

Aus der Universitätsklinik für Anaesthesiologie und

Transfusionsmedizin Tübingen

Abteilung Transfusionsmedizin mit Blutbank

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. Northoff

**Phagozytose-assoziierte Rezeptoren bei der
Legionellen-Pathogenese**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Patrick Weißgerber
aus
Sulz am Neckar**

2003

Dekan: Professor Dr. C. Claussen

1. Berichterstatterin: PDin Dr. B. Neumeister

2. Berichterstatterin: PDin Dr. U. Schumacher

Meiner Mutter und Mike

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Geschichtliches	1
1.2	Taxonomie und Nomenklatur	3
1.3	Diagnostik	3
1.3.1	Mikroskopie	3
1.3.2	Kultur	3
1.3.3	Direkte Immunfluoreszenz	4
1.3.4	Antigen-Test im Urin	4
1.3.5	Serologische Testung	5
1.3.6	Assays mit Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	5
1.4	Epidemiologie	6
1.4.1	Inzidenz der Legionellenpneumonie	6
1.4.2	Vorkommen und Infektionswege	7
1.5	Klinik der Legionelleninfektion	11
1.5.1	Legionellenpneumonie	11
1.5.2	Extrapulmonale Legionellose	12
1.5.3	Pontiac-Fieber	12
1.5.4	Legionelleninfektionen bei Kindern	13
1.6	Risikofaktoren	13
1.7	Therapie	15
1.8	Pathogenese	18
1.8.1	Stoffwechsel	22

1.9	Virulenzfaktoren	24
1.9.1	Extrazelluläre Enzyme und Produkte	24
1.9.2	Zellassoziierte Komponenten	24
1.10	Immunabwehr	26
1.10.1	Humorale Immunität	26
1.10.2	Zellvermittelte Immunität	26
1.11	Fragestellung	27
2	Material und Methoden	29
2.1	Materialien	29
2.1.1	Anzuchtmedien und -materialien	29
2.1.2	Legionellenspezies und -serogruppen	30
2.1.3	Zelllinie Mono Mac 6	30
2.1.4	HeLa-Zellen	31
2.1.5	Jurkat-Zellen	31
2.1.6	Antikörper	31
2.1.7	Technische Geräte	32
2.1.8	Geräte für die Zellkultur	32
2.1.9	Geräte und Materialien für die Durchflußzytometrie	33
2.2	Methoden	34
2.2.1	Anzucht der Legionellen	34
2.2.2	Zellkultur	34
2.2.3	Phagozytose und intrazelluläre Vermehrung	36
2.2.4	Blockierungsversuche	37
2.2.5	Durchflußzytometrie (FACS)	39
3	Ergebnisse	41
3.1	Phagozytose und intrazelluläre Vermehrung von Legionellen durch Mono Mac 6-Zellen	41
3.2	HeLa- und Jurkat-Zellen	41
3.3	Rezeptor-Expression in der Durchflußzytometrie	44

3.4	Blockierung spezifischer Oberflächen-Rezeptoren	45
3.4.1	CD11b	46
3.4.2	CD18	48
3.4.3	CD11b & CD18	50
3.4.4	CD14	51
3.4.5	CD29	52
3.4.6	CD35	54
3.4.7	CD54	55
3.4.8	CD71	57
4	Diskussion	59
4.1	Phagozytose und intrazelluläre Vermehrung	60
4.1.1	Mono Mac 6	60
4.1.2	HeLa-Zellen	60
4.1.3	Jurkat-Zellen	61
4.2	Blockierung von Oberflächenrezeptoren	61
4.2.1	Methode	61
4.2.2	Komplementrezeptoren	62
4.2.3	CD14	65
4.2.4	CD29	66
4.2.5	CD54	67
4.2.6	CD71	67
4.3	Andere Rezeptorsysteme	68
4.3.1	Lektine/Collectine	68
4.3.2	Hitzeschockproteine	70
4.3.3	Mannoserezeptor	72
4.3.4	Scavengerrezeptor	72
4.3.5	Ausblick	73
5	Zusammenfassung	77

Abkürzungsverzeichnis	101
Danksagung	105
Lebenslauf	107

Tabellenverzeichnis

1.1	Sensitivität und Spezifität in der Diagnostik	6
1.2	Risikofaktoren für die Legionellose	14
1.3	Antibiotische Therapie der Legionelleninfektion	16
1.4	Therapieempfehlungen bei Legionellenpneumonie	18
2.1	Material	29
2.2	Antikörper	31
2.3	Technische Geräte	32
2.4	Geräte für die Zellkultur	32
2.5	FACS - Geräte und Materialien	33
3.1	Expression der Oberflächenrezeptoren auf Mono Mac 6	44
4.1	Literaturübersicht	74

Abbildungsverzeichnis

3.1	Intrazelluläre Vermehrung der untersuchten Legionellen in Mono Mac 6 . . .	42
3.2	Intrazelluläre Vermehrung von <i>L. pneumophila</i> Sg1 ATCC 33152 in HeLa- und Jurkat-Zellen	43
3.3	FACS - Zusammenfassung der Messungen	45
3.4	FACS - Beispielergebnis CD29	46
3.5	Ergebnis: CD11b - Klon ICRF44	47
3.6	Ergebnis: CD11b - Klon Bear 1	48
3.7	Ergebnis: CD18	49
3.8	Ergebnis: CD11b & CD18	50
3.9	Ergebnis: CD14	51
3.10	Ergebnis: CD29 - Klon B-D15	52
3.11	Ergebnis: CD29 - Klon 3S3	53
3.12	Ergebnis: CD35	54
3.13	Ergebnis: CD54 - Klon 8.4A6	55
3.14	Ergebnis: CD54 - Klon HA58	56
3.15	Ergebnis: CD71	57

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Geschichtliches

Im Juli 1976 versammelten sich in einem Hotel in Philadelphia, USA, 4400 Mitglieder der „Amerikanischen Legion“, des Veteranenverbandes der USA. Bereits während der Konferenz klagten mehrere Personen über Fieber und trockenen Husten, bis zwei Wochen später erkrankten dann 221 Mitglieder der Legion an Pneumonie und benötigten eine stationäre Behandlung. Insgesamt 34 der Erkrankten verstarben. Teilnehmer eines zur gleichen Zeit im selben Hotel stattfindenden kirchlichen Kongresses und einige andere Gäste erkrankten ebenfalls an einer Pneumonie. Auf Grund der Hauptgruppe der Betroffenen wurde die noch unbekannte Erkrankung „Legionärs-Erkrankung“ oder auch „Veteranen-Erkrankung“ genannt. Zunächst verdächtigte man ein Influenza-A-Virus, aber auch Umweltnoxen, z.B. eine Nickelvergiftung, wurden nicht ausgeschlossen und das betroffene Hotel abgerissen. Trotz intensiver Suche konnte keiner der bis dahin bekannten bakteriellen oder viralen Erreger als Ursache für die Erkrankung verantwortlich gemacht werden. Auch aus der serologischen Diagnostik ließen sich keine Schlußfolgerungen ziehen [257, 313]. Innerhalb von 6 Monaten gelang es Wissenschaftlern der Centers for Disease Control (CDC) in Atlanta zusammen mit dem Pennsylvania Department of Health „rickettsienähnliche“ Mikroorganismen zu isolieren, die die Erkrankung verursacht hatten. Dies konnte dadurch gesichert werden, daß mehr als 90 % der entsprechenden Patientenserum Antikörper gegen diese Erreger im indirekten Immunfluoreszenztest aufwiesen [89, 198]. Aus welchem Reservoir die

Infektion hervorging, blieb jedoch noch unklar, da Untersuchungen des Wassers und der Umwelt nicht durchgeführt wurden. Das „rickettsienähnliche“ Agens, das sich zwar gramnegativ anfärbte, sich jedoch besser mit der für Rickettsien entwickelten Giménez-Färbung darstellen ließ, wurde bezugnehmend auf die betroffene Patientengruppe und auf die Lokalisation der Erkrankung *Legionella (L.) pneumophila* genannt [198, 309]. Mit Hilfe des indirekten Immunfluoreszenztest konnten Antikörper gegen Legionellen nachgewiesen werden, wodurch retrospektiv eine Reihe früherer Ausbrüche anhand von eingefrorenen Patientenseren aufgeklärt werden konnten. So gab es bereits 1957 in einem Fleischverpackungsbetrieb in Austin, Minnesota, USA [230], 1965 in einem psychiatrischen Krankenhaus in Washington und 1974 in dem betreffenden Hotel in Pennsylvania Legionellen-Infektionen mit mehreren erkrankten Personen [257]. Nun fand man aber auch, daß Legionellen Ursache einer weiteren Erkrankung waren, die zu einer grippeähnlichen, nicht tödlich verlaufenden Infektion der oberen Luftwege führten: Dem sogenannten Pontiac-Fieber, das erstmals 1968 bei Besuchern des Gesundheitsamtes von Pontiac, Michigan, USA, beschrieben wurde [109]. Fraser et al. dokumentierten 1979 eine gleichartige Erkrankung bei zehn Arbeitern, die mit Druckluft einen Dampfturbinenkondensator reinigten [88]. Nähere Untersuchungen der beiden unterschiedlichen Erkrankungsformen Legionellen-Pneumonie und Pontiac-Fieber zeigten, daß deren Auftreten sowohl von der Infektionsdosis, als auch von der Abwehrlage des Infizierten abhängt. Nun erkannte man aber auch, daß bereits 1947 von Marilyn Bozeman am National Institute of Health ein Bakterienstamm namens OLDA isoliert wurde, der nach heutiger Nomenklatur auf den Namen *Legionella pneumophila* hört [197]. 1959 stieß sie auf zwei weitere Stämme, denen sie damals die Namen WIGA und HEBA gab und die heute *L. bozemanii* und *L. micdadei* entsprechen [125]. 1979 wurde schließlich ein *Legionella*-Stamm in Pittsburgh isoliert, der zunächst den Namen „Pittsburgh Pneumonia Agent“ bekam und mit *Legionella micdadei* übereinstimmt [216, 251]. Immer mehr Spezies wurden entdeckt, nachdem es gelang, Legionellen problemlos auf synthetischen Agarnährböden anzuzüchten und sowohl aus Patientenproben als auch aus Umweltmaterial Bakterien isoliert und charakterisiert wurden. Eine neuere Übersichtsarbeit von Bender und Fields beschreibt 42 *Legionella*-Spezies in 15 Serogruppen [22].

1.2 Taxonomie und Nomenklatur

Obwohl es innerhalb der Gattung *Legionella* eine Vielzahl von phänotypisch sehr ähnlichen Spezies gibt, ist deren genotypische Identität weit weniger ausgeprägt. Nimmt man zur Definition der genotypischen Gattungszugehörigkeit eine DNA-Homologie von 40% an, so würde *Legionella* in mindestens 14 Gattungen zerfallen, legt man eine 25%ige Homologie zugrunde, so entstünden immer noch 9 Gattungen. Illustriert sei diese geringe genotypische Verwandtschaft an *L. pneumophila*, deren DNA nur zu rund 1% mit der von *L. gormanii* übereinstimmt. Folglich macht es bei der Taxonomie der Gattung *Legionella* Sinn, bei der Einordnung die große phänotypische Ähnlichkeit zugrunde zu legen und sie nicht entsprechend der DNA-Homologie in mehrere Gattungen aufzugliedern [68, 257].

1.3 Diagnostik

1.3.1 Mikroskopie

Legionellen sind gramnegative, plumpe Stäbchen mit mono- oder lophotricher Begeißelung, die in der üblichen Gramfärbung allerdings schlecht dargestellt werden, deutlich besser dafür mit der für Rickettsien und Chlamydien entwickelten Giménez-Färbung (Karbolfuchsin-Malachitgrün-Färbung). Die optimale Darstellung gelingt jedoch mit der direkten Immunfluoreszenz.

1.3.2 Kultur

Die Bakterien stellen hohe Ansprüche an Kulturmedien und benötigen Aminosäuren als primäre Energiequelle, da sie keine Zucker aufspalten können. Man verwendet heute zur Anzucht der Legionellen einen Hefeextrakt-Aktivkohleagar, dem L-Cysteinhydrochlorid, Eisenpyrophosphat [75], ACES-Puffer [233] und α -Ketoglutarat [66] zugesetzt werden und dessen pH-Wert zwischen 6,85 und 6,95 liegen muß. Da Legionellen auf entstehende Sauerstoffradikale hochgradig empfindlich reagieren, müssen diese durch den Zusatz von Aktivkohle beseitigt werden [139]. Die inokulierten Nährböden werden bei 30-35°C und 3-5% CO₂ in einem Inkubator mit 90% Luftfeuchtigkeit bebrütet. Primärkulturen oder Kulturen

nach intrazellulärer Zellkulturpassage benötigen bis zu 10 Tage zur Koloniebildung, agaradaptierte Stämme erscheinen bereits nach 2-3 Tagen als runde, leicht konvexe, milchglasartige, z.T. leicht gelbliche oder blau-rosa opaleszierende Kolonien auf dem Aktivkohleagar. Ältere Kulturen haben ein leicht flockig-wolkiges Aussehen. Die Sensitivität dieser Methode wird mit 9-70% angegeben [68] und muß deshalb im klinischen Alltag durch die serologische Diagnostik ergänzt werden. Ein Problem ergibt sich bei der weiteren Differenzierung der Legionellen. Während andere Bakterien mittels ihrer enzymatischen, fermentativen oder oxidativen Aktivitäten unterschieden werden können, ist dies für Legionellen nicht möglich, da sie nur eine geringe enzymatische Aktivität besitzen und keine Kohlenhydrate abzubauen vermögen. Ihre Identifizierung gelingt also letzten Endes über das Wachstum auf BCYE α -Agar, die Gramfärbung und aufgrund der Tatsache, daß sie auf zysteinfreiem Medium, wie etwa Columbia-Blutagar, nicht wachsen.

1.3.3 Direkte Immunfluoreszenz

Als weiteres Verfahren konnte mit der Zeit die direkte Immunfluoreszenz etabliert werden, bei der ein FITC-markiertes Antiserum gegen das speziesspezifische 28kDa Hauptmembranprotein (MOMP) von *Legionella* verwandt wird und das die Identifizierung der am häufigsten vorkommenden Stämme erlaubt [111, 227, 306]. Eine tiefergehende Differenzierung und Einordnung in bestimmte Serogruppen ist mit spezifischen Antikörpern möglich, die das Spezies-spezifische LPS-Molekül erkennen. Außerdem hat sich in den letzten Jahren die Differenzierung mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) etabliert (siehe Abschnitt 1.3.6 auf Seite 5).

1.3.4 Antigen-Test im Urin

Der Antigen-Test im Urin ist ein relativ günstiger, einfach durchzuführender Test, der *Legionella pneumophila*-Antigen mit Hilfe des Radio-Immun-Assay (RIA), des Enzym-Immun-Assay (ELISA), der Latex-Agglutination oder der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) [127] im Urin nachweist. Hinzu kommt, daß eine Urinprobe im Gegensatz zu einer Sputumprobe sehr einfach gewonnen werden kann, vor allem wenn man bedenkt, daß Patienten mit einer

Legionelleninfektion häufig einen unproduktiven Husten haben. Mit diesem Verfahren kann, anders als bei der Kultur, eine Infektion auch noch Wochen nach Beginn einer Antibiotikatherapie nachgewiesen werden. Obwohl ein Nachweis von *Legionella*-Antigen noch ein Jahr nach Beginn der Infektion berichtet wurde [167], sind diese nach 60 Tagen in der Regel bei mehr als 90 % der Patienten verschwunden [282]. Der größte Nachteil dieses Tests besteht darin, daß er nur *Legionella pneumophila* Sg 1 detektiert, wobei diese aber mehr als 80% der Legionellosen verursachen.

1.3.5 Serologische Testung

Serologische Testungen sind sehr nützlich für die epidemiologische Aufklärung und das Aufdecken von Infektketten. Für den klinisch tätigen Arzt sind sie jedoch wenig hilfreich, da erstens Proben aus der akuten Phase *und* der Rekonvaleszenz benötigt werden und zweitens das Intervall bis zur Bestätigung viel zu lange ist, als daß hieraus therapeutische Konsequenzen abgeleitet werden könnten. Für den Nachweis einer Infektion wird der vierfache Titeranstieg auf 1:128 oder mehr verlangt. Erstmals bestimmte Titer von mehr als 1:256 bei Patienten mit den klinischen Symptomen einer Pneumonie sind ebenfalls hoch verdächtig auf eine Legionellen-Pneumonie, sollten jedoch nur in epidemiologischen Studien und nicht in der diagnostischen Routine angewandt werden [65]. Prinzipiell sollte bei der serologischen Testung nach IgG und IgM gesucht werden, da es zahlreiche Patienten gibt, die nur einen IgM-Anstieg zeigen.

1.3.6 Assays mit Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Legionellen können auch mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) nachgewiesen werden [187, 194, 308]. Hierbei werden winzige Mengen Legionellen-DNA aus Urin, Material einer broncho-alveolären Lavage oder dem Serum amplifiziert. Vorteil dieser Methode ist, daß sie sehr spezifisch, aber nicht sensitiver als beispielsweise die Kultur ist und daß sie mit einem Test alle Legionellenspezies und Serogruppen nachzuweisen vermag. Von Nachteil sind Inhaltsstoffe des Sputums oder auch gewisser Blutproben, die die PCR inhibieren können. Neuere technische Entwicklungen wie die Real-Time-PCR haben diese Methode

noch schneller gemacht, was eine rasche Diagnose ermöglicht [14, 123].

Tabelle 1.1: Sensitivität und Spezifität bei Verfahren der Legionellendiagnostik [282, 306]

<i>Test</i>	<i>Sensitivität</i>	<i>Spezifität</i>
Kultur aus Sputum	80%	100%
Direkte Immunfluoreszenz	33-70%	96-99%
Antigen-Nachweis im Urin	70%	100%
Serologische Antikörper-Bestimmung	40-60%	96-99%
PCR aus Urin/Blut	75-82%	90-100%
PCR aus Bronchialsekret	83-100%	90-100%

Neuere Arbeiten zeigen, daß die PCR auch eine sinnvolle und schnelle Methode zur Identifizierung von *Legionella*-Spezies ist, wobei mit einer randomly amplified polymorphic-DNA (RAPD)-Technik differenziert werden kann zwischen allen Spezies, zwischen den Serogruppen und zwischen den Subtypen derselben Spezies [16]. Dabei lagern sich die Primer an einer unbekanntem, also „zufälligen“ Stelle der DNA an und amplifizieren den Genabschnitt.

Eine weitere Methode benutzt Längenpolymorphismen von Genabschnitten zwischen tRNA-Genen, die mit Hilfe der PCR amplifiziert und anschließend analysiert werden: transferDNA-intergenic length polymorphism (tDNA-ILP) [54].

1.4 Epidemiologie

1.4.1 Inzidenz der Legionellenpneumonie

Betrachtet man die Häufigkeit der Legionellenpneumonie, so stellt man schnell fest, daß es sich um keine sehr seltene Erkrankung handelt. Zwischen 2 und 15% aller ambulant erworbenen Pneumonien, die eine stationäre Behandlung erforderlich machen, werden durch Legionellen ausgelöst [282, 286]. Für Deutschland geht das Robert-Koch-Institut (RKI) in seinem Ratgeber Infektionskrankheiten von einer Inzidenz von 6.000 bis 10.000 Legionella-

Pneumonien pro Jahr aus [249]. Insgesamt zählen sie damit zu den häufigsten bakteriellen Erregern ambulant erworbener Pneumonien. Engt man den Kreis auf hospitalisierte Patienten ein, so lassen sich in 9 bis 25 % serologisch und/oder kulturell eine Legionellenpneumonie nachweisen. Verglichen mit *Streptococcus pneumoniae* ist sie damit mehr als doppelt so häufig [93, 184, 326]. Neuere Zahlen des Robert-Koch-Institutes zeigen aber auch, daß nur in etwa 1-5% der in Krankenhäusern behandelten Pneumonien eine Legionellose diagnostiziert wird. Die höchste Inzidenz zeigt sich jedoch bei den nosokomialen Infektionen: Hier werden bis zu 40% der Pneumonien von Bakterien der Gattung *Legionella* verursacht [157, 213, 258, 325]. Aufgeteilt in die einzelnen Serogruppen ergibt sich ein eindeutiges Bild: 71,5% der Legionellenpneumonien werden durch *L. pneumophila* Sg 1 verursacht, lediglich 10% von *L. pneumophila* Sg 6 und 6% von *L. micdadei* [246, 286]. Gelegentlich findet man auch andere Serogruppen von *L. pneumophila*, *L. bozemanii* und *L. dumoffii*. Nur sehr selten treten Infektionen mit gering humanpathogenen Spezies, in der Regel bei immunsupprimierten Patienten auf [73, 313, 314]. Für das Pontiac-Fieber konnte ebenfalls vor allem *L. pneumophila* Sg 1, gefolgt von *L. pneumophila* Sg 6 und *L. feelei* als Hauptverursacher identifiziert werden [109, 131, 189, 275]. Vor allem vom frühzeitigen Therapiebeginn hängt die Prognose der schweren Legionellenpneumonie ab. Die Letalität beträgt hier zwischen 15 und 45% [53, 232, 286]. Infektionen mit Legionellen treten meist in Form von Epidemien auf, die dann hauptsächlich von Orten mit großen Menschenmengen, wie Hotels und Krankenhäusern ausgehen. Daneben sind aber auch sporadische Fälle beschrieben [257].

1.4.2 Vorkommen und Infektionswege

Legionellen sind weit verbreitet in Warmwasserversorgungen von Wohnhäusern, Krankenhäusern, Heimen und Hotels. Vor allem in raumluftechnischen Anlagen, z. B. Klimaanlage und Kühlaggregaten, in Badebecken, hier insbesondere in Whirlpools und in anderen Anlagen, die einen Spray von Wassertröpfchen erzeugen können, wie z. B. bei Einrichtungen der Hydrotherapie, in Dentaleinheiten und in bestimmten Luftbefeuchtern im häuslichen Bereich, vermehren sich die Bakterien besonders gerne [53, 121, 133, 154, 161, 176, 313]. Hierbei gilt, daß Systeme mit größerem Fassungsvermögen sehr viel häufiger kontaminiert sind als beispielsweise Leitungen in Einfamilienhäusern [26]. Auch in natürlichen Gewässern

sind häufig Legionellen zu finden, von denen ausgehend auch schon Infektionen berichtet wurden [74, 174]. Kingston et al. beschrieben 1994 auch eine Infektion, die bei der Gartenarbeit aufgetreten war, was den Schluß nahe legt, daß sich Legionellen auch im Erdreich aufhalten [164]. Legionellen werden durch 1 bis 5 mm große Aerosole auf den Menschen übertragen [140]. Es gibt jedoch auch Berichte, nach denen Pneumonien durch die Aspiration von kontaminiertem Wasser aufgetreten sind [30, 296, 318, 324]. Wichtige Faktoren für die Vermehrungsfähigkeit der Legionellen sind einerseits die Temperatur und andererseits das Vorhandensein von Protozoen, in denen sie sich multiplizieren können. Temperaturen zwischen 25 und 49°C fördern die Vermehrung in erheblichem Umfang [302], weshalb besonders von Warmwassersystemen eine Gefahr ausgeht. Darüberhinaus besteht ein direkter Zusammenhang zwischen im Wasser lebenden Protozoen, in denen sich die Legionellen vermehren und der Temperatur: Bei niedrigen Temperaturen sind Amöben beispielsweise in der Lage, Legionellen nach deren Phagozytose zu zerstören. Dies gelingt nicht mehr in warmem Wasser, da hier die Rate der intrazellulären Vermehrung von Legionellen drastisch ansteigt und sie deshalb von den Protozoen nicht mehr eliminiert werden können [274, 292]. Hieraus wird auch ersichtlich, daß die Vermehrung der Legionellen unmittelbar an das Vorhandensein von Protozoen gebunden ist; in unbesiedeltem Wasser können sie sich nicht vermehren [17, 33, 81, 80, 129, 219, 255, 262, 301]. Diese Interaktion zwischen Legionella und Protozoen wurde 1980 zunächst für *Acanthamoeba spp.* und *Naegleria spp.* beschrieben [254], später fand man jedoch eine Vielzahl weiterer Gattungen [82, 141, 209, 256, 274, 292, 295]. Das Vermehrungsmuster von Legionellen in Amöben ist nicht unmittelbar auf Versuchstiere oder den Menschen übertragbar. Hier scheint es zahlreiche verschiedene Mechanismen zu geben, die in den genannten Wirtsorganismen unterschiedlich ausgeprägt sind [77, 78, 79, 223, 277]. Aber auch hinsichtlich der Virulenz für den Menschen ist eine Koinhalation von Legionellen und Amöben bedeutsam: Die entstehenden Pneumonien verlaufen sehr viel häufiger mit schwerwiegenden Komplikationen bis hin zum Tod des Patienten, als bei der alleinigen Aufnahme von Legionellen [229]. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, daß die endotracheale Koinokulation von *L. pneumophila* und *Hartmannella vermiformis* in suszeptiblen A/J-Mäusen im Vergleich zur Infektion mit *L. pneumophila* alleine, wesentlich schwerere, multifokale und meist tödliche Pneumonien mit einer si-

gnifikant erhöhten intrapulmonalen Keimzahl hervorruft [34]. Die intrazelluläre Vermehrung der Erreger spielt darüberhinaus eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Invasivität und damit Virulenz, da sie im Vergleich zu agaradaptierten Stämmen in Makrophagen- und Epithelzellkulturen 10 bis 100-fach invasiver sind, sehr viel häufiger durch coiling-Phagozytose aufgenommen werden und sich auch phänotypisch in der Membranproteinelektrophorese von diesen unterscheiden [50]. Auf der anderen Seite werden Legionellen in ihrer Virulenz deutlich abgeschwächt, wenn sie auf suboptimalen Medien, die z. B. viel Kochsalz enthalten, kultiviert werden [45]. Allerdings führt auch die häufige Passage über BCYE α -Agar zu einem attenuierten Stamm [218].

Einen der wichtigsten Infektionsparameter stellt die Legionellenkonzentration dar. 10^4 colony forming units (CFU)/ml gelten als Dosis, die bei gesunden, nicht abwehrgeschwächten Personen eine klinisch manifeste Legionelleninfektion hervorrufen können, für *L. pneumophila* Sg 1 als besonders virulente Spezies werden 10^2 CFU/ml genannt. Immunsupprimierte sind bereits ab 10 CFU/ml gefährdet [169]. Die Empfehlungen an Betreiber von Hotels, Krankenhäusern, Heimen, Bädern etc. lauten, die Keimzahl möglichst unter 10^4 CFU/ml zu halten. Abteilungen in Krankenhäusern, in denen sich Transplantierte, Immunsupprimierte und Intensivpflegepatienten aufhalten, sollten Legionellen-frei sein [70]. Das RKI weist darauf hin, daß für neue Gebäude technische Richtlinien vorgegeben werden, die darauf abzielen, in keinem Bereich des Warmwassersystems Temperaturen unter 55°C zuzulassen [249]. Ein Problem stellen alte Gebäude dar, wo durch blind endende Leitungen oder baulich bedingt an vielen Stellen Temperaturen von deutlich unter 55°C herrschen [225, 257]. Deshalb kommt der regelmässigen Überwachung und gegebenenfalls der gründlichen Sanierung große Bedeutung zu. Empfohlen werden mindestens jährliche Kontrollen in großen Hotel-, Wohn- und Heimkomplexen, in Altenheimen, Krankenhäusern und Betrieben mit Duschanlagen. In den Bereichen mit besonders gefährdeten Patienten wie Intensivstationen und Transplantationseinheiten sollte mindestens viertel-jährlich kontrolliert werden. Zur Sanierung einer Legionellenkontamination stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung [121, 215]:

- thermische Dekontamination
- chemische Dekontamination (Hochchlorierung, Biozide, Natriumhypochlorit, Ozon)
- Beseitigung der Bakterien mittels UV-Strahlen
- Entfernung der Adhäsions- und Vermehrungs-fördernden Biofilme
- Einsatz von Metallionisationseinheiten
- Trinkwasserfiltration

Bei der Chlorierung treten mehrere Probleme auf: Bedingt durch die intrazelluläre Vermehrung überleben die Legionellen selbst 50 mg Chlor pro Liter Wasser [19, 162, 171]. 1988 wurden superchlorresistente Stämme beschrieben [313]. Leider läßt sich die Chlorierung nicht beliebig steigern, da zu hohe Konzentrationen zu Schäden an den Wasserleitungen führen [200] und im Wasser kanzerogene Trihalogenmethane entstehen können [257]. Auch die UV-Bestrahlung ist nicht sehr effektiv, wofür ein erstmals 1991 beschriebenes konjugatives Plasmid in *L. pneumophila* verantwortlich ist, das zur Resistenz der Bakterien gegenüber UV-Strahlen führt [291]. Die Behandlung mit Bioziden wird dadurch erschwert, daß an Biofilm gebundene Legionellen wenig empfindlich sind [319]. Ein Kombinationsprogramm aus Chlorzusatz, UV-Bestrahlung, Temperaturerhöhung und Ozonisierung wurde als erfolgreicher Ansatz beschrieben [214], letztlich gibt es jedoch bis heute kein Patentrezept, mit dem eine 100%ige Eradikation erreicht werden könnte.

Ist eine Legionelleninfektion aufgetreten, so sollte unverzüglich nach der Infektionsquelle gesucht werden. Dabei sollte mittels Plasmidanalyse [119, 155, 186, 201, 228, 281], Restriktionsmusteranalyse [116, 119, 120, 160, 173, 182, 237, 263, 290, 294], DNA-Fingerprinting durch Pulsfeldgelelektrophorese [158, 177, 183, 231, 270] oder PCR [110, 160, 205, 293, 322] die Übereinstimmung des Umweltisolats mit dem Patientenisolat festgestellt und die Infektionskette vervollständigt werden. Anschließend ist eine sofortige Dekontamination mit oben beschriebenen Verfahren durchzuführen.

1.5 Klinik der Legionelleninfektion

1.5.1 Legionellenpneumonie

Die klassische Legionellenpneumonie beginnt zwei bis zehn Tage nach Infektion mit uncharakteristischen Prodromalerscheinungen wie allgemeinem Unwohlsein, Müdigkeit, Benommenheit, Übelkeit, Kopf- und Gliederschmerzen, einem unproduktiven Reizhusten, Myalgien und Fieber. Das Vollbild der Erkrankung präsentiert sich dann mit einem breiten Spektrum von Symptomen. Neben nun produktivem, manchmal purulentem Husten und Fieber, das häufig über 40°C steigt und von Schüttelfrost begleitet ist, kommt es zu Dyspnoe, thorakalen Schmerzen und selten Hämoptysis. Das Thorax-Röntgen zeigt in diesem Stadium eine zunächst fleckige Infiltration, die später konfluiert und in der Verdichtung ganzer Lungenlappen endet. Das Röntgenbild ist aber nicht geeignet, die Legionelleninfektion von anderen Pneumonien abzugrenzen. Als weiteres Charakteristikum gilt, daß die radiologischen Zeichen der antibiotischen Therapie hinterher hinken, das heißt auch nach Beginn der Medikation wird auf dem Röntgenbild eine weitere Verschlechterung der Situation zu sehen sein, wobei sich aber das klinische Zustandsbild deutlich bessert. Mit dem Verschwinden der radiologischen Zeichen der Lungeninfiltration ist erst nach ein bis vier Monaten zu rechnen. Das pathohistologische Korrelat dieser Erkrankung ist eine multifokale, fibrinopurulente Alveolitis und Bronchiolitis mit neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Fibrin und Erythrozyten in den Alveolen [315]. Abszedierungen und Einschmelzungen kommen, vor allem bei immunsupprimierten Patienten, vor [57, 117, 165, 208, 245].

Ältere Personen zeigen häufig eine relative Bradykardie, die lange Zeit als besonderer differentialdiagnostischer Hinweis galt [89, 165], von einigen Autoren in dieser Hinsicht mittlerweile aber als überbeansprucht bewertet wird [282]. 20 bis 40% aller Patienten zeigen gastrointestinale Manifestationen in Form einer wässrigen, selten blutigen Diarrhoe [165, 326]. Ein weiteres differentialdiagnostisches Kriterium ist die Hyponatriämie mit einer Serum-Natrium-Konzentration von weniger als 130 mmol/l, die häufiger bei der Legionellose als bei anderen Pneumonien auftritt.

Kompliziert werden kann der Verlauf der Legionellenpneumonie durch das Auftreten eines ARDS und eines septischen Zustandes mit disseminierter intravasaler Gerinnung (DIC),

Multiorganversagen und häufig letalem Ausgang [10, 95, 130, 210, 300]. Insgesamt liegt die Letalität bei durch Legionellen verursachten Pneumonien bei 15-25%, bei Patienten mit nosokomialen Infektionen 60-70% und bei unbehandelten immunsupprimierten Patienten kann sie bis auf 80% ansteigen. In der Regel heilen die Pneumonie und die Begleiterkrankungen folgenlos aus, in einem Teil der Fälle bleiben jedoch restriktive Ventilationsstörungen bestehen. Vereinzelt sind Lungenfibrosen beschrieben.

1.5.2 Extrapulmonale Legionellose

Extrapulmonale Infektionen mit klinischer Symptomatik sind selten, deren klinische Manifestationen sind jedoch häufig dramatisch. Es wurden Fälle von Sinusitis [266], Cellulitis [303], Pankreatitis [310], Peritonitis, Pyelonephritis und tubulo-interstitieller Nephritis [272] beschrieben. Die häufigsten extrapulmonalen Manifestationen betreffen jedoch das Herz, wozu zahlreiche Veröffentlichungen über Myokarditis, Perikarditis, Postkardiotomie-Syndrom und Ersatzklappen-Endokarditis in Folge einer im Krankenhaus erworbenen Legionellen-Infektion erschienen sind [220, 289]. Interessanterweise waren die meisten Patienten nicht gleichzeitig an einer Pneumonie erkrankt und die Kontamination der Wunden erfolgte über den Eintritt von Legionellen-haltigem Wasser in die Wunde oder über das Drainage-System [180].

1.5.3 Pontiac-Fieber

Das Pontiac-Fieber tritt nach einer Inkubationszeit von ein bis zwei Tagen auf und manifestiert sich klinisch mit grippeähnlichen Symptomen wie allgemeinem Unwohlsein, unproduktivem Husten, Fieber, Kopf-, Glieder-, Muskel- und Thoraxschmerzen und gelegentlich auch mit Verwirrheitszuständen [225, 226]. Außerdem sind bei vielen Patienten entzündliche Veränderungen im Bereich der Mundschleimhäute, eine Konjunktivitis, Lichtscheu und Meningismus zu finden. Das Pontiac-Fieber ist nach zwei bis sieben Tagen wieder verschwunden und heilt folgenlos ab.

1.5.4 Legionelleninfektionen bei Kindern

Bei Kindern treten sowohl ambulant als auch nosokomial erworbene Legionelleninfektionen auf [32, 43, 113]. Die meisten Erkrankten sind auch in dieser Altersgruppe immunsupprimiert. Einige Fälle wurden im postoperativen Verlauf [114] und bei Neugeborenen [142] beobachtet. Die meisten derartigen Infektionen standen im Zusammenhang mit im Krankenhaus erworbenen Pneumonien während künstlicher Beatmung [181, 316].

1.6 Risikofaktoren

Risikofaktoren für den Erwerb einer Legionelleninfektion können in zwei Gruppen unterteilt werden:

- Faktoren, die die Kontamination der Umgebung erhöhen
- Faktoren, die die körpereigene Abwehr des Wirts herabsetzen

Zur ersten Gruppe gehören der Aufenthalt in Räumen mit Klimaanlage, die häufig mit Legionellen kontaminiert sind, der Aufenthalt in Hotels und Ferienanlagen, die Exposition gegenüber kontaminiertem Trinkwasser und eine längere Hospitalisierung (auch hier durch die langfristig steigende Wahrscheinlichkeit einer Exposition gegenüber Aerosolen aus Kühltürmen und Rückkühlgeräten von Klimaanlage). Auch der Aufenthalt auf Baustellen hat sich als Risikofaktor herauskristallisiert, ebenso wie Tätigkeiten bei Ausschachtungs- oder Gartenarbeiten.

Zur zweiten Gruppe gehören als allgemeine Risikofaktoren das Zigarettenrauchen, das die mukoziliäre Clearance der Atemwege beeinträchtigt und so zur Schwächung der unspezifischen Abwehr beiträgt [89]. Das Lebensalter und damit häufig einhergehende Erkrankungen wie Herzinsuffizienz, Diabetes mellitus und chronische Lungenerkrankungen spielen hier ebenfalls eine Rolle [44, 252, 259]. Auch Drogen- oder übermäßiger Alkoholkonsum, Mangelernährung und Stoffwechselanomalien mit Urämie und Azidose können das Immunsystem schwächen [224, 259].

Zu den speziellen Riskofaktoren gehören schließlich vorangegangene Operationen, wobei vor allem Transplantationen das Risiko, an einer Legionellose zu erkranken, signifikant

erhöhen [15, 43, 157, 168, 243, 326]. Die zur Verhinderung der Transplantatabstoßung notwendige Immunsuppression führt hier zusammen mit der sehr komplexen organischen und metabolischen Dysfunktion zur Infektion [257]. Daß die Erkrankungen von Patienten nach Knochenmarktransplantationen geringer sind, hängt wohl mit der besonderen Abschirmung in den „life islands“ zusammen. Auch Patienten, die sich einer Nierendialyse unterziehen müssen, sind stärker gefährdet [25]. Eine iatrogene Beeinträchtigung der Infektabwehr spielt bei der Therapie mit Glucocorticoiden [273] und Chemotherapeutika eine Rolle. Vor allem Patienten unter einer Steroidtherapie sind häufig betroffen. Weiterhin wichtig sind in diesem Zusammenhang vorausgehende bzw. begleitende maligne Erkrankungen, wobei Patienten mit einer Haarzellenleukämie besonders gefährdet erscheinen.

Erstaunlicherweise gehört das erworbene Immunschwäche-Syndrom (AIDS) nicht zu denjenigen Faktoren, die das Risiko, an einer Legionelleninfektion zu erkranken, stark erhöhen [29]. Wohl aber zeigen AIDS-Patienten, die erkrankt sind, einen sehr viel ernsteren klinischen Verlauf, der häufiger mit Lungenabszessen, extrapulmonalen Infektionen und Bakteriämie einhergeht [12, 192, 211]. Eine Übersicht über Risikofaktoren für Legionellose zeigt Tabelle 1.2.

Tabelle 1.2: Risikofaktoren für die Entwicklung einer Legionellenpneumonie [53]

<i>Spezielle Risikofaktoren</i>
Transplantation
Nierendialyse
Kortikosteroidtherapie, Cyclosporintherapie
Chemotherapie
<i>Allgemeine Risikofaktoren</i>
Zigarettenrauchen
chronische Lungenerkrankung
Alkoholismus
Diabetes mellitus
männliches Geschlecht

Alter über 50 Jahre
<i>Umweltfaktoren</i>
Aufenthalt in Räumen mit Klimaanlage
Aufenthalt in Hotels und Ferienanlagen
Inhalationsexposition gegenüber kontaminiertem Trinkwasser
längere Hospitalisierung (Exposition gegenüber Aerosolen aus Kühltürmen und Rückkühlaggregaten von Klimaanlage)
Aufenthalt auf Baustellen
Beteiligung an Ausschachtungs- oder Gartenarbeiten

1.7 Therapie

Der schnelle Beginn der Behandlung stellt den entscheidenden Schritt in der Verringerung der Morbidität und Mortalität der Legionellose dar [124, 241]. Bei der Therapie der Erkrankung ergibt sich allerdings ein spezielles Problem, da sich die Bakterien größtenteils intrazellulär aufhalten. Eine entscheidende Voraussetzung für die Behandlung ist deshalb, daß die verwendeten Antibiotika in die Zellen gelangen und dort ihre Wirkung entfalten können. Zusätzlich müssen sie das Sekret der Atemwege penetrieren können [58]. Es stellte sich alsbald heraus, daß viele der häufig verwendeten Medikamente, wie etwa Aminoglykoside oder auch β -Lactam-Antibiotika zwar in vitro Legionellen abtöten können, in vivo jedoch unwirksam sind [216, 326].

Historisch gesehen ist Erythromycin das wichtigste Medikament, das alle oben genannten Eigenschaften erfüllt. Es gehört in die Gruppe der Makrolidantibiotika und stellt ein bakteriostatisch wirksames Breitspektrumantibiotikum dar, welches die ribosomale Proteinbiosynthese hemmt [5, 304, 305]. Erythromycin wird nur unvollständig und darüberhinaus in äußerst variablen Mengen aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert. Deshalb und weil es sich in der Leber anreichert, werden heute die moderneren Makrolidantibiotika mit ähnlichem Wirkspektrum, Clarithromycin [5, 221] und Roxithromycin [5, 190] bevorzugt. Sie besitzen eine wesentlich höhere Wirksamkeit gegenüber Legionellen, eine günstigere Pharmakokinetik, eine geringere Rate an gastrointestinalen Nebenwirkungen und sind, anders als Erythromycin [285], in relevanten Dosen nicht ototoxisch. In der Schwangerschaft sollte

jedoch weiterhin Erythromycin gegeben werden, da hier nur 8-10% der mütterlichen Serumkonzentration im fetalen Blut nachzuweisen sind gegenüber 50% bei Clarithromycin oder Roxithromycin. Die Verwendung der neueren Makrolidantibiotika wird durch die Tatsache eingeschränkt, daß sie nur als orale Medikamente erhältlich sind.

Eine noch größere Wirksamkeit gegen Legionellen bei insgesamt guter Verträglichkeit besitzt das Azalid-Derivat Azithromycin [172], das sehr eng mit den Makroliden verwandt ist [5, 239]. Es ist sowohl Erythromycin als auch Clarithromycin und Roxithromycin überlegen, was seine Fähigkeit, in die Zellen zu gelangen und dort die Bakterien abzutöten, anbelangt [63, 84, 85, 166, 242, 276]. Dazu trägt auch seine Fähigkeit bei, sich im Gewebe und den Makrophagen anzureichern.

Edelstein empfiehlt als Mittel der Wahl bei immunsupprimierten Patienten ein Fluorchinolone wie Levofloxacin oder Ciprofloxacin [62, 156]. Diese haben gegenüber den Makrolidantibiotika eine nochmals erhöhte in vitro-Aktivität und eine verbesserte intrazelluläre Penetration [18, 62]. Deshalb, und wegen der Interaktionen von Makrolidantibiotika und Rifampicin mit immunsuppressiven Medikamenten erscheinen die Fluorchinolone Mittel der Wahl bei transplantierten Patienten [282].

Rifampicin sollte wegen der Gefahr einer Resistenzentwicklung nur in einer Kombinationstherapie zusammen mit einem Makrolid oder einem Fluorchinolone appliziert werden und ist vor allem bei schwer verlaufenden Pneumonien indiziert, wobei es keine Labordaten gibt, die auf einen erhöhten bakteriziden Effekt bei der Kombination von Fluorchinolonen oder neueren Makroliden mit Rifampicin schließen lassen [64].

Tabelle 1.3: Antibiotische Therapie der Legionelleninfektion

Antibiotikum	Dosierung
<i>Makrolidantibiotika</i>	
Azithromycin	500 mg p.o. oder i.v. alle 24 Stunden
Clarithromycin	500 mg p.o. oder i.v. alle 12 Stunden
Roxithromycin	300 mg p.o. alle 12 Stunden
Erythromycin	1 g i.v. alle 6 Stunden
	500 mg p.o. alle 6 Stunden

<i>Fluorchinolone (Gyrasehemmer)</i>	
Levofloxacin	500 mg p.o. oder i.v. alle 24 Stunden
Ciprofloxacin	400 mg i.v. alle 8 Stunden 750 mg p.o. alle 12 Stunden
Ofloxacin	400 mg p.o. oder i.v. alle 12 Stunden
<i>Tetracycline</i>	
Doxycyclin	100 mg p.o. oder i.v. alle 12 Stunden
Minocyclin	100 mg p.o. oder i.v. alle 12 Stunden
Tetracyclin	500 mg p.o. oder i.v. alle 6 Stunden
<i>Kombinationsantibiotika</i>	
Trimethoprim/Sulfamethoxazol	160 und 800 mg i.v. alle 8 Stunden 160 und 800 mg p.o. alle 12 Stunden
<i>Antituberkulotika</i>	
Rifampicin	300 bis 600 mg p.o. oder i.v. alle 12 Stunden

Historisch wichtig erscheint auch Tetracyclin, weil es dasjenige Medikament ist, das 1976 bei der Epidemie unter den Teilnehmern der Legionärskonferenz in Philadelphia mit Erfolg eingesetzt worden war [89]. Auch mit Hilfe von Minocyclin, Doxycyclin, Imipenem, Co-Trimoxazol, Ofloxacin und Clindamycin sind in der Vergangenheit erfolgreich Legionellen behandelt worden [62, 156].

Die Therapie einer schweren Pneumonie, die auf Legionellose verdächtig ist, sollte immer intravenös begonnen werden. Mit der klinischen Besserung und Entfieberung, die meist innerhalb von drei Tagen nach Beginn der Therapie eintritt, kann auf eine orale Medikamentengabe umgestellt werden. In den meisten Fällen scheint eine Therapiedauer von 10 bis 14 Tagen ausreichend zu sein [172, 203]. Bei Immunsupprimierten oder Patienten mit überdeutlichen radiologischen Zeichen einer Pneumonie werden allerdings bis zu 21 Tage Behandlung empfohlen. Für die Anwendung von Azithromycin genügt eine 3- bis 5- bis 10-tägige Therapie [195].

Tabelle 1.4: Therapieempfehlungen für eine gesicherte Monoinfektion mit *Legionella spp.* nach Edelstein [62, 64, 156]

Ambulant erworbene Pneumonie mit üblicherweise geringer Letalität	Erythromycin, Doxycyclin
Ambulant erworbene Pneumonie mit klinischen Hinweisen auf hohe Letalitätswahrscheinlichkeit	Fluorochinolon (z.B. Levofloxazin, Ofloxazin)
Nosokomiale Pneumonie bei Patienten < 60 Jahren ohne zusätzliche Erkrankung	Hochdosis Penicillin und Azithromycin i.v.
Immunsupprimierte Patienten und Patienten mit zusätzlichen Erkrankungen	Fluorochinolon (z. B. Levofloxacin)

1.8 Pathogenese

Die Pathogenese der Legionelleninfektion beginnt mit der Inhalation von Bakterien-haltigem Aerosol. Dieses gelangt in die Alveolen und wird dort von Alveolarmakrophagen phagozytiert. In-vitro-Versuche mit Serum-haltigem Medium haben ergeben, daß die Komplementkomponente C3b an eine 28 kDa große Untereinheit des „major outer membrane protein“ (MOMP) an der Oberfläche der Legionellen bindet. Dies geschieht über den klassischen oder den alternativen Weg der Komplementaktivierung. Man nahm daher bisher an, daß die solchermassen markierten Bakterien von den Komplementrezeptoren CR3 und CR1 erkannt, gebunden und dann als MOMP-C3bi-CR-Komplex gemeinsam endozytiert werden. Diese Rezeptoren kommen vor allem auf Monozyten/Makrophagen und polymorphkernigen Leukozyten vor. Obwohl man bisher davon ausging, daß für eine effektive Phagozytose der Bakterien Komplementkomponenten benötigt werden, gelingt die Phagozytose jedoch auch, wenn dem Infektionsmedium in vitro kein oder nur hitzeinaktiviertes Serum zugesetzt wird [235]. Da Makrophagen ebenfalls geringe Mengen Komplement sezernieren, wird von zahlreichen Autoren vermutet, daß dies bereits ausreicht, um die Aufnahme der Legionellen in die Makrophagen zu stimulieren. Von einigen Autoren wurde postuliert, daß es eine Oponin-unabhängige Komponente der Legionellenphagozytose geben muß, die über

Lektin-ähnliche Strukturen vermittelt sein könnte. Hier kommen als Antigene insbesondere Kohlenhydrat- oder Lipidmoleküle auf der Legionellenoberfläche in Frage [108], die genauen Rezeptoren müssen aber noch ermittelt werden.

Die Komplement-vermittelte Phagozytose ist ein Mechanismus für zahlreiche intrazelluläre Bakterien, um auf schonende Art und Weise und unter Umgehung bakterizider Mechanismen in die Wirtszelle zu gelangen [320].

Neuere Untersuchungen von Krinos et al. zeigen außerdem eine Komplement-unabhängige Rolle von MOMP bei der Phagozytose von *Legionella spp.* So verbessert das Protein in Abwesenheit von Serum die Bindung von Bakterien um das fünffache und erhöht die Virulenz von *L. pneumophila* in Hühnerembryonen-Assays [170]. Wichtig für die Komplement-unabhängige Adhäsion scheinen weiterhin Typ IV-Pili zu sein, da Mutanten, denen das Strukturgen *pilE_L* fehlt, eine um 50% reduzierte Adhärenz an *A. polyphaga* und die humanen Zelllinien U937 und HeLa zeigen [280].

Ist die Adhärenz geglückt und die Phagozytose in Gang gebracht, so erkennt man unter dem Elektronenmikroskop, daß es hierfür zwei verschiedene Mechanismen gibt: Auf der einen Seite die klassische Phagozytose, bei der die Partikel durch eine Einziehung des Zytoplasmas und letztlich durch die Abschnürung der Plasmamembran in die Zelle aufgenommen werden. Für die Komplementrezeptor-vermittelte Phagozytose von *Legionella pneumophila* Serogruppe 1 hat man einen speziellen Mechanismus entdeckt, der unter anderem aber auch bei *Leishmania donovani*, *Borrelia burgdorferi*, zahlreichen Spirochäten Trypanosomen und Hefen zu beobachten ist [286]: Die sogenannte „coiling-Phagozytose“, bei der eine lange pseudopodienartige Ausziehung der Plasmamembran entsteht, die das Bakterium spiralförmig umschließt und es schließlich in sich aufnimmt [145]. Aber nicht nur Makrophagen, sondern auch Amöben bedienen sich dieser Methode [31], nicht aber *H. vermiformis* [1]. Sowohl tote, als auch lebende *L. pneumophila* Sg 1 werden auf diese Weise internalisiert, nicht jedoch eine Vielzahl anderer Legionellen oder *L. pneumophila* Sg 1, die zuvor mit anti-*Legionella*-Antiserum inkubiert wurden.

Verfolgt man den Prozeß unter dem Elektronenmikroskop weiter, so erkennt man, daß virulente Legionellen nach der Phagozytose ein Phagosom bilden, das von Ribosomen umgeben ist. In diesen Phagosomen vermögen sich die Legionellen zu vermehren, mit einer

Verdopplungszeit von etwa zwei Stunden während der mid-log-Phase [146]. Bisher glaubte man, daß diese Phagosomen weiter persistieren, ohne mit Lysosomen zu fusionieren und darüberhinaus nicht angesäuert werden. Dies seien die entscheidenden Pathomechanismen, die das intrazelluläre Überleben der Legionellen sichern und eine effektive Vermehrung erst ermöglichen. Werden Legionellen vor der Phagozytose mit Formalin inaktiviert, sind sie nicht mehr in der Lage, eine Phagosom-Lysosom-Fusion zu verhindern: Der pH-Wert wird sauer und die Bakterien werden schnell innerhalb des Phagolysosoms verdaut. Neuere Arbeiten von Swanson et al. zeigen jedoch, daß die Mehrzahl der Phagosomen 18 Stunden nach der Infektion LAMP-1 (Lysosomen-assoziiertes Membranglykoprotein 1), ein spätes endo- und lysosomales Glykoprotein und etwa die Hälfte das lysosomale Enzym Cathepsin D enthalten. Diese Arbeitsgruppe beobachtete außerdem eine Ansäuerung der Replikationsvakuolen, die erst im Laufe der Infektion einsetzt und 16-20 Stunden nach Beginn derselben einen pH-Wert von 5,5 messen läßt. Swanson et al. schließen daraus, daß die Phagosomen im Laufe der Zeit doch mit Lysosomen fusionieren und daß dies die bakterielle Replikation nicht verhindert, sondern sogar unterstützt [283, 286]. Wenn die Ansäuerung des Phagosoms aber eine Voraussetzung für die Replikation der Legionellen ist, bleibt ungeklärt, weshalb sich die Bakterien schon kurz nach Beginn der Infektion in dann noch neutralem pH deutlich vermehren können.

In der Vergangenheit wurden fünf Gen-Loci im Legionellen-Genom charakterisiert, die für die intrazelluläre Vermehrung von entscheidender Bedeutung sind:

- *icm* (intracellular multiplication locus [191, 244, 271])
- *dot* (defect in organelle trafficking [6, 23, 299])
- *mip* (macrophage infectivity potentiator [46])
- *pmi* (protozoan and macrophage infectivity loci [100, 102])
- *mil* (macrophage-specific infectivity loci [101, 102, 118])

Das Fehlen eines dieser Genbereiche führt, wie an zahlreichen Mutanten gezeigt, zur Abschwächung der Virulenz mit einer verzögerten intrazellulären Vermehrung. Einschränkend muß gesagt werden, daß *mip*- oder *mip*-ähnliche Gensequenzen auch in anderen Bakterien

vorhanden sind, die sich intrazellulär wenig oder gar nicht vermehren. Außerdem exprimieren auch *Enterobacteriaceae* Mip-Proteine, die sie jedoch sicher nicht für eine intrazelluläre Vermehrung benötigen. Dies läßt die überragende und ausschließliche Bedeutung dieses Genabschnitts für die intrazelluläre Vermehrung zweifelhaft erscheinen.

Zusammenfassend ergibt sich nach Swanson et al. folgendes Pathogenese- und Replikationsmodell für *L. pneumophila* [286]: Werden die Bakterien von Makrophagen oder Amöben aufgenommen, sezernieren sie über Dot/Icm-Proteine Faktoren, die das entstehende Phagosom modifizieren und es vom endosomalen Stoffwechselweg fernhalten. Anschließend wird ein autosomales Phagosom gebildet, indem das ursprüngliche Phagosom vom endoplasmatischen Retikulum aufgenommen wird. In dieser beschützten Umgebung differenzieren sich die Legionellen in eine replizierende Form, die Säure-tolerant ist, keine Dot/Icm-Proteine mehr benötigt und etliche Virulenzfaktoren, die z. B. für das Blockieren der Phagosom-Lysosom-Fusion notwendig sind, nicht mehr exprimiert. Anschließend wird die Autosomen-ähnliche Vakuole zum lysosmalen Kompartiment transportiert, wo nach Fusion von Phagosom und Lysosom die Replikation stattfindet. Wenn schließlich der Aminosäuren-Vorrat der Wirtszelle zur Neige geht, akkumuliert der intrazelluläre Second-messenger Guanosin-3'5'-Bispyrophosphat (ppGpp), was die Ausbildung bestimmter Eigenschaften triggert, die für die Infektion benachbarter Monozyten/Makrophagen benötigt werden [42]. Dazu gehört:

- ein Zytotoxin, das die Flucht aus der Wirtszelle erlaubt
- die osmotische Resistenz der Bakterien wird erhöht, damit sie im extrazellulären Milieu besser überleben können
- eine erhöhte Beweglichkeit erleichtert die Verbreitung und den Kontakt mit einer neuen Wirtszelle und
- es werden wiederum Eigenschaften hervorgebracht, die die Phagosom-Lysosom-Fusion verhindern und somit das Überleben im neuen Makrophagen ermöglichen. Dort beginnt der Zyklus dann von neuem.

Neutrophile Granulozyten phagozytieren ebenfalls Legionellen, allerdings muß *L. pneumophila* zuerst durch spezifische Antikörper opsoniert werden, damit eine, hier F_c -vermittelte

Phagocytose, stattfinden kann. Diese Wirtszellen lassen eine Vermehrung der Bakterien nicht zu [148, 307] und töten 60% der Legionellen eines Inokulums ab. Überlebende Wirtszellen zeigen sich anschließend aber eindeutig funktionsgemindert, was die Chemotaxis und den „oxidative burst“ anbelangt [59, 260].

1.8.1 Stoffwechsel

Eine Reihe von Stoffwechselfaktoren, die einerseits in den Legionellen selbst begründet sind und andererseits Umweltfaktoren darstellen, begünstigen oder benachteiligen das Wachstum, das Überleben der Bakterien in Kultur oder in den Wirtszellen und die Virulenz. Dabei zeichnen sich attenuierte Stämme vor allem dadurch aus, daß sie sich in Wirtszellen nicht mehr oder nur deutlich langsamer vermehren und in Versuchstieren praktisch keine Infektion mehr auslösen können.

„oxidative burst“

Für *L. pneumophila* und für *L. micdadei* konnte gezeigt werden, daß sie den „oxidative burst“ der phagozytierenden Zelle herabsetzen können, indem sie die Produktion von Sauerstoffradikalen hemmen [59, 260]. Dies geschieht zumindest teilweise über das *L. pneumophila*-major secretory protein (Msp), eine Zink-Metalloprotease [261]. Für die Legionellen ist dies besonders wichtig, da sie aufgrund ihrer geringen Enzymaktivitäten an Katalase, Glutathionperoxidase und Glutathionreduktase sehr empfindlich gegen die toxisch wirkenden Sauerstoffradikale sind [179].

Eisenstoffwechsel

Ein weiterer wesentlicher Faktor ist die Beeinflussung des Eisenstoffwechsels der Wirtszelle durch *Legionella spp.* Eisen ist für das Legionellenwachstum essentiell und muß hierfür in hohen Konzentrationen zwischen 3 und 20 μM vorliegen. Dem Kulturmedium wird deshalb Eisenpyrophosphat zugesetzt [75]. In vivo beziehen die Bakterien das Eisen aus dem Stoffwechsel ihrer Wirtszellen. In den Wirtszellen werden das Transferrin-Transferrinrezeptor-System (siehe 4.2.6 auf Seite 67), das Lactoferrin-Lactoferrinrezeptorsystem und das Fer-

ritin für diese Funktionen herangezogen. So beobachtet man, daß nach der Freisetzung von Granula aus neutrophilen Granulozyten die intrazelluläre Vermehrungsrate von Legionellen in benachbarten Makrophagen deutlich abnimmt. Die Granula enthalten Apolactoferrin, das an den Lactoferrinrezeptor von Makrophagen bindet und von diesen aufgenommen wird. Dieses bildet intrazellulär Chelate und reduziert auf diese Weise das für das Wachstum der Legionellen zur Verfügung stehende Eisen. Gesteigert wird dieser Effekt durch die Stimulation der Granulozyten mit $\text{TNF-}\alpha$ oder $\text{IFN-}\gamma$ [37, 38, 39, 40].

Temperatur

Die Umgebungstemperatur beeinflusst maßgeblich die Virulenz der Legionellen. Bei Temperaturen um 37°C finden sie optimale Bedingungen für das Wachstum vor. Wird diese beispielsweise auf 24°C reduziert, so ist die Virulenz deutlich abgeschwächt, steigt aber bei Erwärmung auf 37°C wieder auf das frühere Niveau an [196]. Auch die Transkription und die Synthese von Flagellen ist temperatur-abhängig: So sind die DNA- und die Protein-Synthese bei Temperaturen von 30°C deutlich erniedrigt [178]. Gleiches gilt für die Synthese von Typ IV Pili [286].

Elektrolytkonzentrationen

Kultiviert man Legionellen nicht auf Optimalmedien wie $\text{BCYE}\alpha$ -Agar, in Zellkulturen, Amöbenkulturen oder Hühnereiembryonen, sondern auf suboptimalen Medien, wie beispielsweise SMH-Agar, der einen hohen Gehalt an Kochsalz besitzt, werden die Legionellen in ihrer Virulenz ebenfalls deutlich abgeschwächt [45, 197].

Oberflächenproteine

Legionellen produzieren während des intrazellulären Wachstums eine ganze Reihe von Proteinen, die spezifisch für diese Phase sind. Zu diesen „Macrophage Induced Proteins“ (MIN) gehören auch Hitzeschockproteine, die verstärkt exprimiert werden und an der Oberfläche erscheinen. Deren erhöhte Produktion ist gleichzeitig ein Proliferationsreiz für Lymphozyten, die so die Abwehr der Legionellen erleichtert [2, 284, 323].

1.9 Virulenzfaktoren

Im Laufe der Zeit konnten einige potentielle Virulenzfaktoren von *Legionella spp.* charakterisiert werden, die bei der Pathogenese eine Rolle spielen. Insgesamt kann aber keinem der bislang diskutierten Faktoren ein eindeutig dominanter Effekt zugeordnet werden.

1.9.1 Extrazelluläre Enzyme und Produkte

Zink-Metalloprotease = Major Secretory Protein (MSP) 38 kDa, Metalloprotease mit zytotoxischer und hämolytischer Aktivität, die die protektive zellvermittelte Immunität induziert und den „oxidative burst“ der phagozytierenden Zellen herabsetzt, jedoch keine direkte Bedeutung für die intrazelluläre Vermehrung hat [61, 261]

Legionellatoxin 1,3 kDa großes Protein, welches zytotoxisch ist und den „oxidative burst“ in neutrophilen Granulozyten hemmt [91, 92]

Säurelösliches Toxin 3,4 kDa großes Protein, das ebenfalls zytotoxisch ist und die Chemilumineszenzreaktion von neutrophilen Granulozyten hemmt [126]

Phospholipasen Ein früher als Phospholipase C beschriebenes Molekül, von dem man heute weiß, daß es Phospholipase A-Aktivität aufweist, ist zytotoxisch für eukaryonte Membranen, hydrolysiert evtl. Surfactant und ist spezifisch für zwei Substrate: Phosphatidylglycerol und Lysophosphatidylcholin [13, 86, 87]

1.9.2 Zellassoziierte Komponenten

Major Outer Membrane Protein (MOMP) 100 kDa-Komplex mit einer 28 kDa-Untereinheit, die den Komplementfaktor C3 bindet und einen MOMP-C3bi-CR3-Komplex bildet, der phagozytiert wird; Komplement kann auf klassischem oder alternativem Weg aktiviert werden [35, 97, 96]

Macrophage infectivity potentiator (mip) 24 kDa großes Enzym mit Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase-Aktivität, das für Infektiosität und intrazelluläres Überleben direkt im Anschluß an die Phagozytose zuständig ist [47]

Intracellular multiplication locus (icm) Locus mit 13 Genabschnitten, wichtig für die intrazelluläre Vermehrung [191, 244, 271]

Defect in organelle trafficking (dot) Locus mit 15 Genabschnitten, ebenfalls wichtig für die intrazelluläre Vermehrung [6, 23, 299]

Protozoan and macrophage infectivity loci (pmi) Gen, das eine Rolle spielt für Zytotoxizität, intrazelluläres Überleben und Replikation in Monozyten/Makrophagen und Protozoen [100, 102])

Macrophage-specific infectivity loci (mil) Gen, das für das intrazelluläre Überleben und die Vermehrung vor allem in Monozyten/Makrophagen von Bedeutung ist [101, 102, 118])

Legiolysin (lly) 39 kDa mit Hämolyisin-Aktivität [21]

Hitzeschockprotein = Major cytoplasmic membrane protein (htpB) 60 kDa, immunogenes Protein mit Genus-spezifischem Epitop, das während der intrazellulären Vermehrung im Phagosom von den Legionellen vermehrt exprimiert wird und sich sowohl auf der Legionelloberfläche als auch frei in den Vakuolen befindet [138, 240]

Major iron containing protein (MICP) = Aconitase (acn) 98 kDa, von Bedeutung für den Eisenmetabolismus [202]

Ferric uptake (fur) 15 kDa, ebenfalls von Bedeutung für Eisenmetabolismus [136]

periplasmatische Eisenreduktase wichtig für den Eisenmetabolismus [159]

LPS Lipopolysaccharid mit einem hohen Prozentsatz an verzweigt-kettigen Fettsäuren, das Serogruppen-spezifisch ist, Komplement auf dem klassischen Weg aktivieren kann und nur eine geringe Endotoxinaktivität aufweist [48, 222, 317]

Flagellen (flaA) 47 kDa, entscheidend für die Bakterienmotilität und die Invasion von *Legionella spp.* [56, 134, 135, 250]

Superoxiddismutase (SOD) zur Inaktivierung toxischer Sauerstoffradikale [238]

Phosphatase(n) 86 kDa, Hemmung der Neutrophilenaktivierung und des „oxidative burst“, ohne Bedeutung für die intrazelluläre Vermehrung [8, 7, 144, 163]

1.10 Immunabwehr

1.10.1 Humorale Immunität

Insgesamt muß man feststellen, daß *L. pneumophila* serumresistent ist, d.h. daß weder die Aktivierung des Komplements durch MOMP oder LPS, noch hochtitrige Antikörperkonzentrationen die Legionellen zu inaktivieren oder zu vernichten vermag [148].

1.10.2 Zellvermittelte Immunität

Die zellvermittelte Immunität stellt den entscheidenden Mechanismus für die Abwehr der Legionellen dar. Zwar schafft auch sie es nicht, die Legionellen abzutöten, sie hält aber die Infektion unter Kontrolle und wirkt bakteriostatisch, indem sie in Phagozytose und intrazelluläre Vermehrung eingreift. So zeigen Lymphozyten von infizierten Patienten, die wieder gesundet waren, bei erneutem Kontakt mit Legionellen eine deutliche Proliferationstendenz und eine Erhöhung der Zytokinproduktion, vor allem von $\text{IFN}\gamma$ [90, 143].

Für Makrophagen gilt, daß sie bei Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ deutlich weniger Legionellen phagozytieren und in der Lage sind, die ungehemmte Vermehrung der Bakterien einzuschränken [147]. Vermutlich sind es zwei Mechanismen, die hierzu beitragen: Einerseits die verminderte Expression des Komplementrezeptors, die die Phagozytose erschwert und gleichzeitig die verminderte Expression des Transferrinrezeptors, der die Verfügbarkeit von intrazellulärem Eisen in Form von Ferritin für die Legionellen deutlich einschränkt und sie dadurch im Wachstum behindert. Zusätzlich lassen sich Makrophagen *in vitro* auch durch LPS bzw. Lipid A [9, 67, 106] oder $\text{TNF-}\alpha$ [193] stimulieren, wobei ebenfalls eine verminderte Transferrinrezeptor-Expression zum Tragen kommt.

Die endgültige Beseitigung infizierter phagozytischer Zellen übernehmen NK-Zellen, die wahrscheinlich durch Interleukin-2 (IL-2) getriggert werden [27, 28, 247]. Es entsteht in der Abwehr einer Legionelleninfektion also ein komplexes Zusammenspiel von vielen

Faktoren, das im einzelnen die Antigenpräsentation, die Aktivierung von Makrophagen, T-Lymphozyten und NK-Zellen und die Chemotaxis und Phagozytose durch neutrophile Granulozyten umfaßt. Durch verschiedene Erkrankungen oder immunsuppressive Therapien, allen voran der Applikation von Kortikosteroiden, können Situationen entstehen, die es dem Körper merklich schwerer machen, mit einer Legionelleninfektion fertig zu werden und somit zu schweren klinischen Verläufen führen.

1.11 Fragestellung

Bisherige in-vitro-Untersuchungen mit agaradaptierten Stämmen zeigten eine Adhärenz der Komplementkomponente C3b an das Hauptoberflächenprotein (MOMP) von *L. pneumophila*. Der MOMP-C3bi-Komplex bindet an CR1 oder CR3 auf Monozyten/Makrophagen und wird dann als MOMP-C3bi-CR-Komplex in die Zelle aufgenommen [235]. Ob diese Beobachtungen auf die in-vivo Situation bzw. auf zelladaptierte Stämme zu übertragen sind, ist unklar, da in der Lunge zu Beginn einer Infektion z. B. nur wenig Komplement zu finden ist. Außerdem fanden Gibson et al. später eine Komplementrezeptor-unabhängige Phagozytose, wobei die Legionellen über Lektine in Alveolarmakrophagen und Monozyten aufgenommen wurden [108]. 1997 haben dann Venkataraman et al. ein Galaktose/N-Acetyl-Galaktosamin(Gal/GalNAc)-inhibierbares Lektin gefunden, das Legionellen bei der Adhäsion und Invasion von Protozoen als Rezeptor dient [297]. Gao et al. zeigten schließlich, daß die Aufnahme und intrazelluläre Vermehrung von Legionellen in Protozoen und menschlichen Zellen zu einem sehr großen Teil über ähnliche Mechanismen verlaufen, bestimmte Mechanismen aber nur für die Invasion von Legionellen in Amöben benutzt werden [100]. Als weiterer Ligand mit Bedeutung für die Phagozytose von Legionellen wurde 1998 von Garduño et al. Hsp60 beschrieben, das die Adhäsion und Invasion in HeLa-Zellen vermittelt [104]. Bermudez et al. untersuchten 1997 die Rollen von CR1 und CR3, CD29, CD71 und von Scavengerrezeptoren bei der Phagozytose von *Mycobacterium avium* und stellten fest, daß extrazellulär kultivierte (agaradaptierte) *M. avium* über den CR3-Rezeptor in die Zelle gelangen, während intrazellulär (in Monozyten) gewachsene Bakterien das β -Integrin CD29 und den Transferrinrezeptor (CD71) für ihre Phagozytose nutzen [24]. Schlesinger

et al. fanden 1993, daß die Phagozytose von virulenten *M. tuberculosis* zusätzlich zu den Komplementrezeptoren auch über den Mannoserezeptor vermittelt wird [267]. Dies wurde in einer weiteren Studie von Astarie-Dequeker et al. 1999 auch für pathogene und apathogene Spezies von *M. phoi*, *M. smegmatis* und *M. kansasii* bestätigt [11].

In der vorliegenden Arbeit soll der Zusammenhang und die Beteiligung einzelner Oberflächenrezeptoren von Makrophagen bei der Phagozytose von Legionellen, auch im Hinblick auf Unterschiede zwischen Wirtszell- und Agar-adaptierten Stämmen, untersucht werden. Dies geschieht mit Hilfe einer sehr weit differenzierten Monozyten-Zelllinie (Mono Mac 6) und der Verwendung blockierender monoklonaler Antikörper, unter der Vorstellung, daß sich bei der Blockade des Rezeptors und einer maßgeblichen Beteiligung des entsprechenden Oberflächenmoleküls an der Phagozytose eine signifikante Veränderung der Phagozytoserate finden wird [24]. Bei allen Experimenten wurden sowohl eine hochvirulente, als auch eine durch häufige Agar-Passagen attenuierte Legionellenspezies getestet.

Zu Beginn wurden die Vermehrungsfähigkeit der Legionellen in der verwendeten Zelllinie und der Expressionsgrad der zu untersuchenden Oberflächenrezeptoren auf den Mono Mac 6-Zellen untersucht und anschließend die Versuche mit Blockierung aller in Abschnitt 4.2 ab Seite 61 vorgestellten Rezeptoren durchgeführt, wobei sowohl Integrine (CD11b, CD18, CD29, CD35), als auch der LPS-Rezeptor (CD14), das interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1, CD54) und der Transferrin-Rezeptor (CD71) berücksichtigt wurden.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Anzuchtmedien und -materialien

In der folgenden Tabelle sind alle Medien und Materialien aufgeführt, die zur Anzucht und Kultur der Legionellen verwendet wurden.

Tabelle 2.1: Material

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Agar Agar Lysiertes Pferdeblut	Oxoid, Wesel
Hefeextrakt Aktivkohle <i>Legionella</i> -BCYE α -Supplement	Merck, Darmstadt
Petrischale	Greiner, Frickenhausen
RPMI 1640 Fetales Kälberserum Glutamin Zellkulturwasser Aminosäuren	Gibco Life Technologies, Karlsruhe

Zellkulturflasche belüftet, 75 cm ²	Costar, Corning, NY, USA
OPI	Sigma, München
PP-Röhrchen, steril, 50 ml Röhrchen 15 ml 24-Loch-Platte	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
<i>Mycoplasma</i> PCR-Kit Cryo 1°C Freezing Container	Stratagene, La Jolla, CA, USA Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA

2.1.2 Legionellenspezies und -serogruppen

Folgende *Legionella*-Stämme wurden für die Versuche verwendet:

- *Legionella pneumophila* Serogruppe 1 (Philadelphia 1), Patientenisolat einer in Italien erworbenen Legionellenpneumonie, weniger als drei Agarpassagen nach primärer Isolierung [Lp1v]; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Lück und Herrn Dr. Helbig, Institut für Medizinische Mikrobiologie der Medizinischen Akademie Dresden
- *Legionella pneumophila* Sg 1 (Philadelphia 1), isoliert aus einer menschlichen Lunge, Anzahl der Agarpassagen unbekannt, ATCC 33152 [Lp1a].

Dabei handelt es sich mit Lp1v um ein vergleichsweise pathogenes Isolat, das in seiner Virulenz noch nicht abgeschwächt ist. Die direkte Isolierung aus dem Körper eines betroffenen Patienten und die geringe Anzahl an Agarpassagen garantieren dies. Mit Lp1a wurde hingegen ein *Legionella*-Stamm ausgewählt, der durch eine größere Anzahl von Agarpassagen in seiner Virulenz abgeschwächt wurde [45, 218].

2.1.3 Zelllinie Mono Mac 6

Für alle Versuche wurde die Zelllinie Mono Mac 6 verwendet, die 1988 von Ziegler-Heitbrock et al. erstmals charakterisiert wurde [328]. Es handelt sich hierbei um eine Monozyten-

Zelllinie, die auf Zellen eines 67-jährigen Patienten mit akuter monozytärer Leukämie zurück geht.

Die Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Ziegler-Heitbrock, Institut für Immunologie, München, zur Verfügung gestellt.

2.1.4 HeLa-Zellen

Bei der HeLa-Zelllinie handelt es sich um Zellen eines zunächst als epitheliales Cervix-Karzinom diagnostizierten Tumor einer 31-jährigen schwarzen Frau von 1951, der später aber als Adenocarcinom klassifiziert wurde. Diese Zellen stellen die erste, aneuploide, kontinuierlich kultivierte humane Zelllinie dar [107, 265].

2.1.5 Jurkat-Zellen

Die Jurkat-Zelllinie wurde 1976 aus Zellen eines 14-jährigen Jungen mit dem ersten Rückfall akuter lymphoblastischer Leukämie etabliert. Es handelt sich um T-Zellen, die 1977 erstmals von Schneider et al. charakterisiert wurden [269].

2.1.6 Antikörper

Die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten blockierenden Antikörper (azidfrei) wurden über die entsprechenden Distributoren in Deutschland erworben und gemäß den Lagerungsvorschriften der Hersteller in Aliquots zu 100 μ l entweder im Kühlschrank bei +6°C oder im Gefrierschrank bei -20°C bis zur endgültigen Verwendung gelagert. Die Antikörper wurden für die gesamte Dauer des Versuches im Ansatz belassen und nicht wieder entfernt. Die Endkonzentration betrug jeweils 23,4 μ g/ml.

Tabelle 2.2: Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Klon</i>	<i>Hersteller</i>
anti-CD11b	ICRF44	Serotec, Oxford, GB
anti-CD29	3S3	
anti-CD35	E11	

anti-CD71	DF1513	
Maus-IgG1 Isotypkontrolle	W3/25	
Maus-IgG2a Isotypkontrolle	OX34	
anti-CD11b	ICRF44	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
anti-CD54	HA58	
anti-CD11b	Bear-1	Biodesign, Saco, Maine, USA
anti-CD18	68-5A5	Biosource, Camarillo, CA, USA
anti-CD29	B-D15	
anti-CD54	8.4A6	
anti-CD14	biG14	Biometec GmbH, Greifswald
Maus-IgG2a Isotypkontrolle		

2.1.7 Technische Geräte

Tabelle 2.3: Technische Geräte

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Sterile Werkbank	Heraeus, Hanau
Zentrifuge (Varifuge 3.OR)	
CO ₂ -Brutschrank	
Agar-Ausspatelmaschine Spiralplater	Meintrupp DWS Laborgeräte, Lähden-Holte
Vortex	Bender und Hobein, Zürich

2.1.8 Geräte für die Zellkultur

Tabelle 2.4: Geräte für die Zellkultur

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Zellkulturflaschen	Nunc Intermed, Kamstrup, Dänemark
Multidish 6- und 24-Lochplatten	
Zentrifugenröhrchen (Bluecap-Röhrchen), 15ml und 50ml	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg

Einmal-Pipetten (1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml)	
FACS-Röhrchen	
Neubauer-Zählkammer	Bender und Hohbein, Zürich
Trypanblau (0,4% Lösung)	Sigma, München
Gentamicin-Lösung (50mg/ml)	Gibco Life Technologies, Karlsruhe

Um eine Kontamination der Zellkulturen durch Mykoplasmen auszuschließen, wurden diese in regelmäßigen Abständen mit einem *Mycoplasma*-PCR-Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) untersucht.

2.1.9 Geräte und Materialien für die Durchflußzytometrie

Alle für die Durchflußzytometrie benötigten Antikörper waren mit Ausnahme von Anti-CD54 der Firma BD Pharmingen Fluorescein-Isothiocyanat(FITC)-markiert. An ICAM-1 war PE gebunden. Anti-CD14 wurde mit Fluorescein(DTAF)-markierten Sekundärantikörpern in einem zusätzlichen Arbeitsschritt markiert, alle anderen Zubereitungen wurden von den angegebenen Firmen fertig markiert erworben.

Tabelle 2.5: Durchflußzytometrie: Geräte und Materialien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
FACSort™-Durchflußzytometer	Becton Dickinson,
FACSFlow™-Trägerlösung	Heidelberg
FACStation™(Apple Macintosh Quadra 650) in Verbindung mit CELLQuest™-Software zur Steuerung, Datenerfassung und -auswertung	
FACS-Röhrchen	
FACS-Waschpuffer, bestehend aus	
PBS(Phosphate Buffered Saline)-Puffer	Sigma, München
+ 0,1% Azid	Merck, Darmstadt
+ 0,1% Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma, München
Anti-CD11b-FITC, Klon Bear-1	Biodesign, Saco, ME, USA

Anti-CD18-FITC, Klon 65-5A5 Anti-CD29-FITC, Klon B-D15 Anti-CD54-FITC, Klon 8.4A6 IgG1-FITC Negativ-Kontrolle, Klon MOPC21/321 IgG2a-FITC Negativ-Kontrolle, Klon B-Z2	Biosource, Camarillo, CA, USA
Anti-CD11b-FITC, Klon ICRF44 Anti-CD29-FITC, Klon 3S3 Anti-CD35-FITC, Klon E11 Anti-CD71-FITC, Klon DF1513 IgG1-FITC Negativ-Kontrolle, Klon W3/25 IgG2a-FITC-Negativ-Kontrolle, Klon MRC OX-34	Serotec, Oxford, GB
Anti-CD54-PE, Klon HA58	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
Sekundär-Antikörper: Fluorescein(DTAF)-konjugiertes f(Ab) ₂ - Fragment Anti- Maus IgG + IgM von der Ziege	Jackson Immuno, West Grove, PA, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Anzucht der Legionellen

Die untersuchten Legionellenstämmen wurden für 5 bis 7 Tage auf BCYE α -Agar bei 37°C und 5% CO₂ angezüchtet. Dieser enthält neben Agar und BCYE α -Supplement Aktivkohle und Hefeextrakt, da die Legionellen sehr empfindlich gegenüber reaktiven Sauerstoffverbindungen sind [75, 139].

2.2.2 Zellkultur

Die Anzucht der Mono Mac 6-Zellen erfolgte in einem speziellen Medium, das in seiner Grundsubstanz aus RPMI 1640 bestand und folgende Zusätze – jeweils in Endkonzentration – enthielt:

- 10% fetales Kälberserum (myclone super plus, 30 Minuten bei 56°C im Wasserbad inaktiviert)
- 1% L-Glutamin
- 1% nicht-essentielle Aminosäuren
- 1% OPI-Lösung (Oxalacetat 1mM, Pyruvat 1mM, Insulin 9µg/ml)

Alle Zutaten bis auf das fetale Kälber-Serum wurden vor Zugabe mit Hilfe eines 0,22µm-Filters steril filtriert. Die Zellen wurden anschließend in einem Brutschrank bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% gehalten und zwei mal pro Woche in neues Medium überführt. Vor jedem Umsetzen und vor jeder Verwendung der Zellen für die Versuche wurden die Kulturflaschen lichtmikroskopisch hinsichtlich der Vermehrungsrate der Zellen und auf Verunreinigungen bzw. Kontaminationen hin kontrolliert. Insbesondere wurde darauf geachtet, daß die Zellen rund, regelmäßig geformt und nicht verklumpt waren. Kulturen mit verklumpten oder kontaminierten Zellen wurden grundsätzlich weder weiter kultiviert, noch für Versuche verwendet. Zusätzlich wurde eine Sterilkontrolle auf Columbia-Blut-Agar durchgeführt.

Aus einer Kulturflasche wurden grundsätzlich maximal 30 Passagen durchgeführt. Anschließend wurde eine neue Flasche aus dem tiefgefrorenen Reserve-Zell-Pool verwendet. Hierfür wurden frühzeitig mehrere hundert Kulturflaschen gleichartiger, synchronisierter Zellen eingefroren: Die einzufrierenden Zellen wurden bei 400 × g 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet mit 3 ml eiskaltem Zellkulturmedium, dem 10% DMSO zugesetzt wurden, resuspendiert. Je 1 ml wurde in ein Kryoröhrchen gefüllt und sofort in die Gefrierbox von Nalgene bei -70°C überführt, die Isopropanol enthält und eine Abkühlung der Zellen um 1°C pro Minute garantiert. Im Anschluß daran wurden die Zellen über Nacht bei -70°C gehalten um sie am nächsten Tag für die Langzeit-Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff zu überführen.

Zum Auftauen wurden die Röhrchen aus dem Stickstoff in warmem Wasser schnell erwärmt, in einem Bluecap-Röhrchen sofort mit Zellkulturmedium auf 20 ml Mono Mac 6-Kulturmedium aufgefüllt und bei 400 × g 10 Minuten lang zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes und Resuspendieren der Zellen in 20 ml Kulturmedium wurde erneut

zentrifugiert. Nach abschließendem Auffüllen des Röhrchens mit 10 ml Zellkulturmedium konnten die Zellen schließlich weiter passagiert werden.

Für die Infektionsversuche wurde Mono Mac 6-Medium ohne Serumzusatz verwendet („Infektionsmedium“).

2.2.3 Phagozytose und intrazelluläre Vermehrung

Zur Durchführung dieser Versuche wurden Mono Mac 6-Zellen aus einer gut bewachsenen Kulturflasche, die etwa 20×10^6 Zellen enthält, entnommen und in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Nach Abzentrifugieren der Zellsuspension für 10 Minuten bei $400 \times g$ wurde diese in RPMI 1640 resuspendiert und das Gesamtvolumen abgelesen. Mit Hilfe einer Trypanblau-Färbung wurden die Zellen in der Neubauer-Zählkammer quantifiziert und anschließend die erforderliche Menge Zellsuspension, die 2×10^6 Monozyten enthielt, in ein 50 ml-Röhrchen pipettiert, mit RPMI 1640 aufgefüllt und bei $400 \times g$ 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet mit 1,5 ml Mono Mac 6-Infektionsmedium resuspendiert und in eine 6-Loch-Platte überführt.

In der Zwischenzeit wurden Legionellen von einer BCYE α -Agarplatte entnommen, die mit einem 3-Ösen-Ausstrich hergestellt und 5 Tage in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert wurden. Die Bakterien wuchsen darauf in Form von gut sichtbaren Einzelkolonien. Sie wurden in einem 50ml-Röhrchen mit RPMI 1640 mit Hilfe eines Photometer bei einer Wellenlänge von 578 nm auf eine optische Dichte von 0,200 eingestellt. Bei dieser Extinktion enthält die Suspension etwa 3×10^8 Bakterien/ml. Um ein Infektionsverhältnis von Monozyten zu Legionellen von 1:100 zu erreichen, mussten deshalb 700 μ l der Legionellen-Stammlösung in die vorbereiteten Mono Mac 6-Kulturen pipettiert werden. Für eine Infektionsdosis von 1:10 wurden entsprechend 70 μ l, bei 1:1 7 μ l zugegeben und die beiden letzten Ansätze mit RPMI 1640 auf jeweils 700 μ l aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde dann für zwei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Anschließend wurden diejenigen Legionellen, die sich im Ansatz extrazellulär der Monozyten befanden, mit einer Gentamicin-Lösung (Endkonzentration im Ansatz 75 μ g/ml) abgetötet. Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten bei 37°C und 5% CO₂. Im Anschluß daran wurden die Proben aus der 6-Loch-Platte aufgezogen, in ein 50 ml-Röhrchen pipettiert

und mit RPMI 1640 auf ein Volumen von 25 ml aufgefüllt. Die Proben wurden zwei mal mit Mono Mac 6-Infektionsmedium für 15 Minuten bei $300 \times g$ gewaschen und anschließend dekantiert. Das Pellet wurde mit Mono Mac 6-Infektionsmedium bis zu einem Gesamtvolumen von 8 ml resuspendiert. Je 1 ml Suspension wurde in zwei vorbereitete Eppendorf-Hütchen pipettiert (0 Stunden-Doppelwerte), der Rest in Portionen zu ebenfalls 1 ml in die Vertiefungen einer 24-Loch-Platte überführt. Letztere wurde bei 37°C und 5% CO_2 bis zur weiteren Auswertung nach 24, 48 und 72 Stunden in einen Brutschrank gestellt.

Zur Lyse der Monozyten wurden die Eppendorf-Hütchen zunächst bei $400 \times g$ 5 Minuten zentrifugiert, anschließend die Überstände abgenommen und 1 ml Aqua dest. hinzugefügt. Die chemische Lyse wurde durch mechanische Maßnahmen ergänzt, wobei die Proben sechs mal durch eine 27G-Kanüle aufgezogen und wieder ausgestoßen wurden. Der Erfolg dieser Prozedur wurde in Vorversuchen unter dem Mikroskop kontrolliert. Abschließend wurden die Proben mit Hilfe einer Ausspatelmaschine (Spiralplater, Meintrupp) auf BCYE α -Agar ausplattiert und für fünf Tage bei 37°C und 5% CO_2 bebrütet.

2.2.4 Blockierungsversuche

Für diese Ansätze wurde der Inhalt einer gut bewachsenen Zellkulturflasche mit Mono Mac 6-Zellen in ein 50 ml-Bluecap-Röhrchen pipettiert und bei $400 \times g$ abzentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, mit 10 ml frischem RPMI 1640 aufgenommen und das Gesamtvolumen bestimmt. Im nächsten Arbeitsschritt wurde die Anzahl der Zellen mit Hilfe einer Trypanblau-Färbung bestimmt. Aus der Gesamtzahl der Monozyten wurde berechnet, welches Volumen der Zellsuspension 4×10^6 Zellen enthält. Dieses Zielvolumen wurde dann in ein 50 ml-Röhrchen überführt, mit RPMI 1640 auf 25 ml aufgefüllt und bei $400 \times g$ für zehn Minuten abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und mit Mono Mac 6-Infektionsmedium aufgefüllt bis die enthaltenen 4×10^6 Monozyten in einem Volumen von $500 \mu\text{l}$ pro Well resuspendiert waren. Nun wurden in einer 24-Loch-Platte drei verschiedene Ansätze hergestellt, denen je $15 \mu\text{l}$ Infektionsmedium (Kontrolle), monoklonaler Antikörper (Antikörper-Ansatz) oder irrelevanter Antikörper (Isotypenkontrolle), die in einer Ausgangskonzentration von 1 mg/ml vorlagen, hinzupipettiert und 30 Minuten bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Die Antikörper-Endkonzentration nach Zugabe der Legionellen

und der Antibiotika-Lösung (siehe unten) betrug damit 23,4 $\mu\text{g/ml}$.

Die Legionellen wurden auch für diese Versuche, wie bereits oben beschrieben, von einer BCYE α -Agarplatte entnommen, die nach einem 3-Ösen-Ausstrich 5 Tage in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in Form von gut sichtbaren Einzelkolonien wuchsen. Sie wurden in einem 50 ml-Röhrchen mit RPMI 1640 mit Hilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 578 nm auf eine optische Dichte von 0,200 eingestellt. Bei dieser Extinktion enthält die Suspension etwa 3×10^8 Bakterien/ml. Um ein Infektionsverhältnis von Monozyten zu Legionellen von 1:100 zu erreichen, mussten deshalb 1400 μl der Legionellen-Stammlösung in die vorbereiteten Mono Mac 6-Kulturen pipettiert werden. Für eine Infektionsdosis von 1:10 wurden entsprechend 140 μl , bei 1:1 14 μl zugegeben und die letzten beiden Ansätze mit RPMI 1640 auf jeweils 1400 μl aufgefüllt.

Nun wurden die Ansätze bei 37°C und 5% CO₂ zwei Stunden inkubiert und anschließend eine Sterilkontrolle auf Columbia-Blutagar entnommen. Dann erfolgte die Zugabe von 1 μl einer Gentamicin-Lösung (Konzentration 50 mg/ml), wobei eine Antibiotika-Endkonzentration von 78 $\mu\text{g/ml}$ entstand. Nach einer weiteren Inkubation von 60 Minuten unter den oben genannten Bedingungen wurden die 24-Loch-Platten gut gemischt um die Zellen zu resuspendieren, in ein 15 ml-Röhrchen übertragen, mit RPMI 1640 aufgefüllt und 15 Minuten bei $300 \times g$ abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zwei mal wiederholt, schließlich der Überstand abpipettiert und in 2 ml Mono Mac 6-Infektionsmedium resuspendiert. Je 1 ml wurde in ein Eppendorf-Röhrchen gegeben und bei $400 \times g$ 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 1 ml Aqua dest. zur Lyse der Monozyten zugegeben. Da der Effekt der Wasserzugabe zur Lyse der Zellen alleine nicht ausreicht, wurden die Suspensionen je sechs mal durch eine 27G-Nadel aufgezogen und wieder ausgestoßen. Der Effekt dieser chemischen und mechanischen Lyse wurde in Vorversuchen unter dem Mikroskop kontrolliert.

Abschließend wurden die Proben mit Hilfe einer Ausspatelmaschine (Spiralplater, Meintrupp) auf BCYE α -Agarplatten ausplattiert und 5 Tage in einem Brutschrank bei 27°C und 5% CO₂ bebrütet.

Die Ausspatelmaschine trägt dabei aus der Lyse-Suspension eine definierte Portion auf einer Agarplatte auf, wobei diese mehr und mehr verdünnt wird und so ein Ausstrich von

abnehmender Bakterien-Konzentration entsteht. Die Auswertung erfolgte anschließend mit vom Hersteller gelieferten Auszählshablonen, die die aufgetragene Menge Bakterienlösung und deren Verdünnung berücksichtigten und einen einzelnen CFU-Wert liefern.

2.2.5 Durchflußzytometrie (FACS)

Für die Durchflußzytometrie wurden aus einer Mono Mac 6-Zellkultur, deren Zellgehalt zuvor in der Neubauer-Zählkammer bestimmt wurde, 2×10^5 Zellen pro Ansatz entnommen, in eine 96-Loch-Platte gegeben und bei $400 \times g$ 5 Minuten abzentrifugiert. Die Überstände wurden dekantiert, 200 μl FACS-Waschpuffer – bestehend aus PBS-Puffer, 0,1% Azid und 0,1% bovinem Serumalbumin (BSA) – zugegeben und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen, 5 μl Antikörperlösung zugegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Am Ende der Inkubationszeit wurden die Ansätze mit 200 μl FACS-Waschpuffer für 4 Minuten bei $400 \times g$ zwei mal gewaschen. Nach nochmaligem Dekantieren der Proben wurden die in 200 μl gelösten Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und weitere 500 μl FACS-Waschpuffer hinzugefügt. Im Falle des CD14-Antikörpers, der selbst nicht Fluorescein-markiert war, wurde der Ansatz nochmals 20 Minuten mit einem Fluorescein-(DTAF)-markierten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, zweimal wie oben beschrieben gewaschen, dekantiert und in insgesamt 700 μl FACS-Waschpuffer in einem FACS-Röhrchen gelöst.

Die Proben wurden dann sofort mit dem FACSortTM-Durchflußzytometer in Verbindung mit der FACStationTM und der CELLQuestTM-Software zur Aufnahme, Speicherung und Auswertung der Daten gemessen. Dabei erzeugt das Durchflußzytometer aus einem luftgekühlten 15mW-Argonionenlaser, der monochromatisches Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm aussendet, Streulicht. Dieses regt die Fluoreszenzfarbstoffe Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) und 5-(4,6-Dichlorotriazinyl)-Aminofluorescein (DTAF) an, die an die Antikörper gekoppelt sind und deren Absorptionsmaxima der Laserwellenlänge entsprechen. Die Emissionsspektren, mit denen gemessen wurde, reichen bei FITC von 515 bis 545 nm (Maximum 515 nm) und bei PE von 565 bis 610 nm (Maximum 585 nm).

Die Zellen gelangen durch einen laminaren Hüllstrom über die Probenkapillare in den

Messbereich, wobei immer nur eine Zelle den Laserdetektor passiert und die Fluoreszenzintensität über ein Filter- und Spiegelsystem erfaßt wird. Die Intensitätsverteilungen werden mit Hilfe der Software grafisch dargestellt (Beispiel siehe Abbildung 3.4, Seite 46), wobei zum Ergebnis nur die spezifische Fluoreszenz der monoklonalen Antikörper beiträgt. Unspezifische Bindungen werden durch die Isotypenkontrollen erfaßt.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Phagozytose und intrazelluläre Vermehrung von Legionellen durch Mono Mac 6-Zellen

In einem ersten Vorversuch wurden die Phagozytose und die Rate der intrazellulären Vermehrung der beiden *Legionella*-Spezies untersucht. Beide wurden in Infektionsdosen von 100:1 im Verhältnis zu den Monozyten in die Kultur gegeben. Die Anzahl der phagozytierten und intrazellulär vermehrten Bakterien zu den Zeitpunkten 0, 24, 48 und 72 Stunden wurde durch Lyse der Wirtszellen und Ausbringen der Legionellen auf BCYE α -Agar bestimmt. Es zeigte sich, daß die Bakterien von den Monozyten phagozytiert werden und sich in diesen auch vermehren können. Die Vermehrungsrate betrug über den maximalen Infektionszeitraum von 72 Stunden drei Zehnerpotenzen für die virulenteren *L. pneumophila* Sg1 (frisches Patientenisolat, Lp1v) und etwa eine Zehnerpotenz für *L. pneumophila* Sg1 ATCC 33152 (Lp1a) (siehe Abbildung 3.1 auf Seite 42).

3.2 HeLa- und Jurkat-Zellen

Zum Vergleich mit der verwendeten Monozyten-Zelllinie wurden Versuche zur Phagozytose und intrazellulären Vermehrung der *L. pneumophila* Sg1 ATCC 33152 auch mit HeLa- und Jurkat-Zellen durchgeführt, die ein anderes Oberflächenrezeptorrepertoire aufweisen (vgl.

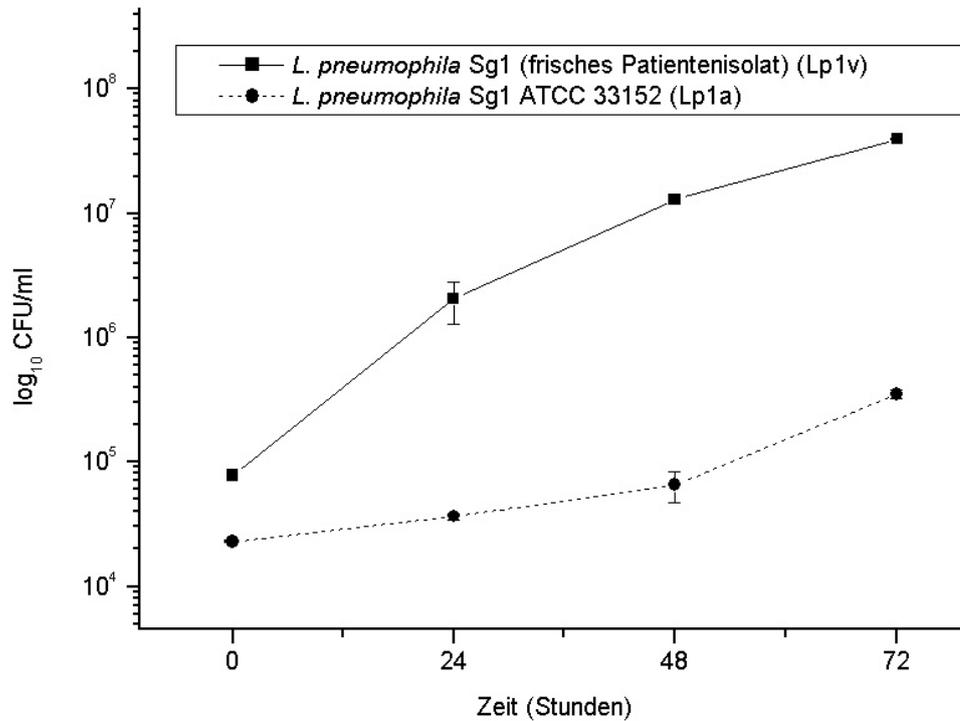


Abbildung 3.1: Vermehrung der verwendeten virulenten *L. pneumophila* Sg 1 (frisches Patientenisolat, Lp1v) und der attenuierten *L. pneumophila* Sg 1 ATCC 33152 (Agar-adaptierter Stamm, Lp1a) über einen Zeitraum von 72 Stunden in Mono Mac 6-Zellen

Abbildung 3.2 auf Seite 43). Hier zeigt sich, daß die Legionellen zwar von beiden Zelllinien in beträchtlichem Maße phagozytiert werden, sich aber nur unwesentlich in ihnen vermehren. So findet in HeLa-Zellen im Laufe der Zeit keine intrazelluläre Vermehrung gegenüber dem Null-Stunden-Wert statt und in Jurkat-Zellen erst nach 72 Stunden auf das fünffache des Ausgangswertes.

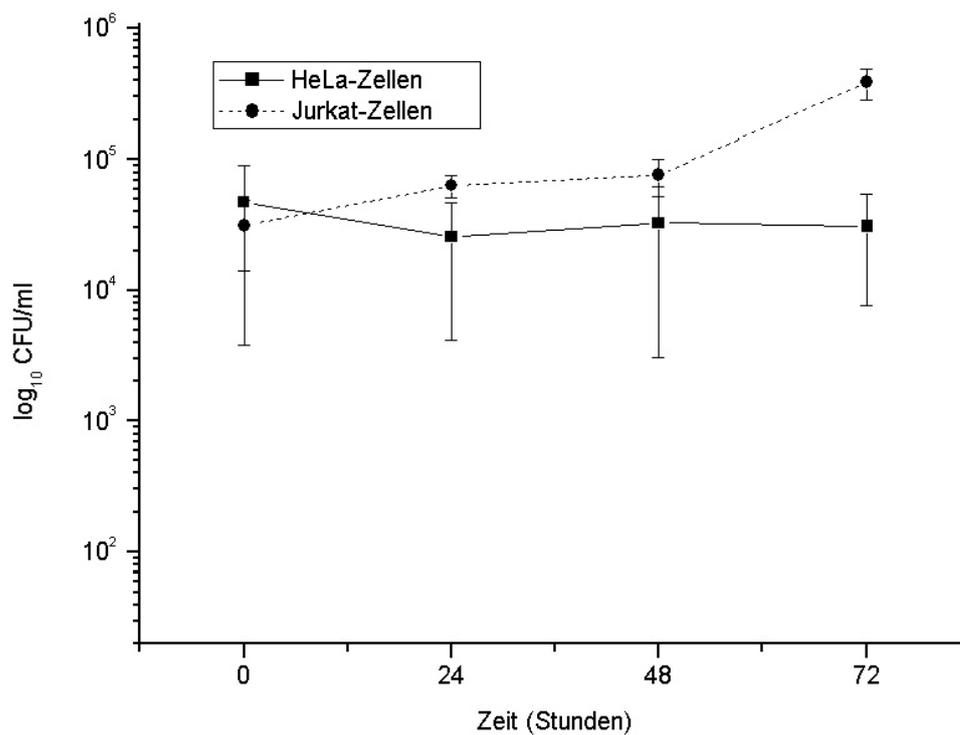


Abbildung 3.2: Vermehrung von *L. pneumophila* Sg 1 ATCC 33152 (Agar-adaptierter Stamm, Lp1a) über einen Zeitraum von 72 Stunden in HeLa- und Jurkat-Zellen: In HeLa-Zellen findet keine statistisch signifikante Replikation der Legionellen statt; in der Jurkat-Zelllinie sind die Bakterien erst zum Zeitpunkt 72 Stunden post infectionem um das fünffache vermehrt.

3.3 Rezeptor-Expression in der Durchflußzytometrie

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie wurde vor Beginn der eigentlichen Versuchsreihen die Expression der untersuchten Oberflächenrezeptoren auf der verwendeten Zelllinie Mono Mac 6 untersucht. Dabei fanden sich die folgenden Expressionsraten.

Tabelle 3.1: Expression der untersuchten Oberflächenrezeptoren auf nicht-infizierten Mono Mac 6-Zellen im Durchflußzytometer

<i>Rezeptor</i>	<i>Klon</i>	<i>Expressionsrate</i>
CD11b	Bear-1	77,6% ($\pm 3,8$)
	ICRF44	9,4% ($\pm 0,9$)
CD14	biG14	92,9% ($\pm 0,0$)
CD18	68-5A5	92,2% ($\pm 1,6$)
CD29	3S3	93,0% ($\pm 1,1$)
	B-D15	77,5% ($\pm 0,60$)
CD35	E11	1,3% ($\pm 0,2$)
CD54	8.4A6	0,2% ($\pm 0,2$)
	HA58	94,1% ($\pm 1,0$)
CD71	DF1513	89,6% ($\pm 1,5$)

Für CD11 haben bereits Ziegler-Heitbrock et al. 1988 in der Erstpublikation zur Mono Mac 6-Zellreihe eine Expressionsrate von 28,2% ($\pm 10,2\%$) gefunden. Bei den durchgeführten Versuchen unterschieden sich die Messergebnisse je nach verwendetem Klon: Für ICRF 44 fand sich nur eine geringe Expression von knapp 10%, wohingegen mit Bear-1 eine Rezeptorexpression von mehr als 77% zu sehen war.

Für CD14, CD18, den Klon 3S3 von CD29, den Klon HA58 von CD54 und für CD71 wurden ebenfalls Expressionsraten von etwa 90 % gemessen. Der Komplementrezeptor CR1 (CD35) konnte mit dem verwendeten Klon E11 nur auf gut einem Prozent der Mono Mac 6-Zellen detektiert werden. Ebenso wurden mit dem Klon 8.4A6 für CD54 lediglich 0,2 % positive Zellen gefunden.

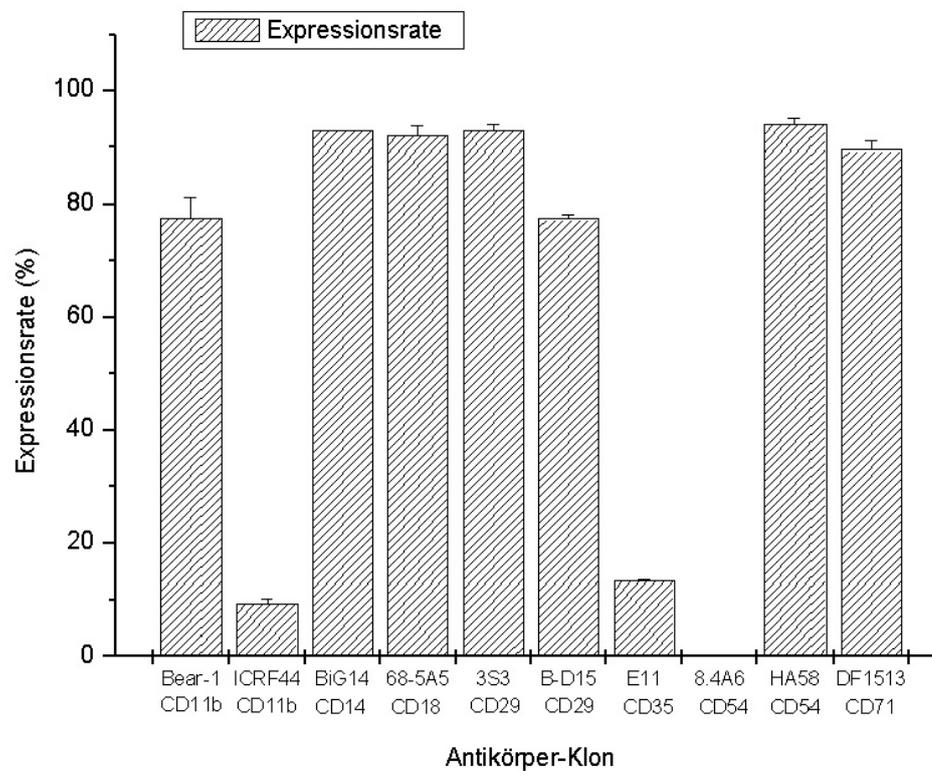


Abbildung 3.3: Übersicht der Messungen im Durchflußzytometer. Gezeigt sind die jeweiligen Expressionsraten der untersuchten Oberflächenrezeptoren auf nicht infizierten Mono Mac 6, die mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten inhibierenden monoklonalen Antikörpern ermittelt wurden.

Beispielhaft sei eine Messung mit FITC-markierten Antikörpern gegen CD29, Klon 3S3, gezeigt (Abbildung 3.4, Seite 46).

3.4 Blockierung spezifischer Oberflächen-Rezeptoren

Nach Abschluß aller Vorversuche wurden blockierende monoklonale Antikörper 30 Minuten vor Beginn der eigentlichen Infektion mit in den Ansatz gegeben, unter der Vorstellung, daß diese die entsprechenden Rezeptoren absättigen. Falls diese Rezeptoren an der Phagozytose der Legionellen beteiligt sein sollten, würde die Rate der phagozytierten Bakterien signifikant vermindert sein.

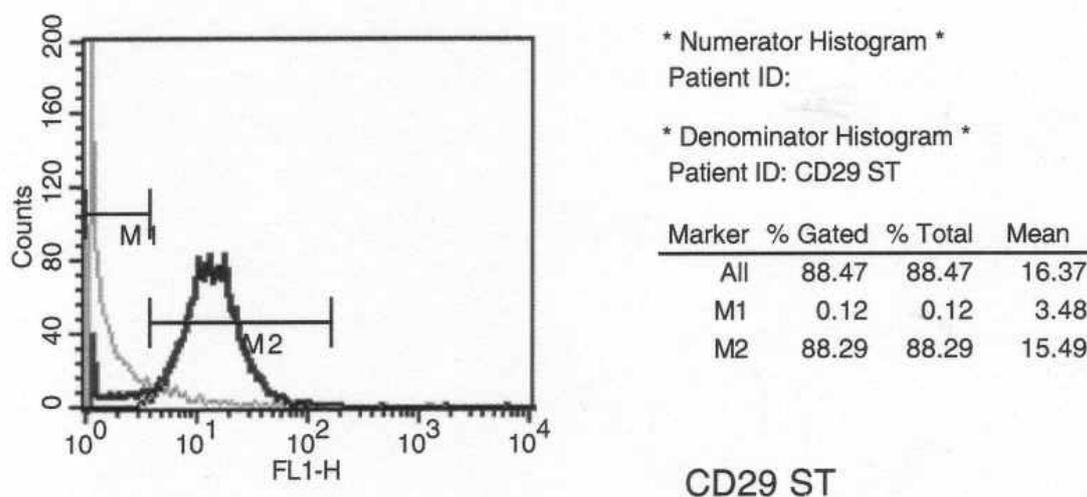


Abbildung 3.4: Beispielhaftes Ergebnis einer Messung der Oberflächenprotein-Expression in der Durchflußzytometrie. Messung der Fluoreszenzintensitätsverteilung von CD29, Klon 3S3. X-Achse: Fluoreszenzintensität, Y-Achse: Anzahl fluoreszierender Partikel, M1: unspezifische Fluoreszenz, M2: Fluoreszenz der Zellen, die spezifischen monoklonalen Antikörper gebunden haben, Ergebnis: 88,29% CD29-positive Zellen.

3.4.1 CD11b

Für den monoklonalen Antikörper anti-CD11b wurden zwei verschiedene Klone verwendet. Die Versuche mit ICRF44 wurden viermal, diejenigen mit Bear-1 zweimal wiederholt. Für beide Antikörper ergaben sich trotz der großen Unterschiede in der Durchflußzytometrie keine signifikanten Veränderungen zwischen dem Kontrollansatz und denjenigen mit Antikörper- oder Isotypenkontrollen-Zusatz (siehe Abbildung 3.5, Seite 47 für ICRF44 und Abbildung 3.6 auf Seite 48 für Bear-1). Deutlich zu sehen sind allerdings signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Infektionsdosen und auch zwischen beiden Legionellenspezies: Je höher die Infektionsdosis, desto mehr CFU/ml fanden sich auf den Agarplatten. Zudem vermehrten sich die virulenten *L. pneumophila* Sg1 (Lp1v) deutlich besser als die avirulenten *L. pneumophila* Sg1 ATCC 33152 (Lp1a).

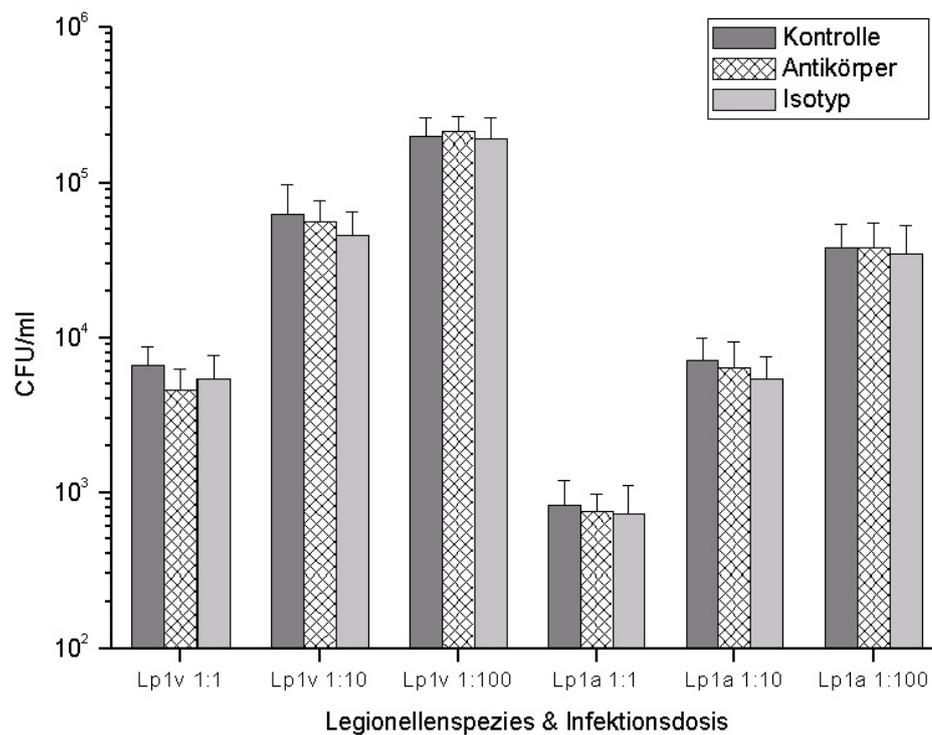


Abbildung 3.5: Ergebnis der Blockierung des Mono Mac 6-Oberflächenrezeptors **CD11b** mit inhibierendem anti-CD11b, **Klon ICRF44**. Sowohl die virulente *L. pneumophila* Sg1 (frisches Patientenisolat, Lp1v), als auch die attenuierte *L. pneumophila* ATCC 33152 (Agar-adaptierter Stamm, Lp1a) wurden in Infektionsdosen von 1:1, 1:10 und 1:100 Monozyten pro Legionellen getestet, wobei sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Antikörper-Ansatz und der Kontrolle bzw. der Isotypenkontrolle feststellen lassen.

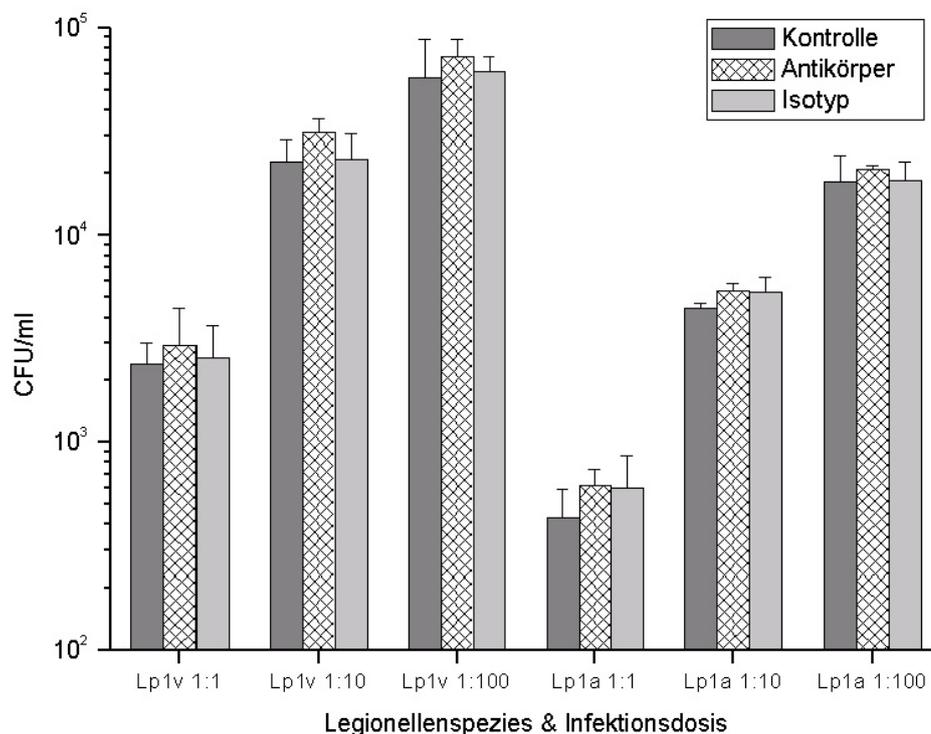


Abbildung 3.6: Ergebnis der Blockierung des Mono Mac 6-Oberflächenrezeptors **CD11b** mit inhibierendem anti-CD11b, **Klon Bear 1**. Sowohl die virulente *L. pneumophila* Sg1 (frisches Patientenisolat, Lp1v), als auch die attenuierte *L. pneumophila* ATCC 33152 (Agar-adaptierter Stamm, Lp1a) wurden in Infektionsdosen von 1:1, 1:10 und 1:100 Monozyten pro Legionellen getestet, wobei sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Antikörper-Ansatz und der Kontrolle bzw. der Isotypenkontrolle feststellen lassen.

3.4.2 CD18

Bei Vorinkubation der entsprechenden Ansätze mit anti-CD18 waren in Einzelversuchen lediglich Tendenzen einer verminderten Phagozytoserate im Vergleich zur Kontrolle zu sehen (siehe Abbildung 3.7, Seite 49). Statistisch signifikante Veränderungen traten dabei weder im Vergleich der einzelnen Tage noch in der Gesamtzusammenschau (siehe Tabelle 3.1 auf Seite 44) auf. Einzelne Versuche wurden auch in Kulturmedium durchgeführt, das zusätzlich zum

sonst verwendeten Medium fetales Kälberserum enthielt, hierbei sank die Phagozytoserate bei einer Infektionsdosis von 1:100 und nur bei der virulenten *L. pneumophila* Sg 1 (Lp1v) auf 85% des Ausgangswertes (Daten nicht gezeigt), die übrigen Ansätze unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

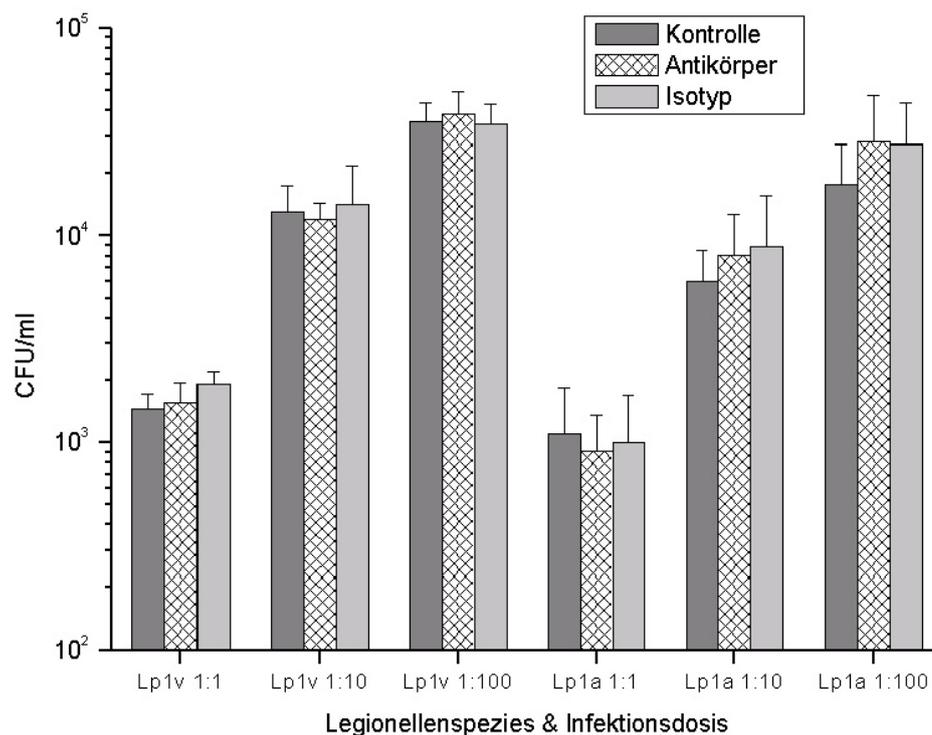


Abbildung 3.7: Ergebnis der Blockierung des Mono Mac 6-Oberflächenrezeptors **CD18** mit monoklonalem anti-CD18. Sowohl die virulente *L. pneumophila* Sg1 (frisches Patientenisolat, Lp1v), als auch die attenuierte *L. pneumophila* ATCC 33152 (Agar-adaptierter Stamm, Lp1a) wurden in Infektionsdosen von 1:1, 1:10 und 1:100 Monozyten pro Legionellen getestet, wobei sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Antikörper-Ansatz und der Kontrolle bzw. der Isotypenkontrolle feststellen lassen.

3.4.3 CD11b & CD18

In einem weiteren Schritt wurden die Versuchsansätze mit jeweils der halben Menge anti-CD11b (Klon Bear-1) und anti-CD18 gemeinsam inkubiert. CD11b und CD18 bilden zusammen den Komplementrezeptor 3, sind also *in vivo* funktionell miteinander verbunden. Bei den hier durchgeführten Versuchen fand sich allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Ansätzen, ebensowenig wie bei alleiniger Zugabe von CD11b oder CD18.

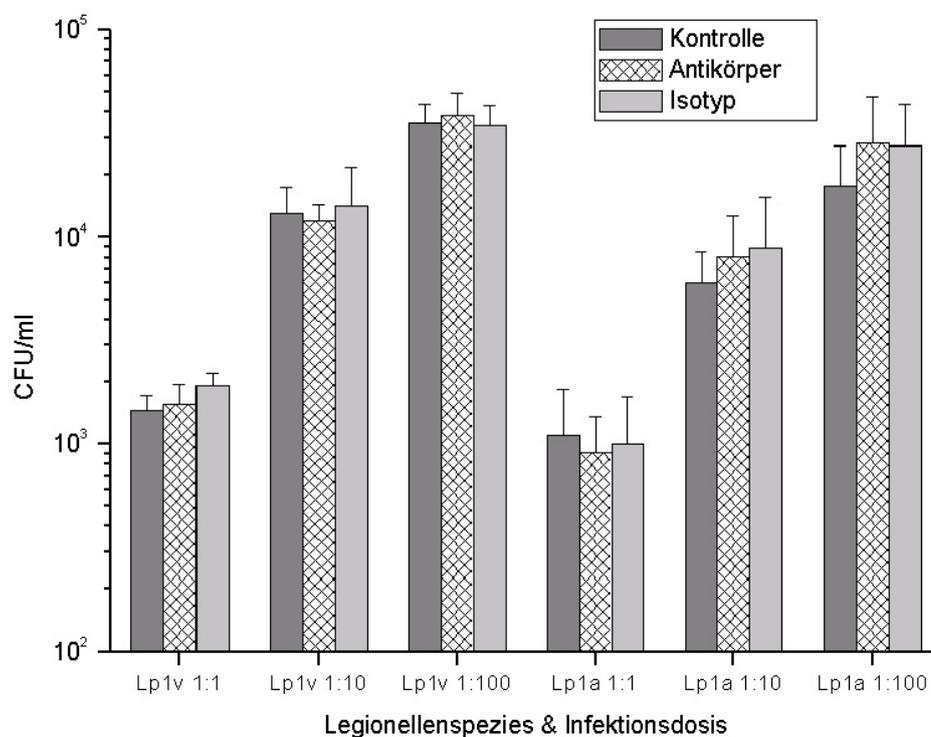


Abbildung 3.8: Ergebnis der Blockierung der Mono Mac 6-Oberflächenrezeptoren **CD11b** und **CD18** mit inhibierenden anti-CD11b, Klon Bear-1 und anti-CD18. Sowohl die virulente *L. pneumophila* Sg1 (frisches Patientenisolat, Lp1v), als auch die attenuierte *L. pneumophila* ATCC 33152 (Agar-adaptierter Stamm, Lp1a) wurden in Infektionsdosen von 1:1, 1:10 und 1:100 Monozyten pro Legionellen getestet, wobei sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Antikörper-Ansatz und der Kontrolle bzw. der Isotypenkontrolle feststellen lassen.

3.4.4 CD14

Auch der LPS-Bindungsrezeptor wurde mit einem inhibitorischen monoklonalen Antikörper blockiert. Es fanden sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im Vergleich mit dem Kontrollansatz (siehe Abbildung 3.9 auf Seite 51).

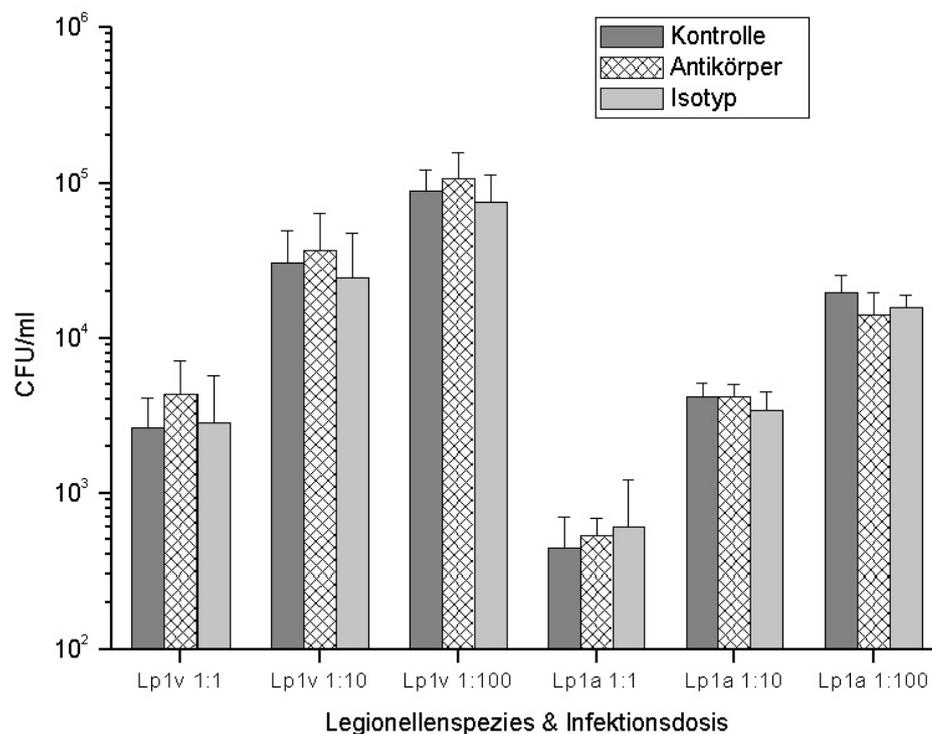


Abbildung 3.9: Ergebnis der Blockierung des Mono Mac 6-Oberflächenrezeptors **CD14** mit inhibierendem anti-CD14. Sowohl die virulente *L. pneumophila* Sg1 (frisches Patientenisolat, Lp1v), als auch die attenuierte *L. pneumophila* ATCC 33152 (Agar-adaptierter Stamm, Lp1a) wurden in Infektionsdosen von 1:1, 1:10 und 1:100 Monozyten pro Legionellen getestet, wobei sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Antikörper-Ansatz und der Kontrolle bzw. der Isotypenkontrolle feststellen lassen.

3.4.5 CD29

Für die Untersuchung des Oberflächenrezeptors CD29 wurden zwei verschiedene Antikörper ausgewählt. Auch hier zeigten sich weder für den Klon B-D 15 (Abbildung 3.10, Seite 52), noch für den Klon 3S3 (Abbildung 3.11, Seite 53) signifikante Veränderungen der Phagozytoserate.

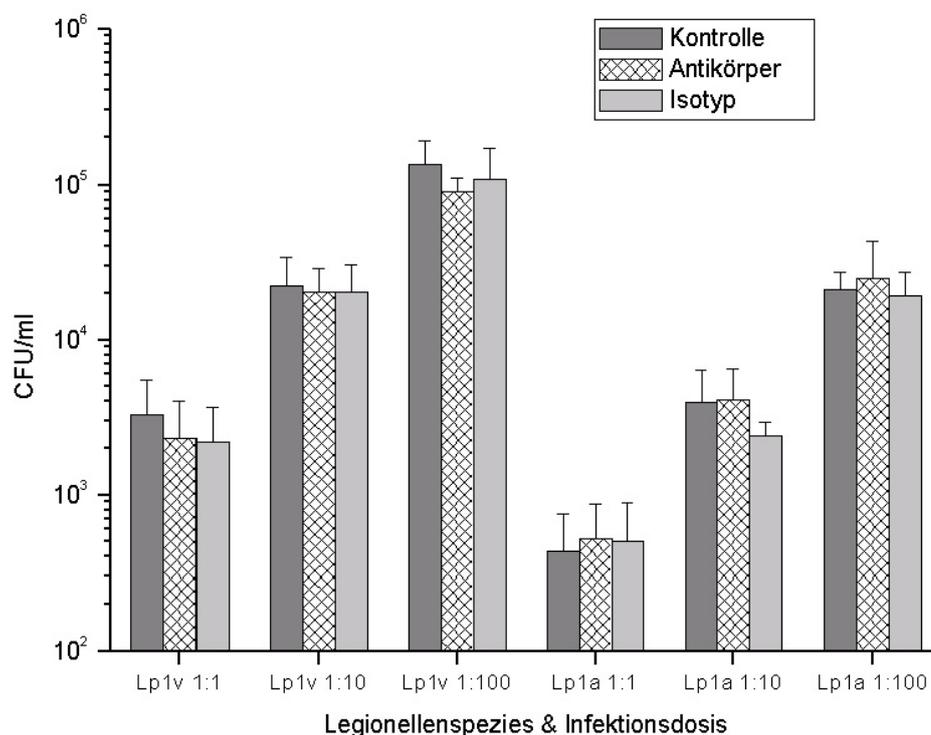


Abbildung 3.10: Ergebnis der Blockierung des Mono Mac 6-Oberflächenrezeptors **CD29** mit inhibierendem anti-CD29, **Klon B-D15**. Sowohl die virulente *L. pneumophila* Sg1 (frisches Patientenisolat, Lp1v), als auch die attenuierte *L. pneumophila* ATCC 33152 (Agaradaptierter Stamm, Lp1a) wurden in Infektionsdosen von 1:1, 1:10 und 1:100 Monozyten pro Legionellen getestet, wobei sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Antikörper-Ansatz und der Kontrolle bzw. der Isotypenkontrolle feststellen lassen.

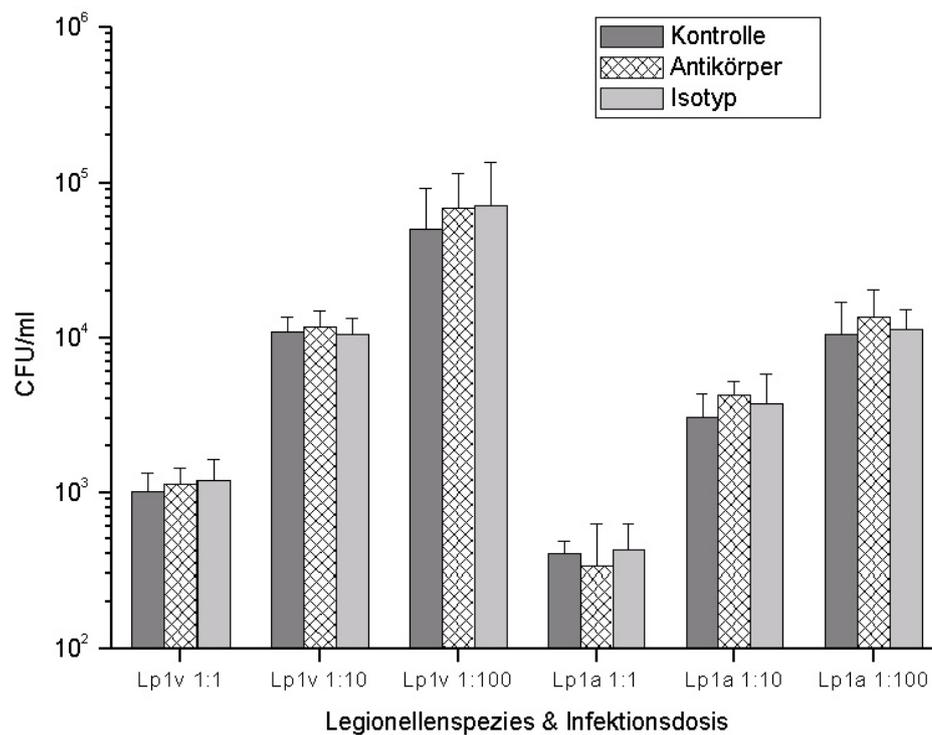


Abbildung 3.11: Ergebnis der Blockierung des Mono Mac 6-Oberflächenrezeptors **CD29** mit inhibierendem anti-CD29, **Klon 3S3**. Sowohl die virulente *L. pneumophila* Sg1 (frisches Patientenisolat, Lp1v), als auch die attenuierte *L. pneumophila* ATCC 33152 (Agar-adaptierter Stamm, Lp1a) wurden in Infektionsdosen von 1:1, 1:10 und 1:100 Monozyten pro Legionellen getestet, wobei sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Antikörper-Ansatz und der Kontrolle bzw. der Isotypenkontrolle feststellen lassen.

3.4.6 CD35

Wie nach den FACS-Messergebnissen zu erwarten, wurden für die Blockierung des Komplementrezeptor 1, CD35, ebenfalls keine signifikanten Veränderungen der Phagozytoserate gefunden (siehe Abbildung 3.12 auf Seite 54).

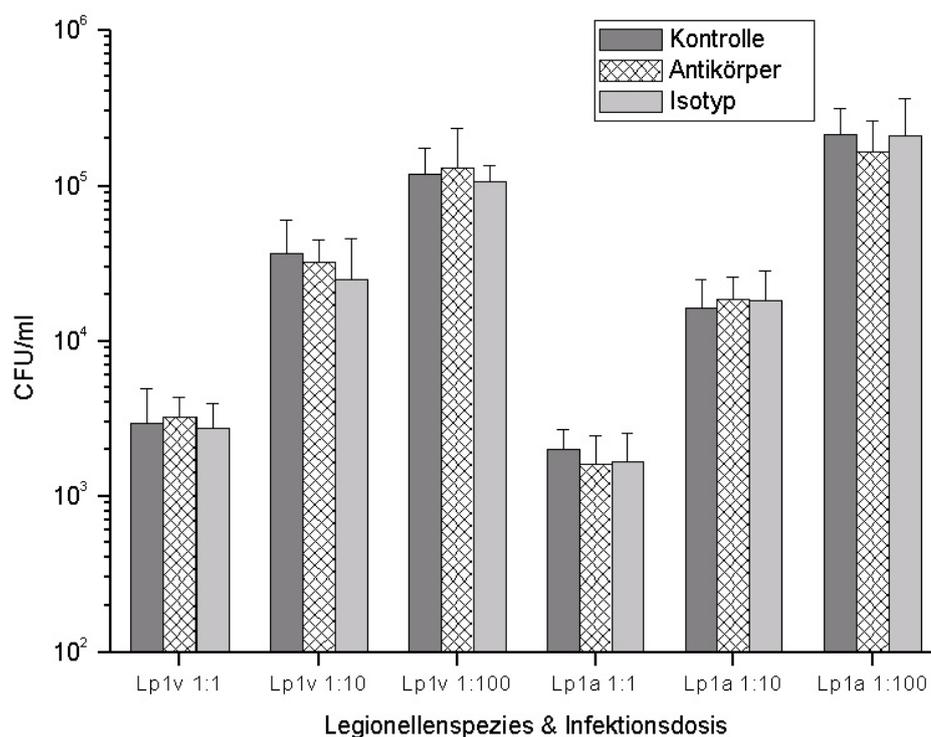


Abbildung 3.12: Ergebnis der Blockierung des Mono Mac 6-Oberflächenrezeptors **CD35** mit inhibierendem anti-CD35. Sowohl die virulente *L. pneumophila* Sg1 (frisches Patientenisolat, Lp1v), als auch die attenuierte *L. pneumophila* ATCC 33152 (Agar-adaptierter Stamm, Lp1a) wurden in Infektionsdosen von 1:1, 1:10 und 1:100 Monozyten pro Legionellen getestet, wobei sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Antikörper-Ansatz und der Kontrolle bzw. der Isotypenkontrolle feststellen lassen.

3.4.7 CD54

Anti-CD54 wurde wiederum in zwei verschiedenen Ausführungen in die Ansätze appliziert. Die Klone 8.4A6 (Abbildung 3.13, Seite 55) und HA58 (Abbildung 3.14, Seite 56) zeigten aber ebenfalls keine signifikanten Veränderungen im Hinblick auf die Phagozytoserate.

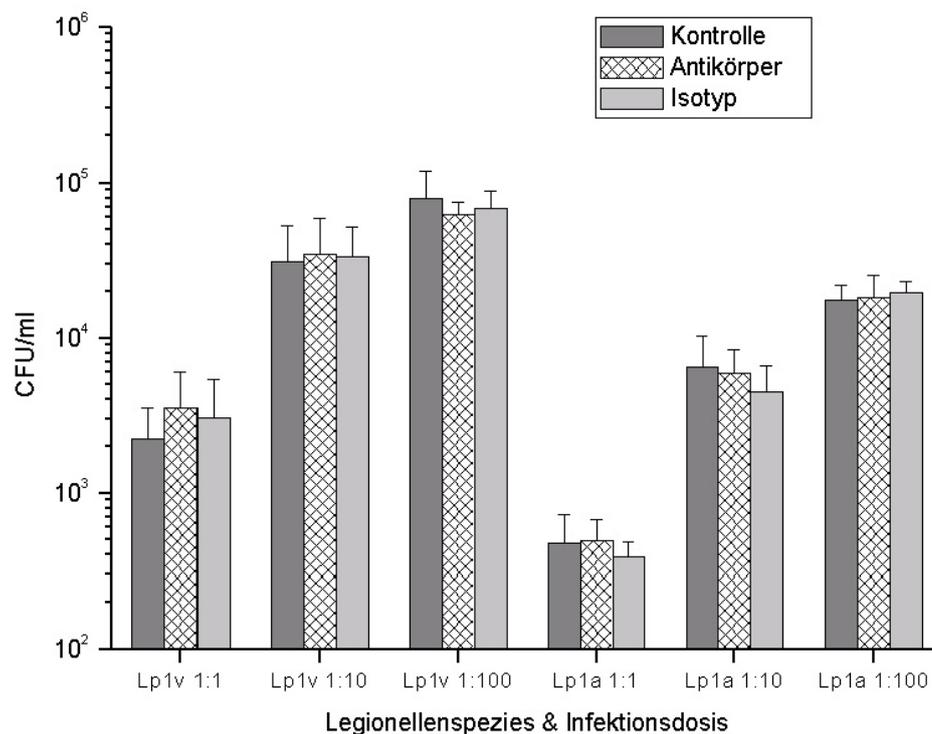


Abbildung 3.13: Ergebnis der Blockierung des Mono Mac 6-Oberflächenrezeptors **CD54** mit inhibierendem anti-CD54, **Klon 8.4A6**. Sowohl die virulente *L. pneumophila* Sg1 (frisches Patientenisolat, Lp1v), als auch die attenuierte *L. pneumophila* ATCC 33152 (Agar-adaptierter Stamm, Lp1a) wurden in Infektionsdosen von 1:1, 1:10 und 1:100 Monozyten pro Legionellen getestet, wobei sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Antikörper-Ansatz und der Kontrolle bzw. der Isotypenkontrolle feststellen lassen.

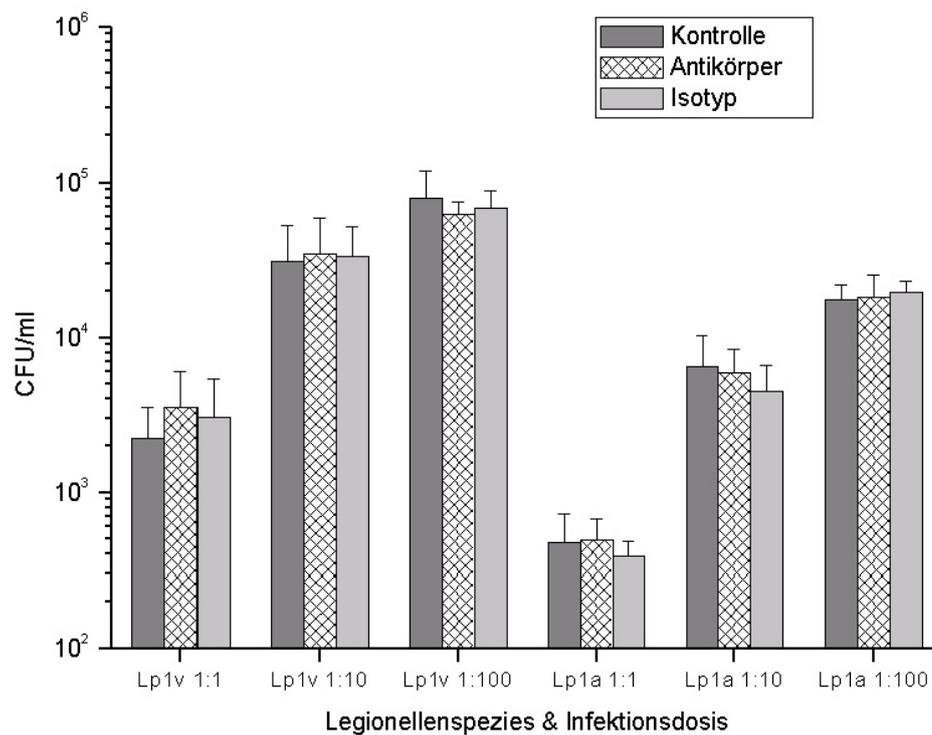


Abbildung 3.14: Ergebnis der Blockierung des Mono Mac 6-Oberflächenrezeptors **CD54** mit inhibierendem anti-CD54, **Klon HA58**. Sowohl die virulente *L. pneumophila* Sg1 (frisches Patientenisolat, Lp1v), als auch die attenuierte *L. pneumophila* ATCC 33152 (Agar-adaptierter Stamm, Lp1a) wurden in Infektionsdosen von 1:1, 1:10 und 1:100 Monozyten pro Legionellen getestet, wobei sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Antikörper-Ansatz und der Kontrolle bzw. der Isotypenkontrolle feststellen lassen.

3.4.8 CD71

Blockierende Antikörper gegen den Transferrinrezeptor brachten ebenfalls dasselbe Ergebnis wie für die bereits aufgeführten Oberflächenrezeptoren: Auch hier änderte sich nichts an der Phagozytoserate (siehe Abbildung 3.15 auf Seite 57).

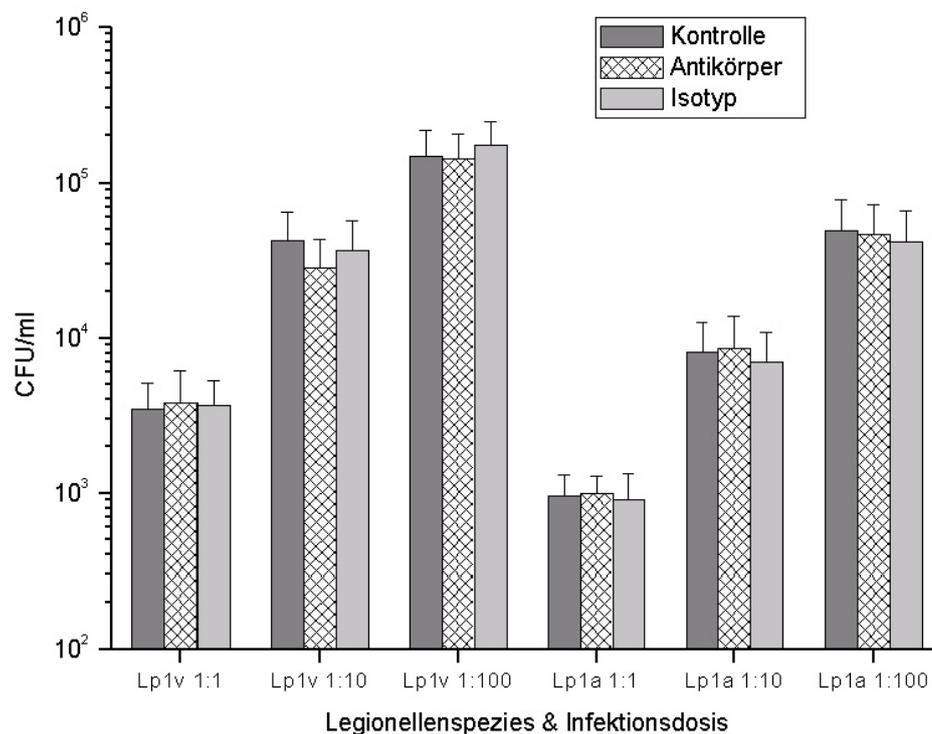


Abbildung 3.15: Ergebnis der Blockierung des Mono Mac 6-Oberflächenrezeptors **CD71** mit inhibierendem anti-CD71. Sowohl die virulente *L. pneumophila* Sg1 (frisches Patientenisolat, Lp1v), als auch die attenuierte *L. pneumophila* ATCC 33152 (Agar-adaptierter Stamm, Lp1a) wurden in Infektionsdosen von 1:1, 1:10 und 1:100 Monozyten pro Legionellen getestet, wobei sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Antikörper-Ansatz und der Kontrolle bzw. der Isotypenkontrolle feststellen lassen.

Kapitel 4

Diskussion

Makrophagen als sogenannte „professionelle“ Phagozyten haben zur Diskriminierung zwischen fremd und selbst eine Reihe von Rezeptoren entwickelt, z. B. den Mannoserezeptor, der stark konservierte Motive auf Pathogenen erkennt. Bakterien werden aber auch nach relativ unspezifischer Opsonierung mit Komplement über Komplementrezeptoren oder über Fc-Rezeptoren nach spezifischer Opsonierung mit Antikörpern phagozytiert. All diese Vorgänge lösen in der Zelle Veränderungen im Aktin-Zytoskelett aus, die zur Aufnahme der Bakterien führen [3].

Wie bereits in der Einleitung besprochen (siehe Seite 27), wurden bisher für die Phagozytose von Legionellen durch Makrophagen die Komplementrezeptoren CR1 und CR3 sowie Lektinbindungen charakterisiert. An der Phagozytose anderer intrazellulärer Bakterien sind auch Integrine, der Transferrinrezeptor und der Mannoserezeptor beteiligt.

In dieser Arbeit wurde nun die Beteiligung verschiedenster Oberflächenrezeptoren an der Phagozytose von Wirtszell-adaptierten im Vergleich zu Agar-adaptierten *Legionella pneumophila* Serogruppe 1 untersucht.

4.1 Phagozytose und intrazelluläre Vermehrung

4.1.1 Mono Mac 6

Die Versuche zur Phagozytose der getesteten Legionellenspezies durch die Monozytenzelllinie Mono Mac 6 wurden mit einer Infektionsdosis von 100 Bakterien auf einen Monozyten durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß beide Stämme von den Monozyten phagozytiert wurden und sich gemäß der Biologie der Bakterien auch intrazellulär stark vermehren. Nicht unerwartet lagen die Phagozytoserate und das Wachstum des virulenten Stammes um ein bis zwei Zehnerpotenzen höher als die des durch Agarpassagen attenuierten Stammes. Die Freisetzung der Legionellen, die sich in den Phagozyten vermehrt haben, erfolgte mittels hypoosmolarer Lyse mit destilliertem Wasser und anschließender mechanischer Lyse durch sechsmaliges Einziehen und wieder Ausstossen der Zellsuspension durch eine 27G-Kanüle. Nach drei Lysezyklen waren im Lysat keine Monozyten mehr zu finden. Diese Prozedur garantierte eine schonende Lyse mit weitgehendem Erhalt der Bakterien. Andere etablierte Lyseverfahren zeigten sich in dieser Hinsicht deutlich verlustbehafteter.

4.1.2 HeLa-Zellen

Um Phagozytose und intrazelluläre Vermehrung in einer Zelllinie ohne CR1- und CR3-Expression modellhaft zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen, die sich als Abkömmlinge von Cervix-Zellen in ihrem Oberflächenrezeptorrepertoire deutlich von den Monozyten als professionellen Phagozyten unterscheiden, mit der attenuierten *L. pneumophila* Sg 1 ATCC 33152 infiziert. HeLa-Zellen exprimieren, anders als die verwendete Monozyten-Zelllinie und Alveolarmakrophagen, praktisch keine Komplement-Rezeptoren 1 und 3 [204]. Bei den Versuchen zeigte sich, daß die Legionellen trotzdem in ähnlich hohem Ausmaß wie von den Mono Mac 6-Zellen phagozytiert wurden, sich aber über einen Zeitraum von 72 Stunden intrazellulär nicht vermehrten. Die intrazellulären Bedingungen für die Vermehrung sind in dieser Zelllinie offensichtlich nicht gegeben. Das Ergebnis steht im Widerspruch zu den Resultaten von Garduño et al., die 1998 zeigen konnten, daß HeLa-Zellen *Legionella pneumophila* zwar ebenfalls per coiling-Phagozytose aufnehmen und sich die Bakterien in Endo-

somen mit Ribosomen-besetzten Membranen vermehren, gleichzeitig waren allerdings nur ein Drittel der HeLa-Zellen infiziert, was die Arbeitsgruppe auf eine unterschiedliche Oberflächenrezeptorexpression oder eine differierende Endozytosekompetenz einzelner Zellen zurückführte [105].

4.1.3 Jurkat-Zellen

Untersuchungen mit der T-Zelllinie Jurkat zeigen eine mit Mono Mac 6 vergleichbare Phagozytoserate der attenuierten Legionellen. Aber auch hier findet im Verlauf lediglich zum Zeitpunkt 72 Stunden eine intrazelluläre Vermehrung um das fünffache des Ausgangswertes statt. Interessanterweise exprimieren T-Zellen in hohem Maße CD11a/CD18 (CR2), aber nur geringfügig CD11b/CD18 (CR3) [98]. Komplementrezeptor 1 (CR1, CD35) wird ebenfalls auf einigen T-Zellen exprimiert ($14,5 \pm 3,7\%$), zu denen auch die der Jurkat-Zelllinie gehören [311]. Schneider et al. fanden in der Erstbeschreibung der Jurkat-Zelllinie 18% Komplementrezeptor-positive Zellen [269].

Insgesamt fällt auf, daß die Komplementrezeptorausstattung (Mono Mac 6 > 80%, Jurkat etwa 18%, HeLa-Zellen < 1%) der verschiedenen untersuchten Zelllinien nicht mit deren Phagozytoserate korreliert. Alle drei phagozytieren 10^4 - 10^5 Legionellen pro 2×10^6 Wirtszellen. Dies widerspricht den Ergebnissen von Payne et al., die die Phagozytose von *L. pneumophila* zum überwiegenden Teil über Komplementrezeptoren vermittelt sehen [235].

4.2 Blockierung von Oberflächenrezeptoren

4.2.1 Methode

Die Blockierung von Oberflächenrezeptoren mit monoklonalen Antikörpern zur Inhibition der Adhärenz und Phagozytose von Mikroorganismen ist ein etabliertes Verfahren, das auch für die Untersuchung der Komplementrezeptoren bei *Legionella pneumophila* [235] und *Mycobacterium tuberculosis* [24] schon verwendet wurde. Die verwendeten Antikörper enthielten in keinem Falle Azid, Endotoxin oder ähnliche Substanzen, die zur Zerstörung der Zellen führen könnten, hatten laut Hersteller blockierende Eigenschaften und sollten sich so auch

durch im Überschuß vorhandene Liganden nicht aus ihrer Bindung verdrängen lassen. Aus den Berichten anderer Autoren ist nicht ersichtlich, ob bei der Verwendung von blockierenden Antikörpern diese Vorsichtsmaßnahmen berücksichtigt worden sind.

Ein generelles Problem bei der Blockierung spezifischer Oberflächenrezeptoren mit Hilfe von inhibitorischen monoklonalen Antikörpern ist die relative Unsicherheit der Methode. Sicher nachweisen lassen sich Verdrängungseffekte nur anhand von knock-out Organismen, die aber für die verwendeten Rezeptoren (noch) nicht erhältlich sind. Außerdem führt die geringe Zahl von inhibitorischen monoklonalen Antikörpern häufig dazu, daß nur ein Klon eines Antikörpers getestet wird, was die Aussagekraft deutlich einschränkt, da unklar ist, ob das blockierte Epitop tatsächlich einer spezifischen Bindungsstelle der Bakterien entspricht oder vielleicht genau die Nachbarregion. In den vorliegenden Untersuchungen wurden deshalb, wenn möglich, mehrere Epitope getestet, mit entsprechenden deutlichen Unterschieden in der Expression der jeweiligen Oberflächenrezeptoren (siehe Abbildung 3.1 auf Seite 44).

4.2.2 Komplementrezeptoren

Payne und Horwitz beschrieben 1987 erstmals die Beteiligung der Komplementrezeptoren CR1 und CR3 an der Phagozytose von *L. pneumophila* durch Monozyten aus peripherem Blut [235]. Sie inkubierten dabei Monozyten mit monoklonalen Antikörpern gegen CR1, CR2, CR3, den Transferrinrezeptor und das DR-Antigen mit oder ohne immunem Serum und infizierten diese Zellen. Dabei fanden sie für die Rezeptoren CR1 und CR3, die C3b bzw. C3bi erkennen, eine Inhibition der Adhärenz von $68 \pm 1\%$ für anti-CR1 und von 64 ± 8 bis $74 \pm 11\%$ für anti-CR3 in nichtimmunem Serum. Dieser Effekt war insgesamt Dosis-abhängig und hatte ein Plateau bei einer Antikörper-Konzentration von 9-10 $\mu\text{g/ml}$. Es wurden Konzentrationen bis über 80 $\mu\text{g/ml}$ getestet, die in keiner weiteren Inhibition der Phagozytose resultierten. Dabei zeigte die Adhärenz von *L. pneumophila* eine Korrelation mit der Fixierung der Komplementkomponente C3 auf der Bakterienoberfläche. Wie drei Jahre später Bellinger-Kawahara und Horwitz zeigen konnten, bindet C3 auf dem alternativen Weg der Komplementaktivierung selektiv an das „major outer membrane proteins“ (MOMP) der Legionellen, um dann zusammen mit dem Komplementrezeptor einen Komplex zu bilden und als ganzes internalisiert zu werden [20]. Unter Bedingungen, in denen

kein oder Hitze-inaktiviertes Serum im Ansatz vorhanden war, sank die Adhärenz deutlich. So fanden Payne und Horwitz in ihrer Studie einen Rückgang der Adhärenz um 84% bei der Verwendung von Hitze-inaktiviertem Serum. Wurde erst gar kein Serum zugegeben, sank die Bindungsrate gar um 97%. Untermauert wurde diese Tatsache durch den zusätzlichen Befund, daß die Adhärenz von präopsonierten Legionellen in Hitze-inaktiviertem Serum 18-fach stärker ist als bei nicht-opsonierten Bakterien. Die Phagozytose benötigt demzufolge ein Serum-Opsonin, welches entweder selbst Hitze-labil ist oder aus einem Hitze-labilen Proteinsystem wie beispielsweise der Komplementkaskade hervorgeht. Wurde der Ansatz allerdings erst nach Opsonisierung der Legionellen in frischem nicht-immunem Serum auf 56°C erhitzt, phagozytierten die Monozyten die Bakterien genauso gut wie nicht-erhitzte präopsonierte Legionellen, was bedeutet, daß das Serum-Opsonin nach Bindung an die Bakterienoberfläche durch Hitze einwirkung nicht mehr verändert werden kann [235].

1992 wurde der von Payne, Horwitz und Bellinger-Kawahara beschriebene Rolle von Komplement bei der Aufnahme von Legionellen durch Studien von Husmann widersprochen, die zeigen konnte, daß die Adhärenz nur bei gleichzeitigem Vorhandensein von Komplement und spezifischen Antikörpern deutlich gesteigert ist [150]. Das alleinige Vorhandensein von Komplement reichte nicht aus um die Adhärenz zu erhöhen. Zudem konnten Verbrugh et al. 1985 zeigen, daß die Opsonierung von *L. pneumophila* Philadelphia 1-Stämmen durch nicht-immunes Serum die IgM-Antikörper-abhängige Aktivierung über den klassischen Weg benötigt [298]. Eine Bestätigung und der Nachweis einer direkten Bindung des Komplementfaktors C1q wurde in zwei Arbeiten von Mintz erbracht, der 1992 beschrieb, daß LPS von *L. pneumophila* den klassischen Weg aktiviert [207] und 1995 die Antikörper-unabhängige Bindung von C1q an *L. pneumophila* nachweisen konnte [206].

Zusammenfassend läßt sich nach Auswertung der bisher existierenden Literatur folgendes sagen:

1. Es gibt eine Antikörper-abhängige Phagozytose von Legionellen.
2. Es gibt eine Antikörper-unabhängige Phagozytose von Legionellen.
3. Die Komplementaktivierung kann auf dem klassischen oder dem alternativen Weg erfolgen.

4. Die effektivste Phagozytose wird durch gleichzeitiges Vorhandensein von Komplement und spezifischen Antikörpern erreicht.

Für die Übertragung des in-vitro-Pathogenesmodells auf den Menschen, nachdem die Komplementrezeptoren CR1 und CR3 die Phagozytose von *L. pneumophila* vermitteln, ist entscheidend, daß auf der Oberfläche von humanen Alveolarmakrophagen CD11b/CD18 (CR3) und CD11c/CD18 (CR4) entdeckt wurden. McGowan und Heckman konnten aber keine Expression von CR 1 (CD35) auf diesen Zellen finden [199, 217]. Es ist daher anzunehmen, daß diesem Rezeptor erst in zweiter Linie eine Bedeutung bei der Pathogenese zukommt, wenn das Immunsystem bereits aktiviert ist und Zytokine freigesetzt werden. Payne und Horwitz führten ihre Versuche aber an peripheren Monozyten durch, die, anders als Alveolarmakrophagen, CD35 exprimieren [235].

Bermudez et al. fanden 1997 für *Mycobacterium avium* eine Abhängigkeit des Bakterienwachstums von der vorausgegangenen Wachstumsumgebung: Zuvor intrazellulär vermehrte Mykobakterien gelangten 6 bis 8 mal effektiver in Makrophagen als eine extrazellulär gewachsene Kontrolle [24]. Darüberhinaus inhibierten anti-CR3-Antikörper die Phagozytose durch humane periphere Monozyten um 60% in der extrazellulär gewachsenen Gruppe, konnten aber die Aufnahme der intrazellulär gewachsenen Bakterien nicht hemmen. Cirillo konnte 1999 für in Amöben gewachsene *Legionella pneumophila* zeigen, daß deren Virulenz deutlich höher ist als die einer auf Agar gewachsenen Kontrollgruppe [49]. Dies scheint ein weiteres Indiz dafür zu sein, daß Legionellen zu unterschiedlichen Zeiten und unter verschiedenen Bedingungen auch nur bestimmte Rezeptorsysteme zur Invasion nutzen.

Letztlich ist bis heute unklar, in welchem Ausmaß die Komplementrezeptoren an der Phagozytose beteiligt sind. Der Vorteil dieses Weges in die Zelle wird im Ausbleiben der Aktivierung einer oxidativen Antwort der Zelle gesehen [320]. Die hier vorgestellten Untersuchungsergebnisse unterstützen eine alternative Route für Legionellen in die Phagozyten, da Wirtszell-adaptierte (*L. pneumophila* Sg1 (Lp1v)) und Agar-adaptierte (*L. pneumophila* Sg1 ATCC 33152) Spezies in gleichem Ausmass phagozytiert werden und bei Blockade der Komplement-Rezeptoren keine Verringerung der Phagozytoserate zu finden war. Selbst bei vollständiger Blockierung des CR3 durch Zugabe von monoklonalen Antikörpern gegen CD11b und CD18 ergab sich keine Änderung der Phagozytoserate. Dies

widerspricht demnach den Untersuchungen von Payne et al. [235], die bei der Verwendung von Hitze-inaktiviertem Serum eine stark verminderte Adhärenz und damit Phagozytose fanden. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zeigen aber, daß trotz der ausschließlichen Verwendung von Hitze-inaktiviertem Serum eine erhebliche Anzahl an Legionellen Komplementrezeptor-unabhängig in die Zellen gelangen kann.

Ein weiterer Beweis für die fehlende Interaktion von Legionellen mit Komplementrezeptoren in unserem Modell ist die Tatsache, daß HeLa-Zellen, die kaum Komplementrezeptoren exprimieren, Legionellen im gleichen Maß wie Komplementrezeptor-positive Zellen (MM6- und Jurkat-Zellen) phagozytieren.

4.2.3 CD14

Das Lipopolysaccharid (LPS) von *L. pneumophila* wurde erstmals von Wong et al. 1979 charakterisiert [317]. Es ist wie bei allen gramnegativen Mikroorganismen grundsätzlich aus Lipid A, einem „Core“-Polysaccharid und einer O-spezifischen Polysaccharidkette (O-Antigen) aufgebaut. Dabei ist Lipid A für die toxische und pyrogene Wirkung und die Aktivierung von Makrophagen durch eine vermehrte Zytokinbildung und -sekretion verantwortlich. Die O-spezifische Polysaccharidkette ist antigen wirksam und unterscheidet sich in ihrem Aufbau von Bakterium zu Bakterium. So ist das *L. pneumophila*-LPS serogruppenspezifisch und kann deshalb zur Gruppeneinteilung verwendet werden [48, 128]. Wong sprach im Falle von *Legionella spp.* von einem „neuen Typ von Lipopolysaccharid“, da sich das gefundene Molekül in zahlreichen Eigenschaften deutlich von den bisher bekannten unterschied. So ist zwar die in-vitro-Aktivität im Limulus-Assay hoch, infizierte Ratten zeigen jedoch nur eine geringe pyrogene Potenz des Endotoxins und keine lokale Shwartzman-Reaktion in Kaninchen und Mäusen. Die Toxizität des *L. pneumophila*-LPS beträgt weniger als 3% derjenigen von *Neisseria gonorrhoeae* und weniger als 0,08% derjenigen von *Salmonella enterica* Serovar Minnesota-Endotoxin [317]. Außerdem entdeckte man, daß das Molekül nicht die üblicherweise mit Lipid A assoziierten Hydroxy-Fettsäuren besitzt, dafür aber relativ viele verzweigt-kettige Fettsäuren aufweist [83, 212]. Dies könnte für die relativ niedrige Endotoxizität im Tiermodell verantwortlich sein und gleichzeitig intrazelluläre Bakterien vor der Verdauung durch Esterasen, die in Amöben vorkommen, schützen [327]. Wie Neumei-

ster et al. 1998 zeigen konnten, ist das LPS von *L. pneumophila* nicht in der Lage, mit in Serum gelöstem (sCD14) oder membranständigem CD14 zu interagieren [222]. Dies läßt darauf schließen, daß die geringe Endotoxizität auf einer fehlerhaften Interaktionen mit dem LPS-Rezeptor CD14 beruht. Bemerkenswert ist außerdem, daß die meisten Antikörper von Patienten mit gesicherten *L. pneumophila*-Infektionen gegen das Lipopolysaccharid und nur wenige gegen das Hauptoberflächenprotein (MOMP) gerichtet sind [97].

Da sich das *L. pneumophila*-LPS strukturell und funktionell stark von dem anderer gram-negativer Bakterien unterscheidet, scheint es möglich, daß es auch bisher unbekannte Funktionen ausübt. Denkbar wäre hier die direkte Beteiligung von CD14 an der Phagozytose von *L. pneumophila*. Peterson et al. konnten 1995 zeigen, daß die Aufnahme von nicht-opsonierten *Mycobacterium tuberculosis* in Medium mit 10% Hitze-inaktiviertem Serum durch humane Microglia über den LPS-Rezeptor vermittelt wird [236]. Um dies für *Legionella spp.* zu untersuchen, wurde der blockierende monoklonale Antikörper biG14 in den Infektionsassay zugegeben. Er hemmt die Bindung des LPS-LBP-Komplexes an den LPS-Rezeptor der Monozyten und blockiert diesen. Für die untersuchte Monozytenzelllinie und die verwendeten Legionellen-Stämme lies sich ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen LPS-Rezeptor und Phagozytose nicht nachweisen; die Phagozytoserate veränderte sich im Vergleich zum Kontrollansatz nicht.

4.2.4 CD29

Bermudez et al. fanden 1997 in Blockierungsversuchen mit monoklonalen Antikörpern gegen CD29 eine Inhibition der Phagozytose von intrazellulär kultivierten *Mycobacterium avium* um $66\pm 5\%$ [24]. Bei Bakterien, die zuvor auf Agar gezüchtet wurden, änderte die Zugabe von Antikörpern nichts an der Phagozytoserate. Die Beteiligung des β_1 -Integrin an der Phagozytose von Bakterien ist in mehreren Fällen nachgewiesen worden: Es wird von einem *Yersinia pseudotuberculosis*-Protein, dem Invasin, erkannt und wurde als Rezeptor für die Invasion des Bakteriums in epitheliale Zellen bestätigt [152, 153]. Darüberhinaus benützt *Mycobacterium leprae* das Molekül als Rezeptor bei der Invasion der Nasenschleimhaut [36]. Da dieses Oberflächenmolekül die Adhäsion von Leukozyten und die Phagozytose von Mykobakterien moduliert, könnte dies auch ein möglicher Mechanismus für die Inva-

sion zumindest der virulenten *Legionella spp.* sein. In den vorliegenden Versuchen fanden sich aber trotz einer deutlichen, durchflußzytometrisch gemessenen Expression von CD29 auf Mono Mac 6-Zellen keine Hinweise auf eine Beteiligung dieses Oberflächenmoleküls an der Phagozytose der verwendeten Legionellen.

4.2.5 CD54

Payne und Horwitz haben 1987 den Komplement-Rezeptor 3 (CD11b/CD18) als bei der Phagozytose wichtiges Oberflächenmolekül identifiziert [235]. Da CR3 aber häufig gemeinsam mit ICAM-1 interagiert [55], lag es nahe, auch diesen Rezeptor durch eine funktionelle Blockade auf eine direkte Beteiligung an der Legionellenphagozytose hin zu untersuchen. Die Ergebnisse lassen aber auch für CD54 keine Beteiligung an der Adhärenz und Invasion von *L. pneumophila* erkennen. In der Durchflußzytometrie ließ sich CD54 auf $0,2 \pm 0,2\%$ (Klon 8.4A6) bzw. $94,1 \pm 1,0\%$ (Klon HA58) aller Mono Mac 6-Zellen nachweisen, was nochmals die Problematik der Blockade mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern verdeutlicht (siehe 4.2.1 auf Seite 61).

4.2.6 CD71

Die intrazelluläre Vermehrung von Legionellen in Makrophagen ist eisenabhängig: So kann das Wachstum durch Zugabe des Eisen-Chelatbildners Deferoxamin komplett gehemmt werden. Dieser Effekt kann jedoch durch Zugabe von Eisen-Transferrin, nicht aber von Apotransferrin, aufgehoben werden. Zusätzlich fanden Byrd et al., daß Interferon γ -aktivierte Makrophagen 73% weniger Transferrin-Rezeptor exprimieren als nicht-aktivierte Zellen. Die Autoren schließen daraus, daß infizierte Makrophagen ihre Transferrin-Rezeptor-Expression herunterfahren, um die intrazelluläre Verfügbarkeit von Eisen, das von den Legionellen für die Vermehrung in hoher Konzentration benötigt wird, einzuschränken [37].

Die Bedeutung der Transferrinrezeptoren bei der Legionellenpathogenese wird unterstrichen durch die Studie an Zellen eines Patienten, dessen Monozyten nur sehr wenige Transferrinrezeptormoleküle an ihrer Oberfläche exprimieren und die eine intrazelluläre Vermehrung von Legionellen nicht zulassen. Erst nach Zusatz von Eisenammoniumcitrat wird den

Legionellen genügend Eisen zur Verfügung gestellt um vom Transferrin-Transferrinrezeptor-System der Wirtszelle unabhängig zu sein und sich adäquat zu vermehren [41].

Da Legionellen sehr sensibel auf Veränderungen des Eisenstoffwechsels reagieren, scheint es gut möglich, daß entsprechend veränderte Stoffwechselbedingungen auch Einfluß auf die Adhäsions- und Invasionsleistung der Legionellen nehmen. Bermudez et al. konnten für *Mycobacterium avium* 1997 nachweisen, daß eine Blockade der Transferrinrezeptoren von humanen peripheren Makrophagen mit monoklonalen Antikörpern die Phagozytoserate intrazellulär gewachsener Mykobakterien um $43 \pm 8\%$ hemmt [24]. In den vorliegenden Untersuchungen konnte bei ausreichend hoher Expression von CD71 ein solcher Zusammenhang zwischen Rezeptorblockade und Phagozytose für Mono Mac 6 und die beiden untersuchten Legionellen-Stämme nicht bestätigt werden.

Insgesamt waren sämtliche verwendete monoklonale Antikörper ohne Einfluß auf die Phagozytoserate der Legionellen durch Mono Mac 6-Zellen. Die inhibierenden Antikörper könnten einerseits Epitope besetzen, die für die Phagozytose keine Rolle spielen oder aber die Legionellen gelangen über gänzlich andere Rezeptoren als die hier untersuchten in die Monozyten.

4.3 Andere Rezeptorsysteme

In den folgenden Abschnitten werden einige andere Rezeptorsysteme vorgestellt, deren Beteiligung bei der Adhärenz und/oder Phagozytose anderer, meist intrazellulärer Bakterien bereits nachgewiesen werden konnte.

4.3.1 Lektine/Collectine

Lektine sind zelluläre Proteine, die spezifische Kohlenhydratstrukturen erkennen und binden können. Ursprünglich wurden sie in Pflanzen gefunden, sie kommen jedoch auch in tierischen Zellen vor. Die am besten untersuchte Gruppe sind die Selektine: Glykoproteine, die auf Endothelien vorkommen und eine extrazelluläre Lektin-Domäne besitzen, mit der sie Leukozyten und Lymphozyten z. B. bei Entzündungsreaktionen binden.

Gibson et al. konnten 1994 nachweisen, daß etwa 2-8% der Legionellen in Abwesenheit von Komplement und Antikörpern an U937-Zellen oder Meerschweinchen-Alveolarmakrophagen gebunden werden. Die Opsonin-unabhängige Bindung geschieht über Bakterienoberflächenproteine, die Lektin-ähnliche Strukturen besitzen und auf Seiten der Wirtszellen an Kohlenhydrat- oder komplexe Zuckermoleküle binden. An dieser Bindung konnte keine Beteiligung der Komplementrezeptoren CR1, CR3 und CR4 nachgewiesen werden [108].

Lange Zeit suchte man nach einem β -Glucan-Rezeptor auf Phagozyten und vermutete eine Verbindung zum Komplementrezeptor 3. Wie dann Thornton et al. 1996 nachweisen konnten, gibt es auf CD11b eine Lektin-Bindungsstelle, die sogenannte C-Domäne [175, 288]. Diese bindet β -Glucan, aber auch eine große Anzahl weiterer Zuckermoleküle, die z. B. Glucose, Mannose oder N-Acetyl-D-Glukosamin enthalten können. Die Domäne ist für Opsonin-unabhängige Bindungen an CR3 verantwortlich. Es war zunächst unklar, ob CR3 vielleicht sogar zwei Lektin-Bindungsstellen besitzt oder ob es diese große Vielfalt an Molekülen innerhalb einer Domäne zu binden vermag [288, 321]. Le Cabec et al. konnten schließlich 2000 zeigen, daß es sich um zwei unterschiedliche Epitope auf CD11b handeln muß, da virulente und avirulente Stämme von *Mycobacterium spp.* und Zymosan, ein Molekül, das aus α -Mannan und β -Glucan besteht, über verschiedene Wege aufgenommen werden [175]. Gibson et al. konnten keine Beteiligung der Komplementrezeptoren 1, 3 oder 4 an der Opsonin-unabhängigen Phagozytose von *Legionella spp.* finden [108]. Das ist vermutlich dadurch zu erklären, daß in diesen Versuchen monoklonale Antikörper gegen die I-Domäne, also die C3b-Bindungsstelle, verwendet wurden und Gibson et al. die C-Domäne noch unbekannt war. Für *Mycobacterium spp.* gibt es zahlreiche Beschreibungen Opsonin-unabhängiger Phagozytose über CR3, die vermutlich über Lektin-ähnliche Substanzen [51, 52, 137, 253, 268, 278, 279] und den Mannoserezeptor (MR) [11, 267] vermittelt werden. Von den in den vorliegenden Untersuchungen verwendeten anti-CD11b ist nur vom Klon ICRF 44 eine Spezifität für die I-Domäne, also die C3bi-Bindungsstelle, bekannt. Der Klon Bear-1 ist zwar spezifisch für CD11b, welches Epitop er erkennt, ist aber derzeit nicht bekannt.

Eine weitere Gruppe von Rezeptoren, die an der Phagozytose von *L. pneumophila* beteiligt sein könnten, sind die Collectin-Rezeptoren. Collectine sind eine Gruppe löslicher,

multimerer Lektine, die eine Kollagen-ähnliche Region und eine Kohlenhydrat-Erkennungs-Domäne besitzen und strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit mit der Komplementkomponente C1q aufweisen. Tenner konnte bereits 1980 zeigen, daß 26% der mononukleären Zellen aus peripherem Blut die Komplementkomponente C1q binden können, also einen C1q-Rezeptor besitzen. [287]. Die Beteiligung der Komplementkomponente C1q an der Phagozytose wurde 1991 von Guan et al. beschrieben, der die Kollagen-ähnliche Region des C1q als Bindungsstelle für Oberflächenmoleküle von phagozytierenden Zellen ausmachen konnte [115]. Alvarez-Dominguez et al. fanden 1993 die Beteiligung von C1q an der Phagozytose [4]: Durch Bindungsstudien konnte gezeigt werden, daß C1q die Aufnahme von *Listeria monocytogenes* verbessert. Da die Bindung dieses Proteins an *L. pneumophila* von Mintz nachgewiesen werden konnte [206], scheint es möglich, daß weitere Mitglieder der Collectin-Familie, zu der die Serumproteine Mannose-bindendes Protein (MBP, auch Mannose-bindendes Lectin (MBL) genannt), Conglutinin, Collectin 43 (CL43) und die Surfactant-Proteine SP-A und SP-D gehören [188], an der Opsonierung, Adhärenz und Phagozytose von Legionellen beteiligt sind.

In vitro-Studien haben gezeigt, daß SP-A als Opsonin wirkt und die Phagozytose einer Reihe von Mikroorganismen verbessert, zu denen *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), *Mycobacterium tuberculosis* [234], *Mycobacterium avium*, Influenza A-Virus, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* und *Klebsiella pneumoniae* zählen. Eine Beteiligung von SP-A an der Pathogenese von *Legionella pneumophila* scheint möglich zu sein, da auch die Legionellen den primären Kontakt mit dem Wirtsorganismus über die Lunge haben. Für die vorliegenden Untersuchungen, in denen sich keine Surfactant-Bestandteile im Ansatz befanden, bietet dies aber keine Erklärung.

4.3.2 Hitzeschockproteine

Eine weitere Gruppe von Oberflächenrezeptoren sind die sogenannten Hitzeschockproteine. Sie gehören in die Familie der molekularen Chaperone (engl. Anstands dame), die unerwünschte, zur Aggregation führende Wechselbeziehungen zwischen Proteinen, vor allem bei deren Synthese, verhindern sollen.

Für zahlreiche Bakterien wurde verschiedenen Hitzeschockproteinen eine Rolle bei der

Adhäsion zugesprochen. So bindet das Hsp70 von *Haemophilus influenzae* an Zelloberflächen-Sulfoglykolipide [122], Hsp60 vermittelt die Bindung von *Salmonella typhimurium* an intestinale Mukosa [69], von *Helicobacter pylori* an epitheliale Membransulfatide des Magens [149] und von *Haemophilus ducreyi* an HEp-2-Zellen [94].

Wie Garduño et al. 1998 zeigen konnten, befinden sich etwa 75% der Hsp60-Epitope von virulenten *Legionella spp.* auf deren Oberfläche [103]. Die Verteilung dieses Moleküls gleicht damit derjenigen von anderen typischen Oberflächenmolekülen der Legionellen, wie beispielsweise dem Hauptoberflächenmolekül (MOMP) und dem Lipopolysaccharid (LPS). In einer weiteren Arbeit konnten Garduño et al. zeigen, daß Adhäsion an und Invasion in HeLa-Zellen von virulenten *Legionella* über Hsp60 vermittelt wird [104]. So inhibieren Hsp60-spezifische Antikörper Adhäsion und Invasion von virulenten Legionellenstämmen deutlich, beeinflussen aber die Aufnahme von Salz-toleranten avirulenten Spezies nicht signifikant. Nach Vorinkubation der Ansätze mit Trypsin, welches Hsp60 proteolytisch verändert, das MOMP aber unangetastet läßt, fanden die Autoren eine unveränderte Adhäsion der Bakterien an HeLa-Zellen, die Fähigkeit zur Invasion war aber aufgehoben. Gleichzeitig wurde in weiteren Untersuchungen gereinigtes Hsp60 in die Ansätze zugegeben und eine deutliche Verminderung der Adhäsion und Invasivität der verwendeten virulenten Legionellen beobachtet. In einem Rezeptor-Modulations-Assay wurde schließlich eine deutliche Verminderung der Adhärenz, nicht aber der Aufnahme von Legionellen gezeigt. Die Autoren schließen deshalb auf das Vorhandensein eines spezifischen Rezeptors für Hsp60. Zusätzlich stellten Garduño et al. fest, daß reife, intrazelluläre Formen von *L. pneumophila*, die in HeLa-Zellen gewachsen waren, 100-fach effektiver waren in der Assoziation an HeLa-Zellen als ihre Agar-gewachsenen Artgenossen. Ein weiterer Hinweis darauf, daß Hsp60 eine Rolle in der Phagozytose von virulenten *Legionella spp.* durch Monozyten spielt, sind Beobachtungen, die eine frühzeitige Hochregulierung der bakteriellen Hsp60-Synthese, eine erhöhte Expression von Hsp60 an der Bakterienoberfläche und die Freisetzung von Hsp60 in die Phagosomen zeigen [76]. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für HeLa-Zellen gemacht [105]. Da die intrazellulären Basalraten von Hsp60 in virulenten und avirulenten *L. pneumophila* ähnlich sind, muß davon ausgegangen werden, daß die avirulenten Stämme keinen Defekt in der Hsp60-Synthese aufweisen, sondern die Fähigkeit zur Präsentation an der Bak-

terienoberfläche und/oder zur Interaktion mit den Wirtszellen nicht (mehr) besitzen [76].

Die Interaktion von Hsp60 auf der Bakterienoberfläche mit humanen Phagozytosezellen benötigt auch auf deren Oberfläche Rezeptoren. Und tatsächlich haben Retzlaff et al. 1996 spezifische Rezeptoren für *L. pneumophila*-Hsp60 auf Makrophagen gefunden, die eine Signalkaskade triggern, die Proteinkinase C-vermittelt ist und eine erhöhte IL-1 β -Synthese verursacht, die wiederum die T-Zell-Aktivierung und die Antigenpräsentation beeinflussen könnte [248].

4.3.3 Mannoserezeptor

Der Mannoserezeptor ist ein primärer Rezeptor für die Abwehr von Mikroorganismen, wird aber im Verlauf der Immunreaktion zugunsten des SP-A-Rezeptors herunterreguliert. Das Oberflächenmolekül ist bei der Phagozytose zahlreicher Mikroorganismen beteiligt. So wurden unter anderem eine Beteiligung bei der Aufnahme von *Candida albicans* [71], *Leishmania donovani* [312], *Pneumocystis carinii* [72] und nicht zuletzt von *Mycobacterium spp.* [11, 267] nachgewiesen. Auch dieser Weg wird von einigen Autoren als sicherer Eintrittspfad in Makrophagen gesehen, da die Bindung an den Mannoserezeptor keine bakterizide Reaktion mit reaktiven Sauerstoffspezies hervorruft [11]. Dieser Weg ist auch für *Legionella spp.* denkbar und bedarf weiterer Aufklärung.

4.3.4 Scavengerrezeptor

Für die Phagozytose von intrazellulär gewachsenen *Mycobacterium avium* durch humane periphere Makrophagen wiesen Bermudez et al. 1997 eine Hemmung von $51 \pm 9\%$ bei Vorbehandlung mit dem potenten Scavengerrezeptorinhibitor Fucoidin nach [24]. Dieser Rezeptor ist demnach an der Phagozytose von Bakterien beteiligt, was aber in den vorliegenden Untersuchungen mit der verwendeten Zelllinie Mono Mac 6 für *Legionella spp.* nicht untersucht werden konnte, da sie Scavengerrezeptor-negativ ist, wie Scheithe et al. 1994 zeigen konnte [264].

4.3.5 Ausblick

Insgesamt muß davon ausgegangen werden, daß auch Legionellen verschiedene Adhäsine und Invasine besitzen, die entsprechend der momentanen Umstände und Gegebenheiten genutzt werden, so wie dies schon für andere Bakterien, wie beispielsweise *Yersinia spp.* [151], *Neisseria gonorrhoeae* [112] und *Listeria monocytogenes* [60, 99, 132, 185], gezeigt werden konnte. Die vorliegenden Daten lassen die Vermutung aufkommen, daß *Legionella spp.* in vivo nicht oder nicht ausschließlich von Komplementrezeptoren aufgenommen werden, sondern daß hier eine Vielzahl von Rezeptorsystemen zum Einsatz kommt. Versucht man, die Ergebnisse der in vitro-Untersuchungen von Payne und Horwitz gedanklich auf den Menschen zu übertragen, so kommen einem schnell Zweifel, ob dies überhaupt ohne weiteres möglich ist. Die Verfügbarkeit von ausreichenden Mengen an Komplementkomponenten in der Lunge ist beispielsweise fraglich. Zwar produzieren Makrophagen, Typ II-Pneumozyten und auch Lungenfibroblasten eine große Vielfalt an Komplementkomponenten, die tatsächliche Konzentration beträgt jedoch nur 1-3% der Serumspiegel. Erst nach einer Stimulation durch bakterielles LPS oder IFN- γ werden größere Mengen produziert. Was aber, bis die Immunreaktion in Gang kommt? Mannoserezeptoren werden noch vor Beginn einer Infektion exprimiert und Zuckermoleküle befinden sich auch auf der Bakterienoberfläche. Die Mannoserezeptoren werden nach dem Beginn einer Infektion schnell von SP-A-Rezeptoren abgelöst. Und SP-A ist ohnehin in ausreichenden Mengen im Alveolarraum vorhanden. Die Zukunft wird sicherlich noch eine Reihe von neuen Rezeptorsystemen für die Phagozytose von *L. pneumophila* hervorbringen und eine Reihe wohl bekannter als bedeutsam charakterisieren.

Tabelle 4.1: Bisherige Untersuchungen zur Rezeptor-abhängigen Phagozytose bei *Legionella pneumophila* und *Mycobacterium spp.*

Bakterium	Zelllinie/Methode	Rezeptoren	Ergebnis	Referenz
<i>L. pneumophila</i>	Periphere humane Monozyten	Komplementrezeptoren CR1, CR2 und CR3, Transferrinrezeptor, DR-Antigen	Phagozytose von <i>L. pneumophila</i> wird vermittelt von Komplementrezeptoren CR1 und CR3; monoklonale Antikörper gegen CR2, DR-Antigen und Transferrin-Rezeptor hemmen die Phagozytose nur geringfügig	Payne und Horwitz 1987 [235]
<i>L. pneumophila</i>	Humane Monozyten; ELISA	MOMP, LPS	<i>L. pneumophila</i> und <i>L. pneumophila</i> -MOMP, nicht aber -LPS fixieren C3; MOMP-Liposomen werden von humanen Monozyten phagozytiert	Bellinger und Horwitz 1990 [20]
<i>L. pneumophila</i>	Funktioneller hämolytischer Assay	Lipopolysaccharid (LPS)	<i>L. pneumophila</i> -LPS aktiviert Komplement IgM-abhängig auf dem klassischen Weg	Mintz et al. 1992 [207]

<i>L. pneumophila</i>	Meerschweinchen-Peritonealmakrophagen, J774 Mausmakrophagen, undifferenzierte U-937	Fc- und Komplementrezeptoren	Fc- und Komplementrezeptoren vermitteln Adhärenz von <i>L. pneumophila</i> nur bei gleichzeitiger Gegenwart von Komplement und spezifischem Antikörper	Husmann und Johnson 1992 [150]
<i>L. pneumophila</i>	U-937, Meerschweinchen-Alveolarmakrophagen	Protein mit Lektin-ähnlicher Struktur, CR1, CR3, CR4	Lektin-ähnliches Protein auf der Bakterienoberfläche; Rezeptoren auf allen Wirtszellen wiesen Strukturen von Kohlenhydraten bzw. komplexen Zuckern auf; 2-8% aller Legionellen binden auf diese Weise Komplement- und Antikörperunabhängig	Gibson et al. 1994 [108]
<i>L. pneumophila</i>	C3-Bindung mit ELISA gemessen	MOMP	<i>L. pneumophila</i> -MOMP, aber nicht -LPS bindet C1q Antikörperunabhängig und aktiviert den klassischen Komplementweg	Mintz et al. 1995 [206]
<i>L. pneumophila</i>	HeLa-Zellen	Hsp60/Hsp60-Rezeptor	Oberflächen-assoziiertes Hsp60 von <i>L. pneumophila</i> vermittelt deren Adhäsion und Invasion in HeLa-Zellen	Garduño et al. 1998 [104]

<i>L. pneumophila</i>	<i>Hartmannella vermiformis</i>	Gal/GalNAc Lektin	<i>L. pneumophila</i> gelangt über einen 170kDa großes Gal/GalNAc-inhibierbares Lektin in das Protozoon <i>H. vermiformis</i>	Venkataraman et al. 1997 [297]
<i>M. avium</i>	Humane periphere Makrophagen	Komplementrezeptoren CR1 und CR3, CD29, Transferrinrezeptor (CD71), Scavengerrezeptor	Anti-CR3 inhibiert die Phagozytose von extrazellulär kultivierten <i>M. avium</i> ; anti-CD29 und anti-CD71 hemmen die Komplement-unabhängige Phagozytose von intrazellulär gewachsenen <i>M. avium</i>	Bermudez et al. 1997 [24]
<i>M. tuberculosis</i>	Aus Blut-Monozyten gewonnene humane Makrophagen	Komplementrezeptoren CR1, CR3 und CR4 und Mannoserezeptor (MR)	Die Phagozytose von virulenten, aber nicht von avirulenten <i>M. tuberculosis</i> , wird außer von Komplementrezeptoren auch durch den Mannoserezeptor vermittelt.	Schlesinger et al. 1993 [267]
<i>M. phlei</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. kansasii</i>	Humane periphere Makrophagen	Mannose-Rezeptor(MR)	MR vermittelt die Phagocytose von pathogenen und apathogenen Mycobakterien und umgeht dabei die bakterizide Wirkung der Makrophagen	Astarie-Dequeker et al. 1999 [11]

Kapitel 5

Zusammenfassung

Legionella pneumophila ist ein Bakterium, das beim Menschen zu lebensbedrohlichen Pneumonien führen kann. Als zentraler Pathomechanismus wird die Fähigkeit zur intrazellulären Vermehrung angesehen. Obwohl in der Vergangenheit Komplementrezeptoren als ein Weg der Legionellen in menschliche Monozyten/Makrophagen beschrieben wurden, ist bis heute völlig unklar, in welchem Ausmaß diese Rezeptoren zur Adhärenz und Phagozytose beitragen. In der vorliegenden Arbeit sollten neben den Komplementrezeptoren 1 und 3 weitere Oberflächenmoleküle auf ihre Beteiligung bei der Aufnahme von *L. pneumophila* untersucht werden. In einem ersten Versuch wurde zunächst die Phagozytose und intrazelluläre Vermehrung der Legionellen in einer Monozyten-Zelllinie bestätigt. Als Bakterien wurden in allen Untersuchungen die Wirtszell-adaptierte *L. pneumophila* Sg1 (frisches Patientenisolat, Lp1v) und die Agar-adaptierte *L. pneumophila* Sg1 ATCC 33152 (Lp1a) eingesetzt. Bei der Zelllinie handelt es sich um die sehr weit differenzierte Monozyten-Linie Mono Mac 6. Diese Versuche wurden anschließend mit der HeLa- und Jurkat-Zellen, die sich beide in ihrem Oberflächenrezeptor-Repertoire vor allem hinsichtlich der Komplementrezeptoren von Mono Mac 6 unterscheiden, wiederholt. Auch in diesem Fall wurden die Legionellen in gleichem Ausmaß phagozytiert, eine intrazelluläre Vermehrung in nennenswertem Ausmaß fand jedoch nicht statt. Für den Hauptteil der Arbeit wurden den Ansätzen 30 Minuten vor Beginn der Infektion von Mono Mac 6 mit Legionellen blockierende monoklonale Antikörper oder irrelevante Isotypenkontrollen zugegeben. Dabei wurden die folgenden Oberflächenrezeptoren untersucht: Die Komplementrezeptoren 1 (CD35) und 3 (CD11b/CD18),

der LPS-Rezeptor (CD14), die β_1 -Integrinkette des Fibronectin-Rezeptors (CD29), das interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1, CD54) und der Transferrinrezeptor (CD71). Die Oberflächenexpression dieser Rezeptoren wurde vor Beginn der Versuchsreihen durchflußzytometrisch ermittelt. Komplementrezeptor 1 (CD35) war als einziger praktisch nicht nachweisbar, alle anderen Oberflächenmoleküle waren, abhängig vom Klon, auf mindestens drei Viertel aller Zellen vorhanden.

In allen Untersuchungen fanden sich, wie zu erwarten war, signifikante Veränderungen der Phagozytoserate zwischen dem Wirtszell-adaptierten, virulenten und dem Agar-adaptierten, avirulenten Stamm: Von *L. pneumophila* Sg1 (Lp1v) fanden sich durchgehend 1 bis 2 Zehnerpotenzen mehr Colony Forming Units (CFU)/ml. Zwischen den Ansätzen mit monoklonalen Antikörpern und denjenigen ohne bzw. mit irrelevanten Antikörpern ließen sich jedoch keinerlei Unterschiede in der Phagozytoserate feststellen. Dies bedeutet, daß sich die Phagozytose der verwendeten Legionellen durch die Mono Mac 6-Zellen mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern nicht verhindern ließ. Hierfür gibt es zwei mögliche Erklärungen: Entweder blockierten die funktionsinhibierenden Antikörper nicht die Bindungsstelle der Bakterien oder die Legionellen gelangen über andere Rezeptoren in die Monozyten. Zu diskutieren sind hier neben dem Mannoserezeptor Hitzeschockprotein-, Lektin- oder noch völlig unbekannte Rezeptorsysteme.

Literaturverzeichnis

- [1] Abu, K. Y. (1996) The phagosome containing legionella pneumophila within the protozoan hartmannella vermiformis is surrounded by the rough endoplasmic reticulum. *Appl.Environ.Microbiol.*, 62(6):2022–2028.
- [2] Abu, K. Y., Eisenstein, B., Engleberg, N. (1993) Phenotypic modulation by legionella pneumophila upon infection of macrophages. *Infect.Immun.*, 61(4):1320–1329.
- [3] Aderem, A., Underhill, D. (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu.Rev.Immunol.*, 17:593–623.
- [4] Alvarez-Dominguez, C., Carrasco-Marin, E., Leyva-Cobian, F. (1993) Role of complement component c1q in phagocytosis of listeria monocytogenes by murine macrophage-like cell lines. *Infect.Immun.*, 61(9):3664–3672.
- [5] Alvarez-Elcoro, S., Enzler, M. (1999) The macrolides: Erythromycin, clarithromycin, and azithromycin. *Mayo Clin.Proc.*, 74(6):613–634.
- [6] Andrews, H., Vogel, J., Isberg, R. (1998) Identification of linked legionella pneumophila genes essential for intracellular growth and evasion of the endocytic pathway. *Infect.Immun.*, 66(3):950–958.
- [7] Aragon, V., Kurtz, S., Cianciotto, N. (2001) Legionella pneumophila major acid phosphatase and its role in intracellular infection. *Infect.Immun.*, 69(1):177–185.
- [8] Aragon, V., Kurtz, S., Flieger, A., Neumeister, B., Cianciotto, N. (2000) Secreted enzymatic activities of wild-type and pilD-deficient legionella pneumophila. *Infect.Immun.*, 68(4):1855–1863.
- [9] Arata, S., Kasai, N., Klein, T., Friedman, H. (1994) Legionella pneumophila growth restriction and cytokine production by murine macrophages activated by a novel pseudomonas lipid a. *Infect.Immun.*, 62(2):729–732.
- [10] Arnouts, P., Ramael, M., Ysebaert, D., Verpooten, G., de, B. M., Van, M. E., Pattyn, S. (1991) Legionella pneumophila peritonitis in a kidney transplant patient. *Scand.J.Infect.Dis.*, 23(1):119–122.
- [11] Astarie-Dequeker, C., Diaye, E., Le, C. V., Rittig, M., Prandi, J., Maridonneau-Parini, I. (1999) The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human. *Infect.Immun.*, 67(2):469–477.
- [12] Babe, J., K.S., Reinhardt, J. (1994) Diagnosis of legionella sepsis by examination of a peripheral blood smear. *Clin.Infect.Dis.*, 19(6):1164–1165.

- [13] Baine, W. (1985) Cytolytic and phospholipase c activity in legionella species. *J.Gen.Microbiol.*, 131(Pt 6):1383–1391.
- [14] Ballard, A., Fry, N., Chan, L., Surman, S., Lee, J., Harrison, T., Towner, K. (2000) Detection of legionella pneumophila using a real-time PCR hybridization assay. *J.Clin.Microbiol.*, 38(11):4215–4218.
- [15] Bangsberg, J., Uldum, S., Jensen, J., Bruun, B. (1995) Nosocomial legionellosis in three heart-lung transplant patients: Case reports and environmental observations. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.*, 14(2):99–104.
- [16] Bansal, N., McDonell, F. (1997) Identification and DNA fingerprinting of legionella strains by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J.Clin.Microbiol.*, 35(9):2310–2314.
- [17] Barbaree, J., Fields, B., Feeley, J., Gorman, G., Martin, W. (1986) Isolation of protozoa from water associated with a legionellosis outbreak and demonstration of intracellular multiplication of legionella pneumophila. *Appl.Environ.Microbiol.*, 51(2):422–424.
- [18] Barker, J., Brown, M. (1995) Speculations on the influence of infecting phenotype on virulence and antibiotic susceptibility of legionella pneumophila. *J.Antimicrob.Chemother.*, 36(1):7–21.
- [19] Barker, J., Brown, M., Collier, P., Farrell, I., Gilbert, P. (1992) Relationship between legionella pneumophila and acanthamoeba polyphaga: Physiological status and susceptibility to chemical inactivation. *Appl.Environ.Microbiol.*, 58(8):2420–2425.
- [20] Bellingier-Kawahara, C., Horwitz, M. (1990) Complement component c3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of legionella pneumophila and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. *J.Exp.Med.*, 172(4):1201–1210.
- [21] Bender, L., Ott, M., Debes, A., Rdest, U., Heesemann, J., Hacker, J. (1991) Distribution, expression, and long-range mapping of legiolysin gene (lly)-specific DNA sequences in legionellae. *Infect.Immun.*, 59(9):3333–3336.
- [22] Benson, R., Fields, B. (1998) Classification of the genus legionella. *Semin.Respir.Infect.*, 13(2):90–99.
- [23] Berger, K., Isberg, R. (1993) Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in legionella pneumophila. *Mol.Microbiol.*, 7(1):7–19.
- [24] Bermudez, L., Parker, A., Goodman, J. (1997) Growth within macrophages increases the efficiency of mycobacterium avium in invading other macrophages by a complement receptor-independent pathway. *Infect.Immun.*, 65(5):1916–1925.
- [25] Bernat, A., Garrigos, E., Martin, J., Moll, R., Perez, A. (1994) Legionnaires' disease outbreak in a haemodialysis unit. *Nephrol.Dial.Transplant.*, 9(2):217–218.
- [26] Bhopal, R. (1995) Source of infection for sporadic legionnaires' disease: A review. *J.Infect.*, 30(1):9–12.
- [27] Blanchard, D., Friedman, H., Stewart, W., Klein, T., Djeu, J. (1988) Role of gamma interferon in induction of natural killer activity by legionella pneumophila in vitro and in an experimental murine infection model. *Infect.Immun.*, 56(5):1187–1193.

- [28] Blanchard, D., Stewart, W., Klein, T., Friedman, H., Djeu, J. (1987) Cytolytic activity of human peripheral blood leukocytes against legionella pneumophila-infected monocytes: Characterization of the effector cell and augmentation by interleukin 2. *J.Immunol.*, 139(2):551–556.
- [29] Blatt, S., Dolan, M., Hendrix, C., Melcher, G. (1994) Legionnaires' disease in human immunodeficiency virus-infected patients: Eight cases and review. *Clin.Infect.Dis.*, 18(2):227–232.
- [30] Blatt, S., Parkinson, M., Pace, E., Hoffman, P., Dolan, D., Lauderdale, P., Zajac, R., Melcher, G. (1993) Nosocomial legionnaires' disease: Aspiration as a primary mode of disease. *Am.J.Med.*, 95(1):16–22.
- [31] Bozue, J., Johnson, W. (1996) Interaction of legionella pneumophila with acanthamoeba castellanii: Uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infect.Immun.*, 64(2):668–673.
- [32] Brady, M. (1989) Nosocomial legionnaires disease in a children's hospital. *J.Pediatr.*, 115(1):46–50.
- [33] Breiman, R., Fields, B., Sanden, G., Volmer, L., Meier, A., Spika, J. (1990) Association of shower use with legionnaires' disease. possible role of amoebae. *JAMA*, 263(21):2924–2926.
- [34] Brieland, J., Heath, L., Huffnagle, G., Remick, D., McClain, M., Hurley, M., Kunkel, R., Fantone, J., Engleberg, C. (1996) Humoral immunity and regulation of intrapulmonary growth of legionella pneumophila in the immunocompetent host. *J.Immunol.*, 157(11):5002–5008.
- [35] Butler, C., Street, E., Hatch, T., Hoffman, P. (1985) Disulfide-bonded outer membrane proteins in the genus legionella. *Infect.Immun.*, 48(1):14–18.
- [36] Byrd, S., Gelber, R., Bermudez, L. (1993) Roles of soluble fibronectin and beta 1 integrin receptors in the binding of mycobacterium leprae to nasal epithelial cells. *Clin.Immunol.Immunopathol.*, 69(3):266–271.
- [37] Byrd, T., Horwitz, M. (1989) Interferon gamma-activated human monocytes down-regulate transferrin receptors and inhibit the intracellular multiplication of legionella pneumophila by limiting the availability of iron. *J.Clin.Invest.*, 83(5):1457–1465.
- [38] Byrd, T., Horwitz, M. (1991) Chloroquine inhibits the intracellular multiplication of legionella pneumophila by limiting the availability of iron. a potential new mechanism for the therapeutic effect of chloroquine against intracellular pathogens. *J.Clin.Invest.*, 88(1):351–357.
- [39] Byrd, T., Horwitz, M. (1991) Lactoferrin inhibits or promotes legionella pneumophila intracellular multiplication in nonactivated and interferon gamma-activated human monocytes depending upon its degree of iron saturation. iron-lactoferrin and nonphysiologic iron chelates reverse monocyte activation against legionella pneumophila. *J.Clin.Invest.*, 88(4):1103–1112.
- [40] Byrd, T., Horwitz, M. (1993) Regulation of transferrin receptor expression and ferritin content in human mononuclear phagocytes. coordinate upregulation by iron transferin and downregulation by interferon gamma. *J.Clin.Invest.*, 91(3):969–976.

- [41] Byrd, T., Horwitz, M. (2000) Aberrantly low transferrin receptor expression on human monocytes is associated with nonpermissiveness for legionella pneumophila growth. *J.Infect.Dis.*, 181(4):1394–1400.
- [42] Byrne, B., Swanson, M. (1998) Expression of legionella pneumophila virulence traits in response to growth conditions. *Infect.Immun.*, 66(7):3029–3034.
- [43] Campins, M., Ferrer, A., Callis, L., Pelaz, C., Cortes, P., Pinart, N., Vaque, J. (2000) Nosocomial legionnaire's disease in a children's hospital. *Pediatr.Infect.Dis.J.*, 19(3):228–234.
- [44] Carratala, J., Gudiol, F., Pallares, R., Dorca, J., Verdager, R., Ariza, J., Manresa, F. (1994) Risk factors for nosocomial legionella pneumophila pneumonia. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.*, 149(3 Pt 1):625–629.
- [45] Catrenich, C., Johnson, W. (1989) Characterization of the selective inhibition of growth of virulent legionella pneumophila by supplemented mueller-hinton medium. *Infect.Immun.*, 57(6):1862–1864.
- [46] Cianciotto, N., Eisenstein, B., Engleberg, N., Shuman, H. (1989) Genetics and molecular pathogenesis of legionella pneumophila, an intracellular parasite of macrophages. *Mol.Biol.Med*, 6(5):409–424.
- [47] Cianciotto, N., Eisenstein, B., Mody, C., Toews, G., Engleberg, N. (1989) A legionella pneumophila gene encoding a species-specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection. *Infect.Immun.*, 57(4):1255–1262.
- [48] Ciesielski, C., Blaser, M., Wang, W. (1986) Serogroup specificity of legionella pneumophila is related to lipopolysaccharide characteristics. *Infect.Immun.*, 51(2):397–404.
- [49] Cirillo, J., Cirillo, S., Yan, L., Bermudez, L., Falkow, S., Tompkins, L. (1999) Intracellular growth in *acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of legionella pneumophila. *Infect.Immun.*, 67(9):4427–4434.
- [50] Cirillo, J., Falkow, S., Tompkins, L. (1994) Growth of legionella pneumophila in *acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect.Immun.*, 62(8):3254–3261.
- [51] Cywes, C., Godenir, N., Hoppe, H., Scholle, R., Steyn, L., Kirsch, R., Ehlers, M. (1996) Nonopsonic binding of mycobacterium tuberculosis to human complement receptor type 3 expressed in chinese hamster ovary cells. *Infect.Immun.*, 64(12):5373–5383.
- [52] Cywes, C., Hoppe, H., Daffe, M., Ehlers, M. (1997) Nonopsonic binding of mycobacterium tuberculosis to complement receptor type 3 is mediated by capsular polysaccharides and is strain dependent. *Infect.Immun.*, 65(10):4258–4266.
- [53] Davis, G., Winn, J., W.C. (1987) Legionnaires' disease: Respiratory infections caused by legionella bacteria. *Clin.Chest Med.*, 8(3):419–439.
- [54] De, G. Y., Maes, N., Presti, F., Etienne, J., Struelens, M. (2001) Rapid identification of clinically relevant legionella spp. by analysis of transfer DNA intergenic spacer length polymorphism. *J.Clin.Microbiol.*, 39(1):162–169.
- [55] Diamond, M., Staunton, D., de, F. A., Stacker, S., Garcia-Aguilar, J., Hibbs, M., Springer, T. (1990) ICAM-1 (CD54): A counter-receptor for mac-1 (CD11b/CD18). *J.Cell Biol.*, 111(6 Pt 2):3129–3139.

- [56] Dietrich, C., Heuner, K., Brand, B., Hacker, J., Steinert, M. (2001) Flagellum of legionella pneumophila positively affects the early phase of infection of eukaryotic host cells. *Infect.Immun.*, 69(4):2116–2122.
- [57] Dobranowski, J., Stringer, D. (1989) Diagnosis of legionella lung abscess by percutaneous needle aspiration. *Can.Assoc.Radiol.J.*, 40(1):43–44.
- [58] Donowitz, G. (1994) Tissue-directed antibiotics and intracellular parasites: Complex interaction of phagocytes, pathogens, and drugs. *Clin.Infect.Dis.*, 19(5):926–930.
- [59] Donowitz, G., Reardon, I., Dowling, J., Rubin, L., Focht, D. (1990) Ingestion of legionella micdadei inhibits human neutrophil function. *Infect.Immun.*, 58(10):3307–3311.
- [60] Dramsi, S., Biswas, I., Maguin, E., Braun, L., Mastroeni, P., Cossart, P. (1995) Entry of listeria monocytogenes into hepatocytes requires expression of inIB, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol.Microbiol.*, 16(2):251–261.
- [61] Dreyfus, L., Iglewski, B. (1986) Purification and characterization of an extracellular protease of legionella pneumophila. *Infect.Immun.*, 51(3):736–743.
- [62] Edelstein, P. (1995) Antimicrobial chemotherapy for legionnaires' disease: A review. *Clin.Infect.Dis.*, 21(Suppl 3):S265–S276.
- [63] Edelstein, P. (1995) Review of azithromycin activity against legionella spp. *Pathol.Biol.(Paris)*, 43(6):569–572.
- [64] Edelstein, P. (1998) Antimicrobial chemotherapy for legionnaires disease: Time for a change. *Ann.Intern.Med.*, 129(4):328–330.
- [65] Edelstein, P. (1998) Legionnaires' disease. *N.Engl.J.Med.*, 338(3):200–201.
- [66] Edelstein, P., Brenner, D., Moss, C., Steigerwalt, A., Francis, E., George, W. (1982) Legionella wadsworthii species nova: A cause of human pneumonia. *Ann.Intern.Med.*, 97(6):809–813.
- [67] Egawa, K., Klein, T., Yamamoto, Y., Newton, C., Friedman, H. (1992) Enhanced growth restriction of legionella pneumophila in endotoxin-treated macrophages. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, 200(3):338–342.
- [68] Ehret, W. (1995) Diagnosis of legionella infection. *Internist.(Berl.)*, 36(2):106–113.
- [69] Ensgraber, M., Loos, M. (1992) A 66-kilodalton heat shock protein of salmonella typhimurium is responsible for binding of the bacterium to intestinal mucus. *Infect.Immun.*, 60(8):3072–3078.
- [70] Exner, M., Jung, K., Haardt, B. (1990) Nosokomiale legionellen infektion im zusammenhang mit einer systematischen legionellen-kontamination des hausinstallationsssystems und erfahrungen zur sanierung. *Forum Städte-Hygiene*, 41:289–293.
- [71] Ezekowitz, R., Sastry, K., Bailly, P., Warner, A. (1990) Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: Demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in cos-1 cells. *J.Exp.Med.*, 172(6):1785–1794.
- [72] Ezekowitz, R., Williams, D., Koziel, H., Armstrong, M., Warner, A., Richards, F., Rose, R. (1991) Uptake of pneumocystis carinii mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature*, 351(6322):155–158.

- [73] Fang, G., Yu, V., Vickers, R. (1989) Disease due to the legionellaceae (other than legionella pneumophila). historical, microbiological, clinical, and epidemiological review. *Medicine (Baltimore)*, 68(2):116–132.
- [74] Farrant, J., Drury, A., Thompson, R. (1988) Legionnaires' disease following immersion in a river. *Lancet*, 2(8608):460.
- [75] Feeley, J., Gibson, R., Gorman, G., Langford, N., Rasheed, J., Mackel, D., Baine, W. (1979) Charcoal-yeast extract agar: Primary isolation medium for legionella pneumophila. *J.Clin.Microbiol.*, 10(4):437–441.
- [76] Fernandez, R., Logan, S., Lee, S., Hoffman, P. (1996) Elevated levels of legionella pneumophila stress protein hsp60 early in infection of human monocytes and 1929 cells correlate with virulence. *Infect.Immun.*, 64(6):1968–1976.
- [77] Fields, B., Barbaree, J., Sanden, G., Morrill, W. (1990) Virulence of a legionella anisa strain associated with pontiac fever: An evaluation using protozoan, cell culture, and guinea pig models. *Infect.Immun.*, 58(9):3139–3142.
- [78] Fields, B., Barbaree, J., Shotts, J., E.B., Feeley, J., Morrill, W., Sanden, G., Dykstra, M. (1986) Comparison of guinea pig and protozoan models for determining virulence of legionella species. *Infect.Immun.*, 53(3):553–559.
- [79] Fields, B., Fields, S., Loy, J., White, E., Steffens, W., Shotts, E. (1993) Attachment and entry of legionella pneumophila in hartmannella vermiformis. *J.Infect.Dis.*, 167(5):1146–1150.
- [80] Fields, B., Nerad, T., Sawyer, T., King, C., Barbaree, J., Martin, W., Morrill, W., Sanden, G. (1990) Characterization of an axenic strain of hartmannella vermiformis obtained from an investigation of nosocomial legionellosis. *J.Protozool.*, 37(6):581–583.
- [81] Fields, B., Sanden, G., Barbaree, J., Morrill, W., Wadowsky, R., White, E., Feeley, J. (1989) Intracellular multiplication of legionella pneumophila in amoebae isolated from hospital hot water tanks. *Curr. Microbiol.*, 16:131–137.
- [82] Fields, B., Shotts, J., E.B., Feeley, J., Gorman, G., Martin, W. (1984) Proliferation of legionella pneumophila as an intracellular parasite of the ciliated protozoan tetrahymena pyriformis. *Appl.Environ.Microbiol.*, 47(3):467–471.
- [83] Finnerty, W., Makula, R., Feeley, J. (1979) Cellular lipids of the legionnaires' disease bacterium. *Ann.Intern.Med.*, 90(4):631–634.
- [84] Fitzgeorge, R., Featherstone, A., Baskerville, A. (1990) Efficacy of azithromycin in the treatment of guinea pigs infected with legionella pneumophila by aerosol. *J.Antimicrob.Chemother.*, 25(Suppl A):101–108.
- [85] Fitzgeorge, R., Lever, S., Baskerville, A. (1993) A comparison of the efficacy of azithromycin and clarithromycin in oral therapy of experimental airborne legionnaires' disease. *J.Antimicrob.Chemother.*, 31(Suppl E):171–176.
- [86] Flieger, A., Gong, S., Faigle, M., Deeg, M., Bartmann, P., Neumeister, B. (2000) Novel phospholipase a activity secreted by legionella species. *J.Bacteriol.*, 182(5):1321–1327.
- [87] Flieger, A., Gong, S., Faigle, M., Stevanovic, S., Cianciotto, N., Neumeister, B. (2001) Novel lysophospholipase a secreted by legionella pneumophila. *J.Bacteriol.*, 183(6):2121–2124.

- [88] Fraser, D., McDade, J. (1979) Legionellosis. *Sci.Am.*, 241(4):82–99.
- [89] Fraser, D., Tsai, T., Orenstein, W., Parkin, W., Beecham, H., Sharrar, R., Harris, J., Mallison, G., Martin, S., McDade, J., Shepard, C. (1977) Legionnaires' disease: Description of an epidemic of pneumonia. *N.Engl.J.Med.*, 297(22):1189–1197.
- [90] Friedman, H., Widen, R., Klein, T., Searls, L., Cabrian, K. (1984) Legionella pneumophila-induced blastogenesis of murine lymphoid cells in vitro. *Infect.Immun.*, 43(1):314–319.
- [91] Friedman, R., Iglewski, B., Miller, R. (1980) Identification of a cytotoxin produced by legionella pneumophila. *Infect.Immun.*, 29(1):271–274.
- [92] Friedman, R., Lochner, J., Bigley, R., Iglewski, B. (1982) The effects of legionella pneumophila toxin on oxidative processes and bacterial killing of human polymorphonuclear leukocytes. *J.Infect.Dis.*, 146(3):328–334.
- [93] Friis-Moller, A., Rechnitzer, C., Black, F., Collins, M., Lind, K., Aalund, O. (1986) Prevalence of legionnaires' disease in pneumonia patients admitted to a danish department of infectious diseases. *Scand.J.Infect.Dis.*, 18(4):321–328.
- [94] Frisk, A., Ison, C., Lagergard, T. (1998) GroEL heat shock protein of haemophilus ducreyi: Association with cell surface and capacity to bind to eukaryotic cells. *Infect.Immun.*, 66(3):1252–1257.
- [95] Fumarola, D., Pece, S. (1992) Multiple organ involvement by legionella pneumophila: Pathogenic mechanisms. *Eur.J.Epidemiol.*, 8(1):142–143.
- [96] Gabay, J., Blake, M., Niles, W., Horwitz, M. (1985) Purification of legionella pneumophila major outer membrane protein and demonstration that it is a porin. *J.Bacteriol.*, 162(1):85–91.
- [97] Gabay, J., Horwitz, M. (1985) Isolation and characterization of the cytoplasmic and outer membranes of the legionnaires' disease bacterium (legionella pneumophila). *J.Exp.Med.*, 161(2):409–422.
- [98] Gahmberg, C. (1997) Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules. *Curr.Opin.Cell Biol.*, 9(5):643–650.
- [99] Gaillard, J., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E., Cossart, P. (1991) Entry of l. monocytogenes into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell*, 65(7):1127–1141.
- [100] Gao, L., Harb, O., Abu, K. Y. (1997) Utilization of similar mechanisms by legionella pneumophila to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa. *Infect.Immun.*, 65(11):4738–4746.
- [101] Gao, L., Harb, O., Kwaik, Y. (1998) Identification of macrophage-specific infectivity loci (mil) of legionella pneumophila that are not required for infectivity of protozoa. *Infect.Immun.*, 66(3):883–892.
- [102] Gao, L., Stone, B., Brieland, J., Abu, K. Y. (1998) Different fates of legionella pneumophila pmi and mil mutants within macrophages and alveolar epithelial cells. *Microb.Pathog.*, 25(6):291–306.
- [103] Garduno, R., Faulkner, G., Trevors, M., Vats, N., Hoffman, P. (1998) Immunolocalization of hsp60 in legionella pneumophila. *J.Bacteriol.*, 180(3):505–513.

- [104] Garduno, R., Garduno, E., Hoffman, P. (1998) Surface-associated hsp60 chaperonin of legionella pneumophila mediates invasion in a HeLa cell model. *Infect.Immun.*, 66(10):4602–4610.
- [105] Garduno, R., Quinn, F., Hoffman, P. (1998) HeLa cells as a model to study the invasiveness and biology of legionella pneumophila. *Can.J.Microbiol.*, 44(5):430–440.
- [106] Gebran, S., Yamamoto, Y., Newton, C., Tomioka, M., Widen, R., Klein, T., Friedman, H. (1995) LPS inhibits the intracellular growth of legionella pneumophila in thioglycolate elicited murine peritoneal macrophages by iron-dependent, tryptophan-independent, oxygen-independent, and arginine-independent mechanisms. *J.Leukoc.Biol.*, 57(1):80–87.
- [107] Gey, G., Coffman, W., Kubicek, M. (1952) Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.*, 12:264–265.
- [108] Gibson, F., Tzianabos, A., Rodgers, F. (1994) Adherence of legionella pneumophila to u-937 cells, guinea-pig alveolar macrophages, and MRC-5 cells by a novel, complement-independent binding mechanism. *Can.J.Microbiol.*, 40(10):865–872.
- [109] Glick, T., Gregg, M., Berman, B., Mallison, G., Rhodes, J., W.W., Kassanoff, I. (1978) Pontiac fever. an epidemic of unknown etiology in a health department: I. clinical and epidemiologic aspects. *Am.J.Epidemiol.*, 107(2):149–160.
- [110] Gomez-Lus, P., Fields, B., Benson, R., Martin, W., O'Connor, S. (1993) Comparison of arbitrarily primed polymerase chain reaction, ribotyping, and monoclonal antibody analysis for subtyping legionella pneumophila serogroup 1. *J.Clin.Microbiol.*, 31(7):1940–1942.
- [111] Gosting, L., Cabrian, K., Sturge, J., Goldstein, L. (1984) Identification of a species-specific antigen in legionella pneumophila by a monoclonal antibody. *J.Clin.Microbiol.*, 20(6):1031–1035.
- [112] Grassme, H., Gulbins, E., Brenner, B., Ferlinz, K., Sandhoff, K., Harzer, K., Lang, F., Meyer, T. (1997) Acidic sphingomyelinase mediates entry of n. gonorrhoeae into nonphagocytic cells. *Cell*, 91(5):605–615.
- [113] Green, M., Wald, E., Dashefsky, B., Barbadora, K., Wadowsky, R. (1996) Field inversion gel electrophoretic analysis of legionella pneumophila strains associated with nosocomial legionellosis in children. *J.Clin.Microbiol.*, 34(1):175–176.
- [114] Greene, K., Rhine, W., Starnes, V., Ariagno, R. (1990) Fatal postoperative legionella pneumonia in a newborn. *J.Perinatol.*, 10(2):183–184.
- [115] Guan, E., Burgess, W., Robinson, S., Goodman, E., McTigue, K. (1991) Phagocytic cell molecules that bind the collagen-like region of c1q. involvement in the c1q-mediated enhancement of phagocytosis. *J.Biol.Chem.*, 266(30):20345–20355.
- [116] Haertl, R., Bandlow, G. (1991) Subtyping of legionella pneumophila serogroup 1 isolates by small-fragment restriction endonuclease analysis. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.*, 10(8):630–635.
- [117] Halberstam, M., Isenberg, H., Hilton, E. (1992) Abscess and empyema caused by legionella micdadei. *J.Clin.Microbiol.*, 30(2):512–513.
- [118] Harb, O., Abu, K. Y. (2000) Characterization of a macrophage-specific infectivity locus (milA) of legionella pneumophila. *Infect.Immun.*, 68(1):368–376.

- [119] Harrison, T., Saunders, N., Haththotuwa, A., Doshi, N., Taylor, A. (1990) Typing of legionella pneumophila serogroups 2-14 strains by analysis of restriction fragment length polymorphisms. *Lett.Appl.Microbiol.*, 11(4):189-192.
- [120] Harrison, T., Saunders, N., Haththotuwa, A., Hallas, G., Birtles, R., Taylor, A. (1990) Phenotypic variation amongst genotypically homogeneous legionella pneumophila serogroup 1 isolates: Implications for the investigation of outbreaks of legionnaires' disease. *Epidemiol.Infect.*, 104(2):171-180.
- [121] Hart, C., Makin, T. (1991) Legionella in hospitals: A review. *J.Hosp.Infect.*, 18(Suppl A):481-489.
- [122] Hartmann, E., Lingwood, C. (1997) Brief heat shock treatment induces a long-lasting alteration in the glycolipid receptor binding specificity and growth rate of haemophilus influenzae. *Infect.Immun.*, 65(5):1729-1733.
- [123] Hayden, R., Uhl, J., Qian, X., Hopkins, M., Aubry, M., Limper, A., Lloyd, R., Cocke-rill, F. (2001) Direct detection of legionella species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: Comparison of LightCycler PCR, in situ hybridization, direct fluorescence antigen detection, and culture. *J.Clin.Microbiol.*, 39(7):2618-2626.
- [124] Heath, C., Grove, D., Looke, D. (1996) Delay in appropriate therapy of legionella pneumonia associated with increased. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.*, 15(4):286-290.
- [125] Hebert, G., Moss, C., McDougal, L., Bozeman, F., McKinney, R., Brenner, D. (1980) The rickettsia-like organisms TATLOCK (1943) and HEBA (1959): Bacteria phenotypically similar to but genetically distinct from legionella pneumophila and the WIGA bacterium. *Ann.Intern.Med.*, 92(1):45-52.
- [126] Hedlund, K. (1981) Legionella toxin. *Pharmacol.Ther.*, 15(1):123-130.
- [127] Helbig, J., Engelstadter, T., Maiwald, M., Uldum, S., Witzleb, W., Luck, P. (1999) Diagnostic relevance of the detection of legionella DNA in urine samples by the polymerase chain reaction. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.*, 18(10):716-722.
- [128] Helbig, J., Kurtz, J., Pastoris, M., Pelaz, C., Luck, P. (1997) Antigenic lipopolysaccharide components of legionella pneumophila recognized by monoclonal antibodies: Possibilities and limitations for division of the species into serogroups. *J.Clin.Microbiol.*, 35(11):2841-2845.
- [129] Henke, M., Seidel, K. (1986) Association between legionella pneumophila and amoebae in water. *Isr.J.Med.Sci.*, 22(9):690-695.
- [130] Hervas, J., Lopez, P., de, I. F., Alomar, P. (1988) Multiple organ system failure in an infant with legionella infection. *Pediatr.Infect.Dis.J.*, 7(9):671-673.
- [131] Herwaldt, L., Gorman, G., McGrath, T., Toma, S., Brake, B., Hightower, A., Jones, J., Reingold, A., Boxer, P., Tang, P. (1984) A new legionella species, legionella feeleii species nova, causes pontiac fever in an automobile plant. *Ann.Intern.Med.*, 100(3):333-338.
- [132] Hess, J., Gentshev, I., Szalay, G., Ladel, C., Bubert, A., Goebel, W. (1995) Listeria monocytogenes p60 supports host cell invasion by and in vivo survival of attenuated salmonella typhimurium. *Infect.Immun.*, 63(5):2047-2053.

- [133] Heudorf, U., Hentschel, W., Hoffmann, M., Luck, C., Schubert, R. (2001) Legionella in domestic warm water—effects on the health of residents. *Gesundheitswesen.*, 63(5):326–334.
- [134] Heuner, K., Bender-Beck, L., Brand, B., Luck, P., Mann, K., Marre, R., Ott, M., Hacker, J. (1995) Cloning and genetic characterization of the flagellum subunit gene (*flaA*) of legionella pneumophila serogroup 1. *Infect.Immun.*, 63(7):2499–2507.
- [135] Heuner, K., Brand, B., Hacker, J. (1999) The expression of the flagellum of legionella pneumophila is modulated by different environmental factors. *FEMS Microbiol.Lett.*, 175(1):69–77.
- [136] Hickey, E., Cianciotto, N. (1994) Cloning and sequencing of the legionella pneumophila *fur* gene. *Gene*, 143(1):117–121.
- [137] Hirsch, C., Ellner, J., Russell, D., Rich, E. (1994) Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor- α -mediated growth inhibition of mycobacterium tuberculosis by human alveolar macrophages. *J.Immunol.*, 152(2):743–753.
- [138] Hoffman, P., Houston, L., Butler, C. (1990) Legionella pneumophila *htpAB* heat shock operon: Nucleotide sequence and expression of the 60-kilodalton antigen in *l. pneumophila*-infected HeLa cells. *Infect.Immun.*, 58(10):3380–3387.
- [139] Hoffman, P., Pine, L., Bell, S. (1983) Production of superoxide and hydrogen peroxide in medium used to culture legionella pneumophila: Catalytic decomposition by charcoal. *Appl.Environ.Microbiol.*, 45(3):784–791.
- [140] Hoge, C., Brieman, R. (1991) Advances in the epidemiology and control of legionella infections. *Epidemiol.Rev.*, 13:329–340.
- [141] Holden, E., Winkler, H., Wood, D., Leinbach, E. (1984) Intracellular growth of legionella pneumophila within *acanthamoeba castellanii*. *Infect.Immun.*, 45(1):18–24.
- [142] Horie, H., Kawakami, H., Minoshima, K., Kamohara, T., Nakamura, T., Kuroki, H. (1992) Neonatal legionnaires' disease. histopathological findings in an autopsied neonate. *Acta Pathol.Jpn.*, 42(6):427–431.
- [143] Horwitz, M. (1983) Cell-mediated immunity in legionnaires' disease. *J.Clin.Invest.*, 71(6):1686–1697.
- [144] Horwitz, M. (1983) The legionnaires' disease bacterium (*legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J.Exp.Med.*, 158(6):2108–2126.
- [145] Horwitz, M. (1984) Phagocytosis of the legionnaires' disease bacterium (*legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: Engulfment within a pseudopod coil. *Cell*, 36(1):27–33.
- [146] Horwitz, M., Silverstein, S. (1980) Legionnaires' disease bacterium (*legionella pneumophila*) multiples intracellularly in human monocytes. *J.Clin.Invest.*, 66(3):441–450.
- [147] Horwitz, M., Silverstein, S. (1981) Activated human monocytes inhibit the intracellular multiplication of legionnaires' disease bacteria. *J.Exp.Med.*, 154(5):1618–1635.
- [148] Horwitz, M., Silverstein, S. (1981) Interaction of the legionnaires' disease bacterium (*legionella pneumophila*) with human phagocytes. II. antibody promotes binding of *l. pneumophila* to monocytes but does not inhibit intracellular multiplication. *J.Exp.Med.*, 153(2):398–406.

- [149] Huesca, M., Borgia, S., Hoffman, P., Lingwood, C. (1996) Acidic pH changes receptor binding specificity of helicobacter pylori: A binary adhesion model in which surface heat shock (stress) proteins mediate sulfatide recognition in gastric colonization. *Infect.Immun.*, 64(7):2643–2648.
- [150] Husmann, L., Johnson, W. (1992) Adherence of legionella pneumophila to guinea pig peritoneal macrophages, j774 mouse macrophages, and undifferentiated u937 human monocytes: Role of fc and complement receptors. *Infect.Immun.*, 60(12):5212–5218.
- [151] Isberg, R. (1989) Mammalian cell adhesion functions and cellular penetration of enteropathogenic yersinia species. *Mol.Microbiol.*, 3(10):1449–1453.
- [152] Isberg, R., Falkow, S. (1985) A single genetic locus encoded by yersinia pseudotuberculosis permits invasion of cultured animal cells by escherichia coli k-12. *Nature*, 317(6034):262–264.
- [153] Isberg, R., Voorhis, D., Falkow, S. (1987) Identification of invasins: A protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell*, 50(5):769–778.
- [154] Jernigan, D., Hofmann, J., Cetron, M., Genese, C., Nuorti, J., Fields, B., Benson, R., Carter, R., Edelstein, P., Guerrero, I., Paul, S., Lipman, H., Breiman, R. (1996) Outbreak of legionnaires' disease among cruise ship passengers exposed to a contaminated whirlpool spa. *Lancet*, 347(9000):494–499.
- [155] John, J., J.F., Twitty, J. (1986) Plasmids as epidemiologic markers in nosocomial gram-negative bacilli: Experience at a university and review of the literature. *Rev.Infect.Dis.*, 8(5):693–704.
- [156] Johnson, J. (1999) Therapy for legionnaires disease. *Ann.Intern.Med.*, 130(10):864.
- [157] Johnson, J., Yu, V., Best, M., Vickers, R., Goetz, A., Wagner, R. (1985) Nosocomial legionellosis in surgical patients with head-and-neck cancer: Implications for epidemiological reservoir and mode of transmission. *Lancet*, 2(8450):298–300.
- [158] Johnson, W., Bernard, K., Marrie, T., Tyler, S. (1994) Discriminatory genomic fingerprinting of legionella pneumophila by pulsed-field electrophoresis. *J.Clin.Microbiol.*, 32(10):2620–2621.
- [159] Johnson, W., Varner, L., Poch, M. (1991) Acquisition of iron by legionella pneumophila: Role of iron reductase. *Infect.Immun.*, 59(7):2376–2381.
- [160] Jonas, D., Meyer, H., Matthes, P., Hartung, D., Jahn, B., Daschner, F., Jansen, B. (2000) Comparative evaluation of three different genotyping methods for investigation of nosocomial outbreaks of legionnaires' disease in hospitals. *J.Clin.Microbiol.*, 38(6):2284–2291.
- [161] Keller, D., Hajjeh, R., DeMaria, A., Fields, B., Pruckler, J., Benson, R., Kludt, P., Lett, S., Mermel, L., Giorgio, C., Breiman, R. (1996) Community outbreak of legionnaires' disease: An investigation confirming the potential for cooling towers to transmit legionella species. *Clin.Infect.Dis.*, 22(2):257–261.
- [162] Kilvington, S., Price, J. (1990) Survival of legionella pneumophila within cysts of acanthamoeba polyphaga following chlorine exposure. *J.Appl.Bacteriol.*, 68(5):519–525.
- [163] Kim, M., Rogers, J., Hurley, M., Engleberg, N. (1994) Phosphatase-negative mutants of legionella pneumophila and their behavior in mammalian cell infection. *Microb.Pathog.*, 17(1):51–62.

- [164] Kingston, M., Padwell, A. (1994) Fatal legionellosis from gardening. *N.Z.Med.J.*, 107(974):111.
- [165] Kirby, B., Snyder, K., Meyer, R., Finegold, S. (1980) Legionnaires' disease: Report of sixty-five nosocomially acquired cases of review of the literature. *Medicine (Baltimore)*, 59(3):188–205.
- [166] Klein, N., Cunha, B. (1998) Treatment of legionnaires' disease. *Semin.Respir.Infect.*, 13(2):140–146.
- [167] Kohler, R., Winn, J., W.C., Wheat, L. (1984) Onset and duration of urinary antigen excretion in legionnaires disease. *J.Clin.Microbiol.*, 20(4):605–607.
- [168] Korvick, J., Yu, V. (1987) Legionnaires' disease: An emerging surgical problem. *Ann.Thorac.Surg.*, 43(3):341–347.
- [169] Kramer, M., Ford, T. (1994) Legionellosis: Ecological factors of an environmentally 'new' disease. *Zentralbl.Hyg.Umweltmed.*, 195(5-6):470–482.
- [170] Krinos, C., High, A., Rodgers, F. (1999) Role of the 25 kDa major outer membrane protein of legionella pneumophila in attachment to u-937 cells and its potential as a virulence factor for chick embryos. *J.Appl.Microbiol.*, 86(2):237–244.
- [171] Kuchta, J., States, S., McGlaughlin, J., Overmeyer, J., Wadowsky, R., McNamara, A., Wolford, R., Yee, R. (1985) Enhanced chlorine resistance of tap water-adapted legionella pneumophila as compared with agar medium-passaged strains. *Appl.Environ.Microbiol.*, 50(1):21–26.
- [172] Kuzman, I., Soldo, I., Schonwald, S., Culig, J. (1995) Azithromycin for treatment of community acquired pneumonia caused by legionella pneumophila: A retrospective study. *Scand.J.Infect.Dis.*, 27(5):503–505.
- [173] Lanser, J., Adams, M., Doyle, R., Hewitt, P., Sangster, N. (1992) Genetic characterization of legionella pneumophila serogroup 1 associated with respiratory disease in australia. *Appl.Environ.Microbiol.*, 58(2):706–708.
- [174] Lavocat, M., Berthier, J., Rousson, A., Bornstein, N., Hartemann, E. (1987) Pulmonary legionnaires' disease in a child following drowning in fresh water. *Presse Med.*, 16(16):780.
- [175] Le, C. V., Cols, C., Maridonneau-Parini, I. (2000) Nonopsonic phagocytosis of zymosan and mycobacterium kansasii by CR3 (CD11b/CD18) involves distinct molecular determinants and is or is not coupled with NADPH oxidase activation. *Infect.Immun.*, 68(8):4736–4745.
- [176] Leoni, E., Legnani, P., Bucci, S. M., Righi, F. (2001) Prevalence of legionella spp. in swimming pool environment. *Water.Res.*, 35(15):3749–3753.
- [177] Leverstein-Van, H. M., Verbon, A., Huisman, M., Kuijper, E., Dankert, J. (1994) Reinfection with legionella pneumophila documented by pulsed-field gel. *Clin.Infect.Dis.*, 19(6):1147–1149.
- [178] Liles, M., Viswanathan, V., Cianciotto, N. (1998) Identification and temperature regulation of legionella pneumophila genes involved in type IV pilus biogenesis and type II protein secretion. *Infect.Immun.*, 66(4):1776–1782.

- [179] Locksley, R., Jacobs, R., Wilson, C., Weaver, W., Klebanoff, S. (1982) Susceptibility of legionella pneumophila to oxygen-dependent microbicidal systems. *J.Immunol.*, 129(5):2192–2197.
- [180] Lowry, P., Blankenship, R., Gridley, N., W. AndTroup, Tompkins, L. (1991) A cluster of legionella sternal-wound infections due to postoperative topical exposure to contaminated tap water. *N.Engl.J.Med.*, 324(2):109–113.
- [181] Luck, P., Dinger, E., Helbig, J., Thurm, V., Keuchel, H., Presch, C., Ott, M. (1994) Analysis of legionella pneumophila strains associated with nosocomial pneumonia in a neonatal intensive care unit. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.*, 13(7):535–571.
- [182] Luck, P., Helbig, J., Gunter, U., Assmann, M., Blau, R., Koch, H., Klepp, M. (1994) Epidemiologic investigation by macrorestriction analysis and by using monoclonal antibodies of nosocomial pneumonia caused by legionella. *J.Clin.Microbiol.*, 32(11):2692–2697.
- [183] Luck, P., Helbig, J., Hagedorn, H., Ehret, W. (1995) DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis to investigate a nosocomial pneumonia caused by legionella bozemanii serogroup 1. *Appl.Environ.Microbiol.*, 61(7):2759–2761.
- [184] Macfarlane, J., Finch, R., Laverick, A., Macrae, A. (1981) Pittsburgh pneumonia agent and legionellosis in nottingham. *Br.Med.J.(Clin.Res.Ed.)*, 283(6301):1222.
- [185] Maganti, S., Pierce, M., Hoffmaster, A., Rodgers, F. (1998) The role of sialic acid in opsonin-dependent and opsonin-independent adhesion of listeria monocytogenes to murine peritoneal macrophages. *Infect.Immun.*, 66(2):620–626.
- [186] Maher, W., Plouffe, J., Para, M. (1983) Plasmid profiles of clinical and environmental isolates of legionella pneumophila serogroup 1. *J.Clin.Microbiol.*, 18(6):1422–1423.
- [187] Maiwald, M., Schill, M., Stockinger, C., Helbig, J., Luck, P., Witzleb, W., Sonntag, H. (1995) Detection of legionella DNA in human and guinea pig urine samples by the polymerase chain reaction. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.*, 14(1):25–33.
- [188] Malhotra, R., Lu, J., Holmskov, U., Sim, R. (1994) Collectins, collectin receptors and the lectin pathway of complement activation. *Clin.Exp.Immunol.*, 97(Suppl 2):4–9.
- [189] Mangione, E., Remis, R., Tait, K., McGee, H., Gorman, G., Wentworth, B., Baron, P., Hightower, A., Barbaree, J., Broome, C. (1985) An outbreak of pontiac fever related to whirlpool use, michigan 1982. *JAMA*, 253(4):535–539.
- [190] Markham, A., Faulds, D. (1994) Roxithromycin. an update of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs*, 48(2):297–326.
- [191] Marra, A., Blander, S., Horwitz, M., Shuman, H. (1992) Identification of a legionella pneumophila locus required for intracellular multiplication in human macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 89(20):9607–9611.
- [192] Marston, B., Lipman, H., Breiman, R. (1994) Surveillance for legionnaires' disease. risk factors for morbidity and mortality. *Arch.Intern.Med.*, 154(21):2417–2422.
- [193] Matsiota-Bernard, P., Lefebvre, C., Sedqui, M., Cornillet, P., Guenounou, M. (1993) Involvement of tumor necrosis factor alpha in intracellular multiplication of legionella pneumophila in human monocytes. *Infect.Immun.*, 61(12):4980–4983.

- [194] Matsiota-Bernard, P., Pitsouni, E., Legakis, N., Nauciel, C. (1994) Evaluation of commercial amplification kit for detection of legionella pneumophila in clinical specimens. *J.Clin.Microbiol.*, 32(6):1503–1505.
- [195] Matute, A., Schurink, C., Hoepelman, I. (2000) Is a 5 day course of azithromycin enough for infections caused by legionella pneumophila? *J.Antimicrob.Chemother.*, 45(6):930–931.
- [196] Mauchline, W., James, B., Fitzgeorge, R., Dennis, P., Keevil, C. (1994) Growth temperature reversibly modulates the virulence of legionella pneumophila. *Infect.Immun.*, 62(7):2995–2997.
- [197] McDade, J., Shepard, C. (1979) Virulent to avirulent conversion of legionnaires' disease bacterium (legionella pneumophila)–its effect on isolation techniques. *J.Infect.Dis.*, 139(6):707–711.
- [198] McDade, J., Shepard, C., Fraser, D., Tsai, T., Redus, M., Dowdle, W. (1977) Legionnaires' disease: Isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N.Engl.J.Med.*, 297(22):1197–1203.
- [199] McGowan, S., Heckman, J. (1991) Mechanisms of serum-enhanced adhesion of human alveolar macrophages to epithelial cells. *Lung*, 169(4):215–226.
- [200] Mead, P., Lawson, J., Patterson, J. (1988) Chlorination of water supplies to control legionella may corrode the pipes. *JAMA*, 260(15):2216.
- [201] Mellado, A., Agüero, J., Seoane, A., Rodríguez-Solorzano, L. (1986) Plasmid profiles of legionella pneumophila strains isolated in Spain. *Eur.J.Epidemiol.*, 2(1):63–66.
- [202] Mengaud, J., Horwitz, M. (1993) The major iron-containing protein of legionella pneumophila is an aconitase homologous with the human iron-responsive element-binding protein. *J.Bacteriol.*, 175(17):5666–5676.
- [203] Mensa, J., Trilla, A., Moreno, A., Vidal, J., Españuela, J., Soriano, E., Garcia, S. M. (1993) Five-day treatment of non-severe, community-acquired pneumonia with josamycin. *J.Antimicrob.Chemother.*, 31(5):749–754.
- [204] Michael, E., McClellan, M., Huebner, H., Hostetter, M. (1995) Expression of CD21 and synthesis of its ligands by HeLa cells after growth in serum-free medium. *J.Lab.Clin.Med.*, 125(1):102–112.
- [205] Miller, L., Beebe, J., Butler, J., Martin, W., Benson, R., Hoffman, R., Fields, B. (1993) Use of polymerase chain reaction in an epidemiologic investigation of Pontiac fever. *J.Infect.Dis.*, 168(3):769–772.
- [206] Mintz, C., Arnold, P., Johnson, W., Schultz, D. (1995) Antibody-independent binding of complement component C1q by legionella pneumophila. *Infect.Immun.*, 63(12):4939–4943.
- [207] Mintz, C., Schultz, D., Arnold, P., Johnson, W. (1992) Legionella pneumophila lipopolysaccharide activates the classical complement pathway. *Infect.Immun.*, 60(7):2769–2776.
- [208] Mirich, D., Gray, R., Hyland, R. (1990) Legionella lung cavitation. *Can.Assoc.Radiol.J.*, 41(2):100–102.

- [209] Moffat, J., Tompkins, L. (1992) A quantitative model of intracellular growth of legionella pneumophila in acanthamoeba castellanii. *Infect.Immun.*, 60(1):296–301.
- [210] Monforte, R., Marco, F., Estruch, R., Campo, E. (1989) Multiple organ involvement by legionella pneumophila in a fatal case of legionnaires' disease. *J.Infect.Dis.*, 159(4):809.
- [211] Morley, J., Smith, L., Baltch, A., Smith, R. (1994) Recurrent infection due to legionella pneumophila in a patient with AIDS. *Clin.Infect.Dis.*, 19(6):1130–1132.
- [212] Moss, C., Weaver, R., Dees, S., Cherry, W. (1977) Cellular fatty acid composition of isolates from legionnaires disease. *J.Clin.Microbiol.*, 6(2):140–143.
- [213] Muder, R., Yu, V., McClure, J., Kroboth, F., Kominos, S., Lumish, R. (1983) Nosocomial legionnaires' disease uncovered in a prospective pneumonia study. *JAMA*, 249(23):3184–3188.
- [214] Muraca, P., Stout, J., Yu, V. (1987) Comparative assessment of chlorine, heat, ozone, and UV light for killing legionella pneumophila within a model plumbing system. *Appl.Environ.Microbiol.*, 53(2):447–453.
- [215] Muraca, P., Yu, V., Goetz, A. (1990) Disinfection of water distribution systems for legionella: A review of application procedures and methodologies. *Infect.Control.Hosp.Epidemiol.*, 11(2):79–88.
- [216] Myerowitz, R., Pasculle, A., Dowling, J., Pazin, G. S., Puerzer, M., Yee, R., Rinaldo, J., C.R., Hakala, T. (1979) Opportunistic lung infection due to pittsburgh pneumonia agent". *N.Engl.J.Med.*, 301(18):953–958.
- [217] Myones, B., Dalzell, J., Hogg, N., Ross, G. (1988) Neutrophil and monocyte cell surface p150,95 has iC3b-receptor (CR4) activity resembling CR3. *J.Clin.Invest.*, 82(2):640–651.
- [218] Nagl, M., Starlinger, R., Tiefenbrunner, F. (2000) Influence of sequential cultivation on virulence of legionella pneumophila and staphylococcus aureus. *Int.J.Hyg.Environ.Health*, 203(2):165–167.
- [219] Nahapetian, K., Challemel, O., Beurtin, D., Dubrou, S., Gounon, P., Squinazi, F. (1991) The intracellular multiplication of legionella pneumophila in protozoa from hospital plumbing systems. *Res.Microbiol.*, 142(6):677–685.
- [220] Nelson, D., Rensimer, E., Raffin, T. (1985) Legionella pneumophila pericarditis without pneumonia. *Arch.Intern.Med.*, 145(5):926.
- [221] Neu, H. (1991) The development of macrolides: Clarithromycin in perspective. *J.Antimicrob.Chemother.*, 27(Suppl A):1–9.
- [222] Neumeister, B., Faigle, M., Sommer, M., Zahringer, U., Stelter, F., Menzel, R., Schutt, C., Northoff, H. (1998) Low endotoxic potential of legionella pneumophila lipopolysaccharide due to failure of interaction with the monocyte lipopolysaccharide receptor CD14. *Infect.Immun.*, 66(9):4151–4157.
- [223] Neumeister, B., Schoniger, S., Faigle, M., Eichner, M., Dietz, K. (1997) Multiplication of different legionella species in mono mac 6 cells and in acanthamoeba castellanii. *Appl.Environ.Microbiol.*, 63(4):1219–1224.

- [224] Newton, C., Klein, T., Friedman, H. (1994) Secondary immunity to legionella pneumophila and th1 activity are suppressed by delta-9-tetrahydrocannabinol injection. *Infect.Immun.*, 62(9):4015–4020.
- [225] Nguyen, M., Stout, J., Yu, V. (1991) Legionellosis. *Infect.Dis.Clin.North Am.*, 5(3):561–584.
- [226] Nguyen, M., Yu, V. (1991) Legionella infection. *Clin.Chest Med.*, 12(2):257–268.
- [227] Nolte, F., Conlin, C. (1986) Major outer membrane protein of legionella pneumophila carries a species-specific epitope. *J.Clin.Microbiol.*, 23(3):643–646.
- [228] Nolte, F., Conlin, C., Roisin, A., Redmond, S. (1984) Plasmids as epidemiological markers in nosocomial legionnaires' disease. *J.Infect.Dis.*, 149(2):251–256.
- [229] O'Brien, S., Bhopal, R. (1993) Legionnaires' disease: The infective dose paradox. *Lancet*, 342(8862):5–6.
- [230] Osterholm, M., Chin, T., Osborne, D., Dull, H., Dean, A., Fraser, D., Hayes, P., Hall, W. (1983) A 1957 outbreak of legionnaires' disease associated with a meat packing plant. *Am.J.Epidemiol.*, 117(1):60–67.
- [231] Ott, M., Bender, L., Marre, R., Hacker, J. (1991) Pulsed field electrophoresis of genomic restriction fragments for the detection of nosocomial legionella pneumophila in hospital water supplies. *J.Clin.Microbiol.*, 29(4):813–815.
- [232] Pachon, J., Prados, M., Capote, F., Cuello, J., Garnacho, J., Verano, A. (1990) Severe community-acquired pneumonia. etiology, prognosis, and treatment. *Am.Rev.Respir.Dis.*, 142(2):369–373.
- [233] Pasculle, A., Feeley, J., Gibson, R., Cordes, L., Myerowitz, R., Patton, C., Gorman, G., Carmack, C., Ezzell, J., Dowling, J. (1980) Pittsburgh pneumonia agent: Direct isolation from human lung tissue. *J.Infect.Dis.*, 141(6):727–732.
- [234] Pasula, R., Downing, J., Wright, J., Kachel, D., Davis, J., T.E., Martin, W. (1997) Surfactant protein a (SP-a) mediates attachment of mycobacterium tuberculosis to murine alveolar macrophages. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, 17(2):209–217.
- [235] Payne, N., Horwitz, M. (1987) Phagocytosis of legionella pneumophila is mediated by human monocyte complement receptors. *J.Exp.Med.*, 166(5):1377–1389.
- [236] Peterson, P., Gekker, G., Hu, S., Sheng, W., Anderson, W., Ulevitch, R., Tobias, P., Gustafson, K., Molitor, T., Chao, C. (1995) CD14 receptor-mediated uptake of nonopsonized mycobacterium tuberculosis by human microglia. *Infect.Immun.*, 63(4):1598–1602.
- [237] Pfaller, M., Hollis, R., Johnson, W., Massanari, R., Helms, C., Wenzel, R., Hall, N., Moyer, N., Joly, J. (1989) The application of molecular and immunologic techniques to study the epidemiology of legionella pneumophila serogroup 1. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.*, 12(4):295–302.
- [238] Pine, L., Hoffman, P., Malcolm, G., Benson, R., Keen, M. (1984) Determination of catalase, peroxidase, and superoxide dismutase within the genus legionella. *J.Clin.Microbiol.*, 20(3):421–429.
- [239] Piscitelli, S., Danziger, L., Rodvold, K. (1992) Clarithromycin and azithromycin: New macrolide antibiotics. *Clin.Pharm.*, 11(2):137–152.

- [240] Plikaytis, B., Carlone, G., Pau, C., Wilkinson, H. (1987) Purified 60-kilodalton legionella protein antigen with legionella-specific and nonspecific epitopes. *J.Clin.Microbiol.*, 25(11):2080–2084.
- [241] Plouffe, J. (2000) Importance of atypical pathogens of community-acquired pneumonia. *Clin.Infect.Dis.*, 31(Suppl 2):S35–S39.
- [242] Plouffe, J., Schwartz, D., Kolokathis, A., Sherman, B., Arnow, P., Gezon, J., Suh, B., Anzuetto, A., Greenberg, R., Niederman, M., Paladino, J., Ramirez, J., Inverso, J., Knirsch, C. (2000) Clinical efficacy of intravenous followed by oral azithromycin monotherapy in hospitalized patients with community-acquired pneumonia. the azithromycin intravenous clinical trials group. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 44(7):1796–1802.
- [243] Prodinger, W., Bonatti, H., Allerberger, F., Wewalka, G., Harrison, T., Aichberger, C., Dierich, M., Margreiter, R., Tiefenbrunner, F. (1994) Legionella pneumonia in transplant recipients: A cluster of cases of eight years' duration. *J.Hosp.Infect.*, 26(3):191–202.
- [244] Purcell, M., Shuman, H. (1998) The legionella pneumophila icmGCDJBF genes are required for killing of human macrophages. *Infect.Immun.*, 66(5):2245–2255.
- [245] Quagliano, P., Das, N. L. (1993) Legionella pneumonia causing multiple cavitating pulmonary nodules in a 7-month-old infant. *AJR.Am.J.Roentgenol.*, 161(2):367–368.
- [246] Reingold, A., Thomason, B., Brake, B., Thacker, L., Wilkinson, H., Kuritsky, J. (1984) Legionella pneumonia in the united states: The distribution of serogroups and species causing human illness. *J.Infect.Dis.*, 149(5):819.
- [247] Resnick, M., Roguel, N., Bercovier, H., Enk, C., Frankenburg, S., Kedar, E. (1988) Lysis of murine macrophages infected with intracellular pathogens by interleukin 2-activated killer (LAK) cells in vitro. *Cell Immunol.*, 113(1):214–219.
- [248] Retzlaff, C., Yamamoto, Y., Okubo, S., Hoffman, P., Friedman, H., Klein, T. (1996) Legionella pneumophila heat-shock protein-induced increase of interleukin-1 beta mRNA involves protein kinase c signalling in macrophages. *Immunology*, 89(2):281–288.
- [249] Robert-Koch-Institut (1999) Ratgeber infektionskrankheiten, 10. folge: Legionellose. *Epidemiologisches Bulletin.*, 49:369–372.
- [250] Rodgers, F., Greaves, P., Macrae, A., Lewis, M. (1980) Electron microscopic evidence of flagella and pili on legionella pneumophila. *J.Clin.Pathol.*, 33(12):1184–1188.
- [251] Rogers, B., Donowitz, G., Walker, G., Harding, S., Sande, M. (1979) Opportunistic pneumonia: A clinicopathological study of five cases caused by an unidentified acid-fast bacterium. *N.Engl.J.Med.*, 301(18):959–961.
- [252] Roig, J., Aguilar, X., Ruiz, J., Domingo, C., Mesalles, E., Manterola, J., Morera, J. (1991) Comparative study of legionella pneumophila and other nosocomial-acquired pneumonias. *Chest*, 99(2):344–350.
- [253] Ross, G., Cain, J., Lachmann, P. (1985) Membrane complement receptor type three (CR3) has lectin-like properties analogous to bovine conglutinin as functions as a receptor for zymosan and rabbit erythrocytes as well as a receptor for iC3b. *J.Immunol.*, 134(5):3307–3315.

- [254] Rowbotham, T. (1980) Preliminary report on the pathogenicity of legionella pneumophila for freshwater and soil amoebae. *J.Clin.Pathol.*, 33(12):1179–1183.
- [255] Rowbotham, T. (1983) Isolation of legionella pneumophila from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae. *J.Clin.Pathol.*, 36(9):978–986.
- [256] Rowbotham, T. (1986) Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man. *Isr.J.Med.Sci.*, 22(9):678–689.
- [257] Ruckdeschel, G., Ehret, W. (1993) Legionella infection. *Ergeb.Inn.Med.Kinderheilkd.*, 61:207–302.
- [258] Ruf, B., Schurmann, D., Horbach, I., Fehrenbach, F., Pohle, H. (1989) The incidence of legionella pneumonia: A 1-year prospective study in a large community hospital. *Lung*, 167(1):11–22.
- [259] Ruiz, M., Ewig, S., Torres, A., Arancibia, F., Marco, F., Mensa, J., Sanchez, M., Martinez, J. (1999) Severe community-acquired pneumonia. risk factors and follow-up epidemiology. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.*, 160(3):923–929.
- [260] Sahney, N., Lambe, B., Summersgill, J., Miller, R. (1990) Inhibition of polymorphonuclear leukocyte function by legionella pneumophila exoproducts. *Microb.Pathog.*, 9(2):117–125.
- [261] Sahney, N., Summersgill, J., Ramirez, J., Miller, R. (2001) Inhibition of oxidative burst and chemotaxis in human phagocytes by legionella pneumophila zinc metalloprotease. *J.Med.Microbiol.*, 50(6):517–525.
- [262] Sanden, G., Morrill, W., Fields, B., Breiman, R., Barbaree, J. (1992) Incubation of water samples containing amoebae improves detection of legionellae by the culture method. *Appl.Environ.Microbiol.*, 58(6):2001–2004.
- [263] Saunders, N., Harrison, T., Haththotuwa, A., Kachwalla, N., Taylor, A. (1990) A method for typing strains of legionella pneumophila serogroup 1 by analysis of restriction fragment length polymorphisms. *J.Med.Microbiol.*, 31(1):45–55.
- [264] Scheithe, R., Hrboticky, N., Ziegler-Heitbrock, H., Weber, P. (1994) Receptor-specific uptake and degradation of acetylated, oxidized and native LDL in the human monocytic mono mac 6sr cell line. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 202(1):334–339.
- [265] Scherer, W., Syverton, J., Gey, G. (1953) Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.*, 97:695–715.
- [266] Schlanger, G., Lutwick, L., Kurzman, M., Hoch, B., Chandler, F. (1984) Sinusitis caused by legionella pneumophila in a patient with the acquired immune deficiency syndrome. *Am.J.Med.*, 77(5):957–960.
- [267] Schlesinger, L. (1993) Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of mycobacterium tuberculosis is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J.Immunol.*, 150(7):2920–2930.
- [268] Schlesinger, L., Hull, S., Kaufman, T. (1994) Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of mycobacterium tuberculosis to human macrophages. *J.Immunol.*, 152(8):4070–4079.

- [269] Schneider, U., Schwenk, H., Bornkamm, G. (1977) Characterization of EBV-genome negative nulländ tcell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-hodgkin lymphoma. *Int.J.Cancer*, 19(5):621–626.
- [270] Schoonmaker, D., Heimberger, T., Birkhead, G. (1992) Comparison of ribotyping and restriction enzyme analysis using pulsed-field gel electrophoresis for distinguishing legionella pneumophila isolates obtained during a nosocomial outbreak. *J.Clin.Microbiol.*, 30(6):1491–1498.
- [271] Segal, G., Shuman, H. (1997) Characterization of a new region required for macrophage killing by legionella pneumophila. *Infect.Immun.*, 65(12):5057–5066.
- [272] Shah, A., Check, F., Baskin, S., Reyman, T., Menard, R. (1992) Legionnaires' disease and acute renal failure: Case report and review. *Clin.Infect.Dis.*, 14(1):204–207.
- [273] Skogberg, K., Ruutu, P., Koivula, I., Jousimies-Somer, H., Valtonen, V. (1994) Effect of immunosuppressive therapy on the clinical presentation of legionellosis. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.*, 13(7):535–541.
- [274] Smith-Somerville, H., Huryn, V., Walker, C., Winters, A. (1991) Survival of legionella pneumophila in the cold-water ciliate tetrahymena vorax. *Appl.Environ.Microbiol.*, 57(9):2742–2749.
- [275] Spitalny, K., Vogt, R., Orciari, L., Witherell, L., Etkind, P., Novick, L. (1984) Pontiac fever associated with a whirlpool spa. *Am.J.Epidemiol.*, 120(6):809–817.
- [276] Stampler, D., Edelstein, M., Edelstein, P. (1994) Azithromycin pharmacokinetics and intracellular concentrations in legionella pneumophila-infected and uninfected guinea pigs and their alveolar macrophages. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 38(2):217–222.
- [277] Steele, T., McLennan, A. (1996) Infection of tetrahymena pyriformis by legionella longbeachae and other legionella species found in potting mixes. *Appl.Environ.Microbiol.*, 62(3):1081–1083.
- [278] Stokes, R., Haidl, I., Jefferies, W., Speert, D. (1993) Mycobacteria-macrophage interactions. macrophage phenotype determines the nonopsonic binding of mycobacterium tuberculosis to murine macrophages. *J.Immunol.*, 151(12):7067–7076.
- [279] Stokes, R., Thorson, L., Speert, D. (1998) Nonopsonic and opsonic association of mycobacterium tuberculosis with resident alveolar macrophages is inefficient. *J.Immunol.*, 160(11):5514–5521.
- [280] Stone, B., Abu, K. Y. (1998) Expression of multiple pili by legionella pneumophila: Identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infect.Immun.*, 66(4):1768–1775.
- [281] Stout, J., Joly, J., Para, M., Plouffe, J., Ciesielski, C., Blaser, M., Yu, V. (1988) Comparison of molecular methods for subtyping patients and epidemiologically linked environmental isolates of legionella pneumophila. *J.Infect.Dis.*, 157(3):486–495.
- [282] Stout, J., Yu, V. (1997) Legionellosis. *N.Engl.J.Med.*, 337(10):682–687.
- [283] Sturgill-Koszycki, S., Swanson, M. (2000) Legionella pneumophila replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. *J.Exp.Med.*, 192(9):1261–1272.
- [284] Susa, M., Hacker, J., Marre, R. (1996) De novo synthesis of legionella pneumophila antigens during intracellular growth in phagocytic cells. *Infect.Immun.*, 64(5):1679–1684.

- [285] Swanson, D., Sung, R., Fine, M., Orloff, J., Chu, S., Yu, V. (1992) Erythromycin ototoxicity: Prospective assessment with serum concentrations and audiograms in a study of patients with pneumonia. *Am.J.Med.*, 92(1):61–68.
- [286] Swanson, M., Hammer, B. (2000) Legionella pneumophila pathogenesis: A fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu.Rev.Microbiol.*, 54:567–613.
- [287] Tenner, A., Cooper, N. (1980) Analysis of receptor-mediated c1q binding to human peripheral blood mononuclear cells. *J.Immunol.*, 125(4):1658–1664.
- [288] Thornton, B., Vetvicka, V., Pitman, M., Goldman, R., Ross, G. (1996) Analysis of the sugar specificity and molecular location of the beta-glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *J.Immunol.*, 156(3):1235–1246.
- [289] Tompkins, L., Roessler, B., Redd, S., Markowitz, L., Cohen, M. (1988) Legionella prosthetic-valve endocarditis. *N.Engl.J.Med.*, 318(9):530–535.
- [290] Tompkins, L., Troup, N., Woods, T., Bibb, W., McKinney, R. (1987) Molecular epidemiology of legionella species by restriction endonuclease and alloenzyme analysis. *J.Clin.Microbiol.*, 25(10):1875–1880.
- [291] Tully, M. (1991) A plasmid from a virulent strain of legionella pneumophila is conjugative and confers resistance to ultraviolet light. *FEMS Microbiol.Lett.*, 69(1):43–48.
- [292] Tyndall, R., Domingue, E. (1982) Cocultivation of legionella pneumophila and free-living amoebae. *Appl.Environ.Microbiol.*, 44(4):954–959.
- [293] Van, B. A., Struelens, M., Quint, W. (1993) Typing of legionella pneumophila strains by polymerase chain reaction-mediated DNA fingerprinting. *J.Clin.Microbiol.*, 31(8):2198–2200.
- [294] Van, K. R., de, W. B. (1989) Genetic typing in a cluster of legionella pneumophila infections. *J.Clin.Microbiol.*, 27(5):1105–1107.
- [295] Vandenesch, F., Surgot, M., Bornstein, N., Paucod, J., Marmet, D., Isoard, P., Fleurette, J. (1990) Relationship between free amoeba and legionella: Studies in vitro and in vivo. *Zentralbl.Bakteriol.*, 272(3):265–275.
- [296] Venezia, R., Agresta, M., Hanley, E., Urquhart, K., Schoonmaker, D. (1994) Nosocomial legionellosis associated with aspiration of nasogastric feedings diluted in tap water. *Infect.Control.Hosp.Epidemiol.*, 15(8):529–533.
- [297] Venkataraman, C., Haack, B., Bondada, S., Abu, K. Y. (1997) Identification of a Gal/GalNAc lectin in the protozoan hartmannella vermiformis as a potential receptor for attachment and invasion by the legionnaires' disease bacterium. *J.Exp.Med.*, 186(4):537–547.
- [298] Verbrugh, H., Lee, D., Elliott, G., Keane, W., Hoidal, J., Peterson, P. (1985) Opsonization of legionella pneumophila in human serum: Key roles for specific antibodies and the classical complement pathway. *Immunology*, 54(4):643–653.
- [299] Vogel, J., Andrews, H., Wong, S., Isberg, R. (1998) Conjugative transfer by the virulence system of legionella pneumophila. *Science*, 279(5352):873–876.
- [300] Waanders, H., Dik, H., Meinders, A. (1991) Legionella pneumonia complicated by adult respiratory distress syndrome. *Neth.J.Med.*, 38(3-4):159–166.

- [301] Wadowsky, R., Butler, L., Cook, M., Verma, S., Paul, M., Fields, B., Keleti, G., Sykora, J., Yee, R. (1988) Growth-supporting activity for legionella pneumophila in tap water cultures and implication of hartmannellid amoebae as growth factors. *Appl.Environ.Microbiol.*, 54(11):2677–2682.
- [302] Wadowsky, R., Wolford, R., McNamara, A., Yee, R. (1985) Effect of temperature, pH, and oxygen level on the multiplication of naturally occurring legionella pneumophila in potable water. *Appl.Environ.Microbiol.*, 49(5):1197–1205.
- [303] Waldor, M., Wilson, B., Swartz, M. (1993) Cellulitis caused by legionella pneumophila. *Clin.Infect.Dis.*, 16(1):51–53.
- [304] Washington, J., Wilson, W. (1985) Erythromycin: A microbial and clinical perspective after 30 years of clinical use (1). *Mayo Clin Proc*, 60(3):189–203.
- [305] Washington, J., Wilson, W. (1985) Erythromycin: A microbial and clinical perspective after 30 years of clinical use (2). *Mayo Clin Proc*, 60(4):271–278.
- [306] Waterer, G., Baselski, V., Wunderink, R. (2001) Legionella and community-acquired pneumonia: A review of current diagnostic tests from a clinician's viewpoint. *Am.J.Med.*, 110(1):41–48.
- [307] Weinbaum, D., Bailey, J., Benner, R., Pasculle, A., Dowling, J. (1983) The contribution of human neutrophils and serum to host defense against legionella micdadei. *J.Infect.Dis.*, 148(3):510–517.
- [308] Weir, S., Fischer, S., Stock, F., Gill, V. (1998) Detection of legionella by PCR in respiratory specimens using a commercially available kit. *Am.J.Clin.Pathol.*, 110(3):295–300.
- [309] Weisse, A. (1992) A plague in philadelphia. the story of legionnaires' disease. *Hosp.Pract.(Off.Ed.)*, 27(6):151–158.
- [310] Westblom, T., Hamory, B. (1988) Acute pancreatitis caused by legionella pneumophila. *South.Med.J.*, 81(9):1200–1201.
- [311] Wilson, J., Tedder, T., Fearon, D. (1983) Characterization of human t lymphocytes that express the c3b receptor. *J.Immunol.*, 131(2):684–689.
- [312] Wilson, M., Pearson, R. (1988) Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of leishmania donovani by human mononuclear phagocytes. *Infect.Immun.*, 56(2):363–369.
- [313] Winn, J., W.C. (1988) Legionnaires disease: Historical perspective. *Clin.Microbiol.Rev.*, 1(1):60–81.
- [314] Winn, J., W.C. (1993) Legionella and the clinical microbiologist. *Infect.Dis.Clin.North Am.*, 7(2):377–392.
- [315] Winn, J., W.C., Myerowitz, R. (1981) The pathology of the legionella pneumonias. a review of 74 cases and the literature. *Hum.Pathol.*, 12(5):401–422.
- [316] Womack, S., Liang, K., Ilagan, N., Weyhing, B., Planas, A. (1992) Legionella pneumophila in a preterm infant. a case report. *J.Perinatol.*, 12(3):303–305.
- [317] Wong, K., Moss, C., Hochstein, D., Arko, R., Schalla, W. (1979) Endotoxicity of the legionnaires' disease bacterium. *Ann.Intern.Med.*, 90(4):624–627.

- [318] Wright, J., Athar, M., Van, J., Olm T.M. Wootliff, Costerton, J. (1989) Atypical legionellosis: Isolation of legionella pneumophila serogroup 1 from a patient with aspiration pneumonia. *J.Hosp.Infect.*, 13(2):187–190.
- [319] Wright, J., Ruseska, I., Costerton, J. (1991) Decreased biocide susceptibility of adherent legionella pneumophila. *J. Appl. Bacteriol.*, 71:531–538.
- [320] Wright, S., Silverstein, S. (1983) Receptors for c3b and c3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *J.Exp.Med.*, 158(6):2016–2023.
- [321] Xia, Y., Vetvicka, V., Yan, J., Hanikyrova, M., Mayadas, T., Ross, G. (1999) The beta-glucan-binding lectin site of mouse CR3 (CD11b/CD18) and its function in generating a primed state of the receptor that mediates cytotoxic activation in response to iC3b-opsinized target cells. *J.Immunol.*, 162(4):2281–2290.
- [322] Yamamoto, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T. (1993) Comparison of detection methods for legionella species in environmental water by colony isolation, fluorescent antibody staining, and polymerase chain reaction. *Microbiol.Immunol.*, 37(8):617–622.
- [323] Yamamoto, Y., Klein, T., Shinomiya, H., Nakano, M., Friedman, H. (1992) Infection of macrophages with legionella pneumophila induces phosphorylation of a 76-kilodalton protein. *Infect.Immun.*, 60(8):3452–3455.
- [324] Yu, V. (1993) Could aspiration be the major mode of transmission for legionella? *Am.J.Med.*, 95(1):13–15.
- [325] Yu, V., Beam, J., T.R., Lumish, R., Vickers, R., Fleming, J., McDermott, C., Romano, J. (1987) Routine culturing for legionella in the hospital environment may be a good idea: A three-hospital prospective study. *Am.J.Med.Sci.*, 294(2):97–99.
- [326] Yu, V., Kroboth, F., Shonnard, J., Brown, A., McDearman, S., Magnussen, M. (1982) Legionnaires' disease: New clinical perspective from a prospective pneumonia. *Am.J.Med.*, 73(3):357–361.
- [327] Zahringer, U., Knirel, Y., Lindner, B., Helbig, J., Sonesson, A., Marre, R., Rietschel, E. (1995) The lipopolysaccharide of legionella pneumophila serogroup 1 (strain philadelphia 1): Chemical structure and biological significance. *Prog.Clin.Biol.Res.*, 392:113–139.
- [328] Ziegler-Heitbrock, H., Thiel, E., Futterer, A., Herzog, V., Wirtz, A., Riethmuller, G. (1988) Establishment of a human cell line (mono mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int.J.Cancer*, 41(3):456–461.

Abkürzungsverzeichnis

ACES N-2-Acetamido-2-Aminoethansulfonsäure

AIDS (engl.) Acquired immunodeficiency syndrome - Erworbenes Immunschwächesyndrom

ARDS (engl.) Adult respiratory distress syndrome - Atemnotsyndrom des Erwachsenen

ATCC (engl.) American type culture collection - Amerikanische Organisation, die Zellkulturen, Bakterien, Viren usw. kultiviert und vertreibt

BCYE (engl.) Buffered charcoal yeast extract - Gepufferter Aktivkohle-Hefe-Extrakt

BSA Bovines Serumalbumin

CD (engl.) Cluster of differentiation - Oberflächendifferenzierungsmarker

CDC (engl.) Centers for disease control and prevention in Atlanta, Georgia, USA

CFU (engl.) Colony forming units - Kolonie-bildende Einheiten

CR (engl.) Complement receptor - Komplementrezeptor

DIC (engl.) Disseminated intravascular coagulation - Disseminierte intravasale Gerinnung

dot (engl.) Defect in organelle trafficking - Genlokus, dessen Fehlen einen Defekt in der Attraktion von Organellen zum Legionellenphagosom verursacht

DTAF 5-(4,6-Dichlorotriazinyl)-Aminofluorescein

FACS Fluorescence activated cell sorting - Zellsortierung mit Hilfe der Durchflusszytometrie

FcR Fc-Rezeptor

FITC Fluoresceinisothiocyanat

g Gravitationskonstante $g = 9,81 \frac{m}{s^2}$

GPI-Anker Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker

Hsp Hitzeschockprotein

ICAM (engl.) Intercellular adhesion molecule - Interzelluläres Adhäsionsmolekül

icm (engl.) Intracellular multiplication locus - Genlokus für die intrazelluläre Vermehrung von Legionellen

Ig Immunglobulin

IL-x Interleukin-x (x = 1-21)

LAMP-1 (engl.) Lysosome associated membrane glycoprotein 1 - Lysosomen-assoziiertes Membranglykoprotein 1

LBP Lipopolysaccharid-bindendes Protein

LPS Lipopolysaccharid

MIN (engl.) Macrophage induced proteins - Proteine, die während der intrazellulären Bakterienvermehrung von Makrophagen vermehrt exprimiert werden

mip (engl.) Macrophage infectivity potentiator - Genlokus, dessen Expression die Infektiosität der intrazellulären Bakterien und ihre Vermehrung in einem frühen Stadium nach der Phagozytose erhöht.

MM6 Mono Mac 6

MOMP (engl.) Major outer membrane protein - Hauptoberflächenprotein

MR Mannoserezeptor

mRNA (engl.) messenger ribonucleic acid - Boten-Ribonukleinsäure

PBS Phosphate buffered saline - Phosphat-gepufferte Salzlösung

PCR (engl.) Polymerase chain reaction - Polymerase-Ketten-Reaktion

PE Phycoerythrin

RAPD (engl.) Random Amplified Polymorphic DNA - Zufällig vervielfältigte polymorphe DNA

Sg Serogruppe

SP-X Surfactant Protein A, B, C oder D

tDNA-ILP (engl.) transferDNA-intergenic length polymorphism - Untersucht Längenpolymorphismen von mit Hilfe der PCR amplifizierten Abschnitten zwischen tDNA-Genen

Danksagung

Bedanken möchte ich mich ganz herzlich bei...

...**Frau PD Dr. med. B. Neumeister** für die Überlassung des Themas und die hervorragende, engagierte Betreuung bei der Durchführung und Erstellung der Arbeit.

...**Marion Faigle** für die ausgezeichnete Betreuung vor Ort im Labor, die hilfreichen Ratschläge und Diskussionen, die tatkräftige Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre, die diese Dissertation erst ermöglicht haben.

...**Dipl.-Biol. Anke Bittkau, Dipl.-Biol. Jennifer von der Fecht, Dipl.-Biol. Sascha Kristian**, durch deren vielseitige kollegiale fachliche und tatkräftige Unterstützung die Laborarbeit für mich zu einer unvergessenen Zeit wurde.

...meiner Freundin **Gisa Rathke** für die lebenswerte Unterstützung in jeder Lebenslage, insbesondere aber auch in fachlichen Dingen und bei den alltäglichen Kleinigkeiten, die für das Erstellen dieser Arbeit so wichtig waren.

...**meinen Eltern** für die Ermöglichung der Ausbildung.

...und schließlich all denen, die direkt oder indirekt am Gelingen der Arbeit beteiligt waren, aber in Danksagungen regelmäßig nicht namentlich genannt werden!

Lebenslauf

Zur Person

Name	Patrick Weißgerber
Geburtsdatum und -ort	04. Juli 1974 in Sulz am Neckar
Eltern	Ella Maria Weißgerber, geb. Hartmann (*1952) Wieland Gerhard Weißgerber (*1952)
Geschwister	Mike Oliver Weißgerber (*1975)

Ausbildung

1981–1983	Grundschule in Horb am Neckar - Dettingen
1983–1985	Vogt-Hess-Grundschule Herrenberg
1985–1994	Andrae-Gymnasium Herrenberg
1994	Allgemeine Hochschulreife
1994–1995	Studium der Zahnmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
1995–1996	Zivildienst im Pflegedienst der Universitäts-Kinderklinik, Abt. Neonatologie
1996–2003	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
August 1998	Ärztliche Vorprüfung
August 1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08.05.2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung