
F. Diskussion

F.1 rRNA-Hybridisierung

Die Detektion und exakte Identifizierung von Bakterien auf Artniveau ist durch das Fehlen von geeigneten morphologischen Merkmalen oft schwierig oder unspezifisch. So kann nur in den seltensten Fällen auf eine mikroskopische Bestimmung zurückgegriffen werden (Woese 1987). Beim Nachweis mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper (DFA) kann es zu unspezifischen Kreuzreaktionen mit anderen Keimen kommen (Lück und Helbig 1997, Winn 1999). Serologische und biochemische Bestimmungsverfahren (Enzymassays, Analyse der Protein- und Fettsäuremuster und der Zellwand) erfordern eine vorhergehende Isolierung und Kultivierung, die nicht nur zeitaufwendig sondern auch oft durch das Vorhandensein von unkultivierbaren Stadien der Bakterien unmöglich ist. So sind auch Legionellen in der Lage, ungünstige Umweltbedingungen in einem sogenannten 'viable but nonculturable'-Stadium (VBNC) zu überdauern (Hussong et al. 1987, Paszko-Kolva et al. 1992, Steinert et al. 1997). Die PCR ist zwar kulturunabhängig, aber durch einen Nachweis mittels spezifischer Primer werden nicht nur lebende sondern auch tote Zellen erfasst, es lassen sich also keine Aussagen über die aktuelle Zusammensetzung der untersuchten Population machen. Mit den genannten Verfahren ist außerdem eine *in situ* Identifizierung der Bakterien in ihrem Lebensraum nicht möglich.

Um diese Probleme zu umgehen, wird in der mikrobiellen Ökologie immer öfter auf die kulturunabhängige *in situ* Hybridisierung mit rRNA-gerichteten Sonden zurückgegriffen (Amann et al. 1995, 1997a, Brand et al. 2000, Friedrich et al. 1999, Juretschko et al. 1998, Manz et al. 1996). Diese Methode liefert Informationen sowohl über den Aufenthaltsort der Zielzellen in ihrer natürlichen Umgebung als auch über ihren metabolischen Zustand (Manz et al. 1995).

Die rRNA als Zielmolekül für eine Identifizierung von Mikroorganismen weist entscheidende Vorteile auf. Sie ist in jeder Zelle und in einer hohen Kopienzahl von 10^3 bis 10^5 Molekülen pro Zelle vorhanden, dadurch ist das Nachweisverfahren besonders empfindlich, künstliche Amplifikationen (wie für PCR nötig) sind damit überflüssig. Die Anzahl der rRNA-Kopien pro Zelle ist sogar im Stadium geringer Stoffwechselaktivität (z. B. VBNC) für einen Nachweis mittels Hybridisierung ausreichend. Die rRNA weist viele einzelsträngige Abschnitte auf, so dass teilweise auf eine Denaturierung (wie bei DNA nötig) verzichtet werden kann. Aus vergleichenden Sequenzanalysen ist bekannt, dass die rRNA-Moleküle Bereiche unterschiedlicher

evolutionärer Konservierung aufweisen. Durch die geeignete Wahl der Zielregion können spezifische Sonden auf jeder taxonomischen Ebene für monophyletische Gruppen wie Domänen (z. B. *Bacteria*), Klassen, Ordnungen, Familien, Gattungen, Arten, teilweise sogar Unterarten entworfen werden. So lässt sich auch die phylogenetische Stellung unbekannter Mikroorganismen in einem sogenannten 'top to the bottom approach' ermitteln (Amann 1995, Springer 1992).

In Bakterien stehen drei ribosomale Nukleinsäuren zur Verfügung: 5S (ca. 120 Nukleotide), 16S (ca. 1500 Nukleotide) und 23S (ca. 3000 Nukleotide), in Eukaryoten vier: 5S, 5,8S, 18S und 23S. Da der Informationsgehalt der vergleichsweise kurzen 5S rRNA sehr gering ist, werden meistens die 16S, 18S und 23S rRNA verwendet (Amann 1995, Ludwig und Schleifer 1994). Werden die eingesetzten Sonden mit einem Fluoreszenzmarker markiert, ist eine schnelle mikroskopische Auswertung der Hybridisierung auf Einzelzellebene möglich. Durch den simultanen Einsatz von verschiedenen markierten Sonden (zur Zeit bis zu vier Fluoreszenzfarbstoffe möglich) lässt sich auch die Zusammensetzung komplexer Lebensgemeinschaften analysieren (Amann 1995). Eine vorherige Kultivierung der Zielzellen ist nicht nötig, es werden also auch nicht kultivierbare Organismen erfasst. Da die rRNA in toten Zellen rasch abgebaut wird, zeigen nur lebende Zielzellen ein positives Signal. Die Sonden können sowohl an isolierten Nukleinsäuren in Dot blot-, Southern- und Koloniehybridisierungen eingesetzt werden als auch *in situ* mit ganzen Zellen (Amann 1995, Manz et al. 1994) (Abb. F.1).

Um einen bestimmten Mikroorganismus durch Hybridisierung mit Gensonden nachweisen zu können, ist der erste Schritt das Design einer spezifischen Sonde. Anhand von Vergleichen bereits in Datenbanken gespeicherter Sequenzen wird eine ca. 18 (\pm 3) Basen lange Sondensequenz ermittelt. Bestimmte Regionen der rRNA haben sich in früheren Versuchen als für Hybridisierungen unzugänglich herausgestellt, diese sollten daher nach Möglichkeit gemieden werden (Amann 1995). Die exakte Spezifität sowie die praktische Zugänglichkeit der Zielregion müssen in Hybridisierungsexperimenten für jede neue Sonde getestet werden. Die Stringenz wird durch die Formamid- und Salzkonzentration in den verwendeten Puffern bzw. durch die Hybridisierungs- und Waschttemperatur gesteuert. Da während der Hybridisierung die Zellen hohen Temperaturen, Detergentien und osmotischen Gradienten ausgesetzt werden, ist eine vorhergehende Fixierung zum Erhalt der Zellmorphologie unerlässlich. Hier haben sich Aldehyde (für Gram-negative Bakterien) und Alkohole (für Gram-positive Bakterien) bewährt (Amann 1995). Die Durchlässigkeit der Zellmembran für die Gensonden wird bei Gram-negativen Bakterien durch anschließende Entwässerung über eine aufsteigende Ethanolreihe erreicht (Manz et al. 1992). Eine weitere Permeabilisierung durch Enzymbehandlungen, wie sie für Gram-positive

Bakterien erforderlich ist (Roller et al. 1994, Schmid 1998), ist aufgrund der unterschiedlichen Struktur der Zellwand nicht nötig.

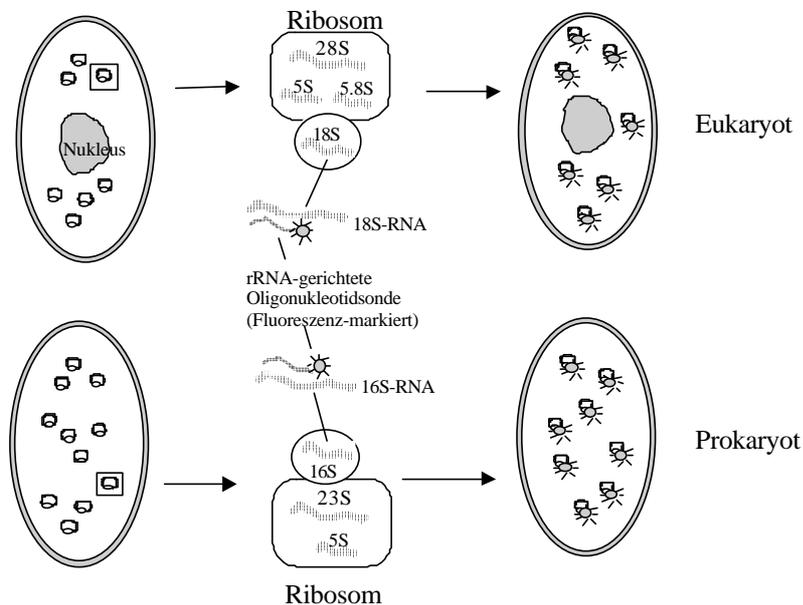


Abb. F.1: Bei der fluoreszierenden *in situ* Hybridisierung (FISH) sind die Gensonden mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und binden an komplementäre RNA-Bereiche in den Zielzellen. So lassen sich sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Zellen nachweisen (nach Hacker 2000b).

F.1.1 *Legionella*

Basierend auf Sequenzvergleichen der rRNA von mehr als 10.000 Mikroorganismen wurde in der vorliegenden Arbeit eine neue Sonde für die *in situ* Hybridisierung entwickelt, die spezifisch ist für den Haupterreger der Legionellose, *L. pneumophila*. Die Sonde LEGPNE1 erkannte unter hochstringenten Hybridisierungsbedingungen alle getesteten Stämme von *L. pneumophila* ungeachtet ihrer Serogruppe und zeigte keinerlei Kreuzreaktionen mit nicht-*pneumophila*- bzw. nicht-*Legionella*-Referenzstämmen. Dies galt auch für *L. anisa*, *L. bozemanii* und *L. longbeachae*, bei denen sich die rRNA-Sequenz nur durch einen einzigen Basenaustausch von der Zielsequenz unterscheidet (H.2 im Anhang). Die Hybridisierung wurde so-

wohl an Bakterienrein- und -mischkulturen als auch intrazellulär in Amöben-Infektionsassays erfolgreich durchgeführt. Mit dieser Methode ist so eine Darstellung des intrazellulären Wachstums von Legionellen in Amöben auf Einzelzellebene möglich.

Es konnte gezeigt werden, dass eine spezifische Detektion von *Legionella* spp. und *L. pneumophila* auch in Umweltproben verschiedener Herkunft möglich ist. Dadurch können natürliche Reservoirs und somit potentielle Infektionsquellen dieser Krankheitserreger erkannt werden, auch wenn eine Isolierung und Kultivierung der Keime nicht möglich ist (VBNC-Stadium). Darüber hinaus kann durch den simultanen Einsatz mehrerer Gensonden gegen unterschiedliche Zielgruppen *in situ* die Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften in *Legionella*-positiven und -negativen Habitaten analysiert und miteinander verglichen werden.

Das entwickelte *in situ* Nachweisverfahren von Legionellen sollte auch im medizinischen Bereich einsetzbar sein, um schnell entscheiden zu können, ob eine diagnostizierte Lungenentzündung durch Legionellen oder andere Keime hervorgerufen wurde. Da die Kenntnis des Erregers für die Wahl der geeigneten Antibiotika wichtig ist, ist eine möglichst rasche Identifizierung für den Patienten lebensnotwendig. Die beschriebene *in situ* Technik erlaubt eine Identifikation innerhalb von etwa zwei Stunden und bietet so im Vergleich zu den bislang üblichen Anreicherungsverfahren auf Selektivmedien (eine Woche) und anschließender serologischer oder biochemischer Identifizierung einen erheblichen Zeitvorteil. Erste Versuche mit *in situ* Hybridisierungen von verschiedenen Patientenproben (Lungensputum, bronchoalveoläre Lavage, Pleuraflüssigkeit, Nadel-Biopsie) ergaben positive Ergebnisse für *Legionella* spp. (Sonde LEG705) und *L. pneumophila* (Sonde LEGPNE1) und zeigten eine der DFA- und der Kultivierungsmethode deutlich überlegene Sensitivität (Hu et al. 2000).

F.1.2 Amöben

Freilebende Süßwasser-Amöben können beim Menschen verschiedene Krankheiten hervorrufen. So verursacht z. B. *Naegleria fowleri* die oft tödlich verlaufende Primäre Amöben-Meningoencephalitis, verschiedene Vertreter der Gattung *Acanthamoeba* gelten als Erreger der Granulomatösen Amöben-Encephalitis und einiger anderer Krankheiten wie Keratitis (Ma et al. 1990, Szénási et al. 1998). Invasiv ist jeweils nur das Trophozitenstadium (Ferrante 1991). Andere Amöben wie *Hartmannella* und *Vahlkampfia* sind nicht humanpathogen (de Jonckheere

und Brown 1998). Es kommt ihnen aber wie zahlreichen anderen Protozoen große Bedeutung zu als Wirtsorganismen zahlreicher obligater Endozytobionten der *Chlamydiales* und *Rickettsiales* sowie z. T. humanpathogener Bakterien wie *Aeromonas salmonicida*, *Burkholderia pickettii*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *Helicobacter pylori*, *Legionella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella* spp., *Vibrio cholerae* (Barker und Brown 1994, Brieland et al. 1996, Essig et al. 1997, Fritsche et al. 1993, Ly und Müller 1990, Michel 1997, Michel et al. 1995, Rollins und Colwell 1986, Shahamat et al. 1993, Steinert et al. 1998, Thom et al. 1992).

Für Amöben stehen zumindest auf Gattungsebene morphologische Bestimmungsmerkmale zur Verfügung, einige Arten lassen sich durch biochemische oder molekulare Verfahren näher charakterisieren (Adams et al. 1989, Page und Siemensma 1991). Die exakte Bestimmung ist jedoch zeitaufwendig und erfordert einige Übung. So werden schätzungsweise bis zu 70 % der durch *Acanthamoeba*-Infektionen verursachten Keratitisfälle falsch diagnostiziert und behandelt (Stothard et al. 1999). Daher ist eine Identifizierungsmethode mit möglichst geringem Zeit- und Arbeitsaufwand auch hier erforderlich. Als bisher einzige protozoenspezifische, 18S rRNA-gerichtete Sonden wurden unlängst von Stothard et al. spezifische Oligonukleotide für die Gattung *Acanthamoeba* sowie für den Sequenztyp T4 der *Acanthamoeben* beschrieben (Stothard et al. 1999).

In der vorliegenden Arbeit konnten zwei neue gattungsspezifische 18S rRNA-Sonden für *Hartmannella* (HART498) und *Naegleria* (NAEG1088) etabliert werden. Für die Fixierung der Amöben wurde ein optimiertes Protokoll erstellt, das sich aus von verschiedenen Autoren veröffentlichten Verfahren mit z. T. größerem Aufwand zusammensetzt (Amann et al. 1990, Ammendola 1999, Fritsche et al. 1999). Für die Hybridisierung wurde auf das für Bakterien und Eukaryoten erprobte Protokoll von Manz et al. zurückgegriffen (Manz et al. 1992).

Die zwei neuen Sonden erwiesen sich in *in situ* Hybridisierungen unter hochstringenten Bedingungen sowohl mit Laborstämmen als auch mit Umweltisolaten als spezifisch und zeigten keinerlei Kreuzreaktionen mit den Referenzstämmen. Die Sonde NAEG1088 zeigte sich trotz der geringen Sequenzunterschiede der ssu (small subunit) rRNA innerhalb der *Vahlkampfiidae* (Brown und de Jonckheere 1999) als spezifisch und reagierte nicht mit *Vahlkampfia ovis*.

Der simultane Einsatz von 18S rRNA-gerichteten Amöbensonden und 16S rRNA-gerichteten Bakteriensonden wurde in Infektionsassays von *H. vermiformis* mit *L. pneumophila* erfolgreich

durchgeführt (Abb. E.5). Dadurch kann in Zukunft die Interaktion von Legionellen und anderen Bakterien mit Amöben *in situ* weitergehend untersucht und dargestellt werden.

In der Umwelt bilden viele Amöben unter Stress (durch chemische, physikalische oder nahrungsbedingte Veränderungen in der Umgebung) Zysten aus (Byers et al. 1991). Diese Überdauerungsformen besitzen eine sehr starke Eigenfluoreszenz in beiden verwendeten Fluoreszenzanregungen (450 - 490 nm, 530 - 585 nm). Es war im Rahmen dieser Arbeit weder möglich, diese Eigenfluoreszenz zu unterdrücken (z. B. durch Gegenfärbung mit Evans Blue), noch die Zysten von ihrer Eigenfluoreszenz unterscheidbar zu hybridisieren, da die Autofluoreszenz immer stärker als die Hybridisierungssignale war. Dieses Problem wurde auch von Stothard et al. beschrieben (Stothard et al. 1999). Eine Unterscheidung zwischen leuchtenden Zysten und Trophozoiten war somit nur auf morphologischer Ebene möglich, da die Zysten völlig rund und innen hohl erschienen (Abb. E.5). Sie leuchteten außerdem in allen Fluoreszenzanregungen, auch wenn nur eine einzige Sonde für die Hybridisierung verwendet wurde. Um dennoch eine erfolgreiche Bestimmung der Zellen durch *in situ* Hybridisierung durchführen zu können, war daher eine vorherige Isolierung und Kultivierung zum Erhalt von Trophozoiten notwendig. Eine andere Möglichkeit wäre die Markierung der Sonden mit nicht-fluoreszierenden Markern. So wurden Digoxigenin-markierte 26S rRNA-Sonden von Lai und Mitarbeitern erfolgreich zur Hybridisierung von Acanthamoeben-Zysten eingesetzt (Stothard et al. 1999).

Ein weiteres Problem bei der *in situ* Hybridisierung von Amöben ergab die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes cy3. Der Farbstoff wird aufgrund seiner hohen Leuchtkraft und Fotostabilität bevorzugt benutzt (Glöckner et al. 1996). Cy3 schien jedoch in manchen Gattungen mit ribosomalen Strukturen zu reagieren, was in einem von einer 'echten' Hybridisierung nicht zu unterscheidenden Falsch-Positiv-Signal resultierte. Es sollten daher in Protozoen nur Marker mit einem chemisch nicht mit cy3 verwandten Grundgerüst verwendet werden, z. B. FLUOS. Als zweiter Fluoreszenzfarbstoff für eine gleichzeitige Hybridisierung mit mehreren Sonden kämen Texas Red oder Rhodamin in Frage. Cy5 ist vermutlich ebenfalls ungeeignet, da dieser Farbstoff sich vom cy3-Grundgerüst ableitet.

Für zukünftige Untersuchungen ist es erstrebenswert, basierend auf dem rRNA-Datensatz der TU München (Dr. W. Ludwig) und der rRNA-Sequenzen der GenBank (Byers 1998) unter Verwendung des Software-Pakets ARB (Strunk und Ludwig 1996) zusätzliche Sonden zum spezifischen Nachweis sowohl der einzelnen *Legionella*-Arten als auch weiterer Protozoen-

Gattungen bzw. -Arten zu konstruieren und für den *in situ* Einsatz zu optimieren. So könnten wichtige Informationen zur Phylogenie gewonnen werden (Ludwig et al. 1998, Siefert und Fox 1998). Der zeitersparende und artspezifische Nachweis von pathogenen und apathogenen Vertretern der Gattung *Legionella* sowie verschiedener Amöben wäre außerdem in der Kontrolle von Trinkwasser von großem Nutzen (Hoffmann und Michel 1998; in't Veld, pers. Mitt.).

F.2 Umweltuntersuchungen

F.2.1 *Legionella*

Legionellen sind weltweit verbreitete Umweltbakterien, die sowohl im Boden als auch im Wasser vorkommen (Fliermans 1996). Sie wurden sogar in marinen Gewässern gefunden (Atlas 1999, Ortiz-Roque und Hazen 1987). Sie leben in Biofilmen oder intrazellulär in Protozoen. Aus ihrer natürlichen Umgebung können sie in künstliche Warmwassersysteme gelangen, wo sie sich bedingt durch die höhere Temperatur zu hohen Konzentrationen vermehren (Fliermans 1996). Die natürlichen Habitate stellen somit ein Reservoir für pathogene Bakterien dar. Daher ist es wichtig, mehr über ihre Eigenschaften zu wissen, um potentielle Infektionsquellen besser identifizieren zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb 21 unterschiedliche Gewässer in einem definierten Gebiet charakterisiert sowie auf das Vorhandensein von Legionellen und teilweise auch auf die Verbreitung von Amöben untersucht.

Aus früheren Studien ist bekannt, dass sich verschiedene Faktoren positiv auf das Legionellenwachstum auswirken. Die Angaben für *Legionella* spp. unterscheiden sich hierbei nicht wesentlich von denen für *L. pneumophila* (Fliermans 1996, Fliermans et al. 1981). So gelten hohe Temperaturen als begünstigend (Lee und West 1991, Veríssimo et al. 1991), weshalb in tropischen Gewässern (Ortiz-Roque und Hazen 1987) oder Thermalquellen (Fliermans 1996, Veríssimo et al. 1991) auch höhere Konzentrationen an Legionellen als in gemäßigten Breiten gefunden werden. Allgemein sind Wassertemperaturen zwischen 20 und 50 °C vorteilhaft, das Wachstumsoptimum liegt bei 35 - 40 °C. Es werden pH-Werte zwischen 2,0 und 8,5 toleriert. Erhöhte Leitfähigkeitswerte, hoher Gehalt an organischem Material und niedriger Sauerstoffge-

halt wirken sich positiv auf die Legionellen aus, beides ist in Sedimenten stehender Gewässer mit hohem Trophiegrad zu finden (Fliermans 1996, Zanetti et al. 2000). Stehendes Wasser wird daher bevorzugt, hier wird v. a. das Sediment (Aufenthaltort weiterer Mikroorganismen wie Amöben, Biofilmbildung auf dem Substrat) besiedelt. Assoziationen mit bestimmten Cyanobakterien (*Fisherella*, *Phormidium*, *Oscillatoria*), Protozoen (u. a. *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Naegleria*, *Tetrahymena*), Algen und Wasserpflanzen wurden beschrieben (Fliermans 1996, Fliermans et al. 1981, Flügel 1999, Smith-Somerville et al. 1991, Tison et al. 1980). Verschiedene Gram-negative Bakterien fördern bzw. hemmen das Legionellenwachstum (Steinert 1996, Wadowsky und Yee 1985, Zanetti et al. 2000). *Pseudomonas* wurde von Fliermans (1996) als wachstumsfördernd für Legionellen beschrieben, während Gomez-Lus et al. (1993) und Rowbotham (1986) es als wachstumshemmend bezeichneten. Indirekte Effekte der Pseudomonaden auf Legionellen durch Bildung von für Amöben giftige Pigmente wurden ebenfalls beschrieben (Steinert und Hacker 1996). Die positiven und negativen biologischen Wachstumsfaktoren sind in Tab. C.1 zusammengefasst.

Die in dieser Arbeit gesammelten Daten bestätigen die Studien früherer Autoren, deren Ergebnisse jedoch auf anderen Techniken als FISH basieren (Fliermans et al. 1981, Wilkinson et al. 1990). So konnten auch hier keinerlei Präferenzen weder für *Legionella* spp. noch für *L. pneumophila* entdeckt werden. Die Bakterien sind im Gegenteil in der Lage, relativ breite Spektren der jeweiligen Gewässerparameter zu tolerieren.

Während künstliche Warmwassersysteme meist mit *L. pneumophila* kontaminiert sind (Koide et al. 1993, Steinert 1996, Ta et al. 1995), war in der vorliegenden Arbeit nur in 11,1 % der Proben *L. pneumophila* detektierbar, die anderen *Legionella*-positiven Habitate enthielten andere, nicht näher bestimmte Spezies (80,3 %, Tab. E.5). Die Ursache hierfür könnte in der niedrigeren Temperatur der natürlichen Kaltwassersysteme liegen, die möglicherweise andere *Legionella*-Arten favorisiert. So haben Dennis et al. und Hebert für *L. micdadei* ein längeres Überleben bei niedrigen Temperaturen als für *L. pneumophila* beobachtet (Dennis et al. 1994, Hebert 1980). Genauere Befunde über unterschiedliche Optima verschiedener *Legionella*-Spezies bezüglich physikalischer oder chemischer Wasserparameter liegen jedoch nicht vor. Eine andere Erklärung beruht auf der unterschiedlichen mikrobiellen Begleitfauna, die sich möglicherweise auf das Wachstum der non-*pneumophila*-Arten positiver auswirkt. Da auch hierzu keine Kenntnisse vorliegen und dies somit rein spekulativ ist, sind weitere Untersuchungen nötig, um die biotischen Faktoren näher zu beleuchten.

Verschiedene Autoren weisen auf saisonale Schwankungen im *Legionella*-Vorkommen hin (Fliermans 1996, Lee und West 1991, Tobiansky et al. 1986). Daher wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Gewässer exemplarisch über 30 Monate hinweg regelmäßig beprobt. Es konnten zwar zu jeder Jahreszeit Legionellen nachgewiesen werden, die gefundenen Zellen gingen jedoch für alle detektierten Bakterien in der kalten Jahreszeit deutlich zurück. Exakte quantitative Auswertungen der mittels Kultur und FISH detektierten Bakterien wurden nicht vorgenommen, da das Ergebnis aufgrund der Isolierungs- und Konzentrationsschritte der einzelnen Proben durch methodische Schwankungen verfälscht wäre.

Der Versuch, Legionellen aus Umweltproben auf Agarplatten anzuzüchten, schlug in der Mehrzahl der Fälle fehl. Lediglich aus einem Springbrunnen konnte ein *Legionella*-Stamm isoliert und als *L. micdadei* identifiziert werden. Die Charakterisierung dieses Isolats bezüglich der Vermehrung in Amöben ergab ein zu dem Patientenisolat *L. micdadei* ATCC 33218 unterschiedliches Bild (Abb. E.18, E.19). Das Umweltisolat zeigte weder in *A. castellanii* noch in *H. vermiformis* eine Replikation, lediglich eine Persistenz war zu beobachten. Dagegen vermehrte sich das Patientenisolat in *H. vermiformis* um fast zwei log-Stufen (Abb. E.18) und in *A. castellanii* um knapp eine log-Stufe (Hägele et al. 2000). Demnach bevorzugt *L. micdadei* WUE 18-1 andere Wirtsorganismen. Infektionsassays mit den aus demselben Springbrunnen isolierten Amöben *Echinamoeba* spp., *Naegleria* spp. und *Platyamoeba placida* könnten hierüber Aufschluss geben.

Winn (1999) beschrieb die Isolierung von *L. micdadei* aus Wasserproben als schwieriger im Vergleich zu der von *L. pneumophila*. Aliquots aus jeder Probe wurden auf BCYE- und auf Selektivplatten (VPC-BCYE) ausplattiert, außerdem wurde ein Teil der Proben einer Säure- bzw. Hitzebehandlung unterzogen (D.21). Trotz dieser Maßnahmen wuchsen meist sehr viele Begleitorganismen hoch und verhinderten so evtl. eine Koloniebildung der nur langsam wachsenden Legionellen. Dieselben Probleme bei der Isolierung hatten bereits Ortiz-Roque und Hazen (Ortiz-Roque und Hazen 1987). Aus künstlichen Wassersystemen werden dagegen bei Routineuntersuchungen regelmäßig Legionellen isoliert und kultiviert (in't Veld, pers. Mitt.; Müller 1988). Möglicherweise sind bedingt durch die niedrigeren Temperaturen in natürlichen Kaltwassersystemen mehr Legionellen in einem nicht kultivierbaren Zustand (VBNC). Dagegen spricht allerdings, dass auch Wiederbelebungsversuche mittels Amöbenpassage über *A. castellanii* und *H. vermiformis*, wie sie von Steinert et al. erfolgreich durchgeführt wurden, keine kultivierbaren Kolonien ergaben (Steinert et al. 1997). Da sich nicht alle Legionellen aufgrund ihres eingeschränkten Wirtsspektrums in einer dieser beiden Amöben replizieren können

(Fields 1996), müssten weitere Amöbenarten für die Passage herangezogen werden (siehe Abb. E.18, E.19). Andererseits sind aus Süßwasser nur 0,25 % der Mikroorganismen, die mikroskopisch detektiert werden können, auf künstlichen Medien anziehbar. Das liegt entweder am metabolischen Zustand der Bakterien oder am Mangel an geeigneten Nährböden (Amann 1995). So wären speziellere Nährstoffansprüche der Umweltisolate im Vergleich zu Laborstämmen von Legionellen denkbar. Es sind jedoch auch Legionellen bekannt, die sich auf künstlichen Nährmedien überhaupt nicht anziehen lassen sondern obligat intrazellulär leben, wie z. B. verschiedene LLAP's (*Legionella*-like amoebal pathogens) (Adeleke et al. 1996). Denkbar ist zudem, dass trotz Filtration und Zentrifugation der Proben die Konzentration an kultivierfähigen Legionellen in den ausplattierten Aliquots zu gering war.

F.2.2 Amöben

Da die Legionellen keine erkennbaren Präferenzen für bestimmte Habitate bezüglich verschiedener Wasserparameter aufwiesen und meistens in Assoziation mit anderen Mikroorganismen leben, sollte diesen Organismen mehr Beachtung geschenkt werden. Vielleicht lassen sich anhand ihrer Verbreitung und Präferenzen die *Legionella*-Habitate genauer kennzeichnen.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Amöbenfauna von drei Gewässern analysiert. Freilebende Süßwasser-Amöben sind wie die Legionellen weltweit verbreitet. Sie leben in feuchtem Boden, benthisch in Süß- und Salzwasser, auf der Oberfläche von Unterwasserpflanzen und -tieren, oberirdischen Pflanzenteilen und in Vertebraten. Es gibt nur wenige ökologische Arbeiten über Amöben (de Jonckheere 1991). Doch es ist bekannt, dass ihr Vorkommen von den abiotischen Faktoren pH, Temperatur, Salinität, Osmolarität, Gehalt an organischen Stoffen und der Konzentration an schwefliger Säure beeinflusst wird. Außerdem spielt die Verfügbarkeit von besiedelbaren Oberflächen eine wichtige Rolle, da Amöben nicht pelagisch leben. Der pH-Wert wirkt sich auf viele Faktoren, die das Amöbenvorkommen bestimmen, aus. So hat er beispielsweise Effekte auf das Nahrungsangebot sowie die Adsorption und Aktivität von Enzymen. Unter widrigen Umweltbedingungen bilden Amöben Zysten zur Überdauerung oder als alternative Überlebensstrategie kleinere und dafür zahlreichere Zellen (Rodríguez-Zaragoza 1994). Vermutlich fungieren nicht alle Arten als potentielle Wirte der Legionellen, und wahrscheinlich gibt es Parameter, die das Vorkommen einzelner Arten stark einschränken.

Die im Rahmen dieser Arbeit am häufigsten gefundene Amöbengattung war *Naegleria*. Die meisten kultivierten Spezies gehören aufgrund ihrer Temperaturtoleranz zum nicht humanpathogenen *Naegleria gruberi*-Komplex (Ferrante 1991, Page und Siemensma 1991). Zu dieser Gruppe gehört bislang neben *N. gruberi* nur noch die Art *N. jadini*, es werden jedoch laufend neue Arten postuliert (Adams et al. 1989, Robinson et al. 1992). Eine exakte Artbestimmung der Naeglerien ist durch morphologische Merkmale nicht möglich (Clark und Cross 1988a, Clark et al. 1989). Die tatsächliche Pathogenität der Isolate lässt sich nur im Tiermodell (Mäuse-Inokulationstest) feststellen (Hoffmann und Michel 1998). Einige Isolate zeigten eine späte und nur sehr spärliche Flagellierung, die Fähigkeit zur Flagellatenbildung kann jedoch bei manchen Stämmen nach mehrmaligem Überimpfen verloren gehen (Page und Siemensma 1991). Dank dieser Flagellatenstadien haben Naeglerien die Möglichkeit, ihre Habitate auszudehnen (de Jonckheere 1991). *Naegleria* wurde bereits von zahlreichen Autoren als potentieller *Legionella*-Wirt erwähnt (Brown und Barker 1999, Fields 1996, Henke und Seidel 1986, Kuroki et al. 1998a, Rodríguez-Zaragoza 1994, Rohr et al. 1998, Rowbotham 1980, Szénási et al. 1998).

Aus einem Teich wurde im Herbst eine *Didascalus*-like Amöbe kultiviert. Der Status der Gattung *Didascalus* ist umstritten (de Jonckheere et al. 1997), im aktuellen ATCC-Katalog wird *Didascalus thorntoni* als *Naegleria thorntoni* aufgeführt (www.atcc.com). Die isolierten Amöben zeigen typische Merkmale sowohl von *Naegleria* als auch von *Didascalus* (siehe E.4.5). Das positive Signal in der *in situ* Hybridisierung mit der Sonde NAEG1088 kann jedoch als Hinweis auf die Identität des Stammes mit *Naegleria* gewertet werden. Ein Sequenzvergleich von NAEG1088 mit der 18S rRNA von *D. thorntoni* (accession number x93085) ergab deutliche Unterschiede. Vermutlich handelt es sich also um ein untypisches *Naegleria*-Isolat oder sogar um eine neue *Naegleria*-Art.

Ebenfalls häufig in den untersuchten Proben waren *Echinamoeba* spp. sowie sogenannte *Echinamoeba*-like Amöben. Letztere lassen sich morphologisch gesehen den Echinamoeben zuordnen, sie bilden allerdings keine Zysten. Da die Zystenbildung von Page und Siemensma (1991) jedoch als Gattungsmerkmal beschrieben wurde, stellen die in der Literatur als *Echinamoeba*-like bezeichneten Amöben (Rohr et al. 1998) entweder eine neue, zystenlose *Echinamoeba*-Art dar oder gehören in eine eigenständige Gattung. Möglicherweise ist die fehlende Zystenbildung auch nur eine Antwort auf die veränderte Umwelt im Labor und spiegelt nicht die tatsächlichen Eigenschaften der Amöben wider. So wird die Fähigkeit zur Enzystierung durch unterschiedlichste Faktoren beeinflusst. Sie ist z. B. abhängig von der Art der Bakteriennahrung (Michel,

pers. Mitt.), die im Labor meist deutlich von den Bedingungen im natürlichen Habitat abweicht, oder kann nach mehrmaligem Passagieren verloren gehen (Page und Siemensma 1991). Die Unfähigkeit zur Zystenbildung kann auch durch Endozytobionten verursacht werden (Michel et al. 1998b). Eine genaue Bestimmung dieser Amöben ist daher nur auf molekularer Ebene anhand von Sequenzvergleichen oder Isoenzymmustern möglich. *Echinamoeba* wurde in der Literatur mehrmals als potentieller Wirt für Legionellen genannt (Breiman 1996, Campbell et al. 1994, Fields 1996, Fields et al. 1990).

Jeweils nur in einzelnen Proben gefunden wurden die als potentielle *Legionella*-Wirte beschriebenen Amöben *Acanthamoeba* sp. (Gruppe II), *Hartmannella* sp., *Saccamoeba* sp. und *Vexillifera* sp. (Fields 1996, Kuroki et al. 1998b, Newsome et al. 1998, Paszko-Kolva et al. 1998, Rohr et al. 1998).

Hartmannella wurde häufig aus *Legionella*-kontaminierten Warmwassersystemen isoliert (Fields 1993, Rohr et al. 1998). Evtl. ist die in natürlichen Gewässern deutlich niedrigere Temperatur ein Selektionsnachteil für diese Gattung, so dass sie von anderen, besser adaptierten Amöben verdrängt wird.

Die bevorzugte Wachstumstemperatur für *Acanthamoeba* liegt deutlich unter der von *N. fowleri* (35 °C) (Ferrante 1991), damit wäre sie in den untersuchten natürlichen Gewässern mit Temperaturen von max. 22 °C (Tab. E.4) in höherer Anzahl zu erwarten gewesen. Die Wachstumsrate von Acanthamoeben ist jedoch geringer als die von Naeglerien (Ma et al. 1990). Möglicherweise wurde die Gattung daher in manchen Proben übersehen, weil sie von den schnell wachsenden Naeglerien einfach überwuchert wurde. Außerdem haben Acanthamoeben durch das fehlende Flagellatenstadium einen geringeren Aktionsradius im Vergleich zu Naeglerien (de Jonckheere 1991).

Thecamoeba quadrilineata wurde aus einer Sommerprobe aus dem Main isoliert. Diese relativ große Amöbe wanderte bei der Isolierung auf NNA-Platten erst sehr spät aus dem Filter aus. Dies könnte auf ein häufigeres Vorkommen der Gattung hindeuten, die durch ihre relative Trägheit jedoch oft übersehen wird. Ob die Art ein potentieller Wirtsorganismus für Legionellen darstellt, ist unbekannt. Untersuchungen mit axenischen *Thecamoeba*-Kulturen, die mit *Legionella* direkt infiziert oder mit *Legionella*-enthaltenden Naeglerien gefüttert werden, könnten Aufschluss darüber geben.

Aus der Springbrunnen-Probe 18-2 konnte außer *Echinamoeba* und *Naegleria* noch *Platyamoeba placida* kultiviert werden. Diese zystenbildenden Amöben wurden bisher im Zusammenhang mit Legionellen nur von Kuroki et al. aus Japan erwähnt (Kuroki et al. 1998a).

Die aus diesem Habitat kultivierten drei Gattungen stellen wahrscheinlich nur einen Ausschnitt aus der Gesamt-Amöbenfauna dar, da nur ein einziges Mal im Winter Amöben isoliert wurden. Protozoen weisen jedoch saisonal bedingte Schwankungen in ihrer Population auf (Kyle und Noblet 1987, O'Dell 1979, Rodríguez-Zaragoza 1994). Somit ist zu erwarten, dass Isolierungen von Amöben zu anderen Jahreszeiten mehr Arten ergeben werden.

Es lassen sich aus den vorgenommenen Untersuchungen noch keine endgültigen Schlüsse auf mögliche Habitatspräferenzen der gefundenen Amöben ziehen. Dies liegt zum Teil an der schwierigen Kultivierung. So ließen sich einige Amöben, bevor sie genau bestimmt werden konnten, nicht mehr auf den *Klebsiella*-NNA-Platten anziehen. Langsam wachsende Arten wurden durch schneller wachsende Arten möglicherweise verdrängt und konnten nicht mehr berücksichtigt werden. Andere Platten wurden v. a. im Sommer durch Pilze überwuchert. Einige Isolate ließen sich anhand morphologischer Merkmale nicht bestimmen, hier wären molekulare Bestimmungsmethoden wie Sequenzierung oder Isoenzymmuster nötig gewesen. Rowbotham fand heraus, dass für sehr kleine Amöben *Klebsiella*-Bakterien als Futter zu groß sind (Rowbotham 1986). Eventuell vorkommende Arten dieser Größe ließen sich daher in der vorliegenden Arbeit nicht kultivieren.

Anhand der Isolierungshäufigkeit der gefundenen *Naegleria*- und *Echinamoeba*-Stämme kann man spekulieren, dass diese beiden Amöben bevorzugte Wirte für die Legionellen in natürlichen Kaltwassersystemen darstellen. Um dies zu belegen, sind jedoch weitere Studien nötig. Wünschenswert ist daher neben einer für Protozoen verbesserten FISH-Methode auch die Entwicklung neuer spezifischer Sonden, um die Amöben direkt aus den Umweltproben detektieren und identifizieren zu können, wie dies für Bakterien bereits möglich ist.

F.3 mRNA-Hybridisierung

Die *in situ* rRNA-Hybridisierung eignet sich sehr gut zur Identifikation von lebenden Mikroorganismen in ihrem Habitat. Diese Methode sagt jedoch nichts über die Funktion der Organismen in ihrer Umgebung aus. Um diese Lücke zu schließen und die physiologischen Aktivitäten zu analysieren, wurden verschiedene molekulare Techniken zum Nachweis der bakteriellen mRNA entwickelt (Hahn et al. 1993, Hodson et al. 1995, Hönerlage et al. 1995, Hurek et al. 1997, Schmid 1998, Tolker-Nielsen et al. 1997). Eine Kombination der rRNA-gerichteten *in situ* Identifizierung und des mRNA-gerichteten Expressionsnachweises des Virulenzfaktors *iap* (invasion associated protein) konnte bei *Listeria monocytogenes* erfolgreich durchgeführt werden (Wagner et al. 1998).

Der Nachweis von mRNA mit Gensonden weist im Vergleich zu anderen Methoden entscheidende Vorteile auf. Polyribonukleotid-Transkriptsonden werden aufgrund ihrer Länge nicht vollständig in die Zielzelle aufgenommen und ragen so teilweise nach außen über die Zellwand hinaus. Durch eine Kopplung dieser SONDENSCHWÄNZE AN PARAMAGNETISCHE KÖRPER SIND SPEZIFISCHE ANREICHERUNGEN VON ZIELZELLEN AUS UMWELTPROBEN MÖGLICH (Stoffels et al. 1999). Studien zur spezifischen Genexpression mittels Fusionen der zu untersuchenden Gene mit Reporter Genen, wie z. B. *lux* für die bakterielle, lichtproduzierende Luciferase (Sternberg et al. 1997) oder *gfp* für das grün fluoreszierende Protein (Köhler et al. 2000), erfordern immer den Einsatz von gentechnisch veränderten Organismen. Dabei besteht die Möglichkeit, dass diese Genfusionen die Expression der nachzuweisenden mRNA in den transformierten Klonen im Vergleich zum nicht modifizierten Organismus beeinflussen. Das GFP leuchtet zudem noch Stunden nach der bereits beendeten Genexpression, so dass keine exakte zeitliche Definierung der Expression möglich ist. Neben dem Einsatz von Reporter Genen wurde auch die *in situ* RT-PCR erfolgreich zum Nachweis von mRNA in Bakterien verwendet (Hodson et al. 1995, Tolker-Nielsen et al. 1997). Bei diesem Verfahren wird jedoch nicht zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden.

In dieser Arbeit sollte die Genexpression des Virulenzfaktors *mip* von *L. pneumophila* mittels Dot blot- und *in situ* Hybridisierung der *mip*-mRNA analysiert werden. Da es zunächst um die allgemeine Etablierung dieser Methode in *Legionella* ging, wurde die mRNA eines Gens als Zielmolekül gewählt, das konstitutiv hoch exprimiert in der Zelle vorliegt (Dumais-Pope et al. 1993). Mip ist für das intrazelluläre Überleben der Legionellen sowohl in Protozoen als auch in Makrophagen wichtig (Cianciotto und Fields 1992, Doyle et al. 1998, Wintermeyer et al. 1995). Es wird sowohl in virulenten als auch in avirulenten Vertretern der Gattung *Legionella* exprimiert (Köhler et al. 2000).

Für den *in situ* Nachweis von mRNA in Bakterien sind aufgrund ihrer geringen zellulären Konzentration in der Regel Maßnahmen zur Signalamplifikation erforderlich, die z. B. auf enzymatischen Umsetzungen basieren. Hierfür stehen direkt bzw. indirekt enzymatisch markierte Oligo- (Zarda et al. 1991) oder mehrfach markierte Polyribonukleotidsonden (Trebesius et al. 1994) zur Verfügung. Durch kombinierte Amplifizierungen kann ein bis zu achtfach verstärktes Signal erzielt werden (Yamaguchi et al. 1996). Die allgemeinen Vorteile in der Anwendung und Detektion durch die Markierung von Sonden mit DIG wurden ausführlich von Höltke et al. beschrieben (Höltke et al. 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurde mit DIG- und FLUOS-markierten Sonden hybridisiert. Der Einsatz der direkt fluoreszenzmarkierten Polyribonukleotidsonde zeigte jedoch aufgrund der niedrigen mRNA-Menge und der fehlenden Signalverstärkung keine detektierbaren Signale. Daher wurden die FLUOS-markierten Sonden nicht weiterverwendet, und es wird auch im folgenden nicht näher auf ihre Anwendung eingegangen.

Die Polyribonukleotidsonden werden mittels *in vitro* Transkription hergestellt. Als Matrize dient meist ein zuvor durch Klonierung amplifiziertes DNA-Stück. Die Klonierung der gewünschten *mip*-Sequenz scheiterte allerdings, möglicherweise aufgrund von negativen Wechselwirkungen zwischen Vektor und Insert. Daher wurde die Matrize mittels PCR amplifiziert. Anhand dieser Vorlage synthetisiert eine T7-Polymerase die Transkriptsonde und baut zu 50 % DIG-11-UTP in den Strang ein (Abb. F.2). Nach der Hybridisierung folgt eine Inkubation mit einem anti-DIG-POD-F_{ab}-Fragment. Durch die anschließende Tyramid-Signal-Amplifikation werden das Enzym Peroxidase und das im TSA[™]-direct-(Red)-Kit enthaltene cy3-Tyramid zu einem reaktiven Radikal umgesetzt. In dieser radikalischen Form lagert sich das cy3-Tyramid an elektronenreiche Bereiche in unmittelbarer Nähe der Zelloberfläche an. Dabei dienen Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten (z. B. Tryptophan oder Phenylalanin) als Anheftungspunkte des Radikals. Nicht gebundenes radikalisches sowie nicht umgesetztes cy3-Tyramid werden durch Waschschriffe entfernt (Abb. F.3). Die Hybridisierung kann nun am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

Um mögliche Falsch-Positiv-Reaktionen durch unspezifisches Binden der Sonde ausschließen zu können, wurden die Versuche nicht nur mit der Sonde *mip*-Poly-antisense sondern auch mit der Negativkontrolle *mip*-Poly-sense durchgeführt.

Da stationäre Bakterien oft nur eingeschränkt für Gensonden zugänglich sind (Schmid 1998) und in dieser Lebensphase auch kaum mRNA produzieren, wurden für die RNA-Isolierungen und für die *in situ* mRNA-Hybridisierungen nur Bakterien aus der frühen logarithmischen Wachstumsphase verwendet, um eine ausreichende Menge an nachweisbarer mRNA zu gewährleisten.

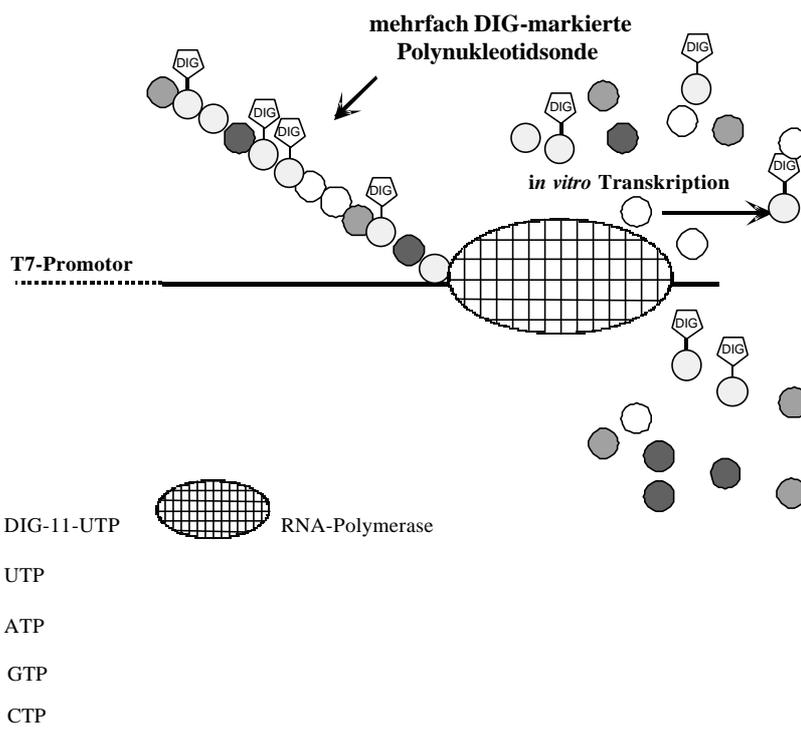


Abb. F.2: Herstellung von mehrfach markierten Polynukleotidsonden durch *in vitro* Transkription unter Verwendung von DIG-11-UTP als Reporter-molekül (nach Schmid 1998).

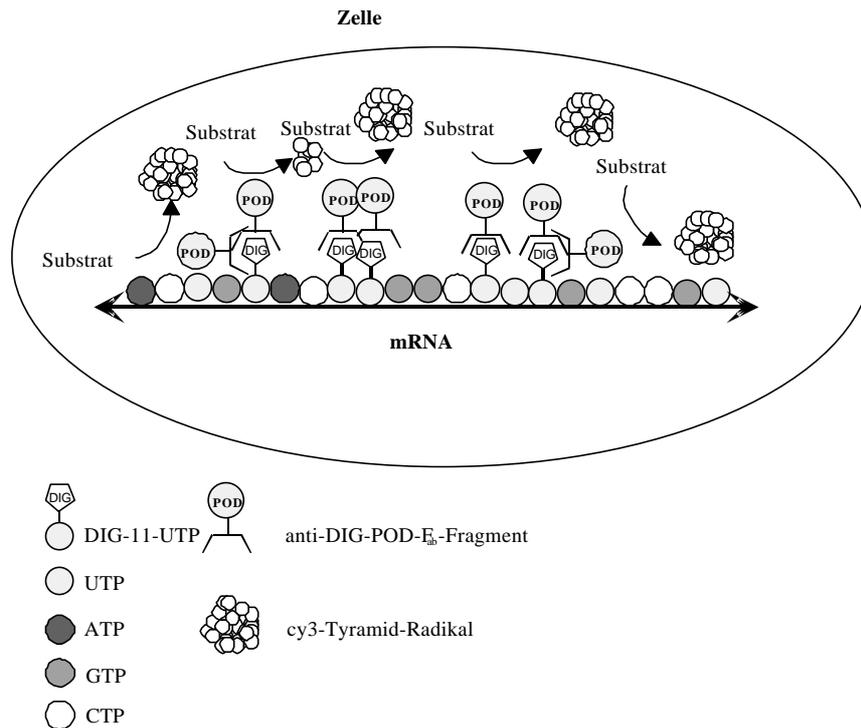


Abb. F.3: Detektion mit dem Tyramid-Signal-Amplifikationssystem nach Hybridisierung mit einer mehrfach DIG-markierten Polyribonukleotidsonde (nach Schmid 1998).

Die Ergebnisse der Dot blot-Hybridisierung ergaben mit *mip*-Poly-antisense unter niedrig-stringenten Bedingungen (60 % Formamid) korrekterweise positive Signale bei den Zielzellen und kein Signal bei *Listeria monocytogenes*. Der Dot blot mit *mip*-Poly-sense zeigte mit allen RNA-Proben ein positives Signal, das für die Listerien jedoch etwas weniger intensiv war (Abb. E.6). Die daraufhin erhöhte Stringenz (70 bzw. 80 % Formamid) brachte keine Verbesserung sondern zusätzliche Signale der Nichtzielzellen mit *mip*-Poly-antisense (Abb. E.7).

Auch die *in situ* Hybridisierungen mit den Polyribonukleotidsonden zeigten nicht das gewünschte Ergebnis (Tab. E.5). Entweder es leuchteten alle Bakterien mit *mip*-Poly-antisense, oder die Hybridisierung mit *mip*-Poly-sense ergab ebenfalls ein Signal.

Um den Durchtritt für Enzyme wie die 44 kDa große Peroxidase oder Enzym-markierte Antikörper wie das 240 kDa große anti-DIG-POD-F_{ab}-Fragment zu ermöglichen, werden in Gram-positiven Organismen eine Fixierung mit EtOH sowie enzymatische Vorbehandlungen benötigt (Schönhuber et al. 1997). Zur Optimierung der Versuchsbedingungen wurden daher auch die Gram-negativen Legionellen EtOH-fixiert bzw. zusätzlich mit Lysozym permeabilisiert. Dies

resultierte jedoch in einem völligen Zerfall der Zellen und einer somit nicht mehr auswertbaren Hybridisierung.

Weitere *in situ* Versuche wurden, um die Bindungsgenauigkeit zu erhöhen, mit einfach DIG-markierten Oligonukleotidsonden durchgeführt. Diese kurzen Sonden können auch noch an bereits im Abbau befindliche mRNA binden, die DNA-RNA-Bindung gilt allgemein als stabiler als die RNA-RNA-Bindung, außerdem kann es durch den gleichzeitigen Einsatz mehrerer Sonden zu (nicht vorhersagbaren) Signalverstärkungen kommen. Schmid beschrieb andererseits eine deutlich geringere Signalintensität bei der Verwendung von einfach markierten Oligonukleotidsonden im Vergleich zu Polyribonukleotidsonden, da letztere mehrfach DIG-markiert sind (Schmid 1998). In den durchgeführten Versuchen gab es zwar ein detektierbares Signal, es konnte allerdings wiederum keine Stringenz ermittelt werden, bei der die Sonden ein befriedigendes Ergebnis bezüglich ihrer Spezifität lieferten (Tab. E.6).

Der Grund für die ungenügende Spezifität der mRNA-Hybridisierung konnte nicht abschließend ermittelt werden. Denkbar ist, dass das *mip*-Gen aufgrund seiner Sequenzeigenschaften nicht für diese Methode geeignet ist. Dies wäre auch eine Erklärung für die Probleme bei der Klonierung. Möglicherweise befindet sich der für die Sonden gewählte Sequenzabschnitt an einer ungünstigen Stelle, so dass es zu unspezifischen Reaktionen mit der mRNA-Sekundärstruktur kommt, was die positiven Signale mit der sense-Kontrollsonde erklären würde. Eine alternative Erklärung ist, dass Legionellen eine spezielle Vorbehandlung für die mRNA-Hybridisierung benötigen, die in dieser Arbeit nicht getestet wurde. Versuche mit weiteren *Legionella*-Genen, veränderten Fixierungs- und/oder Hybridisierungsbedingungen bzw. mit anderen Gramnegativen Bakterien könnten darüber Aufklärung geben.