluoreszenz handelt es sich um apoptotische Zellen. Allerdings muss dann im Verlauf der Zeit zuerst eine deutliche Verschiebung der Zellen in den unteren rechten Quadranten (nur grün gefärbte Zellen) zu beobachten sein, bevor sich die Zellen nach oben rechts (grün und rot gefärbte Zellen) bewegen. Ist in der Analyse gleich eine Verschiebung nach oben rechts zu beobachten, so handelt es sich um nekrotische Zellen, die an den Schnittstellen der Quadranten fälschlicherweise als apoptotisch erfasst werden (Hägele et al., 1998).

Bei einer Färbung *Legionella*-infizierter Dictyostelien konnte nur eine solche Verschiebung in Richtung der doppelt gefärbten Zellen und damit keine Apoptoseinduktion nachgewiesen werden, obwohl in der Abbildung 4.7 diese falsch positiven als "apoptotisch" dargestellt wurden. Dieses Ergebnis entspricht auch den elektronenoptischen Experimenten. Dort kann man zwar Kerne mit kondensiertem Chromatin feststellen, allerdings beobachtet man dies auch in der nicht infizierten Kontrolle und es handelt sich dabei um die für *Dictyostelium* 



Abb. 4.7: Durchflusszytometrische Analyse *L. p.* Corby-infizierter Dictyostelien (MOI 50) zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Färbung mit Annexin V und Propidiumiodid. Die Anzahl nekrotischer Zellen nimmt auch nach 48 h nur leicht zu. Bei dem geringen Anteil an Zellen, der als "apoptotisch" erfasst wurde, handelt es sich ausschließlich um falsch positive, deren prozentualer Anteil über die Zeit konstant bleibt.

typischen so genannten Kernkappen in gesunden Zellen. Weiterhin kann festgehalten werden, dass selbst bei einer Infektion mit einer MOI von 50 erst nach 48 h eine leichte Zunahme nekrotischer Dictyostelien erfolgt. Obwohl zu diesem Zeitpunkt schon eine massive Abrundung der Zellen zu beobachten ist, bleibt deren Membran noch intakt.

Bei *T. pyriformis* konnte über einen Zeitraum von 48 h weder eine Zunahme von nekrotischen noch von apoptotischen Zellen beobachtet werden. Hier kam erschwerend dazu, dass Propidiumiodid eine unspezifische Bindung an die Ciliaten besitzt, oder eventuell mit dem Puffer ins Zellinnere gestrudelt wird und somit ein hoher Anteil scheinbar nekrotischer Zellen vorhanden ist. Im Lichtmikroskop kann dieser Eindruck jedoch nicht bestätigt werden, da lebende Zellen an der hohen Beweglichkeit eindeutig erkannt werden. Es kann daher gesagt werden, dass die Induktion der Apoptose während einer *Legionella*-Infektion auf die höheren eukaryontischen Zellen beschränkt ist und in Protozoen-Wirten keine Rolle spielt.

## 4.2.6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Bodenamöbe *D. discoideum* als neues Wirtsmodell für *Legionella*-Infektionen etabliert. Mittels Infektionsversuchen und Durchflusszytometrie wurde zunächst eine Mischung von HL5-Medium und Soerensenpuffer als geeignetes Infektionsmedium bestimmt. Über elektronenmikroskopische Analysen und *In-situ*-Hybridisierung wurde der Nachweis der intrazellulären Vermehrung von *L. lytica*, LLAP 10 und *L. pneumophila* erbracht. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Zucker Mannose, Galaktose und Glukose keine hemmende Wirkung auf die Phagozytose besitzen, sondern diese z. T. sogar fördern. Außerdem konnte gezeigt werden, dass bei infizierten Dictyostelien die Entwicklung zu Fruchtkörpern gestört ist. Eine Induktion der Apoptose, wie sie in den Stielzellen des Fruchtkörpers zu finden ist, konnte jedoch bei Infektion der Dictyostelien mit Legionellen nicht nachgewiesen werden.

# 4.3 Analyse benötigter Wirtsfaktoren während einer *Legionella*-Infektion in *Dictyostelium*

Da es sich bei *D. discoideum* um eine haploide, genetisch manipulierbare Amöbe handelt, können Mutanten relativ einfach hergestellt werden. Um für eine Infektion notwendige Wirtsfaktoren zu analysieren wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Wege beschritten. Zum einen wurden schon vorhandene Mutanten, die eventuell einen Einfluss auf die Infektion besitzen könnten, getestet, zum anderen wurden zufällige Mutanten mittels einer REMI-Mutagenese hergestellt und diese auf eine Resistenz gegenüber Legionellen geprüft. Im Folgenden sind die Ergebnisse beider Vorgehensweisen beschrieben.

## 4.3.1 Herstellung und Screening zufälliger Mutanten von D. discoideum

Durch die REMI-Mutagenese konnten zufällige Mutanten produziert werden. Bei einem Einsatz von 5 x  $10^7$  Zellen pro Mutagenese erhielt man im Mittel ungefähr 20 bis 60 Klone, die als Kolonien am Boden der Zellkulturflasche zu sehen waren. Die Inkubationszeit bis zum Wachstum der Klone schwankte sehr stark von 10 Tagen bis zu 5 Wochen. Die REMI-Mutagenese war aber im allgemeinen eine gute Methode um zufällige Mutanten zu generieren.

Das Screening gestaltete sich dagegen sehr schwierig. Nach dem Heranwachsen zu einem losen Monolayer wurden die Zellen mit *L. pneumophila* oder LLAP 10 infiziert. Diese Infektion verläuft zum einem relativ langsam (1 bis 2 Wochen), zum anderen werden nie alle nicht resistenten Klone vollständig von den Bakterien lysiert, so dass auch nach mehreren Infektionszyklen immer noch falsch positive Klone vorhanden sind. Ein zu häufiges Wiederholen der Infektionszyklen sollte allerdings trotzdem vermieden werden, da die Dictyostelien zur Spontanmutation neigen. Erhielt man dann resistente Klone so wurden diese eventuell durch die zusätzliche spontane Veränderung des Genoms bedingt und die Resistenz wurde nicht durch den spezifischen Einsatz des REMI-Vektors herbeigeführt. Daher wurden nach spätestens drei Infektionszyklen die Mutanten auf *Klebsiella*-Platten vereinzelt, gepickt und in 24-well-Schalen als Einzelklone erneut kultiviert. Nach intensivem, täglichen Waschen mit Antibiotika-haltigem Medium über zwei Wochen waren die Klone frei von Klebsiellen und konnten erneut mit Legionellen infiziert werden. Bei diesem Schritt stellten sich alle erhaltenen Klone als falsch positiv und damit nicht resistent gegenüber einer Infektion mit

Legionellen heraus. Nach ca. einem Jahr wurden die Versuche mangels Erfolg eingestellt. Ein Grund für diesen Misserfolg ist das ineffektive Screening. Hätte die Infektion denselben schnellen Verlauf wie in *A. castellanii* und würden die Wirtszellen genauso wirkungsvoll lysiert, läge die Wahrscheinlichkeit, einen resistenten Klon zu bekommen, wesentlich höher. Da Acanthamoeben für genetische Manipulationen nicht zugänglich sind, kann man diesen Versuch jedoch nicht auf sie übertragen. Kürzere Versuchslaufzeiten könnten weiterhin die Anzahl der getesteten Klone deutlich erhöhen und damit auch die Anzahl mutierter Gene. Dies würde ebenfalls zu einer größeren Trefferquote führen. Zu Bedenken bleibt aber dennoch, ob eine Resistenz gegenüber Legionellen wirklich auf die Mutation allein eines einzigen Faktors zurückgeführt werden kann, oder ob man im günstigsten Fall eine Attenuation der Vermehrung erreicht, da meistens mehrere Faktoren zusammenwirken. Eine Attenuation aber kann unter den hier gewählten Bedingungen nicht detektiert werden.

# 4.3.2 Untersuchung spezifischer AX2-Zytoskelett-Mutanten hinsichtlich ihres Einflusses auf eine Infektion mit Legionellen

Da bei der Phagozytose von Bakterien die Aktinreorganisation unerlässlich ist, wurden zunächst zwei verschiedene Knock-out Mutanten getestet. Beide Mutanten wurden aus dem Wildtypstamm AX2 generiert. Bei der Profilin I/II- Doppelmutante wurden beide Isoformen des Profilins deletiert. Das 12 kDa große Profilin bindet in einem Verhältnis von 1:1 an globuläres Aktin. Weiterhin greift es in die Signaltransduktion ein, indem es an Lipide oder poly-Prolin-Domänen in Zielproteinen bindet. Zusammen mit der PI<sub>3</sub> Kinase und LimpA produziert es PIP<sub>3</sub> aus PIP<sub>2</sub>, wodurch die Makropinozytose positiv reguliert wird. Ohne diese Aktivität entsteht aus PIP<sub>2</sub> Diacylglycerol und IP<sub>3</sub>, womit die Phagozytoserate steigt (Rupper und Cardelli, 2001). In der Profilin-Mutante ist das Verhältnis von G-Aktin zu filamentösem F-Aktin im Vergleich zum Wildtyp von 1:1 auf 1:3 verschoben. Weitere phänotypische Merkmale dieser Mutante sind Defekte in der Zytokinese (größeres Zellvolumen, mehrkernig), verlangsamte Wanderungsgeschwindigkeit während der Chemotaxis sowie erhöhte Sensitivität gegenüber mechanischer Beanspruchung (kein Wachstum in Schüttelkultur, keine Ausbildung von Fruchtkörpern).

Die Reorganisation des Zytoskeletts erfordert außerdem Proteine, die Aktinfilamente fragmentieren und neu bündeln. Das Hauptprotein dafür in *Dictyostelium* ist das Severin. In Anwesenheit von mikromolaren Mengen  $Ca^{2+}$  schneidet Severin Aktinfilamente, bindet an deren schnell wachsende Enden ("capping") und bildet den Kristallisationskeim für neue

Aktinfilamente. PIP<sub>2</sub> und andere negativ geladene Phospholipide üben auf die Aktivität von Severin eine hemmende Wirkung aus (Noegel und Luna, 1995).

Alle Mutanten wurden mit denjenigen *Legionella*-Stämmen infiziert, die schon im AX2 WT eine intrazelluläre Replikation zeigten. Dabei konnte beobachtet werden, dass sich LLAP 10 in den Mutanten genauso vermehrt wie in AX2 Zellen während bei einer Infektion mit *L. lytica* eine Steigerung der Wachstumsrate in Profilin-minus Zellen zu beobachten ist. Der größte Unterschied zwischen Mutante und WT kann dabei nach 72 h festgestellt werden. Die Severinmutante erlaubt nur eine leichte Steigerung der intrazellulären Replikation und ist nicht signifikant. Dieselbe Tendenz findet sich bei *L. pneumophila* infizierten Zellen wieder, allerdings sind die Unterschiede zwischen WT und Mutanten hier nicht ganz so deutlich ausgeprägt. In der Abbildung 4.8 wurde daher der Infektionsverlauf von LLAP 10 und *L. lytica* gegenübergestellt.



**Abb. 4.8** Infektionskinetik von LLAP 10 (A) und *L. lytica* (B) in AX2 WT und zwei Mutanten von Aktinbindenden Proteinen. Die intrazelluläre Vermehrungsrate von Legionellen ist in der Profilin-negativen Mutante leicht erhöht, wobei dieser Effekt bei einer Infektion mit *L. lytica* stärker ausgeprägt ist. Die Deletion von Severin bewirkt nur eine leichte Erhöhung der intrazellulären Vermehrungsrate und ist statistisch nicht signifikant.

### FACS-Analyse zur Bestimmung der Phagozytoserate in verschiedenen AX2-Mutanten

Wie oben beschrieben, reguliert Profilin in Wildtypzellen die Makropinozytose in positiver Art und Weise. In einer Profilin-minus-Mutante müsste daher die Phagozytoserate erhöht sein, da aus PIP<sub>2</sub> ohne Profilin kein PIP<sub>3</sub> mehr gebildet wird und somit nur Diacylglycerol und IP<sub>3</sub> entsteht, welche die Phagozytose fördern. Für die Messung der Aufnahmerate wurden *Dictyostelium*-Mutanten mit GFP-markierten Legionellen infiziert. Grünleuchtende Amöben konnten damit durchflusszytometrisch erfasst werden. Wie erwartet konnte in der Profilin-Mutante eine höhere phagozytotische Aktivität festgestellt werden. Die Inkubation der Zellen wurde in Soerensenpuffer durchgeführt. Damit wurde die Eigenfluoreszenz der Amöben durch das HL5-Medium unterbunden, allerdings erfolgt die Aufnahme von *L. pneumophila* dann nur noch in geringem Maße (siehe 4.2.1). 6 h nach Infektionsbeginn hatten im WT gerade 0,5% aller Zellen Bakterien internalisiert. Trotz allem konnte in der Profilin-Mutante mehr infizierte Zellen nachgewiesen werden (1,09%). 24 h nach Infektionsbeginn hatte sich in allen Zellen der Anteil der infizierten erhöht, lag jedoch weder in WT noch in Mutante höher



**Abb. 4.9**: Dargestellt ist die durchflusszytometrische Analyse infizierter *Dictyostelium*-Mutanten im Vergleich zum AX2-WT nach 6 und 24 h. Infiziert wurde mit GFP markierten *L. p.* Corby bzw. *L. p.* Nr.6 mit einer MOI von 100. Die Profilin-Mutante zeigte in 4 unabhängigen Experimenten eine erhöhte Phagozytoserate, während bei der Severinmutante die Unterschiede zum WT weder signifikant noch reproduzierbar waren.

als 2%. Daher wurde gleichzeitig das klinische Isolat *L. pneumophila* Nr. 6 getestet, das eine höhere Invasivität besitzt. Dort konnte nach einer Infektionsdauer von 6 h in der Profilin-Mutante 4% mehr infizierte Wirtszellen nachgewiesen werden. In AX2-Widltypzellen zeigt der Stamm Nr. 6 dann allerdings keine so effektive intrazelluläre Vermehrung im Vergleich zu *L. pneumophila*. Dies zeigt sich in einer Reduktion der infizierten Zellen von 6 h auf 24 h post Infektion von 6,2 auf 3,4%. In Profilin-minus Zellen findet dagegen eine Zunahme von 10,14% auf über 12% infizierte Zellen statt. Die Severin-Mutante wurde ebenfalls getestet. Die Unterschiede zum WT sind jedoch nicht signifikant. Zusätzlich wurde in fünf unabhängigen Experimenten entweder eine leicht erhöhte oder erniedrigte Phagozytoserate bestimmt. Die Tendenzen konnten also nicht reproduziert werden.

# 4.3.3 Untersuchung der REMI-Mutante RB2 sowie der spezifischen Knock-out Mutante *lmp*A<sup>-</sup>

Bei der mittels REMI hergestellten Mutante RB2 handelt es sich um eine Amöbe, in der in einem Profilin-minus Hintergrund der wildtypische Phänotyp wiederhergestellt wurde. Dabei wurde im Gen *lmpA* der REMI-Vektor integriert. DdLIMP ist das Genprodukt von *lmpA* und wurde unter 4.3.5 beschrieben. In der ImpA Deletionsmutante wurde in einem AX2-Stammhintergrund eine spezifische Mutation dieses Genes herbeigeführt (Schleicher, pers. Mitteilung). Da sich die Legionellen in der Profilin-Mutante besser replizieren, wurden im Folgenden diese beiden Stämme ebenfalls getestet. Dabei zeigte die RB2-REMI Mutante ein ähnliches Verhalten wie der Ausgangsstamm Profilin-minus. In der ImpA-Mutante waren jedoch alle drei getesteten Stämme in weit geringerem Ausmaß dazu in der Lage sich intrazellulär zu replizieren (siehe Abbildung 4.10). Die Funktion von DdLIMP ist noch nicht abschließend aufgeklärt, es könnte sich aber um einen Fettsäuretransporter handeln. Von L. pneumophila ist bekannt, dass sich die Zusammensetzung der Fettsäuren in der phagosomalen Membran sehr schnell verändert. Die Dicke der Lipiddoppelschicht wird dadurch verringert und ähnelt nach der Umwandlung der des ERs und nicht mehr der des endosomalen Systems. Falls dabei DdLIMP eine Rolle spielen könnte, so bleibt die Membranzusammensetzung in der Deletionsmutante erhalten und die Reifung des Phagosoms wird nicht verhindert. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass die Vermehrungsrate der Legionellen in ImpA reduziert ist. Allerdings müsste dann auch in der RB2-Mutante die Infektion wesentlich schlechter verlaufen, als dies der Fall ist. In der folgenden Abbildung wurde eine repräsentative Infektionskinetik von L. lytica infizierten Mutanten dargestellt.



**Abb. 4.10:** Infektion der REMI-Mutante RB2 sowie der spezifischen Deletionsmutante  $lmpA^{-}$  mit *L. lytica* über 96 h

# 4.3.4 Einfluss verschiedener Calcineurin Überexpressionsmutanten auf eine Infektion mit Legionellen

Außer den bisher verwendeten zufälligen und spezifischen Deletionsmutanten gibt es in Dictyostelium die Möglichkeit, Proteine in einem Expressionsvektor im Überschuss zu exprimieren. In dieser Arbeit wurden Calcineurin Überexpressionsmutanten verwendet. Calcineurin besteht aus zwei verschiedenen Untereinheiten, dem katalytischen 60 kDa Calcineurin A und der 12 kDa großen regulatorischen Untereinheit Calcineurin B. Calcineurin gehört in Dictyostelium zu einer Signalkaskade, die die Zelldifferenzierung steuert. Die Aktivität dieser Ca2+/Calmodulin-abhängigen Proteinphosphatase spielt eine wichtige Rolle bei der Übertragung von intrazellulären Calciumsignalen auf die Genebene. Immunsuppresoren wie Cyclosporin A und FK506 wirken hemmend auf diese Phosphataseaktivität. Da ein wichtiger Virulenzfaktor von L. pneumophila, das "major infectivity potentiator" mip-Protein ebenfalls ein FK506-Bindungspartner darstellt, wurden die Mutanten hinsichtlich einer Infektion mit Legionellen untersucht. Dabei wurden in der CNA/B OP Mutante beide Untereinheiten überexprimiert, in der TrE1-Mutante nur das katalytische Calcineurin A. In LLAP 10 infizierten Zellen konnte kein Unterschied zwischen AX2 WT und den Überexpressionsmutanten beobachtet werden. Dagegen zeigten mit L. lytica infizierte TrE1-Zellen eine langsamere Infektionskinetik (siehe Abb. 4.11). Die maximale Differenz in der Bakterienzahl pro ml kann 72 h nach Infektionsbeginn detektiert werden und beträgt zwei Zehnerpotenzen. Im Stamm CNA/B OP nehmen die CFU-Werte bis 48 h post Infektion genauso ab wie bei TrE1, dann findet jedoch ein schnelleres Wachstum statt, so dass die Differenz zum WT am Ende der Infektion geringer ist. Diese Tendenz findet sich bei *L. pneumophila* genauso wieder, jedoch nicht ganz so deutlich ausgeprägt. Daher wurden in der folgenden Abbildung nur LLAP 10 und *L. lytica* dargestellt.



**Abb. 4.11:** Infektionskinetik von LLAP 10 und *L. lytica* in den Calcineurin Überexpressionsmutanten CNA/B OP und TrE1. Die CNA/B OP-Mutante exprimiert sowohl die katalytische als auch die regulatorische Untereinheit im Überschuss, bei der TrE1-Mutante wird nur die katalytische Untereinheit A überexprimiert. Während bei LLAP 10 kein Effekt der Calcineurin-Überexpression auf die intrazelluläre Vermehrung dieses Stammes zu beobachten ist, ist die Replikationsrate von *L. lytica* reduziert.

# 4.3.5 Untersuchung zur Kolokalisierung des lysosomalen Markers DdLIMP mit Phagosomen

DdLIMP gehört zu der CD36/LIMP II Proteinfamilie, die eine hohe Konservierung von Amöben bis zu Säugern aufweist. In *D. discoideum* sind bislang die drei Gene *lmpA-C* bekannt, wobei *lmpA* für den verwendeten Marker DdLIMP kodiert. Es handelt sich dabei um ein Protein der lysosomalen Membran mit 2 Transmembrandomänen. Fast alle anderen CD36-Homologe sind dagegen in der Plasmamembran der Zelle lokalisiert. DdLIMP besitzt eine Bindungsspezifität für das anionische PIP<sub>2</sub>. Andere Mitglieder dieser Proteinfamilie binden indessen stärker an Phosphatidylcholin und Phosphatidylserin, an die DdLIMP nicht bzw. nur sehr schwach bindet. Downstream von PIP<sub>2</sub> gelegene Signalkaskaden regulieren neben der Entwicklung zu Fruchtkörpern und der Zytokinese den Vesikeltransport. Eventuell besitzt DdLIMP eine Lipidtransporteraktivität und könnte somit auf die zelluläre Konzentration bestimmter Lipide in der Zelle einwirken (Karakessisoglou et al., 1999).

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob eine Kolokalisierung von Bakterien mit DdLIMP zu beobachten ist. Ein Charakteristikum während einer Infektion mit *L. pneumophila* ist die Hemmung der Phagolysosom-Fusion. Sollte keine Kolokalisierung von DdLIMP mit *L. pneumophila* zu finden sein, wird diese Fusion in *D. discoideum* genauso inhibiert wie in den bislang etablierten Wirtszellsystemen. Als Kontrolle dienten *E. coli* und *L. hackeliae*, die keine intrazelluläre Replikation in Dictyostelien aufweisen und auf dem normalen Weg mit Verdauungsvakuolen fusionieren.



**Abb. 4.12**: Kolokalisierungsstudie des lysosomalen Markers DdLIMP mit verschiedenen Bakterien. Oben links befinden sich nicht infizierte Zellen. Die Lysosomen sind als rote Punkte erkennbar. Rechts daneben ist eine Zelle mit sich replizierenden *L. p.* Corby abgebildet. Die Replikationsvakuole liegt eng neben den Lysosomen, aber es hat keine Fusion stattgefunden. Dagegen erkennt man bei *L. hackeliae* (unten links) und *E. coli* (unten rechts) an der Gelbfärbung die Kolokalisierung von Bakterien mit lysosomalen Markern.

Für den Versuch wurden Dictyostelien für 72 h mit L. hackeliae und L. pneumophila und für 24 h mit E. coli infiziert. Die beiden letzteren waren GFP markiert und konnten direkt detektiert werden. L. hackeliae wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen HSP 60 grün angefärbt. Die Lysosomen werden mit einem polyklonalen Antikörper gegen DdLIMP rot markiert. In der Analyse am konfokalen Mikroskop ergab sich, dass L. pneumophilahaltige Phagosomen in ca. 15,8% aller Fälle mit Lysosomen fusioniert waren und deshalb eine Kolokalisierung der roten und grünen Fluoreszenz beobachtet werden konnte. In den restlichen 84,2% der Fälle konnten replizierende Bakterien nachgewiesen werden, deren Vakuolen zwar in enger räumlicher Nähe zu Lysosomen lagen, jedoch klar von ihnen getrennt waren (siehe Abb. 4.12). L. hackeliae dagegen zeigte mit 81,6% eine deutliche Kolokalisierung. Es handelt sich dabei um einen Stamm, der zwar kontinuierlich degradiert wird, aber trotzdem nach 96 h post Infektion noch nachgewiesen werden kann. Die Vakuolen, in denen noch keine Kolokalisierung der Marker aufgetreten ist, werden daher eventuell zu einem späteren Zeitpunkt noch fusionieren. Die Fusionsrate bei dem Futterbakterium E. coli lag dagegen bei annähernd 100%. Virulente Legionellen-Stämme benutzen in D. discoideum also dieselbe intrazelluläre Überlebensstrategie wie in den bisher etablierten Wirtssystemen.

# 4.3.6 Bestimmung des intraphagosomalen pH-Wertes von *Legionella*-Stämmen in *D. discoideum*

L. pneumophila durchläuft in einer Infektion von Makrophagen verschiedene Stadien. Bis ca. 16 h nach Infektionsbeginn wird die Ansäuerung der Vakuole verhindert und der pH ist nahezu neutral. Danach beginnen sich die Legionellen zu vermehren und der pH sinkt auf einen Wert von 5,5. Damit verbunden sind Veränderungen in der Membranzusammensetzung der Bakterien, die den vormals Säure-sensitiven Legionellen nun eine Säuretoleranz verleiht. In diesen Versuchen sollte untersucht werden, ob in *Dictyostelium* 2 h nach Beginn der Infektion der allgemeine Mechanismus greift und eine Ansäuerung der Vakuole zunächst verhindert wird. Dazu wurden die Legionellen mit Carboxyfluorescein (CF) markiert. Die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes ist abhängig vom pH Wert, je saurer der pH umso geringer die Intensität. In einer Eichgeraden wird der phagosomale pH-Wert an den des Puffers angeglichen, in dem den Zellen Nigericin zugesetzt wird. Dieses Antibiotikum bildet Poren in der Membran, zerstört dadurch das Membranpotential und erlaubt den Einstrom der Ionen ins Zellinnere. Nach Erstellen der Eichgeraden kann dann der pH der gemessenen

Probe bestimmt werden. Außerdem wurden die Bakterien mit Antikörpern opsonisiert, um die

Phagozytoserate zu optimieren. Dabei konnte in einem Kontrollversuch kein Unterschied in der Ansäuerung der Phagosomen detektiert werden. Dies bestätigt die seit langem bekannte Beobachtung, dass eine Opsonisierung von Legionellen deren intrazelluläre Replikationsrate nicht beeinträchtigt (Horwitz et al., 1984). Weiterhin war von Mycobakterien bekannt, dass der intrazelluläre pH durch die Opsonisierung nicht beeinflusst wird (Oh und Straubinger, 1996).

Wie erwartet konnte bei *L. pneumophila* eine Verhinderung der Ansäuerung festgestellt werden. Der gemessene pH-Wert lag bei 6,33 und stimmt ungefähr mit der Literatur überein, in der Werte von 6,1 publiziert sind (Horwitz et al., 1984). Dieser Wert unterschied sich somit deutlich von dem der abgetöteten *L. pneumophila*, deren Phagosomen normal reifen und einen pH von 3,84 erreichen. Dies liegt sogar noch unter dem Wert des Futterbakteriums *Klebsiella aerogenes* mit 5,13. Alle anderen Legionellen zeigen eine Ansäuerung ihres Kompartimentes. Zwei Stämme besitzen Werte unter 4,0 (*L. bozemanii* 3,64; *L. oakridgensis* 3,36), dabei handelt es sich aber nicht um diejenigen Stämme die am schnellsten degradiert werden. *L. anisa* (pH 4,19) und *L. hackeliae* (pH 4,06) werden von Dictyostelien am effektivsten verdaut



**Abb. 4.13**: Intraphagosomale pH-Werte verschiedener Legionellen sowie lebender und abgetöteter *L. p.* Corby. Zum Vergleich wurde weiterhin der pH eines Futterbakteriums bestimmt (*Klebsiella aerogenes*). Lebende *L. p.* Corby verhindern die Ansäuerung ihres Phagosoms, während alle anderen Stämme in einem saueren Kompartiment vorliegen.

und nehmen die nächst niedrigsten Werte an. Alle anderen Legionellen liegen zwischen pH 4,23 (*L. longbeachae*) und pH 4,51 (*L. lytica*), und zeigen also keine statistisch signifikanten Differenzen, obwohl sich Stämme wie LLAP 10 und *L. lytica* in *Dictyostelium* vermehren, während z. B. *L. erythra* degradiert wird.

#### 4.3.7 Einfluss von Bafilomycin auf die Infektion von Dictyostelium mit Legionella

Bafilomycin ist ein Inhibitor der vATPase und verhindert den Transport von H<sup>+</sup>-Ionen ins Innere einer Vakuole und damit deren Ansäuerung. Wie in Abb.4.8 gezeigt, kann *L. pneumophila* die Ansäuerung des Phagosoms verhindern, während dies bei *L. lytica* oder LLAP 10 nicht festgestellt werden konnte. In diesem Experiment sollte nun untersucht werden, ob durch den Einsatz von Bafilomycin und dem damit entstehenden höheren pH im Phagosom die Vermehrungsrate der Legionellen gesteigert werden kann. Dazu wurde ein Infektionsassay durchgeführt wie unter 3.9 beschrieben, die Zellen jedoch zusätzlich 30 min vor Infektionsbeginn mit 100 nM Bafilomycin vorinkubiert und dann in Anwesenheit von Bafilomycin für 96 h infiziert. Im folgenden Diagramm ist eine solche Infektionskinetik für *L. pneumophila* und LLAP 10 dargestellt. Wie ersichtlich, hat Bafilomycin bei keinem der beiden Stämme eine Auswirkung auf den Infektionsverlauf. Die Vermehrungsrate wird weder vermindert noch gesteigert. Dasselbe gilt für *L. lytica*. Die dazugehörigen Daten sind jedoch hier nicht abgebildet.



**Abb. 4.14** Infektionskinetik LLAP 10 und *L. p.* Corby infizierter Dictyostelien mit bzw. ohne den Inhibitor der vATPase Bafilomycin (100nM).

#### 4.3.8 Zusammenfassung

Mit unterschiedlichen Methoden sollten die an einer Legionella-Infektion beteiligten Wirtsfaktoren identifiziert werden. Dazu wurden zunächst mittels REMI-Mutagenese ungerichtete Wirtszellmutanten hergestellt und auf Infektionsresistenz getestet. Es gelang jedoch nicht, einen resistenten Dictyostelium-Klon zu isolieren. Die Analyse der spezifischen Deletions-Mutante des Aktin-bindenden Proteins Profilin ergab eine erhöhte Phagozytoserate und damit auch eine leicht gesteigerte intrazelluläre Replikation von L. lytica und L. pneumophila. Die Überexpression der katalytischen Untereinheit von Calcineurin führt dagegen zu einer verminderten intrazellulären Vermehrung dieser Legionellen-Spezies. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurde Kolokalisierung des lysosomalen Markers DdLIMP mit Legionella-haltigen Phagosomen untersucht. Dabei konnte eine deutliche Kolokalisierung von DdLIMP mit den sich nicht replizierenden L. hackeliae beobachtet werden, während L. pneumophila eine Fusion von Phagosomen und Lysosomen inhibiert. L. pneumophila Bakterien verhindern außerdem die Ansäuerung ihres Phagosoms. Die Bestimmung des intraphagosomalen pH-Wertes mittels FACS-Analyse ergab bei L. pneumophila einen durchschnittlichen pH von 6,3. Alle anderen Legionella-Spezies, auch diejenigen die sich wie L. pneumophila intrazellulär in Dictyostelium vermehren, liegen dagegen in einem sauren Kompartiment vor ebenso wie hitzeabgetötete L. pneumophila.

### 4.4 Isolierung Bakterien-haltiger Phagosomen aus D. discoideum

Als Bodenamöbe lebt *D. discoideum* von dem Bakterienbiofilm auf verfaulendem organischem Material. Die aufgenommenen Bakterien werden rasch abgebaut und unverdauliche Partikel exozytiert. Pathogene Bakterien wie *L. pneumophila* sind jedoch in der Lage, die sie umgebenden Phagosomen so zu verändern, dass sie nicht mehr länger Teil des endozytischen Systems sind und nicht mit Endosomen oder Lysosomen fusionieren können. Weitere Bakterien, wie z. B. *M. tuberculosis*, nutzen eine andere Strategie und halten die Reifung in einem frühen Stadium an. Die Analyse der Wirtsproteine in isolierten Phagosomen kann Aufschluss über Faktoren geben, die für diesen Prozess unerlässlich sind. Weiterhin scheint es lohnenswert, die Lipidzusammensetzung dieses Bakterien-spezifischen Kompartimentes zu untersuchen. Ziel dieses Projektes war die Etablierung einer Methode die es erlaubt, bakterienhaltige Phagosomen zu isolieren und die phagosomalen Proteine mittels 2D-Gelelektrophorese zu analysieren. Zu Beginn dieser Arbeit wurde ein Protokoll für die

Isolierung von Phagosomen aus Makrophagen übernommen (Lührmann und Haas, 2001). Es stellte sich jedoch bald heraus, dass dieses Protokoll für *Dictyostelium* nicht geeignet ist. Die Hauptprobleme, die sich durch das gesamte Projekt zogen und bei diesem Protokoll besonders stark zu Tage traten, waren mangelnde Ausbeute und Reinheit. Werden z. B. Makrophagen mit Bakterien infiziert, so ist nach einer Stunde mit einer MOI von 10 der Großteil der Zellen mehrfach infiziert. Bei *Dictyostelium* ist nach einer zweistündigen Infektion mit opsonisierten *L. pneumophila* mit maximal 20 % infizierten Zellen zu rechnen. Werden dagegen die gewöhnlichen Futterbakterien *K. aerogenes* verwendet, so liegt die Phagozytoserate wesentlich höher und bei der Verwendung von Latex-Beads haben nahezu alle Amöben mehrere Partikel internalisiert. Daher wurde zunächst versucht, mit Beads, an die Bakterien gekoppelt wurden, die Menge der phagozytierten Partikel in den Dictyostelien zu erhöhen. Davon erhoffte man sich auch eine höhere Ausbeute an den anschließend isolierten Phagosomen.

### 4.4.1 Isolierung von Bakterien-gelabelten Magnetbeadphagosomen

#### 4.4.1.1 Kopplung von Bakterien an verschiedene magnetische Beads

Aus der Literatur war bekannt, dass sich Yersinia pseudotuberculosis über polyklonale Antikörper an Protein G gelabelte paramagnetische Dynabeads (2,5 µm Durchmesser, Dynal, Hamburg) koppeln lässt und es möglich ist, diese Phagosomen magnetisch zu reinigen (Tsukano et al., 1999). Daher wurde zunächst diese Methode auf Dictyostelium und Legionella übertragen. Ein polyklonaler Antikörper von C. Lück (Uni Dresden) stand in großer Menge zur Verfügung. In Kontrollversuchen konnte eine schnelle Agglutination von Bakterien auf einem Objektträger sowie eine starke Immunfluoreszens bei Legionellen nach einer Antikörper-Behandlung beobachtet werden. Der Antikörper war also in der Lage, an die Antigene zu binden. Trotz allem war die Konjugation an die Dynabeads nicht sehr erfolgreich und bei jedem Waschschritt gingen weitere Bakterien verloren. Daher wurde nun versucht, die Bakterien zu biotinylieren und sie dann mit Streptavidin gelabelten Beads zu konjugieren. Die Bindung von Biotin an Streptavidin ist sehr stark und müsste daher zu einer besseren Kopplungsrate führen. Allerdings ließen sich hier die Bakterien nur in einem geringen Ausmaß biotinylieren und daher schwer an die Beads konjugieren. In einem Kontrollversuch mit dem Gram-positiven Bakterium Staphylococcus aureus lag die Rate sehr viel höher. Ca. 50 % aller Magnetbeads waren mit mehren S. aureus Bakterien gekoppelt, während die Rate bei L. pneumophila so gering war, dass eine Isolierung von Phagosomen damit nicht erfolgreich war. Als dritte Möglichkeit wurden tosylaktivierte Beads verwendet. Dabei handelt es sich um Polyurethan-beschichtete Beads deren aktivierte Oberfläche eine Bindung mit primären Amino- und Sulfhydrylgruppen eingeht. Die Bakterien werden deshalb sowohl durch hydrophobe Wechselwirkung an das Polyurethan als auch kovalent an die aktivierte Oberfläche gebunden. Mit den stark hydrophoben *L. pneumophila* wurden damit gute Ergebnisse erzielt; 41% der Beads waren mit 1-2 Bakterien konjugiert, 12% mit 3 und mehr Legionellen. Nur an 41% konnten keine konjugierten Bakterien beobachtet werden, während dies bei Verwendung von *Klebsiella aerogenes* 89% ausmachte. Tosylierte Beads schienen daher für eine magnetische Reinigung von *Legionella*-haltigen Phagosomen am besten geeignet.

#### 4.4.1.2 Magnetische Reinigung von Phagosomen

Für die Isolierung der Phagosomen wurden die Dictyostelien mit gelabelten Beads (MOI 1,5-3) infiziert und in Homogenisierungspuffer (HP) mit einem Douncer lysiert. Zunächst wurde versucht, die Phagosomen zu reinigen, indem das Homogenat auf 200 µl 30% Saccharose geschichtet wurde. Das Reaktionsgefäß wurde dann über einen Dynal-Permanentmagneten gehalten und die Phagosomen sollten nach unten gezogen werden, während alle anderen Organellen sowie das Zytoplasma auf dem Saccharosekissen liegen bleiben sollten. Diese Methode versagte, da das Homogenat auch nach dem Verdau der DNA mit Benzonase eine sehr zähe Konsistenz besitzt und die magnetische Kraft nicht ausreicht, um die Phagosomen auf den Boden des Reaktionsgefäßes zu ziehen. Eine Verringerung der Saccharosekonzentration auf bis zu 15% brachte ebenfalls keine Verbesserung. Daher wurde das Homogenat mit HP auf 6 ml Volumen aufgefüllt, in ein 15 ml Röhrchen überführt und das Röhrchen in den Dynalmagneten gestellt. Die Phagosomen reichern sich so an der Wand des Röhrchens an. Durch zwei weitere Waschschritte konnte die Reinheit der Phagosomen weiter erhöht werden. Die Phagosomen wurden dann für die Elektronenmikroskopie fixiert und analysiert. Dabei wurden Dynabeads mit einer intakten Membran beobachtet. Eng anliegende Membranen sind dabei ein Kennzeichen für Phagosomen, die noch nicht gereift sind und nicht mit Endosomen fusioniert haben. Weit abstehende phagosomale Membranen sind dagegen ein Indiz für vorhergehende Fusionsvorgänge (siehe Abbildung 4.16). Die Verunreinigung mit weiteren Organellen war tolerierbar. Problematisch war allerdings, dass auch ganze Zellen, die nicht lysiert waren, aber Beads internalisiert hatten, über den Magneten gereinigt wurden. Bei der Analyse phagosomaler Proteine über 2D Gelelektrophorese können diese Verunreinigungen große Probleme verursachen, da eine intakte Zelle wesentlich mehr zum Gesamtproteingehalt beiträgt als viele einzelne isolierte Phagosomen. Eventuelle Unterschiede im Proteinmuster zwischen pathogenen und apathogenen Bakterien werden somit überdeckt und sind nicht mehr länger detektierbar. Das Hauptproblem war jedoch nicht die mangelnde Reinheit der Präparation, sondern dass so gut wie nie Phagosomen entdeckt wurden, die Bakterien-gelabelte Beads enthielten. Ihr Anteil im Elektronenmikroskop entsprach keinesfalls den 53% mit Bakterien konjugierten Partikeln zu Beginn der Infektion, auch wenn man in Betracht zieht, dass die Bakterien eventuell nicht in der Schnittebene lagen. Daher wurden in einem Kontrollversuch GFP-markierte Legionellen an Dynabeads gekoppelt und der Prozentsatz an gelabelten Beads zu jedem Zeitpunkt des Versuches bestimmt. Infiziert wurde mit Dynabeads, die zu 47 % mit Bakterien beladen waren. Bei der ersten Kontrolle im Fluoreszenzmikroskop findet man zwei Stunden nach Infektionsbeginn in intakten Dictyostelium-Zellen solche Phagosomen mit Beads ohne Bakterien und solche Phagosomen mit Legionellen ohne Beads (siehe Abbildung 4.15). Phagosomen mit Bakterien-konjugierten Beads konnten jedoch nie beobachtet werden, allerdings ist dies in intakten Zellen relativ schwer zu detektieren. Die Phagosomen, die Legionellen ohne Beads beinhalten, sind aus Bakterien entstanden, die nach dem Labeling der Beads nicht vollständig weggewaschen wurden. Bei der mikroskopischen Kontrolle des Homogenats und der gereinigten Magnetfraktion konnten dann schließlich weniger als 3 % bzw. 2 % Bakterien-konjugierte Beads detektiert werden, wobei die Legionellen häufig nicht mehr fluoreszierten und somit auf tote Legionellen schließen lässt, in denen das GFP proteolytisch abgebaut wurde. Dies führte zu der Hypothese, dass Legionellen in dem durch die Beads vergrößerten Phagosom nicht in der Lage waren, dieses Kompartiment zu einer Legionella-spezifischen Replikationsvakuole umzugestalten und statt dessen eine normale Ansäuerung und Reifung des Phagosoms stattfindet, was dann den Abbau der Legionellen im Phagosom bewirkt.

Diese Hypothese wurde geprüft, indem Dictyostelien mit *Legionella*-Beads in Chamber Slides infiziert wurden. Nach einer Infektionszeit von 24 bis 96 h wurde Neutralrot ins Medium gegeben und die Zellen am konfokalen Mikroskop analysiert. Neutralrot ist ein membrangängiger Farbstoff, der in sauren Kompartimenten protoniert wird, dadurch die Membrangängigkeit verliert und die saure Vakuole rot fluoreszieren lässt. Es konnte beobachtet werden, dass alle Bead-haltigen Vakuolen rot gefärbt waren und somit eine Ansäuerung erfolgt war. Außerdem nahm mit der Zeit der Anteil an Dictyostelien, die Partikel internalisiert hatten ab, und gleichzeitig die Menge exozytierter, extrazellulärer Dynabeads zu, die nicht wieder erneut phagozytiert wurden. Zu Beginn der Infektion werden dagegen z. T. mehrere Beads sehr rasch von den Zellen aufgenommen. Eventuell liegt hier eine Art "Lernverhalten" der Dictyostelien vor, so dass unverdauliche Beads nicht erneut aufgenommen werden. Dies könnte durch eine Veränderung und Markierung der Partikeloberfläche während des intrazellulären Reifungsprozesses bewirkt werden.

Insgesamt wurden mindestens 5 x  $10^6$  infizierte Zellen am Fluoreszenzmikroskop analysiert, dabei konnte nur in ca. 30 Dictyostelien Replikationsvakuolen detektiert werden, in denen sowohl *L. pneumophila* Bakterien als auch ein magnetisches Bead vorlag (Abbildung 4.15). Dabei handelt es sich wahrscheinlich um die seltenen Fälle, bei denen mehr als 10 Bakterien an die Partikel gekoppelt waren und die ungünstige Größe des Phagosoms durch die hohe Anzahl an Bakterien ausgeglichen werden konnte. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine magnetische Reinigung von *Legionella*-haltigen Phagosomen nicht möglich war.



Abb. 4.15 Mikroskopische Aufnahmen infizierter Dictyostelien. Saure Vakuolen wurden mit Neutralrot eingefärbt, die Bakterien sind mit GFP markiert. In der linken Abbildungs-Hälfte ist der seltene Fall gezeigt, bei dem nach 48 h ein Phagosom aus magnetischen Beads und sich vermehrenden Legionellen vorliegt. In der rechten Abbildungshälfte sind dagegen Zellen nach 72 h gezeigt, die entweder nur Legionellen beinhalten (Pfeil von unten) oder Beads, die in sauren (Neutralrot-gefärbten) Vakuolen vorliegen (siehe Pfeil von oben). Außerdem sind viele extrazellulär vorliegende Dynabeads zu erkennen. Größenmarker ca. 2,8 µm.



Abb. 4.16: Elektronenmikroskopische Analyse der Infektion von *Dictyostelium* mit Bakterien-konjugierten, tosylierten Dynabeads sowie der nachfolgenden magnetischen Isolierung der Bead-haltigen Phagosomen. In A) ist eine intakte Zelle abgebildet. Im oberen Drittel der Zelle befindet sich ein Partikel-haltiges Phagosom, mit weit abstehender Membran. Eine Reifung dieses Phagosoms über den endozytischen Weg hat somit stattgefunden. Das zweite Phagosom dieser Zelle besitzt noch eine eng anliegende Membran. Die weitere Reifung steht somit noch aus. Außerdem erscheint der Durchmesser dieses Partikels größer. Dies liegt jedoch daran, dass das Kügelchen in einer anderen Ebene angeschnitten wurde. Weiterhin kann man bei dieser Zelle einen dritten Partikel entdecken, der gerade am linken unterer Bildrand der Abbildung A) phagozytiert wird. Im Teil B) ist ein Fusionsvorgang des Phagosoms mit einem endozytischen Vesikel abgebildet. Die Teile C) und D) zeigen magnetisch isolierte Phagosomen in einem frühen (C) und späten (D) Stadium des endozytischen Pathways. Größenmarker: A) und B) 1 $\mu$ m; C) und D) 0,5  $\mu$ m

# 4.4.2 Isolierung Bakterien-haltiger Phagosomen über diskontinuierliche Optiprepgradienten

#### 4.4.2.1 Bestimmung eines geeigneten Gradienten

In einem ersten Schritt wurde ein Gradient gesucht, der für die Auftrennung der verschiedenen Organellen geeignet war. Dafür wurden kontinuierliche Gradienten von 50-10%, 40-5% und 30-5% Optiprep hergestellt. Als Ladefraktion wurde der postnukleäre Überstand (PNS) verwendet, der zuvor in einem diskontinuierlichen Saccharosegradienten durch 15% Saccharose auf ein 65% Saccharosekissen zentrifugiert worden war. Lösliche Bestandteile des Zytoplasmas verbleiben dabei in der Ladefraktion und werden verworfen. Die membranhaltige Fraktion auf dem 65% Saccharosekissen wurde sorgfältig aufgenommen und auf ein Volumen von 4 ml und eine Dichte von 8,5% Saccharose eingestellt, der Optiprepgradient damit überschichtet, zentrifugiert und mittels Austropfen fraktioniert. Saure Phosphatase ist ein typisches lysosomales Enzym. Die Bestimmung der Aktivität in den verschieden Fraktionen gibt daher Auskunft über die Lage der Lysosomen im Gradienten, zeigt aber auch mit Lysosomen fusionierte Phagosomen an. Diese Auswertung ergab, dass in einem 50-10% Gradienten nur etwa über die Hälfte der verfügbaren Strecke eine Auftrennung der Organellen aus der Zellsuspension erfolgt (siehe Abb.4.17). Die Organellen sind dementsprechend in dem Gradienten eng benachbart und lassen sich beim Austropfen nicht vollständig voneinander trennen. Dieser Konzentrationsbereich ist daher also nicht geeignet. In einem 40-5% Gradienten ist der Peak der Enzymaktivität schon weiter auseinander gezogen, noch deutlicher ist dies aber im 30-5% Gradienten zu sehen. Die Auftrennung der Organellen erfolgt hier über mehr als <sup>2</sup>/<sub>3</sub> der Strecke, womit die Phagosomen z. B. von den Retikularkörperchen (kleine Vesikel, die bei der Lyse der Zellen aus dem zerfallenden ER entstehen) getrennt werden konnten. Die Phagosomen sammeln sich dabei mit den Lysosomen und Mitochondrien auf einer Höhe von ca. 17-20% Optiprep an und entsprechen einer Dichte von 1,112 bis 1,127 g/ml. Aus der Literatur sind in einem Saccharosegradienten Werte von 1,19-1,22 g/ml für Lysosomen und 1,17 -1,21 g/ml für Mitochondrien beschrieben. Sie stimmen damit nicht überein, aber es ist bekannt, dass sich die Werte für die spezifische Dichte in verschiedenen Gradienten unterscheiden können und somit ein Iodixanolgradient (Optiprep) nicht unbedingt mit einem Saccharosegradienten vergleichbar ist.



Abb. 4.17: Verlauf der sauren Phosphataseaktivität in Optiprepgradienten mit unterschiedlichen Konzentrationsbereichen. Die Aktivität der sauren Phosphatase zeigt die Lage der Lysosomen und Phagolysosomen im Gradienten an. Eine Auftrennung erfolgt in den höher konzentrierten Gradienten nur bis maximal Fraktion 20, während in 30-5% Optiprep eine längere Strecke zur Auftrennung der Organellen genutzt wird und somit die Organellen besser voneinander getrennt werden. Die Präparationen stammen aus LLAP 10 infizierten Dictyostelien.

Weiterhin wurden von jeder Fraktion die CFU-Werte bestimmt, um die Lage der Bakterien im Gradienten zu determinieren. Dabei konnte festgestellt werden, dass der Anstieg der CFU-Werte ungefähr mit dem der sauren Phosphataseaktivität beginnt, jedoch erst wenn dieser schon wieder abfällt ein Maximum in der Bakterienanzahl erreicht wird (Abb. 4.18). Bei *Klebsiella* infizierten Zellen ist dies deutlicher zu sehen als bei LLAP 10 infizierten Dictyostelien. Das bedeutet, dass extrazelluläre Bakterien nur in geringem Ausmaß mit denen, die von einer phagosomalen Membran umschlossen sind, im Gradienten kolokalisieren. Eine Kolokalisierung kann jedoch auch nicht ganz verhindert werden, wobei diese bei LLAP 10 im Vergleich zu *Klebsiella* vermehrt zu beobachten ist. Allgemein lässt sich sagen, dass die Ausbeute an Phagosomen relativ gering war. Zudem waren die Phagosomen-haltigen Fraktionen dieser Präparation mit vielen Lysosomen und einigen Mitochondrien kontaminiert. Aufgrund dieser Verunreinigungen war es nicht möglich, das phagosomale Protein mittels 2D-Gelelektrophorese zu analysieren. Daher wurde zunächst versucht, die Kontamination mit Lysosomen zu verringern.



Abb. 4.18 Verlauf der sauren Phosphataseaktivität und der Kolonienanzahl von *K. aerogenes* über die Fraktionen eines Optiprepgradienten.

# 4.4.2.2 Versuch der spezifischen Lyse der Lysosomen mit GPN (Strømhaug et al., 1998)

Von Strømhaug wurde eine Methode für die spezifische Lyse kontaminierender Lysosomen beschrieben, wodurch Autophagosomen aus Rattenhepatozyten in großer Reinheit gewonnen werden konnten (Strømhaug et al., 1998). Dazu wird dem PNS 0,05 mM (Endkonz.) des Peptids <u>Glycyl-L-Phenylalanin-β-Naphtylamid</u> (GPN) zugegeben. GPN ist ein Substrat für das lysosomale Enzym Cathepsin D. In isolierten Ratten-Lysosomen wird dieses Substrat umgesetzt und führt zur osmotischen Lyse dieser Organellen. In dieser Arbeit wurden daher in einem Vorversuch nicht infizierte AX2-Zellen homogenisiert, ein PNS hergestellt und dieser in 2 Aliqouts aufgeteilt. Ein Teil wurde für 7 min bei 37°C mit GPN behandelt, die Kontrollgruppe bleibt unbehandelt. Die Organellen wurden dann vorsichtig abzentrifugiert. Falls GPN in Dictyostelium Lysosomen dieselbe Wirkung besitzt wie in Hepatozyten, dann müsste sich im Überstand der behandelten Zellen eine höhere saure Phosphataseaktivität nachweisen lassen als in der Kontrollgruppe. Diese wiederum sollte im Pellet eine erhöhte Aktivität gegenüber den GPN behandelten Zellen aufweisen. Allerdings ließen sich keine unterschiedlich großen Enzymaktivitäten im Überstand oder im Pellet nachweisen, die Aktivität pro µg Protein im Pellet mit GPN war gegenüber der Kontrollgruppe (0,134) sogar leicht erhöht (0,193). Die Aktivität im Überstand war bei beiden Gruppen gering (0,019 mit GPN bzw. 0,017 ohne GPN). Diese Methode ist daher nicht geeignet, um die Lysosomen aus einer Präparation zu entfernen.

## 4.4.2.3 Magnetische Eliminierung von Lysosomen aus Homogenaten

Eine weitere Methode für die Eliminierung von Lysosomen, deren Anwendung in Dictyostelium beschrieben ist, stellt die magnetische Isolierung dar (Rodriguez-Paris et al., 1993). Dabei werden kolloidale Eisenpartikel hergestellt und an die Amöben verfüttert. Die Partikelgröße ist dabei so klein, dass sie nicht phagozytiert sondern endozytiert werden. Nach 30 min sind die Partikel über den endosomalen Weg in den Lysosomen angelangt, inkubiert man länger, so wird nach und nach das gesamte endozytische System mit Partikeln beladen. Nach Herstellung eines PNS wurden die Lysosomen über eine MiniMACS-Säule (Miltenyi Biotech) in einem Elektromagneten entfernt. Der Durchlauf wurde über einen Saccharoseund einen Optiprepgradienten gereinigt wie unter 4.4.2.1 beschrieben und die Fraktionen am EM analysiert. Die Anzahl der kontaminierenden Lysosomen war deutlich gesunken, dafür stellen nun die Mitochondrien die Hauptkontamination dar. Die Abbildung 4.19 zeigt die vom Magneten zurückgehaltene Fraktion. Bakterien-haltige Phagolysosomen wurden in der Magnetfraktion nicht beobachtet. Zum einen sind diese entweder schon vor der Zugabe der Eisenpartikel gereift und sind deshalb nicht magnetisch. Zum anderen sind die Eisenpartikel nach 20 bis 30 Minuten nur in den Lysosomen angereichert, aber noch nicht in den weiteren endozytischen Vesikeln zu finden.

Das Diagramm 4.20 zeigt eine erhöhte Enzymaktivität der sauren Phosphatase in der Magnetfraktion Vergleich zum Durchlauf. Dies bestätigt die EM-Analyse Es handelt sich hierbei also um eine gute Methode zur Elimination von kontaminierenden Lysosomen.



**Abb. 4.19:** Elektronenoptische Aufnahme der magnetischen Fraktion, die aus dem PNS gewonnen wurde. In den Lysosomen sind die Eisenpartikel zu erkennen (siehe Pfeile). Größenmarker ca. 0,5 µm



**Abb. 4.20:** Relative Phosphatase-Aktivität pro  $\mu$ g Protein in den jeweiligen Fraktionen von LLAP 10-, *KLebsiella-* und nicht infizierten Dictyostelien. Durch die Anreicherung von Lysosomen in der Magnetfraktion ist dort die Aktivität der sauren Phosphatase erhöht.

#### 4.4.2.4 Elimination kontaminierender Mitochondrien aus der phagosomalen Fraktion

Um die Trennung der Mitochondrien von den Phagosomen in einem Gradienten zu bewirken, kann man entweder deren Dichte erhöhen oder stark erniedrigen. Von Kawashima et al. wurde eine Methode beschrieben, in der mit CaCl<sub>2</sub> ein Anschwellen der Mitochondrien herbeigeführt wurde (Kawashima et al., 1998). Dadurch verringert sich deren spezifische Dichte und sie können somit von Lysosomen aus Rattennieren abgesondert werden. Für dieses Projekt war diese Methode allerdings nicht geeignet. Nach dem Waschen der Zellen in Homogenisierungspuffer ohne EGTA wurden sie im selben Puffer lysiert, ein PNS hergestellt und die Lysosomen magnetisch entfernt. Anschließend wurde 200 mM CaCl<sub>2</sub> bis zu einer Endkonzentration von 2 mM zugegeben und für 20 min bei 30°C inkubiert. Während dieser Zeit verklumpten die Organellen so stark, dass auch eine anschließende Zugabe von EGTA dies nicht mehr rückgängig machen konnte. Das Homogenat war somit über einen Optiprepgradienten nicht mehr aufzureinigen. Daher wurde versucht. mit Iodonitrotretrazoliumchlorid (INT) die Dichte der Mitochondrien zu erhöhen (Parish, 1975). INT ist ein Substrat für das mitochondriale Enzym Succinatdehydrogenase. Beim Umsetzen des INT entsteht ein Produkt (Formazan) das sich in die Membran einlagert und dadurch die Dichte der Organellen erhöht. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die entstehende Rotfärbung des Homogenats durch das Reaktions-produkt. Man kann folglich die Umsetzung optisch kontrollieren. Die Zellen für diese Art der Reinigung wurden in Puffer mit INT lysiert anschießend wie gewohnt weiterverarbeitet (siehe 4.4.2.1). und Beim ersten Zentrifugationsschritt ergaben sich allerdings Probleme, da die schwereren Mitochondrien nicht auf dem 65% Saccharosekissen zu liegen kamen und sich stattdessen ein Pellet am Röhrchenboden bildete. Daher wurde in allen folgenden Präparationen auf die Zentrifugation durch 15% Saccharose verzichtet und der PNS direkt auf den Optiprepgradienten aufgetragen. Leichte zytoplasmatische Verunreinigungen wurden dabei in Kauf genommen, allerdings müsste der Großteil der löslichen Bestandteile in der Ladefraktion verbleiben. Die Analyse am EM ergab, dass nur noch wenige Mitochondrien und Lysosomen die Präparation der Phagosomen verunreinigten, allerdings gab es noch Kontaminationen von weiteren nicht näher bekannten Vesikeln. Die EM-Analysen der verschiedenen Präparationsmethoden sind in der Abb. 4.21 zusammengefasst dargestellt.

Zum Vergleich des Proteingehalts in den Fraktionen einer Präparation mit und ohne INT wurden die Gradienten ausgetropft, das Volumen der einzelnen Fraktionen bestimmt und der Proteingehalt je Fraktion über der Summe des Volumens aufgetragen. Dabei ist Fraktion 1 diejenige mit der geringsten Dichte, aber dem Volumen, das am weitesten vom Röhrchenboden entfernt ist (ca. 12000µl). Der Vergleich einer Präparation mit und ohne INT zeigt, dass in den 4 ml Ladefraktion (12000-8000 µl) der Präparation ohne INT wesentlich mehr Protein vorhanden ist. Dies wurde auch erwartet, da hier die zytoplasmatischen Bestandteile nicht über einen Saccharosegradienten entfernt wurden, wie dies bei einer Reinigung von Phagosomen ohne INT der Fall ist. Am Ende der Ladefraktion nimmt in beiden Fällen die Proteinkonzentration ab und steigt dann ab ca. 5000 µl wieder an. Dabei ist der Gesamtproteingehalt mit INT größer als ohne INT, obwohl von derselben Proteinmenge im PNS ausgegangen wurde. Eventuell werden die instabilen Organellen während der Saccharosezentrifugation und besonders während der Verdünnung der Saccharose von 50% auf 8,5% z. T. lysiert, so dass die Ausbeute im nachfolgenden Optiprepgradienten geringer wird. Ohne INT tendiert die Proteinkonzentration unter 2000 µl Volumen gegen null, während mit INT auch in diesen Fraktionen mit höherer Dichte Proteine detektiert werden können. Dieser Shift ist auf die Mitochondrien zurückzuführen, deren Dichte durch die INT-Behandlung erhöht wurde (siehe Abb. 4.21).

Weiterhin wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen das mitochondriale Porin VDAC (voltage dependant anion channel) die Menge dieses Proteins in den verschiedenen Fraktionen mittels eines Western Blots überprüft (Abb. 4.22). Man erkennt deutlich den Anstieg der Proteinmenge bis zur Fraktion 26, in der der Maximalwert erreicht wird. In den nachfolgenden Fraktionen nimmt die Menge an VDAC gegenüber der Fraktion 26 wieder leicht ab, bleibt aber dennoch deutlich über dem Niveau der Fraktionen geringerer Dichte. Da die Phagosomen je nach Präparation vor allem in den Fraktionen 19 bis 23 vorgefunden werden, konnte somit eine gewisse Trennung von den Mitochondrien erzielt werden.



Abb. 4.21 EM-Analyse der verschiedenen Präparationsmethoden. In der linken Spalte sind LLAP 10-haltige Phagosomen dargestellt, in der rechten die von *K. aerogenes*. In A) sieht man eine Präparation, in der Lysosomen (siehe Pfeil) als Hauptverunreinigung vorkommen. In B) und C) ist eine Isolierung von Phagosomen nach magnetischer Entfernung der Lysosomen zu sehen. Die Hauptkontamination stellen nun die gekennzeichneten Mitochondrien dar. D) und E) zeigen Phagosomen nach Behandlung der Mitochondrien mit INT. Dabei kann man bei LLAP 10 sowohl ein gereiftes Phagosom (Dreieck) als auch eine mit Ribosomen besetzte *Legionella*-spezifische Replikationsvakuole (Pfeil) erkennen. Größenmarker: A, B, C: 0,5  $\mu$ m; D, E: 1 $\mu$ m



Abb. 4.22: Proteinmenge in den verschiedenen Fraktionen eines Optiprepgradienten mit und ohne INT-Behandlung des Homogenats von *K. aerogenes* infizierten Dictyostelien. Die Volumina der einzelnen Fraktionen wurden bestimmt und addiert. Dabei entspricht der Wert 0  $\mu$ l dem Röhrchenboden und der Fraktion mit der höchsten Dichte. 12000  $\mu$ l entsprechen dem oberen Ende des Gradienten und daher der Fraktion Nr.1 mit der geringsten Dichte. Zusätzlich sind die Fraktionsnummern angegeben. Die Verschiebung der Fraktionsnummern gegeneinander ist deutlich erkennbar.



Abb. 4.23 Nachweis des mitochondrialen Porins VDAC mittels Western-Blotting. Analysiert wurden die Fraktionen 21 bis 29 einer Phagosomenpräparation mit INT einer Infektion von Dictyostelien mit hitzeabgetöteten *L. p.* Corby. Mit dem monoklonalen Antikörper 70-100-01 (Verdünnung 1:3) wurde das VDAC detektiert. Man erkennt eine deutliche Zunahme der Mitochondrien ab Fraktion 26, während sich die Phagosomen in diesem Experiment in Fraktion 23 angereichert haben. Die Spuren wurden wie folgt aufgetragen: Spur 1: Marker Spur 4, Fraktion 23 Spur 7, Fraktion 26 Spur 10, Fraktion 29

Spur 2, Fraktion 21 Spur 3, Fraktion 22 Spur 5, Fraktion 24 Spur 6, Fraktion 25 Spur 7, Fraktion 26 Spur 8, Fraktion 27 Spur 9, Fraktion 28

#### 4.4.2.5 Analyse der Phagosomenpräparation mittels Enzymassays und Western Blotting

Die Analyse der Phagosomenpräparation hat das Ziel, Unterschiede zwischen gereiften Klebsiella-Phagosomen und nicht gereiften LLAP 10 Vakuolen, bzw. Phagosomen mit lebenden und toten L. pneumophila zu detektieren. Dazu wird zum einen die Aktivität der sauren Phosphatase bestimmt. Dieses Enzym ist spezifisch für späte Endosomen und Lysosomen. In Phagosomen, die mit Lysosomen fusionierten, müsste diese Aktivität folglich erhöht sein. Zum anderen werden definierte Proteinmengen in einem SDS-PAGE aufgetrennt und spezifische Marker des endozytischen Systems wie z. B. die vATPase, die die Ansäuerung der Vakuolen bewirkt oder das  $\alpha$ -common antigen, ein gemeinsames Epitop aller lysosomaler Proteine, mittels ECL auf einem Western Blot nachgewiesen. Dabei müssten sich unterschiedliche Mengen an Protein in unterschiedlichen Signalstärken auf einem Röntgenfilm niederschlagen. Mit beiden Methoden konnten allerdings weder im Vergleich von LLAP 10 mit Klebsiella Vakuolen, noch in der Gegenüberstellung von lebenden und toten L. pneumophila Phagosomen, Unterschiede detektiert werden (siehe Abbildungen 4.24 und 4.25). Den durch Lysosomen und gereifte Phagosomen verursachten Peak in der Enzymaktivität findet man bei ca. 4200 µl. Allerdings findet man die maximale Aktivität nicht wie erwartet bei K. aerogenes sondern bei LLAP 10. Die nicht infizierte Negativkontrolle besitzt dabei immer den geringsten Wert (Abb.4.24). Bei Phagosomen mit toten und lebenden L. pneumophila kann man ebenfalls keine erhöhte Aktivität bei den Phagosomen der toten Bakterien detektieren, die eine normale Reifung aufweisen. Um dieses Ergebnis mit einer weiteren Methode zu überprüfen wurden Western Blots durchgeführt. Dabei war die Signalstärke bei der vATPase und dem α-common-antigen über alle Fraktionen etwa gleich verteilt, vor allem konnte aber kein Unterschied zwischen Phagosomen mit lebenden und toten L. pneumophila detektiert werden (siehe Abb. 4.25). Bei Western Blotting Experimenten mit einem Antikörper gegen DdLIMP existierte ebenfalls kein Unterschied zwischen den Phagosomen mit lebenden und toten L. pneumophila, aber man konnte eine Zunahme dieses lysosomalen Markers ab Fraktion 24 feststellen (siehe Abb. 4.25). Dabei konnte als interne Kontrolle das ebenfalls mit diesem polyklonalen Antikörper kreuzreagierende p60 verwendet werden, dessen Signalstärke über die Fraktionen gleich verteilt ist (vergleiche Jansen et al. 1999). Es kann also davon ausgegangen werden, dass in allen Spuren des Geles dieselbe Proteinmenge aufgetragen wurde.

Für die mangelnden Unterschiede zwischen *Klebsiella*- und LLAP 10- haltigen Phagosomen sowie Phagosomen mit lebenden und toten *L. pneumophila* im Western Blot und in der sauren Phosphatase-Aktivität, besteht keine schlüssige Erklärung. Bei isolierten Phagosomen aus

Makrophagen konnten in ähnlichen Versuchen durchaus reproduzierbare Unterschiede detektiert werden (Lührmann und Haas, 2001). Trotz allem wurden die auf diese Weise präparierten Phagosomen einer 2D-Gelelektrophorese unterzogen. Mit dieser Methode war es durchaus möglich Unterschiede im Proteinmuster zwischen Phagosomen mit lebenden und toten *L. pneumophila* zu detektieren.



Abb. 4.24: Verteilung der sauren Phosphatase-Aktivität in einem Optiprepgradienten. Aufgetrennt wurden Zellsuspensionen von nicht infizierten (NK), LLAP 10- und *Klebsiella*-infizierten Dictyostelien. Bei ca. 4100  $\mu$ l ist der durch die Lysosomen verursachte Peak zu erkennen. Bakterien-haltige Phagosomen befinden sich im Gradienten ungefähr auf der Höhe der halben maximalen Aktivität der sauren Phosphatae. Insbesondere in dieser Region wurde eine erhöhte Aktivität von *Klebsiella*-haltigen Phagosomen gegenüber LLAP 10-haltigen Phagosomen erwartet.

### A) vATPase



Abb. 4.25: Western Blot einer Phagosomenpräparation mit lebenden und toten *L. p.* Corby. In A) wurde die 70 kDa Untereinheit der vATPase mit einem monoklonalen Antikörper detektiert (Verdünnung wie in B) und C) 1:10). Das Signal ist in etwa gleichmäßig über die Fraktionen verteilt. B) zeigt denselben Blot nach der Entwicklung mit Antikörpern gegen das  $\alpha$ -common-antigen. Im Teil C) wurde DdLIMP mit einem polyklonalen Antikörper detektiert. DdLIMP (88 kDa) ist ab Fraktion 24 in einer größeren Menge vorhanden, während das mit dem Antikörper kreuzreagierende p60 in allen Fraktionen dieselbe Signalstärke besitzt. Die Spuren wurden wie folgt aufgetragen:

Spur 1, Marker Spur 2, Fraktion 20, Corby lebend Spur 3, Fraktion 20, Corby tot Spur 4, Fraktion 21, Corby lebend Spur 5, Fraktion 21, Corby tot Spur 6, Fraktion 22, Corby lebend Spur 7, Fraktion 22, Corby tot Spur 8, Fraktion 23, Corby lebend Spur 9, Fraktion 23, Corby tot Spur 10, Marker Spur 11, Fraktion 24, Corby lebend Spur 12, Fraktion 24, Corby tot Spur 13, Fraktion 25, Corby lebend Spur 14, Fraktion 26, Corby tot Spur 15, Fraktion 26, Corby lebend Spur 16, Fraktion 26, Corby tot Spur 17, Fraktion 27, Corby lebend Spur 18, Fraktion 27, Corby tot

#### 4.4.2.6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal Bakterien-haltige Phagosomen aus *Dictyostelium* isoliert. Die Reinigung von Bakterien-konjugierten, paramagnetischen Beads ist dabei für die Isolierung von Phagosomen nicht geeignet, da diese Phagosomen entlang des endozytischen Weges reifen und die Bakterien somit verdaut werden. Deshalb erfolgte die Isolierung der Phagosomen über eine kontinuierliche Dichtegradienten-Zentrifugation. Verunreinigt wurden die Präparationen zunächst hauptsächlich durch Lysosomen und Mitochondrien. Die Lysosomen wurden daher mit Eisenpartikeln beladen und magnetisch entfernt. Bei den Mitochondrien wurden durch die spezifische Dichte durch die enzymatische Umsetzung des Substrates INT erhöht und auf diese Weise von den Phagosomen im Gradienten separiert. Allerdings ergab werden die Messung lysosomaler Enzymaktivitäten noch die Analyse lysosomaler Protein mittels Western-Blotting-Experimenten eine Unterschied zwischen gereiften und ungereiften Phagosomen.

## 4.4.3 Analyse von Phagosomenpräparationen mittels 2D-Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Gelelektrophorese erlaubt die Auftrennung von komplexen Proteingemischen. Mit einer Silberfärbung solcher Gele lassen sich noch kleinste Proteinmengen nachweisen. Da es möglich ist, aus solchen Gelen gefärbte Protein-Spots auszuschneiden und mit Hilfe der Massenspektrometrie zu identifizieren, stellt die Analyse des phagosomalen Proteoms eine geeignete Methode dar, um bisher unbekannte Wirtsfaktoren im Legionella-spezifischen Phagosom zu charakterisieren. Die Phagosomen wurden mit Hilfe einer Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert (siehe 4.4.2). Allerdings konnten die Bakterien-haltigen Phagosomen nicht einer bestimmten, konstanten Fraktionsnummer zugeordnet werden, da durch das Ernten des Gradienten mittels Austropfen immer unterschiedlich viele Fraktionen entstanden. Für die 2D-Gelelektrophorese wurden daher immer diejenigen Fraktionen verwendet, die ungefähr die halbe maximale Aktivität der sauren Phosphatase aufweisen. Aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen war bekannt, dass diese Fraktionen reich an Phagosomen sind. In der 2D-Gelelektrophorese konnten mit diesen Fraktionen gut reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden, obwohl sich die tatsächlichen Fraktionsnummern z. T. stark unterschieden (Fraktion 17-23). Vor der Analyse des phagosomalen Proteoms wurden die Bakterien mittels einer Triton-Behandlung entfernt.

Für die erste Dimension der 2D-Gelelektrophorese können verschiedene pH-Gradienten gewählt werden, um eine optimale Auftrennung der Proteine zu erzielen. Zu Beginn wurde ein Gradient von pH 3-10 verwendet, um ein möglichst breites pH-Spektrum zu analysieren. Der Nachteil dieser Streifen besteht allerdings darin, dass für eine Silberfärbung maximal 30  $\mu$ g Protein aufgetragen werden können. Außerdem konnte festgestellt werden, dass sich die Proteine im mittleren pH-Bereich anreichern. Die Auftrennung der Proteine ist demzufolge nicht optimal, da nur ein geringer Anteil dieses Gradienten dem pI-Wert der Proteine entspricht. Daher wurde in allen weiteren Versuchen ein Gradient von pH 4-7 verwendet. Hier ist es dann möglich, bis zu 60  $\mu$ g Protein aufzutrennen. Trotz allem konnten in einem Gradienten von pH 3-10 mit nur 15  $\mu$ g aufgetragenem Protein aus einer Phagosomen-präparation ca. 25-30 Spots detektiert werden (Abb.4.25). Drei dieser Proteine (Pfeilnummer 1-3) waren in Phagosomen mit toten *L. pneumophila* stärker exprimiert. Ein weiterer Spot besitzt dieselbe molekulare Masse, ist allerdings in Phagosomen mit lebenden *L. pneumophila* weiter in den sauren Bereich verschoben (Spot Nr.4). Es könnte sich folglich um die



**Abb. 4.26:** Ausschnitt eines silbergefärbten 2D-Geles mit einem Gradienten von pH 3-10. Der Ausschnitt zeigt den Bereich von pH 5 bis 6,5. In der linken Hälfte sind Proteine aus Phagosomen mit toten *L. p.* Corby aufgetrennt. Dabei erkennt man bei Spot 1-3 eine stärkere Expression als bei den Phagosomen mit lebenden Legionellen (rechte Hälfte) sowie einen mit schwächerer Signalstärke (Nr. 5). Protein Nr. 4 scheint bei lebenden *Legionella*-Phagosomen modifiziert zu werden, da die Lage in den sauren Bereich verschoben ist. Insgesamt wurden 15 µg Protein je Gel verwendet.

Modifikation eines Proteins während der Infektion handeln (z. B. Phosphorylierung). Spot Nr. 5 ist schließlich in Phagosomen mit lebenden Legionellen stärker exprimiert. Allerdings findet sich bei diesem pH-Gradienten mit einer so geringen Proteinmenge noch kein Proteinspot, der ausschließlich bei lebenden, nicht aber bei toten Legionellen vorhanden ist. Diese Proteine sind von besonderem Interesse, da es sich dabei um von den Legionellen rekrutierte Wirtsfaktoren handeln könnte.

Um eine bessere Auflösung zu erhalten wurden in allen weiteren Versuchen Streifen mit einem immobilisierten pH Gradienten von 4 bis 7 verwendet und zwischen 30 und 60 µg Protein aufgetragen. Dabei konnten 4 Spots detektiert werden, die sich in zwei Versuchen reproduzierbar zwischen Präparationen mit lebenden und toten Legionellen voneinander unterschieden, ein weiterer konnte im Gel mit der höheren Proteinmenge gefunden werden. Dabei waren 4 Spots vorhanden, die in Phagosomen mit toten Legionellen stärker vorhanden waren (Abb. 4.27). Dabei handelt es sich wahrscheinlich um Proteine, die für den Reifungsprozess charakteristisch sind. Allerdings konnte in dieser 2D-Analyse ein Spot gefunden werden, der charakteristisch für Phagosomen mit lebenden Legionellen ist. Eventuell handelt es sich dabei um einen rekrutierten Wirtsfaktor, der für die Umgestaltung des Phagosoms in eine *Legionella*-spezifische Replikationsvakuole von Bedeutung ist. Das Ergebnis ist in Abb. 4.27 dargestellt.

## 4.4.3.1 Zusammenfassung

Das Proteom der isolierten *Legionella*-haltigen Phagosomen wurde mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese analysiert. Dabei war die Auflösung der Proteine in Gelen mit einem pH-Bereich von 3-10 mangelhaft. Darum erfolgte in weiteren Versuchen die Auftrennung in einem Bereich von pH 4-7. Nach Silberfärbung der Gele konnten Unterschiede im Proteom der Phagosomen mit toten bzw. lebenden *L. pneumophila* detektiert werden. Dabei wurden 4 Spots beobachtet, die in Phagosomen, die tote *L. pneumophila* Bakterien beinhalteten, stärker exprimiert waren. Ein Spot war spezifisch für Phagosomen, die lebende Legionellen enthielten.



**Abb. 4.27** Silbergefärbtes 2D-Gel mit einem pH-Bereich von 4 bis 7. Es wurden 60  $\mu$ g Protein aus einer Präparation mit lebenden *L. p.* Corby aufgetragen. Dabei sind die Proteine 1 bis 4 in Phagosomen mit toten Legionellen in stärkerem Ausmaß vorhanden als in diesem Gel. Dagegen tritt das Protein Nr. 1 ausschließlich bei Vakuolen mit lebenden *L. p.* Corby auf.