

A. Zusammenfassung

Legionella pneumophila wurde 1976 als Erreger der Legionellose, einer schweren Form von Lungenentzündung, identifiziert. Die inzwischen 42 Arten umfassende Gattung ist weltweit in aquatischen Biotopen verbreitet. Die Bakterien leben vergesellschaftet mit anderen Mikroorganismen in Biofilmen oder intrazellulär in Protozoen. Sie haben ein duales Wirtssystem, das heißt, sie sind in der Lage, sich sowohl in Einzellern als auch in humanen Phagozyten zu vermehren. Für die Erweiterung ihrer Habitats spielen verschiedene Umweltfaktoren eine Rolle. Eine exakte und schnelle Detektion und Identifikation der humanpathogenen Keime ist sowohl für die Lokalisierung der Infektionsquelle als auch für eine rechtzeitige Therapie der Patienten von großer Bedeutung.

Die Technik der fluoreszierenden *in situ* Hybridisierung (FISH) basiert auf der Bindung einer spezifischen, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Oligonukleotidsonde an eine komplementäre Zielsequenz der ribosomalen RNA. In der vorliegenden Arbeit wurde für die *in situ* Hybridisierung eine neue 16S rRNA-gerichtete Sonde LEGPNE1 entwickelt, die spezifisch ist für *L. pneumophila*. In Versuchsreihen mit verschiedenen Bakterienkulturen wurden die Spezifität und Sensitivität der Gensonde ermittelt. LEGPNE1 erwies sich als artspezifisch und erkannte alle getesteten *L. pneumophila*-Stämme, ungeachtet ihrer Serogruppe. Nicht-*pneumophila*-Referenzstämme hybridisierten nicht mit der Sonde, ein einziger Basenaustausch in der Sequenz war für diese Unterscheidung ausreichend.

Die Anwendung der Sonde wurde auch in Amöben-Infektionsassays und Umweltproben erfolgreich durchgeführt. Unterschiedliche, intrazellulär vorliegende Bakterien wurden von der Sonde spezifisch erkannt. Eine *in situ* Dokumentation der Infektions- und Vermehrungsrate war damit möglich.

Durch die meist fakultativ intrazelluläre Lebensweise der Legionellen ist es wichtig, auch die Wirtszellen der Keime qualitativ zu detektieren und zu identifizieren. Die Entwicklung neuer Gensonden wurde daher auf die beiden bekannten Wirtsamöben *Hartmannella* und *Naegleria* ausgedehnt. Basierend auf Sequenzvergleichen wurden die gattungsspezifischen 18S rRNA-gerichteten Sonden HART498 und NAE1088 konstruiert und in Versuchsreihen mit Referenzstämmen bei steigender Stringenz etabliert. Mit ihrer Hilfe konnten die Ergebnisse der zeit- und arbeitsaufwendigen Determination unbekannter Amöben anhand morphologischer Merkmale bestätigt werden.

In situ Hybridisierungen mit einer Kombination von 16S und 18S rRNA-gerichteten Sonden wurden in Amöben-Infektionsassays mit *Hartmannella vermiformis* und *L. pneumophila* erfolgreich durchgeführt. Eine Interferenz der Sonden fand nicht statt.

Die *in situ* Untersuchung der Struktur und Funktion komplexer mikrobieller Lebensgemeinschaften erfordert eine kultivierungsunabhängige und hochauflösende Methode, wie sie die fluoreszierende *in situ* Hybridisierung darstellt. Mit dem Ziel, mögliche Präferenzen der Legionellen für bestimmte Parameter, wie pH, Temperatur, elektrische Leitfähigkeit, Strömungsverhältnisse, zu erkennen und zu definieren, wurden mit Hilfe der neu entwickelten 16S rRNA-gerichteten Sonde 21 verschiedene Kaltwasserhabitats auf die Verbreitung von *Legionella* untersucht. Die Bakterien zeigten jedoch ein breites Toleranzspektrum gegenüber den gemessenen Parametern. Sie waren in nahezu allen beprobten Gewässern zu finden und ließen sich unabhängig von der Jahreszeit nachweisen. Die neue Sonde LEGPNE1 zeigte sich in *in situ* Hybridisierungen der Umweltproben als hochspezifisch. Mit ihr konnten auch nicht kultivierbare Legionellen detektiert werden.

In drei *Legionella*-positiven Gewässern wurde außerdem das Vorkommen von Amöben untersucht. Es konnten insgesamt acht Amöbengattungen isoliert, kultiviert und bestimmt werden. Dominierend waren Stämme des nicht humanpathogenen *Naegleria gruberi*-Komplexes, *Echinamoeba* spp. und *Echinamoeba*-like Amöben. In einzelnen Proben wurden *Acanthamoeba* spp. Gruppe II, *Hartmannella* spp., *Platyamoeba placida*, *Saccamoeba* spp., *Thecamoeba quadrilineata* und *Vexillifera* spp. gefunden. Durch *in situ* Hybridisierung mit den neuen 18S rRNA-gerichteten Sonden HART498 und NAEG1088 konnten die Ergebnisse der morphologischen Bestimmung der Amöben bestätigt werden. Auch die Amöben zeigten keine Präferenzen bezüglich der in den Standorten gemessenen Wasserparameter.

Die *in situ* Hybridisierung mit rRNA-gerichteten Sonden erlaubt eine Analyse der Struktur und Dynamik von Biozönosen, ermöglicht aber keine Aussage über die speziellen Aktivitäten der nachgewiesenen Bakterien. Eine Lösung hierfür könnte der spezifische *in situ* Nachweis von mRNA-Molekülen darstellen. Ein Problem hierbei stellt ihre, im Vergleich zu anderen Molekülen wie rRNA, sehr kurze Halbwertszeit und das Vorhandensein von nur wenigen Kopien pro Zelle dar. Daher ist im Anschluss an die *in situ* Hybridisierung in den meisten Fällen eine Signalamplifikation nötig, um ein detektierbares Signal zu erhalten. In dieser Arbeit sollte die für das *iap*-Gen in *Listeria monocytogenes* entwickelte Methode zum Nachweis der *mip*-mRNA in *L. pneumophila* etabliert werden. Erste Anwendungen in Dot blot- und *in situ* Hybri-

disierungen mit mehrfach DIG-markierten Polyribonukleotidsonden bzw. mit simultan eingesetzten, einfach DIG-markierten Oligonukleotiden zeigten noch nicht die gewünschte Spezifität. Diese Ergebnisse stellen jedoch eine wichtige Grundlage für zukünftige Experimente dar.