

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene  
der Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar  
(Direktor : Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. H. Wagner, Ph. D. (Melbourne))

**Apoptoseinduktion durch *Legionella pneumophila*  
in menschlichen Zellen:**  
Charakterisierung des molekularen Ablaufs und  
Zusammenhang zwischen Invasion und Apoptoseinduktion

**Catharina Müller-Thomas**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
**Doktors der Medizin**  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender : Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation :

1. Univ.-Prof. Dr. G. A. Häcker
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. H. Wagner, Ph. D. (Melbourne)

Die Dissertation wurde am 26.01.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 05.05.2004 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>1.1. <i>Legionella pneumophila</i> – der Erreger der Legionellose</b>	<b>7</b>
1.1.1. Charakterisierung der Legionellen	7
1.1.2. Legionellose – Klinik und Therapie	8
1.1.3. Überblick über die Epidemiologie der Legionellose in Deutschland	8
1.1.4. Apoptoseinduktion durch <i>Legionella pneumophila</i>	9
<b>1.2. Apoptose – das Selbstmordprogramm der Zelle</b>	<b>10</b>
1.2.1. Die Bedeutung der Apoptose	10
1.2.2. Morphologische Charakteristika der apoptotischen Zelle	11
1.2.3. Caspasen – die Vollstrecker der Apoptose	11
1.2.4. Der Todesrezeptor-vermittelte Signalweg der Caspasenaktivierung	13
1.2.5. Der mitochondriale Signalweg der Caspasenaktivierung	16
1.2.6. Verbindungen zwischen dem Todesrezeptor-vermittelten Signalweg und dem mitochondrialen Signalweg der Caspasenaktivierung	16
1.2.7. Die Bcl-2-Proteinfamilie	17
<b>1.3. Fragestellung</b>	<b>18</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>19</b>
<b>2.1. Material</b>	<b>19</b>
2.1.1. Chemikalien und Enzyme	19
2.1.2. Antikörper	21
2.1.3. Zelllinien und Legionellenstämme	21
2.1.4. Kulturmedien	22
2.1.5. Lösungen	24
2.1.6. Geräte	26
2.1.7. Sonstige Materialien	27
<b>2.2. Methoden</b>	<b>28</b>
2.2.1. Kultur von humanen und murinen Zellen	28
2.2.2. Legionellenkultur	28

2.2.3.	Herstellung von Versuchsansätzen aus humanen und murinen Zellen	28
2.2.4.	Bestimmung der Anzahl von Legionellen in Suspensionen	30
2.2.5.	Inkubation von humanen und murinen Zellen mit Legionellen	31
2.2.6.	Zellfixierung	31
2.2.7.	Herstellung von Zelllysaten	31
2.2.8.	Zellfärbungen und durchflusszytometrische Messung	32
2.2.9.	Western-Blotting	38
2.2.10.	Affinitätsblotting	40
2.2.11.	Messung enzymatischer Aktivität	40
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
<b>3.1.</b>	<b>Induktion von Apoptose durch <i>Legionella pneumophila</i> in verschiedenen Zelllinien</b>	<b>42</b>
3.1.1.	<i>Legionella pneumophila</i> induziert Apoptose in U937-Zellen	42
3.1.2.	<i>Legionella pneumophila</i> induziert Apoptose in HL-60-Zellen	47
3.1.3.	<i>Legionella pneumophila</i> induziert Apoptose in Jurkat-Zellen	49
3.1.4.	<i>Legionella pneumophila</i> induziert Apoptose in primären humanen mononukleären Zellen	56
<b>3.2.</b>	<b>Analyse der Aktivierung des Apoptosewegs durch <i>Legionella pneumophila</i></b>	<b>58</b>
3.2.1.	Aktivierung von Effektorcaspasen	58
3.2.2.	Aktivierung von Caspase-3	62
3.2.3.	Aktivierung von Caspase-9	65
3.2.4.	Bcl-2 schützt Wirtszellen vor Apoptoseinduktion durch <i>Legionella pneumophila</i>	67
3.2.5.	Aktivierung von Caspase-8	68
3.2.6.	<i>Legionella pneumophila</i> induziert Apoptose in FADD-defizienten Jurkat-Zellen	70
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>72</b>
<b>4.1.</b>	<b><i>Legionella pneumophila</i> induziert Apoptose in verschiedenen Zelllinien</b>	<b>72</b>
<b>4.2.</b>	<b>Mechanismus der Apoptoseinduktion durch <i>Legionella pneumophila</i></b>	<b>74</b>
4.2.1.	Die Bedeutung des Dot/Icm-TypIV-Sekretionssystems	74
4.2.2.	Nach Infektion von Jurkat-T-Zellen und myeloiden U937-Zellen mit <i>Legionella pneumophila</i> kommt es zur Aktivierung von Caspase-3	75

4.2.3. Nach Infektion von Jurkat-T-Zellen und myeloiden U937-Zellen mit <i>Legionella pneumophila</i> kommt es zur Aktivierung von Caspase-9	76
4.2.4. Nach Infektion von Jurkat-T-Zellen und myeloiden U937-Zellen mit <i>Legionella pneumophila</i> kommt es zur Aktivierung von Caspase-8	77
4.2.5. Weitere Signalwege, die bei der Apoptoseinduktion durch <i>Legionella pneumophila</i> eine Rolle spielen könnten	78
4.2.6. Modell der Apoptoseinduktion durch <i>Legionella pneumophila</i>	79
<b>4.3. <i>Legionella pneumophila</i> oder Wirtszelle – wer profitiert von der Apoptose ?</b>	<b>81</b>
<b>4.4. Legionelleninfektion von Protozoen und Säugetierzellen – Unterschiede und Gemeinsamkeiten</b>	<b>81</b>
<b>4.5. <i>Legionella micdadei</i> induziert keine Apoptose in seinen Wirtszellen</b>	<b>84</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>85</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>86</b>
<b>Danksagung</b>	<b>96</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>97</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIF	apoptosis inducing factor
AILP	apoptoseinduzierendes Legionellenprotein
Apaf-1	apoptotic protease-activating factor-1
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BCYE $\alpha$	buffered charcoal yeast extract (with) $\alpha$ -ketoglutarate
BH	Bcl-2 homology domain
CAD	caspase-activated deoxyribonuclease
CARD	caspase recruitment domain
CD	cluster of differentiation
c-FLIP	cellular FLICE-inhibitory protein
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DD	death domain
DED	death effector domain
DIABLO	direct IAP binding protein with low PI
DISC	death-inducing signaling complex
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dot	defect in organelle trafficking
DR	death receptor
FADD	Fas-associated death domain
FasL	Fas-Ligand
FSC	forward scatter
Genta	Gentamicin
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
IAP	inhibitor of apoptosis proteins
ICAD	inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease
icm	intracellular multiplication
IRAK	interleukin-1 receptor associated kinase
<i>L.mic.</i>	<i>Legionella micdadei</i>
<i>L.pn.</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
LPS	Lipopolysaccharid

---

Lsg.	Lösung
McF	Mc Farland
MDM2	mouse double minute 2 homolog
mil	macrophage infectivity loci
Min.	Minuten
MyD88	myeloider Differenzierungsfaktor 88
NF- $\kappa$ B	nukleärer Faktor $\kappa$ B
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBMCs	peripheral blood monocytic cells
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
pil	prepilin peptidase
pmi	protozoan and macrophage infectivity
RIP	receptor-interacting protein
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
Sg	Serogruppe
Smac	second mitochondria-derived activator of caspase
SSC	side scatter
tBid	truncated Bid
TICAM-1	TIR-containing adaptor molecule-1
TIR	Toll/interleukin-1 receptor homology region
TLR	Toll-like receptor
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-1
TRADD	TNF receptor-associated death domain
TRAF2	TNF receptor-associated factor-2
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAIL-R	TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor
TRAMP	TNF receptor-related apoptosis mediating protein
TRIF	TIR domain-containing adapter inducing INF- $\beta$

# 1. Einleitung

In vorliegender Arbeit wird der molekulare Ablauf der Apoptoseinduktion durch *Legionella pneumophila* charakterisiert.

Zunächst wird in Folgendem das Bakterium *Legionella pneumophila* vorgestellt und ein Überblick über die Klinik und Epidemiologie der Legionellose gegeben. Danach wird der molekulare Ablauf der Apoptose skizziert.

## 1.1. *Legionella pneumophila* – der Erreger der Legionellose

### 1.1.1. Charakterisierung der Legionellen

Die Familie der *Legionellaceae* enthält als einzige Gattung das Genus *Legionella*. Gegenwärtig sind ungefähr 50 Spezies mit mehr als 70 Serogruppen bekannt. Für die überwiegende Zahl der humanen Legionellosen ist die Art *Legionella pneumophila* verantwortlich, die zur Zeit in 16 Serogruppen unterteilt werden kann.

Legionellen sind weit verbreitete Umweltkeime. Ihr natürliches Habitat sind Feuchtbiotope, wo sie sich in Amöben und anderen Einzellern vermehren. In natürlichen Gewässern kommen Legionellen nur in geringen Mengen vor; hingegen finden sie in künstlichen, vom Menschen geschaffenen Wassersystemen bei Temperaturen zwischen 25°C und 50°C günstige Wachstumsbedingungen. Vorrangige Infektionsquellen sind Leitungssysteme zur Warmwasserverteilung, wie Duschen oder Sprudlbäder und Kühltürme von Lüftungstechnischen Anlagen. Die entscheidenden Faktoren sind die Temperatur des Wassers, seine Verweildauer im Leitungssystem – beide Faktoren beeinflussen die Vermehrung der Legionellen – und das Entstehen von Aerosolen, über die die Infektion verbreitet wird.

Bis 1976 waren die Legionellen nicht bekannt. In jenem Jahr kam es während eines Kongresses amerikanischer Kriegsveteranen in einem Hotel in Philadelphia zu einer Epidemie mit einem unbekanntem Erreger. 34 der 221 infizierten Veteranen erlagen ihrer Erkrankung. Es dauerte einige Zeit bis ein Bakterium als Erreger ausfindig gemacht werden konnte; es erhielt den Namen „*Legionella*“ in Gedenken an die erkrankten „Legionäre“.

*Legionella pneumophila* ist ein 0,3 – 1 µm dickes und 2 – 20 µm langes Stäbchen. Aufgrund des Zellwandaufbaus gehört es zu den gramnegativen Bakterien. Allerdings lässt sich *Legionella pneumophila* in der Gramfärbung nur sehr schlecht anfärben. Die optische Darstellung gelingt mit der direkten Immunfluoreszenz.

Das aerobe Bakterium lässt sich in Spezialmedien (z. Bsp. MWY-Selektivnährböden) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> anzüchten.

### **1.1.2. Legionellose – Klinik und Therapie**

Bei der Legionellose handelt es sich um eine Atemwegserkrankung, die durch Legionellen hervorgerufen wird. Zwei Erkrankungsformen werden unterschieden :

Legionärskrankheit: Nach einer Inkubationszeit von zwei bis zehn Tagen kommt es zu einer multifokalen, nekrotisierenden Pneumonie. Besonders gefährdet sind immunsupprimierte Menschen, Personen mit chronischen Lungenerkrankungen sowie ältere Menschen mit Grunderkrankungen wie Diabetes mellitus oder Herzinsuffizienz. Je nach gesundheitlicher Konstitution beträgt die Letalität bis zu 15 %.

Pontiac Fieber: Nach einer kurzen Inkubationszeit von ein bis zwei Tagen kommt es zu einem Influenza-ähnlichen Krankheitsbild mit Fieber, Husten und Muskelschmerzen.

Die Ansteckung erfolgt durch Inhalation keimhaltiger Aerosole. Eine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch gibt es nicht.

Zum Nachweis einer Legionelleninfektion stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Die Methode der ersten Wahl ist die Isolierung der Legionellen mittels Kultur aus Sekreten des tiefen Respirationstrakts. Dabei kann die Legionellenspezies bestimmt werden. Außerdem bietet die Kultur den Vorteil, dass bei der Abklärung möglicher Infektionsquellen der Legionellenstamm des Patienten mit dem Legionellenstamm aus der Umwelt verglichen werden kann. In der überwiegenden Zahl der Fälle erfolgt der Legionellennachweis jedoch durch den Antigennachweis im Urin oder den Antikörpernachweis im Serum.

In der Therapie der Legionellose werden als Mittel der ersten Wahl Makrolid-Antibiotika eingesetzt. Fluorchinolone der Gruppe 3/4 gelten als Mittel der Reserve.

### **1.1.3. Überblick über die Epidemiologie der Legionellose in Deutschland**

Bis zur 45. Woche des Jahres 2003 wurden dem Robert-Koch-Institut 327 Fälle von Legionellose gemeldet; im Jahr 2002 waren es insgesamt 413 Fälle. Für das Jahr 2002 entspricht dies bundesweit einer Inzidenz von 0,5 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner. Diese Zahlen sind jedoch zu niedrig angesiedelt. Aufgrund der Ergebnisse verschiedener Studien wird davon ausgegangen, dass 3,4 % bis 7 % der ambulant erworbenen Pneumonien auf die Legionärskrankheit zurückzuführen sind, was in Deutschland mindestens 6000 Fällen pro Jahr entsprechen dürfte. Die hohe Untererfassung lässt sich dadurch erklären, dass nicht alle Legionellosen erkannt werden und dass bei Pneumonien zu selten eine spezifische Erregerdiagnostik durchgeführt wird.

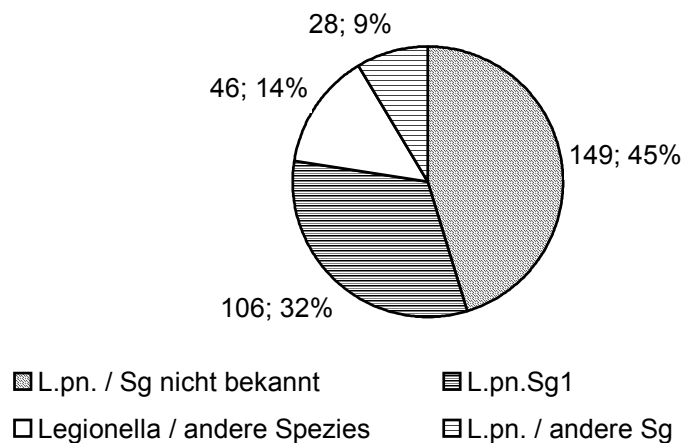


Im Jahr 2002 befanden sich 326 (78,9 %) der 413 Erkrankten in stationärer Behandlung. Bei 288 (69,7 %) Patienten wurde eine Pneumonie festgestellt, an der 28 Patienten starben. Das entspricht einer Letalität von 9,7 %.

Das Durchschnittsalter der Erkrankten lag bei 56,3 Jahren (Median 57 Jahre, Spannweite 2 – 92 Jahre). Männer (n = 263) erkrankten etwa doppelt so häufig wie Frauen (n = 150).

Von den 413 gemeldeten Fällen lagen bei 329 (79,7 %) Angaben zum Erreger vor (siehe Abb. 1) :

- 283 Erkrankungen (86 %) wurden durch *Legionella pneumophila* verursacht. Davon konnte bei 106 (32,2 %) die Serogruppe 1 identifiziert werden. ; bei 149 (45,3 %) Fällen wurde die Serogruppe nicht bestimmt.
- 46 (14%) Erkrankungen konnten auf andere Legionellenspezies zurückgeführt werden.



**Abb. 1 :** Gemeldete Legionellosen in Deutschland im Jahr 2002. Dargestellt ist die Verteilung der einzelnen Erregerspezies und Serogruppen (Sg ; Robert-Koch-Institut, 2003a/b, siehe 6./91 und 92).

Insgesamt darf die Gefahr von Legionellosen gerade für immunsupprimierte Patienten oder Patienten mit Grunderkrankungen nicht unterschätzt werden. Da Legionelleninfektionen ausschließlich aus der Umwelt erfolgen, ist es für eine effektive Prävention wichtig, den Infektionsweg aufzuklären und die Infektionsquelle zu sanieren.

#### 1.1.4. Apoptoseinduktion durch *Legionella pneumophila*

Bei der Aufklärung des Pathomechanismus von Legionelleninfektionen wurde festgestellt, dass *Legionella pneumophila* in seinen Wirtszellen (Alveolarepithelzellen, Makrophagen, primäre Blutmonozyten) Apoptose induzieren kann (Walz *et al.*, 2000 ; Gao & Abu Kwaik, 1999a ; Hägele *et al.*, 1998 ; Müller *et al.*, 1996).

---

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den molekularen Ablauf der Apoptoseinduktion zu charakterisieren.

Im Hinblick darauf werden zunächst die Grundlagen der Apoptose dargestellt.

## **1.2. Apoptose – das Selbstmordprogramm der Zelle**

Der Begriff „Apoptose“ stammt aus dem Griechischen und kann mit „Abfallen“ – im weiteren Sinn mit „Abfallen der Blätter (im Herbst)“ – übersetzt werden. 1972 haben Kerr *et al.* „Apoptose“ als Namen für eine Form des physiologischen Zelltods vorgeschlagen, die durch typische morphologische Erscheinungen der Zelle charakterisiert ist (siehe 1.2.2.).

### **1.2.1. Die Bedeutung der Apoptose**

In vielzelligen Organismen spielt der physiologische Zelltod eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellhomöostase und bei der Abwehr schädlicher und potentiell schädlicher Zellen (Vaux & Strasser, 1996).

Beispiele dafür lassen sich anhand des Immunsystems aufzeigen :

Stimulierte und proliferierende Lymphozyten werden nach erfolgreicher Eliminierung des Pathogens durch Apoptose beseitigt (Nagata, 1997).

Bei der T-Zellreifung im Thymus werden autoreaktive T-Zellen durch Apoptose eliminiert (Rathmell & Thompson, 2002). Diese negative Selektion ist unabdingbar für die Entwicklung der Selbsttoleranz.

Eine weitere wichtige Funktion erfüllt der programmierte Zelltod bei der Embryonalentwicklung. Überschüssig angelegtes Gewebe, wie beispielsweise die zu den phylogenetischen Überresten gehörenden „Schwimmhäute“ zwischen den Fingern und Zehen des menschlichen Embryos, geht durch Apoptose zugrunde.

Welch große Bedeutung die Apoptose für die Wahrung der Integrität eines vielzelligen Organismus hat, zeigt sich deutlich bei Regulationsstörungen des physiologischen Zelltods (Thompson, 1995): Gendefekte, die eine Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli bewirken, führen zur Akkumulation von Zellen. In der Folge können Krebs- oder Autoimmunerkrankungen entstehen. Eine übersteigerte Apoptoserate dagegen verursacht u.a. neurodegenerative Erkrankungen (z.B. Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson) oder myelodysplastische Syndrome (z.B. aplastische Anämie).

Viele mikrobielle Pathogene – Bakterien, Viren, Protozoen – können in die Apoptosesteuerung ihrer Wirtszellen eingreifen (Gao & Abu Kwaik, 2000a ; Roulston *et al.*, 1999 ; Luder *et al.*, 2001). Das geschieht entweder durch Hemmung oder durch Induktion des

programmierten Zelltods. Bei den Bakterien kann beispielsweise *Chlamydia pneumoniae* Apoptose inhibieren (Fischer *et al.*, 2001), während *Legionella pneumophila* – wie bereits erwähnt – Apoptose induzieren kann (Gao & Abu Kwaik, 1999a/b ; Müller *et al.*, 1996).

Es ist wichtig, die Regulation und den Ablauf der Apoptose aufzuklären, um kausale Therapien für oben genannte Krankheiten zu entwickeln.

### **1.2.2. Morphologische Charakteristika der apoptotischen Zelle**

Apoptotische Zellen sind durch folgende morphologische Erscheinungen charakterisiert (Kerr *et al.*, 1972) :

Das Kernchromatin verklumpt entlang der Kernmembran (Kernmembranhyperchromatose). Der Zellkern schrumpft (Karyopyknose) und zerfällt in zahlreiche Fragmente. Die Zelle löst sich aus dem Zellverband und schrumpft ebenfalls. Auf der Zelloberfläche bilden sich Ausstülpungen, die Zytoplasma, Zellorganelle oder Kernmaterial enthalten und von der Zelle abgeschnürt werden. Diese Formationen heißen Apoptosekörperchen. Sie werden von umliegenden Zellen oder professionellen Phagozyten phagozytiert.

Im Gegensatz zur Nekrose löst die Apoptose weitgehend keine Entzündungsreaktion aus.

### **1.2.3. Caspasen – die Vollstrecker der Apoptose**

Caspasen (Alnemri *et al.*, 1996) sind eine Familie von Cysteinproteasen, die ihre Substrate spezifisch nach einem Tetrapeptidmotiv mit der Aminosäure Asparaginsäure an Position 1 spalten. Die einzelnen Caspasen sind in der Reihenfolge ihrer Erstbeschreibung nummeriert.

Alle Caspasen werden als Proenzyme exprimiert, die sich aus drei Domänen zusammensetzen: einer N-terminalen Prodomäne, einer großen Untereinheit und einer kleinen Untereinheit (Thornberry & Lazebnik, 1998). Die Aktivierung der Caspasen erfolgt durch Proteolyse an Asparaginsäureresten zwischen den Domänen. Das weist darauf hin, dass die Caspasen entweder durch Selbstspaltung (Chang *et al.*, 2003 ; Muzio *et al.*, 1998) oder von anderen Caspasen (Slee *et al.*, 1999) aktiviert werden. Die große und die kleine Untereinheit lagern sich anschließend zu einem Heterodimer zusammen, zwei Heterodimere danach zu einem Heterotetramer.

Die große Proteinfamilie der Caspasen kann in zwei Subgruppen unterteilt werden (Creagh *et al.*, 2003): Eine Gruppe, bestehend aus den Caspasen-2, -3, -6, -7, -8, -9 und -10, wird bei der Apoptose aktiviert. Die andere Gruppe bilden die Caspasen-1, -4, -5 und -11. Sie werden im Zuge eines Entzündungsprozesses aktiviert.

Die Caspasen, die am Vollzug des programmierten Zelltods beteiligt sind, lassen sich in zwei weitere Untergruppen aufteilen: Die „apikalen“ Caspasen (Caspase-8, -9, -10) sind die ersten Caspasen, die nach Eintreffen des Apoptosesignals aktiviert werden. Sie aktivieren danach weitere Caspasen. N-terminal weisen sie eine lange Prodomäne auf. Innerhalb dieser Prodomäne wurden zwei verschiedene Proteininteraktionsmotive identifiziert. Die Todes-effektordomäne (DED), die in den Prodomänen der Caspasen-8 und -10 doppelt vorliegt (Boldin *et al.*, 1996 ; Fernandes-Alnemri *et al.*, 1996 ; Muzio *et al.*, 1996) vermittelt die Bindung der Procaspasen an die DED des Adaptorproteins FADD (Boldin *et al.*, 1995 ; Chinnaiyan *et al.*, 1995). Die Caspasenrekrutierungsdomäne (CARD) vermittelt die Bindung von Procaspase-9 an Apaf-1 (Li *et al.*, 1997).

Die Effektorcaspasen (Caspase-3, -6, -7) werden von den „apikalen“ Caspasen aktiviert und steuern die endgültige Zerstörung der Zelle. Die Aktivierung der Effektorcaspasen erfolgt hierarchisch. Caspase-3 wird von der apikalen Caspase-8 oder -9 aktiviert, Caspase-7 wird von Caspase-9 und Caspase-3 aktiviert. Caspase-3 aktiviert außerdem Caspase-6 (Slee *et al.*, 1999).

Die aktiven Effektorcaspasen aktivieren Proteine, die zu den morphologischen Erscheinungen der Apoptose führen. Dazu gehört die Nuklease CAD, die in der Zelle die DNS-Fragmentierung katalysiert. In nicht apoptotischen Zellen liegt sie im Zellkern als Komplex mit dem Protein ICAD vor, durch das sie inhibiert wird. Während der Apoptose wird ICAD von Caspase-3 gespalten und dadurch inaktiviert. CAD wird aus dem Komplex freigesetzt und spaltet die DNS (Lechardeur *et al.*, 2000 ; Enari *et al.*, 1998 ; Sakahira *et al.*, 1998).

Mittlerweile sind über 280 Proteine bekannt, die von den Caspasen gespalten werden (Fischer *et al.*, 2003). Dazu gehören u.a. das DNS-Reparaturenzym PARP, die DNS-Polymerasekinase, Proteine zur Regulation des Zellzyklus (z.B. das Retinoblastomprotein, der p53-Regulator MDM-2) und Strukturproteine (z.B. Gelsolin, Fodrin).

Insgesamt erfüllen die Caspasen bei der Apoptose folgende Funktionen: Aktivierung weiterer Caspasen, Hemmung der DNS-Replikation und –Reparatur, Abbau der DNS, Störung des Zellzyklus, Zerstörung von Zellstrukturen, Zerfall der Zelle in Apoptosekörperchen und Induktion von Phagozytose.

Nach heutigem Wissensstand sind die Caspasen für den Vollzug der Apoptose unentbehrlich. Bisher sind zwei Signalwege bekannt, über die die einzelnen Caspasen bei der Apoptose aktiviert werden. Sie werden im Folgenden beschrieben.

#### 1.2.4. Der Todesrezeptor-vermittelte Signalweg der Caspasenaktivierung

Todesrezeptoren sind transmembranöse Rezeptoren, die in kürzester Zeit nach Bindung von spezifischen Todesliganden die „Apoptosemaschinerie“ der Zelle starten. Sie gehören zur großen Superfamilie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren, die durch eine cysteinreiche extrazelluläre Domäne charakterisiert sind (Bodmer *et al.*, 2002). Darüberhinaus besitzen die Todesrezeptoren eine homologe zytoplasmatische Aminosäuresequenz, die Todesdomäne (DD ; Tartaglia *et al.*, 1993 ; Itoh & Nagata, 1993).

Mittlerweile sind mehrere Todesrezeptoren bekannt, darunter CD95 (APO-1/Fas ; Itoh *et al.*, 1991) , TNFR1 (p55/CD120a ; Smith *et al.*, 1994) , DR3 (TRAMP/APO-3 ; Chinnaiyan *et al.*, 1996a ; Bodmer *et al.*, 1997) , DR4 (TRAIL-R1/APO-2 ; Pan *et al.*, 1997) und DR5 (TRAIL-R2 ; Walczak *et al.*, 1997 ; Chaudhary *et al.*, 1997). Aktiviert werden sie von Liganden, die auch zur TNF-Superfamilie gezählt werden. CD95-Ligand (CD95L/FasL) bindet an CD95, TNF und Lymphotoxin  $\alpha$  binden an TNFR1, APO-3-Ligand aktiviert DR3, TRAIL (APO-2-Ligand) DR4 und DR5 (Marsters *et al.*, 1998 ; Wiley *et al.*, 1995).

Exemplarisch für die vielen verschiedenen Todesrezeptor-vermittelten Signalwege werden im Folgenden zwei gut erforschte Signalwege beschrieben (siehe Abb.2) :

CD95/Fas: CD95 und CD95L sind an der Apoptosesteuerung im Immunsystem beteiligt. Sie initiieren die Apoptose von virushaltigen Zellen, Tumorzellen oder Immunzellen in „immunprivilegierten“ Organen (Nagata, 1997). Viele Tumorzellen exprimieren CD95L. Damit sind sie in der Lage, CD95-positive, tumoraggressive Immunzellen zu eliminieren (Hahne *et al.*, 1996).

CD95L ist ein homotrimeres Molekül. Jedes CD95L-Trimer bindet drei CD95-Rezeptoren (Nagata, 1997). In der Folge lagern sich die Todesdomänen der drei CD95-Rezeptoren zusammen (Huang *et al.*, 1996). An den Komplex dieser drei Todesdomänen bindet die C-terminale Todesdomäne des Adaptorproteins FADD (Chinnaiyan *et al.*, 1995 ; Boldin *et al.*, 1995). N-terminal besitzt FADD eine Region, die unverzichtbar für die Apoptoseinduktion ist und deshalb Todeseffektordomäne (DED) genannt wird. An sie bindet die DED der Procaspase-8 (Muzio *et al.*, 1996 ; Boldin *et al.*, 1996). FADD vermittelt somit die Bindung von Procaspase-8 an die Todesrezeptoren und ist unabdingbarer Bestandteil des CD95-vermittelten Apoptosesignalwegs (Juo *et al.*, 1999). Eine wichtige Rolle spielt darüber hinaus das Protein c-FLIP. Es liegt hauptsächlich in zwei Spleißvarianten vor. Die kurze Variante, c-FLIP<sub>s</sub>, besitzt zwei DEDs. Die lange Variante, c-FLIP<sub>L</sub>, weist C-terminal eine Domäne mit starker Homologie zu Procaspase-8 auf; allerdings ist sie aufgrund des Peptidmusters ihres aktiven Zentrums enzymatisch inaktiv. Der Komplex aus CD95, FADD, c-FLIP und

---

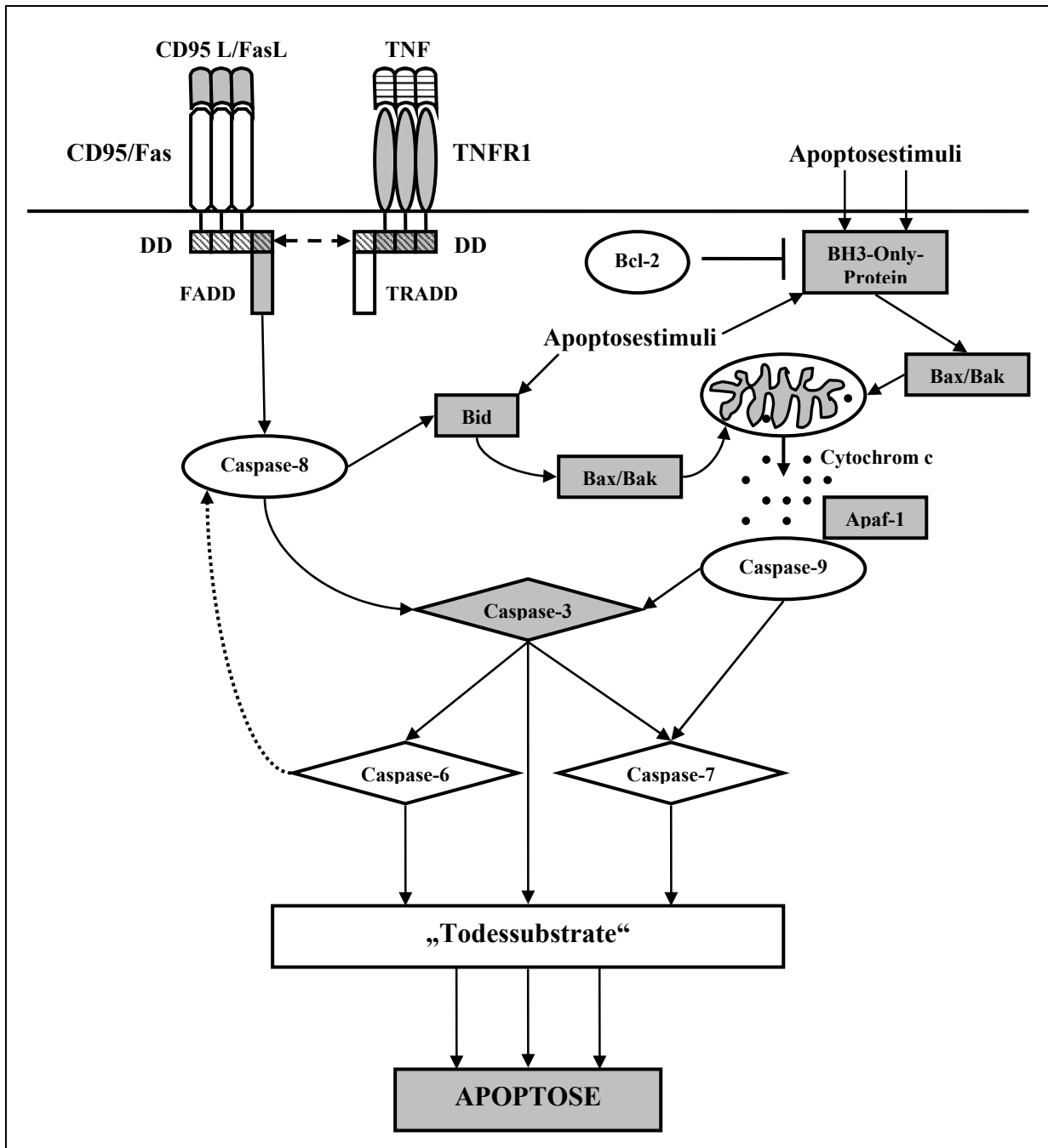
Procaspase-8 wird todesinduzierender Signalkomplex (DISC) genannt (Peter *et al.*, 1996). Innerhalb dieses Komplexes unterliegt die Aktivierung von Procaspase-8 zu Caspase-8 der Kontrolle von c-FLIP. Während c-FLIP<sub>S</sub> die Aktivierung von Procaspase-8 inhibiert (Krueger *et al.*, 2001), fördert c-FLIP<sub>L</sub> die Aktivierung, indem es über seine zu Procaspase-8 homologe Domäne mit Procaspase-8 assoziiert und dadurch die Selbstspaltung von Procaspase-8 induziert (Chang *et al.*, 2002). Außerdem induziert die Bindung von Procaspase-8 an FADD die Oligomerisation von Procaspase-8 und die Autoaktivierung zu Caspase-8 (Muzio *et al.*, 1998). Caspase-8 aktiviert anschließend die Effektorcaspase-3 (Tewari *et al.*, 1995 ; Fernandes-Alnemri *et al.*, 1994).

TNFR1: TNF- $\alpha$ , ein pleiotropes Zytokin, wird bei Infektionen von aktivierten Monozyten, Makrophagen und T-Zellen produziert und sezerniert. Genauso wie CD95L liegt TNF- $\alpha$  als trimeres Molekül vor und bindet drei TNF-Rezeptoren-1 (Bodmer *et al.*, 2002). An die drei Todesdomänen der TNF-Rezeptoren bindet die Todesdomäne des Adaptormoleküls TRADD (Hsu *et al.*, 1995). Je nach Aktivierung gehen von TRADD verschiedene Signalwege aus :

Durch die Bindung von RIP (Ting *et al.*, 1996) und TRAF2 (Hsu *et al.*, 1996a ; Hsu *et al.*, 1996b ; Rothe *et al.*, 1994) kommt es zur Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, der die Expression proinflammatorisch wirkender Proteine induziert.

Nach Bindung von FADD an die Todesdomäne von TRADD (Chinnaiyan *et al.*, 1996b) erfolgt – wie bereits beschrieben – die Rekrutierung von Procaspase-8 an die Todeseffektor-domäne von FADD. Anschließend aktiviert Caspase-8 die Effektorcaspase-3.

Dieses Modell der Apoptoseinduktion ist anhand von *in-vitro*-Experimenten etabliert worden, seine Bedeutung *in vivo* ist bisher unsicher.



**Abb. 2 :** Der Todesrezeptor-vermittelte Weg und der mitochondriale Weg der Caspasenaktivierung (vereinfacht dargestellt). CD95L trimerisiert CD95. Die Todesdomänen (DD) von CD95 lagern sich zusammen und ermöglichen die Bindung der Todesdomäne des Adaptorproteins FADD. FADD rekrutiert Procaspase-8. Es kommt zur Oligomerisation von Procaspase-8 und anschließend zur Autoaktivierung. Die aktive Caspase-8 aktiviert Caspase-3. Außerdem spaltet sie das Protein Bid, das danach die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien induziert. Die Effektorcaspase-3 aktiviert die Caspasen-6 und -7 und spaltet mit ihnen zahlreiche „Todessubstrate“, die den programmierten Zelltod „vollstrecken“. Caspase-6 kann darüber hinaus Caspase-8 spalten. TNF ist der Ligand von TNFR1. Nach Bindung von jeweils drei TNF-Rezeptoren-1 wird intrazellulär das Adaptorprotein TRADD rekrutiert. Die Todesdomäne von TRADD bindet an die Todesdomäne von FADD. Dadurch kommt es zur Aktivierung von Caspase-8. Zahlreiche Apoptosestimuli aktivieren BH3-Only-Proteine (siehe 1.2.7.), die anschließend Bax und/oder Bak aktivieren. Bax/Bak induzieren die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Cytochrom c und Apaf-1 rekrutieren Procaspase-9 in einen Komplex, der Apoptosom genannt wird. Nach ihrer Autoaktivierung aktiviert Caspase-9 die Caspasen-3 und -7. Wenn anwesend, bindet und inaktiviert Bcl-2 aktive BH3-Only-Proteine (siehe 1.2.7.).

### 1.2.5. Der mitochondriale Signalweg der Caspasenaktivierung

Bei diesem Signalweg stehen die Mitochondrien im Mittelpunkt des Geschehens. Zahlreiche intra- und extrazelluläre Apoptosestimuli, wie Serumentzug, Zytostatika, Staurosporin, UV- Bestrahlung oder ein ausgeprägter DNS-Schaden, induzieren die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum der Mitochondrien ins Zytosol. Dieser Prozess wird von Proteinen aus der Bcl-2-Familie gesteuert (siehe 1.2.7.) Im Zytosol bindet Cytochrom c bei Anwesenheit von dATP oder ATP (Liu *et al.*, 1996) an das Protein Apaf-1 (Zou *et al.*, 1997). Der Komplex aus Apaf-1 und Cytochrom c rekrutiert Procaspase-9, die über ihre CARD-Domäne an Apaf-1 bindet und sich anschließend durch Selbstspaltung aktiviert (Zou *et al.*, 1999). Der Komplex aus Apaf-1, Caspase-9 und Cytochrom c wird Apoptosom genannt. Die aktive Caspase-9 aktiviert die Effektorcaspase-3, die sowohl weitere Caspasen aktiviert als auch die Zerstörung der Zelle steuert (siehe 1.2.3./Abb.2).

Cytochrom c ist nicht das einzige Protein, das nach Eintreffen von Apoptosestimuli aus den Mitochondrien freigesetzt wird. Eine Reihe weiterer Proteine wird ebenfalls ins Zytosol freigesetzt. Dazu gehört das Protein Smac/DIABLO (Du *et al.*, 2000 ; Verhagen *et al.*, 2000), das im Zytosol die antiapoptotisch wirkenden IAP-Proteine inaktiviert. Beim Menschen sind aus dieser Proteinfamilie die Proteine XIAP, c-IAP-1 und c-IAP-2 bekannt, die Procaspase-9 binden und dadurch die Aktivierung zur aktiven Caspase-9 verhindern (Deveraux *et al.*, 1998). Außerdem können sie bereits aktive Caspasen binden und hemmen (Deveraux *et al.*, 1998). Smac/DIABLO inaktiviert die IAP-Proteine durch direkte Bindung und ist somit Bestandteil des mitochondrialen Signalwegs der Apoptose.

### 1.2.6. Verbindungen zwischen dem Todesrezeptor-vermittelten Signalweg und dem mitochondrialen Signalweg

Der Todesrezeptor-vermittelte Signalweg und der mitochondriale Signalweg der Caspasenaktivierung laufen nicht streng getrennt voneinander ab. Vielmehr kommt es während des Ablaufs eines Signalwegs zur Aktivierung des anderen Signalwegs (siehe Abb.2).

Eine Verbindung zwischen den beiden Signalwegen, deren Bedeutung *in vivo* unsicher ist, läuft über das BH3-Only-Protein Bid (siehe 1.2.7.). Bid wird von Caspase-8 nach deren Aktivierung über Fas/TNFR1 zu tBid gespalten. tBid transloziert zum Mitochondrium und aktiviert dort die proapoptotischen Proteine Bax und/oder Bak, die die Freisetzung von Cytochrom c induzieren (Wei *et al.*, 2001 ; Gross *et al.*, 1999 ; Luo *et al.*, 1998 ; Li *et al.*, 1998).



### 1.2.7. Die Bcl-2-Proteinfamilie

Eine Schlüsselfunktion in der Apoptosesteuerung erfüllt die Familie der Bcl-2-Proteine. Sie reguliert die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und entscheidet damit über Leben und Tod der Zelle. Die Mitglieder der Bcl-2-Familie lassen sich in drei Gruppen unterteilen (Bouillet & Strasser, 2002 ; Huang & Strasser, 2000) :

Die Proteine Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1, A1, Boo/Diva/Bcl-2-L10 und Bcl-B, die in Säugetierzellen vorkommen, sowie CED-9, das strukturelle und funktionelle Homolog in *Caenorhabditis elegans*, blockieren Apoptose. Strukturell weisen sie ähnliche Sequenzen in drei bzw. vier der insgesamt vier bekannten sog. Bcl-2-Homologiedomänen (BH1-4) auf. Diese Domänen sind charakteristisch für die Bcl-2-Proteine.

Eine weitere Gruppe innerhalb der Bcl-2-Proteinfamilie bilden in Säugetierzellen die Proteine Bax, Bak, Bcl-x<sub>S</sub>, Bok/Mtd und Bcl-G<sub>L</sub>. Sie besitzen nur die Domänen BH1, BH2 und BH3, in denen sie Sequenzähnlichkeit zu Bcl-2 aufweisen. Im Gegensatz zu Bcl-2 wirken sie proapoptotisch.

Die dritte Gruppe aus der Bcl-2-Proteinfamilie besteht aus proapoptotischen Proteinen, die nur die BH3-Domäne besitzen und daher BH3-Only-Proteine genannt werden. In Säugetierzellen wurden aus dieser Gruppe Bad, Bik/Nbk, Blk, Bid, Hrk/DP5, Bim/Bod, Bmf, Noxa und Puma/Bbc-3 identifiziert. Bekannt ist, dass manche dieser BH3-Only-Proteine in nicht apoptotischen Zellen in inaktiver Form vorliegen. Nach Eintreffen von Apoptosestimuli werden sie durch Transkription und/oder posttranslationale Modifikation aktiviert.

Insgesamt unterliegt die Expression der Proteine der Bcl-2-Familie einer komplexen Regulation, an der Zytokine, p53, Proteinkinasen, Caspasen, Wachstumsfaktoren und viele andere pro- und antiapoptotische Faktoren beteiligt sind (Huang & Strasser, 2000 ; Adams & Cory, 1998).

Die Rolle der verschiedenen Proteine aus der Bcl-2-Familie lässt sich mit folgendem Modell beschreiben: Apoptosestimuli bewirken die Aktivierung von BH3-Only-Proteinen. Anschließend aktivieren aktive BH3-Only-Proteine die proapoptotischen Proteine Bax und/oder Bak, die die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien induzieren (Wei *et al.*, 2001 ; Jürgensmeier *et al.*, 1998). Vor kurzem wurde gezeigt, dass Bax in der äußeren Mitochondrienmembran Öffnungen bilden kann, durch die Makromoleküle, wie beispielsweise Cytochrom c, passen (Kuwana *et al.*, 2002). Für diese Funktion von Bax ist Cardiolipin, ein typisches Lipid der mitochondrialen Membranen, erforderlich (Kuwana *et al.*, 2002). Der genaue Mechanismus der Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien ist allerdings nicht bekannt. Die antiapoptotisch wirkenden Proteine Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> verhindern

---

die zur Caspase-9-Aktivierung notwendige Freisetzung von Cytochrom c und anderen mitochondrialen Molekülen (Kuwana *et al.*, 2002 ; Yang *et al.*, 1997 ; Kluck *et al.*, 1997), indem sie wahrscheinlich aktive BH3-Only-Proteine binden und damit inaktivieren.

Die molekulare Natur des Ablaufs und der Steuerung der Apoptose ist also noch nicht vollständig bekannt. Mittlerweile lassen sich zwar viele Details in einem äußerst komplizierten Gesamtbild erkennen, doch es gibt noch viele unbekannte Mechanismen und ungelöste Zusammenhänge.

### 1.3. Fragestellung

Das gramnegative Bakterium *Legionella pneumophila* kann – wie bereits erwähnt – in seinen Wirtszellen Apoptose induzieren.

Das Ziel dieser Arbeit war,

- den molekularen Ablauf der Apoptoseinduktion durch *Legionella pneumophila* zu charakterisieren.
- die Interaktion zwischen *Legionella pneumophila* und T-Zellen, die im Organismus bei der Abwehr von Legionellen eine große Rolle spielen (Susa *et al.*, 1998), zu untersuchen.
- ein Modell der Apoptoseinduktion durch *Legionella pneumophila* aufzustellen.
- zu untersuchen, ob *Legionella micdadei*, der zweithäufigste Erreger der Legionärskrankheit (Benin *et al.*, 2002), ebenfalls Apoptose induzieren kann.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

In diesem Abschnitt werden alle Reagenzien und Geräte aufgeführt, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Übliche Labormaterialien z.B. Zentrifugen- und Rundbodenröhrchen, 1,5ml-Reaktionsgefäße, Mikroliterpipetten, Parafilm®, Reagenzgläser usw. sind nicht angegeben.

#### 2.1.1. Chemikalien und Enzyme

Name	Hersteller
Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methylcoumarin (Ac-DEVD-AMC)	Bachem ; Heidelberg
Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lsg. (29 : 1)	Biorad ; Hercules , USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma ; Deisenhofen
$\beta$ -Glycerophosphat	Sigma ; Deisenhofen
$\beta$ - Mercaptoethanol	Sigma ; Deisenhofen
Biocoll-Trennlösung ( $\rho = 1,077$ g/ml ; isoton)	Biochrom ; Berlin
Biotin , Peroxidase-konjugiert (Biotin-POD)	Molecular Probes ; Eugene , USA
Biotin-Tyr-Val-Ala-Asp-Fluoracyloxy-methylketon (Bio-YVAD-faom)	Calbiochem-Novabiochem ; San Diego , USA
Bovines Albumin (BSA)	Sigma ; Deisenhofen
Bromphenolblau	Sigma ; Deisenhofen
3-[(3-Colamidopropyl)dimethylammonio]-1-propan sulfonat (CHAPS)	Sigma ; Deisenhofen
Click's-RPMI-Trockenmedium (mit L-Glutamin, ohne NaHCO <sub>3</sub> )	Biochrom ; Berlin
Concanavalin A (ConA)	Amersham Pharmacia Biotech ; Uppsala , Schweden
Dithiothreitol (DTT)	Sigma ; Deisenhofen
Ethanol (96%ig, p.a)	Merck ; Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma ; Deisenhofen
Ethylenglycol-bis( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat (EGTA)	Sigma ; Deisenhofen
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom ; Berlin
Formalin-Lösung (37%ig)	Merck ; Darmstadt
Gelatine	Merck ; Darmstadt
Gentamicin (1 % w/v)	Gibco BRL ; Rockville , USA
L-Glutamin	Biochrom ; Berlin
Glycerol	Sigma ; Deisenhofen

Glycin	Roth ; Karlsruhe
N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure] (HEPES)	Fluka ; Neu-Ulm
bisBenzimid Hoechst No.33342 Trihydrochlorid (H33342)	Sigma ; Deisenhofen
Hydrogenchlorid (32%ig, p.a.) (HCl)	Merck ; Darmstadt
Interleukin-2	Genzyme ; Cambridge, USA
Magermilchpulver (MMP)	Fluka ; Neu-Ulm
Magnesiumchlorid (Hexahydrat) (MgCl <sub>2</sub> )	Merck ; Darmstadt
Methanol (99%ig, p.a.)	Merck ; Darmstadt
Natriumacetat	Sigma ; Deisenhofen
Natriumchlorid (NaCl)	Merck ; Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	F.Hoffmann-La Roche ; Basel , Schweiz
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck ; Darmstadt
Neutravidin	Molecular Probes ; Eugene , USA
NP40-Stammlsg. (= IGEPAL CA-630)	Sigma ; Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin (10.000 IE / 10.000µg/ml)	Biochrom ; Berlin
Phosphate Buffered Saline , Dulbecco (PBS) (ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> )	Biochrom ; Berlin
Phytohämagglutinin (PHA)	Amersham Pharmacia Biotech ; Uppsala , Schweden
Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat (TWEEN 20)	Sigma ; Deisenhofen
Propidiumiodid	Sigma ; Deisenhofen
Proteinaseinhibitor	F.Hoffmann-La Roche ; Basel , Schweiz
Ribonuklease A (RNaseA)	Sigma ; Deisenhofen
Saponin	Sigma ; Deisenhofen
SeeBlue® Pre-Stained Standard (Molekulargewichtsmarker)	Invitrogen life technologies ; Carlsbad , USA
Staurosporin	Sigma ; Deisenhofen
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma ; Deisenhofen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth ; Karlsruhe
Triton X-100	Biorad ; Hercules , USA
Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus → Enhanced Luminol Reagent → Oxidizing Reagent	PerkinElmer Life Sciences ; Boston , USA
Z-Val-Ala-DL-Asp-Fluormethylketon (Z-VAD-fmk)	Bachem ; Heidelberg

### 2.1.2. Antikörper

Name	Herkunft	Hersteller
monoklonaler Anti-aktive-Caspase-3-Antikörper	Kaninchen	BD Pharmingen ; Franklin Lakes , USA
polyklonaler Anti-Caspase-3-Antikörper	Kaninchen	BD Pharmingen ; Franklin Lakes , USA
monoklonaler Anti-Caspase-8-Antikörper (1C12)	Maus	Cell Signaling Technology ; Beverly , USA
polyklonaler Anti-Caspase-9-Antikörper	Kaninchen	BD Pharmingen ; Franklin Lakes , USA
Peroxidase-konjugiertes Anti-Maus-IgG (H+L)	Ziege	Dianova ; Hamburg
Peroxidase-konjugiertes Anti-Kaninchen-IgG (H+L)	Ziege	Sigma ; Deisenhofen
Phycoerythrin-konjugiertes Anti-Kaninchen-IgG (H+L)	Esel	Dianova ; Hamburg

### 2.1.3. Zelllinien und Legionellenstämmen

#### Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Referenz
U937	humane monoblastische Leukämiezellen	American Type Culture Collection ; Rockville, USA
Jurkat	humane T-Zell-Leukämiezellen	American Type Culture Collection ; Rockville, USA
Jurkat-Subklon A3 (Wildtyp)	vgl. Jurkat	Juo <i>et al.</i> , 1999
FADD defiziente Jurkat- Mutante I6.2	vgl. Jurkat	Juo <i>et al.</i> , 1999
HL-60	humane Leukämiezellen	American Type Culture Collection ; Rockville, USA
Primäre humane mononukleäre Zellen	humane mononukleäre Zellen	
Primäre murine Lymphozyten	murine Lymphozyten : - Mausstamm C57B1/6 - Mausstamm vav-bcl-2 (bcl-2-überexprimierend)	Ogilvy <i>et al.</i> , 1999

Legionellenstämme

<b>Legionellenstämme</b>	<b>Referenz</b>
<i>Legionella pneumophila</i> Philadelphia 1 (Lp1-Vir)	Dr. Paul S. Hoffman Dalhousie University ; Halifax , Canada
GFP-exprimierende <i>Legionella pneumophila</i> Philadelphia 1 (GFP-Lp1-Vir)	Dr. Georg Häcker, TU München ; Plasmid pBC(gfp)Pmip wurde freundlicherweise zur Verfü- gung gestellt von Dr. Jörg Hacker , Universität Würzburg
<i>Legionella pneumophila</i> Muc	Institut für Medizinische Mikrobiologie , TU München
<i>Legionella pneumophila</i> Sg3 / Bloomington 2	ATCC 33155
<i>Legionella pneumophila</i> Sg8 Concord	ATCC 35096
<i>Legionella micdadei</i> 2000	ATCC 33204
<i>Legionella micdadei</i> 2001	Institut für Medizinische Mikrobiologie ; TU München

**2.1.4. Kulturmedien**Nährmedium für die Kultur von humanen und murinen Zellen

Click's RPMI : Click's RPMI-Trockenmedium supplementiert mit

- 2,383 g/l HEPES
- 1,175 g/l NaHCO<sub>3</sub>
- 10 % FCS
- 1 % L-Glutamin
- 1 % Penicillin/Streptomycin ( 10000 IE/ml Penicillin ;  
10000 µg/ml Streptomycin )
- pH 7,2

Für die Kultur primärer Lymphozyten der Maus wurde Click's RPMI zusätzlich versetzt mit 50mM  $\beta$ -Mercaptoethanol.

FCS wurde zur Inaktivierung von Komplementfaktoren vor dem ersten Gebrauch für 30 Minuten auf 56°C erhitzt.

Das Nährmedium wurde sterilfiltriert.

Nährböden für Legionellen

Die verschiedenen Legionellenstämme wurden auf MWY-Selektivnährböden (Medium nach Wadowsky und Yee, 1981; modifiziert von Edelstein, 1982) kultiviert. Ein wesentlicher Bestandteil dieser Selektivnährböden ist **Buffered Charcoal Yeast Extract Agar** mit  $\alpha$ -Ketoglutarat, kurz BCYE $\alpha$ .

<b>Name</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>CYE-Agar-Basis</b> ( je 100ml) pH 6,9 $\pm$ 0,1 (Oxoid GmbH ; Wesel)	0,2 g Aktivkohle 1,0 g Hefeextrakt 1,3 g Agar
<b>BCYE<math>\alpha</math>- Supplement</b> (je 100ml) (Oxoid GmbH ; Wesel)	1,0 g ACES-Puffer/Kaliumhydroxid 0,025 g Eisen(III)-pyrophosphat 0,04 g L-Cystein 0,1 g $\alpha$ -Ketoglutarat
<b>MWY-Selektiv-Supplement</b> (je 100ml) (Oxoid GmbH ; Wesel)	0,3 g Glycin 0,008 g Anisomycin 0,001 g Bromthymolblau 0,001 g Bromkresolpurpur 100 $\mu$ g Vancomycin 5000 IE Polymyxin B

Die Nährböden für den GFP-exprimierenden Legionellenstamm wurden zusätzlich mit 5 mg/l Chloramphenicol supplementiert.

Alle Nährböden wurden von Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der TU München hergestellt und zur Verfügung gestellt.

### 2.1.5. Lösungen

Wenn nicht anders angegeben, wurden die folgenden Lösungen und Puffer mit MilliQ-Wasser angesetzt.

#### Western-Blotting :

Ammoniumpersulfatlösung	:	10,0 % (w/v) APS
LGB-Lösung (für Trenngel)	:	18,2 % (w/v) Tris 0,4 % (w/v) SDS pH 8,8 eingestellt mit HCl-Lösung (32%ig)
UGB-Lösung (für Sammelgel)	:	6,0 % (w/v) Tris 0,4 % (w/v) SDS pH 6,8 eingestellt mit HCl-Lösung (32%ig)
5x-Laufpuffer	:	14,4 % (w/v) Glycin 3,0 % (w/v) Tris 0,5 % (w/v) SDS
2x-Transferpuffer	:	1,16 % (w/v) Tris 0,59 % (w/v) Glycin 0,074 % (w/v) SDS pH 8,3 eingestellt mit HCl-Lösung (32%ig)  Vor dem Blotten : Zugabe von 20 % (v/v) Methanol
10x-TBS-Lösung	:	8,0 % (w/v) NaCl 2,42 % (w/v) Tris pH 7,6 eingestellt mit HCl-Lösung (32%ig)
TBS/T-Waschpuffer	:	10,0 % (v/v) 10x-TBS-Lösung 0,05 % (v/v) Tween 20
MMP-Blockierungspuffer	:	5,0 % (w/v) Magermilchpulver gelöst in TBS/T-Waschpuffer

#### Lysepuffer

4x-Laemmli-Puffer ( = 4x-SDS-Ladepuffer )	:	400 mM DTT 200 mM Tris-HCl (pH 6,8) 40,0 % (v/v) Glycerol 8,0 % (w/v) SDS 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
NP40-Lysepuffer I	:	150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1,0 % (v/v) NP40-Stammlösung
NP40-Lysepuffer II	:	150 mM NaCl 20 mM HEPES-HCl (pH 7,5) 1,0 % (v/v) NP40-Stammlösung



**Fixierlösungen**

Ethanol, 70 %ig	:	70,0 % (v/v) Ethanol
Formalin, 2 %ig	:	2,0 % (v/v) Formalin

**Färbelösungen**

Hoechst No. 33342- Lösung	:	2,0 % (w/v) Hoechst No. 33342
Propidiumiodid-Lösung	:	0,1 % (w/v) Propidiumiodid

**Sonstige Lösungen / Puffer**

BSA-Lösung, 1 %ig	:	1,0 % (w/v) BSA
CHAPS-Lösung, 10 %ig	:	10,0 % (w/v) CHAPS
MDB-Puffer	:	50 mM NaCl 40 mM $\beta$ -Glycerophosphat 10 mM Hepes-HCl (pH 7,0) 5 mM EGTA 2 mM MgCl <sub>2</sub>
Net-Gelatine	:	0,25 % (w/v) Gelatine 150 $\mu$ M NaCl 5 mM EDTA 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) 0,05 % (v/v) Triton X-100
RNaseA-Lösung	:	1,0 % (w/v) RNaseA

## 2.1.6. Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Blotkammer</b> Mini-Trans-Blot®Cell	Biorad ; Hercules , USA
<b>Brutschränke</b> ( Zellkulturen/ Legionellen)	Heraeus ; Hanau
<b>Densimat</b> Densimat	bioMérieux ; Marcy-l'Etoile , Frankreich
<b>Durchflusszytometer</b> FACSCalibur	Becton Dickinson ; Franklin Lakes , USA
<b>Elektrophoresekammer</b> Mighty Small SE260 Mini-vertical Unit	Hoefer ; San Francisco , USA
<b>Fluoreszenzlesegerät</b> Cytofluor 2350 Fluorescence Measurement System	Millipore ; Bedford , USA
<b>Fluoreszenzmikroskop</b> LEITZ DMRBE	Leica : Solms
<b>Spannungsquelle</b> EPS 1001 ( für SDS-PAGE- Gelelektrophorese )	Amersham Pharmacia Biotech ; Uppsala , Schweden
<b>Sterilwerkbank</b> HERAsafe HSP 18	Heraeus ; Hanau
<b>Ultraschallgerät</b> Sonopuls HD60	Bandelin electronic ; Berlin
<b>(Kühl-)Zentrifugen</b> Omnifuge 2.ORS Biofuge 13 Biofuge fresco	Heraeus ; Hanau Heraeus ; Hanau Heraeus ; Hanau

### 2.1.7. Sonstige Materialien

Name	Hersteller
<b>Durchflusszytometrie</b> Falcon® 5ml-Rundbodenröhrchen , 12 x 75 mm	Becton Dickinson ; Franklin Lakes , USA
<b>Auswertungssoftware für Durchfluss- zytometrie</b> BD CellQuest™Pro	Becton Dickinson ; Franklin Lakes , USA
<b>Western-Blotting</b> Hyperfilm™ ECL™ Chemiluminescence Film  Protran® BA 85 Nitrocellulose Transfer Membran  Whatman Papier	Amersham Pharmacia Biotech ; Uppsala , Schweden  Schleicher & Schüll ; Dassel  Schleicher & Schüll ; Dassel
<b>Zellkulturartikel</b> Falcon® Zellkulturplatten Multiwell™ ( 6-, 12-, 24- und 96-Well )  Falcon® Zellkulturflaschen , 750 ml  Falcon® Zellkulturschalen , 150 x 25 mm	Becton Dickinson ; Franklin Lakes , USA  Becton Dickinson ; Franklin Lakes , USA  Becton Dickinson ; Franklin Lakes , USA

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Kultur von humanen und murinen Zellen

Die Zellen aller verwendeten Zelllinien wurden in Brutschränken bei 37°C , 7 % CO<sub>2</sub> und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert.

Bei einer Dichte von 1 – 1,5x10<sup>6</sup> Zellen/ml wurden die Suspensionszellen mit frischem Click's RPMI-Medium versorgt.

Alle Zellkulturarbeiten wurden in einer Sicherheitswerkbank der Klasse II (Heraeus) durchgeführt.

### 2.2.2. Legionellenkultur

Alle Legionellenstämme wurden in Brutschränken bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert.

Alle drei bis vier Tage wurden die verschiedenen Legionellenstämme auf frische Nährböden überimpft und zwei bis drei Tage danach für Versuche verwendet.

### 2.2.3. Herstellung von Versuchsansätzen aus humanen und murinen Zellen

Versuch	Zellen/Ansatz (abhängig vom Versuch)
Durchflusszytometrie	1,5x10 <sup>5</sup> – 10 <sup>6</sup>
Westernblot	10 <sup>6</sup> oder 2x10 <sup>6</sup>
Caspase-3-Aktivität	10 <sup>6</sup>

#### Suspensionszellen

Die für den Versuch benötigte Anzahl von Zellen wurde aus der Kulturflasche bzw. –schale entnommen und zentrifugiert (1500 rpm, 5 Min., RT). Danach wurden die Zellen in Kulturmedium ohne Zusatz von Penicillin/Streptomycin resuspendiert. Die Menge an Medium richtete sich nach der pro Zellansatz gewünschten Zellzahl, wobei das Minimum bei 10<sup>5</sup> Zellen/500µl lag, das Maximum bei 10<sup>6</sup> Zellen/500µl. Jeweils gleiche Volumina an Zellsuspension wurden in die Schälchen der Zellkulturplatten pipettiert. Abhängig vom Versuch

wurden die Zellansätze einfach, doppelt oder dreifach angelegt. Anschließend wurden die Zellen entweder gleich mit Legionellen inkubiert, oder es wurde vor der Inkubation eine der folgenden Substanzen zugefügt :

Proteinkinaseinhibitor	:	Staurosporin	:	1 $\mu$ M
Pancaspaseninhibitor	:	Z-VAD-FMK	:	25 $\mu$ M , 50 $\mu$ M
Aminoglykosid-Antibiotikum	:	Gentamicin	:	100 $\mu$ g/ml

### Primäre humane mononukleäre Zellen

In eine 50ml-Spritze wurde etwas Heparin aufgezogen. Danach wurden 20-30ml venöses Blut eines gesunden Probanden abgenommen, mit dem Heparin gemischt und im Verhältnis 1:1 mit sterilem PBS verdünnt. 50ml-Röhrchen wurden mit je 10ml isotoner Biocoll-Trennlösung ( $\rho = 1,077\text{g/ml}$ ) gefüllt. Das verdünnte Vollblut wurde vorsichtig darüber geschichtet. Die Trennung der Blutbestandteile erfolgte bei einer 20-minütigen Zentrifugation mit 2500 rpm ohne Bremse bei RT. Die mononukleären Zellen (Monozyten / Lymphozyten) hatten sich als weissliche Schicht zwischen Plasma und Trennlösung angereichert. Sie wurden mit einer Pasteurpipette aufgenommen und in ein frisches 50ml-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden zweimal mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 10ml Medium, supplementiert mit 50mM Mercaptoethanol, resuspendiert. Die Anzahl der Zellen, die stimuliert werden sollten, wurde abgenommen, zentrifugiert (1500 rpm, 5 Min., RT) und in soviel Medium aufgenommen bis eine Dichte von  $10^6$  Zellen/ml erreicht war. Die Stimulation der T-Zellen erfolgte durch Zusatz von 10 $\mu$ g/ml Phytohämagglutinin. Die Zellsuspension wurde in eine Kulturflasche überführt und für 72 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Das weitere Vorgehen mit den unstimulierten und stimulierten Zellen erfolgte in gleicher Weise wie mit den Suspensionszellen.

### Lymphozyten der Maus

Die Versuchsm Maus wurde durch Genickbruch getötet. Anschließend wurden die axillären, inguinalen und mesenterialen Lymphknoten exzidiert und in PBS überführt. In der Sterilbank wurden die Lymphknoten durch ein Haarsieb gedrückt, die Lymphozyten in PBS aufgefangen und zentrifugiert (1500 rpm, 5 Min., RT). Die Zellen wurden in Click's RPMI-Medium, supplementiert mit 50mM Mercaptoethanol, gewaschen, zentrifugiert und in 10ml des gleichen Mediums resuspendiert. Die für das Experiment benötigten Lymphozyten wurden

abgenommen, zentrifugiert (1500 rpm, 5 Min., RT) und in soviel Medium aufgenommen, dass eine Dichte von  $10^6$  Zellen/ml vorlag. Zum Stimulieren der T-Zellen wurden dem anderen Teil der Lymphozyten  $2\mu\text{M}$  Concanavalin A und 10 Einheiten/ml IL-2 zugefügt. Die Zellsuspension wurde in eine Zellkulturflasche überführt und für 60 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Nach diesem Zeitraum wurden die toten T-Zellen von den lebenden durch Dichtezentrifugation über Biocoll-Trennlösung ( $\rho = 1,077\text{g/ml}$ ) getrennt (siehe oben).

Sowohl das weitere Vorgehen mit den unstimulierten Zellen als auch das mit den stimulierten Zellen ist oben aufgeführt.

#### **2.2.4. Bestimmung der Anzahl von Legionellen in Suspensionen**

Die für die Versuche benötigte Legionellenmenge wurde mit Hilfe eines Densimats auf der Skala nach McFarland (McF) gemessen.

Allgemein gilt folgende Definition :  $1 \text{ McF} = 3 \times 10^8 \text{ Bakterien/ml}$   
 $2 \text{ McF} = 6 \times 10^8 \text{ Bakterien/ml}$

Da diese definierten Konzentrationen nicht für alle Bakterienstämme übernommen werden können, war es nötig, für jeden verwendeten Legionellenstamm den Korrekturfaktor zu bestimmen.

In 0,85 %iger NaCl-Lösung wurde eine Legionellensuspension von 0,5 McF hergestellt. Anschließend erfolgten zwei Verdünnungen im Verhältnis 1:1000. In der zweiten Verdünnung sollten laut Definition  $1,5 \times 10^3$  Legionellen/100 $\mu\text{l}$  vorhanden sein. Daraus wurden 1 $\mu\text{l}$  (= 15 Leg.) und 10 $\mu\text{l}$  (= 150 Leg.) auf je einen MWY-Selektivnährboden ausplattiert. Die Platten wurden für zwei Tage im Brutschrank inkubiert.

Die Kolonien wurden gezählt und ihre Anzahl mit der nach Definition berechneten Koloniezahl verglichen. Der Korrekturfaktor wurde festgelegt als das Verhältnis von Ist-Wert zu Soll-Wert.

Um die für das jeweilige Experiment benötigte Legionellenmenge zu berechnen, wurde der Messwert nach Mc Farland mit dem Korrekturfaktor multipliziert. Der Korrekturfaktor wurde in unregelmäßigen Abständen erneut ermittelt und gegebenenfalls angepasst.

### **2.2.5. Inkubation von humanen und murinen Zellen mit Legionellen**

Das für den Versuch benötigte Volumen an antibiotikafreiem Medium wurde in ein Glasröhrchen gefüllt. Mit dem Densimat wurde zunächst der Leerwert gemessen. Anschließend wurden die Legionellen mit einer sterilen Öse von der Agarplatte abgenommen und in das Medium eingerührt. Unter Berücksichtigung des Leerwerts wurde mit dem Densimat die erforderliche Bakterienanzahl/ml genau eingestellt. Das Verhältnis Legionellenzahl zu Wirtszellenzahl lag je nach Versuch bei 2:1, 10:1 oder 50:1. Danach wurden die für die korrekte Legionellenzahl erforderlichen Volumina an Legionellensuspension zu den Zellansätzen pipettiert. Zu den Negativkontrollansätzen wurden entsprechende Volumina an antibiotikafreiem Medium pipettiert.

Die Zellkulturplatte wurde für die entsprechende Infektionsdauer in den Brutschrank gestellt.

### **2.2.6. Zellfixierung**

#### Fixierung mit 70 %igem Ethanol

Nach Ablauf der Infektionszeit wurden die Zellen in Rundbodenröhrchen überführt und zentrifugiert (1500 rpm, 5 Min., RT). Anschließend wurden die Zellen in je 500µl PBS gewaschen und zum Fixieren in je 500µl 70 %igem Ethanol resuspendiert.

Bis zur Analyse durch Durchflusszytometrie wurden die Zellsuspensionen bei 4°C aufbewahrt

#### Fixierung mit 2 %igem Formalin

Die Zellen wurden am Ende der Infektion in Rundbodenröhrchen überführt und zentrifugiert (1500 rpm, 5 Min., RT). Nach einer zwanzigminütigen Fixation in je 200µl 2 %igem Formalin bei RT wurden die Zellen in je 500µl PBS überführt und bei 4°C aufbewahrt.

### **2.2.7. Herstellung von Zelllysaten**

#### Laemmli-Lysate

Am Ende der Infektionszeit wurden die Zellsuspensionen in 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (2000 rpm, 5 Min., RT). Nach dem Waschen in je 200µl PBS wurden die Zellen in je 40µl Laemmli-Puffer ( 1:1 mit MilliQ-H<sub>2</sub>O verdünnt ) lysiert.

Die Zelllysate wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren.

### NP40-Lysate

Nachdem die Infektionszeit abgelaufen war, wurden die Zellansätze in 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt, zentrifugiert (2000 rpm, 5 Min., RT) und danach in je 200µl PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in NP40-Lysepuffer, versetzt mit Proteinaseinhibitor, aufgenommen. Dabei wurden je 40µl NP40-Lysepuffer I oder II pro Zellansatz für Westernblotproben eingesetzt und je 50µl NP40-Lysepuffer I pro Zellansatz für Caspase-3-Aktivitätsmessungen. NP40-Lysepuffer II (mit HEPES) wurde verwendet, wenn die Zellysate neben Westernblots noch für weitere Experimente verwendet werden sollten. Die Zellyse wurde durch fünfminütige Kühlung der Proben auf Eis verstärkt. Nach Zentrifugation bei 4°C (13000 rpm, 5 Min.) wurden die das Zytosol enthaltende Überstände in frische 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C aufbewahrt.

### **2.2.8. Zellfärbungen und durchflusszytometrische Messung**

#### Propidiumiodid-Färbung von nativen Zellen

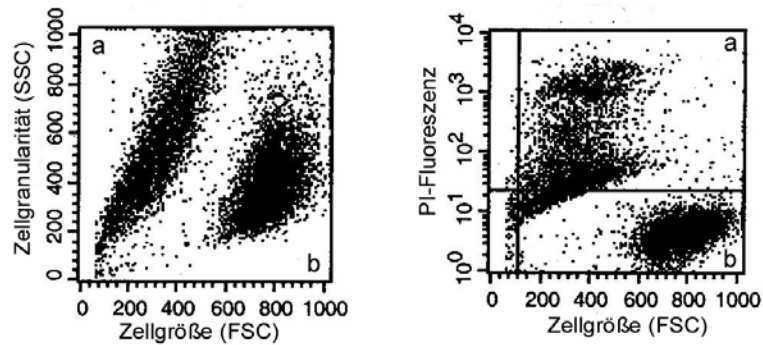
Mit der Propidiumiodid-Färbung nativer Zellen lassen sich lebende von toten Zellen differenzieren.

Die Färbung basiert darauf, dass Propidiumiodid in den Zellkernen unspezifisch alle Regionen von DNS und RNS mit Doppelstrangbrüchen interkaliert. Tote Zellen nehmen Propidiumiodid aufgrund ihrer nicht mehr intakten Zellmembran verstärkt auf. Deshalb fluoreszieren sie bei der durchflusszytometrischen Messung wesentlich stärker als lebende Zellen. Die schwache Anfärbbarkeit der lebenden Zellen mit Propidiumiodid belegt die Integrität der Zellen.

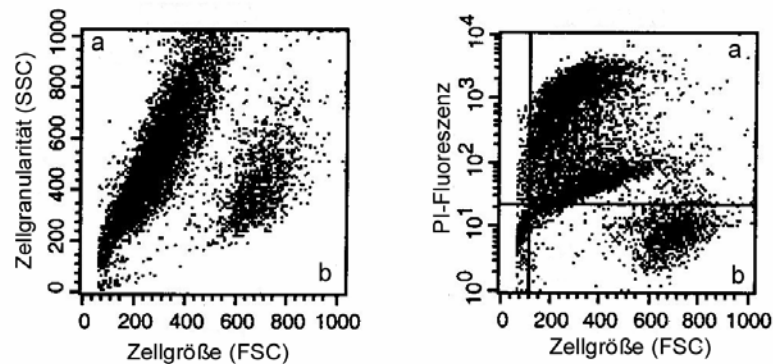
Zunächst wurde je 5µl (= 5µg) Propidiumiodid-Lösung in Rundbodenröhrchen pipettiert. Je 500µl Zellsuspension wurde dazugegeben und mit der Färbelösung gemischt.

Innerhalb der folgenden halben Stunde wurde die FACS-Analyse durchgeführt. Propidiumiodid-haltige Zellen fluoreszieren rot bei  $\lambda = 630$  nm.





**Abb. 3 :** Jurkat-Kulturen. Durchflusszytometrische Originalbilder nach PI-Färbung der Jurkat-Zellen.



**Abb. 4 :** Jurkat-Kulturen nach Infektion mit *Legionella pneumophila*. Durchflusszytometrische Originalbilder nach PI-Färbung der Jurkat-Zellen.

Auf den linken Diagrammen (Abb. 3 und 4) sind die Zellen nach Größe und Granularität aufgetragen. Mit **a** sind die kleineren, toten Zellen bezeichnet ; die Zellpopulation **b** stellt die größeren, lebenden Zellen dar. Auf den rechten Diagrammen sind dieselben Zellen nach Größe und PI-Fluoreszenz aufgetragen. Der Quadrant **a** enthält die stark Propidiumiodid aufnehmenden toten Zellen; die im Quadrant **b** liegenden Zellen werden aufgrund ihrer schwachen Anfärbbarkeit mit Propidiumiodid als lebend gewertet. Von den Zellpopulationen in den Quadranten **a** und **b** wird der Anteil an der Gesamtzellzahl ermittelt. Die Summe aus beiden Messwerten wird auf 100 % gesetzt, die Einzelwerte werden entsprechend berechnet. In den Säulendiagrammen im Ergebnisteil wird der extrapolierte Messwert für die lebende Zellpopulation dargestellt.

#### Propidiumiodid-Färbung von fixierten Zellen

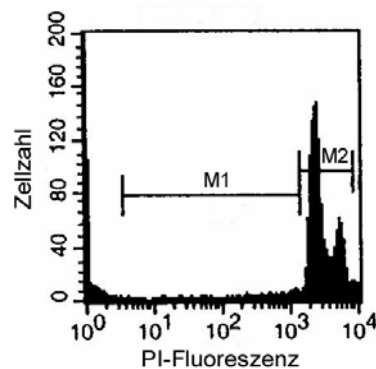
Die Propidiumiodid-Färbung von fixierten Zellen ermöglicht es, den DNS-Gehalt der Zellen durch durchflusszytometrische Messung zu quantifizieren.

Wie oben erwähnt nehmen vor allem tote Zellen den Farbstoff auf. Allerdings bewirkt die Permeabilisierung und Fixierung der Zellmembran mit 70 %igem Ethanol einen Austritt der

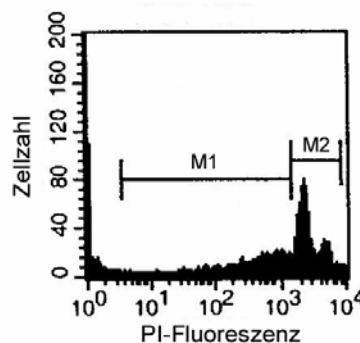
degradierten DNS aus apoptotischen Zellen. Damit weisen apoptotische Zellen im Vergleich zu vitalen Zellen einen reduzierten DNS-Gehalt auf. Durch Einsatz von RNase A wird die zelluläre RNS zerstört. Die durchflusszytometrisch gemessene PI-Fluoreszenz der Zellen resultiert daher insbesondere aus deren DNS-Gehalt. Apoptotische Zellen mit subdiploidem DNS-Gehalt fluoreszieren deshalb bei  $\lambda = 630 \text{ nm}$  nur schwach. Im Auswertungsprogramm werden sie als sub-G1-Peak sichtbar (Nicoletti *et al.*, 1991).

Für die Färbelösung wurde PBS mit  $50 \mu\text{g/ml}$  Propidiumiodid-Lösung und  $10 \mu\text{g/ml}$  RNaseA-Lösung vermischt. Danach wurden die fixierten Zellen zentrifugiert (1500 rpm, 5 Min., RT) und in je  $500 \mu\text{l}$  PI-Färbelösung resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden abgedunkelt etwa eine Stunde bei Raumtemperatur stehengelassen, um eine gute Zellfärbung zu erzielen.

Unmittelbar vor der FACS-Analyse wurden die Suspensionen aufgewirbelt, damit sich die Zellen gleichmäßig verteilen.



**Abb. 5 :** Jurkat-Kulturen. Durchflusszytometrisches Originalbild nach PI-Färbung der fixierten Jurkat-Zellen



**Abb. 6 :** Jurkat-Kulturen nach Infektion mit *Legionella pneumophila*. Durchflusszytometrisches Originalbild nach PI-Färbung der fixierten Jurkat-Zellen.

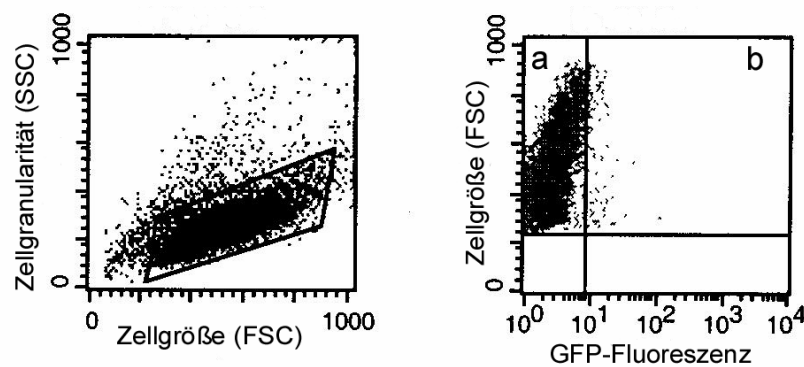
Auf den Diagrammen (Abb. 5 und 6) sind die Zellen nach relativer Stärke der PI-Fluoreszenz und Zellzahl aufgetragen. **M1** umfasst die apoptotischen Zellen, **M2** enthält Zellen, die sich in verschiedenen Zellzyklusphasen befinden.

In der Darstellung der Ergebnisse werden diese Rohdaten als Säulendiagramme zusammengefasst. Zur besseren Vergleichbarkeit mehrerer Experimente wird zunächst die Summe aus **M1** und **M2** mit 100 % gleichgesetzt, anschließend werden die Messergebnisse von **M1** und **M2** entsprechend berechnet. In den Säulendiagrammen wird jeweils der extrapolierte **M1**-Wert, das heißt der Anteil apoptotischer Wirtszellen, gezeigt.

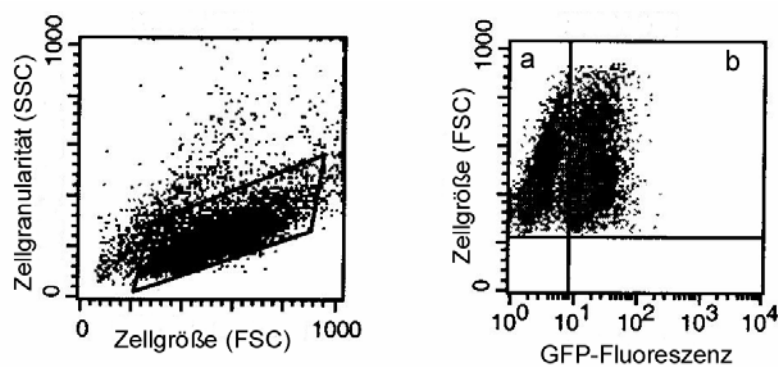
Die Messwerte außerhalb von **M1** und **M2** werden verworfen, da es sich dabei wahrscheinlich um Zelltrümmer oder –aggregate handelt.

### Durchflusszytometrie von GFP-positiven Zellen

Die Intensität der Fluoreszenz von grün-fluoreszierendem Protein (GFP) in den mit *Legionella pneumophila* GFP-Lp1-Vir infizierten Jurkat-Kulturen wurde nach Anregung bei  $\lambda = 488$  nm bei  $\lambda = 525$  nm gemessen. Dadurch konnten die Jurkat-Zellen detektiert werden, in die Legionellen penetriert waren bzw. an denen Legionellen adhärten.



**Abb. 7 :** Jurkat-Kulturen. Durchflusszytometrische Originalbilder. Erfassung der Eigenfluoreszenz der Jurkat-Zellen im Emissionsbereich von GFP.



**Abb. 8 :** Jurkat-Kulturen nach Infektion mit *Legionella pneumophila* GFP-Lp1-Vir. Durchflusszytometrische Originalbilder. Erfassung der GFP-Fluoreszenz.

Auf den linken Diagrammen (Abb. 7 und 8) sind die Zellen nach Größe und Granularität aufgetragen. Das eingezeichnete Viereck umfasst die lebende Zellpopulation. Auf den rechten

Diagrammen sind die als lebend gewerteten Zellen nach relativer Stärke der GFP-Fluoreszenz und Zellgröße aufgetragen. Im Quadranten **a** liegen die GFP-negativen Zellen, die leichte GFP-Fluoreszenz wird durch Eigenfluoreszenz der Zellen hervorgerufen. Mit **b** werden die GFP-positiven, also legionellenhaltigen Zellen bezeichnet.

### Antikörper-Färbung

Die durchflusszytometrische Messung beruht darauf, dass der eingesetzte Sekundärantikörper mit Fluorochromen konjugiert ist. Phycoerythrin (PE) wird durch Laserlicht bei  $\lambda \approx 565$  nm angeregt und emittiert bei  $\lambda \approx 585$  nm.

Da der Antikörper an einen aktive-Caspase-3 detektierenden Erstantikörper bindet, korreliert die Intensität der Emission mit der Menge an Zellen, in denen Caspase-3 aktiviert ist.

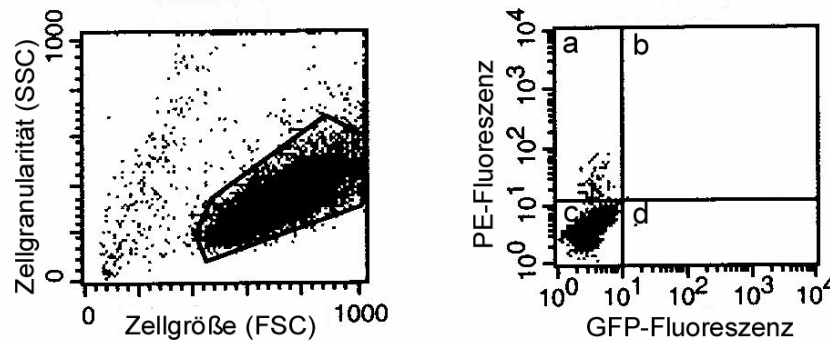
Der an Phycoerythrin gekoppelte Sekundärantikörper wurde eingesetzt, wenn GFP-exprimierende Legionellen im Versuch verwendet wurden. Phycoerythrin und grün-fluoreszierendes Protein haben ihre Emissionsmaxima in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen ; bei der durchflusszytometrischen Messung kommt es daher nicht zu Überlagerungen.

Die Färbung wurde in folgenden Schritten durchgeführt :

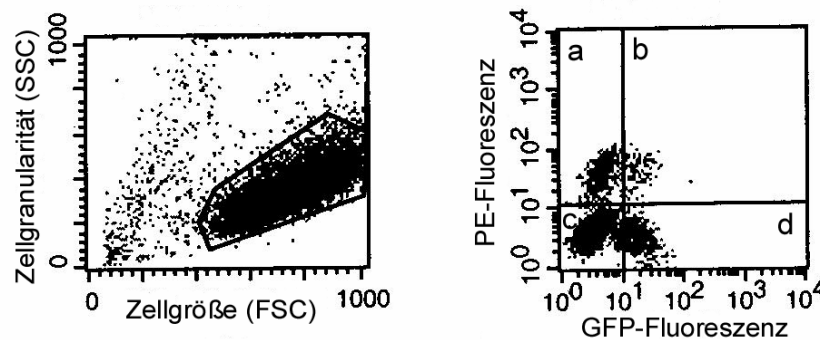
Am Ende der Infektionszeit wurden die Zellen in 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (2000 rpm, 5 Min., RT). Anschließend erfolgte eine zwanzigminütige Fixierung der Zellen in je 500 $\mu$ l 2 %igem Formalin. Nach erneuter Zentrifugation (6000 rpm, 5 Min., RT) wurden die Zellen mit je 500 $\mu$ l PBS/0,5 % BSA-Lösung gewaschen, danach in je 50 $\mu$ l PBS/0,5%BSA/0,5 % Saponin-Lösung resuspendiert und in eine 96-Loch-Spitzbodenplatte überführt.

Saponin erleichtert die Penetration von Proteinen und anderen Makromolekülen durch die Zellmembran. Dadurch können auch die für die Färbung verwendeten Antikörper in das Zytosol der Zellen gelangen. Als Erstantikörper wurde Anti-aktive-Caspase-3-Antikörper im Verhältnis 1:100 verwendet. Nach 20 Minuten Inkubation bei RT wurden jeweils 150 $\mu$ l PBS/0,5 % BSA/0,5 % Saponin-Lösung zu jeder Probe dazugegeben. Die Ansätze wurden zentrifugiert (4000 rpm, 5 Min., RT) und die Zellen erneut in je 50 $\mu$ l PBS/0,5 % BSA/0,5 % Saponin-Lösung resuspendiert. Als Zweitantikörper wurde PE-konjugierter Esel-anti-Kaninchen Antikörper im Verhältnis 1 : 300 eingesetzt. Der Antikörper wurde für 20 Minuten mit den Zellen inkubiert. Anschließend wurden die Schälchen mit 150 $\mu$ l PBS/ 0,5 % BSA/ 0,5 % Saponin-Lösung aufgefüllt. Nach dem Zentrifugieren (4000 rpm, 5 Min., RT) wurden die Zellen mit je 200 $\mu$ l der gleichen Lösung gewaschen. Zuletzt wurden die Zellen in je 400 $\mu$ l

PBS/0,5 % BSA-Lösung resuspendiert und unmittelbar danach durchflusszytometrisch analysiert.



**Abb. 9 :** Jurkat-Kulturen. Durchflusszytometrische Originaldaten nach Färbung der Zellen mit einem PE-positiven Antikörper. Erfassung der Eigenfluoreszenz der Jurkat-Zellen im Emissionsbereich von GFP und PE.



**Abb. 10 :** Jurkat-Kulturen nach Infektion mit *Legionella pneumophila* GFP-Lp1-Vir. Durchflusszytometrische Originalbilder nach Färbung der Jurkat-Zellen mit einem PE-positiven Antikörper. Erfassung der GFP- und PE-Fluoreszenz.

Auf den linken Diagrammen (Abb. 9 und 10) sind die Zellen nach Größe und Granularität aufgetragen. Die lebenden Jurkat-Zellen sind eingerahmt. Auf den rechten Diagrammen ist die lebende Zellpopulation nach relativer Stärke der GFP- und PE-Fluoreszenz aufgetragen. Mit **a** sind die GFP-negativen, PE-positiven Zellen bezeichnet, mit **b** die GFP-positiven, PE-positiven Zellen, mit **c** die GFP-negativen, PE-negativen Zellen und mit **d** die GFP-positiven, PE-negativen Jurkat-Zellen. Die leichte Fluoreszenz sowohl der als GFP-negativ als auch der als PE-negativ bezeichneten Zellpopulation wird durch unspezifische Eigenfluoreszenz der Jurkat-Zellen verursacht.

### 2.2.9. Western-Blotting

Zunächst wurden vertikale, 12,5 %ige SDS-Polyacrylamidgele mit folgender Zusammensetzung hergestellt :

	<b>Sammelgel</b>	<b>Trenngel</b>
UGB	3,75 ml	-----
LGB	-----	7,5 ml
Acrylamid	2,4 ml	12,6 ml
H <sub>2</sub> O	13,8 ml	9,9 ml
APS 10 %	70µl	180µl
Temed	30µl	30µl

Die fertigen Gele wurden in eine Elektrophoresekammer gestellt und mit 1x-Laufpuffer übergossen.

#### Western-Blotting mit Laemmli-Zelllysaten

Die sehr viskosen Laemmli-Zelllysate wurden nach dem Auftauen für wenige Sekunden mit Ultraschall behandelt. Die Extrakte wurden flüssiger, da die in den Extrakten vorhandene und die Viskosität verursachende DNS durch die Schallwellen geschert wurde. Anschließend wurden die Proben zur Denaturierung der Proteine für fünf Minuten bei 95°C erhitzt. Die Proben wurden zum Abkühlen auf Eis gestellt, danach zentrifugiert (13.000 rpm, 5 Min, RT) und die das Zytosol enthaltenden Überstände isoliert.

Das frisch hergestellte Gel wurde mit je 15µl zytosolischen Extrakt und 5µl Molekulargewichtsmarker geladen. Danach wurde die Elektrophorese mit folgenden Strom- und Spannungseinstellungen durchgeführt :

Sammelgel :     U = 130 V   ;    I = 34 mA

Trenngel    :     U = 180 V   ;    I = 44 mA

Die Gelelektrophorese wurde beendet, wenn die Bromphenolblau-Bande des Markers am unteren Rand des Gels angelangt war. Das Gel sowie die Nitrozellulosemembran wurden für einige Minuten in 1x-Transferpuffer äquilibriert.

Als nächstes wurden die Proteine unter Kühlung auf die Nitrozellulosemembran übertragen. Der Proteintransfer erfolgte in 1x-Transferpuffer für 1,5 h und folgenden Einstellungen :

U = 100 V   ;    I = 185 mA (zu Beginn des Transfervorgangs)

U = 100 V   ;    I = 226 mA (am Ende des Transfervorgangs)

Danach wurde die Nitrozellulosemembran für mindestens eine Stunde in MMP-Blockierpuffer gelegt, um unspezifische Proteinbindungen mit dem Blocker abzusättigen. Der Bloc-

kierungspuffer wurde verworfen und der Blot mit dem ersten Antikörper für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur oder gekühlt über Nacht inkubiert. Der Erstantikörper variierte je nach Versuch :

Anti-Caspase-3-Antikörper : 1 : 1000 , verdünnt in MMP-Blockierungspuffer

Anti-Caspase-8-Antikörper : 1 : 500 , verdünnt in MMP-Blockierungspuffer

Anti-Caspase-9-Antikörper : 1 : 1000 , verdünnt in MMP-Blockierungspuffer

Anschließend wurde die Membran dreimal für je zehn Minuten in TBS/Tween-Puffer gewaschen.

Als Zweitantikörper wurde abhängig vom ersten Antikörper einer der folgenden an Meerrettichperoxidase gekoppelten Antikörper eingesetzt :

Ziege-anti-Maus-Antikörper : 1 : 1000 , verdünnt in MMP-Blockierungspuffer

Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper : 1 : 3000 , verdünnt in MMP-Blockierungspuffer

Die Membran wurde für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit dem zweiten Antikörper inkubiert, danach mehrmals in TBS/Tween-Puffer gewaschen.

Im letzten Schritt wurde die Nitrozellulosemembran für eine Minute in Luminol- und Oxidationsreagenz (eingesetzt im Verhältnis 1 : 1) inkubiert. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase katalysiert zusammen mit Peroxid die Oxidation des Substrats Lumigen PS-3 Akridan. Als instabiles Zwischenprodukt entsteht Akridiniumester, der nach weiterer Reaktion mit Peroxid in zwei Endprodukte zerfällt. Eines dieser Produkte emittiert Licht, das zur Belichtung eines Films benutzt wird. Die Belichtung (mindestens eine Minute) und Entwicklung des Films erfolgten in der Dunkelkammer.

#### Western-Blotting mit NP40-Zelllysaten

NP40-Lysate wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Je nach geschätzter Menge der nachzuweisenden Caspase wurden entweder 10µl NP40-Zelllysate mit 2,5µl 4x-Laemmli-Puffer versetzt oder 20µl NP40-Probe mit 5µl 4x-Laemmli-Puffer. Anschließend wurden die Proben zur Denaturierung der Proteine bei 95°C fünf Minuten erhitzt und danach zum Abkühlen kurz auf Eis gelegt. Nach dem Zentrifugieren (13.000 rpm, 5 Min., RT) wurden 12µl oder 20µl zytosolischer Überstand und 5µl Molekulargewichtsmarker auf ein 12,5 %iges frisch hergestelltes SDS-Polyacrylamidgel appliziert.

Das weitere Vorgehen ist oben beschrieben.

### 2.2.10. Affinitätsblotting

Aus NP40-Lysaten wurden die Proteine durch Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das Verfahren ist bis zum Transfer der Proteine auf die Membran unter 2.2.9. beschrieben.

Die Nitrozellulosemembran wurde über Nacht bei 4°C in Net-Gelatine geblockt, dann für eine Stunde mit Neutravidin ( 1:5000, verdünnt mit Net-Gelatine) bei Raumtemperatur inkubiert. Neutravidin bindet dabei an das biotinylierte Ende des Effektorcaspasen-Inhibitors Bio-YVAD-faom. Anschließend wurde die Membran dreimal für je zehn Minuten mit Net-Gelatine gewaschen und mit biotinylierter Peroxidase ( 1:5000, verdünnt mit Net-Gelatine), die spezifisch an Neutravidin bindet, für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je zehn Minuten mit Net-Gelatine wurde die Membran für je eine Minute in Luminol- und Oxidationsreagenz (eingesetzt im Verhältnis 1:1) gelegt. Im Dunkelraum wurde ein Film mit der Membran belichtet und entwickelt.

### 2.2.11. Messung enzymatischer Aktivität

#### Caspase-3-Aktivität

NP40-Lysate wurden auf Eis aufgetaut. In der Zwischenzeit wurde zum Nachweis der Caspase-3-Aktivität folgender Substratpuffer hergestellt :

MDP-Puffer	:	100 % (v/v)	
BSA-Lsg.	:	1 % (v/v)	
CHAPS-Lsg.	:	1 % (v/v)	
Ac-DEVD-AMC	:	0,11 % (v/v)	= <b>Caspase-3-Substrat</b>
(c = 100mM)			

In eine Flachbodenplatte mit 96 Schälchen wurden als dreifacher Ansatz je 10µl Zellysate und 90µl Substratpuffer pipettiert. Weitere drei Schälchen wurden mit je 10µl NP40-Puffer und je 90µl Substratpuffer gefüllt, um die vom Photometer gemessene NP40-Puffer-Aktivität bei der Versuchsauswertung erfassen zu können. Die Proben wurden im Brutschrank für eine Stunde inkubiert.

Ac-DEVD-AMC ist ein synthetisches Substrat für Caspase-3. Das Tetrapeptid Asp-Glu-Val-Asp imitiert die Spaltungsstelle des physiologischen Caspase-3-Substrats Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP). Daran gekoppelt ist die fluorogene Verbindung 7-Amino-4-methyl-coumarin (AMC). Bei der Spaltung von Ac-DEVD-AMC durch Caspase-3 wird AMC freigesetzt. Die Intensität der Fluoreszenz von AMC wird direkt im Anschluss an die



---

Inkubation mit einem Millipore Cytofluor 2350 Fluoreszenzlesegerät bei  $\lambda = 460\text{nm}$  gemessen; sie korreliert mit der Menge an freigesetztem AMC und ist so ein Maß für die Aktivität von Caspase-3.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Induktion von Apoptose durch *Legionella pneumophila* in verschiedenen Zelllinien

##### 3.1.1. *Legionella pneumophila* induziert Apoptose in U937-Zellen

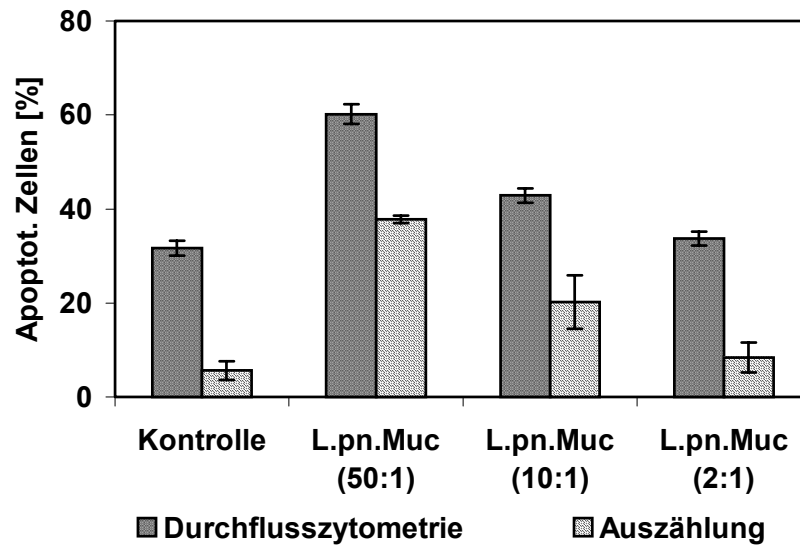
U937-Zellen sind humane monoblastische Leukämiezellen. Sie wurden als Versuchszellen gewählt, da sie als Vorläuferzellen der Makrophagen der unspezifischen Immunabwehr angehören und somit als Wirtszellen für Legionellen in Frage kommen. Als immortalisierte Zelllinie lassen sich U937-Zellen einfach in Kultur halten.

Es wurden mehrere Versuchsreihen mit U937-Kulturen durchgeführt. Dabei wurden neben der Infektionszeit und dem Legionellen-U937-Verhältnis die Legionellenspezies bzw. -stämme variiert, um Unterschiede zwischen einzelnen Stämmen und Isolaten beurteilen zu können. Folgende Legionellenstämme wurden ausgewählt: *Legionella pneumophila* Muc – isoliert von einem Patienten mit atypischer Pneumonie –, *Legionella pneumophila* Sg8 Concord und *Legionella pneumophila* Sg3 / Bloomington 2.

Vergleichend wurden Experimente mit *Legionella micdadei*, einer schwach virulenten Spezies und Erreger des Pontiac-Fiebers durchgeführt.

Zunächst sollte untersucht werden, wie potent Legionellen in U937-Zellen Apoptose induzieren.

U937-Kulturen wurden für 22 Stunden mit *Legionella pneumophila* Muc im Legionellen-U937-Verhältnis von 50:1, 10:1 oder 2:1 infiziert. Nach Ablauf der Infektionszeit wurde ein Teil der U937-Zellen zunächst fixiert, später nach PI-Färbung durchflusszytometrisch analysiert. Der andere Teil der U937-Zellen wurde mit dem Kernfarbstoff Hoechst No. 33342 gefärbt und unter einem Fluoreszenz-Mikroskop bei 40facher Vergrößerung ausgezählt. Dabei wurde Apoptose anhand der typischen Kernmorphologie (Kernmembranhyperchromatose, Karyopyknose und Apoptosekörperchen) beurteilt. Das Auftreten von Apoptose konnte somit mit einer unabhängigen Methode bestätigt werden.



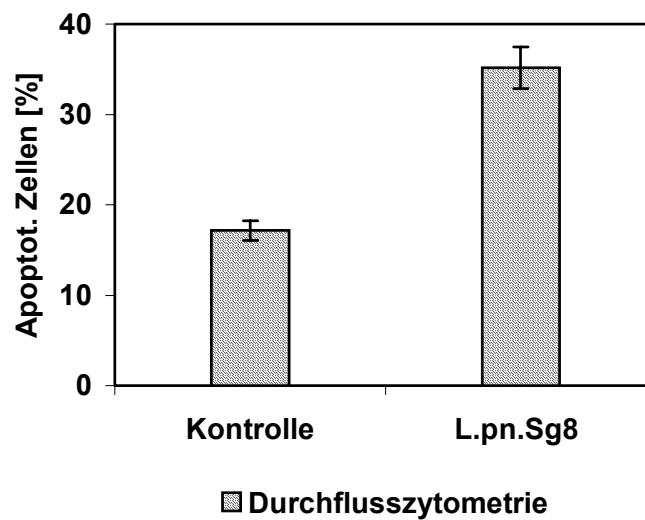
**Abb. 11:** *Legionella pneumophila* Muc induziert Apoptose in U937-Zellen. U937-Zellen ( $5 \cdot 10^5$  Zellen/Kulturansatz) wurden in 24-Lochplatten mit *Legionella pneumophila* Muc im Legionellen-U937-Verhältnis von 50:1, 10:1 oder 2:1 für 22 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde ein Teil der U937-Zellen mit Hoechst gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Der andere Teil wurde fixiert, mit PI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus je drei Ansätzen. Die Ergebnisse wurden in  $n = 3$  unabhängigen Experimenten bestätigt.

Wie in Abbildung 11 gezeigt, führte die Infektion der U937-Kulturen mit *Legionella pneumophila* Muc im Bakterien-U937-Verhältnis von 50:1 zu einem starken Anstieg der Apoptose-rate. Auch im Legionellen-U937-Verhältnis von 10:1 war noch eine klare Apoptoseinduktion erkennbar, nicht jedoch bei einem Bakterien-U937-Verhältnis von 2:1.

Sowohl mit durchflusszytometrischer Analyse als auch mit mikroskopischer Auszählung konnte ein ähnlicher Anstieg der Apoptoserate gemessen werden (Abb.11), so dass die Ergebnisse als valide betrachtet werden können.

In einem weiteren Experiment wurde ein anderer *Legionella pneumophila*-Stamm darauf getestet, ob er in U937-Kulturen Apoptose induziert. U937-Zellen wurden mit *Legionella pneumophila* Sg8 Concord im Legionellen-U937-Verhältnis von 50:1 für 21 Stunden inkubiert.

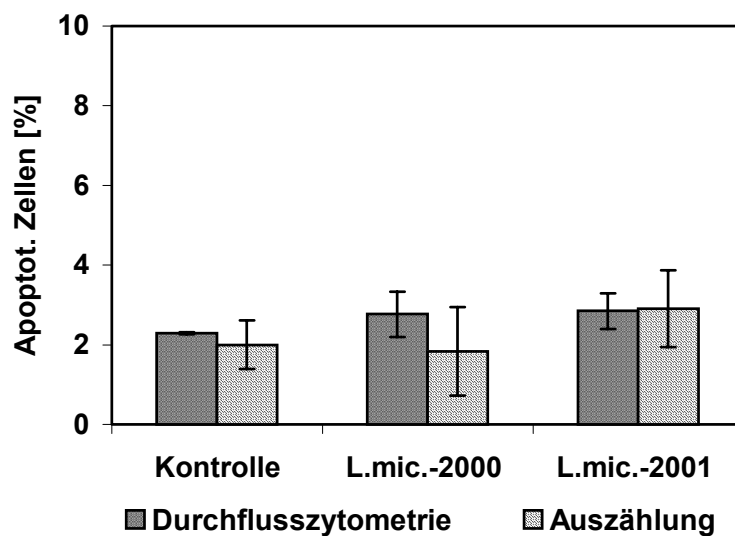
Die durchflusszytometrische Messung der mit PI gefärbten U937-Zellen ergab, dass auch dieser Legionellenstamm in U937-Zellen deutlich Apoptose induzierte (Abb.12).



**Abb. 12 :** *Legionella pneumophila* Sg8 Concord induziert Apoptose in U937-Zellen. Kulturen aus je  $5 \cdot 10^5$  U937-Zellen wurden für 21 Stunden mit *Legionella pneumophila* Sg8 Concord im Legionellen-U937-Verhältnis von 50:1 infiziert. Nach der Fixierung erfolgte die Färbung der U937-Zellen mit PI, anschließend die durchflusszytometrische Analyse. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus je drei Ansätzen. Die Ergebnisse wurden in  $n = 3$  unabhängigen Experimenten bestätigt.

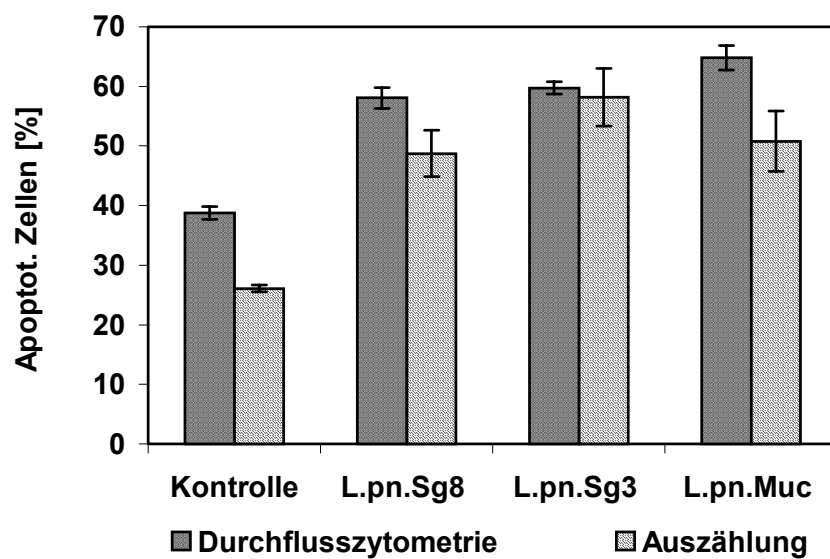
Interessant war es nun, zu überprüfen, ob *Legionella micdadei*, ein weniger virulenter Legionellenstamm, in seinen Wirtszellen zur Apoptoseinduktion fähig ist. Dazu wurden U937-Kulturen für 21 Stunden mit zwei Stämmen von *Legionella micdadei* in einem Legionellen-U937-Verhältnis von 50:1 infiziert.

Mittels durchflusszytometrischer Messung und Auszählung der infizierten U937-Kulturen konnte keine erkennbare Apoptose festgestellt werden (Abb.13).



**Abb. 13 :** *Legionella micdadei* 2000 und 2001 induzieren keine Apoptose in U937-Zellen. Die Infektion der U937-Kulturen ( $5 \cdot 10^5$  Zellen/Kulturansatz, 24-Lochplatten) erfolgte mit *Legionella micdadei* 2000 bzw. 2001 im Legionellen-U937-Verhältnis von 50:1 für 21 Stunden. Anschließend wurde ein Teil der U937-Zellen mit Hoechst gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt; der andere Teil wurde fixiert, mit PI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus je drei Ansätzen. Bestätigung der Ergebnisse in  $n = 3$  unabhängigen Experimenten.

Nachdem klar gezeigt werden konnte (siehe Abb.11-13), dass es nach eintägiger Infektion mit *Legionella pneumophila* zu einer deutlichen Zunahme apoptotischer U937-Zellen gekommen war, sollte als nächstes untersucht werden, ob längere Infektionszeiten einen weiteren Anstieg der Apoptoserate bewirken. Dazu wurden U937-Kulturen für 47 Stunden mit *Legionella pneumophila* Sg8 Concord, *Legionella pneumophila* Sg3/Bloomington 2 oder *Legionella pneumophila* Muc infiziert. Das Legionellen-U937-Verhältnis lag bei 50:1. Nach Ablauf der Infektionszeit erfolgte die gleiche Analyse wie in den oben beschriebenen Experimenten.



**Abb. 14 :** *Legionella pneumophila* Sg8 Concord, *L.pn* Sg3/Bloomington 2 und *L.pn*.Muc induzieren Apoptose in U937-Zellen. U937-Zellen ( $5 \cdot 10^5$  Zellen/Kulturansatz) wurden in 24-Lochplatten mit *Legionella pneumophila* Sg8 Concord, *L.pn*.Sg3/Bloomington 2 oder *L.pn*.Muc im Legionellen-U937-Verhältnis von 50:1 für 47 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Hälfte der U937-Zellen nach Färbung mit Hoechst unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Die restlichen U937-Zellen wurden fixiert. Nach PI-Färbung wurde die durchflusszytometrische Messung durchgeführt. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus je drei Ansätzen. Die Ergebnisse ließen sich in  $n = 2$  unabhängigen Experimenten reproduzieren.

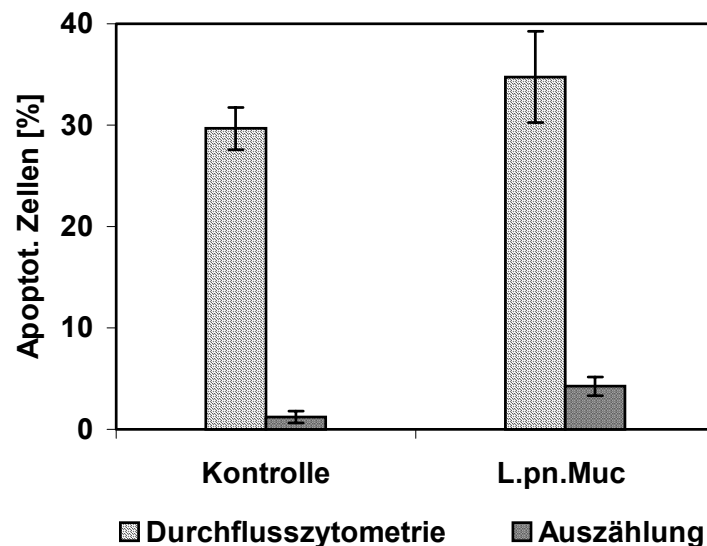
Erwartungsgemäß ließ sich eine Induktion von Apoptose bei den infizierten Kulturen durch durchflusszytometrische Messung und durch Auszählung der Zellkerne nachweisen (Abb.14). Nach zweitägiger Infektion kam es jedoch zu keiner größeren Zunahme apoptotischer Zellen, verglichen mit der Apoptoserate nach eintägiger Infektion (siehe Abb.11 und 12).

Dies ist ein interessanter Befund, der darauf hinweist, dass *Legionella pneumophila* nicht in allen Wirtszellen einer Population Apoptose induziert.

### 3.1.2. *Legionella pneumophila* induziert Apoptose in HL-60-Zellen

Nachdem die Versuche mit U937-Zellen gezeigt haben, dass *Legionella pneumophila* in diesen Zellen potent Apoptose induzieren kann, sollte nun untersucht werden, inwieweit sich dieses Ergebnis auf andere Zelllinien des Menschen übertragen lässt. Hierzu wurde zunächst die Induktion von Apoptose in HL-60-Zellen untersucht. HL-60-Zellen sind immortalisierte Zellen, die ursprünglich von einem Patienten mit akuter Promyelozyten-Leukämie isoliert wurden.

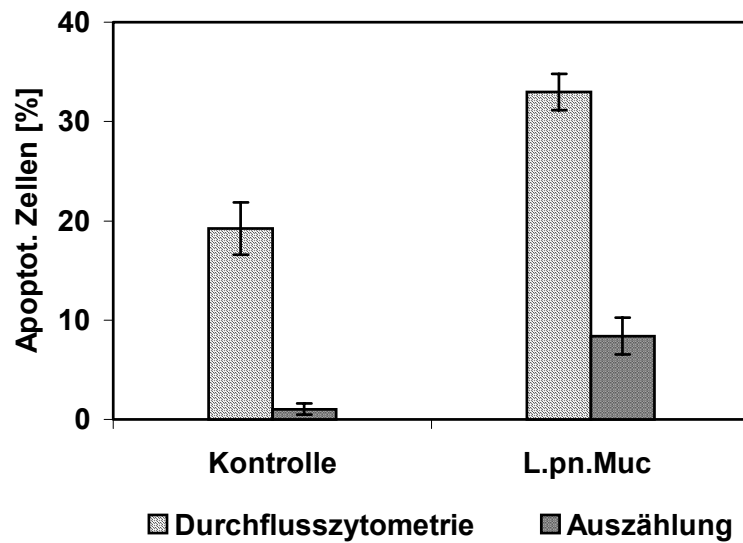
HL-60-Zellen wurden zunächst für 24 Stunden mit *Legionella pneumophila* Muc in einem Legionellen-HL-60-Verhältnis von 50:1 inkubiert.



**Abb. 15 :** *Legionella pneumophila* Muc induziert schwach Apoptose in HL-60-Zellen. Kulturen aus je  $5 \cdot 10^5$  HL-60-Zellen wurden für 24 Stunden mit *Legionella pneumophila* Muc im Legionellen-HL-60-Verhältnis von 50:1 infiziert. Ein Teil der HL-60-Zellen wurde mit Hoechst gefärbt und unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Der andere Teil der HL-60-Zellen wurde fixiert, später erfolgte die Färbung mit PI, anschließend die durchflusszytometrische Analyse. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus je drei Ansätzen. Die Ergebnisse wurden in  $n = 2$  unabhängigen Experimenten bestätigt.

Im Vergleich zu den U937-Kulturen (siehe 3.1.1.) war bei den HL-60-Kulturen nach eintägiger Infektion keine deutliche Zunahme apoptotischer Zellen nachweisbar (Abb.15).

Daher sollte überprüft werden, ob eine längere Infektion ( $t = 47\text{h}$ ) der HL-60-Kulturen mit *Legionella pneumophila* eine deutlichere Apoptoseinduktion bewirkt.



**Abb. 16 :** *Legionella pneumophila* Muc induziert Apoptose in HL-60-Zellen. Die Infektion der HL-60-Kulturen ( $5 \cdot 10^5$  Zellen/Kulturansatz, 24-Lochplatten) erfolgte für 47 Stunden mit *Legionella pneumophila* Muc im Legionellen- HL-60-Verhältnis von 50:1. Anschließend wurde ein Teil der HL-60-Zellen für die Auszählung unter dem Fluoreszenzmikroskop mit Hoechst gefärbt. Der andere Teil der HL-60-Zellen wurde nach der Fixierung mit PI gefärbt, dann durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus je drei Ansätzen. Bestätigung der Ergebnisse in n = 2 unabhängigen Experimenten.

Die durchflusszytometrische Messung und die Auszählung von Zellkernen ergaben bei den infizierten HL-60-Kulturen eine deutliche Zunahme apoptotischer Zellen nach 48 Stunden (Abb.16).

Insgesamt hat sich in den mehrmals durchgeführten Versuchen gezeigt, dass *Legionella pneumophila* in HL-60-Zellen wesentlich schwächer Apoptose induzierte als in U937-Zellen. Außerdem waren bei den HL-60-Kulturen für eine durchflusszytometrisch messbare Apoptoseinduktion längere Infektionszeiten nötig als bei den U937-Zellen. Während bei U937-Kulturen schon nach eintägiger Infektion mit *Legionella pneumophila* deutlich Apoptose messbar war, mussten HL-60-Kulturen für ein ähnliches Ergebnis durchschnittlich 48 Stunden infiziert werden.



### 3.1.3. *Legionella pneumophila* induziert Apoptose in Jurkat-Zellen

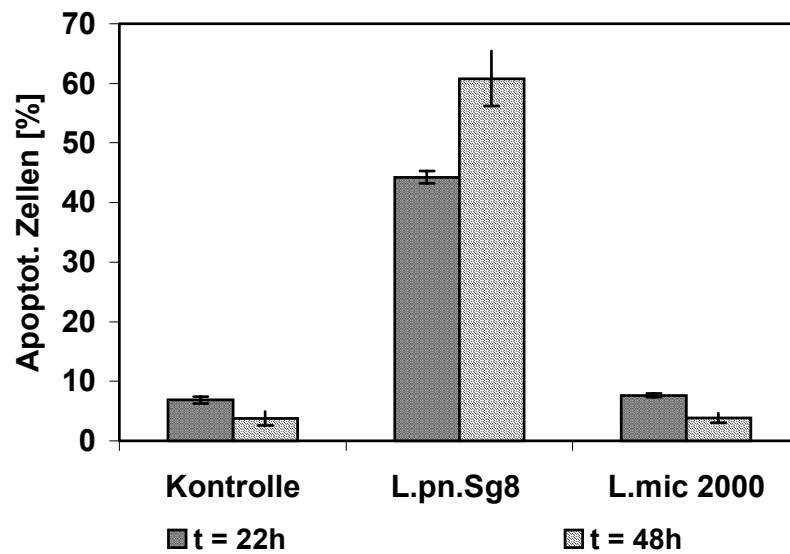
Neben den phagozytären Zellen der unspezifischen Immunabwehr, wie Monozyten und Granulozyten, leisten bei der Bekämpfung bakterieller Infektionen auch T- und B-Lymphozyten, die zur spezifischen Immunabwehr gezählt werden, einen wesentlichen Beitrag. Für die Infektion mit *Legionella pneumophila* wurde direkt gezeigt, dass eine Effektorleistung von T-Zellen für die Immunantwort von wesentlicher Bedeutung ist (Susa *et al.*, 1998). T-Zellen kommen demnach sehr wahrscheinlich *in vivo* direkt in Kontakt mit Legionellen, so dass sich die Frage stellt, ob Legionellen auch in T-Zellen Apoptose induzieren können.

Die Ergebnisse der vorangegangenen Versuche zeigen, dass *Legionella pneumophila* in myeloiden Zellen Apoptose induziert.

Es sollte daher untersucht werden, welche Wirkung Legionellen auf T-Zellen haben. Dazu wurde zunächst die Leukämiezelllinie Jurkat verwendet, in späteren Experimenten primäre T-Lymphozyten. Jurkat-Zellen bieten den Vorteil, dass ihr Apoptosesystem in vielen Arbeiten extrem gut untersucht und daher genau beschrieben ist (u.a. Juo *et al.*, 1999 und 1998 ; Chinnayan *et al.*, 1996c ; Fernandes-Alnemri *et al.*, 1994).

Jurkat-Kulturen wurden entweder für 22 Stunden oder für 48 Stunden mit *Legionella pneumophila* Sg8 Concord oder *Legionella micdadei* 2000 im Legionellen-Jurkat-Verhältnis von 50:1 infiziert.

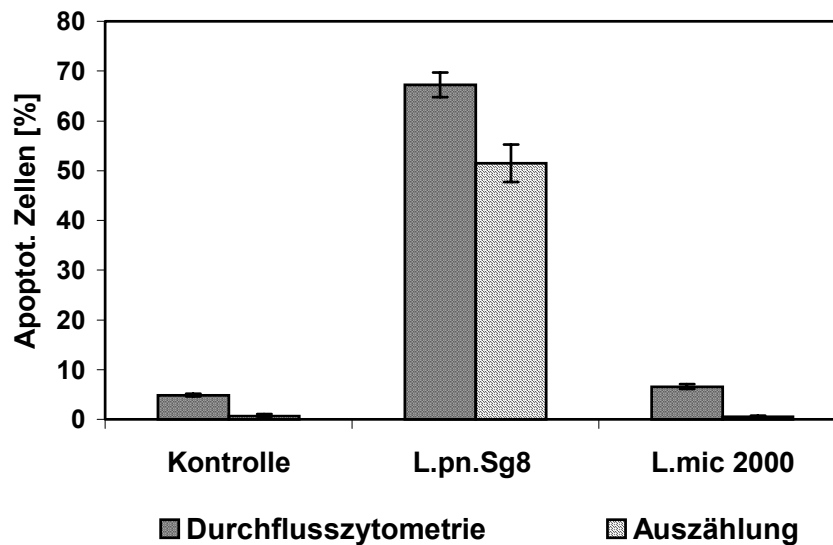
Wie in Abbildung 17 dargestellt, konnte sowohl nach 22-stündiger als auch nach 48-stündiger Infektion von Jurkat-Zellen mit *Legionella pneumophila* Sg8 Concord ein deutlicher Anstieg der Apoptoserate festgestellt werden. Ebenso wie bei den U937-Zellen erfolgte das Gros der Apoptoseinduktion innerhalb der ersten 24 Stunden der Infektion. *Legionella micdadei* 2000 induzierte keine erkennbare Apoptose.



**Abb. 17** : *Legionella pneumophila* Sg8 Concord induziert Apoptose in Jurkat-Zellen; keine Apoptoseinduktion durch *Legionella micdadei* 2000. Jurkat-Zellen ( $5 \cdot 10^5$  Zellen/Kulturansatz) wurden in 24-Lochplatten mit *Legionella pneumophila* Sg8 Concord oder *Legionella micdadei* 2000 im Legionellen-Jurkat-Verhältnis von 50:1 für 22 oder 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Jurkat-Zellen fixiert, mit PI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus je drei Ansätzen. Die Ergebnisse wurden in  $n = 3$  unabhängigen Experimenten bestätigt.

In einem weiteren Ansatz wurde zur Sicherung der Ergebnisse ein Teil der Zellkerne nach Hoechst-Färbung unter dem Mikroskop ausgezählt, um Apoptose anhand des Kriteriums der Kernmorphologie zu messen.

Die durchflusszytometrischen Ergebnisse konnten mit dieser unabhängigen Methode bestätigt werden (Abb.18).

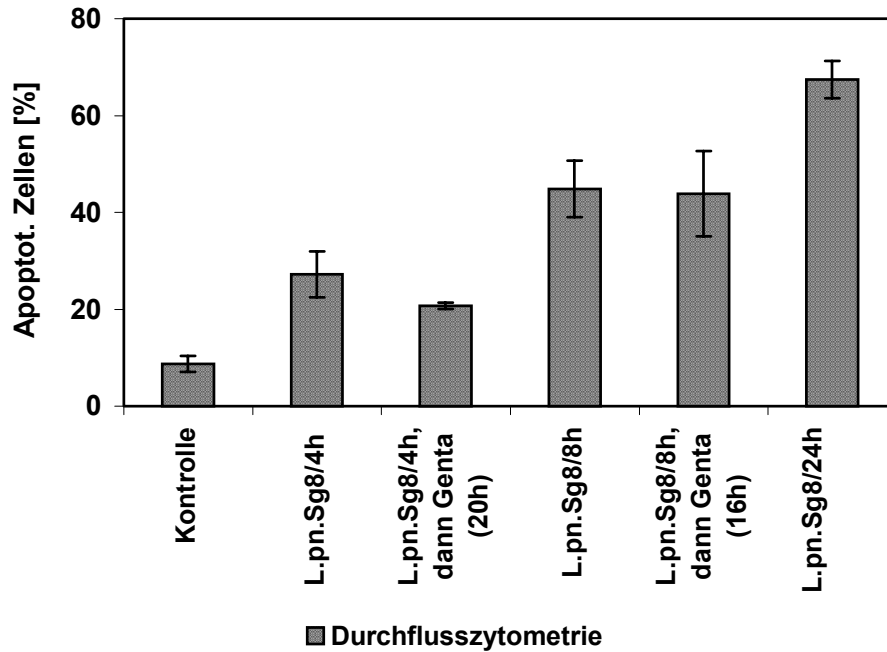


**Abb. 18 :** *Legionella pneumophila* Sg8 Concord induziert Apoptose in Jurkat-Zellen; keine Apoptoseinduktion durch *Legionella micdadei* 2000. Kulturen aus  $5 \cdot 10^5$  Jurkat-Zellen wurden für 29 Stunden mit *Legionella pneumophila* Sg8 Concord oder *Legionella micdadei* 2000 im Legionellen-Jurkat-Verhältnis von 50:1 bei 37°C infiziert. Danach wurde die Hälfte der Jurkat-Zellen nach Färbung mit Hoechst unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Die andere Hälfte wurde zunächst fixiert. Die durchflusszytometrische Messung wurde nach PI-Färbung durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus je drei Ansätzen. Die Ergebnisse ließen sich in  $n = 3$  unabhängigen Experimenten reproduzieren.

Legionellen besitzen das Potential, in menschliche Zellen einzudringen (Payne & Horwitz, 1987). In obigen Experimenten war keine Differenzierung möglich, ob Apoptose durch extra- oder intrazelluläre Legionellen verursacht wird. Deshalb wurde in folgendem Versuch das Aminoglykosid-Antibiotikum Gentamicin eingesetzt, in dessen Wirkungsspektrum Legionellen fallen. Gentamicin tötet nur extrazelluläre Bakterien ab; die Beurteilung der Apoptose in Abwesenheit und Gegenwart von Gentamicin bietet also die Möglichkeit, den Effekt von extra- bzw. intrazellulären Bakterien darzustellen.

Jurkat-Kulturen wurden mit *Legionella pneumophila* Sg8 Concord im Legionellen-Jurkat-Verhältnis von 50:1 für vier, acht oder 24 Stunden infiziert. Nach Ablauf der Infektionszeit wurde ein Teil der Jurkat-Zellen fixiert, um die Apoptoseinduktion bis zu diesem Zeitpunkt später durchflusszytometrisch messen zu können.

Der andere Teil der Jurkat-Zellen wurde in sterilem PBS gewaschen, um extrazelluläre Legionellen zu entfernen. Anschließend wurden die Jurkat-Zellen in gentamicinhaltigem Nährmedium (100µg Gentamicin/ml) resuspendiert und bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden ab dem Zeitpunkt der Infektion wurde der Versuch beendet. Die Jurkat-Zellen wurden fixiert und zur durchflusszytometrischen Analyse mit Propidiumiodid gefärbt.



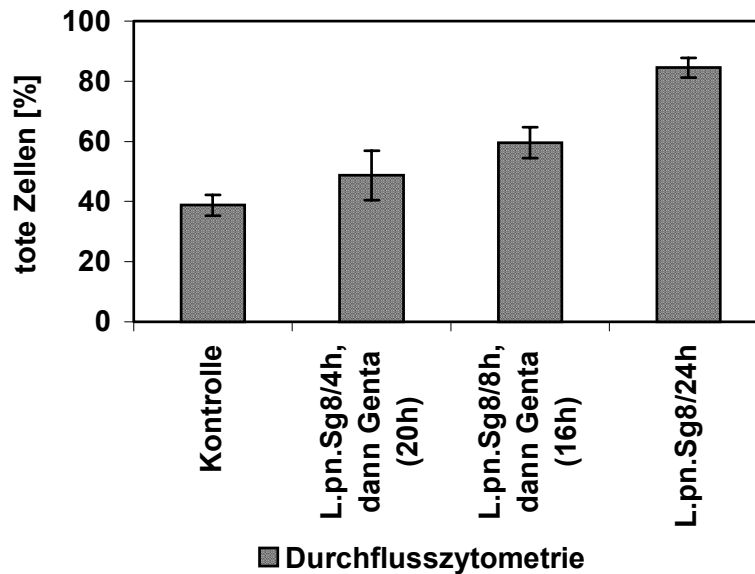
**Abb. 19 :** Kinetik der Apoptoseinduktion durch *Legionella pneumophila* Sg8 Concord in Jurkat-Zellen. Für die Infektion der Jurkat-Kulturen ( $5 \cdot 10^5$  Zellen/Kulturansatz, 24-Lochplatten) wurde *Legionella pneumophila* Sg8 Concord im Legionellen-Jurkat-Verhältnis von 50:1 verwendet. Die Infektionszeiten lagen bei vier, acht oder 24 Stunden. Am Ende der Infektionszeit wurde ein Teil der Jurkat-Zellen fixiert. Der andere Teil wurde mit PBS gewaschen, in gentamicinhaltigem Nährmedium resuspendiert und bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden ab Infektion wurden die Jurkat-Kulturen fixiert. Für die durchflusszytometrische Messung wurde eine PI-Färbung durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus je drei Ansätzen. Bestätigung der Ergebnisse in  $n = 3$  unabhängigen Experimenten.

Schon nach einer Infektionsdauer von vier Stunden war ein deutlicher Anstieg apoptotischer Jurkat-Zellen nachweisbar (Abb.19). Je länger die Infektion andauerte, desto größer wurde die Zahl apoptotischer Zellen. Die Apoptoseraten der mit Gentamicin behandelten Jurkat-Zellen unterschieden sich kaum von denen der unbehandelten Jurkat-Zellen. Daraus kann geschlossen werden, dass extrazelluläre Legionellen – wahrscheinlich jedoch nicht intrazelluläre Legionellen – Apoptose induzieren, da nach Einsatz von Gentamicin keine weitere Apoptoseinduktion beobachtet wurde.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde die Kinetik der Apoptoseinduktion durch *Legionella pneumophila* Sg8 Concord unter Einfluss von Gentamicin mit einer anderen Methode untersucht. Dabei wurden am Ende der Infektion die Jurkat-Kulturen sofort mit Propidiumiodid gefärbt, da mit dieser Färbemethode eine Abgrenzung von toten und lebendigen Zellen möglich ist.

Jurkat-Kulturen wurden für vier, acht oder 24 Stunden mit *Legionella pneumophila* Sg8 bei 37°C infiziert. Nach Ablauf der Infektionszeit wurden die Jurkat-Zellen in sterilem PBS gewaschen, um extrazelluläre Legionellen zu entfernen. Danach wurden die Zellen in Nähr-

medium, das 100µg/ml Gentamicin enthielt, resuspendiert, um noch verbliebene Legionellen abzutöten. Die Jurkat-Zellen wurden bei 37°C inkubiert. 24 Stunden nach dem Zeitpunkt der Infektion wurde der Versuch beendet. Die Jurkat-Zellen wurden mit Propidiumiodid gefärbt und sofort durchflusszytometrisch analysiert.



**Abb. 20 :** Kinetik der Apoptoseinduktion durch *Legionella pneumophila* Sg8 Concord in Jurkat-Zellen. Jurkat-Zellen ( $10^6$  Zellen/Kulturansatz) wurden in 12-Lochplatten mit *Legionella pneumophila* Sg8 Concord im Legionellen-Jurkat-Verhältnis von 50:1 für vier, acht oder 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Jurkat-Zellen mit PBS gewaschen, in gentamicinhaltigem Nährmedium resuspendiert und bei 37°C inkubiert. 24 Stunden nach der Infektion wurden die Jurkat-Kulturen mit PI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus je drei Ansätzen. Die Ergebnisse wurden in  $n = 2$  unabhängigen Experimenten bestätigt.

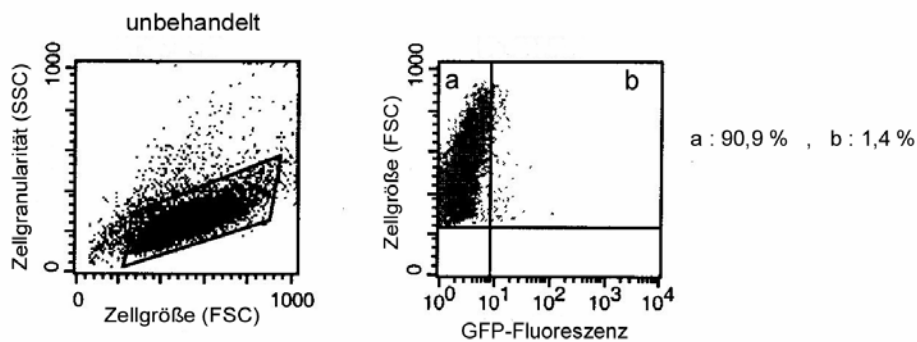
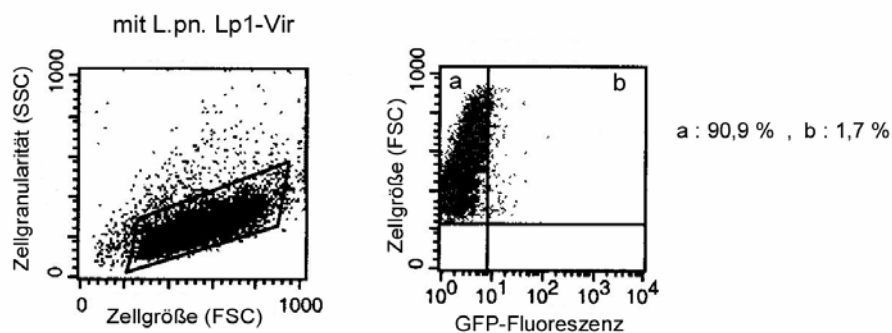
Die durchflusszytometrische Analyse der gefärbten Jurkat-Zellen ergab, dass der Anteil der toten Zellen, der auch die apoptotischen Zellen erfasst, größer wird, je länger die Infektion mit *Legionella pneumophila* Sg8 andauert (Abb. 20). Trotz weiterer Inkubation der Jurkat-Zellen bei 37°C nach Entfernen der extrazellulären Legionellen kam es nicht – wie bei Apoptoseinduktion durch intrazelluläre Legionellen zu erwarten wäre – zu einer Angleichung der Apoptoseraten nach 24 Stunden.

Daraus kann gefolgert werden, dass die Apoptoseinduktion bei Jurkat-Zellen entweder durch extrazelluläre Legionellen bewirkt wird oder dass die Legionellen im Laufe der Zeit aus den Jurkat-Zellen hinausgehen und dann durch Gentamicin abgetötet werden.

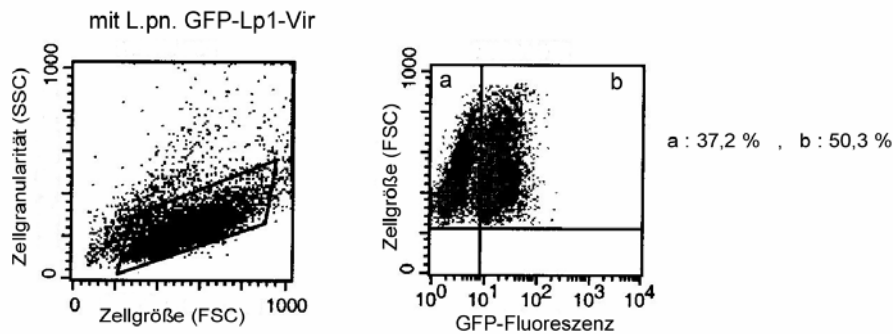
Um die Kinetik des Eindringens der Legionellen in ihre Wirtszellen zu bestimmen, wurde in folgenden Versuchen der grün fluoreszierendes Protein (GFP) exprimierende *Legionella pneumophila*-Stamm GFP-Lp1-Vir eingesetzt.

GFP lässt sich in der durchflusszytometrischen Analyse nachweisen. Dadurch ist es möglich, den Anteil der Wirtszellen zu bestimmen, der mit GFP-exprimierenden Legionellen Kontakt hat. Als entsprechende Kontrolle diente *Legionella pneumophila* Lp1-Vir.

Jurkat-Zellen wurden für zwei, sechs oder 24 Stunden mit den Legionellenstämmen Lp1-Vir oder GFP-Lp1-Vir im Legionellen-Jurkat-Verhältnis von 50:1 infiziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 21A-C).

**A****B**

C



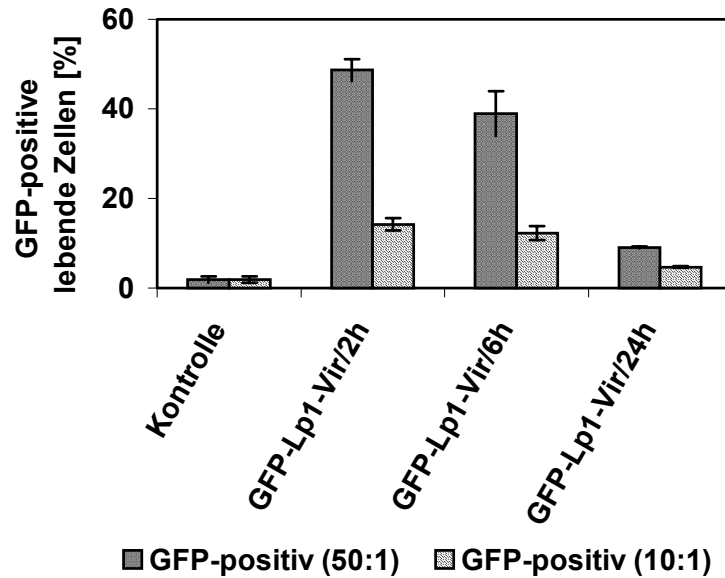
**Abb. 21 :** *Legionella pneumophila* GFP-Lp1-Vir dringt in Jurkat-Zellen ein. Jurkat-Zellen ( $5 \cdot 10^5$  Zellen/ Kulturansatz) wurden in 24-Lochplatten überführt und **A)** unbehandelt oder **B)** mit *Legionella pneumophila* Lp1-Vir (Negativkontrolle) oder **C)** *Legionella pneumophila* GFP-Lp1-Vir im Legionellen-Jurkat-Verhältnis von 50:1 für zwei Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die Jurkat-Zellen fixiert und durchflusszytometrisch analysiert. Auf den linken Diagrammen sind die Jurkat-Zellen nach Größe und Granularität aufgetragen. Die lebenden Jurkat-Zellen sind eingrahmt. Auf den rechten Diagrammen ist die lebende Jurkat-Population nach Stärke der GFP-Fluoreszenz und Zellgröße aufgetragen. Mit **a** werden die GFP-negativen Zellen bezeichnet, die leichte Fluoreszenz wird durch die Eigenfluoreszenz der Jurkat-Zellen hervorgerufen. Mit **b** werden die GFP-positiven Zellen bezeichnet. Dargestellt sind Originaldaten aus einem repräsentativen Versuch. Die Ergebnisse wurden in  $n = 2$  unabhängigen Experimenten bestätigt.

Auf Abbildung 21C ist ersichtlich, dass *Legionella pneumophila* GFP-Lp1-Vir schon nach zweistündiger Infektion in einen erheblichen Anteil der Jurkat-Zellen eingedrungen war. Ferner fällt auf, dass die lebende Jurkat-Population aus GFP-positiven Zellen und GFP-negativen Zellen bestand.

Das deutet darauf hin, dass *Legionella pneumophila* nicht von allen Jurkat-Zellen aufgenommen wird. Spätere Untersuchungen infizierter Jurkat-Kulturen mit einem konfokalen Mikroskop bestätigten diese durchflusszytometrischen Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Der Anteil GFP-positiver Zellen war nach zweistündiger Infektion im Legionellen-Jurkat-Verhältnis von 50:1 am größten und nahm bei längerer Infektionsdauer ab. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei einem Bakterien-Zellen-Verhältnis von 10:1 (Abb. 22).

Den Gründen für dieses interessante Ergebnis wurde nicht nachgegangen. Vorstellbar ist, dass GFP von den Legionellen nicht mehr exprimiert wurde und folglich nicht mehr gemessen werden konnte. Zusammen mit den Ergebnissen der Versuche mit Gentamicin ist es jedoch sehr wahrscheinlich, dass die Legionellen nach einiger Zeit – zum Beispiel nach der Replikation – ihre Wirtszellen wieder verlassen haben.



**Abb. 22 :** GFP-positive Jurkat-Zellen nach Infektion mit *Legionella pneumophila* GFP-Lp1-Vir. Kulturen aus  $5 \cdot 10^5$  Jurkat-Zellen wurden für zwei, sechs oder 24 Stunden mit *Legionella pneumophila* GFP-Lp1-Vir im Legionellen-Jurkat-Verhältnis von 50:1 oder 10:1 infiziert. Nach der Fixierung der Jurkat-Zellen erfolgte die durchflusszytometrische Analyse. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus je zwei Ansätzen. Die Ergebnisse ließen sich in  $n = 2$  unabhängigen Experimenten reproduzieren.

### 3.1.4. *Legionella pneumophila* induziert Apoptose in primären humanen mononukleären Zellen

U937-, HL-60- und Jurkat-Zellen sind humane Leukämiezelllinien mit unbegrenztem Vermehrungspotential. Der Nachteil solcher Zellen ist, dass sie sich weit von normalen Zellen entfernt haben und somit Experimente mit ihnen möglicherweise nur eingeschränkt die Vorgänge widerspiegeln, die in „normalen“ Zellen des Immunsystems bei bakterieller Infektion physiologisch ablaufen.

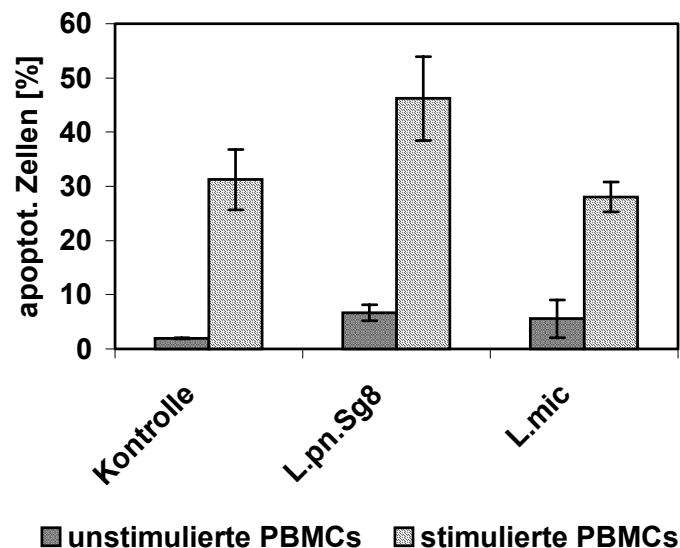
Deshalb wurden für folgende Versuche primäre humane mononukleäre Zellen verwendet, um herauszufinden, ob und in welchem Umfang Legionellen in diesen Zellen Apoptose induzieren.

Es wurde zunächst peripheres Venenblut eines gesunden Spenders abgenommen. Die mononukleären Zellen wurden durch Zentrifugation über einem Dichtegradienten ( $\rho = 1,077$  g/ml) isoliert. Ca. 70 % der mononukleären Zellen im Blut sind T-Lymphozyten, ca. 20 % B-Lymphozyten, ca. 5 % Natural-Killer-Zellen und ca. 5 % Monozyten.

Die Hälfte der noch unstimulierten mononukleären Zellen (PBMCs) wurde sofort mit *Legionella pneumophila* Sg8 Concord oder *Legionella micdadei* 2000 im Legionellen-PBMC-Verhältnis von 50:1 für 24 Stunden inkubiert.



Der andere Teil der PBMCs wurde für 72 Stunden mit Phytohämagglutinin stimuliert, einem Pflanzenmitogen, das eine hohe Selektivität für T-Zellen aufweist (Henkart & Fisher, 1975). Ziel war es, die T-Zellen zur Proliferation, zur Differenzierung in T-Helfer-Zellen und zytotoxische T-Zellen und zur Produktion von Zytokinen anzuregen. Die stimulierten PBMCs wurden danach ebenfalls mit *Legionella pneumophila* Sg8 Concord oder *Legionella micdadei* 2000 im Legionellen-PBMC-Verhältnis von 50:1 für 24 Stunden inkubiert.



**Abb. 23 :** *Legionella pneumophila* Sg8 Concord induziert Apoptose in primären humanen mononukleären Zellen (PBMCs); keine Apoptoseinduktion durch *Legionella micdadei* 2000. Primäre humane mononukleäre Zellen wurden aus venösem Vollblut isoliert. Ein Teil der PBMCs ( $5 \cdot 10^5$  Zellen/Kulturansatz) wurde unstimuliert in 12-Lochplatten mit *Legionella pneumophila* Sg8 Concord oder *Legionella micdadei* 2000 im Legionellen-PBMC-Verhältnis von 50:1 für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die PBMCs fixiert, mit PI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Der andere Teil der PBMCs wurde für 72 Stunden mit 10µg/ml Phytohaemagglutinin bei 37°C stimuliert. Danach wurden die stimulierten mononukleären Zellen ( $2,5 \cdot 10^5$  Zellen/Kulturansatz ; 12-Lochplatten) mit *Legionella pneumophila* Sg8 Concord oder *Legionella micdadei* 2000 im Legionellen-PBMC-Verhältnis von 50:1 für 24 Stunden inkubiert. Nach der Fixierung wurden die PBMCs mit PI gefärbt, eine Stunde später wurde die durchflusszytometrische Messung durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus je drei Ansätzen. Die Ergebnisse wurden in n = 2 unabhängigen Experimenten bestätigt.

Die Inkubation der unstimulierten PBMCs sowohl mit *Legionella pneumophila* Sg8 Concord als auch mit *Legionella micdadei* 2000 führte zu keiner deutlichen Zunahme der Apoptoserate (Abb.23).

Anders verhielt es sich bei der Inkubation der stimulierten PBMCs ( v.a. T-Lymphozyten) mit *Legionella pneumophila* Sg8 Concord. Hier konnte eine gewisse Zunahme der Apoptoserate beobachtet werden (Abb.23). Bei den mit *Legionella micdadei* 2000 inkubierten stimulierten PBMCs war durchflusszytometrisch keine Änderung der Apoptoserate zu erfassen.

## 3.2. Analyse der Aktivierung des Apoptosewegs durch *Legionella pneumophila*

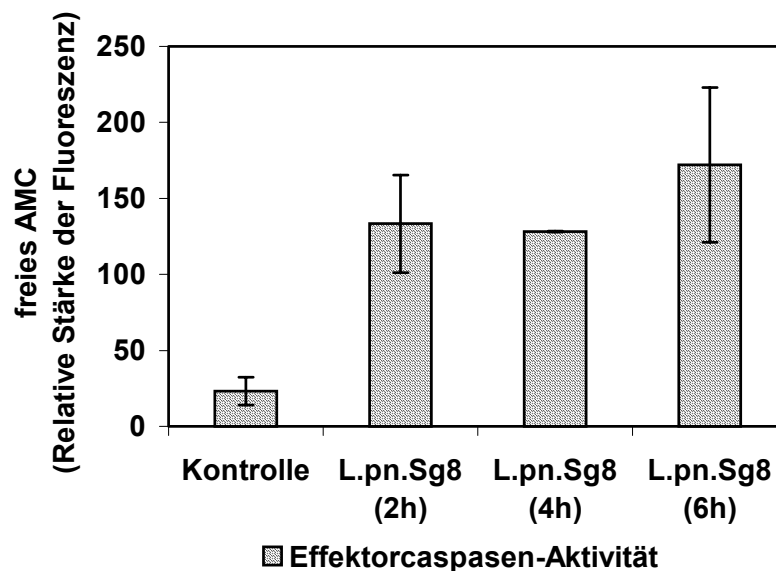
### 3.2.1. Aktivierung von Effektorcaspasen

Ein wesentliches Charakteristikum der Apoptose ist die Aktivierung von Effektorcaspasen, zu denen die Caspasen-3, -6 und -7 gezählt werden.

Um herauszufinden, ob in Zellen des Menschen nach Inkubation mit *Legionella pneumophila* Effektorcaspasen aktiv sind, wurde in einem Enzymtest die Aktivität dieser Caspasen gemessen.

Die synthetische Verbindung Ac-DEVD-AMC (Nicholson *et al.*, 1995) enthält die fluorogene Verbindung 7-Amino-4-methyl-coumarin (AMC), die durch Effektorcaspasen – insbesondere Caspase-3- abgespalten wird und mit einem Fluoreszenzlesegerät in Zelllysaten und intakten Zellen (Mack *et al.*, 2000) gemessen werden kann. Als Maß für die Aktivität von Effektorcaspasen dient die Stärke der Fluoreszenz.

Jurkat-Kulturen wurden für zwei, vier oder sechs Stunden mit *Legionella pneumophila* Sg8 Concord im Legionellen-Jurkat-Verhältnis von 50:1 infiziert, danach lysiert. Der zytosolische Überstand wurde mit Ac-DEVD-AMC inkubiert, anschließend wurde die Menge des abgespaltenen AMC gemessen.



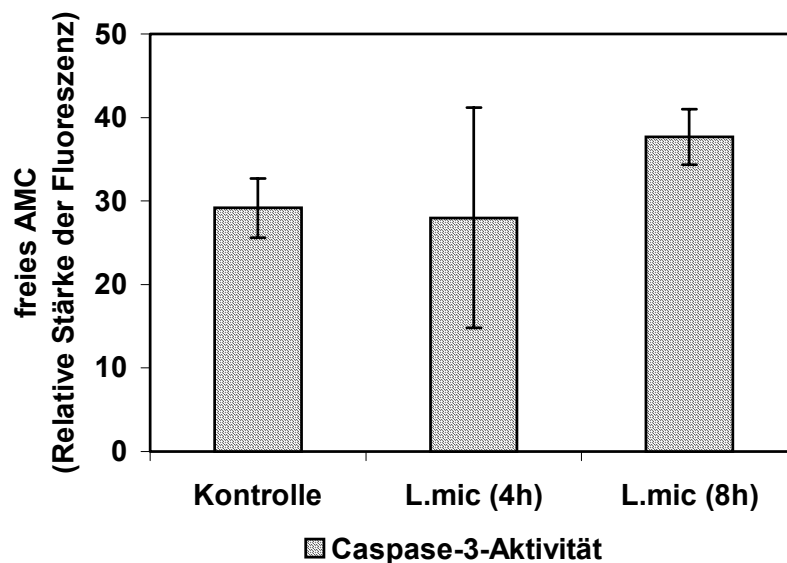
**Abb. 24 :** Effektorcaspasen-Aktivität in Jurkat-Zellen nach Infektion mit *Legionella pneumophila* Sg8 Concord. Kulturen aus  $10^6$  Jurkat-Zellen wurden für zwei, vier oder sechs Stunden mit *Legionella pneumophila* Sg8 Concord im Legionellen-Jurkat-Verhältnis von 50:1 bei 37°C infiziert. Anschließend wurden die Jurkat-Zellen lysiert. Dem zytosolischen Überstand wurde Ac-DEVD-AMC zugesetzt, nach einer Stunde wurde die relative Fluoreszenz von freiem AMC mit dem Fluoreszenzlesegerät Millipore Cytofluor 2350 gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus je zwei Ansätzen. Die Ergebnisse wurden in n = 3 unabhängigen Experimenten bestätigt.

Nach Infektion der Jurkat-Kulturen mit *Legionella pneumophila* kam es zur Aktivierung von Effektorcaspasen (Abb.24). Die Aktivität erreichte schon nach zwei Stunden ein stabiles Plateau (Abb.24). Bei Infektionszeiten von mehr als zwölf Stunden zeigte sich eine Aktivitätsabnahme (Daten nicht gezeigt).

Mittels durchflusszytometrischen Messungen war es nicht möglich, Apoptoseinduktion in Jurkat-Zellen durch *Legionella micdadei* nachzuweisen (siehe Abb.17 und 18). Es sollte nun untersucht werden, ob durch die Messung von freiem AMC, einer sensitiveren Methode, Effektorcaspasen-Aktivität in infizierten Jurkat- Kulturen nachgewiesen werden kann.

Dazu wurden Jurkat-Zellen für vier oder acht Stunden mit *Legionella micdadei* 2000 im Legionellen-Jurkat-Verhältnis von 50:1 inkubiert.

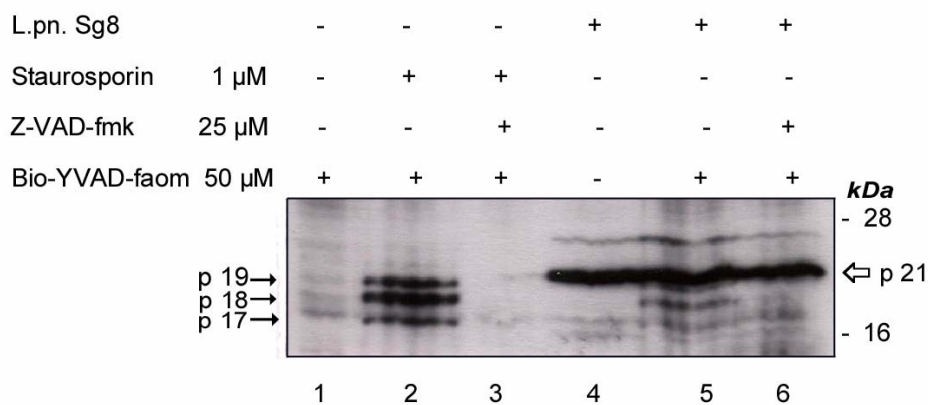
Die Messung von freiem AMC ergab, dass durch *Legionella micdadei* 2000 keine Effektorcaspasen aktiviert worden waren (Abb. 25).



**Abb. 25 :** Caspase-3-Aktivität in Jurkat-Zellen nach Infektion mit *Legionella micdadei* 2000. Die Infektion der Jurkat-Kulturen ( $10^6$  Zellen/Kulturansatz, 24-Lochplatten) erfolgte mit *Legionella micdadei* 2000 im Legionellen-Jurkat-Verhältnis von 50:1 für einen Zeitraum von vier oder acht Stunden. Nach der Lyse der Jurkat-Zellen wurde dem zytosolischen Überstand Ac-DEVD-AMC zugesetzt. Die relative Fluoreszenz von freiem AMC wurde eine Stunde später mit dem Fluoreszenzlesegerät Millipore Cytofluor 2350 gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus je zwei Ansätzen. Bestätigung der Ergebnisse in  $n=2$  unabhängigen Experimenten.

Um die nach Infektion mit *Legionella pneumophila* beobachtete Aktivierung von Effektorcaspasen mit einer unabhängigen Methode zu bestätigen, wurden diese Caspasen in folgendem Experiment mit biotinylierten Peptiden gekoppelt. Dabei wird das am N-Terminus biotinylierte Tetrapeptid Tyr-Val-Ala-Asp von den aktivierten Caspasen-1, -3, -6 und -7 gebunden (Faleiro *et al.*, 1997). Der Komplex aus Tetrapeptid und Caspase kann durch Affinitäts-Blotting mit Neutravidin und biotinylierter Peroxidase nachgewiesen werden (Thornberry *et al.*, 1994 ; Faleiro *et al.*, 1997 ; Mesner *et al.*, 1999).

Jurkat-Kulturen wurden mit *Legionella pneumophila* Sg8 Concord im Legionellen-Jurkat-Verhältnis von 50:1 für sieben Stunden infiziert. Als Positivkontrolle für die Caspasenaktivierung wurden Jurkat-Zellen für drei Stunden mit 1µM des Proteinkinaseinhibitors Staurosporin inkubiert. Staurosporin induziert potent Apoptose über die Caspasen-9 und -3. Anschließend wurden einem Teil der Versuchsansätze zur Spezifitätskontrolle 25µM des Tripeptids Z-VAD-fmk zugesetzt, das über eine Hemmung der Caspase-9 eine Aktivierung der Caspase-3 verhindert. Danach erfolgte die Inkubation der Proben mit 50µM Bio-Tyr-Val-Ala-Asp-faom (Bio-YVAD-faom). Nach Lyse der Jurkat-Zellen wurden die zytosolischen Extrakte für das Affinitätsblotting verwendet.



**Abb. 26 :** Nachweis von Effektorcaspasen in Jurkat-Zellen nach Infektion mit *Legionella pneumophila* Sg8 Concord. Jurkat-Zellen ( $10^6$  Zellen/Kulturansatz) wurden in 12-Lochplatten überführt und entweder unbehandelt gelassen (Spur 1) oder mit *Legionella pneumophila* Sg8 Concord im Legionellen-Jurkat-Verhältnis von 50:1 für sieben Stunden bei 37°C infiziert (Spur 4-6) oder mit 1µM Staurosporin für drei Stunden bei 37°C inkubiert (Spur 2 und 3). Nach Ablauf der Infektionszeit wurden einem Teil der Versuchsansätze 25µM Z-VAD-fmk für fünf Minuten zugesetzt (Spur 3 und 6). Anschließend wurden die Proben für eine halbe Stunde mit 50µM Bio-YVAD-faom bei 37°C inkubiert. Die Jurkat-Zellen wurden gewaschen und lysiert. Die zytosolischen Extrakte wurden für den Affinitätsblot verwendet. Die 17, 18 und 19 kDa schweren Proteine p17, p18 und p19 sind aktivierte Effektorcaspasen. Die Bande (⇒) im Bereich von 21 kDa ist sehr wahrscheinlich ein von den Sekundärreagenzien gebundenes Legionellenprotein. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus  $n = 2$  unabhängigen Experimenten.

---

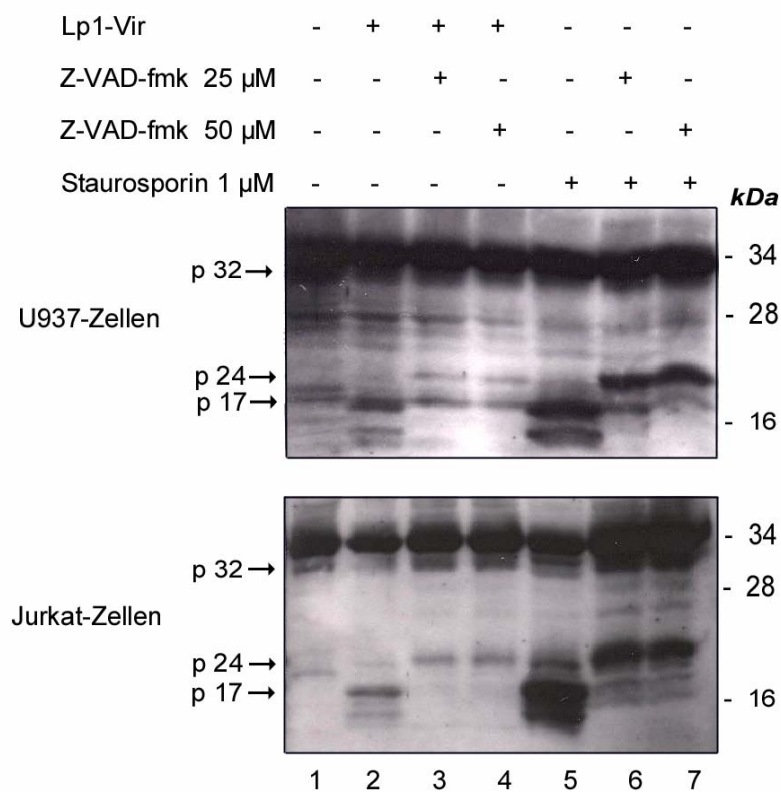
Wie erwartet kam es nach Inkubation der Jurkat-Zellen mit *Legionella pneumophila* Sg8 Concord zur Aktivierung von Effektorcaspasen (Abb.26 / Spur 5). Die gleichen Banden zeigten sich in stärkerer Ausprägung bei den mit Staurosporin behandelten Jurkat-Zellen (Spur 2). Bei den nicht infizierten Kontrollzellen konnte allenfalls eine geringe Caspasenaktivierung nachgewiesen werden (Spur 1). Z-VAD-fmk inhibierte vollständig die Bindung von Bio-YVAD-faom an aktivierte Caspasen (Spuren 3 und 6). In allen mit Legionellen infizierten Proben (Spuren 4-6) trat eine starke Bande im Bereich von 21 kDa auf, die auch in der nicht mit Bio-YVAD-faom gekoppelten Probe detektiert wurde (Spur 4). Vermutlich handelte es sich dabei um ein Legionellenprotein, das von den Sekundärreagenzien Biotin oder Avidin gebunden worden war.

Insgesamt konnte nachgewiesen werden, dass *Legionella pneumophila* gleichartig wie Staurosporin die Prozessierung von Effektorcaspasen induziert.

### 3.2.2. Aktivierung von Caspase-3

Als nächstes sollte speziell die Aktivierung der Effektorcaspase-3 in infizierten Zellkulturen untersucht werden.

Für das Western-Blot-Verfahren wurden U937- und Jurkat-Kulturen mit *Legionella pneumophila* Lp1-Vir im Legionellen-Wirtszellen-Verhältnis von 50:1 für vier Stunden infiziert. Einem Teil dieser infizierten Zellkulturen wurde zusätzlich der Caspaseninhibitor Z-VAD-fmk zugesetzt. Außerdem erfolgte als Positivkontrolle für die Apoptoseinduktion die Inkubation einiger Versuchsansätze mit Staurosporin.



**Abb. 27 :** Prozessierung von Caspase-3 in U937-Kulturen und Jurkat-Kulturen nach Infektion mit *Legionella pneumophila* Lp1-Vir. Kulturen aus  $2 \cdot 10^6$  U937-Zellen und  $2 \cdot 10^6$  Jurkat-Zellen wurden entweder als Kontrollansätze angelegt (Spur 1) oder für vier Stunden mit *Legionella pneumophila* Lp1-Vir im Legionellen-U937/Jurkat-Verhältnis von 50:1 bei 37°C infiziert (Spuren 2-4) oder für drei Stunden mit 1  $\mu$ M Staurosporin bei 37°C inkubiert (Spuren 5-7). Zusätzlich wurden einem Teil der Versuchsansätze 25  $\mu$ M Z-VAD-fmk (Spuren 3 und 6) oder 50  $\mu$ M Z-VAD-fmk (Spuren 4 und 7) zugesetzt. Nach Lyse der U937/Jurkat-Zellen wurde in den zytosolischen Extrakten durch Western-Blotting Caspase-3 nachgewiesen. Das 32 kDa schwere Protein p32 ist Procaspase-3, das 24 kDa schwere Protein p24 entsteht als Zwischenform bei der Prozessierung der p17-Untereinheit von aktiver Caspase-3, p17 ist die 17 kDa schwere Untereinheit von aktiver Caspase-3. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus n = 4 unabhängigen Experimenten.

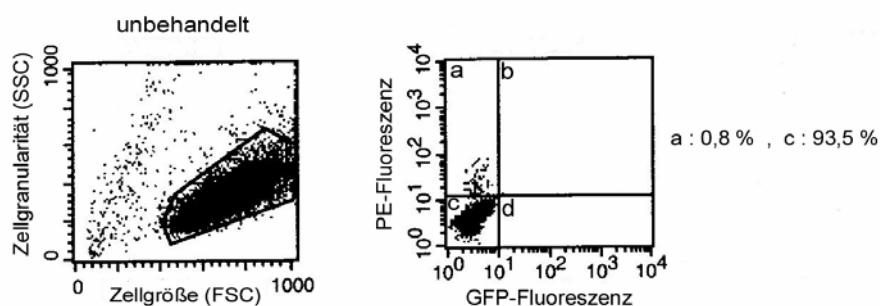
Die Infektion von U937- und Jurkat-Kulturen mit *Legionella pneumophila* Lp1-Vir induzierte ebenso wie Staurosporin (Abb.27 / Spur 5) eine Prozessierung von Procaspase-3 zu Caspase-3 (Spur 2). Z-VAD-fmk inhibierte die Aktivierung von Caspase-3 (Spuren 3, 4, 6, 7).

In beiden Western-Blots stellte sich in den Spuren 3, 4, 6 und 7 eine zusätzliche Bande im Bereich von 24 kDa dar. Bei diesem Protein handelt es sich um eine bei der Prozessierung der p17-Untereinheit von aktiver Caspase-3 entstehende Zwischenform, in der noch die Prodomäne von Caspase-3 enthalten ist.

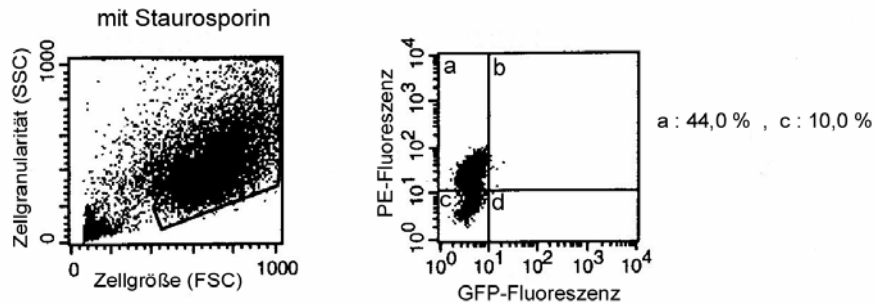
Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde Caspase-3 als nächstes durch ein immunzytochemisches Verfahren nachgewiesen. Zur Detektion von aktiver Caspase-3 wurde ein spezifischer Antikörper benutzt, der von einem weiteren mit Phycoerythrin-konjugierten Antikörper gebunden wird und dadurch durchflusszytometrisch dargestellt werden kann.

Nur Zellen, in denen Caspase-3 aktiviert ist, binden in diesem Verfahren die Antikörper und sind PE-positiv. Mit dem Einsatz GFP-exprimierender Legionellen konnten die Jurkat-Zellen gemessen werden, in die Legionellen eingedrungen waren. Die Kombination aus PE-konjugiertem Antikörper und GFP-exprimierenden Legionellen ermöglichte herauszufinden, in welcher Zellpopulation (Legionellen enthaltend oder nicht) Caspase-3 aktiv ist.

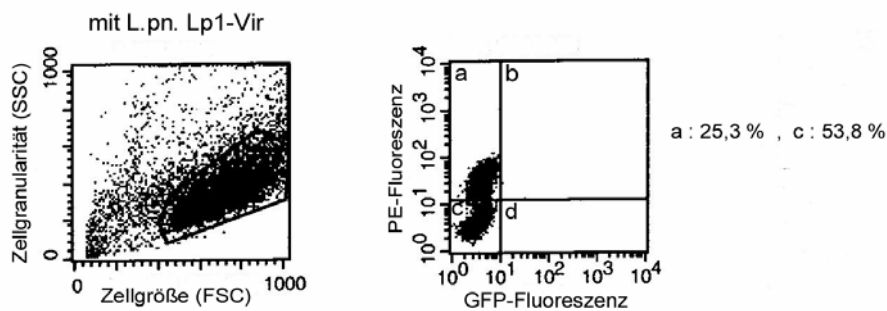
Jurkat-Kulturen wurden mit den Legionellenstämmen Lp1-Vir oder GFP-Lp1-Vir für 4,5 Stunden infiziert. Als Positivkontrolle für die Caspase-3-Aktivierung wurden weitere Jurkat-Zellen für vier Stunden mit Staurosporin inkubiert.

**A**

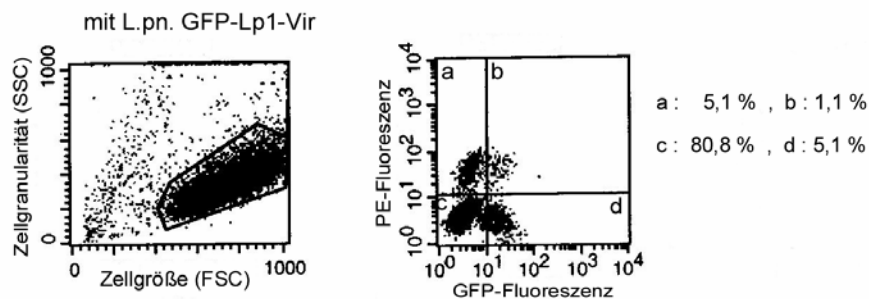
## B



## C



## D



**Abb. 28** : Nachweis von aktiver Caspase-3 und GFP in Jurkat-Zellen. Jurkat-Zellen ( $10^6$  Zellen/Kulturansatz) wurden in 24-Lochplatten überführt und **A**) unbehandelt, **B**) mit Staurosporin für vier Stunden, **C**) mit *Legionella pneumophila* Lp1-Vir oder **D**) mit *Legionella pneumophila* GFP-Lp1-Vir im Legionellen-Jurkat-Verhältnis von 50:1 für je 4,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Versuchszeit wurden die Zellen zunächst fixiert, dann mit PBS-0,5% BSA-0,5% Saponin-Lösung gewaschen und anschließend nacheinander mit Anti-Caspase-3-Antikörper und Phycoerythrin-konjugiertem Zweitantikörper inkubiert. Unmittelbar darauf erfolgte die durchflusszytometrische Analyse. Auf den linken Diagrammen sind die Jurkat-Zellen nach Größe und Granularität aufgetragen. Die lebenden Zellen sind eingerahmt. Auf den rechten Diagrammen ist die lebende Zellpopulation nach GFP-Fluoreszenz und PE-Fluoreszenz aufgetragen. Die Stärke der PE-Fluoreszenz korreliert mit dem Vorhandensein von aktiver Caspase-3, die GFP-Fluoreszenz mit dem Vorhandensein von Legionellen. Mit „a“ sind die GFP-negativen, Caspase-3-positiven Jurkat-Zellen bezeichnet, mit „b“ die GFP-positiven, Caspase-3-positiven Zellen, mit „c“ die GFP-negativen, Caspase-3-negativen Zellen und mit „d“ die GFP-positiven, Caspase-3-negativen Jurkat-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus  $n = 2$  unabhängigen Experimenten.



Mit diesem Experiment (Abb.28 A-D) konnte klar gezeigt werden, dass Caspase-3 in Jurkat-Zellen nach Inkubation mit *Legionella pneumophila* aktiviert wird. *Legionella pneumophila* Lp1-Vir bewirkte in Zellen infizierter Kulturen eine stärkere Caspase-3-Aktivität als *Legionella pneumophila* GFP-Lp1-Vir (Abb.28 C, D). Ein möglicher Grund dafür könnte in einer geringeren Virulenz der transfizierten GFP-haltigen Legionellen liegen. Am stärksten induzierte Staurosporin Caspase-3 (Abb.28 B). Interessant ist, dass im weitaus größeren Teil der Caspase-3-positiven Jurkat-Zellen keine Legionellen nachweisbar waren (Abb.28 D). Das weist darauf hin, dass Legionellen zwar in Jurkat-Zellen penetrieren können, die Wirtszellen aber nach einiger Zeit wieder verlassen. Die Apoptose wird sehr wahrscheinlich – dafür sprechen auch die Ergebnisse der mit Gentamicin durchgeführten Versuche (siehe Abb.19 und 20) – über extrazelluläre Legionellen induziert.

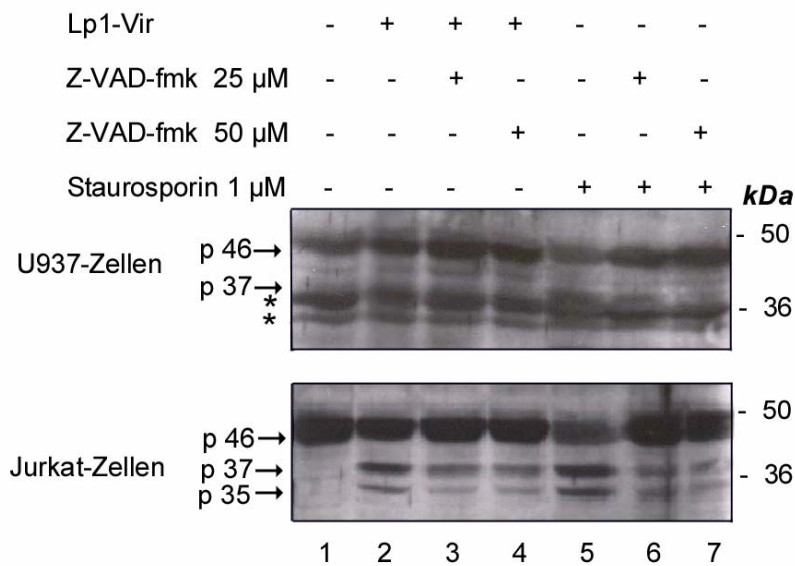
### 3.2.3. Aktivierung von Caspase-9

Der Nachweis von Caspase-3 in den mit Legionellen infizierten Zellkulturen warf die Frage auf, wie es zur Aktivierung dieser Caspase gekommen war.

Da Caspase-3 sowohl von Caspase-9 als auch Caspase-8 aktiviert werden kann (siehe Einleitung), wurde davon ausgegangen, dass wenigstens eine dieser Caspasen durch Western-Blotting nachweisbar sein muss.

Zunächst sollte untersucht werden, ob eine Infektion mit *Legionella pneumophila* die Aktivierung von Caspase-9 induziert. Unter den gleichen Versuchsbedingungen wie in 3.2.2. wurden U937- und Jurkat-Kulturen mit *Legionella pneumophila* Lp1-Vir infiziert.

In beiden infizierten Zellkulturen – in Jurkat-Kulturen deutlicher als in U937-Kulturen – konnte aktivierte Caspase-9 nachgewiesen werden (Abb.29 / Spur 2). Besonders ausgeprägt war die Aktivierung von Caspase-9 in den mit dem Proteinkinaseinhibitor Staurosporin inkubierten Zellkulturen (Spur 5). Z-VAD-fmk konnte die Aktivierung von Caspase-9 zwar nicht vollständig inhibieren, dafür aber sichtbar abschwächen (Spuren 3, 4, 6, 7).



**Abb. 29 :** Prozessierung von Caspase-9 in U937-Kulturen und Jurkat-Kulturen nach Infektion mit *Legionella pneumophila* Lp1-Vir. U937-Kulturen ( $2 \cdot 10^6$  Zellen/Kulturansatz) und Jurkat-Kulturen ( $2 \cdot 10^6$  Zellen/Kulturansatz) wurden in 12-Lochplatten überführt und entweder unbehandelt gelassen (Spur 1) oder mit *Legionella pneumophila* Lp1-Vir im Legionellen-U937/Jurkat-Verhältnis von 50:1 für vier Stunden bei 37°C infiziert (Spuren 2-4) oder mit 1  $\mu$ M Staurosporin für drei Stunden bei 37°C inkubiert (Spuren 5-7). Einem Teil der Versuchsansätze wurden 25  $\mu$ M Z-VAD-fmk (Spuren 3 und 6) oder 50  $\mu$ M Z-VAD-fmk (Spuren 4 und 7) zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und lysiert. In den zytosolischen Extrakten wurde durch Western-Blotting Caspase-9 nachgewiesen. Das 46 kDa schwere Protein p46 ist Procaspase-9, das 37 kDa schwere Protein p37 ist eine Untereinheit von aktiver Caspase-9. Das bei den Jurkat-Zellen darstellbare 35 kDa schwere Protein p35 ist die andere Untereinheit von aktiver Caspase-9. Die mit \* markierten Banden sind unspezifische Hintergrundbanden. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus  $n = 4$  unabhängigen Experimenten.

Aufgrund der unterschiedlichen Proteinexpression in U937- und Jurkat-Zellen traten bei den U937-Zellen, nicht jedoch bei den Jurkat-Zellen, unspezifische Hintergrundbanden im Western-Blotting auf.

Mit beiden Westernblots (Abb.29) konnte gezeigt werden, dass *Legionella pneumophila* gleichermaßen wie Staurosporin zur Caspase-9-Aktivierung führt.

### 3.2.4. Bcl-2 schützt Wirtszellen vor Apoptoseinduktion durch *Legionella pneumophila*

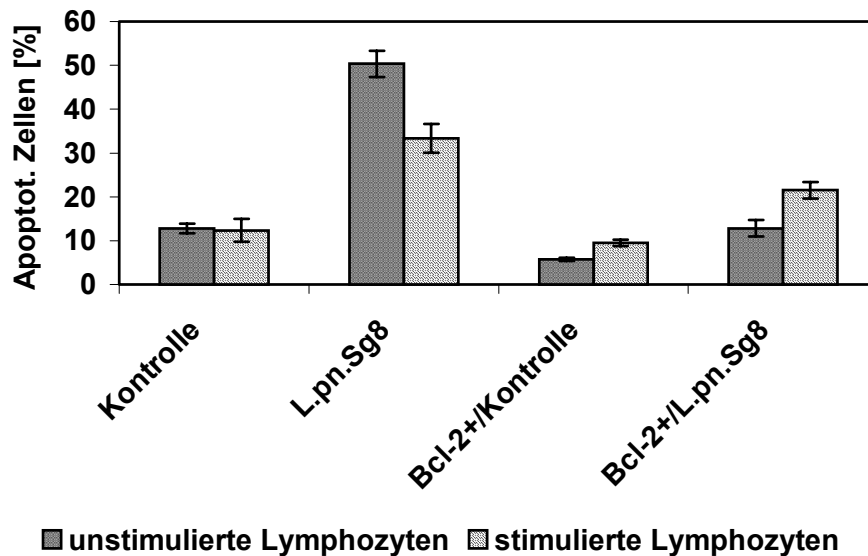
Das integrale Membranprotein Bcl-2 ist hauptsächlich in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und schützt die Zelle vor Apoptose (siehe Einleitung). Da Bcl-2 an der Regulation von Apoptose über Caspase-9 beteiligt ist, war es interessant zu untersuchen, ob Bcl-2 die Apoptoseinduktion durch Legionellen verhindern kann.

Bei Mäusen des Stammes vav-bcl-2 wird humanes Bcl-2 in allen lymphoiden und myeloiden Zellen exprimiert (Ogilvy *et al.*, 1999).

In folgendem Versuch wurde die Apoptoseinduktion durch Legionellen in Bcl-2-exprimierenden Lymphozyten der Maus untersucht. Lymphozyten des Mausstammes C57B1/6 wurden als Kontrollen eingesetzt. Mononukleäre Zellen wurden aus den axillären, inguinalen und mesenterialen Lymphknoten der Tiere isoliert. 70-80 % der Zellen in Lymphknoten der Maus sind T-Lymphozyten, die restlichen Zellen sind B-Lymphozyten und Makrophagen.

Ein Teil der Lymphozyten wurde unstimuliert mit *Legionella pneumophila* Sg8 Concord im Legionellen-Lymphozyten -Verhältnis von 50:1 für 24 Stunden inkubiert. Der andere Teil der Lymphozyten wurde für 60 Stunden mit Interleukin-2 und Concanavalin A, einem pflanzlichen Mitogen, das selektiv T-Zellen stimuliert, inkubiert. Anschließend wurden die aktivierten Zellen mit *Legionella pneumophila* Sg8 Concord im Legionellen-Lymphozyten-Verhältnis von 50:1 für 24 Stunden inkubiert.

Wie in Abbildung 30 gezeigt, kam es nach Inkubation sowohl von unstimulierten Lymphozyten als auch von stimulierten Lymphozyten mit *Legionella pneumophila* Sg8 Concord zu einer deutlichen Zunahme apoptotischer Zellen. Im Gegensatz dazu ließ sich bei den Bcl-2-überexprimierenden Lymphozyten nach Inkubation mit Legionellen nur ein geringer Anstieg der Apoptoserate nachweisen. Somit konnte gezeigt werden, dass Bcl-2 Apoptose, induziert durch *Legionella pneumophila*, verhindern kann.



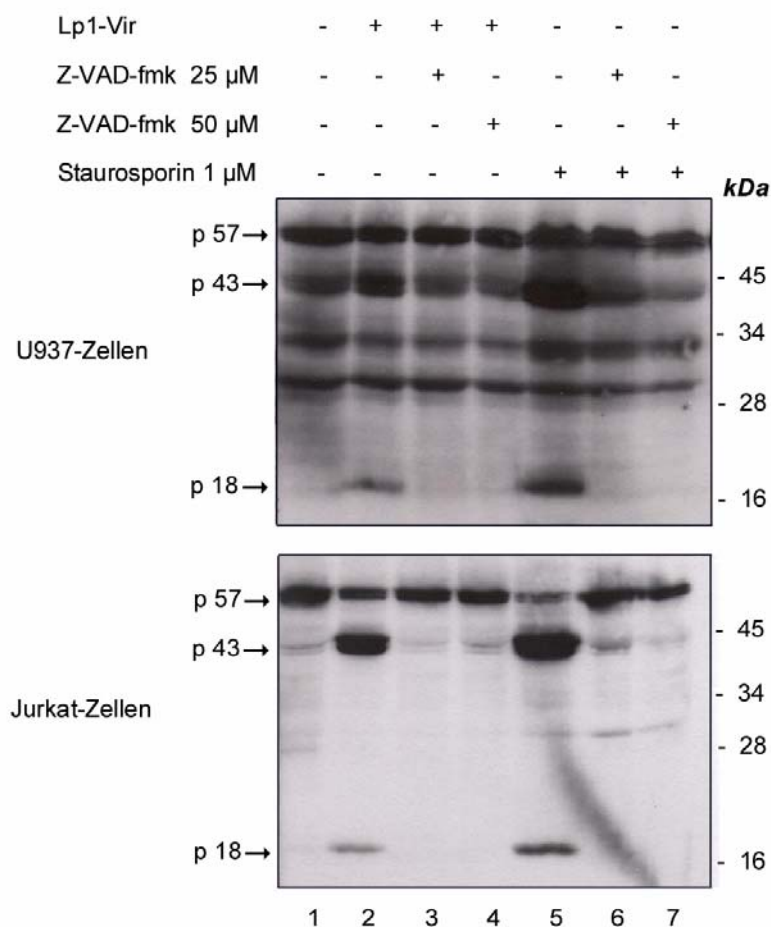
**Abb. 30 :** Bcl-2 schützt Lymphozyten vor Apoptose, induziert durch *Legionella pneumophila* Sg8 Concord. Mononukleäre Zellen von Mäusen der Stämme C57B1/6 und vav-bcl-2 wurden aus axillären, inguinalen und mesenterialen Lymphknoten isoliert. Ein Teil der Zellen ( $10^6$  Zellen/Kulturansatz) wurde in 12-Lochplatten mit *Legionella pneumophila* Sg8 Concord im Legionellen-Lymphozyten-Verhältnis von 50:1 für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Lymphozyten fixiert, mit PI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Der andere Teil der Zellen wurde mit 10U/ml Interleukin-2 und 2µM Concanavalin A für 60 Stunden stimuliert. Danach erfolgte die Infektion der aktivierten Zellkulturen ( $1,5 \cdot 10^5$  Zellen/Kulturansatz, 12-Lochplatten) mit *Legionella pneumophila* Sg8 Concord im Legionellen-Lymphozyten-Verhältnis von 50:1 für 24 Stunden. Nach Ablauf der Infektionszeit wurden die Zellen fixiert. Nach der Färbung mit PI wurde die durchflusszytometrische Messung durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus je drei Ansätzen. Die Ergebnisse ließen sich in n = 2 unabhängigen Experimenten reproduzieren.

### 3.2.5. Aktivierung von Caspase-8

Zur Aktivierung von Caspase-8 kann es über verschiedene Signalwege kommen (siehe Einleitung). Ein Signalweg beginnt mit der Aktivierung des Todesrezeptors Fas, der dann das Adaptorprotein FADD rekrutiert. FADD vermittelt die Bindung von aktiviertem Fas an Procaspase-8. Nach Oligomerisation aktiviert sich Procaspase-8 durch Selbstspaltung zu Caspase-8. Danach aktiviert Caspase-8 Caspase-3. Ein anderer Mechanismus der Caspase-8-Aktivierung verläuft zuerst über Caspase-3. Caspase-3 wird über den mitochondrialen Signalweg aktiviert und aktiviert anschließend Caspase-6. Caspase-6 spaltet Caspase-8, die dadurch möglicherweise aktiviert wird.

Zunächst sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob Caspase-8 bei Infektion mit *Legionella pneumophila* aktiviert wird und durch Western-Blotting nachweisbar ist.

U937-Kulturen und Jurkat-Kulturen wurden mit *Legionella pneumophila* Lp1-Vir im Legionellen-Wirtszellen-Verhältnis von 50:1 für vier Stunden infiziert. Außerdem wurde ein Teil der Versuchsansätze für drei Stunden mit 1  $\mu$ M des Proteinkinaseinhibitors Staurosporin inkubiert, um Apoptose über den mitochondrialen Signalweg zu induzieren. Einem Teil der Versuchsansätze wurde zusätzlich der Caspaseninhibitor Z-VAD-fmk zugesetzt.



**Abb. 31** : Prozessierung von Caspase-8 in U937-Kulturen und Jurkat-Kulturen nach Infektion mit *Legionella pneumophila* Lp1-Vir. Je Versuchsansatz wurden Kulturen von  $2 \cdot 10^6$  U937-Zellen oder  $2 \cdot 10^6$  Jurkat-Zellen verwendet. Spur 1: unbehandelte Kontrollansätze. Spuren 2-4: Infektion mit *Legionella pneumophila* Lp1-Vir im Legionellen-U937/Jurkat-Verhältnis von 50:1 für vier Stunden. Spuren 5-7: Inkubation mit 1  $\mu$ M Staurosporin für drei Stunden. Spuren 3 und 6: Zusatz von 25  $\mu$ M ZVAD-fmk. Spuren 4 und 7: Zusatz von 50  $\mu$ M Z-VAD-fmk. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und lysiert. In den zytosolischen Extrakten wurde durch Western-Blotting Caspase-8 nachgewiesen. Das 57 kDa schwere Protein p57 ist Procaspase-8, das 43 kDa schwere Protein p43 ist ein bei der Prozessierung von Caspase-8 auftretendes Zwischenprodukt, mit p18 ist die 18 kDa schwere Untereinheit von aktiver Caspase-8 bezeichnet. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus  $n = 4$  unabhängigen Experimenten.

Auf beiden Westernblots (Abb.31) zeigt sich eine deutliche Prozessierung von Caspase-8 bei den mit *Legionella pneumophila* Lp1-Vir infizierten U937- und Jurkat-Kulturen (Spur 2). Die 18 kDa schwere aktive Untereinheit von Caspase-8 konnte nach Legionelleninfektion sowie nach Inkubation mit Staurosporin in beiden Zelllinien nachgewiesen werden (Spuren 2 und 5). Die Zugabe von Z-VAD-fmk inhibierte sowohl bei den Jurkat-Zellen als auch bei den U937-Zellen die Aktivierung von Caspase-8 (Spuren 3, 4, 6, 7).

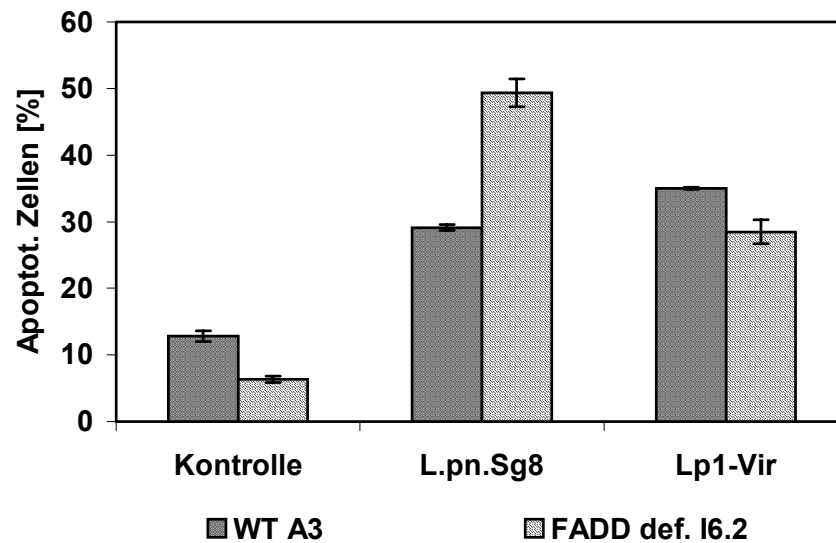
Insgesamt konnte zwar eine Aktivierung von Caspase-8 nachgewiesen werden, es blieb aber unklar, über welchen Mechanismus diese Aktivierung erfolgte.

### **3.2.6. *Legionella pneumophila* induziert Apoptose in FADD-defizienten Jurkat-Zellen**

Wie oben erwähnt, spielt das Adaptorprotein FADD eine unabdingbare Rolle bei der über Fas induzierten Aktivierung von Caspase-8.

Mit Hilfe von FADD-defizienten Jurkat-Zellen sollte nun getestet werden, ob FADD bei der Infektion mit *Legionella pneumophila* Einfluss auf die Aktivierung von Caspase-8 hat. Während bei einer Aktivierung über Fas-FADD keine Änderung der Apoptoserate nach Infektion mit *Legionella pneumophila* nachweisbar sein sollte, wurde bei einer „retrograden“ Aktivierung über Caspase-3 – d.h. unabhängig von FADD - ein Anstieg der Apoptoserate erwartet.

Die FADD-defizienten Jurkat-Kulturen I6.2 wurden mit *Legionella pneumophila* Sg8 Concord oder *Legionella pneumophila* Lp1-Vir im Legionellen-Jurkat-Verhältnis von 50:1 für 24 Stunden infiziert, anschließend fixiert und durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle diente die Jurkat-Linie WT A3, die funktionelles FADD exprimiert.



**Abb. 32 :** *Legionella pneumophila* induziert Apoptose in FADD-defizienten Jurkat-Zellen. Die Infektion der Jurkat-Kulturen ( $5 \cdot 10^5$  Zellen/Kulturansatz, 24-Lochplatten) erfolgte für 24 Stunden mit *Legionella pneumophila* Sg8 Concord oder *Legionella pneumophila* Lp1-Vir im Legionellen-Jurkat-Verhältnis von 50:1 bei 37°C. Nach Fixierung wurden die Jurkat-Zellen mit PI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus je drei Ansätzen. Die Ergebnisse wurden in  $n = 2$  unabhängigen Experimenten bestätigt.

Nach Infektion der FADD-defizienten Jurkat-Kulturen mit beiden Legionellenstämmen kam es zu einem deutlichen Anstieg der Apoptoserate (Abb.32). Eine ähnliche Apoptoseinduktion konnte auch bei den Wildtyp-Jurkat-Kulturen beobachtet werden.

Insgesamt konnte mit diesem Experiment gezeigt werden, dass die Apoptoseinduktion durch *Legionella pneumophila* unabhängig von FADD verläuft und Caspase-8 sehr wahrscheinlich „retrograd“ über Caspase-3 aktiviert wird.

## 4. Diskussion

### 4.1. *Legionella pneumophila* induziert Apoptose in verschiedenen Zelllinien

In vorliegender Arbeit wurde zunächst übereinstimmend mit früheren Ergebnissen (Walz *et al.*, 2000 ; Gao & Abu Kwaik, 1999a ; Hägele *et al.*, 1998 ; Müller *et al.*, 1996) gezeigt , dass *Legionella pneumophila* in Makrophagen und primären mononukleären Zellen des peripheren Bluts Apoptose induziert. Dabei wurde festgestellt, dass nicht alle *Legionella pneumophila*-Stämme gleichermaßen zur Apoptoseinduktion fähig sind (Eigene Daten ; Alli *et al.*, 2003). Ein Grund dafür ist möglicherweise die Heterogenität der verschiedenen Legionellenstämme in ihren Virulenzfaktoren. Alli *et al.* (2003) definierten die Zytopathogenität, die Fähigkeit zur Porenbildung in der Wirtszelle, die Schnelligkeit der intrazellulären Vermehrung und die Fähigkeit zur Apoptoseinduktion als typische Virulenzfaktoren der Legionellen und untersuchten diese Merkmale an verschiedenen Legionellenstämmen. Sie stellten erhebliche Unterschiede zwischen den Stämmen fest.

T-Zellen spielen bei der Bekämpfung von Legionellen im Organismus eine entscheidende Rolle (Susa *et al.*, 1998). Ein Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, wie T-Zellen auf die *in-vitro*-Inkubation mit *Legionella pneumophila* reagieren. In zahlreichen Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass *Legionella pneumophila* sowohl in der T-Zelllinie Jurkat als auch in primären T-Zellen Apoptose induziert. Mittlerweile liegt eine Veröffentlichung vor, in der diese Ergebnisse bestätigt werden (Neumeister *et al.*, 2002).

Bei Versuchen mit primären mononukleären Zellen des peripheren Bluts (v.a. T-Lymphozyten) fiel auf, dass *Legionella pneumophila* nur bei den stimulierten T-Zellen Apoptose induzierte. Möglicherweise handelt es sich dabei um einen Abwehrmechanismus der Legionellen gegen „aggressive“ Immunzellen.

Das Ausmaß der Apoptoseinduktion durch *Legionella pneumophila* korreliert mit der Zytopathogenität der Legionellen, dem Legionellen-Wirtszellen-Verhältnis sowie der Infektionszeit. Außerdem induziert *Legionella pneumophila* nur in frühen Stadien der Infektion Apoptose (Gao & Abu Kwaik, 1999a); das Absterben der Wirtszellen im Spätstadium der Infektion wird nach Ansicht dieser Autoren durch Nekrose bedingt.

In den Experimenten dieser Arbeit nahm die Anzahl apoptotischer Zellen in den ersten 24 Stunden nach Inkubation mit *Legionella pneumophila* kontinuierlich zu. Eine Verlängerung der Infektionszeit auf insgesamt 48 Stunden bewirkte keine weitere Zunahme apoptotischer Zellen. Nekrose der Zellen konnte auch nicht festgestellt werden. Somit konnte das von Gao



und Abu Kwaik (1999a) festgestellte nekrotisch bedingte Absterben der Wirtszellen in der Spätphase der Infektion in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Eine Erklärung für die Stagnation der Apoptoseinduktion im Laufe der Infektion ist die Abhängigkeit der Legionellenvirulenz von den Wachstumsbedingungen und den Wachstumsphasen (Byrne & Swanson, 1998): Bei günstigen Umweltbedingungen (v.a. Nährstoffangebot) vermehren sich die Legionellen schnell (Exponentialphase) und weisen nur eine geringe Virulenz auf. Sind die Nährstoffe (v.a. Aminosäuren) aufgebraucht, stoppt die Vermehrung (Postexponentialphase). Die Legionellen ändern ihren Phänotyp und werden sehr virulent. Für alle Experimente dieser Arbeit wurden die Legionellen auf MWY-Selektivnährböden gezüchtet. Um zu vermeiden, dass sich die Legionellen in der Exponentialphase der Wachstumskurve befinden, wurden die Legionellen erst zwei Tage nach Beimpfung der Nährböden für die Versuche verwendet, sie waren also in einer virulenten Phase. Nach der Invasion der Wirtszellen folgte die intrazelluläre Vermehrung der Legionellen bei wahrscheinlich stark reduzierter Virulenz.

Lediglich bei den HL-60-Zellen zeigte sich das Maximum apoptotischer Zellen erst nach zweitägiger Infektion mit *Legionella pneumophila*. Allerdings begann die Apoptose dieser Zellen erst sehr spät.

Bei allen in dieser Arbeit mit *Legionella pneumophila* infizierten Zellkulturen wurde beobachtet, dass die Anzahl apoptotischer Zellen bei einem Legionellen-Wirtszellen-Verhältnis von 50:1 wesentlich höher war als bei einem Legionellen-Wirtszellen-Verhältnis von 10:1. Bei einem Legionellen-Wirtszellen-Verhältnis von 2:1 konnte durchflusszytometrisch keine Apoptoseinduktion durch *Legionella pneumophila* festgestellt werden. Gao und Abu Kwaik (1999a) konnten noch bei einem Legionellen-Wirtszellen-Verhältnis von 1:2 die für Apoptose typische DNS-Fragmentierung nachweisen. Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte eine stärkere Virulenz des verwendeten *Legionella pneumophila*-Stamms sein, vielleicht wirken sich auch unbekannte Unterschiede in der Bakterienkultur auf das Ergebnis aus.

Als nächstes stellte sich die Frage, ob extra- oder intrazelluläre Legionellen Apoptose induzieren. Die Ergebnisse folgender an Jurkat-Zellen durchgeführten Experimente sprechen für eine Apoptoseinduktion durch extrazelluläre Legionellen: In Experimenten, in denen nach vier oder acht Stunden die extrazellulären Legionellen mit dem Aminoglykosid-Antibiotikum Gentamicin abgetötet wurden, kam es danach zu keiner weiteren Steigerung apoptotischer Jurkat-Zellen. Mehrere Versuche mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) exprimierenden Legionellen ergaben, dass sich die Legionellen vor allem in nicht apoptotischen Jurkat-Zellen

befinden und dass der Anteil legionellenhaltiger Jurkat-Zellen mit zunehmender Infektionsdauer abnimmt. Letzteres konnte in Untersuchungen mit einem konfokalen Mikroskop bestätigt werden. Ferner fiel in der durchflusszytometrischen Analyse der mit GFP-exprimierenden Legionellen infizierten Jurkat-Zellen auf, dass Caspase-3 überwiegend in Zellen aktiv war, die keine Legionellen enthielten. Diese Beobachtung bekräftigt die Vorstellung, dass sich die Legionellen zwar intrazellulär vermehren, aber Apoptose extrazellulär induzieren. Auch bei Makrophagen und Alveolarzellen erfolgt die Induktion des physiologischen Zelltodes durch extrazelluläre Legionellen (Gao & Abu Kwaik, 1999a). Allerdings gibt es Ergebnisse, die intrazelluläre Legionellen für die Apoptoseinduktion verantwortlich machen (Hägele *et al.*, 1998): Versuche mit Cytochalasin D, das durch Angriff am Zytoskelett der Zelle auch die Phagozytose blockieren kann, ergaben, dass die Anzahl apoptotischer Monozyten nach der Infektion mit *Legionella pneumophila* geringer bei den Monozyten war, die vorher mit Cytochalasin D behandelt worden waren. Das schließt aber nicht aus, dass Cytochalasin D den Transfer eines apoptoseinduzierenden Faktors von extrazellulären Legionellen in die Monozyten möglicherweise verhindert. Vereinbar mit den Ergebnissen der Experimente vorliegender Arbeit, die mit GFP-exprimierenden Legionellen durchgeführt worden waren, wäre die Vorstellung, dass die Legionellen intrazellulär Apoptose induzieren und anschließend die Wirtszelle verlassen. Das würde beispielsweise erklären, warum Caspase-3 in weitaus mehr Zellen aktiv war, in denen keine Legionellen nachweisbar waren. Dennoch erscheint es wahrscheinlicher, dass die Apoptoseinduktion von extrazellulären Legionellen ausgeht.

## **4.2. Mechanismus der Apoptoseinduktion durch *Legionella pneumophila***

### **4.2.1. Die Bedeutung des Dot/Icm-TypIV-Sekretionssystems**

Nach der Entdeckung, dass *Legionella pneumophila* in seinen Wirtszellen Apoptose induzieren kann, wurde der Mechanismus der Apoptoseinduktion untersucht. Schon früh fiel auf, dass das Dot/Icm-TypIV-Sekretionssystem an der Apoptosesteuerung beteiligt ist (Gao & Abu Kwaik, 1999a/b). Bakterielle TypIV-Sekretionssysteme sind Konjugationssysteme, über die Bakterien Plasmid-DNS, Nukleoproteine, A/B-Toxine oder Effektorproteine in andere Zellen transferieren (Christie & Vogel, 2000). Der Prototyp der TypIV-Systeme ist das T-DNS-Konjugationssystem von *Agrobacterium tumefaciens*, über das Onkogene in Pflanzenzellen injiziert werden. Bei *Legionella pneumophila* sind Dot- und Icm-Proteine die Hauptbestandteile des Konjugationssystems. Vogel *et al.* (1998) identifizierten Dot-Proteine (Dot G, Dot L, Dot M, Dot B), die Homologien zu Proteinen aus bekannten Konjugations-

systemen aufwiesen. Bei *Legionella pneumophila* konnten Dot G und Dot B Plasmide mobilisieren. *Legionella pneumophila*- Stämme mit Mutationen innerhalb der dot-Gene konnten sich in Makrophagen nicht vermehren. Aufgrund dieser Beobachtungen postulierten Vogel *et al.* (1998), dass Dot-Proteine ein Sekretionssystem bilden, über das ein Effektorprotein in Makrophagen transferiert wird, das die Ansäuerung des legionellenhaltigen Phagosoms sowie die Fusion dieses Phagosoms mit einem Lysosom zum Phagolysosom verhindert.

Zur gleichen Zeit untersuchten Segal *et al.* (1998) icm-Gene, die *Legionella pneumophila* zum Töten von Makrophagen benötigt. Die Sequenzierung dieser Gene ergab, dass vier icm-Gene (icm P, icm O, icm L, icm E) signifikante Ähnlichkeit zu Plasmidgenen zeigten, die an der Steuerung der Konjugation beteiligt sind. Bei *Legionella pneumophila* sind diese Gene allerdings für die Plasmidkonjugation entbehrlich, für das Töten von Makrophagen hingegen absolut notwendig. Icm O und icm P sind identisch zu dot L und dot M (Vogel *et al.*, 1998). Zwei weitere icm-Gene (icm T, icm R) wiesen keine Ähnlichkeit zu bekannten Genen auf, waren aber bei *Legionella pneumophila* für die Plasmidkonjugation unerlässlich. Daraus folgerten Segal *et al.* (1998), dass Icm-Proteine ein Sekretionssystem bilden, über das ein Makromolekül zum Abtöten von Makrophagen in die Makrophagen transferiert wird. Kürzlich konnten Zink *et al.* (2002) in Versuchen mit *Legionella pneumophila*-Stämmen, die Mutationen im Dot/Icm-TypIV-Sekretionssystem aufwiesen, nachweisen, dass das Dot/Icm-TypIV-Sekretionssystem essentiell für die Apoptoseinduktion ist.

Die Rolle des Dot/Icm-TypIV-Sekretionssystems lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt wie folgt zusammenfassen: Transfer eines Effektorproteins zur Hemmung der Fusion von Phagosom und Lysosom; Export eines porenbildenden Toxins; Transfer eines Faktors zur Apoptoseinduktion.

#### **4.2.2. Nach Infektion von Jurkat-T-Zellen und myeloiden U937-Zellen mit *Legionella pneumophila* kommt es zur Aktivierung von Caspase-3**

Die Enzymfamilie der Caspasen ist nach jetzigem Wissensstand für den Vollzug des programmierten Zelltods unerlässlich (siehe Einleitung). Daher lag es nahe, Caspasenaktivierung nach Infektion von Zellen des Menschen mit *Legionella pneumophila* zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass Caspase-3 nach der Infektion von Makrophagen mit *Legionella pneumophila* aktiv ist, es aber nicht zu einer Aktivierung von Caspase-1 kommt (Gao & Abu Kwaik, 1999b).

An diese Ergebnisse wurde in vorliegender Arbeit angeknüpft. Ziel war es, den Weg der Caspasenaktivierung in U937- und Jurkat-T-Zellen schrittweise aufzuklären.

Zunächst konnte nachgewiesen werden, dass die Infektion von Jurkat-T-Zellkulturen mit *Legionella pneumophila* die Aktivierung von Effektorcaspasen, zu denen neben Caspase-3 die Caspasen-6 und -7 zählen, bewirkte. Als Positivkontrolle für die Aktivierung dieser Caspasen wurde der Proteinkinaseinhibitor Staurosporin eingesetzt. Die Inkubation der Jurkat-T-Zellen mit dem Tripeptid Z-VAD-fmk, das die Aktivierung von Caspasen inhibiert, unterband nach der Legionelleninfektion zwar nicht vollständig, aber sehr deutlich die Aktivierung der Effektorcaspasen.

Im nächsten Schritt sollte speziell Caspase-3 dargestellt werden. Sowohl mit Western-Blotting als auch mit durchflusszytometrischer Analyse gelang es, die durch *Legionella pneumophila* induzierte Aktivierung von Caspase-3 in Jurkat-T-Zellen und myeloiden U937-Zellen nachzuweisen. Wie schon in den vorangegangenen Experimenten wurde Staurosporin als Positivkontrolle für die Caspasenaktivierung und Z-VAD-fmk zur Inhibition eingesetzt.

#### **4.2.3. Nach Infektion von Jurkat-T-Zellen und myeloiden U937-Zellen mit *Legionella pneumophila* kommt es zur Aktivierung von Caspase-9**

Nachdem es zwei Hauptsignalwege gibt, die in der Aktivierung von Caspase-3 münden (Creagh *et al.*, 2003), war es notwendig zu untersuchen, welcher bei der Apoptoseinduktion durch *Legionella pneumophila* eingeschlagen wird.

Die Aktivierung von Caspase-9 erfolgt innerhalb des mitochondrialen Signalwegs (siehe Einleitung). Zahlreiche Bakterien, wie zum Beispiel *Pseudomonas aeruginosa* oder *Streptococcus pyogenes* steuern über diesen Weg den Tod ihrer Wirtszellen (Jendrossek *et al.*, 2003 ; Nakagawa *et al.*, 2001). Aus diesem Grund wurde zunächst untersucht, ob auch *Legionella pneumophila* diesen Mechanismus zur Apoptoseinduktion nutzt.

Sowohl in Jurkat-T-Zellen als auch in U937-Zellen konnte nach Inkubation mit *Legionella pneumophila* aktive Caspase-9 nachgewiesen werden. Die Gegenwart von Z-VAD-fmk während der Inkubation mit *Legionella pneumophila* schwächte – wie erwartet – die Aktivierung von Caspase-9 in beiden Zelllinien deutlich ab.

Durch den Nachweis von aktiver Caspase-9 zeichnete es sich immer mehr ab, dass *Legionella pneumophila* Apoptose über den mitochondrialen Signalweg induziert.

Die mitochondrialen Membranproteine Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> wirken antiapoptotisch (siehe Einleitung), indem sie die zur Apoptoseinduktion und Caspase-9-Aktivierung notwendige Freisetzung von Cytochrom c und anderen mitochondrialen Faktoren, wie Smac/Diablo und vielleicht Endonuklease D und AIF, verhindern. Daher wurde erwartet, dass die Überexpression von Bcl-2 die durch *Legionella pneumophila* induzierte Apoptose verhindert. In

Experimenten, bei denen Bcl-2-exprimierende Lymphozyten und normale Lymphozyten der Maus mit *Legionella pneumophila* inkubiert worden waren, waren wesentlich weniger Bcl-2-Lymphozyten als Wildtyp-Lymphozyten apoptotisch. Ähnliche Ergebnisse wurden kürzlich in Versuchen mit Bcl-2-überexprimierenden Jurkat-Zellen erzielt (Neumeister *et al.*, 2002). Darüberhinaus konnte dort gezeigt werden, dass nach Infektion von Bcl-2-überexprimierenden Jurkat-Zellen weder Caspase-9 noch Caspase-3 aktiviert werden.

In einer vor kurzem erschienenen Veröffentlichung von Marsden *et al.* (2002) wird postuliert, dass Bcl-2 Apoptose unabhängig von Caspase-9 und Apaf-1 reguliert. Es wird vorgeschlagen, dass die antiapoptotische Aktivität von Bcl-2 in der Inhibierung von mindestens zwei Initiatorcaspasen besteht, die sonst den mitochondrialen Signalweg oder Caspase-7 aktivieren würden.

Das widerspricht allerdings nicht den Ergebnissen dieser Arbeit, mit denen gezeigt werden konnte, dass *Legionella pneumophila* über den mitochondrialen Signalweg Apoptose induziert.

#### **4.2.4. Nach Infektion von Jurkat-T-Zellen und myeloiden U937-Zellen mit *Legionella pneumophila* kommt es zur Aktivierung von Caspase-8**

Der Nachweis von aktiver Caspase-8 in Jurkat-T-Zellen und U937-Zellen nach Inkubation mit *Legionella pneumophila* ließ die Frage aufkommen, wie es zur Aktivierung dieser Caspase gekommen war.

Ein möglicher Mechanismus ist die Todesrezeptor-vermittelte Aktivierung von Caspase-8 (siehe Einleitung). Dabei vermittelt das Adaptorprotein FADD die Bindung von Procaspase-8 an den aktivierten Todesrezeptor Fas.

In Experimenten mit FADD-defizienten Jurkat-Zellen wurde in vorliegender Arbeit festgestellt, dass *Legionella pneumophila* in diesen Zellen genauso potent Apoptose induziert wie in unveränderten Jurkat-Zellen. Somit konnte – in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Neumeister *et al.* (2002) – die Aktivierung von Caspase-8 über Fas/FADD ausgeschlossen werden.

Ein weiterer Signalweg, der in der Aktivierung von Caspase-8 mündet, verläuft über die von Caspase-9 aktivierte Caspase-3. Caspase-3 aktiviert Caspase-6, die ihrerseits Caspase-8 spaltet und dadurch möglicherweise aktiviert (Slee *et al.*, 1999).

Nachdem bereits nachgewiesen wurde, dass es während der Infektion mit *Legionella pneumophila* zur Aktivierung von Caspase-9 kommt, erscheint es plausibel, dass Caspase-8 im Zuge des mitochondrialen Signalwegs aktiviert wird.

#### 4.2.5. Weitere Signalwege, die bei der Apoptoseinduktion durch *Legionella pneumophila* eine Rolle spielen könnten

TNF- $\alpha$  ist ein pleiotropes Zytokin, das bei Infektionen u.a. von Monozyten/Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und T-Lymphozyten sezerniert wird und andere Zellen des Immunsystems stimuliert. Außerdem ist bekannt, dass TNF- $\alpha$  durch Bindung an TNFR1 die Aktivierung von Caspase-8 veranlassen kann und damit Apoptose induzieren kann (siehe Einleitung).

Legionellen sind gramnegative Bakterien, die in ihrer Zellwand das Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) enthalten. Da LPS die Bildung und Sekretion von Zytokinen, wie TNF- $\alpha$  stimuliert, ist es vorstellbar, dass die Apoptoseinduktion durch *Legionella pneumophila* mittelbar über TNF-Sekretion erfolgt. Hägele *et al.* (1998) fanden jedoch in Experimenten mit Monozyten heraus, dass *Legionella pneumophila* unabhängig von TNF- $\alpha$  Apoptose induziert.

Rezeptoren aus der Toll-Familie dienen den Zellen des angeborenen Immunsystems dazu, die Anwesenheit von Pathogenen zu signalisieren und die Immunabwehr zu initiieren.

Toll-like Rezeptoren (TLR) sind transmembranöse Proteine mit einer extrazellulären leucinreichen Domäne und einer intrazellulären sog. Toll/IL-1R-Homologieregion (TIR), die diesen Namen aufgrund ihrer starken Ähnlichkeit mit dem Interleukin-1-Rezeptor-1 bekommen hat (Rock *et al.*, 1998). An die TIR-Domäne von TLR bindet das Adaptorprotein MyD88 über seine C-terminal gelegene TIR-Domäne (Medzhitov *et al.*, 1998). MyD88 übermittelt die Signale des aktivierten TLR an Effektorproteine, wie z.B. an die Serinkinase IRAK-4, die die Produktion von Zytokinen induziert (Picard *et al.*, 2003 ; Suzuki *et al.*, 2002).

Für den Toll-like Rezeptor-2 (TLR2) wurde gezeigt, dass es nach seiner Stimulation mit bakteriellen Lipoproteinen sowohl zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B als auch zur Induktion von Apoptose kommt (Aliprantis *et al.*, 1999 ; Yang *et al.*, 1998). Aliprantis *et al.* (2000) haben den von TLR2 ausgehenden Apoptosesignalweg untersucht und vorgeschlagen, dass MyD88 FADD bindet und folglich Caspase-8 aktiviert wird. Sie folgerten daraus, dass auf der Höhe von MyD88 das Signal zur NF- $\kappa$ B-Aktivierung und das Signal zur Induktion des programmierten Zelltods möglicherweise auseinanderlaufen.

MyD88 ist nicht das einzige Adaptorprotein der Toll-like Rezeptoren. Vor kurzem wurde das Adaptorprotein TRIF bzw. TICAM-1 identifiziert, das wie MyD88 eine TIR-Domäne enthält (Oshiumi *et al.*, 2003 ; Yamamoto *et al.*, 2002). Seine Rolle im TLR-Signalweg wurde von Hoebe *et al.* (2003) in Versuchen mit Knock-out-Mäusen untersucht, die in beiden für TRIF codierenden Allelen eine Mutation aufwiesen. Dabei wurde u.a. gezeigt, dass Makrophagen

dieser Mäuse nach Stimulation mit Lipopolysaccharid nicht apoptotisch wurden. Aufgrund dieses Ergebnisses postulierten Hoebe *et al.* (2003), dass das von Toll-like Rezeptoren ausgehende Apoptosesignal nicht über MyD88 verläuft, sondern über TRIF.

Ob *Legionella pneumophila* über diesen Weg die Apoptose seiner Wirtszellen induziert, ist bisher nicht bekannt.

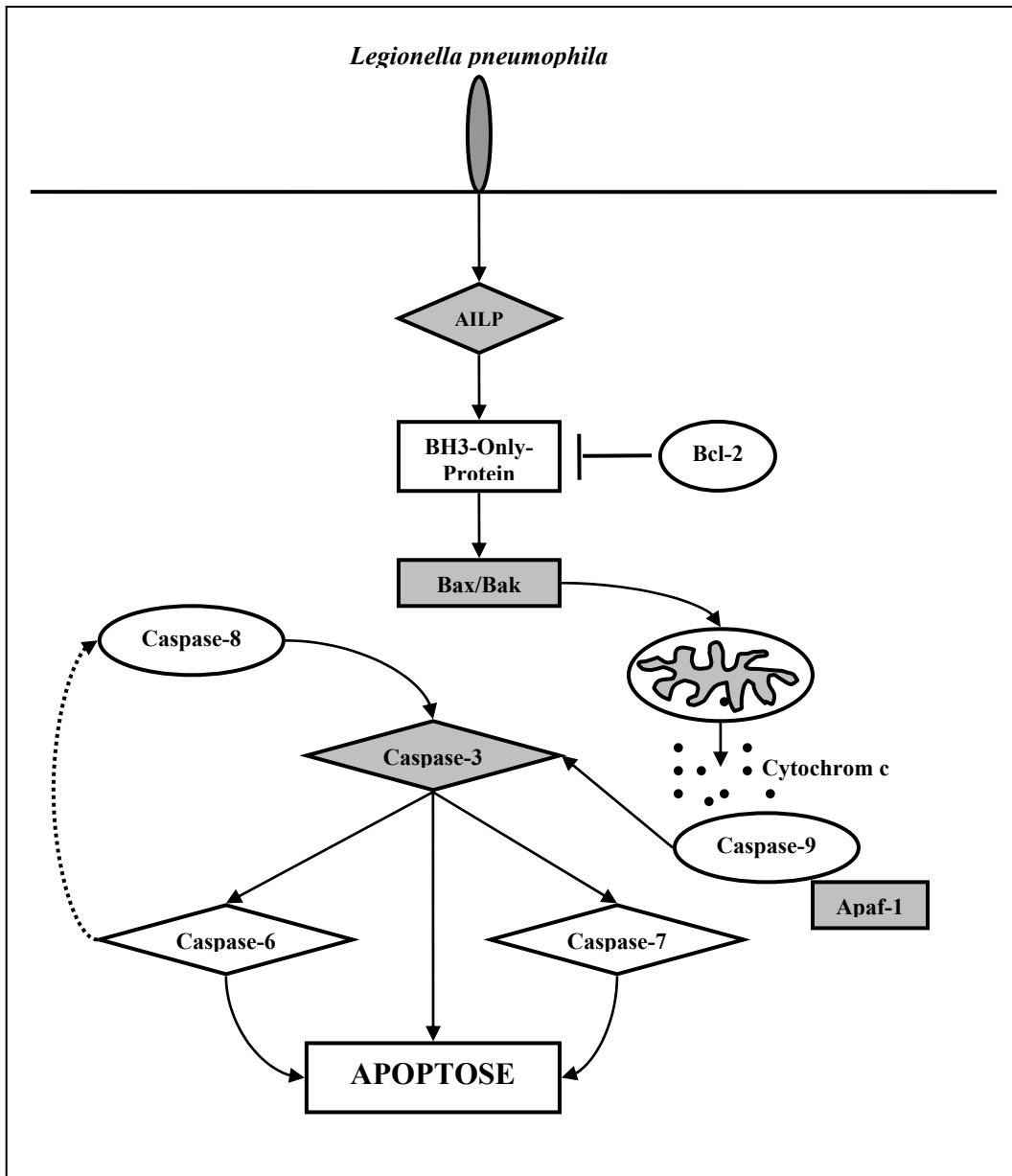
#### **4.2.6. Modell der Apoptoseinduktion durch *Legionella pneumophila***

Aus allen bisher diskutierten Ergebnissen lässt sich folgendes Modell zur Apoptoseinduktion durch *Legionella pneumophila* aufstellen (Abb. 33) :

*Legionella pneumophila* bindet von außen an die Wirtszelle und injiziert in sie über das Dot/Icm-TypIV-Sekretionssystem ein noch nicht näher charakterisiertes apoptoseinduzierendes Protein (AILP). Dieses Protein aktiviert in der Wirtszelle ein Protein aus der BH3-Only-Proteinfamilie (siehe Einleitung). Das BH3-Only-Protein aktiviert anschließend die Proteine Bax und/oder Bak, die die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien induzieren. Dadurch wird der mitochondriale Apoptosesignalweg initiiert. Nacheinander werden Caspase-9, Caspase-3 und Caspase-8 aktiviert. Letztlich kommt es zur Degradierung der DNS und zum geordneten Zerfall der Wirtszelle in Apoptosekörperchen.

Bcl-2 bindet, wenn anwesend, das aktivierte BH3-Only-Protein und blockiert dadurch die Apoptose.

Möglich aber weniger wahrscheinlich wäre noch, dass dieser Mechanismus von intrazellulären Legionellen ausgelöst wird, die daraufhin die Wirtszelle verlassen.



**Abb. 33 :** Modell der Apoptoseinduktion durch *Legionella pneumophila*. Nach extrazellulärer Bindung an die Wirtszelle transferiert *Legionella pneumophila* über das Dot/Icm-TypIV-Sekretionssystem ein apoptoseinduzierendes Legionellenprotein (AILP) in die Wirtszelle. AILP aktiviert ein BH3-Only-Protein, das daraufhin Bax und/oder Bak aktiviert. Bax/Bak induzieren die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Es folgt nacheinander die Aktivierung von Caspase-9, Caspase-3, Caspase-6, Caspase-7 und Caspase-8. Die Aktivität der Effektorcaspasen-3, -6 und -7 führt zu den morphologischen Erscheinungen der Apoptose. Wenn anwesend bindet Bcl-2 das aktivierte BH3-Only-Protein und blockiert dadurch die Apoptose.



### **4.3. *Legionella pneumophila* oder Wirtszelle – wer profitiert von der Apoptose ?**

Der physiologische Zelltod stellt eine komplexe Reaktion der Wirtszelle auf die Infektion mit *Legionella pneumophila* dar. Da es *Legionella pneumophila* ist, die die Apoptose induziert, stellt sich die Frage, ob sich daraus überhaupt Vorteile für das Bakterium ergeben :

Über die Apoptoseinduktion können die Legionellen ihnen gefährliche Zellen des Immunsystems, wie Makrophagen, T-Zellen und wahrscheinlich auch B-Zellen eliminieren. Apoptotische Zellen lösen nur eine geringe Entzündungsreaktion aus, bleiben also immunologisch weitgehend unsichtbar. Außerdem ist vorstellbar, dass über die Apoptose von B-Zellen die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses verhindert wird. Insgesamt ergeben sich für *Legionella pneumophila* erhebliche Überlebensvorteile aus dem physiologischen Zelltod von Immunzellen.

Doch auch der Wirtsorganismus profitiert möglicherweise von der Apoptoseinduktion. Es ist noch nicht geklärt, ob die von *Legionella pneumophila* induzierte Apoptose der Wirtszelle überhaupt im „Interesse“ von *Legionella pneumophila* ist. Dem von *Legionella pneumophila* sezernierten apoptoseinduzierenden Protein könnte eine andere Aufgabe zugedacht worden sein, die es in Amöben zugunsten der Legionellen erfüllen kann, die aber in höher entwickelten Wirtszellen zur Apoptoseinduktion – wahrscheinlich über ein BH3-Only-Protein – führt. Dafür spricht, dass der Mensch für *Legionella pneumophila* Fehlwirt ist. Die Proteinausstattung von *Legionella pneumophila* ist folglich nicht auf ein Überleben in Zellen des Menschen ausgerichtet.

Mit dem physiologischen Zelltod steht dem Organismus ein effektives Mittel zur Verfügung, die intrazelluläre Vermehrung der Legionellen, die trotz nur mäßiger Anpassung an das Zellmilieu des Fehlwirts stattfinden kann, einzudämmen. Die katabolen Prozesse in der apoptotischen Wirtszelle schädigen sehr wahrscheinlich auch die Legionellen. Außerdem werden bei der Apoptose die Legionellen aus ihren Wirtszellen freigesetzt und sind so den Immunzellen zugänglich.

### **4.4. Legionelleninfektion von Protozoen und Säugetierzellen – Unterschiede und Gemeinsamkeiten**

Der natürliche Lebensraum von Legionellen sind Wasser- und Feuchtgebiete. Weltweit finden sich Legionellen in Flüssen, Seen, Wasserleitungen, Schwimmbädern oder im Kühlwasser von Klimaanlage. In dieser Umgebung lagern sich die Legionellen meistens zu einem Bio-

film zusammen (Rogers & Keevil, 1992), innerhalb dessen sie sehr widerstandsfähig sind (Stickler, 1999).

Ein Hauptcharakteristikum der Legionellen ist ihre Fähigkeit, in frei lebende Protozoen aus der Familie der Amöben (u.a. *Hartmannella vermiformis*, *Acanthamoeba polyphaga*) einzudringen und sich intrazellulär zu vermehren. Innerhalb der Amöben finden die Legionellen Schutz vor widrigen Umweltbedingungen, wie hohe Temperatur oder Chlorierung, und ein reiches Nährstoffangebot. Für ihre Vermehrung nutzen sie den Proteinsyntheseapparat der Wirtszelle.

Die Amöben ihrerseits besitzen zahlreiche Mechanismen zur Abwehr von Infektionserregern. Daher mussten die Legionellen Strategien entwickeln, mit denen sie die Abwehrmechanismen der Amöben unterlaufen oder ausschalten. Einige dieser Virulenzfaktoren spielen auch bei der Infektion von Makrophagen des Menschen eine wichtige Rolle (Harb *et al.*, 2000).

Das Dot/Icm-TypIV-Sekretionssystem ist unentbehrlich für die erfolgreiche Infektion von Protozoen (Segal *et al.*, 1999 ; Gao *et al.*, 1997) und von Zellen des Menschen (Zink *et al.*, 2002 ; Alli *et al.*, 2000 ; Gao & Abu Kwaik, 1999a ; Vogel *et al.*, 1998).

Ein Legionellenprotein verhindert intrazellulär die Fusion des legionellenhaltigen Phagosoms mit einem Lysosom zum Phagolysosom. Dadurch wird ein wichtiger Schutzmechanismus der Wirtszelle gegenüber Pathogenen außer Kraft gesetzt. Außerdem ist das Dot/Icm-TypIV-Sekretionssystem für den Export eines porenbildenden Toxins sowohl in Protozoen als auch in Makrophagen notwendig (Alli *et al.*, 2000 ; Gao & Abu Kwaik, 2000b). Nach der Replikation der Legionellen in Phagosomen kommt es zur Aktivierung dieses Toxins, das – so wird angenommen – zur Ausbildung von Poren in der Phagosomenmembran führt. Das Phagosom zerfällt und entlässt die Legionellen ins Zytoplasma der Wirtszelle. Daraufhin durchlöchert das Toxin die Zellmembran. Es folgt die osmotische Zytolyse der Wirtszelle und die Freisetzung der Legionellen (Alli *et al.*, 2000 ; Kirby *et al.*, 1998). Interessanterweise sind die freigesetzten Legionellen zytotoxisch zu Säugetierzellen, jedoch nicht zu *Acanthamoeba polyphaga*. (Gao & Abu Kwaik, 2000b).

Während die Protozoen nur über diesen Mechanismus getötet werden können, kommt es bei Säugetierzellen zusätzlich zur Apoptoseinduktion. Bei Protozoen kann *Legionella pneumophila* keine Apoptose induzieren (Gao & Abu Kwaik, 2000b ; Hägele *et al.*, 1998), da diese Organismen keine Enzymausstattung zum Vollzug der Apoptose besitzen.

Die Induktion von Nekrose – wahrscheinlich durch ein porenbildendes Toxin – spielt bei der Infektion mit *Legionella pneumophila* eine große Rolle. In histologischen Untersuchungen von Lungengewebe von Patienten, die an der Legionärskrankheit erkrankt waren, und von

Meerschweinchen, die intratracheal mit *Legionella pneumophila* infiziert worden waren, konnten nekrotische Entzündungszellen und nekrotische Alveolarepithelzellen nachgewiesen werden (Katz & Hashemi, 1982 ; Blackmon *et al.*, 1978).

Weitere Gene, die sowohl bei der Infektion von Zellen des Menschen als auch bei der Infektion von Amöben von Bedeutung sind, sind die pmi-Gene und pilBCD-Gene. *Legionella pneumophila*-Stämme mit Mutationen im Bereich der pmi-Gene sind nicht in der Lage, U937-Zellen oder *Acanthamoeba polyphaga* zu infizieren (Gao *et al.*, 1997). *Legionella pneumophila*-Stämme, die Mutationen im pilD-Gen aufweisen, können sich weder in Makrophagen noch in *Hartmannella vermiformis* vermehren (Liles *et al.*, 1998 ; Liles *et al.*, 1999).

Deutliche Unterschiede bei der Infektion von Protozoen und Säugetierzellen durch *Legionella pneumophila* sind die oben beschriebene Apoptoseinduktion bei Säugetierzellen und die Abhängigkeit der Legionellen von der Proteinsynthese der Amöben (beschrieben bei *Hartmannella vermiformis*) und nicht von Säugetierzellen.

Insgesamt wird aus diesen Erkenntnissen deutlich, dass die Anpassung der Legionellen an das intrazelluläre Milieu der Amöben eine wesentliche Voraussetzung für die Infektion von Säugetierzellen, insbesondere von Zellen des Menschen darstellt. Durch den Selektionsdruck in den Amöben hat *Legionella pneumophila* Virulenzfaktoren erworben, die ihm auch die Infektion menschlicher Zellen ermöglichen. Darüberhinaus besitzen Legionellen Gene, zum Beispiel das mil-Gen, die nur bei der Infektion von Säugetierzellen exprimiert werden (Gao *et al.*, 1998). Zur Zeit ist noch unklar, ob sich diese Gene „neu“ entwickelt haben oder ob sie bereits existierten und bei Infektionen von Protozoen, die bisher noch nicht im Labor untersucht worden sind, exprimiert werden. Da es keinen Anhalt für eine Selektion von *Legionella pneumophila* im Menschen gibt, scheinen die oben beschriebenen Gene nicht speziell für die Infektion von Zellen des Menschen zu existieren, sie scheinen aber dafür nützlich zu sein und werden deshalb aktiviert.

Das wichtigste Reservoir für die Legionellen bleiben nach wie vor die Amöben.

#### **4.5. *Legionella micdadei* induziert keine Apoptose in seinen Wirtszellen**

*Legionella micdadei* ist hinter *Legionella pneumophila* weltweit der zweithäufigste Erreger der Legionärskrankheit (Benin *et al.*, 2002). Deshalb stellte sich die Frage, ob *Legionella micdadei* ebenso wie *Legionella pneumophila* zur Apoptoseinduktion fähig ist.

Überraschenderweise konnte nach Inkubation von Jurkat-T-Zellen und myeloiden U937-Zellen mit *Legionella micdadei* keine Apoptoseinduktion festgestellt werden.

Diese Ergebnisse wurden vor kurzem in einer Studie von Alli *et al.* (2003) bestätigt :

27 Legionellenspezies und –stämme wurden auf ihre Virulenzfaktoren untersucht. Der eingesetzte *Legionella micdadei*-Stamm (*L.mic.* Rivera) war zwar ausgesprochen zytopathisch, induzierte aber keine DNS-Fragmentierung, ein typisches Charakteristikum für Apoptose.

Interessant ist, dass in anderen Veröffentlichungen Apoptoseinduktion durch *Legionella micdadei* beschrieben wurde (Gao *et al.*, 1999 ; Walz *et al.*, 2000). Der Grund für diese widersprüchlichen Ergebnisse liegt sehr wahrscheinlich in unbekanntem Faktoren, in denen sich die verschiedenen *Legionella micdadei*-Stämme unterscheiden.

Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass ähnliche Beobachtungen bei *Legionella longbeachae*, dem dritthäufigsten Erreger der Legionärskrankheit gemacht wurden. Während Arakaki *et al.* (2002) klar Apoptoseinduktion durch *Legionella longbeachae* nachgewiesen haben, gelang Alli *et al.* (2003) dieser Nachweis nicht.

## 5. Zusammenfassung

Bakterielle Infektionen gehören nach wie vor weltweit zu den häufigsten Todesursachen.

Legionelleninfektionen, die in regelmäßigen Abständen epidemisch auftreten, sind aufgrund ihrer hohen Mortalität bei abwehrgeschwächten Patienten sehr gefürchtet. Es stehen zwar für die Behandlung potente Antibiotika zur Verfügung, doch ist es für die Entwicklung neuer Therapien – vor allem in Hinblick auf die Entwicklung multiresistenter Keime – von großer Bedeutung, die Interaktionen zwischen dem Pathogen und der Zielzelle aufzuklären.

Arbeiten der letzten Jahre zeigen, dass das gramnegative Bakterium *Legionella pneumophila* in Makrophagen, primären Blutmonozyten und Alveolarepithelzellen Apoptose induzieren kann. Der Mechanismus der Apoptoseinduktion ist nur teilweise bekannt. Das Ziel vorliegender Arbeit war, den Weg der Apoptoseinduktion durch Legionellen weiter aufzuklären.

Folgende Ergebnisse wurden hier erhoben :

*Legionella pneumophila* induziert Apoptose in den myeloiden menschlichen Zelllinien U937- und HL-60-Zellen, in Jurkat-T-Zellen und in primären mononukleären Zellen des peripheren Bluts des Menschen. Der größte Teil der Versuchszellen wird innerhalb der ersten 24 Stunden der Infektion mit *Legionella pneumophila* apoptotisch. Während der Apoptose erfolgt die Aktivierung der Caspase-9, Caspase-3 und Caspase-8. Die Überexpression des zellulären Proteins Bcl-2 vermindert bei primären Lymphozyten der Maus nach Inkubation mit *Legionella pneumophila* deutlich die Anzahl apoptotischer Lymphozyten. Das Fehlen des Adaptorproteins FADD wirkt sich bei Jurkat-Kulturen nach Infektion mit *Legionella pneumophila* nicht auf die Apoptose aus.

Diese Daten zeigen, dass *Legionella pneumophila* Apoptose über den sog. mitochondrialen Signalweg induziert.

Der Zusammenhang zwischen Invasion und Apoptoseinduktion durch *Legionella pneumophila* wurde weiter untersucht. Die Ergebnisse sprechen für eine Induktion des programmierten Zelltods durch extrazelluläre Legionellen.

Die molekulare Natur des auslösenden Signals für die Apoptose wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Es weisen jedoch Ergebnisse dieser Arbeit und Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen darauf hin, dass *Legionella pneumophila* einen apoptoseinduzierenden Faktor über das Dot/Icm-TypIV-Sekretionssystem in die Wirtszellen transferiert, dessen Isolierung und Charakterisierung noch aussteht.

Der in dieser Arbeit untersuchte Stamm von *Legionella micdadei*, des Erregers des Pontiac-Fiebers, ist nicht zur Apoptoseinduktion fähig.

## 6. Literaturverzeichnis

1. **Adams, J.M., Cory, S. (1998).** The Bcl-2 protein family : arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326.
2. **Aliprantis, A.O., Yang, R.B., Mark, M.R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J.D., Klimpel, G.R., Godowski, P., Zychlinski, A. (1999).** Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through Toll-like receptor-2. *Science* 285, 736-739.
3. **Aliprantis, A.O., Yang, R.B., Weiss, D.S., Godowski, P., Zychlinsky, A. (2000).** The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *EMBO J.* 19, 3325-3336.
4. **Alli, O.A.T., Gao, L.Y., Pedersen, L.L., Zink, S., Radulic, M., Doric, M., Abu Kwaik, Y. (2000).** Temporal pore formation-mediated egress from macrophages and alveolar epithelial cells by *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 68, 6431-6440.
5. **Alli, O.A.T., Zink, S.D., von Lackum, K., Abu Kwaik, Y. (2003).** Comparative assessment of virulence traits in *Legionella* spp. *Microbiology* 149, 631-641.
6. **Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G.S., Thornberry, N.A., Wong, W.W., Yuan, J. (1996).** Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171-172.
7. **Arakaki, N., Higa, F., Koide, M., Tateyama, M., Saito, A. (2002).** Induction of apoptosis of human macrophages in vitro by *Legionella longbeachae* through activation of the caspase pathway. *J. Med. Microbiol.* 51, 159-168.
8. **Benin, A.L., Benson, R.F., Besser, R.E. (2002).** Trends in Legionnaires' disease, 1980-1998: declining mortality and new patterns of diagnosis. *Clin. Infect. Dis.* 35, 1039-1046.
9. **Blackmon, J.A., Hicklin, M.D., Chandler, F.W. (1978).** Legionnaires' disease : pathological and historical aspects of a "new" disease. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 102, 337-343.
10. **Bodmer, J.L., Burns, K., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Thome, M., Bornand, T., Hahne, M., Schroter, M., Becker, K., Wilson, A., French, L.E., Browning, J.L., MacDonald, H.R., Tschopp, J. (1997).** TRAMP, a novel apoptosis-mediating receptor with sequence homology to tumor necrosis factor receptor 1 and Fas (Apo-1/CD95). *Immunity* 6, 79-88.
11. **Bodmer, J.L., Schneider, P., Tschopp, J. (2002).** The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem. Sci.* 27, 19-26.
12. **Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V., Wallach, D. (1996).** Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1 and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85, 803-815.

13. **Boldin, M.P., Varfolomeev, E.E., Pancer, Z., Mett, I.L., Camonis, J.H., Wallach, D. (1995).** A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO-1 contains a sequence motif related to the death domain. *J. Biol. Chem.* 270, 7795-7798.
14. **Bouillet, P., Strasser, A. (2002).** BH3-only proteins – evolutionarily conserved pro-apoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J. Cell Sci.* 115, 1567-1574.
15. **Byrne, B., Swanson, M.S. (1998).** Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. *Infect. Immun.* 66, 3029-3034.
16. **Chang, D.W., Ditsworth, D., Liu, H., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Yang, X. (2003).** Oligomerization is a general mechanism for the activation of apoptosis initiator and inflammatory procaspases. *J. Biol. Chem.* 278, 16466-16469.
17. **Chang, D.W., Xing, Z., Pan, Y., Algeciras-Schimmich, A., Barnhart, B.C., Yaish-Ohad, S., Peter, M.E., Yang, X. (2002).** c-FLIP<sub>L</sub> is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *EMBO J.* 21, 3704-3714.
18. **Chaudhary, P.M., Eby, M., Jasmin, A., Bookwalter, A., Murray, J., Hood, L. (1997).** Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF- $\kappa$ B pathway. *Immunity* 7, 821-830.
19. **Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., Dixit, V.M. (1995).** FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505-512.
20. **Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Yu, G.L., Lyons, R.H., Garg, M., Duan, D.R., Xing, L., Gentz, R., Ni, J., Dixit, V.M. (1996a).** Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science* 274, 990-992.
21. **Chinnaiyan, A.M., Trepper, C.G., Seldin, M.F., O'Rourke, K., Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Krammer, P.H., Peter, M.E., Dixit, V.M. (1996b).** FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271, 4961-4965.
22. **Chinnaiyan, A.M., Orth, K., O'Rourke, K., Duan, H., Poirier, G.G., Dixit, V.M. (1996c).** Molecular ordering of the cell death pathway. *J. Biol. Chem.* 271, 4573-4576.
23. **Christie, P.J., Vogel, J.P. (2000).** Bacterial type IV secretion : conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol.* 8, 354-360.
24. **Creagh, E.M., Conroy, H., Martin, S.J. (2003).** Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunol. Rev.* 193, 10-21.

25. **Deveraux, Q.L., Roy, N., Stennicke, H.R., van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Salvesen, G.S., Reed, J.C. (1998).** IAPs block apoptosis events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* 17, 2215-2223.
26. **Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X. (2000).** Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42.
27. **Edelstein, P.H. (1982).** Comparative study of selective media for isolation of *Legionella pneumophila* from potable water. *J. Clin. Microbiol.* 16, 697-699.
28. **Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S. (1998).** A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.
29. **Faleiro, L., Kobayashi, R., Fearnhead, H., Lazebnik, Y.A. (1997).** Multiple species of CPP32 and Mch2 are the major active caspases present in apoptotic cells. *EMBO J.* 16, 2271-2281.
30. **Fernandes-Alnemri, T., Armstrong, R.C., Krebs, J., Srinivasula, S.M., Wang, L., Bullrich, F., Fritz, L.C., Trapani, J.A., Tomaselli, K.J., Litwack, G., Alnemri, E.S. (1996).** *In vitro* activation of CPP32 and Mch-3 by Mch-4, a novel apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 7464-7469.
31. **Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., Alnemri, E.S. (1994).** CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian Interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 269, 30761 -30764.
32. **Fischer, S.F., Schwarz, C., Vier, J., Häcker, G. (2001).** Characterization of antiapoptotic activities of *Chlamydia pneumoniae* in human cells. *Infect. Immun.* 69, 7121-7129.
33. **Fischer, U., Janicke, R.U., Schulze-Osthoff, K. (2003).** Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.* 1, 76-100.
34. **Gao, L.Y., Abu Kwaik, Y. (1999a).** Apoptosis in macrophages and alveolar epithelial cells during early stages of infection by *Legionella pneumophila* and its role in cytopathogenicity. *Infect. Immun.* 67, 862-870.
35. **Gao, L.Y., Abu Kwaik, Y. (1999b).** Activation of caspase-3 during *Legionella pneumophila*-induced apoptosis. *Infect. Immun.* 67, 4886-4894.
36. **Gao, L.Y., Abu Kwaik, Y. (2000a).** Hijacking of apoptotic pathways by bacterial pathogens. *Microb. Infect.* 2, 1705-1719.
37. **Gao, L.Y., Abu Kwaik, Y. (2000b).** The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba polyphaga* by *Legionella pneumophila*. *Environ. Microbiol.* 2, 79-90.



38. **Gao, L.Y., Harb, O.S., Abu Kwaik Y. (1997).** Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa. *Infect. Immun.* 65, 4738-4746.
39. **Gao, L.Y., Harb, O.S., Abu Kwaik, Y. (1998).** Identification of macrophage-specific infectivity loci (mil) of *Legionella pneumophila* that are not required for infectivity of protozoa. *Infect. Immun.* 66, 883-892.
40. **Gao, L.Y., Susa, M., Ticac, B., Abu Kwaik, Y. (1999).** Heterogeneity in intracellular replication and cytopathogenicity of *Legionella pneumophila* and *Legionella micdadei* in mammalian and protozoan cells. *Microb. Pathog.* 27, 273-287.
41. **Gross, A., Yin, X.M., Wang, K., Wei, M.C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Korsmeyer, S.J. (1999).** Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J. Biol. Chem.* 274, 1156-1163.
42. **Hägele, S., Hacker, J., Brand, B.C. (1998).** *Legionella pneumophila* kills human phagocytes but not protozoan host cells by inducing apoptotic cell death. *FEMS Microbiol. Lett.* 169, 51-58.
43. **Hahne, M., Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L.E., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., Cerottini, J., Tschopp, J. (1996).** Melanoma cell expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand : implications for tumor immune escape. *Science* 274, 1363-1366.
44. **Harb, O.S., Gao, L.Y., Abu Kwaik, Y. (2000).** From protozoa to mammalian cells : a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens. *Environ. Microbiol.* 2, 251-265.
45. **Henkart, P.A., Fisher, R.I. (1975).** Characterization of the lymphocyte surface receptors for ConA and PHA. *J. Immunol.* 114, 2710-2714.
46. **Hoebe, K., Du, X., Georgel, P., Janssen, E., Tabet, K., Kim, S.O., Goode, J., Lin, P., Mann, N., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Han, J., Beutler, B. (2003).** Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 424, 743-748.
47. **Hsu, H., Shu, H.B., Pan, M.G., Goeddel, D.V. (1996a).** TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84, 299-308.
48. **Hsu, H., Huang, J., Shu, H.B., Baichwal, V., Goeddel, D.V. (1996b).** TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* 4, 387-396.
49. **Hsu, H., Xiong, J., Goeddel, D.V. (1995).** The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- $\kappa$ B activation. *Cell* 81, 495-504.

50. **Huang, B., Eberstadt, M., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P., Fesik, S.W. (1996).** NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature* 384, 638-641.
51. **Huang, D.C.S., Strasser, A. (2000).** BH3-only proteins – essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 103, 839-842.
52. **Itoh, N., Nagata, S. (1993).** A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J. Biol. Chem.* 268, 10932-10937.
53. **Itoh, N., Yonehara, S.I.A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., Nagata, S. (1991).** The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66, 233-243.
54. **Jendrossek, V., Fillon, S., Belka, C., Müller, I., Puttkammer, B., Lang, F. (2003).** Apoptotic response of Chang cells to infection with *Pseudomonas aeruginosa* strains PAK and PAO-I : molecular ordering of the apoptosis signaling cascade and role of type IV pili. *Infect. Immun.* 71, 2665-2673.
55. **Juo, P., Kuo, C.J., Yuan, J., Blenis, J. (1998).** Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr. Biol.* 8, 1001-1008.
56. **Juo, P., Woo, M.S., Kuo, C.J., Signorelli, P., Biemann, H.P., Hannun, Y.A., Blenis, J. (1999).** FADD is required for multiple signaling events downstream of the receptor Fas. *Cell Growth Differ.* 10, 797-804.
57. **Jürgensmeier, J.M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., Reed, J.C. (1998).** Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4997-5002.
58. **Katz, S.M., Hashemi, S. (1982).** Electron microscopic examination of the inflammatory response to *Legionella pneumophila* in guinea pigs. *Lab. Invest.* 46, 24-32.
59. **Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972).** Apoptosis : a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26 , 239-257.
60. **Kirby, J.E., Vogel, J.P., Andrews, H.L., Isberg, R.R. (1998).** Evidence for pore-forming ability by *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* 27, 323-336.
61. **Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R., Newmeyer, D.D. (1997).** The release of cytochrome c from mitochondria : a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132-111136.
62. **Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P.H., Kirchhoff, S. (2001).** Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J. Biol. Chem.* 276, 20633-20640.

63. **Kuwana, T., Mackey, M.R., Perkins, G., Ellisman, M.H., Latterich, M., Schneider, R., Green, D.R., Newmeyer, D.D. (2002).** Bid, Bax and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 111, 331-342.
64. **Lechardeur, D., Drzymala, L., Sharma, M., Zylka, D., Kinach, R., Pacia, J., Hicks, C., Usmani, N., Rommens, J.M., Lukacs, G.L. (2000).** Determinants of the nuclear localization of the heterodimeric DNA fragmentation factor (ICAD/CAD). *J. Cell Biol.* 150, 321-334.
65. **Li, H., Zhu, H., Xu, C., Yuan, J. (1998).** Cleavage of Bid by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.
66. **Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., Wang, X. (1997).** Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.
67. **Liles, M.R., Edelstein, P.H., Cianciotto, N.P. (1999).** The prepilin peptidase is required for protein secretion by and the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* 31, 959-970.
68. **Liles, M.R., Viswanathan, V.K., Cianciotto, N.P. (1998).** Identification and temperature regulation of *Legionella pneumophila* genes involved in type IV pilus biogenesis and type II protein secretion. *Infect. Immun.* 66, 1776-1782.
69. **Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X. (1996).** Induction of apoptotic program in cell-free extracts : requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-157.
70. **Luder, C.G., Gross, U., Lopes, M.F. (2001).** Intracellular protozoan parasites and apoptosis : diverse strategies to modulate parasite-host interactions. *Trends Parasitol.* 17, 480-486.
71. **Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. (1998).** Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.
72. **Mack, A., Fürmann, C., Häcker, G. (2000).** Detection of caspase-activation in intact lymphoid cells using standard caspase substrates and inhibitors. *J. Immunol. Methods* 241, 19-31.
73. **Marsden, V.S., O'Connor, L., O'Reilly, L.A., Silke, J., Metcalf, D., Ekert, P.G., Huang, D.C.S., Cecconi, F., Kuida, K., Tomaselli, K.J., Roy, S., Nicholson, D.W., Vaux, D.L., Bouillet, P., Adams, J.M., Strasser, A. (2002).** Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature* 419, 634-637.
74. **Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., Janeway, C.A., Jr (1998).** MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell* 2, 253-258.

75. Mesner, P.W., Bible, K.C., Martins, L.M., Kottke, T.J., Srinivasula, S.M., Svingen, P.A., Chilcote, T.J., Basi, G.S., Tung, J.S., Krajewski, S., Reed, J.C., Alnemri, E.S., Earnshaw, W.C., Kaufmann, S.H. (1999). Characterization of caspase processing and activation in HL-60 cell cytosol under cell free conditions. Nucleotide requirement and inhibitor profile. *J. Biol. Chem.* 274, 22635-22645.
76. Müller, A., Hacker, J., Brand, B.C. (1996). Evidence for apoptosis of human macrophage-like HL-60 cells by *Legionella pneumophila* infection. *Infect. Immun.* 64, 4900-4906.
77. Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., Dixit, V.M. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85, 817-827.
78. Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Dixit, V.M. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.* 273, 2926-2930.
79. Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* 88 , 355-365.
80. Nakagawa, I., Nakata, M., Kawabata, S., Hamada, S. (2001). Cytochrome c-mediated caspase-9 activation triggers apoptosis in *Streptococcus pyogenes*-infected epithelial cells. *Cell. Microbiol.* 3, 395-405.
81. Neumeister, B., Faigle, M., Lauber, K., Northoff, H., Wesselborg, S. (2002). *Legionella pneumophila* induces apoptosis via the mitochondrial death pathway. *Microbiology* 148, 3639-3650.
82. Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A., Munday, N.A., Raju, S.M., Smulson, M.E., Yamin, T.T., Yu, V.L., Miller, D.K. (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376, 37-43.
83. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F., Riccardi, C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 139, 271-279.
84. Ogilvy, S., Metcalf, D., Print, C.G., Bath, M.L., Harris, A.W., Adams, J.M. (1999). Constitutive Bcl-2 expression throughout the hematopoietic compartment affects multiple lineages and enhances progenitor cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 14943-14948.
85. Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T., Seya, T. (2003). TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nature Immunol.* 4, 161-171.
86. Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A.M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J., Dixit, V.M. (1997). The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276, 111-113.

87. **Payne, N.R., Horwitz, M.A. (1987).** Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors. *J. Exp. Med.* 166, 1377-1389.
88. **Peter, M.E., Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Chinnaiyan, A.M., Krammer, P.H., Dixit, V.M. (1996).** CD95 (APO-1/Fas)-associating signaling proteins. *Cell Death Differ.* 3, 161-170.
89. **Picard, C., Puel, A., Bonnet, M., Ku, C.L., Bustamante, J., Yang, K., Soudais, C., Dupuis, S., Feinberg, J., Fieschi, C., Elbim, C., Hitchcock, R., Lammas, D., Davies, G., Al-Ghonaïm, A., Al-Rayes, H., Al-Jumaah, S., Al-Hajjar, S., Al-Mohsen, I.Z., Frayha, H.H., Rucker, R., Hawn, T.R., Aderem, A., Tufenkeji, H., Haraguchi, S., Day, N.K., Good, R.A., Gougerot-Pocidalò. M.A., Ozinsky, A., Casanova, J.L. (2003).** Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science* 299, 2076-2079.
90. **Rathmell, J.C., Thompson, C.B. (2002).** Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis and disease. *Cell* 109 *Suppl.* , S97-S107.
91. **Robert-Koch-Institut (2003a).** Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten. *Epidemiologisches Bulletin* 48, 402.
92. **Robert-Koch-Institut (2003b).** Legionellose im Jahr 2002. *Epidemiologisches Bulletin* 45, 361-366.
93. **Rock, F.L., Hardiman, G., Timans, J.C., Kastelein, R.A., Bazan, J.F. (1998).** A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 588-593.
94. **Rogers, J., Keevil, C.W. (1992).** Immunogold and fluorescein immunolabelling of *Legionella pneumophila* within an aquatic biofilm visualized by using episcopic differential interference contrast microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2326-2330.
95. **Rothe, M., Wong, S.C., Henzel, W.J., Goeddel, D.V. (1994).** A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 78, 681-692.
96. **Roulston, A., Marcellus, R.C., Branton, P.E. (1999).** Viruses and apoptosis. *Ann. Rev. Microbiol.* 53, 577-628.
97. **Sakahira, H., Enari, M., Nagata, S. (1998).** Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391, 96-99.
98. **Segal, G., Purcell, M., Shuman, H.A. (1998).** Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1669-1674.
99. **Segal, G., Russo, J.J., Shuman, H.A. (1999).** Relationships between a new type IV secretion system and the icm/dot virulence system of *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* 34, 799-809.

100. **Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S., Green, D.R., Martin, S.J. (1999).** Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade : hierarchical activation of caspase-2, -3, -6, -7, -8 and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell Biol.* 144, 281-292.
101. **Smith, C.A., Farrah, T., Goodwin, R.G. (1994).** The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins : activation, costimulation and death. *Cell* 76, 959-962.
102. **Stickler, D. (1999).** Biofilms. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 270-275.
103. **Susa, M., Ticac, B., Rukavina, T., Doric, M., Marre, R. (1998).** *Legionella pneumophila* infection in intratracheally inoculated T cell-depleted or -nondepleted A/J mice. *J. Immunol.* 160, 316-321.
104. **Suzuki, N., Suzuki, S., Duncan, G.S., Millar, D.G., Wada, T., Mirtsos, C., Takada, H., Wakeham, A., Itie, A., Li, S., Penninger, J.M., Wesche, H., Ohashi, P.S., Mak, T.W., Yeh, W.C. (2002).** Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 416, 750-756.
105. **Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H., Goeddel, D.V. (1993).** A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74, 845-853.
106. **Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S., Dixit, V.M. (1995).** Yama/CPP32 $\beta$ , a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate Poly(ADP-Ribose)Polymerase. *Cell* 81, 801-809.
107. **Thompson, C.B. (1995).** Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.
108. **Thornberry, N.A., Lazebnik, Y. (1998).** Caspases : enemies within. *Science* 281, 1312-1316.
109. **Thornberry, N.A., Peterson, E.P., Zhao, J.J., Howard, A.D., Griffin, P.R., Chapman, K.T. (1994).** Inactivation of interleukin-1 beta converting enzyme by peptide (acyloxy)methyl ketones. *Biochemistry* 33, 3934-3940.
110. **Ting, A.T., Pimentel Muinos, F.X., Seed, B. (1996).** RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF- $\kappa$ B but not Fas/APO-1 initiated apoptosis. *EMBO J.* 15, 6189-6196.
111. **Vaux, D.L., Strasser, A. (1996).** The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2239-2244.
112. **Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., Vaux, D.L. (2000).** Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102, 43-53.

113. **Vogel, J.P., Andrews, H.L., Wong, S.K., Isberg, R.R. (1998).** Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science* 279, 873-876.
114. **Wadowsky, R.M., Yee, R.B. (1981).** A glycine-containing selective medium for isolation of *Legionellaceae* from environmental specimens. *Appl. Environ. Microbiol.* 42, 768-772.
115. **Walczak, H., Degli Eposti, M.A., Johnson, R.S., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Boiani, N., Timour, M.S., Gerhart, M.J., Schooley, K.A., Smith, C.A., Goodwin, R.G., Rauch, C.T. (1997).** TRAIL-R2 : a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J.* 16, 5386-5397.
116. **Walz, J.M., Gerhardt, H., Faigle, M., Wolburg, H., Neumeister, B. (2000).** Legionella species of different human prevalence induce different rates of apoptosis in human monocytic cells. *APMIS* 108, 398-408.
117. **Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H.Y., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., Korsmeyer, S.J. (2001).** Proapoptotic BAX and BAK : a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727-730.
118. **Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K., Akira, S. (2002).** Cutting edge : a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN- $\beta$  promoter in the Toll-like receptor signaling. *J. Immunol.* 169, 6668-6672.
119. **Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P., Wang, X. (1997).** Prevention of apoptosis by Bcl-2 : release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275, 1129-1132.
120. **Yang, R.B., Mark, M.R., Gray, A., Huang, A., Xie, M.H., Zhang, M., Goddard, A., Wood, W.I., Gurney, A.L., Godowski, P.J. (1998).** Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* 395, 284-288.
121. **Zink, S.D., Pedersen, L., Cianciotto, N.P., Abu Kwaik, Y. (2002).** The Dot/Icm type IV secretion system of *Legionella pneumophila* is essential for the induction of apoptosis in human macrophages. *Infect. Immun.* 70, 1657-1663.
122. **Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., Wang, X. (1997).** Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405-413.
123. **Zou, H., Li, Y., Liu, X., Wang, X. (1999).** An Apaf-1/cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* 274, 11549-11556.

---

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München durchgeführt.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Georg Häcker für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit der Promotion. Er führte mich mit großem Engagement in die Welt der molekularbiologischen Forschung ein und unterstützte das Entstehen dieser Arbeit mit nicht nachlassendem Interesse.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Häcker“ für die konstruktive Zusammenarbeit und das sehr angenehme und kollegiale Arbeitsklima bedanken. Besonderer Dank gilt Frau Juliane Vier und Frau Christine Fürmann für die geduldige Einarbeitung in die verwendeten Labortechniken, die stete Hilfe bei allen großen und kleinen Problemen „rund ums Labor“ und die großartige Unterstützung bei vorliegender Arbeit. Bei Frau Dr. Silke Fischer bedanke ich mich für ihre fachlichen Anregungen und die engagierte Betreuung während der Zeit im Labor. Frau Barbara Seiffert danke ich für die vielen wertvollen Tipps beim Erstellen der Abbildungen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen aus der „Diagnostik“ des Instituts bedanken, die mir in allen Fragen der Legionellenzucht stets hilfreich zur Seite standen. Besonderer Dank gilt Frau Veronika Honig für die „Hege und Pflege“ der Legionellen, wenn ich mal nicht da war.

Nicht zuletzt danke ich ganz herzlich meinen Eltern, meiner Schwester und meiner Großmutter, die mich während der Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit sowie während des gesamten Studiums immer unterstützten und ermutigten. Vielen Dank.



---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten :

Name : Müller-Thomas  
Vorname : Catharina  
Geburtsdatum : 17.05.1977  
Geburtsort : Würzburg

### Ausbildung :

Juni 1997 : Abitur am Willi-Graf-Gymnasium , München  
ab November 1997 : Medizinstudium an der Technischen Universität München ,  
Stipendium der bayerischen Begabtenförderung  
August 1999 : Ärztliche Vorprüfung  
August 2000 : Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
August 2002 : Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
Oktober 2002 – August 2003 : Ausbildung im Praktischen Jahr  
10/02 – 12/02 : Gastroenterologie , Klinikum Rechts der Isar , München  
12/02 – 02/03 : Hämatookologie , Klinikum Rechts der Isar , München  
02/03 – 04/03 : Transplantationschirurgie , Klinikum Rechts der Isar , München  
04/03 – 06/03 : Allgemein-/Viszeralchirurgie ,  
CHU de Rouen , Rouen/ Frankreich  
06/03 – 08/03 : Pathologie , Klinikum Rechts der Isar , München  
November 2003 : Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Famulaturen :

März 2000 : Traumatologie , Unfallklinik Murnau  
September 2000 : Kardiologie , Krankenhaus München-Schwabing  
März 2001 : Medizinische Mikrobiologie , Klinikum Rechts der Isar  
August 2001 : Hämatookologie , Universitätsklinik Incheon ,  
Südkorea