

## II. Einleitung

### 1. *Legionella pneumophila*

Während der Jahrestagung der "American Legion Convention" in Philadelphia im Jahr 1976 erkrankten 182 Personen an einer atypisch verlaufenden Pneumonie. In 29 Fällen endete die Infektion lethal. Der kurze Zeit später aus dem Lungengewebe infizierter Personen isolierte pathogene Keim wurde als *Legionella pneumophila* bezeichnet (McDade, 1977). Verbreitung im natürlichen Habitat finden die Bakterien vornehmlich in stehenden oder fließenden aquatischen Biotopen (Fliermans et al., 1981). Als Infektionsquelle für den Menschen kommen primär kontaminierte Warmwasseranlagen mit einem Temperaturspektrum von 16 bis 50 °C in Betracht (Barbaree et al., 1986). Die in Kühltürmen, Klimaanlage und Duschen entstehenden Aerosole können die Keime durch Inhalation auf den Menschen übertragen (Garbe et al., 1985; Breiman et al., 1990). Die intrazelluläre Vermehrung des Keimes in den Alveolarmakrophagen der Lunge (Winn, 1988) hat eine schwere Pneumonie zur Folge, die man als Legionärskrankheit oder auch Legionellose bezeichnet hat.

#### 1.1 Biologie der Legionellen

Die Einteilung der bisher bekannten *Legionella*-Arten erfolgte in die Familie der Legionellaceae. Die phänotypisch begründete Gattung *Legionella* umfaßt zur Zeit 42 Spezies, von denen 19 als humanpathogen eingestuft werden. Dabei kommt *L. pneumophila* als Infektionserreger besondere Bedeutung zu (Lück et al., 1990).

*Legionella pneumophila* ist ein fakultativ intrazelluläres, gram-negatives, strikt aerobes, polar monotrich begeißeltes Stäbchen von 2 µm Länge und einem Durchmesser von 0,5 µm. Unbegeißelte Formen kommen vor. Sporenbildung, Kapseln und S-Layer sind nicht vorhanden (Ott et al., 1991; Winn, 1988). Ein filamentöses Wachstum ist möglich.

Legionellen zeigen sich mit Ausnahme von *L. micdadei in vivo* als nicht säurefest. Der GC-Gehalt der bakteriellen DNA liegt zwischen 35 und 52 %.

Als Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle dienen primär Aminosäuren (Geroge et al., 1980; Tesh et al., 1981, 1983). Kohlenhydrate werden nur in sehr geringem Maße als C-Quelle verwendet (Weiss et al. 1980). Der Nachweis von Peroxidase und Katalase ist bei allen Arten möglich. Zudem sind Legionellen in der Lage, eine Superoxiddismutase zu bilden (Galeazzi,

1990; Steinman, 1992). Die Befähigung zur Synthese penicillinspaltender  $\beta$ -Lactamasen ist bei fast allen Spezies zu finden (Ehret, 1989; Emmerling, 1980).

Die Mechanismen zur Eisen-Assimilierung sind nicht exakt aufgeklärt. *L. pneumophila* ist durch ein essentielles Nährstoffbedürfnis für L-Cystein und lösliche Eisensalze gekennzeichnet (Liles und Cianciotto, 1996; Reeves et al., 1983). Die Existenz einer Eisen- und Fur-Regulation mit Homologien zu Aerobactin-Synthetasen aus *Escherichia coli* läßt auf ein entsprechendes Siderophorensystem schließen (Hickey und Cianciotto, 1997). Viele, für das intrazelluläre Wachstum essentielle Gene werden durch die Menge an vorhandenem Eisen reguliert. Zudem scheint das Makrophagen-Phagosom nur eine niedrige Eisenkonzentration aufzuweisen, da Eisen- und Fur-regulierte Mutanten nicht mehr in der Lage sind, makrophagenähnliche Zellen zu infizieren (Hickey und Cianciotto, 1995; Pope et al., 1996). Möglicherweise erfolgt die Eisenaufnahme aber auch durch Überführung von dreiwertigem Eisen in die lösliche, zweiwertige Form über eine Eisenreduktase (Johnson et al., 1991). Zudem sind Legionellen in der Lage, Hemin als Eisenquelle zu nutzen (O'Connell et al., 1996).

Unter Laborbedingungen erfolgt die Anzucht der sonst intrazellulär in Protozoen parasitierenden Keime durch Supplementation der Nährmedien mit entsprechenden Wachstumsfaktoren (Winn, 1988). Es hat sich der üblicherweise auf pH 6,9 gepufferte BCYE-Agar unter Zusatz von L-Cystein, Eisenpyrophosphat,  $\alpha$ -Ketoglutarat und Antibiotika zur Repression unerwünschter Begleitflora etabliert. Bei 37 °C und 90% Luftfeuchtigkeit unter ständiger 5% CO<sub>2</sub>-Begasung erfordert die Kultivierung etwa drei Tage. Ein Zusatz von Aktivkohle zum Nährmedium dient der Eliminierung freier Sauerstoffradikale. Die Toleranz von *Legionella* gegenüber Wasserstoffperoxid liegt mit  $7,5 \times 10^4$  M um 10- bis 100-fach niedriger als bei *E. coli*. Des weiteren ist eine hohe Sensibilität gegen Halogene festzustellen (Tartakovski et al., 1989).

## 1.2. Überlebensstrategien von *L. pneumophila* in der Umwelt

*Legionella pneumophila* findet als Umweltkeim im aquatischen Habitat ubiquitäre Verbreitung. In Kaltwassersystemen, Flüssen und Seen ist seine Konzentration mit 1-10 Keimen / l recht niedrig (Lück et al., 1990), kann sich bei Erwärmung des Wassers aber auf Keimzahlen von  $10^2$  bis  $10^6$  Zellen / l anreichern. Selbst bei einer Temperatur von 42 °C ist noch eine Vermehrung der Bakterien möglich (Winn, 1988).

Im natürlichen Habitat sind Legionellen aufgrund ihrer hohen Nährstoffansprüche vorwiegend in Assoziation mit Protozoen oder weiterer Mikrofauna anzutreffen. Dazu gehören *Chlorella* sp., *Gleocystis* sp., Cyanobakterien (*Fischerella* sp.), sowie die Amöben *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Hartmanella*, *Vahlkampfia*, *Tetrahymena* und *Echinamoeba* (Lee und West, 1991; Fields, 1993). Die benötigten Wachstumsfaktoren werden von diesen Wirten bereitgestellt (Tison et al., 1980; Pope et al., 1982; Rowbotham, 1986; Steinert, 1991). Es sind bisher 13 Amöben- und 2 Ciliatenarten beschrieben, innerhalb derer *L. pneumophila* zu replizieren vermag (Fields, 1996). Andere Legionellenarten zeigen jedoch ein eingeschränktes Wirtsspektrum. So akzeptiert die apathogene Spezies *L. anisa* nur *Hartmanella* als Wirt, nicht jedoch *Echinamoeba*, *Naegleria* oder *Tetrahymena* (Fields, 1990). Die erhöhte Resistenz gegen Chlor ist mit einem Toleranzniveau von 50 mg/l Wasser bei Assoziation mit *Acanthamoeba castellanii* durch Enzystierung des Wirts zu erklären. Innerhalb der Zysten ist dabei ein Überleben des Keimes möglich (Lee und West, 1991).

Suboptimale Lebensbedingungen mit stark variierenden Nährstoffkonzentrationen und Temperaturschwankungen stellen für Umweltbakterien den Regelfall dar. Die nachhaltige Besiedlung des meist nährstoffarmen Milieus (z. B. Trinkwasser) durch Legionellen wird durch entsprechende Überlebensstrategien moduliert. Wie für viele andere gram-negative nichtsporulierende Bakterien wurde auch bei *L. pneumophila* eine lebensfähige, aber auf normalen Nährmedien nicht kultivierbare Lebensform (viable but nonculturable; VBNC) beobachtet (Hussong et al., 1987; Paszko-Kolva et al., 1993). Trotz vieler morphologischer und physiologischer Veränderungen bleiben Bakterien in diesem Ruhestadium über Monate metabolisch aktiv, wenngleich auf niedrigem Niveau.

## 1.3. Intrazelluläre Vermehrung in Protozoen

Durch Ultrastrukturanalysen konnte gezeigt werden, daß der Lebenszyklus von *L. pneumophila* innerhalb von humanen phagozytierenden Zellen und in Protozoen sehr ähnlich ist (Abu Kwaik, 1996; Gao et al., 1997; Harb et al., 1998). Bindung und Aufnahme erfolgen

jedoch bei Makrophagen und Protozoen durch verschiedene molekulare Mechanismen (Gao et al., 1998). Im Gegensatz zur Internalisierung der Keime in Makrophagen ist diese nicht durch Cytochalasin D hemmbar, und somit unabhängig vom Mikrofilament- und Mikrotubulisystem (King et al., 1991). Der initiale Kontakt zwischen intrazellulärem Pathogen und der protozoischen Wirtszelle erfolgt u. a. über CAP ("competence- and adherence-associated pili"), einem Typ IV Pilus (Stone und Abu Kwaik, 1998). Die geringe Neigung zur Adhärenz an *A. castellanii* konnte elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden (Steinert et al., 1994). Hingegen wird die Aufnahme von *L. pneumophila* in *Hartmanella vermiformis* durch Methylamin, einem Inhibitor der adsorptiven Pinocytose, gehemmt. Die Annahme einer Rezeptor-vermittelten Aufnahme in *H. vermiformis* konnte für *L. pneumophila* durch Entdeckung eines Galaktose/N-Acetylgalaktosamin- (Gal/GalNAc-) inhibierbaren Lektins verifiziert werden (Venkataraman et al., 1997). Bei *Acanthamoeba polyphaga* dient dieser Rezeptor jedoch nicht der Internalisierung, wie entsprechende Studien zur Hemmung durch Galaktose oder N-Acetylglukosamin gezeigt haben (Harb et al., 1998). Das Lektin weist Homologien zu einem 170 kD Protein aus *Echinamoeba histolytica*, wie auch zu humanen CR1- und  $\beta$ -Integrinen auf. Integrine sind heterodimere Protein-Tyrosinkinase-Rezeptoren, die nach der Liganden-Bindung einer Tyrosin-Phosphorylierung unterliegen und damit in die Rekrutierung und das Rearrangement des Wirts-Zytoskeletts involviert sind (Abu Kwaik et al., 1998). Die Bindung von *L. pneumophila* an Gal/GalNAc dient bei *H. vermiformis* als Trigger in der Signaltransduktion und führt zu massiver Tyrosin-Dephosphorylierung des Lektin-Rezeptors, wie auch anderer Proteine (Venkataraman et al., 1997). Die Rezeptor-vermittelte Aufnahme von *L. pneumophila* in *H. vermiformis* ist von der spezifischen Induktion der protozoischen Wirts-Proteinsynthese abhängig. Hemmt man die Proteinsynthese der Amöbe durch Zugabe von Cycloheximid, so werden die Legionellen nicht mehr aufgenommen (Kwaik et al., 1994).

Ähnlich wie in Makrophagen, kann die Aufnahme von *L. pneumophila* auch bei *A. castellanii* durch sog. "coiling phagocytosis" erfolgen (Bouze and Johnson, 1996). Kurz nach der Aufnahme befinden sich die Parasiten in Vakuolen, die meist von glatten und mit Ribosomen besetzten Vesikeln umgeben sind. Die Ansäuerung und Reifung des Phagosoms zum Phagolysosom wird im weiteren Verlauf der Infektion unterbunden. In den Vakuolen sind die Bakterien somit vor der Aktivität lysosomaler Enzyme geschützt (Fields, 1993). In dieser Hinsicht nutzen Legionellen die gleiche Strategie des intrazellulären Überlebens, wie *Chlamydia psittacii*, *Mycobacterium tuberculosis* oder *Salmonella typhimurium* (Hodinka

und Wyrick, 1986; Clemens, 1996). Im Laufe der Infektion füllt sich die gesamte Protozoenzelle mit einer *Legionella*-haltigen Vakuole. Am Ende des Infektionszyklus werden die Bakterien motil und gelangen mit dem Aufreißen der Wirtszelle ins Freie (Rowbotham, 1986).

#### **1.4. Infektion des Menschen durch *Legionella***

Man bezeichnet die durch die Gattung *Legionella* hervorgerufene schwere Erkrankung des Respirationstraktes als Legionellose oder Legionärskrankheit. Im Durchschnitt liegt die Häufigkeit einer Legionellose bei 10 bis 15% aller Pneumonien. Sie gehört damit zur zweit- bis dritthäufigsten Ursache einer Lungenentzündung (Günther, 1980; Marre, 1987; Gattermann, 1989). *L. pneumophila* Sg1 ist zu 85% auslösendes Agens einer Legionellose, in 6% aller Fälle verursacht *L. micdadei* die Krankheit (Winn, 1988). Als typische Symptome lassen sich Fieber ( $> 40^{\circ}\text{C}$ ), nicht produktiver Husten, Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen nennen. Eine fortschreitende konfluierende Pneumonie kann ganze Lungenlappen erfassen und läßt sich radiologisch nachweisen.

Nosokomiale und ambulante Infektionen mit Legionellen erfolgen durch Einatmen keimhaltiger Aerosole. Darüber hinaus kann eine Pneumonie durch die Inhalation von keimhaltigen Vesikeln ausgelöst werden, die durch Amöben freigesetzt wurden. Die Vesikelbildung findet kurz vor dem Übergang des amöboiden Trophozoiten- zum Zystenstadium verstärkt statt. Innerhalb der myelinartigen Membran des Vesikels können bis zu 200 Legionellen eingeschlossen sein, die durch diese Abschnürung gegen Umwelteinflüsse gut geschützt sind (Berk et al., 1998). Der Krankheitsverlauf nach Inhalation mit *L. pneumophila* infizierter Hartmannellen gestaltet sich dabei ungleich schwerer, als nach dem Einatmen des freien Keimes. Möglicherweise bietet der Amöbenwirt einen verbesserten Schutz gegen das Immunsystem oder führt zu einer Adaptation an die intrazelluläre Lebensweise der Legionellen (Brieland et al., 1997).

Als Infektionsquellen dienen in erster Linie Klimaanlage, Duschen, Luftbefeuchter, Kühltürme und kontaminiertes Trinkwasser (Fraser, 1985; Muder et al., 1986). Eine Keimübertragung von Mensch zu Mensch erfolgt nicht (Yu et al., 1983), weshalb dieser Infektionsweg auch als Sackgasse angesehen werden kann. Als Risikofaktoren einer Infektion gelten insbesondere Immunsuppression, wie bei chronischen Leiden oder nach Operationen, aber auch Herz-, Lungen- und Nierenschäden, sowie Diabetes. Zudem kann übermäßiger Genuß von Alkohol und Nikotin einer Infektion Vorschub leisten (Günther, 1980).

Zur Therapie eignen sich membrangängige Breitbandantibiotika, wie Erythromycin, Rifampicin oder Ciprofloxacin (Fraser et al., 1977; Gatterman et al., 1989). Als erfolgversprechende

Prophylaxe gegen die Besiedlung von *Legionella* hat sich die wiederholte Erwärmung von Warmwassersystemen auf über 60 °C erwiesen.

In 10 bis 20% aller Fälle endet eine Legionellose lethal (Günther, 1980; Lück, 1990).

Als eine besondere Form der Legionellen-Infektion tritt das Pontiac-Fieber auf, dessen grippeähnlicher Verlauf nicht zu einer Pneumonie führt (Winn, 1988). Erstmals wurde diese selbstlimitierende und nicht lethal verlaufende Erkrankung 1968 als Epidemie in Pontiac, Michigan beobachtet (Günther, 1981). Möglicherweise ist für diese Form der Erkrankung das VBNC-Stadium des Keimes verantwortlich (Steinert et al., 1997).

Neben Wund- und Darminfektionen konnten Legionellen als Ursache für weitere extrapulmonale Infektionen detektiert werden (Edelstein et al., 1979; Dournon et al., 1982; Schmidt et al., 1989).

Der Nachweis von Legionellen erfolgt in der Regel durch indirekte Immunfluoreszenz. Als biochemische Nachweismethoden dienen Untersuchungen der äußeren Membranproteine und chromatographische Analysen der artspezifischen Ubichinon- und Fettsäurezusammensetzung der Zellwand. Molekulargenetische Techniken, wie Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) (Ott et al., 1991a), Repetitive-Element PCR (Georghiou et al., 1994), "Arbitrary primed" PCR (AP-PCR) (Williams et al., 1990), Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) (Bangsborg et al., 1995) und *in situ*-Hybridisierung mit speziesspezifischen rRNA-Sonden werden ebenso angewandt (Ehret, 1989; Manz et al., 1995; Steinert et al., 1997; Grimm et al., 1998).

### **1.5. Intrazelluläre Vermehrung in Makrophagen und Monozyten**

Nach Inhalation keimhaltiger Aerosole erfolgt die intrazelluläre Vermehrung vornehmlich in Alveolarmakrophagen, aber auch Blutmonozyten und polymorphkernige Leukozyten werden infiziert (Horwitz and Silverstein, 1980; Nash et al., 1984). Die Anreicherung von Legionellen in nicht phagozytierenden Epithel- und Endothelzellen konnte *in vitro* nachgewiesen werden (Yamamoto, 1987). Da die Alveolar-Oberfläche zu 95 % aus Typ I und II - Alveolar-Epithelzellen besteht, können diese *in vivo* alternativ als potentielle Zielzellen zur intrazellulären Vermehrung dienen (Abu Kwaik, 1998). Während der intrazellulären Vermehrung werden einige *Legionella*-spezifische Proteine induziert, andere reprimiert (Abu Kwaik et al., 1993, Abu Kwaik, 1998, Susa et al., 1996).

Der Phagozytoseprozeß kann durch C3b- und iC3b-Opsonisierung des MOMP ("mayor outer membrane protein") mit nachfolgender Bindung des Komplexes an die CR1- und CR3-

Komplementrezeptoren auf der Makrophagenoberfläche initialisiert werden (Horwitz, 1984; Payne und Horwitz, 1987; Hoffman et al., 1992). Da der Komplementfaktor C1q ebenfalls in der Lage ist, an MOMP zu binden, kann *L. pneumophila* auch über diesen Rezeptor aufgenommen werden (Minz et al., 1995). Die Opsonierung mit *Legionella*-spezifischen Antikörpern kann alternativ zur Bindung an den Fc-Rezeptor und anschließender Internalisierung führen (Husmann, 1992). Alle Aufnahmeprozesse sind abhängig vom Mikrofilamentsystem und daher durch Cytochalasin D inhibierbar. Neben dieser Komplement-abhängigen Aufnahme ist auch eine vom Komplementsystem unabhängige Internalisierung über den Typ IV-Pilus von *L. pneumophila* möglich (Stone und Abu Kwaik, 1998). Die in den Aufnahme-prozeß involvierten epithelialen Zellrezeptoren sind bisher unbekannt (Abu Kwaik, 1998).

Die Aufnahme von *L. pneumophila* erfolgt über konventionelle oder sog. "coiling"-Phagozytose (Horwitz, 1984; Elliot und Winn, 1986; King et al., 1991). Die intrazellulären Legionellen befinden sich im Phagosom, das zunächst mit glatten Vesikeln interagiert. Bereits nach wenigen Minuten erfolgt die Rekrutierung von Mitochondrien, später auch die von Ribosomen. Die anschließende Assoziation mit dem Endoplasmatischen Retikulum verhindert die Phagolysosomen-Fusion und dient den intrazellulären Bakterien als Nährstoffreservoir (Bouze und Johnson, 1996; Abu Kwaik, 1996). Nach 4 bis 8 Stunden beginnen sich die Legionellen im Phagosom zu vermehren (Swanson and Isberg, 1995). Dieser Prozeß setzt sich im weiteren Verlauf der Infektion fort und führt letztlich zur Ruptierung der Zelle (Horwitz, 1983; 1988). Möglicherweise spielen zytotoxische Aktivitäten bei der Lyse eine Rolle (Friedman et al., 1980; Quinn et al., 1989). Auch die Induktion der Apoptose scheint denkbar, wie für die Makrophagen-ähnliche Zelllinie HL 60 nach Infektion mit *L. pneumophila* gezeigt wurde (Müller et al., 1996). Bei niedriger Infektionsdosis wird die Apoptose in Makrophagen, Monozyten und Alveolar-Epithelzellen aus noch unbekanntem Gründen bereits innerhalb von 2 - 3 Stunden nach Infektionsbeginn induziert. Möglicherweise nutzen die zu Beginn einer Infektion nur in geringer Keimzahl vorhandenen Bakterien apoptotische Zellen zur verstärkten Replikation, bevor sich der Keim mit hoher Infektionsdosis im Wirt manifestiert (Abu Kwaik, 1998).

## 1.6. Zelluläre Abwehr durch den Wirt

Die intrazelluläre Abwehr der Wirtszelle wird im Verlauf des Infektionsprozesses durch Unterbindung der Phagolysosomenfusion umgangen (Finlay und Falkow, 1997). Die durch die Phagozytose induzierte Phagosomenansäuerung wird ebenfalls inhibiert (Lück et al., 1990; Horwitz and Maxfield, 1984), der "oxidative burst" als Folge einer Reduktion toxischer Sauerstoffradikale ist stark minimiert (Klebanoff, 1982). Aufgrund einer nicht voll wirksamen humoralen Immunreaktion kommt der durch Makrophagen vermittelten zellulären Abwehr somit zentrale Bedeutung zu (Horwitz, 1989).

Freigesetztes LPS stellt die immundominante Oberflächenstruktur von *L. pneumophila* dar und spielt als Endotoxin im Entzündungsprozeß eine Rolle. Zudem können die ungewöhnlich langen Fettsäuren des Lipids A während der Infektion eine Protektion gegen Amidasen und Esterasen bieten (Zähringer et al., 1995). Legionellen zeichnen sich des weiteren durch Serumresistenz aus (Mintz, 1992).

Das intrazelluläre Wachstum der Legionellen kann durch  $\gamma$ -Interferon signifikant minimiert werden (Nash et al., 1984). Zum Teil mag die Wirkung von INF- $\gamma$  auch auf einer TNF- $\alpha$  Expression oder der damit einhergehenden Stimulation der NO-Synthese des Makrophagen beruhen (Matsiota-Bernard et al., 1993; Skerrett and Martin, 1996). Darüber hinaus wird durch die Zugabe von  $\gamma$ -Interferon die Anzahl der auf der Oberfläche der induzierten Alveolarmakrophagen befindlichen Transferrinrezeptoren herabgesetzt. Die freie Verfügbarkeit von intrazellulärem Eisen ist jedoch als Wachstumsfaktor für *L. pneumophila* von essentieller Bedeutung. Möglicherweise wird dieses System zur Aufnahme und Reduktion von Eisen neben dem Eisen- und Fur-regulierten Siderophorensystem von *L. pneumophila* genutzt (Byrd und Horwitz, 1989; Johnson et al., 1991; Hickey und Cianciotto, 1996). Die Minimierung der Expression der Komplementrezeptoren CR1 und CR3 ist ein weiterer Effekt von INF- $\gamma$ , die zusätzlich verminderte Aufnahme von *Legionella* ist die Folge (Byrd und Horwitz, 1989).

## 1.7. Modellsysteme zur Ermittlung des Virulenzpotentials

Es werden heute verschiedene Modellsysteme zur Bestimmung des Virulenzpotentials von *L. pneumophila* eingesetzt. Als wichtigstes Tiermodell dient das Meerschweinchen. Der Nachweis einer Infektion erfolgt nach intranasaler, intratrachealer oder intraperitonealer Verabreichung von *Legionella* in Lunge und Milz (Gattermann et al., 1989). Wird das Versuchstier durch keimhaltige Aerosole infiziert, so verläuft die Krankheit analog zu einer humanen Pneumonie (Berendt et al., 1980; Baskerville et al., 1981; Jepras et al., 1985). Die



Anreicherung von *Legionella* läßt sich 24 Stunden nach Infektion in mononuklearen Phagozyten nachweisen (Davis et al., 1982). Weitere Modellsysteme zur Untersuchung des Virulenzpotentials sind Infektionen von Makrophagenzelllinien und Blutmonozyten (Nash et al., 1984; Oldham und Rodgers, 1985). In der Routine hat sich jedoch die Verwendung der Makrophagen-ähnlichen Zelllinien U937 (humane Histiocytenzelllinie) oder HL60 (humane promyelotische Leukämiezelllinie) bewährt (Pearlman et al., 1988; Marra und Shuman, 1990). Diese Zellkulturen erleichtern die Standardisierung und ermöglichen die Einschränkung von Tierexperimenten.

### **1.8. Virulenzfaktoren von *L. pneumophila***

Durch die Anwendung verschiedener molekularbiologischer Methoden konnte eine Anzahl von Faktoren identifiziert werden, die für die Virulenz des Keims verantwortlich sind. In *E. coli* K-12 angelegte Cosmid- und Expressionsgenbanken dienen dem Screening *Legionella*-spezifischer Virulenzdeterminanten (Marra und Shuman, 1992; Heuner, 1994). Zudem konnten durch Komplementation natürlich vorkommender Mutanten einige Pathogenitätsfaktoren kloniert werden (Marra et al., 1992; Berger und Isberg, 1993). Durch Transposonmutagenese von *Legionella* konnten weitere Faktoren identifiziert werden (Tully et al., 1992; Pope et al., 1994; Wiater et al., 1994). Durch Transkriptionsfusionen mit *gfp* ("green fluorescent protein") konnte dieses Reporter-System in *Legionella* etabliert werden. Es findet Verwendung bei der Messung von Promotor-Aktivitäten und dem Monitoring verschiedener Virulenzeigenschaften während des intrazellulären Infektionsprozesses (Köhler et al., 1999).

Kein singuläres Gen ist als virulenzauslösender Faktor bis dato isoliert worden, vielmehr ist dafür die Kombination mehrerer Faktoren relevant (Abu Kwaik et al., 1993). Obwohl in *Legionella* Plasmide nachgewiesen wurden, ist die Existenz Plasmid-kodierter Virulenzfaktoren nicht nachweisbar (Winn, 1988). Vielmehr scheinen Plasmid-kodierte Genprodukte zur Hydrophobizität und UV-Resistenz beizutragen (Tully, 1991). In Tabelle 1 sind die bisher identifizierten Faktoren zusammengefaßt.

**Tabelle 1: Gene aus *L. pneumophila*, die bisher identifiziert wurden:**

GEN / LOCUS	PROTEIN/EIGENSCHAFTEN	MG (KD)	REFERENZ
<i>acn</i>	"major iron containing protein" Aconitase	98	Mengaud und Horwitz, 1993
<i>dot</i>	"defect in organelle trafficking"	x	Berger und Isberg, 1993 Vogel et al., 1998
<i>eml</i>	"early stage macrophage induced locus"	x	Abu Kwaik et al., 1996
<i>flaA</i>	"flagellin"	48	Heuner et al., 1995
<i>fliA</i>	$\sigma^{28}$ - Faktor, alternativer $\sigma$ -Faktor	27	Heuner et al., 1997
<i>frgA</i>	"fur regulated gene", Homologien zu Aerobactin-Synthetasen von <i>E. coli</i>	63,3	Hickey und Cianciotto, 1997
<i>fur</i>	"ferric uptake regulation"	15	Hickey und Cianciotto, 1997
<i>gspA</i>	"global stress protein"	19	Abu Kwaik und Engleberg, 1994
<i>hbp</i>	"hemin binding protein"	15,5	O' Connell et al., 1996
<i>helCBA</i>	intrazellulär induzierter Genlokus	x	McClain et al, 1996
<i>htpA/B</i>	"heat shock protein"	60	Hoffman et al., 1990 Sampson et al., 1990
<i>icm</i>	"intracellular multiplication"	x	Marra et al., 1992 Brand et al., 1994 Segal et al., 1998 Vogel et al., 1998
<i>lcy</i>	<i>Legionella</i> -Cyclophilin	18	Schmidt et al., 1996
<i>liga</i>	" <i>Legionella</i> intracellular growth antigen"	44	Susa et al., 1996 Abu Kwaik und Pederson, 1996
<i>lly</i>	Legiolysin; vermittelt Pigmentbildung, Hämolyse und Fluoreszenz	39	Wintermeyer et al., 1991, 1994 Steinert et al., 1995
<i>mil</i>	"macrophage specific infectivity locus"	x	Gao et al., 1998
<i>mip</i>	"macrophage infectivity potentiator" Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerase FK506-Bindeprotein (FKBP)	24	Cianciotto et al., 1989, 1990 Fischer et al., 1992 Bangsborg et al., 1991
<i>msp</i>	"major secretory protein" $Zn^{2+}$ -Metalloprotease; cytotoxische, hämolytische und proteolytische Aktivität	60	Quinn und Tompkins, 1989 Szeto und Shuman, 1990
<i>ompS</i>	"major outer membrane protein" kationenselektives Porin, 100 kD Komplex, C3b-Bindung	28- 31	Hoffman et al., 1992 Bellinger-Kawahara und Horwitz, 1990

GEN / LOCUS	PROTEIN/EIGENSCHAFTEN	MG (KD)	REFERENZ
<i>pho</i>	"major alkaline phosphatase"	x	Kim et al., 1994
<i>pig</i>	Pigment	x	Wiater et al., 1994
<i>pilBCD</i>	Typ IV-Pilus-Bildung; Typ II-Proteinsekretion	x	Liles et al., 1998 Liles et al., 1999
<i>pmi</i>	"protozoan and macrophage infectivity"	x	Gao et al., 1997
<i>pplA</i>	"peptidoglycan associated protein of <i>Legionella</i> " Lipoprotein, Strukturprotein der Zellmembran	19	Engleberg et al., 1991 Ludwig et al., 1991
<i>recA</i>	"homologue recombination"	38	Zhao und Dreyfus, 1990
<i>rpoD</i>	moduliert Hsp60-Expression	x	Cheng et al., 1996
<i>sodB</i>	"iron superoxiddismutase" (FeSOD)	x	Steinman, 1992
<i>sodC</i>	Kupfer-Zink-Superoxiddismutase	16	Gregory und Steinman, 1996

Nachfolgend sind die bisher identifizierten Faktoren näher beschrieben:

Das von *ompS* kodierte 100kD große MOMP-Porin ("major outer membrane protein") liegt in oligomerer Form kovalent an das Peptidoglycan gebunden vor. Je zwei Trimere werden aus jeweils zwei Untereinheiten von 28 und 31 kD aufgebaut, die durch Disulfidbrücken stabilisiert werden (Gabay et al., 1985; Butler und Hoffman, 1990). Der kationenselektive Porin-Komplex spielt als C3b-Akzeptormolekül bei der Aufnahme von Legionellen durch Phagozytose eine wichtige Rolle (Horwitz, 1984). Homologien bestehen zum eukaryontischen CR1-Rezeptor, sowie zu Pertaktin aus *Bordetella pertussis* (Weeratna et al., 1994).

PplA ist ein 19 kD großes "Peptidoglycan assoziiertes" Protein mit Sequenzhomologien zu Lipoproteinen aus *E. coli* (Pal) und *Haemophilus influenzae* (Ludwig et al., 1991; Engleberg et al., 1991). Der Beitrag zur Virulenz ist bisher nicht geklärt worden.

Das LIGA-Protein ("*Legionella* intracellular growth antigen") ist ein weiteres "Peptidoglycan assoziiertes" Protein mit einem Molekulargewicht von 44 kD (Susa et al., 1996). Die Expression des Genproduktes erfolgt ausschließlich in intrazellulär wachsenden Legionellen der Gattung *L. pneumophila*. Die Frage, ob es sich um einen Virulenzfaktor, oder einen für das Überleben generell wichtigen Faktor handelt, ist noch nicht abschließend geklärt.

RecA ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 38 kD. Es weist Sequenzhomologien zu RecA aus *E. coli* auf (Dreyfus, 1989).

Die Eliminierung schädlicher O<sub>2</sub>-Radikale erfolgt durch die zytoplasmatisch lokalisierte SOD (Superoxiddismutase; *sodB*) (Steinman et al., 1992). Das essentielle Gen kann nicht durch die periplasmatische CuZn-SOD (*sodC*) substituiert werden, die während der stationären Wachstumsphase als Überlebensfaktor fungiert (Sadosky et al., 1994). Die Fähigkeit zum intrazellulären Wachstum in Makrophagen wird durch Mutation von *sodC* nicht tangiert (Gregory und Steinman, 1996).

Das 60 kD große HtpB-Protein ist ein Angehöriger der GroEL/ Hsp60 - Hitzeschock-Proteine. Es ist charakterisiert durch 40 % Homologie im Promoterbereich zu GroEL aus *E. coli* (Hoffmann et al., 1989). Die Induktion der Expression des *htpA/B*-Operons erfolgt durch Streßfaktoren, zu denen auch das intrazelluläre Wachstum gehört (Hoffmann et al., 1990). Funktional dient es in Form eines Lipochaperons membranstabilisierend (Garduño et al., 1998), wird bei intrazellulärem Wachstum aber auch in die neu generierten Phagosomen sekretiert. Möglicherweise spielt das Oberflächen-Hsp60 bei der Adhärenz an HeLa-Zellen eine Rolle. Die Tatsache, daß Hsp60 als Hauptantigen während einer Legionellose auftritt, ist durch die Oberflächenexpression hinreichend geklärt (Garduño et al., 1998).

Das GspA-Protein von *L. pneumophila* ist ein weiteres Streßprotein. Das 19 kD große Protein ist homolog zu den IpbA/B - Hitzeschock-Proteinen von *E. coli*. Die Induktion seiner Synthese erfolgt durch eine ganze Reihe von Streß-Faktoren, u. a. auch bei intrazellulärem Wachstum in Makrophagen (Abu Kwaik und Engleberg, 1994).

Als erster, nachweislich notwendiger Virulenzfaktor von *L. pneumophila* konnte das 24 kD große Mip-Oberflächenprotein ("macrophage infectivity potentiator") kloniert und sequenziert werden. Durch eine N-terminale Signalsequenz wird der Transport des Proteins über die Zytoplasmamembran vermittelt (Engleberg et al., 1989; Ludwig et al., 1994). Es spielt eine Rolle bei der Initiation der intrazellulären Vermehrung in Protozoen und humanen Alveolarmakrophagen (Wintermeyer et al., 1995; Cianciotto et al., 1989, 1990, 1992; Doyle et al., 1998). Die genaue Wirkungsweise ist jedoch unbekannt. *Mip*-negative Mutanten besitzen eine geringere intrazelluläre Replikationsrate (Cianciotto und Fields, 1992). Mip besitzt auf Proteinebene 50% Homologie zu FKBP-Isomerasen, die zur Klasse der Immunophilinen zählen

(Hacker und Fischer, 1993). Es gehört zu den FK506-Bindeproteinen mit Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerase - (PPIase-) Aktivität des C-Terminus, die auf eine Funktion bei der Zellsignalübermittlung und Proteinfaltung schließen lassen (Fischer und Schmidt, 1990; Fischer et al., 1992; Maki et al., 1990). Für das intrazelluläre Überleben von *L. pneumophila* ist diese PPIase-Aktivität jedoch unbedeutend (Wintermeyer et al., 1995).

Als weiteres Immunophilin konnte das 18 kD große Lcy-Protein (*Legionella*-Cyclophilin) in *L. pneumophila* charakterisiert werden. Es gehört zur Klasse der Cyclophiline (Hacker und Fischer, 1993; Schmidt et al., 1996).

Die Flagelle von *Legionella* stellt einen weiteren, mit der Virulenz der Bakterien assoziierten Faktor dar. Sie besteht vornehmlich aus der Hauptstruktureinheit FlaA mit einem Molekulargewicht von 48 kD, dessen Expression von dem alternativen Sigma-Faktor  $\sigma^{28}$  reguliert wird (Heuner et al., 1995, 1997). Neben der Wachstumsphase bedingen die Umweltparameter Temperatur, Viskosität und Osmolarität des Mediums und die Verfügbarkeit von Aminosäuren als Nährstoffe die Modulation der Flagellenexpression (Heuner et al., 1999). Der Verlust der Flagelle bei Infektion von *A. castellanii* könnte sich auch auf die Fähigkeit zum intrazellulären Überleben auswirken (Pruckler et al., 1995).

Die Fähigkeit zur Bindung von Eisen wird durch das 98 kD große, zu den Aconitasen gehörende Acn-Protein vermittelt (Mengaud und Horwitz, 1993), die im Citratzyklus bei Pro- und Eukaryonten involviert sind.

Zudem vermag *L. pneumophila* über das 15,5 kD große Hbp-Protein Hämin zu binden. Die Expression von *hbp* korreliert jedoch nicht mit dem intrazellulären Wachstum von *L. pneumophila* in *H. vermiformis* sowie Makrophagen-ähnlichen Zelllinien (O'Connell et al., 1996).

Das 15 kD große Fur-Protein ("ferric uptake regulation") von *L. pneumophila* vermittelt die Regulation der Eisenaufnahme. Das Protein ist hochgradig homolog zum Fur-Protein aus *E. coli* (Hickey und Cianciotto, 1997).

Der *eml*-Locus ("early stage macrophage induced locus") ist als ein Gen charakterisiert, dessen Expression erst nach Internalisierung des Bakteriums durch Makrophagenzellen induziert wird. Es wird dementsprechend in die Gruppe der sog. MI ("macrophage induced") -Gene

eingordnet. Eine signifikante Verminderung des intrazellulären Wachstums ist nach Verlust dieses Faktors zu beobachten (Abu Kwaik und Pederson, 1996).

Ein weiteres MI-Gen kodiert für die 20 kD große anorganische Pyrophosphatase, dessen Expression ebenfalls nur intrazellulär erfolgt (Abu Kwaik, 1998). Andere Streßfaktoren vermögen keine Induktion herbeizuführen. Das Protein ist zur PPase aus *E. coli* homolog, wird dort jedoch konstitutiv exprimiert.

Durch Komplementationsstudien mit *L. pneumophila* - Mutanten wurden zwei benachbarte MI-Genloci charakterisiert, deren Expression das intrazelluläre Überleben ermöglichen.

Der *dotA*-Lokus ("defect in organelle trafficking") ist an der Koordination einer Assoziation verschiedener Wirtszellorganellen mit der Phagosomenmembran beteiligt (Berger und Isberg, 1993). Mutationen in *dotA* führen zur Inhibition der Phagolysosomenfusion (Berger et al., 1994). Er kodiert zudem für eine Pore, die während des Infektionsprozesses in die Phagosomenmembran eingebracht wird.

Ebenso wie der *dot*-Locus, ist auch der *icm*-Locus ("intracellular multiplication") als Inhibitor der Phagolysosomenfusion, sowie für intrazelluläre Vermehrung essentiell (Marra et al., 1992; Brand et al., 1994; Segal und Shuman, 1997; Purcell und Shuman, 1998). Neben den Genen *icmWXYZ* konnten durch Transposonmutagenese 16 weitere *icm*-Gene entdeckt werden, die teilweise Operonstruktur aufweisen (Segal et al., 1998; Vogel et al., 1998). Durch Komplementation avirulenter Mutanten konnten zudem die *dot*-Gene *dotBCD* identifiziert werden (Vogel et al., 1998).

Vier der *dot*-Gene (*dotG*, M, L, B) besitzen Homologien zu plasmidkodierten *E. coli* und *Salmonella trb*-Genen, die der Konjugation dienen. Auch *L. pneumophila* ist damit in der Lage, Plasmide zu mobilisieren (Segal et al., 1997; Vogel et al., 1998). Aufgrund seiner Ähnlichkeit zu spezifischen Typ IV-Sekretionssystemen, die *Bordetella pertussis* und *Agrobacterium tumefaciens* den Substrattransport über die äußere Membran gestatten, dient diese Gendeterminante möglicherweise aber auch der Sekretion von Proteinen zur Modulation bzw. Inhibition der Phagosomenreifung (Vogel et al., 1998).

Durch Transposonmutagenese konnte ein weiterer Locus mit Homologie zu Typ II-Sekretionssystemen und essentiellen Proteinen für die Produktion von Typ IV-Pili identifiziert werden. Die Gene *pilB*, *pilC* und *pilD* besitzen Operonstruktur und weisen auf Proteinebene hochgradige Homologien zu entsprechenden Genprodukten aus *Pseudomonas aeruginosa* auf. Die Expression der Gene erfolgt temperaturgeregelt und ist bei 30 °C stärker als bei 37 °C (Liles et al., 1998). Eine *pilD*-Mutante ist in ihrer Fähigkeit zur intrazellulären Vermehrung in

*H. vermiformis* und U937-Zellen stark beeinträchtigt. Die LD50 von intratracheal mit dieser Mutante infizierten Meerschweinchen ist um das 100-fache größer (Liles et al., 1999).

Durch Transposonmutagenese konnten Mutanten voneinander diskriminiert werden, die unterschiedliche Defekte in Bezug auf ihre Adhärenz, das intrazelluläre Überleben und ihre Vermehrungsfähigkeit aufweisen. Dabei konnte zwischen Mutanten im *pmi*-Genlocus ("protozoan and macrophage infectivity"), deren Virulenz sowohl in Protozoen, als auch in Makrophagen-Wirtszellen betroffen ist, und jenen im *mil*-Locus ("macrophage specific infectivity loci"), bei denen bislang nur Defekte in Makrophagen beobachtet wurden, unterschieden werden (Gao et al., 1997; 1998). Es scheint denkbar, daß aufgrund der lang andauernden Coevolution von Legionellen und Protozoen mehrere Alternativmechanismen des Parasitismus entwickelt wurden, von denen manche spezifisch sind, einige jedoch die Infektion von anderen Eukaryontenzellen (Makrophagenzellen) ermöglichen. Andererseits könnte die natürliche Kompetenz der Erlangung von Faktoren gedient haben, die dem Bakterium neben seiner parasitären Lebensweise als Umweltkeim das intrazelluläre Überleben in Lungenmakrophagen ermöglichte.

Die  $Zn^{2+}$ -Metalloprotease Msp ("major secretory protein") ist ein gegenüber Casein, Collagen und Gelatine proteolytisches Protein (Dreyfus und Iglewsky, 1986) mit zytotoxischer Aktivität gegenüber CHO ("chinese hamster ovary") - Zellen und einem Molekulargewicht von 38 kD. Zudem werden Hunde- und Meerschweinchenerythrozyten lysiert (Keen und Hoffmann, 1989). Das Protein ist in Struktur und Funktion homolog zur Elastase aus *P. aeruginosa* (Black et al., 1990). Eine *msp*-Mutante von *L. pneumophila* ist ebenso wie der Wildtyp in der Lage, Makrophagen-ähnliche Zellen zu infizieren und verhält sich im Tiermodell gleichermaßen virulent, obwohl infizierte Meerschweinchen stark immunogen gegen Msp reagieren und gegen das Protein immunisiert werden können (Szeto und Shuman, 1990). Die Expression der Protease vermag im Tiermodell zudem akute Entzündungsprozesse zu verstärken (Moffart et al., 1994).

## 1. 9. Legiolysin: Umweltfaktor mit pathogenem Potential ?

Neben proteolytischer und zytotoxischer Aktivität (Dreyfus and Iglewski, 1986), die von der weiter oben beschriebenen  $Zn^{2+}$ -Metalloprotease vermittelt werden, konnten als weitere phänotypische Charakteristika von *L. pneumophila* Hämolyse, grün-gelbliche Fluoreszenz und Pigmentbildung beobachtet werden (Baine et al., 1979; Vickers und Yu, 1984; Wintermeyer et al., 1991). Diese Eigenschaften sind alle auf die enzymatische Aktivität eines einzigen Genprodukts zurückzuführen. Aufgrund seiner Fähigkeit zur Hämolyse von Human- und Schaferythrozyten wurde der Faktor "Legiolysin" (Lly) genannt (Wintermeyer et al., 1991). Die Pigmentbildung ist abhängig von der Präsenz der aromatischen Aminosäure Tyrosin als Mediumsupplement. Die durch das Lly verursachte Hämolyse von Humanerythrozyten, wie auch die Pigmentgenerierung treten in der späten stationären Wachstumsphase auf. Die Pigmentierung geht der meist verzögerten Lyse der Erythrozyten voraus. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, daß die durch Lly verursachte Hämolyse ein sekundärer Effekt ist, der durch die vorausgehende Pigmentierung bedingt ist. Die zusätzliche Gabe von Cystein vermittelt zudem die Fluoreszenz im nahen UV-Bereich.

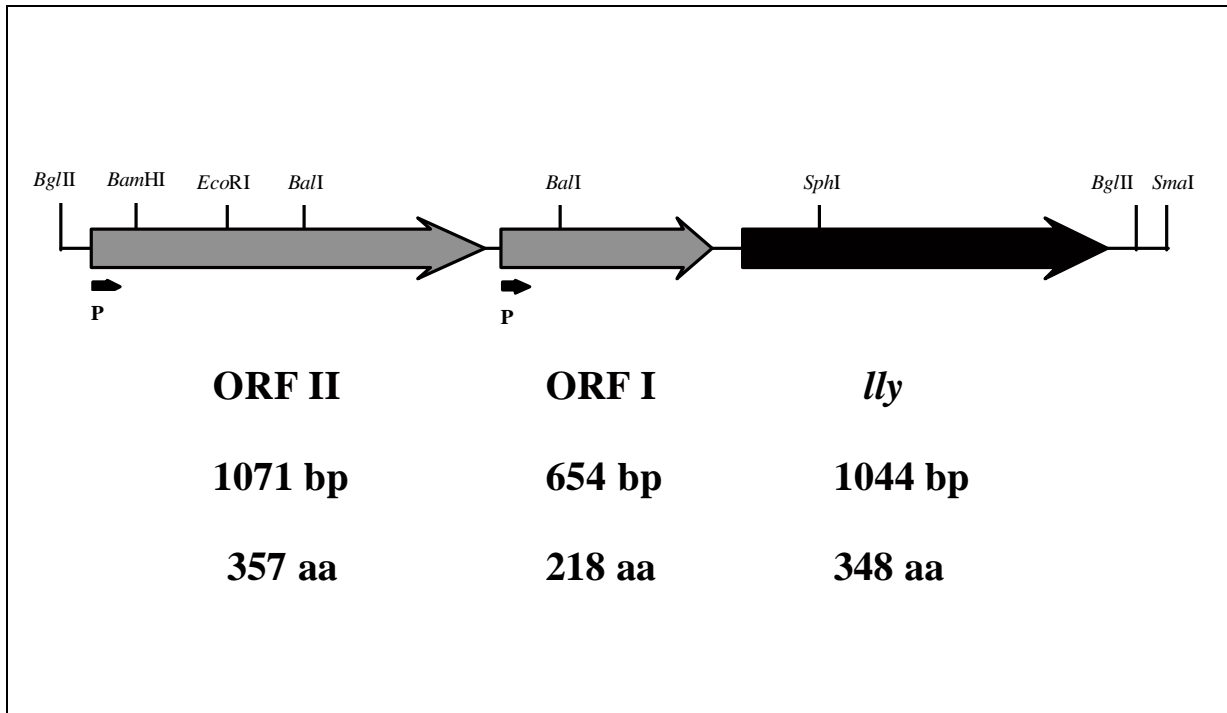
Die Pigmentbildung ist nicht auf *Legionella pneumophila* beschränkt, sondern erstreckt sich auch auf andere *Legionella*-Arten. Die zur Pigmentsynthese erforderlichen Substrate variieren dabei zwischen den verschiedenen Spezies (Vickers und Yu, 1984). Zudem hybridisieren die zu diesen Proteinen korrespondierenden DNA-Sequenzen in ganzen Zellextrakten nur bei verminderter Stringenz mit *lly*-spezifischen Sonden und zeigen gegenüber monospezifischen polyklonalen Antikörpern gegen Lly keinerlei positive Reaktion (Bender et al., 1991). Möglicherweise ist der *pig*-Faktor für diese Art der Melanisierung verantwortlich (Wiater et al., 1994). In rekombinanten *E. coli* K-12 bleibt nach Klonierung dieses Faktors die Pigmentierung aus. Dies läßt auf einen anderen Syntheseweg schließen, als jenen, in den Legiolysin involviert ist.

Die Pigmentierung vermittelt unter Laborbedingungen gegenüber künstlichem Licht eine Protektion, die auch im natürlichen Habitat als Umweltfaktor von Bedeutung sein könnte (Steinert et al., 1995).

Die DNA-Sequenz von 1044 bp kodiert für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 39 kD. Das Protein besitzt signifikante Homologien zur *p*-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Pseudomonas* ssp., zu MelA aus *Shewanella colwelliana* (Wintermeyer et al., 1994) und dem Hämolysin VIIY aus *Vibrio vulnificus* (Chang et al., 1997). Unmittelbar upstream von *lly*



befinden sich zwei weitere Leseraster, die möglicherweise bei der Synthese des Pigments eine Rolle spielen. Die genetische Determinante ist in Abbildung 1 dargestellt.



**Abb. 1)** Genetische Determinanten der *lly*-Region. Wichtige Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet. Nach Sequenzanalyse abgeleitete Promoterbereiche sind als kleine Pfeile dargestellt.

Da weder eine N-terminale Signalsequenz, noch Hinweise auf Transmembrandomänen oder membranassoziierte Helices vorliegen, liegt *Lly* vermutlich zytoplasmatisch vor.

## 2. Zielsetzung

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte durch molekularbiologische Methoden eine Charakterisierung der *lly*-Determinante erfolgen und die ökologischen Zusammenhänge aufgeklärt werden, in die Legiolysin involviert ist. Zudem sollten die Umwelt- und Pathogenitätsfaktoren *lly* und *mip* chromosomal in einen *E. coli* K-12 Stamm integriert werden, um in nachfolgenden ökologischen Studien ein stabiles Expressionsmuster dieser Faktoren zu gewährleisten.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten Studien zur Persistenz von *L. pneumophila* und *E. coli* in der Umwelt durchgeführt werden. Diese sind im Zusammenhang mit der Verbreitung der Keime zu sehen. Dabei sollte geklärt werden, ob insbesondere *lly* einen Einfluß auf die Persistenz unter Lichtstreß, in suboptimaler Umgebung einer Bodenprobe und in verschiedenen Wasserproben ausübt. Ferner sollte die Assoziation von *L. pneumophila* zu *Fischerella* sp. näher charakterisiert werden.

Schließlich sollte durch Studien zur Reaktivierung von VBNC-Ruhestadien ermittelt werden, ob verschiedene Umwelt- und Pathogenitätsfaktoren das Reaktivierungspotential des Keimes beeinflussen können.