

## I. Zusammenfassung

*Legionella pneumophila*, der Erreger der Legionärskrankheit, ist ein Umweltkeim mit Verbreitung in aquatischen Habitaten. Die Keime sind in der Lage, sich intrazellulär in eukaryontischen Zellen, wie Makrophagen, Monozyten und Protozoen zu vermehren. Die erfolgreiche Besiedlung ökologischer Nischen, aber auch das Virulenzpotential des Keimes können dabei von Umweltfaktoren abhängen. Die Erforschung ökologischer Zusammenhänge kann daher für das Verständnis der bakteriellen Virulenz von großer Bedeutung sein.

Ausgangspunkt dieser Arbeit ist die in der späten stationären Phase des Bakterienwachstums von *L. pneumophila* zu beobachtende intensive Pigmentierung des Kulturmediums. Für diesen Phänotyp ist das Legiolysin (Lly) verantwortlich. Es ist eines der wenigen bekannten Genprodukte von *L. pneumophila*, die einen Einfluß auf das Überleben des Keimes in der Umwelt haben. Legiolysin kann daher als Fitnessfaktor bezeichnet werden.

Um die ökologischen Zusammenhänge der Pigmentgenerierung näher zu untersuchen, wurde das *lly*-positive Plasmid pEWL 1 subkloniert und sequenziert. Neben *lly* konnten in diesem Genabschnitt durch Sequenzvergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenzen sechs weitere Leseraster detektiert werden. Die drei unmittelbar benachbarten Gene von *lly* kodieren dabei für Proteine mit Funktionalität in Bezug zur *lly*-Determinante, während die drei upstream von *lly* liegenden Leseraster Homologien zu Proteinen aufweisen, die an Transportprozessen beteiligt sind.

Die Länge des RNA-Transkripts von *lly* konnte im Northern-Blot mit ungefähr 1,8 kb bestimmt werden und läßt damit auf die gemeinsame Transkription des *lly*-Gens mit dem unmittelbar upstream liegenden Leseraster schließen.

Durch Sequenzanalysen konnte aufgezeigt werden, daß das für diesen Phänotyp verantwortliche Legiolysin-Gen für eine *p*-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (HPPD) kodiert. Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung von *p*-Hydroxyphenylpyruvat zu Homogentisat (HGA).

In Zusammenarbeit mit Prof. P. Proksch (Pharmazeutische Biologie, Würzburg) konnte im Vergleich zu *lly*-negativen *L. pneumophila*- und rekombinanten *E. coli*-Stämmen in den Kulturüberständen von *lly*-positiven Stämmen auf Basis einer Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) HGA nachgewiesen werden. Es konnte somit gezeigt werden, daß das Legiolysin-Gen für ein Protein mit HPPD- Aktivität kodiert, und in die Degradation der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin involviert ist.

Des Weiteren wurden chromosomale Integrationsmutationen der aus *L. pneumophila* stammenden Gene *lly* und *mip* ("macrophage infectivity potentiator") in *E. coli* K-12 Stämmen erstellt. Diese wurden nachfolgend in ökologisch ausgerichteten Langzeitstudien eingesetzt. Die chromosomale Integration von *lly* erfolgte als ortsspezifische Rekombination in die  $\lambda$  att - site von *E. coli* WM 2269. Die Integration von *mip* erfolgte in die *fim*-Region des *E. coli* K-12-Stammes AAEC 160.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit befaßt sich mit ökologischen Studien zur Persistenz von *L. pneumophila* in der Umwelt.

Durch die Bestrahlung mit Licht über einen Verlauf von sieben Tagen konnte gezeigt werden, daß die Expressierung von *lly* zu einer Persistenz unter Lichtstreß führt. Dieser Lichtschutz könnte in der Umwelt, aber auch bei der Sanierung von Wasserleitungssystemen mittels UV-Licht Relevanz aufweisen.

Die Assoziation von *L. pneumophila* JR32 und JR32-1 (*lly*-negativ) mit dem Cyanobakterium *Fischerella* wurde in Mikrokosmen über einen Verlauf von sieben Tagen beobachtet. Dabei konnte gezeigt werden, daß *Legionella* in Assoziation mit *Fischerella* bzw. in dessen Überstand zu persistieren vermag, während dies den Bakterien in frischem *Fischerella*-Medium nicht möglich war. Wie die Coinkubation der Fischerellen mit *L. pneumophila* JR32-1 zeigte, spielt die Expression von *lly* dabei keine Rolle. Ein Wachstum der Bakterienkulturen konnte weder im *Fischerella*-Überstand, noch in *Fischerella*-Medium beobachtet werden. Durch Rasterelektronenmikroskopie konnte der adhäsive Charakter der Assoziation von *L. pneumophila* zu *Fischerella* dokumentiert werden.

Durch Persistenzstudien von *L. pneumophila* und *E. coli* in Boden wurde die Überlebensfähigkeit der Mikroorganismen in suboptimaler Umgebung getestet. Für *Legionella* ist eine rapide Abnahme der Zellzahl schon nach kurzer Zeit zu detektieren. Nach sechs Tagen konnten keine Zellen mehr kultiviert werden. Die Defizienz der Pathogenitäts- und Umweltfaktoren *Mip*, *Fla* (Flagellin) und *Lly* hatte dabei keinen Einfluß auf die Persistenz der Bakterien im Boden. Zudem sind die zuvor generierten rekombinanten *E. coli*-Klone AAEC 160-1 und WM 2269-1 mit genomischer *mip*- bzw. *lly*-Integration eingesetzt worden. Innerhalb von vier Wochen konnte für diese Stämme eine kontinuierliche Reduktion der Zellzahlen

beobachtet werden. Somit erwies sich keiner der Organismen als erfolgreicher Besiedler der Bodenprobe.

Die Studien zum Verlust der Kultivierbarkeit von *L. pneumophila* und *E. coli* erfolgten in autoklaviertem Leitungswasser bzw. PBS und zwei unterschiedlich behandelten Varianten von Mainwasser. Neben sterilfiltriertem Mainwasser fand die Inokulierung der Organismen auch in einem Ansatz mit autoklaviertem Mainwasser statt. Es konnte gezeigt werden, daß *L. pneumophila* in Leitungswasser und Mainwasser außerordentlich gut zu persistieren vermochte. Zudem konnte dokumentiert werden, daß auch *E. coli* DH5 $\alpha$  in ein lebensfähiges, aber nicht mehr kultivierbares Ruhestadium (viable but nonculturable, VBNC) eintreten kann. Parallel zur Ermittlung der CFU-Werte wurden während des Verlaufs der Experimente die Lebendzellzahlen durch Fluoreszenzfärbungen bestimmt. Der Übergang von *L. pneumophila* in das VBNC-Ruhestadium wurde zudem durch *in situ* - Hybridisierungen mit fluoreszenzmarkierten 16 S rRNA-Oligonukleotidsonden dokumentiert. Im Naturhaushalt spielt dieser Übergang zu VBNC-Stadien bei Umweltbakterien zur Überwindung ungünstiger Phasen eine große Rolle. Schließlich erfolgten Experimente zur Reaktivierung der VBNC-Ruhestadien. Diese Reaktivierung ist abhängig von speziesspezifischen Triggern und kann bei *L. pneumophila* durch Coinkubation mit *Acanthamoeba castellanii* erfolgen.