

C. Einleitung

C.1 Biologie von *Legionella* spp.

Durch die zunehmende Technisierung im vergangenen Jahrhundert hat sich die Umwelt grundlegend verändert. Unter anderem haben künstlich geschaffene Habitate verschiedenen Mikroorganismen die Ausweitung ihres Lebensraums ermöglicht. Dies stellt für Menschen dann ein Problem dar, wenn sich pathogene Keime durch die optimierten Wachstumsbedingungen rapide vermehren können und den Mensch als neuen Wirt 'besiedeln'. So sind während der letzten Jahrzehnte eine Reihe neuer Krankheitserreger bekannt geworden. Zu ihnen gehört auch *Legionella pneumophila*. Dieses aquatische Bakterium war in der Lage, sich in künstlichen Warmwassersystemen, meist intrazellulär in Protozoen, zu etablieren. In dieser Arbeit sollten Nachweismethoden für Legionellen und ihre einzelligen Wirte entwickelt und mit ihrer Hilfe die Lebensweise dieser Mikroorganismen genauer untersucht werden.

C.1.1 Allgemeine Merkmale

Taxonomisch gehören Legionellen zur γ -Gruppe der Proteobakterien. Sie bilden hier als einzige Gattung die Familie der *Legionellaceae* (Fry et al. 1991, Winn 1999). Basierend auf genetischen und serologischen Analysen sind bislang 42 Arten mit 65 Serogruppen beschrieben worden, weitere Spezies und Serogruppen sind zu erwarten. Die bekannten Arten wurden aus Umwelt- bzw. Patientenproben auf künstlichen Medien isoliert, einzelne Spezies ließen sich nur intrazellulär in Amöben kultivieren (Lück und Helbig 1997). Der Lebenszyklus der Legionellen mit ihrem dualen Wirtssystem ist in Abb. C.1 dargestellt.

Legionellen sind dünne Stäbchenbakterien mit 1,5 - 5 μm Länge und 0,3 - 0,9 μm Dicke, in Kulturmedien können sie bis zu 50 μm lange Filamente bilden. Sie haben eine Gram-negative Zellwand, in der verzweigte Fettsäuren dominieren, lassen sich jedoch mit der Gram-Färbung nur schlecht darstellen (Lück und Helbig 1997). Sie besitzen Pili und eine polare Flagelle (Hacker 2000a). Sie bilden keine Sporen und keine Kapsel. Legionellen sind weder fermentativ noch saccharolytisch. Außer *L. micdadei* sind sie nicht säurefest (Lück und Helbig 1997). Alle Arten sind positiv für Peroxidase und Katalase, aber nur einige Vertreter verfügen über β -

Lactamase und Gelatinase (Heuner 1997, Winn 1999). Die Bakterien nutzen Aminosäuren als primäre Kohlenstoff- und Energiequelle. Sie benötigen lösliche Eisensalze und L-Cystein zur Reduktion von unlöslichen, dreiwertigen Eisenverbindungen (Kapfhammer 1998). Der Mechanismus der Eisenaufnahme ist noch nicht endgültig aufgeklärt, siderophorähnliche Strukturen wurden von Liles et al. beschrieben und als Legiobactin bezeichnet (Liles et al. 2000). Legionellen leben strikt aerob, ihr Wachstum wird durch 5 % CO₂ in der Atmosphäre stimuliert (Winn 1999).

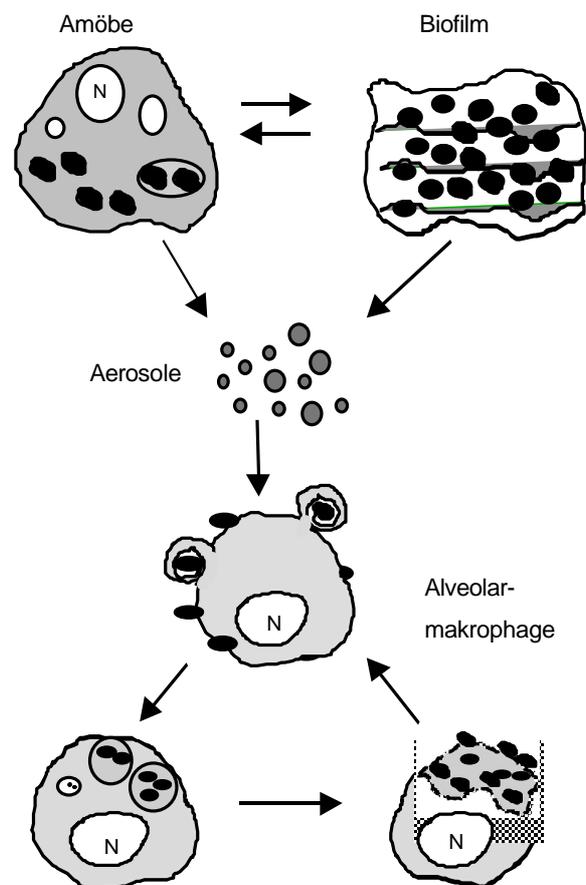


Abb. C.1: Lebenszyklus von *Legionella* spp. mit dualen Wirtssystem (nach Hacker 2000a).

Für die Anzucht im Labor hat sich BCYE-Agar (buffered charcoal yeast extract) als künstliches Festmedium bewährt. Dieses Medium enthält neben Hefeextrakt als Nährstoff noch Aktivkohle zur Eliminierung toxischer Sauerstoffradikale, ACES zur Pufferung, lösliche Eisensalze und die essentielle Aminosäure L-Cystein. Zur Anzucht in Flüssigmedium gilt YEB (yeast extract, buffered) als ideal, das außer Agar und Aktivkohle die gleichen Inhaltsstoffe wie BCYE aufweist.

Das Wachstum erfolgt bei 5 % CO₂, 80 - 90 % Luftfeuchtigkeit und meist 37 °C (Lück und Helbig 1997). Auf Agarplatten bilden die Bakterien nach drei bis fünf Tagen weißliche bis bläuliche oder gräuliche, ganzrandige, uhrglasförmig gewölbte Kolonien. Einige Arten fluoreszieren unter UV-Licht glänzend weiß, rot oder matt grün (ISO/CD 11731-2 1998).

C.1.2 Verbreitung in der Umwelt

Legionellen sind in der Lage, sowohl verschiedene Süß- als auch Salzwasserhabitats zu besiedeln (Atlas 1999). In diesen natürlichen Kaltwasserbiotopen erreichen sie Keimzahlen von bis zu 10 Bakterien pro Liter Wasser (Steinert 1996). Aufgrund ihrer hohen Nährstoffansprüche leben sie hier ausschließlich assoziiert mit anderen Mikroorganismen in Biofilmen oder intrazellulär in Protozoen, die in den oft nährstoffarmen Gewässern die benötigten Wachstumsfaktoren bereitstellen (Barbaree et al. 1986, Lück und Helbig 1997, Rowbotham 1986).

Gelangen die Legionellen in künstliche Warmwassersysteme, können sie sich auf bis zu 10⁶ Zellen pro Liter vermehren (Lück und Helbig 1997). Begünstigt durch die hohen Temperaturen sind sie in der Lage, ihre Habitats auf Wasserleitungen, Duschen, Whirlpools, Schwimmbäder, Kühltürme, Klimaanlage, Luftbefeuchter, Beatmungs- und Inhalationsgeräte, usw. auszudehnen. Durch den Schutz von Einzellern bzw. Biofilmen sind sie außerdem vor ungünstigen Bedingungen wie pH- oder Osmolaritätsschwankungen geschützt. Dies hat besondere Bedeutung für die Sanierung kontaminierter Wassersysteme durch thermische oder chemische Desinfektion, wie die nachfolgenden Beispiele belegen.

So sind Zellen aus Biofilmen über 500 mal resistenter gegen antibakterielle Agenzien als frei lebende Bakterien (Costerton et al. 1995). Intrazellulär in Protozoen lebende *L. pneumophila* waren sogar 1000 mal resistenter gegenüber Antibiotika und Bioziden als Bakterien, die auf künstlichen Medien kultiviert wurden (Brown und Barker 1999).

L. pneumophila ist im Inneren von *Acanthamoeba polyphaga*-Zysten in der Lage, eine Desinfektion mit 50 ml/l Chlor zu überleben (Bernander und Kallings 1998). Eine subletale Desinfektionsdosis stimuliert zudem die Enzystierung von Amöben (Wienicka-Krusnell und Linder 1999). So wird durch eine ungenügende Desinfektion von kontaminiertem Wasser sogar die Überlebensrate der Legionellen in den Amöbenzysten gesteigert.

Mit Legionellen infizierte Hartmannellen und Saccamoeben tolerieren Temperaturen bis zu 50 °C (Atlas 1999). In einem anderen Versuch überlebten 6 % der *Acanthamoeben*-Zysten eine

thermische Behandlung mit 80 °C (Wienicka-Krusnell und Linder 1999). Da Amöben in Biofilmen noch besser geschützt sind, überleben hier wahrscheinlich noch mehr eine solche Erhitzung, und damit auch die intrazellulär vorliegenden Legionellen.

C.1.3 Intrazelluläre Vermehrung in Protozoen

Protozoen stellen die Wirte der Legionellen sowohl in natürlichen als auch künstlichen Gewässern dar (Abb. C.1, C.2). Das Überleben der Bakterien in der Umwelt ist oft wesentlich von dieser Fähigkeit der intrazellulären Persistenz abhängig (Brown und Barker 1999). Abu Kwaik et al. postulierten daher ein ausschließliches Vorkommen von Legionellen in Protozoen und schlossen ein extrazelluläres Wachstum in Biofilmen aus (Abu Kwaik et al. 1998). Verschiedene Studien belegen, dass eine Vermehrung der Bakterien nur in solchen Gewässern stattfand, die auch Amöben enthielten (Atlas 1999). Bei Temperaturen unter 20 °C werden die Bakterien allerdings von den Protozoen als Nahrungsquelle benutzt und verdaut (Lück und Helbig 1997). Zahlreiche Amöben und Ciliaten sind in der Literatur als potentielle Wirte für Legionellen beschrieben worden (Tab. C.1). Manche Arten wie *L. anisa* oder *L. micdadei* weisen eine hohe Wirtsspezifität auf, während *L. pneumophila* sich in nahezu allen genannten Wirtsorganismen replizieren kann (Barbaree et al. 1986, Fields et al. 1990, Gao et al. 1999).

Wie Studien mit Inhibitoren zeigten, verläuft die Aufnahme der Bakterien in die Protozoen Rezeptor-vermittelt, z. B. bei *Hartmannella vermiformis* über den Gal/GalNAc-Lectin-Rezeptor (Stone et al. 1999, Venkataraman et al. 1997), und ist unabhängig von Mikrofilamenten und Mikrotubuli (Abu Kwaik 2000). Venkataraman et al. konnten außerdem zeigen, dass durch die Adhärenz von *Legionella* an *Hartmannella* mehrere Proteine im Amöben-Zytoskelett Tyrosin-phosphoryliert werden (Venkataraman et al. 1998). Dies geschieht unabhängig von der späteren Invasion. Für *L. pneumophila* wurde in wenigen Fällen auch eine 'coiling'-Phagozytose analog zur Aufnahme in humane Makrophagen beschrieben (C.1.4) (Bozue und Johnson 1996, Venkataraman et al. 1998), nicht jedoch für *L. micdadei* (Gao et al. 1999).

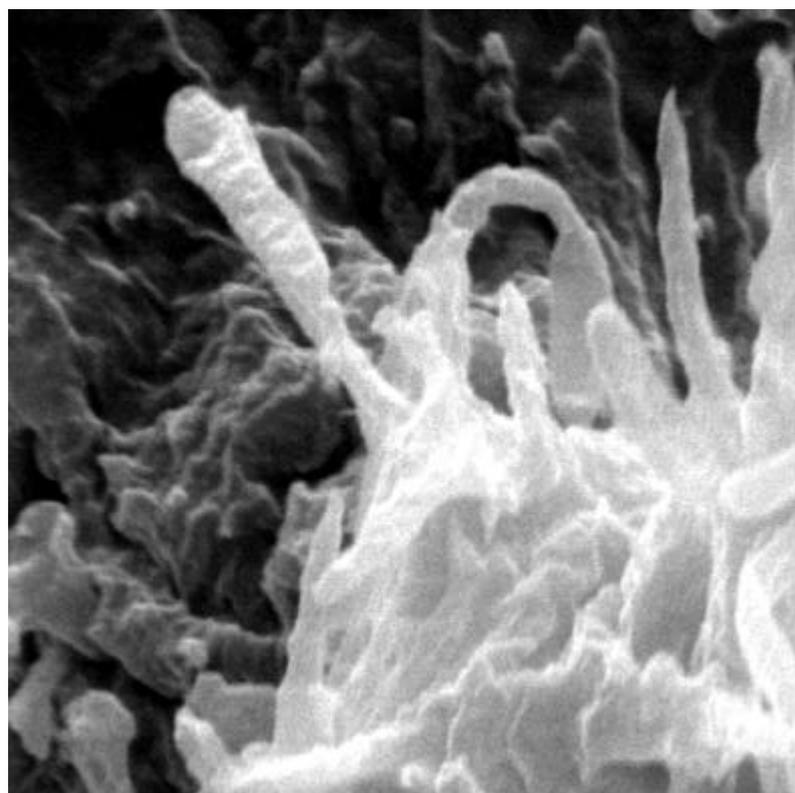
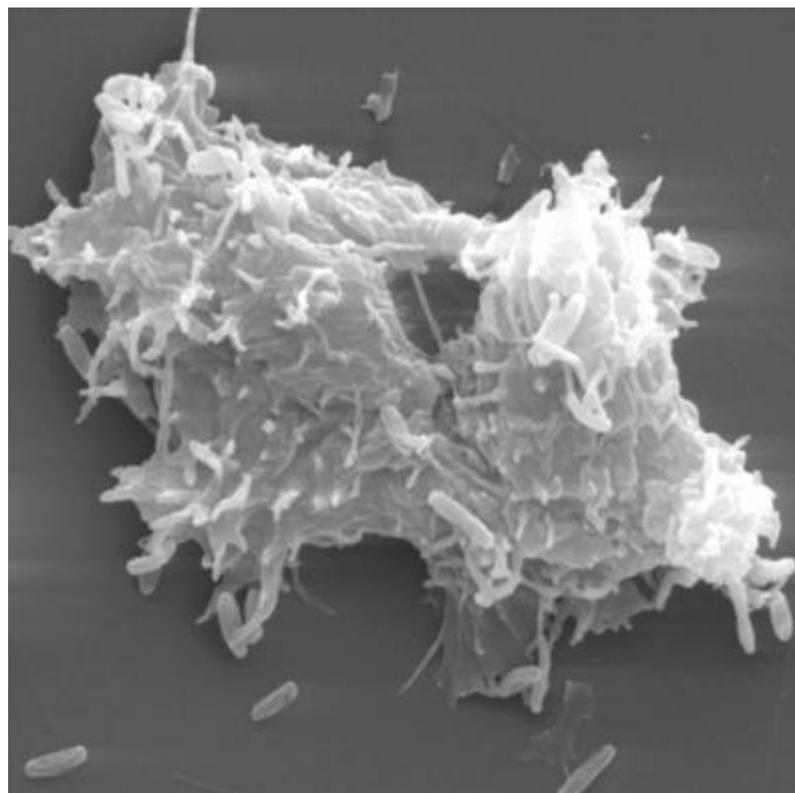


Abb. C.2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Infektion von *A. castellanii* mit *L. pneumophila* Corby. Bereits zehn Minuten nach Zugabe der Bakterien sind Adhärenz und Phagozytose der Legionellen zu beobachten (Merkert und Grimm, unveröff.).

Tab. C.1: Biologische Faktoren, die das Wachstum von *Legionella* spp. beeinflussen.

Organismus	Art des Einflusses	Referenz	
Amöben:	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	Potentieller Wirt	Rowbotham 1986
	<i>A. culbertsoni</i>	Potentieller Wirt	Fields 1993
	<i>A. griffini</i>	Potentieller Wirt	Jaulhac et al. 1993
	<i>A. lenticulata</i>	Potentieller Wirt	Tyndall et al. 1993
	<i>A. palestinensis</i>	Potentieller Wirt	Rowbotham 1986
	<i>A. polyphaga</i>	Potentieller Wirt	Rowbotham 1986
	<i>A. royreba</i>	Potentieller Wirt	Fields 1993
	<i>Echinamoeba exundans</i>	Potentieller Wirt	Fields et al. 1990
	<i>Hartmannella cantabrigiensis</i>	Potentieller Wirt	Rowbotham 1986
	<i>H. vermiformis</i>	Potentieller Wirt	Rowbotham 1986
	<i>Naegleria fowleri</i>	Potentieller Wirt	Newsome et al. 1985
	<i>N. gruberi</i>	Potentieller Wirt	Fields 1993
	<i>N. jadini</i>	Potentieller Wirt	Fields 1993
	<i>N. lovaniensis</i>	Potentieller Wirt	Fields 1993
	<i>Platyamoeba placida</i>	Potentieller Wirt	Kuroki et al. 1998a
	<i>Saccamoeba</i> spp.	Potentieller Wirt	Rohr et al. 1998
	<i>Vahlkampfia jugosa</i>	Potentieller Wirt	Rowbotham 1986
<i>Vexillifera</i> spp.	Potentieller Wirt	Kuroki et al. 1998b	
Myxamöben:	<i>Dictyostelium discoideum</i>	Potentieller Wirt	Hägele et al. 2000
Ciliaten:	<i>Cyclidium</i> spp.	Potentieller Wirt	Barbaree et al. 1986
	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	Potentieller Wirt	Barbaree et al. 1986
	<i>T. vorax</i>	Potentieller Wirt	Somerville et al. 1991
Grünalgen:	<i>Chlorella</i> spp.	Assoziation	Steinert 1996
	<i>Gleocystis</i> spp.	Assoziation	Steinert 1996
	<i>Scenedesmus</i> spp.	Assoziation	Steinert 1996
Cyano- bakterien:	<i>Fisherella</i> spp.	Assoziation	Tison et al. 1980
	<i>Oscillatoria</i> spp.	Assoziation	Tison et al. 1980
	<i>Phormidium</i> spp.	Assoziation	Tison et al. 1980
Bakterien:	<i>Acinetobacter</i> spp.	Synergismus	Lee und West 1991
	<i>Aeromonas</i> spp.	Inhibierung	Gomez-Lus et al. 1993
	<i>Alcaligenes</i> spp.	Synergismus	Lee und West 1991
	<i>Bdellovibrio bacterivorus</i>	Parasit	Tomov et al. 1982
	<i>Flavobacterium breve</i>	Synergismus	Steinert 1996
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Inhibierung	Gomez-Lus et al. 1993
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Synergismus Inhibierung	Fliermans 1996 Rowbotham 1986

Die Legionellen verhindern eine Verschmelzung des Phagosoms mit dem Lysosom und können sich so intrazellulär replizieren, wobei die Mechanismen hierfür denen in Makrophagen ähneln (Gao et al. 1997). Gegen Ende des Replikationszyklus können mehr als 1000 Bakterien in einer Amöbe vorliegen (Bernander und Kallings 1998).

Die Fähigkeit der Legionellen, Protozoen als Nische für eine intrazelluläre Vermehrung zu nutzen, war vermutlich eine Voraussetzung für die erfolgreiche Besiedelung von Säugetier-Zellen und damit für die Evolution zum Humanpathogen (Shuman et al. 1998, Steinert et al. 2000). Die Infektion von menschlichen Zellen gilt jedoch als 'unbeabsichtigtes Ereignis' (Hoffman 1997).

C.1.4 Pathogenese der Legionellose

1976 trat bei 182 der ca. 4000 Teilnehmer einer Jahrestagung der 'American Legion' in Philadelphia/USA eine atypische Pneumonie auf, an der 29 Personen starben. Aus dem Lungengewebe eines dieser Patienten konnte kurze Zeit später ein Bakterium isoliert werden, das *Legionella pneumophila* genannt wurde. Die verursachte Pneumonie trägt seither den Namen Legionärs-Krankheit (Fraser et al. 1977, McDade et al. 1977). Der Erreger wurde auch aus dem Wasser der Klimaanlage des Tagungshotels kultiviert (Family Medical 1997).

Nach der Identifizierung von *L. pneumophila* als Auslöser der Epidemie von 1976 gab es Nachforschungen bezüglich dieses Bakteriums. So ist der Keim bereits seit 1943 als Erreger von schweren Lungenentzündungen bekannt und wurde zunächst als 'rickettsia-like organism' bezeichnet (Winn 1999). Inzwischen sind auch aus Australien, Afrika, Südamerika und Europa zahlreiche Fälle von Legionellose bekannt (Family Medical 1997).

Von den bislang beschriebenen 42 *Legionella*-Arten können 19 für den Menschen pathogen sein (Hacker 2000a). Als Hauptverursacher der Legionellose gilt *L. pneumophila* (85 % der Krankheitsfälle), gefolgt von *L. micdadei*, *L. bozemanii* und *L. dumoffii* (Family Medical 1997, Winn 1988). Legionellen sind in der Lage, zwei unterschiedliche Krankheitsbilder hervorzurufen: die Legionärs-Krankheit und das Pontiac-Fieber.

Etwa 4 % aller Lungenentzündungen entfallen auf die Legionärs-Krankheit, in den USA werden ca. 20.000 Fälle jährlich gemeldet (Hoffman 1997), in Deutschland sind es 8 - 12.000 (Lück und Helbig 1997). Die Krankheit beginnt nach einer Inkubationszeit von zwei bis zehn Tagen

mit Kopf- und Gliederschmerzen, Fieber bis über 40 °C, Husten, Schüttelfrost und Pneumonie (Brand und Hacker 1997). Extrapulmonale Symptome wie Beeinträchtigungen des zentralen Nervensystems, Störungen im Gastrointestinaltrakt sowie der Leber- und Nierenfunktionen können zusätzlich auftreten. Bei Nichtbehandlung verläuft diese Form der Legionellose in 10 - 34 % der Fälle tödlich (Bernander und Kallings 1998, Susa et al. 1997). Eine Therapie ist mit den membrangängigen Antibiotika Ciprofloxacin, Erythromycin und Rifampicin möglich (Lück und Helbig 1997). In neueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Azithromycin, Clarithromycin und Fluorochinolone sehr viel effektiver gegen Legionellen sind als die bisher verwendeten Mittel, während Penicilline und Cefalosporine nur gegen manche Arten wirken (Bernander und Kallings 1998).

Beim Pontiac-Fieber handelt es sich um einen respiratorischen Infekt mit einer Inkubationszeit von ein bis vier Tagen (Paszko-Kolva et al. 1995). Diese Infektion muss nicht antibiotisch therapiert werden, sie ist selbstlimitierend und nicht letal. Die Krankheit ähnelt einem Virusinfekt und geht einher mit Benommenheit, Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen, trockenem Husten und geringer Leukozytose (Lück und Helbig 1997).

Als Erklärung für die Verursachung zweier verschiedener Krankheitsverläufe durch ein- und denselben Erreger gibt es mehrere denkbare Gründe. Eine mögliche Rolle spielen die Dosis an aufgenommenen Legionellen, die Größe der inhalierten kontaminierten Partikel, der Immunitätszustand des Wirtes, die Virulenz des inhalierten Stammes (Paszko-Kolva et al. 1995) sowie die Lebensphase ('developmental switch') (Vogel und Isberg 1999). So verhalten sich virulente Stämme von *L. pneumophila* adhärent und invasiv, während avirulente Stämme lediglich adhärent sind (Garduño et al. 1998a, Vogel und Isberg 1999). Denkbar ist auch, dass das Pontiac-Fieber durch eine Infektion mit sogenannten viable but nonculturable-Bakterien (VBNC) ausgelöst wird (Steinert et al. 1997).

Die Infektion mit Legionellen erfolgt über Inhalation bzw. Mikroaspiration von kontaminierten Aerosolen, eine Übertragung von Mensch zu Mensch ist nicht bekannt (Brand und Hacker 1997, Lück und Helbig 1997). Es wurde auch die Möglichkeit der Wundinfektion mit kontaminiertem Leitungswasser beschrieben (Lowry et al. 1991). Als besonders gefährdete Risikogruppen gelten alte Menschen, chronisch Lungenkranke, Raucher, Alkoholiker, Immunsupprimierte und Transplantationspatienten (Lück und Helbig 1997, Winn 1988). Durch Inhalation von *L. pneumophila*-haltigen Amöben (z. B. Hartmannellen) wird die Virulenz des Erregers noch gesteigert.

gert. Dies kann durch den Schutz der intrazellulär vorliegenden Legionellen vor dem menschlichen Immunsystem oder durch die bereits erfolgte Aktivierung der intrazellulär benötigten Gene verursacht sein (Brieland et al. 1996). Im Respirationstrakt werden die Legionellen in den Alveolen von professionellen Phagozyten (Alveolar-Makrophagen, polymorphkernige Lymphozyten) oder auch nicht-professionell phagozytierenden Zellen (Epithelzellen, Lungenfibroblasten, Typ II-Pneumozellen) aufgenommen (Lück und Helbig 1997). Die Ingestion erfolgt Mikrofilament-abhängig durch 'coiling'- oder 'zipper'-Phagozytose, wie in Studien mit dem Inhibitor Cytochalasin D gezeigt werden konnte.

Bei der 'coiling'-Phagozytose binden die Komplement-Faktoren C3b und C3bi an ein äußeres Membranprotein (MOMP) von *L. pneumophila*, das dadurch verändert wird (Hoffman et al. 1992a, 1992b). Das MOMP bindet nun an die Komplement-Rezeptoren CR1 und CR3 auf der Oberfläche der Phagozyten, woraufhin sich ein Pseudopodium um das Bakterium wickelt und es in einem Phagosom einschließt (Horwitz 1984). Dieses Phagosom ist durch einen reduzierten 'oxidative burst', die unterbleibende Fusion mit primären und sekundären Lysosomen und fehlende Ansäuerung, gekennzeichnet (Hacker et al. 1994). Da die Membran des Phagosoms keine MHC-Moleküle enthält (major histocompatibility complex), sind die Legionellen offenbar in der Lage, die Zusammensetzung dieser Membran zu beeinflussen (Clemens und Horwitz 1993). Dagegen wird die konventionelle 'zipper'-Phagozytose durch die Bindung von Antikörpern an *L. pneumophila* eingeleitet. Die Aufnahme der Bakterien wird mittels Anlagerung der Antikörper an die F_C-Rezeptoren der Phagozyten getriggert. Die auf diesem Weg phagozytierten Legionellen sind nicht in der Lage, den 'oxidative burst' zu unterbinden, weshalb nur etwa 50 % von ihnen im angesäuerten Phagosom überleben (Shuman et al. 1998).

Die Vakuolen, die Legionellen enthalten, unterscheiden sich deutlich von anderen Phagosomen. So sind Legionellen in der Lage, Wirtsorganellen aus dem Zytosol zu rekrutieren. Das Phagosom ist dann typischerweise von glatten Vesikeln, rauhem endoplasmatischem Retikulum (ER) und Mitochondrien umgeben. Haben sich die Bakterien an ihre neue Umgebung angepasst (lag-Phase, ca. sechs bis acht Stunden), beginnen sie mit der Replikation. Ihre durchschnittliche Replikationszeit beträgt etwa zwei Stunden (Shumann et al. 1998). Mit zunehmender Vermehrung der Legionellen zeigen sich etwa 18 Stunden nach der Infektion massive zytotoxische Effekte, die letztendlich zur Lyse der Wirtszelle führen. Für die Lyse verantwortlich gelten bislang von den Bakterien sekretierte Toxine bzw. LPS (Shuman et al. 1998). Denkbare Ursachen für das Absterben der Zellen sind auch die gegen Ende des Vermehrungszyklus hohe Konzent-

ration an toxischen bakteriellen Stoffwechselprodukten (z. B. NH_3 aus dem Aminosäure-Stoffwechsel), oder ein mechanisches Platzen durch die Bewegung der zu diesem Zeitpunkt flagellierten Legionellen im Phagosom (Rowbotham 1986).

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass lebende, intrazelluläre *L. pneumophila* zudem in der Lage sind, abhängig von der Infektionsdosis, der Infektionsdauer und der intrazellulären Lokalisation der Bakterien in humanen Wirtszellen Apoptose zu induzieren (Abu Kwaik 1998, Gao und Abu Kwaik 1999, Hägele et al. 1998). So zeigen infizierte Blutmonozyten und HL60-Zellen die typischen Merkmale apoptotischer Zellen wie Vakuolisierung des Zytoplasmas, Kondensation des Chromatins und schrumpfendes Zellvolumen (Hägele 1998). Nachdem die Bakterien aus der Zelle freigesetzt sind, können sie neue Wirtszellen infizieren (Abb. C.1).

Nach überstandenen Legionelosen bleiben die Patienten nicht immun, daher sind Reinfektionen möglich (Lück und Helbig 1997).

C.1.5 Virulenzfaktoren von *L. pneumophila*

Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden wie der Erstellung von Cosmid- und Expressionsgenbanken, Mutagenese und Komplementation natürlich vorkommender Mutanten wurden verschiedene Faktoren und Genloci, die zur Virulenz und Pathogenität von *L. pneumophila* beitragen, charakterisiert (Edelstein et al. 1999, Heuner 1994, Ott 1994). Die wichtigsten werden im folgenden näher beschrieben.

Die meisten *Legionella*-Arten bilden eine polare Flagelle aus, die in der Hauptsache aus dem FlaA-Protein (Flagellin) besteht. Die Expression findet erst am Übergang von der logarithmischen zur stationären Wachstumsphase statt, ist temperaturabhängig und wird vermutlich durch den alternativen σ^{28} -Faktor gesteuert (Heuner et al. 1995). Die Motilität spielt beim Auffinden von Wirtszellen eine wichtige Rolle (Chandler et al. 1980, Rowbotham 1986). Eine Flagellenvermittelte Adhäsion an *A. castellanii* wurde für *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben (Preston und King 1984). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein der Flagelle außerdem in den ersten beiden Stunden der Infektion die Invasion fördert (Dietrich et al. 2000). Für das intrazelluläre Wachstum scheint die Flagelle jedoch keine Bedeutung zu haben (Dietrich et al. 2000, Kapfhammer 1998).

Pili spielen bei der Adhäsion an die Wirtszelle eine wichtige Rolle. Den Typ IV-Pilus CAP (competence- and adherence-associated pili) benötigt *L. pneumophila* für das Adhärenieren an Protozoen und möglicherweise an Biofilme (Abu Kwaik et al. 1998), während CAP bei *L. micdadei* fehlt (Gao et al. 1999).

Die Gene *pilBCD* (pilin) sind als Operon organisiert und weisen Homologien zum Typ II-Sekretionssystem von *P. aeruginosa* auf. Mutationen in diesen Genen vermindern die intrazelluläre Vermehrung sowohl in Hartmannellen als auch in den Makrophagen-ähnlichen U937-Zellen (Liles et al. 1999).

Die Lipopolysaccharide (LPS) bestimmen die Serogruppen der Legionellen. Sie weisen durch das Vorhandensein langer und vielverzweigter Fettsäuren eine relativ geringe Pyrogenität auf. Dank der hohen Hydrophobizität des LPS können sich Legionellen im Schaum künstlicher Wassersysteme anreichern, was für ihre aerogene Übertragung von großem Vorteil ist (Lück und Helbig 1997).

Das Hauptprotein der äußeren Membran, MOMP (major outer membrane protein), wurde von Hoffman et al. analysiert (Hoffman et al. 1992b). Es wird von *ompS* kodiert und triggert über die Komplement-Rezeptoren CR1 und CR3 die Phagozytose in Makrophagen (Brand und Hacker 1997, Dowling et al. 1992).

Ein weiteres Membranprotein, Mip (macrophage infectivity potentiator), gehört zu den Immunophilinen, und zwar zur Gruppe der FK506-Bindeproteine, und besitzt eine Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase-Aktivität (PPIase). Es wird in virulenten und avirulenten *Legionella*-Stämmen konstitutiv exprimiert (Dumais-Pope et al. 1993). Mip hat keinen Einfluss auf die Infektionsrate von Monozyten und Amöben mit Legionellen, es wirkt sich aber deutlich auf ihre intrazelluläre Vermehrung aus (Steinert 1996). Die Funktion für das Überleben der Legionellen in einzelligen Wirtsorganismen ist nicht von der genannten Enzymaktivität abhängig, sondern von der Dimerisierung des Proteins (Köhler et al. 2000, Wintermeyer et al. 1995). Dagegen ist im Tiermodell die PPIase-Aktivität sehr wohl für die intrazelluläre Etablierung der Legionellen von Bedeutung (Köhler, pers. Mitt.). Mögliche Bindungspartner für Mip sind noch nicht bekannt.

Mutanten von *L. pneumophila* in zwei neu beschriebenen Genloci, *enhABC* (enhanced entry) und *rtxA* (structural toxin), zeigen eine signifikant verminderte Invasivität (Cirillo et al. 2000).

Der *icm*-Locus (intracellular multiplication) enthält die Gene *icmVWX* und ist für die Vermeidung der Phagosom-Lysosom-Fusion, die intrazelluläre Vermehrung und das Abtöten der Wirtszelle nötig (Brand et al. 1994, Burns 1999, Vogel und Isberg 1999). Segal et al. beschrieben in-

zwischen 16 weitere *icm*-Gene, die am Zelltod der Makrophagen-Wirtszelle beteiligt sind (Segal et al. 1998). Vier dieser Gene weisen Homologien zu Plasmiden von *Salmonella* und *E. coli* auf. Segal und Shuman zeigten, dass auch *L. pneumophila* mit diesen Genprodukten Plasmide mobilisieren kann (Segal und Shuman 1997), während sie z. B. bei *Agrobacterium tumefaciens* und *Bordetella pertussis* als Typ IV-Sekretionssystem zum Transport von DNA bzw. Substraten durch die Außenmembran dienen (Vogel et al. 1998).

Ein weiteres Gen, *dotA* (defect in organelle trafficking), kodiert für das in der Innenmembran von *L. pneumophila* lokalisierte DotA, das für die Rekrutierung von Wirtsorganellen und deren Bindung an die Phagosomenmembran benötigt wird (Hacker 2000a, Vogel und Isberg 1999).

Inzwischen sind 23 *dot/icm*-Gene bekannt, die in zwei getrennten 20 kb-Regionen auf dem *L. pneumophila*-Chromosom liegen (Vogel und Isberg 1999). Mutationen in diesen Genen erzeugen Phänotypen mit Defekten bei der intrazellulären Multiplikation, der Lyse der Wirtszelle, der Kolokalisation des spät-endosomalen Markers LAMP-1 (lysosomal-associated membrane protein 1) oder der unmittelbaren Zytotoxizität (Segal und Shuman 1998). Es wird vermutet, dass es zwei Klassen von Dot/Icm-Proteinen gibt, die einen Membrankomplex (Typ IV-Sekretionssystem) bilden, mit dessen Hilfe die Verschmelzung von Phagosom und Lysosom unterbunden wird (Segal und Shuman 1998, Vogel und Isberg 1999). Bewerkstelligt wird dies wahrscheinlich über die Bildung einer Pore in der Wirtszellmembran, durch die ein Effektor vom Bakterium an den Wirt abgegeben werden kann (Kirby und Isberg 1998). Weitere Funktionen, die im Zusammenhang mit den *dot/icm*-Genen stehen, sind die Sensitivität gegenüber NaCl, kontaktvermittelte Zytotoxizität und Motilität (Vogel und Isberg 1999).

Eisen spielt als Kofaktor verschiedener Enzyme für die Physiologie und die Pathogenität von Bakterien eine wichtige Rolle und wird sowohl extrazellulär als auch intrazellulär benötigt. Für die Bindung von Eisen stehen in *L. pneumophila* verschiedene Systeme zur Verfügung. In der Wirtszelle in Form von Hemin oder Ferritin vorliegendes Eisen kann mittels Hbp (hemin binding protein) oder durch das von den *acn*-Genen (Aconitase) kodierte MICP (major iron-containing protein) gebunden werden (Brand und Hacker 1997, Mengaud und Horwitz 1993). Eisen ist außerdem an der Regulation der Genexpression beteiligt, wie durch das Vorhandensein der *fur*- und *frgA*-Gene (ferric uptake regulation, *fur* regulated gene) gezeigt werden konnte (Brand und Hacker 1997). *fur*-Mutanten von *L. pneumophila* wiesen Defekte bei der Infektion von Makrophagen und *H. vermiformis* auf (Hickey und Cianciotto 1997).

Eine Gruppe von MI-Genen (macrophage induced), deren Transkription nach der Aufnahme in Makrophagen induziert wird, wurde von Abu Kwaik beschrieben (Abu Kwaik 1998). Hierzu gehört neben weiteren 34 Genen der *eml*-Locus (early stage macrophage induced locus), der

unmittelbar nach der Phagozytose exprimiert wird. Mutationen bewirken eine signifikante Reduktion des intrazellulären Wachstums (Abu Kwaik und Pederson 1996).

Der *prp*-Genlocus von *L. pneumophila* ist für die Zytopathogenität in U937-Zellen verantwortlich. Die Genprodukte werden für die intrazelluläre Etablierung in Makrophagen und in Amöben benötigt (Stone et al. 1999).

Gao et al. beschrieben zwei Genloci, *pmi* (protozoa and macrophage infectivity) und *mil* (macrophage-specific infectivity loci), die die Virulenz von *L. pneumophila* in Protozoen und Makrophagen bzw. ausschließlich in Makrophagen beeinflussen (Gao et al. 1997, 1998). Mutationen in *milA* bewirkten eine Kolokalisation des Phagosoms mit dem spät-endosomalen Marker LAMP-2 und dem ER-Marker BiP, sowie eine verminderte intrazelluläre Replikation (Harb und Abu Kwaik 2000).

Der Sigma-Faktor RpoS reguliert vermutlich die Expression von Genen, die für das intrazelluläre Wachstum in Protozoen benötigt werden. *rpoS*-Mutanten von *L. pneumophila* konnten sich zwar in Makrophagen replizieren, nicht aber in *A. castellanii* (Hales und Shuman 1999a).

Die von *L. pneumophila* sekretierte Phospholipase A ist in der Lage, die Phospholipide auf der Oberfläche der Alveolarzellen zu hydrolysieren, und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Pneumonie (Flieger et al. 2000).

Das vom Hitzeschock-Gen *htpB* kodierte Adhäsion-Invasin Hsp60 (heat shock protein) tritt als Hauptantigen während der Legionellose auf und wird durch die Interaktion der phagozytierten Legionellen mit dem Immunabwehrsystem des Wirtes induziert. Es besitzt Lipochaperon-Funktion und ist damit für die Stabilisierung der Membran verantwortlich. Versuche mit virulenten und avirulenten *L. pneumophila*-Stämmen haben gezeigt, dass Hsp60 zwar in beiden Stämmen exprimiert wird, aber nur in virulenten Stämmen auf der bakteriellen Oberfläche verankert ist und mit dem Wirt interagiert (Garduño et al. 1998b, Hoffman und Garduño 1999).

Ein weiteres, durch intrazellulären Stress induziertes Protein ist das GspA (global stress protein), dessen genaue Funktion noch unklar ist (Abu Kwaik und Engleberg 1994, Brand und Hacker 1997).

Der LIGA-Faktor (*Legionella* intrazellulär growth antigen) wird ausschließlich intrazellulär von *L. pneumophila* exprimiert. Welche genaue Rolle dieser putative Virulenzfaktor spielt, ist bislang rein spekulativ (Susa et al. 1996).

Zytotoxische bzw. hämolytische Effekte haben außerdem die Genprodukte von *hel* (hemolysis expression in *Legionella*), *lly* (Legiolysin) und eine Metalloprotease Msp (major secretory protein) (Hacker 2000a). Legiolysin wird auch als 'Fitnessfaktor' bezeichnet, möglicherweise

stellt das Pigment einen Lichtschutz für die Bakterien dar (Flügel 1999, Steinert et al. 1995). Die Rolle der Zn^{2+} -Metalloprotease Msp (major secretory protein) für die Pathogenität von *L. pneumophila* war lange umstritten (Kapfhammer 1998). Hales und Shuman konnten einen Genlocus *lspFGHIJK* identifizieren, der für Proteine kodiert, die Ähnlichkeit mit dem Typ II-Sekretionssystem Gram-negativer Bakterien aufweisen (Hales und Shuman 1999b). Entsprechende Mutanten waren nicht mehr in der Lage, sich in *A. castellanii* zu vermehren.

Superoxid-Dismutasen (SOD) sind Metalloenzyme, die giftige Nebenprodukte aus dem aeroben Stoffwechsel unschädlich machen (Brand und Hacker 1997). Dadurch verhindern sie den 'oxidative burst' im Phagosom (Amemura-Maekawa et al. 1996). *sodB* kodiert für die eisenhaltige Fe-SOD, die für die Lebensfähigkeit der Legionellen essentiell ist. Die Funktion von Fe-SOD kann nicht von der kupfer- und zinkhaltigen Cu,Zn-SOD (*sodC*-kodiert) übernommen werden (Sadosky et al. 1994, Steinman 1992). *SodC* tritt nur bei *L. pneumophila* auf, andere *Legionella*-Spezies besitzen dieses Gen nicht (Amemura-Maekawa et al. 1996).

C.1.6 Nachweismöglichkeiten für *Legionella* spp.

Die Standardmethode zur Detektion von Legionellen aus Patientenmaterial und Wasserproben ist die Anzucht auf BCYE-Agarplatten, sowie Subkulturen auf Selektiv- bzw. Mangelplatten zur Bestätigung der Identität der Klone (ISO/CD 11731-2 1998, Lück und Helbig 1997). Die Kultivierungsfähigkeit wird von verschiedenen Faktoren negativ beeinflusst, z. B. Antibiotika und Enzyme in Patientenproben, so dass die Anzuchtrate lediglich 10 - 70 % beträgt (Lück und Helbig 1997). In Wasserproben spielt dagegen der Stoffwechselzustand der Bakterien für ihre Kultivierbarkeit eine wichtige Rolle (VBNC-Stadium) (Steinert et al. 1997). Da Legionellen nur langsam wachsen, kann eine Kultur erst nach etwa einer Woche ausgewertet bzw. weiterbearbeitet werden. Zudem lassen sich die verschiedenen Stämme unterschiedlich gut auf künstlichen Medien anzüchten, was oft zu falschen Negativergebnissen führt.

Für weitere Nachweismethoden ist eine vorherige Kultur der Legionellen zwingend erforderlich. Hier sind z. B. immunologische Verfahren mit polyklonalen und monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene Membranproteine zu nennen (Lück und Helbig 1997), Antikörpertests unterscheiden jedoch nicht zwischen toten und lebenden Bakterien. Ein weiterer Nachteil dieser Methoden sind mögliche Kreuzreaktionen mit anderen Bakterien (Paszko-Kolva et al. 1995). Antigennachweise mittels Immunfluoreszenz, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) o-

der RIA (Radioimmunoassay) erfordern ebenfalls eine vorherige Kultivierung der Stämme, die Sensitivität ist mit 30 - 60 % zudem sehr gering (Lück und Helbig 1997). Ein neuer, immuno-chromatografischer Antigentest für *L. pneumophila* Serogruppe 1 wurde kürzlich entwickelt. Bei Tests von Urinproben während einer Epidemie zeigte er eine Sensitivität und Spezifität von jeweils 95 % (Wever et al. 2000).

Kulturunabhängige und sensitive Verfahren stellen die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die allerdings tote wie lebende Bakterien erfasst, und die fluoreszierende *in situ* Hybridisierung (FISH) dar. Beide Methoden wurden bereits sowohl in Patientenisolaten als auch Umweltproben erfolgreich angewendet (Hu et al. 2000, Pabst et al. 1997, Paszko-Kolva et al. 1995).

C.2 Biologie freilebender Süßwasser-Amöben

Heterotrophe Einzeller mit einer sich ständig ändernden Form werden als Amöben bezeichnet und zum Stamm der 'Rhizopoda' zusammengefasst. Ihre Fortbewegung erfolgt kriechend auf Substrat mittels Ausbildung von Lobopodien, Filopodien oder Rhizopodien. Einzelne Gruppen (z. B. *Naegleria*) besitzen ein flagelliertes Schwimmstadium. Da sich amöboid bewegende Zellen allgemein unter Metazoen zu finden sind, ist die auf dieser Eigenschaft begründete Monophylie der 'Rhizopoda' fraglich (Page und Siemensa 1991).

Für die Systematik und Identifizierung werden in der Hauptsache morphologische Merkmale benutzt. Diese Merkmale beziehen sich auf Körperform, Pseudopodien, Zystenbildung, Schwimm- und Schwebeformen, Aufbau der Mitochondrien und Mitosetyp. Physiologische Charakteristika wie relative Fortbewegungsgeschwindigkeit und Vermehrungstemperatur werden ebenfalls herangezogen. Biochemische und serologische Eigenschaften zur Bestimmung wurden v. a. für die potentiell humanpathogenen Gattungen *Acanthamoeba* und *Naegleria* beschrieben (Adams et al. 1989, Page und Siemensa 1991). Erst in neuerer Zeit finden molekulare Untersuchungen auf DNA- oder 18S rRNA-Ebene größere Beachtung (Gast und Byers 1995, Kilvington und Beeching 1995, Sims et al. 1999, Stothard et al. 1998, 1999, Szénási et al. 1995). Auch hier liegt der Schwerpunkt auf für den Menschen pathogenen Gruppen. Die Ergebnisse der molekularen Untersuchungen zeigen z. T. erhebliche Differenzen zur bisherigen, morphologisch begründeten Taxonomie auf (Clark und Cross 1988b).

Protozoen erfüllen wichtige Aufgaben in ihrem Habitat. Sie tragen wesentlich zum Stoff- und Energiefluss bei und stellen ein wichtiges Glied in der Nahrungskette dar. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Eliminierung von Mikroorganismen und bilden im Boden den Haupträuber für Bakterien (Mallory et al. 1983, Rodríguez-Zaragoza 1994). Desweiteren werden sie z. T. als Bioindikatoren für die Gewässergüte bzw. Bodenqualität herangezogen (Görtz und Brigge 1998). Eine nicht zu unterschätzende Rolle spielen sie aber auch als Reservoir für pathogene Bakterien, wie z. B. *Legionella* (Michel et al. 1998a, Newsome et al. 1998), bzw. bieten eine Nische für verschiedene Symbionten (Amann et al. 1997b, Fritsche et al. 1993, 1999, Horn et al. 1999, Michel 1997). Die Unterscheidung zwischen pathogenen Parasiten und Symbionten ist nicht immer eindeutig, oft wandelt sich ein anfänglich parasitäres Verhältnis in ein symbiotisches um (Hentschel et al. 2000, Jeon 1995).

Die Zystenbildung ist eine wichtige Errungenschaft vieler Gattungen, neue Nischen zu 'erobern'. Da Amöben im Zystenstadium in der Lage sind, widrige Umweltbedingungen unbeschadet zu überstehen, können auch physikalisch oder chemisch instabile Habitate besiedelt werden. Diese Fähigkeit wirkt sich auf die Desinfektion kontaminierter Wassersysteme aus. So sind Acanthamoeben im Trophozitenstadium nur gegenüber 0,5 mg Chlor/l resistent, ihre Zysten dagegen ertragen 40 mg Chlor/l (Hoffmann und Michel 1998).

Die Bedeutung der Amöben bei der Infektion des Menschen mit Legionellen zeigt sich in der Beobachtung, dass viele Legionellose-Patienten nicht nur Antikörper gegen Legionellen aufweisen, sondern auch gegen freilebende Amöben, die aus der Infektionsquelle isoliert werden konnten (Wienicka-Krusnell und Linder 1999). Vermutlich ist eine Infektion via Inhalation amöbenhaltiger Aerosole häufiger als bislang angenommen.

C.3 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte eine kulturunabhängige Nachweismethode mit hoher Sensitivität und Spezifität für *L. pneumophila* etabliert werden, die nur auf lebende Bakterien reagiert. Daher wurde für die *in situ* Hybridisierung eine neue 16S rRNA-gerichtete Sonde entwickelt.

Da Legionellen häufig intrazellulär in Protozoen anzutreffen sind, in denen sie Schutz vor widrigen Umweltbedingungen genießen, wurde die Etablierung neuer Sonden auf zwei ihrer Hauptwirte, *Hartmannella* und *Naegleria*, ausgedehnt. Der Nachweis und die Bestimmung der freilebenden Amöbengattung *Naegleria* sind durch das Pathogenitätspotential für den Menschen von zusätzlicher Bedeutung.

Legionellen kommen in den unterschiedlichsten Gewässern vor, die somit ein natürliches Reservoir für diese Krankheitskeime bilden. Um die Verbreitung der Bakterien in einem definierten Gebiet sowie eventuell vorhandene Ansprüche an die Habitatbeschaffenheit zu bestimmen, wurden umfangreiche Umweltstudien durchgeführt. Zusätzliches Augenmerk wurde hierbei auf das Vorkommen von Amöben als potentielle Wirtsorganismen gerichtet.

Durch die unterschiedlichen Lebensräume der Legionellen (Biofilm, intrazellulär in Protozoen oder in Säugetierzellen) werden die einzelnen Gene zu verschiedenen Zeiten im Lebenszyklus bzw. in verschiedenen Umgebungen exprimiert. Genaueres Wissen über diese unterschiedliche Expression könnte zu einer verbesserten Bekämpfung der Bakterien führen. Eine für Listerien entwickelte Methode des mRNA-Nachweises von bestimmten Genen sollte deshalb anhand des Virulenzfaktors *mip* für *Legionella* etabliert werden.