Aus der Universitätsklinik für Anaesthesiologie und Transfusionsmedizin

Tübingen

Abteilung Transfusionsmedizin mit Blutbank

Ärztlicher Direktor : Professor Dr. H. Northoff

Interferon-γ-Sekretion von Interleukin-2-aktivierten natürlichen Killerzellen nach Koinkubation mit *L. pneumophila*-infizierten Monozyten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Alexander Mainka

aus

Dresden

2005

Dekan:	**Professor Dr. C. D. Claussen**
1. Berichterstatter:	**Privatdozentin Dr. B. Neumeister**
2. Berichterstatter:	**Privatdozentin Dr. U. Schumacher**

Dem Andenken von
Elisabeth Kaestner,
meiner lieben Großmutter

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung 9

1.1 Einblick in die Forschungsgeschichte zu Legionellen 9

1.2 Taxonomie und Nomenklatur der Legionellen 10

1.3 Diagnostik von Legionellen 11

1.3.1 Mikroskopie und Kultur der Legionellen 11

1.3.2 Antigenurienachweis 11

1.3.3 Antikörpernachweis-Serologie 12

1.3.4 DNA-Nachweis 12

1.3.5 Klinische Diagnose 13

1.3.6 Identifizierung neuer Spezies 13

1.3.7 Überblick – Diagnostik 13

1.4 Epidemiologie 14

1.4.1 Inzidenz und Mortalität der Legionellenpneumonie 14

1.4.2 Erregerreservoir und Infektionsweg 16

1.5 Klinik der Legionelleninfektion 17

1.6 Therapie der Legionelleninfektion 19

1.7 Pathogenese und Virulenzfaktoren 19

1.7.1 Pathogenese 19

1.7.2 Virulenzfaktoren 22

1.7.3 Reduktion des Major-Histocompatibility-Complex class I 26

1.8 Eliminierungsstrategien des humanen Immunsystems für intrazelluläre Erreger wie Legionellen 27

1.8.1 First line of defence – die natürliche Immunantwort 27

1.8.2 Phagozytose durch umgewandelte Monozyten 28

1.8.3 Natürliche Killerzellen 28

1.8.4 Rolle des MHC-Klasse-I: Vergleich von Abwehrstrategien verschiedener Viren und Bakterien 30

1.9 Fragestellung 33

2. Material und Methoden 34

2.1 Legionellen 34

2.1.1 Materialien und Chemikalien 34

2.1.2 Legionellenmedien 34

2.1.3 Legionellenkultur 35

2.2 Zellkultur der K-562-Zelllinie 35

2.2.1 Geräte und Materialien 35

2.2.2 Chemikalien 36

2.2.3 Kulturmedium 36

2.2.4 Kultur 37

2.2.5 Passage 37

2.3 Zellisolationen 37
2.3.1 Geräte und Materialien 37
2.3.2 Chemikalien 38
2.3.3 Isolation von peripheren mononukleären Zellen aus dem Buffy Coat 38
2.3.4 Isolation von Natürlichen Killerzellen aus PBMC 39
2.3.5 Isolation von Monozyten aus PBMC 40
2.4 Infektion der Monozyten und Aktivierung der Natürlichen Killerzellen 41
2.4.1 Geräte, Materialien und Chemikalien 41
2.4.2 Infektionsmedium 41
2.4.3 Infektion und Aktivierung 42
2.5 Ansatz der Koinkubation und Antikörpermarkierung 43
2.5.1 Geräte und Materialien 43
2.5.2 Chemikalien 44
2.5.3 Einstellen der Zellzahl, Vitaliätsprüfung und Koinkubation 45
2.5.4 Intrazellulärer Zytokinassay 46
2.6 Durchflusszytometrische Analyse 47
2.6.1 Exkurs Durchflusszytometrie 47
2.6.2 FACS-Analyse der intrazellulären IFN-γ-Aktivität 49
2.6.3 Statistische Analyse 53
3. Ergebnisse 54
3.1 Experimentelles Vorgehen 54
3.2 Vitalität der NK-Zellen in Kultur und Überlebensrate nach Monensinzugabe 56
3.3 Eignung des Aktivitätsmarkers CD69 57
3.4 Dosisbestimmung von IL-2 58
3.5 Die Positivkontrollen – Stimulation mit der Tumorzelle K-562 und mit PMA 59
3.6 Festlegung auf den 6-Stunden-Wert als Vergleichswert 60
3.7 Kinetik der intrazellulären IFN-γ-Sekretion der NK-Zellen nach 1- bis 24-stündiger Koinkubation mit Mo, iMo1/48, iMo10/48 sowie Vergleichswerte iMo1/24, iMo10/24, iMo10/48st nach 6-stündiger Koinkubation 62
4. Diskussion 67
4.1 Ergebnisüberblick 67
4.2 Die Zytokin-regulierte natürliche Immunabwehr bei Legionellose 69
4.2.1 Beteiligte Komponenten der Immunabwehr 69
4.2.2 Aktivierung von NK-Zellen 70
4.2.3 Immunregulatorisch, antiinfektiös, antiproliferativ – zur Schlüsselrolle des Effektorzytokins IFN-γ bei der Immunabwehr einer Legionellose 72
4.2.4 Rolle des TNF-α 75
4.3 Methodische Einschätzung und Bewertung der Ergebnisse 76
4.4 Bedeutung und Einordnung der Ergebnisse 77

5. Zusammenfassung **82**
6. Literaturverzeichnis **84**
7. Anhang-Wertetabellen **100**
Danksagung **105**
Lebenslauf **106**

Abkürzungen und Fremdwörter

Abb	Abbildung
ACES	N-2-Acetamino-2aminothane-sulphonic-acid
ARDS	*adult respiratory distress syndrome*
BAL	Broncho-alveoläre Lavage
BCYE	*buffered charcoal yeast extract*
BSA	*bovine serum albumin*
Buffy Coat	Blutzellkonzentrat
CDC	*center for disease control and prevention*
c	Konzentration
Da	Dalton
DC	Dendritische Zellen
DFA	*direct fluorescent antibody*
ELISA	e*nzyme-linked-immuno-sorbent-assay*
ER	endoplasmatisches Reticulum
FCS	fötales Kälberserum
FSC	*forward scatter*
FITC	*Fluorescein Isothiocyanat*
GP	Glykoprotein
h	Stunden
HLA	*human leucocyte antigen*
Hsp	Hitzeschockproteine
HTLV	*Human T-cell Leukemia Virus*
ICT	*immunochromatographic membrane assay*
IFA	*indirect immunofluorescence assay*
IFN-γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
K	Kilo
KIRs	*killer inhibitory receptors*
L1P	*Legionella pneumophila* Serogruppe 1 *Pontiac*
L. pneumophila	*Legionella pneumophila*

LLAP	*Legionella-like amoebal pathogens*
L. major	*Leishmania major*
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	*major histocompatibility complex*
MIN	*macrophage induced protein*
min	Minuten
ml	Milliliter
NKT-Zellen	Natürlichen-Killer-T-Zellen
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBMC	*peripheral blood mononuclear cells*
PBS	*phosphat buffered saline*
PCR	*polymerase chain reaction*
PE	*Phycoerythrin*
PerCP	*Perinidin Chlorophyll Protein*
PMA	*phorbol-12-myristat-13-acetat*
SD	Standardabweichung
SG	Serogruppe
SPD-SAG	Citrat-Phosphat-Dextrose-Saline-Adenine-Glukose
SSC	*sideward scatter*
Tab	Tabelle
TAP	*transport associated with antigen processing*
TNF	Tumor Nekrose Faktor
well	Loch, Mulde
µl	Mikroliter

1. Einleitung

1.1 Einblick in die Forschungsgeschichte zu Legionellen

Obgleich es schon in den Jahren zuvor Fälle von Legionärskrankheit, auch Legionellose oder Legionellenpneumonie genannt, gegeben haben musste, wurde der Erreger erst 1977 isoliert. Im Jahr zuvor war Legionellose unter den Teilnehmern einer Versammlung der *American Legion* in einem Hotel in Philadelphia ausgebrochen. Von ca. 4400 Teilnehmern, die meisten davon Kriegsveteranen im vorgerückten Alter, zeigten 221 innerhalb von zwei Wochen Symptome einer Pneumonie, 34 davon erlagen schließlich der Erkrankung. Nach Monaten intensiver Suche gelang Experten vom *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) die Isolierung eines bis dahin unbekannten rickettsienähnlichen Erregers, welcher als Auslöser der Krankheitsfälle identifiziert werden konnte (Fraser et al. 1977; McDade et al. 1977). Es handelte sich um ein GRAM-negatives Bakterium mit der Fähigkeit zur intrazellulären Vermehrung in Säugerzellen und Protozoen (Fields 1996). Es wurde nach der Gruppe der Betroffenen und der Lokalisation der Erkrankung *Legionella (L.) pneumophila* genannt (Weisse 1992; Neumeister 1996).

Legionellen sind weltweit in Frischwasseranlagen zu finden. Retrospektive Analysen von Isolaten legen nahe, dass es mindestens seit Mitte des letzten Jahrhunderts sporadisch zu Infektionen gekommen war (Tatlock 1944; Drozanski 1956).

Der Grund, weshalb Legionellen so lange von der Mikrobiologie unentdeckt blieben, sind ihre anspruchsvollen Wachstumsbedingungen, mit denen sie sich einer Routinediagnostik mittels Keimanzucht auf Standardnährböden entziehen (Fang et al. 1989).

Selbst ein Vierteljahrhundert nach ihrer Entdeckung gilt die Legionellenpneumonie noch als unterdiagnostiziert. Dabei ist u. a. problematisch, dass Infektionsquellen unentdeckt bleiben und nicht beseitigt werden. Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Prävention bietet die Verwendung von neuen Desinfektionsmitteln, wie Monochloraminen (Fields et al. 2002).

1.2 Taxonomie und Nomenklatur der Legionellen

Die Familie der *Legionellaceae* umfasst nur die eine Gattung *Legionella*. Derzeit sind 48 Spezies bekannt, von denen 70 Serogruppen unterschieden werden können (Fields et al. 2002) (siehe Tab. 1.1). Anhand der Isolation aus klinischem Material lassen sich 19 Spezies als humanpathogen einstufen (Muder et al. 2002).

Spezies	Serogruppen	Humanpathogenität	Erstbeschreibung
L. pneumophila	1 bis 15 (Lansing 3)	ja	(Fraser et al. 1977) (Brenner et al. 1988)
L. micdadei		ja	(Hebert et al. 1980)
L. maceachernii		ja	(Brenner et al. 1985)
L. dumoffii		mäßig	(Brenner et al. 1980)
L. longbeachae	1 2	gering	(McKinney et al. 1981) (Bibb et al. 1981)
L. parisiensis		bisher nicht beschrieben	(Brenner et al. 1985)
L. steigerwaltii		bisher nicht beschrieben	(Brenner et al. 1985)

Tab. 1.1: einige ausgewählte Legionellen-Spezies und ihre humanpathogene Bedeutung

Von der humanpathogenetisch bedeutsamsten Spezies *L. pneumophila* sind bereits 15 verschiedene Serogruppen bekannt. Die Serogruppe 1 (SG 1) kann, je nach Stichprobe, für 50-80 % aller diagnostizierten Fälle von Legionärskrankheit verantwortlich gemacht werden (Benin et al. 2002b; Helbig et al. 2002).

Einige Legionellen-Arten können selbst auf Spezialnährböden nicht kultiviert werden und wurden daher „*Legionella*-artige Amöben Pathogene“ („*Legionella like amoebal pathogens*“, LLAPs) genannt (Rowbotham 1993). Bei Vorgabe einer mindestens 40 %igen DNA-Homologie für die Gattungsdefinition würden die Legionellen in mindestens 14 Gattungen und bei 25 %iger DNA-Homologie noch in neun Gattungen zerfallen. Die ausgeprägte phänotypische Ähnlichkeit der Legionellen rechtfertigt jedoch die Einordnung aller Spezies in eine Gattung, so dass eine auf DNA-Homologie beruhende Aufgliederung der Legionellen in mehrere Gattungen nicht vorgenommen wurde (Ruckdeschel et al. 1993). Innerhalb einer Spezies beträgt die DNA-Homologie mindestens 70 % (Benson et al. 1998).

1.3 Diagnostik von Legionellen

1.3.1 Mikroskopie und Kultur der Legionellen

Legionellen sind GRAM-negative ca. 1-10 µm lange und 0,3-0,9 µm dicke begeißelte Stäbchen. Sie besitzen ein einzigartiges Lipopolysaccharid (LPS), das durch einen ungewöhnlich hohen Anteil stark verzweigtkettiger Fettsäuren charakterisiert ist. Legionellen sind mit der üblichen Gramfärbung nur schlecht darstellbar. Besser geeignet ist die für Rickettsien und Chlamydien entwickelte Giménez-Färbung (Karbolfuchsin-Malachitgrün-Färbung). Optimal werden Legionellen durch die direkte Immunfluoreszenz (DFA) dargestellt. Sensitivität beim Testen von respiratorischem Sekretionsmaterial besteht zu 25-75 %. Die Spezifität dieser Methode beträgt mehr als 95 % (Edelstein 1987).

Legionellen stellen, wie bereits erwähnt, hohe Ansprüche an Kulturmedien. Da sie keine Zucker spalten können, benötigen sie Aminosäuren als primäre Energiequelle (zu Kulturbedingungen siehe Kap. 2.1.2). Legionellen werden durch Wachstum auf *buffered charcoal yeast extract*-Agar (BCYE-Agar), einer entsprechenden Morphologie der Kolonien und einer bestehenden Abhängigkeit von L-Cystein diagnostiziert. Primärkulturen benötigen bis zu 10 Tage zur Koloniebildung und erscheinen als leicht konvexe, milchglasartige, z.T. leicht gelbliche oder blau-rosa opaleszierende Kolonien auf dem Aktivkohleagar (Neumeister 1996).

Die Kultur stellt den ‚Goldstandard' der Legionellendiagnostik dar und besitzt die größte Spezifität, jedoch muss man bei der Bewertung die niedrige Sensitivität der Methode (9-70 %) bedenken (Ehret 1995). Das Material der Wahl für die Anzucht stellen Proben aus dem Respirationstrakt, also Sputum oder Broncho-alveoläre Lavage (BAL) dar. Eine erfolgreiche Kultur ist jedoch auch mit anderen Specimen möglich (Edelstein 1987).

1.3.2 Antigenurienachweis

Der Nachweis von Legionellen-Antigen im Urin mittels eines *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) ermöglicht eine sehr frühe Diagnose (Berdal et al. 1979; Bernander et al. 1994; Williams et al. 1995; Kashuba et al. 1996). Er weist bei einer Infektion mit *L. pneumophila* SG 1 eine Spezifität von 97 % und eine Sensitivität von 80 % auf (Marrie et al. 1999). Die Bedeutung des Antigenurie-Nachweises hat in den letzten

Jahren enorm zugenommen, da eine frühe Diagnose mit sofortiger Therapie (siehe Kap. 1.6.) entscheidend für den Krankheitsverlauf ist und von anderen Tests nicht geleistet werden kann (Benin et al. 2002b). Aufgrund der Spezifität der eingesetzten Antikörper gegen *L. pneumophila* SG 1 bleiben allerdings andere Legionellosen unerkannt. Ein weiterer Nachteil ist die Degradation der Antigene bei zu langen Aufbewahrungszeiten (Rigby et al. 1997; Benin et al. 2002b). Neben dem bisher üblichen ELISA kann Antigenurie auch mit einem Immunochromatographischen Membran Assay (ICT), ähnlich dem Schwangerschaftstest mit β-HCG, festgestellt werden. Breitspektrum-Urintests, welche über *L. pneumophila* SG 1 auch Infektionen durch andere Legionellenspezies erfassen, befinden sich in Erprobung.

1.3.3 Antikörpernachweis-Serologie

Als gängiger Routinetest hat sich die indirekte Immunfluoreszenz (IFA) bewährt (Wilkinson et al. 1979). Die detektierbaren Antigene entstammen fixierten Standardstämmen der einzelnen Spezies und Serogruppen. Die Sensitivität dieses Testsystems beträgt zwischen 75 % und 87 %, die Spezifität nahezu 100 % (Wilkinson et al. 1981; Darelid et al. 2003). Da erst 14 Tage nach den ersten klinischen Symptomen ca. 50 % der Patienten serokonvertiert sind (Harrison et al. 1988; Monforte et al. 1988), ist eine frühe Diagnose mit serologischen Methoden nicht zu erbringen. Derzeitige Empfehlungen legen eine Verwendung von monovalentem Antigen von *L. pneumophila* SG 1 nahe (Fields et al. 2002). Neben dem IFA wird auch ein Mikroagglutinationstest verwendet (Harrison et al. 1982).

1.3.4 DNA-Nachweis

Der Nachweis mittels *polymerase chain reaction* (PCR) über Amplifikation Legionellen-spezifischer Gensequenzen stellt neben der kulturellen Anzucht die einzige Methode dar, mit der alle bekannten Legionellenspezies erkannt werden können. Eine Übersicht über benutzte DNA-Targets bietet Fields (Fields et al. 2002). Die Stärke der Nachweise von Legionellen-Nukleinsäuren liegt in der hohen Empfindlichkeit. Allerdings weist bisher keiner der entwickelten Tests eine ausreichend hohe Spezifität auf. In der Routinediagnostik einer *Legionella* verdächtigen Pneumonie spielen PCRs daher bisher nur eine untergeordnete Rolle (Fields et al. 2002).

1.3.5 Klinische Diagnose

Aufgrund der unspezifischen Symptomatik ist es bisher noch nicht gelungen, eine Legionellenpneumonie mittels klinischer Kriterien von anderen Pneumonien zu unterscheiden (Edelstein 1993). Einen erneuten Versuch unternahm jüngst Gupta und Mitarbeiter (Gupta et al. 2001), die eine sehr komplexe Symptomliste (Cunha 1998) einschließlich unspezifischer Laborparameter, wie Serumkalium und Transaminasen, benutzten. Allerdings ergab das Verfahren eine zu geringe Sensitivität, um Legionellose verlässlich ausschließen zu können.

1.3.6 Identifizierung neuer Spezies

Isolate, die mit Legionellen-spezifischen Antiseren reagieren, gelten als bestätigte *Legionellaceae*. Wenn die Reaktion mit spezifischen Antiseren gegen alle bekannten Legionellenspezies nicht gelingt, müssen diese Isolate auf eine mögliche neue Spezies innerhalb der Gattung hin untersucht werden. Geeignete Methoden sind biochemische Analysen, Fettsäure-Profile, Proteinbandenmuster, Serologie sowie Nukleinsäureanalysen (Benson et al. 1998; Fields et al. 2002). Es existieren ferner einige Methoden zur Subtypisierung von Legionellenspezies siehe dazu: (Selander et al. 1985; Schoonmaker et al. 1992; Gomez-Lus et al. 1993; Pruckler et al. 1995; Valsangiocomo et al. 1995; Van Belkum et al. 1996).

1.3.7 Überblick – Diagnostik

Benin et al. haben in einer Übersichtsarbeit aus dem Jahre 2002 alle dem CDC gemeldeten Fälle unter verschiedenen Gesichtspunkten analysiert. Abb. 1.1 entstammt dieser Arbeit und zeigt den diachronen Verlauf der verschiedenen diagnostischen Verfahren während der beiden letzten Jahrzehnte des 20.Jahrhunderts. Es wurden dabei nur Fälle berücksichtigt, die gemäß CDC-Falldefinition (CDC 1997) für Legionärskrankheit eine radiografisch gesicherte Pneumonie aufwiesen und für mindestens einen der angegebenen Tests positives waren. Insgesamt konnten 6757 Fälle in die Analyse eingeschlossen werden. Da 20 % dieser Fälle mehr als einem Test unterzogen wurden, ist die Summe der Einzelwerte in einem Jahr größer als 100 %. Die Grafik zeigt, dass in den USA die Anfang der 80er Jahre in über 80 % der Fälle verwandte Antikörpermessung am Ende

des Analysezeitraumes so gut wie gar nicht mehr eingesetzt wurde. Für den DFA zeichnet sich ein ähnlicher Bedeutungsverlust ab. Genau gegenläufig verläuft der Trend beim Test auf Antigenurie, der sich zum Standardverfahren entwickelt hat. Nach wie vor häufig angewandt ist die Kultur, die immerhin in ca. 50 % aller Fälle durchgeführt wird (Benin et al. 2002b).

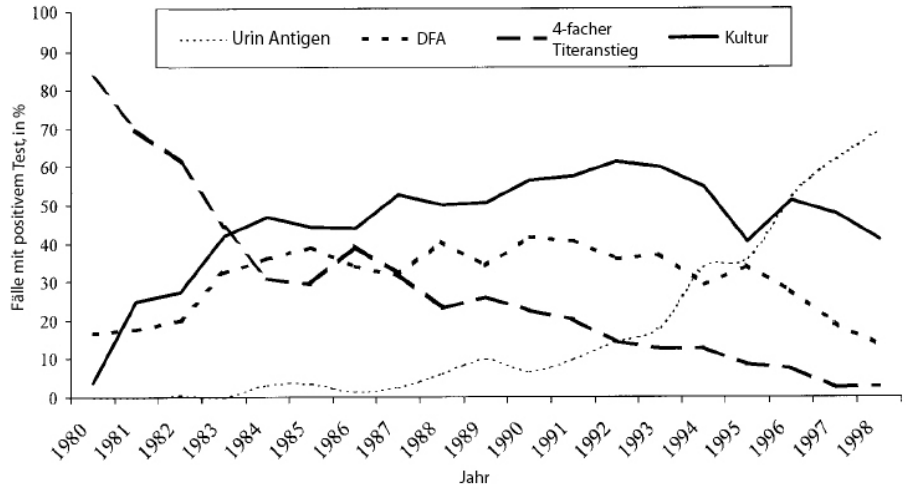

Abb. 1.1: Diagnostische Tests auf *Legionella*; Prozentsatz aller gemeldeten Fälle gemäß der Falldefinition nach Testtyp im Zeitraum 1980-1998; Titeranstieg – Anstieg des Antikörpertiters (Benin et al. 2002b)

Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass Verdachtsfälle sowohl auf Antigenurie als auch mittels Keimanzucht diagnostiziert werden sollten, da nur ein kombiniertes Vorgehen eine möglichst schnelle Diagnose und die Chance auf ein Erkennen von anderen *Legionellaceae* als *L. pneumophila* SG 1 ermöglicht. Außerdem gestattet nur die Kultur die Gewinnung von klinischen Isolaten, die für epidemiologische Untersuchungen einschließlich der Identifizierung der Infektionsquellen essenziell sind.

1.4 Epidemiologie

1.4.1 Inzidenz und Mortalität der Legionellenpneumonie

Legionellen zählen zu den häufigsten bakteriellen Erregern ambulant erworbener Pneumonien (Fang et al. 1990; Fine et al. 1990). Weltweit sind es schätzungsweise 8000-18000 Fälle (Marston et al. 1997). Dabei bleiben die Fallzahlen in etwa konstant (siehe Abb. 1.2).

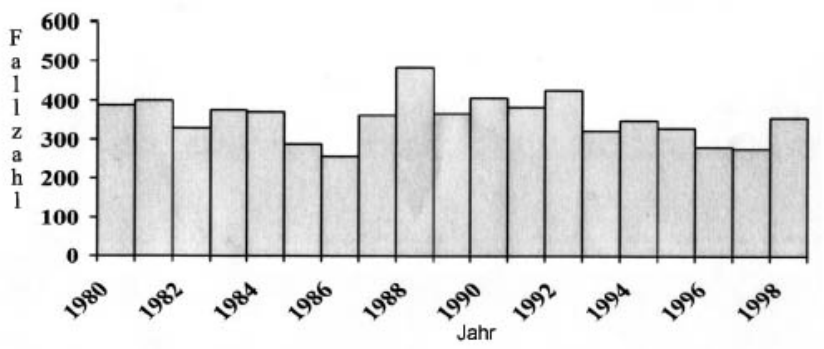

Abb. 1.2: Legionärskrankheit von 1980-1998; jährliche Fallzahlen aus den USA nach Benin (2002b)

Die jährliche Inzidenz in Europa beträgt 0,5 Fälle auf 100.000 Einwohner (Joseph 2002). Die Letalität einer Legionellenpneumonie wird entscheidend von einem frühzeitigen Therapiebeginn beeinflusst (Heath et al. 1996a) und konnte daher durch eine Verbesserung der Diagnostik deutlich gesenkt werden. Eine Untersuchung aller zwischen 1980 und 1998 dem CDC in Atlanta gemeldeten Fälle zeigte einen deutlichen Rückgang der Letalität von max. 34 % im Jahre 1985 auf 11,5 % im Jahre 1998 (Benin et al. 2002b).

Ambulant erworbene Pneumonien werden in Industrieländern bei 2 bis 16 % der Fälle von Legionellen verursacht (Macfarlane et al. 1981; Yu et al. 1982; File et al. 1992; Bohte et al. 1995). Einen höheren Anteil gibt es bei nosokomialen Pneumonien. Sie werden bei bis zu 40 % von Legionellen verursacht (Muder et al. 1983; Johnson et al. 1985; Yu et al. 1987; Ruf et al. 1989). Eine dritte Kategorie stellen die so genannten Reise-assoziierten Krankheitsfälle dar. Darunter fallen Personen, welche in den letzten zehn Tagen vor Krankheitsbeginn mindestens eine Nacht außer Haus verbracht haben (EWGLI 2003). Sie machen ca. 20 % aller Fälle von Legionärskrankheit aus (Helbig et al. 2002).

In den USA werden etwa 90 % der Legionellenpneumonien durch *L. pneumophila* ausgelöst, dabei entfallen ca. 50 % auf die SG 1 und 30 % auf bisher unbekannte Serogruppen. Daneben haben noch *L.micdadei* (2,8 %), *L.longbeachae* (2,2 %), *L.dumoffii* (1,5 %) und *L.bozemanii* (1,3 %) eine gewisse humanpathogenetische Bedeutung (Benin et al. 2002b). In Europa werden 78,5 % aller Fälle von *L. pneumophila* SG 1 hervorgerufen (Helbig et al. 2002).

Infektionen mit weniger bekannten Legionellenstämmen sind wohl nicht zuletzt deshalb selten verzeichnet, weil eine spezifische Diagnostik nur unzureichend möglich ist (Fields 1997).

1.4.2 Erregerreservoir und Infektionsweg

Legionellen sind weltweit in natürlichen Süßwasseransammlungen und besonders in künstlichen Wassersystemen anzutreffen. In einer Erhebung in Süswasserreservoiren gelang bei 40 % ein kultureller Nachweis. Der PCR-Nachweis erbrachte sogar bei 80 % die Bestätigung eines Legionellenbefalls (Fields 1997).

Die primäre Infektionsquelle bilden wasserführende technische Einrichtungen. Dabei fördert eine Warmwassertemperatur zwischen 25°C und 49°C die Bakterienvermehrung (Wadowsky et al. 1985). Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 35°C (Katz et al. 1987). Wasserrohre und Wasserschläuche aus Kunststoff, Silikon oder Gummi erlauben die Bildung eines Biofilms, in dem sich Legionellen länger halten können als auf der relativ dauerhaft glatten Oberfläche von Wasserrohren aus Edelstahl, Glas oder Kupfer (Schoenen et al. 1988; Kramer et al. 1994). Große Wasserversorgungs- und Kühlsysteme, wie sie in Krankenhäusern, Hotels und anderen mehrstöckigen Gebäuden installiert sind, scheinen häufiger Legionellenkontamination aufzuweisen als kleine Systeme in Einfamilienhäusern (Bhopal 1995). Eine wichtige Rolle bei der Vermehrung von Legionellen im Wassersystem spielen mikroökologische Interaktionen von Amöben, Flagellaten und Ziliaten mit den Legionellen. Legionellen vermehren sich nicht in sterilem Wasser, sondern benötigen im Wasser lebende Protozoen als Wirtsorganismus für ihr intrazelluläres Wachstum. Während bei niedrigen Wassertemperaturen Amöben in der Lage sind, Legionellen nach der Phagozytose zu zerstören, fördert Wasser mit Temperaturen zwischen 37°C und 49°C das intrazelluläre Wachstum der Legionellen (Tyndall et al. 1982; Smith-Somerville et al. 1991).

Die Fähigkeit zur intrazellulären Vermehrung in Protozoen erklärt, warum Legionellen gegenüber Chlorierung von Wasser erheblich resistenter sind als andere Bakterien (Kilvington et al. 1990). Sie überleben in Protozoenzysten. Eine Möglichkeit der hygienischen Verbesserung für größere Wassersysteme liegt in der Verwendung von Monochloraminen anstelle von freiem Chlor (Kool et al. 1999). Eine größere Stabilität die-

ser Substanzen scheint hierbei Grund für die erhöhte biozide Wirkung auf Legionellen zu sein. Zu einer besseren Prävention von in Krankenhäusern trägt auch die Verwendung von Kupfer-Silber-Ionisations-Systemen zur Wasserdesinfektion bei (Stout et al. 2000).

Eine Legionelleninfektion erfolgt durch Inhalation der Bakterien in Form von Aerosolen (Hoge et al. 1991), wie sie beispielsweise beim Betrieb von Duschen, medizinischen Verneblergeräten, Klimaanlagen und in Schwimmbädern entstehen (Davis et al. 1987; Winn 1988; Hart et al. 1991).

Eine Ausnahme hierbei bildet *L. longbeachae*, ein häufiges Isolat aus Blumenerde (Steele 1989). *L. longbeachae* stellt den häufigsten Grund für Legionellose in Australien dar und befällt dort vornehmlich Gärtner sowie Beschäftigte im Blumenerdevertrieb (Ruehlemann et al. 1996).

1.5 Klinik der Legionelleninfektion

Eine Legionellose manifestiert sich in der Regel in Form der folgenden zwei Krankheitsbilder: der Legionärskrankheit, einer schweren, multisystemischen Erkrankung mit Pneumonie (Fraser et al. 1977) und dem Pontiacfieber, einer selbstlimitierenden grippeartigen Erkrankung (Glick et al. 1978). Allerdings verläuft ein hoher Prozentsatz der Infektionen klinisch stumm: es finden sich viele Serokonvertierte ohne jegliche Symptomatik (Boshuizen et al. 2001).

Die klassische Legionellenpneumonie ist eine oftmals schwer verlaufende Erkrankung. Sie hat eine Inkubationszeit von 2 bis 10 Tagen. Prodrome sind Müdigkeit, Übelkeit, Benommenheit, Kopf- und Gliederschmerzen sowie Schweißausbrüche. Das Fieber steigt auf über 40°C, meist begleitet von Schüttelfrost. Der anfänglich trockene Husten geht später in einen produktiven Husten mit purulenter Expektoration über. Radiologisch imponieren alveoläre, fleckförmige Verschattungen, die in der Regel konfluieren. Sie sind als Zeichen alveolärer Infiltrate und treten bei der Legionellenpneumonie häufiger auf als bei anderen atypischen Peumonien (Macfarlane et al. 1984). Histopathologisch lässt sich die Erkrankung als eine multifokale, fibrinopurulente Alveolitis und Bronchiolitis klassifizieren. Die Pneumonie kann durch die Entwicklung einer Schock-

lunge (ARDS), oft begleitet von einem Multiorganversagen, kompliziert werden (Hervas et al. 1988; Monforte et al. 1989; Arnouts et al. 1991; Fumarola et al. 1992). In den ersten vier bis fünf Tagen der Erkrankung leidet etwa die Hälfte der Patienten an wässrigen Durchfällen mit Blutbeimengungen (Kirby et al. 1980; Yu et al. 1982). Neurologische Symptome treten bei einem Drittel der Patienten auf (Yu et al. 1982; Mackenzie 1987; Virchow et al. 1995). Andere Organsysteme sind am Krankheitsgeschehen seltener beteiligt. Es wurden jedoch Fälle von Manifestationen an Niere (interstitielle Nephritis, Tubulusnekrosen und akutes Nierenversagen) (Fenves 1985) und Herz (Perikarditis, Myokarditis) (Mayock et al. 1983; Nelson et al. 1984; Luck et al. 1989) beschrieben.

Das Pontiac-Fieber ist eine Legionelleninfektion mit deutlich milderem Verlauf. Der Verlauf ist akut und selbstlimitierend und ähnelt einem grippalen Infekt. Die Inkubationszeit beträgt 48 Stunden. Etwa 90 % der exponierten Personen entwickeln Symptome wie Übelkeit, Myalgien, Fieber, Schüttelfrost und Kopfschmerzen (Nguyen et al. 1991a; Nguyen et al. 1991b). Obwohl häufig ein trockener Husten auftritt, ist eine Pneumonie weder auskultatorisch noch radiologisch nachweisbar. Auch ohne Antibiotikatherapie gesunden die betroffenen Patienten innerhalb weniger Tage. Vitale Legionellen sind kulturell selten nachweisbar. Das Pontiac-Fieber kann innerhalb eines Ausbruchs parallel zur Legionellenpneumonie auftreten und befällt bevorzugt jüngere und gesündere Menschen (Thomas et al. 1993; Kramer et al. 1994; Benin et al. 2002a).

Für die Entwicklung einer Legionellenpneumonie sind bestimmte Risikofaktoren prädisponierend (Davis et al. 1987). Als spezielle Risikofaktoren gelten Transplantationen, Hämodialyse, Chemotherapie sowie die Einnahme von Cortikosteroiden, Cyclosporinen. Zu den allgemeinen Risikofaktoren zählen Noxen wie Zigaretten und Alkohol, chronische Erkrankungen der Lunge, Diabetes mellitus und Urämie. Diese allgemeinen Faktoren implizieren ein höheres Risiko bei männlichem Geschlecht und einem Lebensalter über 50 Jahren (Marston et al. 1994).

Bei Mäusen konnte eine Verschlechterung einer Legionellenpneumonie unter Hypoxiebedingungen, wie sie etwa bei Sauerstoff-Beatmung vorherrschen, beobachtet werden (Tateda et al. 2003).

1.6 Therapie der Legionelleninfektion

Verzögerung einer effektiven Therapie geht immer mit einer erhöhten Mortalität einher (Heath et al. 1996a). Da Azithromycin und Fluorchinolone weniger Nebenwirkungen als Erythromycin besitzen und *in vitro* sogar eine höhere Wirksamkeit aufweisen, werden diese zumindest von einigen Autoren als Mittel der Wahl empfohlen (Edelstein 1998; Pedro-Botet et al. 2001). Neuere Makrolide gelten inzwischen gegenüber Erythromycin als geeigneter (Sabria et al. 2002). Bei Unverträglichkeit oder starken Nebenwirkungen nach Makrolidtherapie wie Phlebitis, Übelkeit, anhaltenden Durchfällen, Störungen der Leberfunktion mit und ohne Cholestase oder Anzeichen von Ototoxizität kann auch Doxycylin eingesetzt werden (Davis et al. 1981; Meyer 1983; Yoshida et al. 1985; Nguyen et al. 1991b).

Da Chinolone keine Interferenz mit Cyclosporin aufweisen, werden sie insbesondere für Transplantationspatienten empfohlen (Hooper et al. 1988; Wynckel et al. 1991; Ruckdeschel et al. 1993). Die Therapiedauer sollte zwei Wochen bei immunkompetenten und drei Wochen bei immunsupprimierten Patienten nicht unterschreiten. Typisch für eine Legionellenpneumonie ist die lange Rekonstitutionsphase der Patienten, die auch unter wirksamer und schnell einsetzender Therapie durchschnittlich zwei bis drei Monate in Anspruch nimmt.

Eine Analyse von sechs Fällen von Legionärskrankheit aus dem Jahr 2002 kommt zu dem Schluss, eine Legionelleninfektion ebne den Weg auch für andere Pathogene, insbesondere *Streptococcus pneumoniae.* Der Autor schlägt daher eine zusätzliche Verwendung von Pneumokokken-wirksamen-Antibiotika bei Risikopatienten vor (Tan et al. 2002).

1.7 Pathogenese und Virulenzfaktoren

1.7.1 Pathogenese

Als entscheidender Pathogenesefaktor wird die Fähigkeit virulenter Legionellen angesehen, sich in Alveolarmakrophagen vermehren zu können (Horwitz et al. 1980). So ist die stark humanpathogene Spezies *L. pneumophila* SG 1 in der Lage, sich intrazellulär

um drei bis vier Logarithmenstufen zu vermehren. Die mäßig humanpathogene Spezies *L. micdadei* zeigt eine weniger ausgeprägte Vermehrungsfähigkeit um etwa eine Logarithmenstufe. Gering oder nur unter bestimmten Bedingungen humanpathogene Spezies wie *L. longbeachae, L. gormanii* und *L. steigerwaltii* zeigen im In-vitro-Test mit einer monozytären Zelllinie eine Abnahme der Bakterienzahl (Neumeister et al. 1997).

Der Lebenszyklus wurde sowohl in Protozoen als auch in Zellen von *Mammalia* charakterisiert (siehe Abb. 1.3): Nach Inhalation eines erregerhaltigen Aerosols werden Legionellen durch Alveolarmakrophagen phagozytiert (Horwitz 1992). Bellinger-Kawahara et al. fanden heraus, dass diesem Vorgang die Fixierung der Komplementkomponente C3 an das *major outer membrane protein* (MOMP) der Bakterien vorangeht (Bellinger-Kawahara et al. 1987, 1990). Payne et al. konnten die Existenz einer Komplement-Rezeptor-vermittelten Phagozytose zeigen (Payne et al. 1987). Eine Arbeit von Weissgerber et al. zeigt jedoch, dass die pathogenetische Bedeutung der Komplement-Rezeptor-vermittelten Phagozytose nur gering ist: die Blockierung monozytärer Zellen mit Komplement-Rezeptor-spezifischen Antikörpern hat keinen Einfluss auf die Menge an phagozytierten Legionellen und Komplement-Rezeptor negative Zellen phagozytieren identische Mengen von *L. pneumophila* wie Komplement-Rezeptor positive Zellen (Weissgerber et al. 2003).

Bei der Phagozytose von *Legionella pneumophila* SG 1 wurde über eine spezielle Form der Phagozytose, die so genannte Coiling-Phagozytose berichtet. Dabei wickelt sich eine Ausstülpung des Makrophagen spiralförmig um das Bakterium, um es aufzunehmen. Andere Legionellen werden konventionell phagozytiert (Horwitz 1984; Marra et al. 1990).

Die Phagozytose über Komplementrezeptoren ermöglicht vitalen Erregern, auf eine schonende Art und Weise in die Wirtszelle aufgenommen zu werden und gleichzeitig den *oxidative burst* im Phagozyten außer Kraft zu setzen (Horwitz 1992). Die Fähigkeit zur Hemmung der intrazellulären Produktion von Sauerstoffradikalen ist gerade für Legionellen sehr wichtig, da sie auf Grund ihrer geringen Katalase-, Glutathionperoxidase- und Glutathionreduktase-Aktivität sehr empfindlich gegenüber toxischen Sauerstoffradikalen sind (Locksley et al. 1982).

Bei der Phagozytose von *L. pneumophila* durch *Hartmanella vermiformis* gelang Venkataraman die Identifizierung eines Rezeptors, welcher Homologie zum Galaktose- und N-acetylgalaktosamin (Gal/GalNAc)-inhibitierbaren Lektin von *Entamoeba histolytica* aufweist (siehe Abb. 1.3). Diesem Lektin wird eine Funktion bei der Adhärenz von *L. pneumophila* an *H. vermiformis* zugeschrieben (Venkataraman et al. 1997).

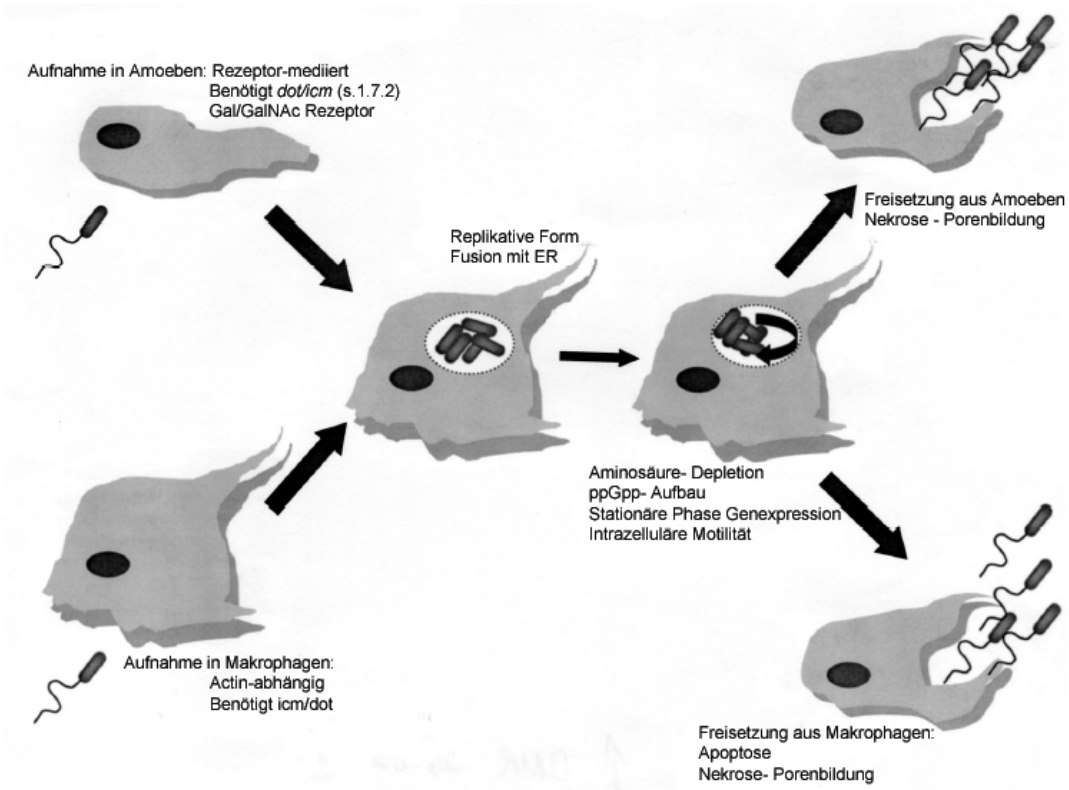

Abb. 1.3: Lebenszyklus von *Legionella pneumophila* in Protozoen und humanen Makrophagen nach Fields (2002) (Erklärungen im Text)

Nach der Aufnahme durch konventionelle Phagozytose oder Coiling-Phagozytose liegt das Bakterium sowohl in Makrophagen als auch in Amöben in einem Phagosom. Binnen 60 Minuten finden sich dem Phagosom der Legionellen von zytosolischer Seite angelagerte Vesikel (Horwitz 1983a). Nach etwa einer Stunde kann eine Interaktion mit Mitochondrien beobachtet werden. Aus der Fusion mit Bestandteilen des ER resultiert nach vier bis zwölf Stunden ein Phagosom, das ebenso wie raues ER mit Ribosomen besetzt ist und ER-Antigene besitzt (siehe Abb. 1.3) (Horwitz 1983a; Swanson et al. 1995; Abu Kwaik 1996; Swanson et al. 2000; Tilney et al. 2001; Kagan et al. 2002; Roy et al. 2002). *L. pneumophila* vermehrt sich innerhalb dieses Phagosoms mit einer Verdopplungszeit von ca. zwei Stunden während der mid-log-Phase (Horwitz et al.

dopplungszeit von ca. zwei Stunden während der mid-log-Phase (Horwitz et al. 1980). Während der intrazellulären Vermehrung ist *L. pneumophila* in der Lage, die Fusion von Phagosom mit Monozytenlysosom und die Ansäuerung des Phagosoms zu verhindern (Horwitz 1983b; Horwitz et al. 1984; Sturgill-Koszycki et al. 2000). Dieser Mechanismus scheint eine aktive Leistung der Legionellen darzustellen, da ebenfalls durch Coiling-Phagozytose aufgenommene, Formalin-inaktivierte Legionellen die Phagolysosomenfusion nicht hemmen, ihr Phagosom angesäuert wird und sie schnell innerhalb des Phagolysosoms verdaut werden (Horwitz et al. 1984). Allerdings konnte die Hemmung der Phagolysosomenbildung bisher nur für *L. pneumophila* SG 1 nachgewiesen werden. Andere Serogruppen und andere Legionellenspezies, die die Phagolysosomenbildung nicht hemmen können, vermehren sich – zumindest teilweise – trotzdem intrazellulär (Rechnitzer et al. 1989a; O'Connell et al. 1996; Neumeister et al. 1997).

Die intrazelluläre Vermehrung der Legionellen geht mit einer Aminosäure-Depletion der Wirtszelle einher, welche die Anhäufung von 3'-5' Bipyrophosphat (ppGpp) verursacht (siehe Abb. 1.3) (Hammer et al. 1999). Dies erhöht die Bildung des so genannten σ-Faktors RpoS, der wiederum die Expressionsrate von Genen der stationären Phase erhöht. Diese erleichtern die Infektion von neuen Zellen (Swanson et al. 2000).

Den finalen Schritt des Infektionszyklus stellt dann der Zelltod mit Freisetzung der Bakterien dar (Swanson et al. 2000). In Makrophagen und alveolären Epithelzellen wird Zelltod zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion durch Apoptose auf mitochondrialem Weg (Neumeister et al. 2002), und später auch durch direkte Zytotoxizität (Hagele et al. 1998; Gao et al. 1999) verursacht. Dagegen konnte bei *Acanthamoeba polyphaga* und *Acanthamoeba castellani* keine Apoptose induzierende Wirkung bestätigt werden (Hagele et al. 1998; Gao et al. 2000).

1.7.2 Virulenzfaktoren

Im Laufe der Zeit konnten verschiedene Virulenzfaktoren charakterisiert werden. Es handelt sich um von *Legionella* kodierte Genprodukte, die bei der Wirtszellinvasion oder der intrazellulären Vermehrung Bedeutung haben. Die folgende Einteilung beruht auf der Übersichtsarbeit von Cianciotto (Cianciotto 2001):

Strukturen der Legionellen-Oberflächen:

- LPS – Das Legionellen-LPS verfügt über einen hohen Prozentsatz verzweigtkettiger Fettsäuren und eine hydrophobe O-Kette (Ciesielski et al. 1986; Petitjean et al. 1990; Mintz et al. 1992).
- LipidA hat nur geringe endotoxische Aktivität, die mit einer niedrigen Affinität zum CD14-Rezptor von Makrophagen assoziiert ist (Neumeister et al. 1998a); jüngst wurde allerdings auch ein Zusammenhang mit intrazellulärem Wachstum und Virulenz nachgewiesen (Lüneberg et al. 1998; Lüneberg et al. 2001).
- *rcp (resistance to cationic antimicrobial peptides*) – Das Genprodukt modifiziert LipidA und erhöht die Virulenz (Robey et al. 2001);
- Legionellen-Geißeln (Flagellen) spielen eine Adhärenz-unabhängige Rolle bei der Wirtszellinvasion (Dietrich et al. 2001).
- *mip* (*macrophage infectivity potentiator*) – Es handelt sich um ein Oberflächenprotein von 24 kDa mit Peptidyl-prolyl-cis/trans-Isomerase-Aktivität (Cianciotto et al. 1989; Fischer et al. 1992; Helbig et al. 2001).
- *pilE* kodiert für das Pilin-Protein, dessen mögliche Bedeutung liegt in der Adhärenz, es liegt jedoch kein Einfluss auf intrazelluläre Vermehrung vor (Liles et al. 1998).

Sekretionssysteme und Sekretionsfaktoren:

- *pilD* – Genprodukt ist die Prepilin Peptidase, welche über das Typ IV Sekretionssystem sezerniert wird und wichtig für Typ-II-Protein-Sekretion ist (Stone et al. 1998; Liles et al. 1999). Über das Typ-II-Protein-Sekretionssystem werden eine Reihe von Enzymen sezerniert, dazu gehören die Zink-Metalloprotease, weitere Endo- und Exopeptidasen sowie eine PhospholipaseA, die an der Destruktion von befallenen Phagozyten beteiligt sind und Lungensurfactant sowie Membranen zerstören (Flieger et al. 2000a; Flieger et al. 2000b; Flieger et al. 2001; Rossier et al. 2001).
- *lsp* kodiert für ein Typ-II-Sekretionssystem (Hales et al. 1999; Polesky et al. 2001; Rossier et al. 2001).
- *icm/dot* (*intracellular multiplication locus/ defect in organelle trafficking*) (Marra et al. 1992; Berger et al. 1993) – Es handelt sich um 24 Genloci, die für das Typ-IV-Sekretionssystem von *L. pneumophila* kodieren. Es konnten die Sekretionsprodukte DotA und RalF identifiziert werden (Nagai et al. 2001; Nagai et al. 2002). Die evolutionsbiologisch-ursprüngliche Funktion des Typ-IV-Sekretionssystems ist der

Austausch von Transfer-Plasmiden im Rahmen bakterieller Konjugation. Legionellen bedienen sich wahrscheinlich des Typ-IV-Sekretionssystems, um den Proteintransfer zwischen ihren replikativen Phagosomen und dem Zytoplasma zu erleichtern. Für das DotA-Protein konnte eine Porenbildner-Aktivität in Wirtszellmembranen nachgewiesen (Kirby et al. 1998; Vogel et al. 1998; Christie et al. 2000; Swanson et al. 2000; Christie 2001); Legionellen-Mutanten ohne DotA-Expression können keine Wirtszell-Poren mehr bilden (Coers et al. 2000)

Periplasmatische und zytosolische Virulenzfaktoren :

- Katalase-peroxidaseB (KatB) ist nötig für optimale intrazelluläre Infektion (Bandyopadhyay et al. 1998).

Andere Infektionsfördernde Genloci:

- *pmi* (*protozoan and macrophage infectivity*) (Gao et al. 1997),
- *mil* (*macrophage-specific infectivity*) (Gao et al. 1998) und
- *enh, eml, milA sind* wichtig für Invasion und Etablierung des replikativen Phagosoms (Cirillo et al. 2000; Harb et al. 2000)

Das Fehlen eines der angeführten Genbereiche – mit Ausnahme von *pilE* – hebt die Fähigkeit zur intrazellulären Vermehrung von *L. pneumophila* SG 1 auf bzw. führt zu einer Reduzierung und Verzögerung der intrazellulären Vermehrung (Cianciotto et al. 1990; Cianciotto et al. 1992; Marra et al. 1992; Berger et al. 1993; Gao et al. 1997; Gao et al. 1998; Cianciotto 2001).

Legionellen synthetisieren während ihres intrazellulären Wachstums in Makrophagen spezifische Proteine (*macrophage induced protein*s, MINs) (Yamamoto et al. 1992; Abu Kwaik et al. 1993; Susa et al. 1996). Insbesondere der verstärkten Synthese von Hitzeschockproteinen (Hsp) und ihrer Expression an der Wirtszelloberfläche dürfte dabei eine besondere Bedeutung hinsichtlich der Lyse solcher Zellen durch T-Lymphozyten zukommen (Weeratna et al. 1994). Hsp60 wird ferner eine Rolle bei der Invasion zugeschrieben (Garduno et al. 1998).

Die Virulenz von Legionellen kann auch durch verschiedene Umweltfaktoren und Wachstumsbedingungen beeinflusst werden. Für die Vermehrung ist z. B. eine ausreichende Bereitstellung von Eisen essenziell. Legionellen sezernieren Legiobactin, ein Siderophor (Liles et al. 2000). Weitere Gene, welche die Eisenbereitstellung und damit die intrazellu-

läre Infektion erleichtern, kodieren für eine Methyltransferase (iraA) und einen Eisen-Peptid-Transporter (iraB) (Viswanathan et al. 2002). Auch die Kulturtemperatur beeinflusst die Virulenz. Legionellen haben *in vitro* volle Virulenz bei einer Inkubationstemperatur von 37°C. Siehe dazu Übersicht bei Neumeister (Neumeister 1996).

Im Gegensatz zur humoralen Immunität kommt der zellvermittelten Immunität entscheidende Bedeutung bei der Abwehr einer Legionelleninfektion zu. Bereits sehr frühe Untersuchungen haben gezeigt, dass Lymphozyten von Patienten, die von einer Legionellenpneumonie genasen, nach in-vitro-Kontakt mit Formalin-inaktivierten Legionellen sowohl Proliferation ([^{3}H]-Thymidineinbau) als auch Zytokin-Aktivität im Zellkulturüberstand zeigten (Plouffe et al. 1981, 1982; Friedman et al. 1983; Horwitz et al. 1983; Friedman et al. 1984a; Friedman et al. 1984b). Später wurde klar, dass die beobachtete Zytokin-Aktivität im Überstand Antigen-aktivierter Lymphozyten hauptsächlich auf die Produktion von Interferon-γ (IFN-γ) durch diese Lymphozyten zurückzuführen war (Bhardwaj et al. 1986; Whitaker Dowling et al. 1986; Jensen et al. 1987; Nash et al. 1988; Byrd et al. 1989; Skerrett et al. 1992). Makrophagen, die *in vitro* durch IFN-γ stimuliert wurden, phagozytierten weniger *L. pneumophila*-Bakterien, vermutlich aufgrund verminderter Expression des Komplementrezeptors nach Stimulation. Sie waren außerdem in der Lage, durch verminderte Expression des Transferrinrezeptors und durch Senkung der intrazellulären Ferritinkonzentration die Bereitstellung von Eisen für die Legionellen zu beschränken und so die intrazelluläre Multiplikation von *L. pneumophila* zu hemmen. Sie vermochten jedoch nicht, alle intrazellulär gelegenen Legionellen auch abzutöten (Byrd et al. 1989) (Gebran et al. 1994a; Gebran et al. 1994b; Gebran et al. 1994c). Mit *L. pneumophila*-infizierte Makrophagen sezernieren Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF-α). Die Produktion von TNF-α der Wirtsmakrophagen wird durch IFN-γ verstärkt und durch IL-10 gehemmt. TNF-α forciert seinerseits autokrin die Makrophagenstimulation, wahrscheinlich über eine Stimulation der endogenen NO-Produktion (Blanchard et al. 1989; Summersgill et al. 1992; Matsiota-Bernard et al. 1993; Brieland et al. 1995; Park et al. 1996). Da aktivierte Makrophagen *in vitro* die intrazelluläre Vermehrung von Legionellen zwar hemmen können, also bakteriostatisch wirken, nicht aber Bakterizidie vermitteln, wurden weitere Mechanismen zur vollständigen Eradikation der Bakterien postuliert, wie z. B. NK-Zell- oder CD8-T-

Zell-vermittelte Zytotoxizität (Blanchard et al. 1987b; Blanchard et al. 1988; Resnick et al. 1988; Friedman et al. 2002). Einen Beitrag zum Verständnis der möglichen Wirkung von NK-Zellen im Rahmen einer Legionellose versucht die vorliegende Arbeit zu leisten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die Begrenzung und Überwindung einer Legionelleninfektion vor allem eine intakte zellvermittelte Immunreaktion notwendig ist, die aus dem Zusammenspiel von Antigenpräsentation, Zytokin-vermittelter T-Zell-, Makrophagen- und NK-Zell-Aktivierung sowie aus Phagozytose und Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten besteht. Wird ein Teil dieses Netzwerkes gestört, z. B. durch Kortikosteroidtherapie, schwere Grunderkrankungen oder Immunsuppression, besteht eine erhöhte Gefährdung hinsichtlich einer Legionelleninfektion.

1.7.3 Reduktion des Major-Histocompatibility-Complex class I

Noch nicht publizierte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen bei durch *L. pneumophila*-infizierten humanen Monozyten nach 48 Stunden Infektionsdauer eine gegenüber uninfizierten Monozyten deutlich verminderte Expression der MHC-Klasse-I (siehe Abb. 1.4).

Im Infektionsverlauf ist nach 24 Stunden eine geringe Abnahme der MHC-Klasse-I feststellbar, die sich nach 48 Stunden auf die im Histogramm dargestellte Kurvenverschiebung (siehe Pfeil in Abb. 1.4) ausweitet. Monozyten, welche mit der apathogenen Spezies *L. steigerwaltii* infiziert worden waren, zeigten dagegen kaum quantitative Veränderungen in ihrem MHC-Klasse-I-Besatz.

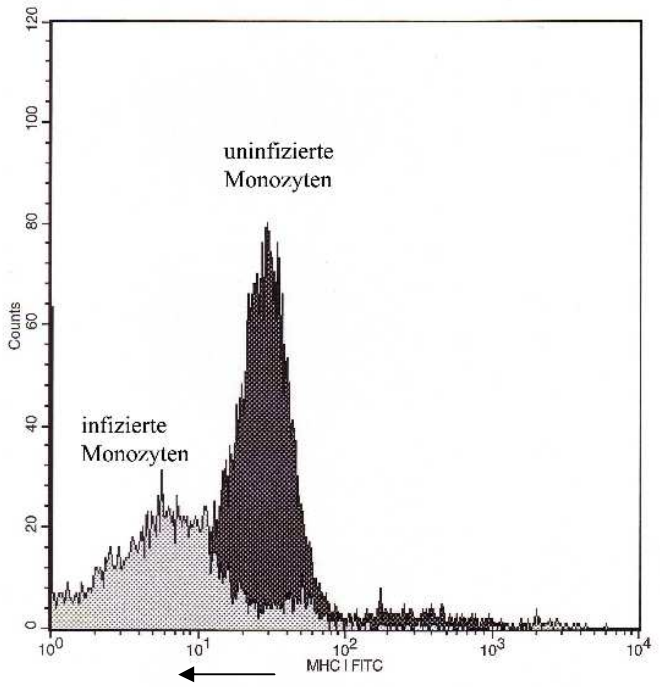

Abb. 1.4: Überlagertes Histogramm humaner Monozyten; Durchflusszytometrische Analyse der Fluoreszenz-Aktivität von MHC-Klasse-I spezifischen Antikörpern (x) auf einzelnen Monozyten (y = Anzahl der Monozyten); infizierte Monozyten nach 48 Stunden Infektion mit *L. pneumophila* (freundlicherweise von Frau Marion Faigle zur Verfügung gestellt) (zur Darstellungsform „Histogramm“ siehe Kap. 2.6.2).

1.8 Eliminierungsstrategien des humanen Immunsystems für intrazelluläre Erreger wie Legionellen

1.8.1 *First line of defence* – die natürliche Immunantwort

Intrazelluläre Erreger wie Legionellen sind der spezifischen Immunabwehr, sei es zellulär via T-Zellen oder humoral via Antikörper, nur eingeschränkt direkt zugänglich. Zumindest existieren bisher kaum detaillierte Kenntnisse über derartige Mechanismen im Zusammenhang mit einer *L. pneumophila*-Infektion (Friedman et al. 2002). Das humane Immunsystem ist daher bei der Bekämpfung solcher Erreger in erster Linie auf die angeborene, unspezifische oder auch natürliche Immunabwehr angewiesen. Die Wirkungsweise des natürlichen Immunsystems ist charakterisiert durch eine unmittelbare, nicht verzögerte Antwort mittels co-stimulatorischer Moleküle, einer Aktivierung über

genomisch fixierte Rezeptoren und einer perfekten Unterscheidung zwischen ‚eigen' und ‚fremd' (Janeway et al. 2002).

Zu den humoralen Komponenten der unspezifischen Abwehr zählen die Komplementfaktoren, aber auch Zytokine, z. B. Interleukine und Akutphaseproteine (Kayser et al. 1998). Bei Zytokinen handelt es sich um kleine Proteine von etwa 25kDa, die auf einen Aktivierungsreiz hin aus verschiedenen Körperzellen freigesetzt werden und über spezifische Rezeptoren autokrin, parakrin und/ oder endokrin auf Zellen wirken. Sie werden in Chemokine und Interleukine unterteilt. Unter Interleukinen (IL) versteht man von Leukozyten sezernierte oder auf Leukozyten wirkende Moleküle.

Die zellulären Bestandteile der natürlichen Immunabwehr wirken entweder über Phagozytose von Pathogenen – durch neutrophile und eosinophile Granulozyten oder Monozyten –, über die Lyse infizierter Zellen durch natürliche Killerzellen oder deren Stimulation mittels Effektorzytokinen (Kayser et al. 1998; Janeway 2002).

1.8.2 Phagozytose durch umgewandelte Monozyten

Monozyten bzw. Makrophagen erkennen Krankheitserreger und sind in der Lage, diese in einen Vesikel, genannt Phagosom, aufzunehmen und einzuschließen. Im Anschluss an die Phagozytose werden Pathogene durch Verschmelzen präformierter intrazytoplasmatischer Vesikel – den Lysosomen – mit dem Phagosom zum Phagolysosom von Verdauungsenzymen zerlegt und so unschädlich gemacht. Makrophagen werden z. B. durch IFN-γ aktiviert. Dabei werden die Phagolysosombildung erleichtert, die Sauerstoffradikalbildung und die Produktion von Stickstoffoxid erhöht und vermehrt TNF-α-Rezeptoren exprimiert (Janeway 2002). Legionellen überleben insbesondere in nicht aktivierten Makrophagen, indem sie die Aktivierung bremsen und die geschilderten Prozesse blockieren. Sie sind so genannte Phagozytosequertreiber (siehe Kap. 1.7.1).

1.8.3 Natürliche Killerzellen

Die klassischen NK-Zellen entstammen der lymphoiden Zelllinie und gelten als Nicht-T-Nicht-B-Lymphozyten. Nur kurze Erwähnung sollen an dieser Stelle die so genannten Natürlichen-Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) finden. Es handelt sich um Subpopulation

der T-Lymphozyten, welche sowohl NK-Zell-Rezeptoren als auch T-Zell-Rezeptoren exprimieren (Kronenberg et al. 2002).

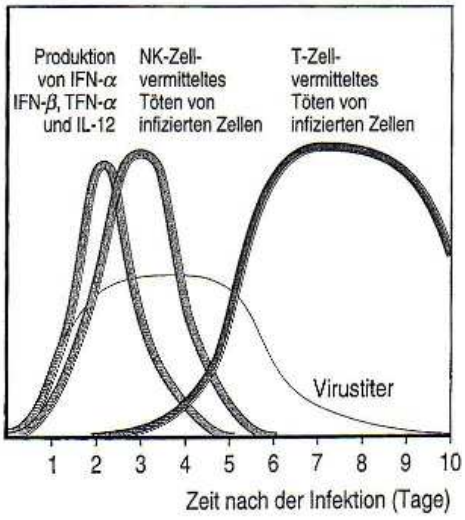

Abb. 1.5: Verlauf der Zytokin-Produktion, NK-Zell- und T-Zell-vermittelten Abwehr während einer Virusinfektion bei Mäusen aus (Janeway 2002)

Anders als T- und B- Lymphozyten, welche die Hauptakteure der spezifischen Immunabwehr nach Epitoperkennung sind, besteht die Hauptfunktion der NK-Zellen in der unspezifischen Abwehr von Protozoen und Viren, aber auch von intrazellulären Bakterien. Bei Mäusen limitieren NK-Zellen im Verlauf einer viralen Infektion die Virusvermehrung in den ersten Tagen, bis etwa ab Tag fünf bis sechs CD8-T-Zellen damit beginnen, die infizierten Zellen gezielt abzutöten (siehe Abb. 1.5).

Darüber hinaus sind NK-Zellen auch in der frühen Abwehr bakterieller Infektionen durch GRAM-positive Bakterien (wie Listerien, Corynebakterien und Staphylokokken), GRAM-negative (wie Salmonellen, Shigellen, Serratien und Legionellen) sowie Protozoen (wie Plasmodien, Toxoplasmen und Leishmanien) involviert. Neben direkten inhibitorischen Effekten auf mikrobiologische Pathogene und der immunregulierenden Zytokin-Produktion spielt bei NK-Zell-Abwehr auch zytolytische Aktivität gegen infizierte Zielzellen eine wichtige Rolle (Bancroft 1993).

NK-Zellen verfügen über zwei Typen von Rezeptoren zur Erkennung von infizierten Zellen. Interaktion mit dem einen Typ löst den Tötungsmechanismus, also die Lyse der Zielzelle, aus. Der Rezeptor wird entsprechend ‚aktivierend' genannt. Zur Gruppe der aktivierenden Rezeptoren, welche ein breites Spektrum an Kohlenhydratliganden erkennen, gehören calciumbindende C-Typ-Lektine, wie z. B. NKG2D (Bauer et al. 1999; Janeway 2002).

Der zweite Rezeptortyp hemmt die Tötung von unveränderten Körperzellen, er wirkt also ‚inhibierend'. Anhand des Aufbaus lassen sich diese inhibitorischen Rezeptoren in je zwei Proteinklassen unterteilen: den bei Mäusen vorhandenen C-Typ-Lectinen (Vertreter Ly49) und den beim Menschen anzutreffenden Immunglobulinen, welche als kil-

lerhemmende Rezeptoren (*killer inhibitory receptors,* KIRs) angesprochen werden. Diese inhibitorischen Rezeptortypen sind spezifisch für MHC-Klasse-I (Yokoyama et al. 1993). An der Interaktion ist seitens der NK-Zellen neben den KIRs ein Heterodimer beteiligt, welches aus den beiden C-Typ-Lektinen CD94 und NKG2 gebildet wird. Es wird angenommen, dass Zellen mit veränderter MHC-Klasse-I-Expression von NK-Zellen abgetötet werden, da der Lysemechanismus der NK-Zellen mangels Interaktion mit normalen MHC-Klasse-I auf den Zielzellen nicht mehr ausreichend unterbunden wird (Janeway 2002). Entscheidend scheinen dabei vor allem quantitative Veränderungen der MHC-Klasse-I-Expression zu sein. Dagegen sind qualitative – also strukturelle – Veränderungen der MHC-Klasse-I weniger bedeutsam, da auch unbeladene MHC-Klasse-I TAP-defizienter Zellen noch einen wirksamem Schutz vor NK-Zell-Lyse bieten (Mandelboim et al. 1996; Natarajan et al. 2002).

NK-Zellen können zum einen über Kontakt und Perforinfreisetzung zytotoxisch wirken und zum anderen über Interleukinfreisetzung (vor allem IFN-γ) nicht-zytotoxische Effektorfunktionen vermitteln. Anhand von Knockout-Mausmutanten, die kein Perforin mehr bilden können, ließ sich feststellen, dass insbesondere nicht-zytopathogene Viren, Tumoren, transformierte Zellen, aber auch hochvirulente zytopathogene Viren (z. B. Pockenviren) über perforinabhängige Zell-Lyse kontrolliert werden. Nicht-zytolytischen Effektormechanismen von NK-Zellen, wie z. B. der IFN-γ-Freisetzung scheint dagegen bei der Kontrolle von zytopathischen Viren und intrazellulären Bakterien große Bedeutung zuzukommen (Kayser et al. 1998). Durch Zugabe von IL-2 und IL-12 wurde eine Zunahme der zytolytischen Aktivität von NK-Zellen um das Zwanzig- bis Hundertfache beobachtet (Henney et al. 1981; Janeway 2002).

1.8.4 Rolle des MHC-Klasse-I: Vergleich von Abwehrstrategien verschiedener Viren und Bakterien

Der *major histocompatibility complex* (MHC) verdankt seine Entdeckung und Bezeichnung Experimenten zur Gewebeverträglichkeit (Histokompatibilität) an Mäusen. Als Pendant beim Menschen konnten antigene Strukturen auf Leukozyten ausfindig gemacht werden. Da diese *human leukocyte antigens* (HLA) maßgeblichen Einfluss auf die Akzeptanz eines Gewebetransplantats haben, wurden sie MHC genannt (Klein

1975). Die HLA werden in zwei Untergruppen von Proteinen – die MHC-Klasse-I-Moleküle (MHC-Klasse-I) und die MHC-Klasse-II-Moleküle (MHC-Klasse-II) – unterteilt. MHC-Klasse-I sind auf nahezu allen Körperzellen vorhanden, während MHC-Klasse-II vor allem auf lymphohämatopoetischen Zellen, wie z. B. Makrophagen, zu finden sind (Kayser et al. 1998). MHC-Klasse-I werden im ER unter Mithilfe der formstabilisierenden Chaperone Calnexin und Calreticulin aus einer schweren Kette und β2-Microglobulin zu einem Heterodimer zusammengesetzt. Die Tertiärstruktur des MHC-Klasse-I-Komplexes weist eine nach Translokation dem Extrazellulärraum zugewandte Tasche auf, was die Beladung mit normalen bzw. mutierten, zelleigenen oder auch mit im Proteasom fragmentierten Fremdantigenen gestattet (Berg et al. 2003). Diese fragmentierten Fremdantigene stammen aus dem Proteasom und gelangen über spezielle TAP-Transporter (*transport associated with antigen processing*) ins ER, wo sie an der ER-Membran in einem Komplex aus MHC-Klasse-I, TAP und Tapasin auf den MHC-Klasse-I geladen werden. Die mit Fremdantigen beladenen MHC-Klasse-I werden nun über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche, ihrer immunologischen Wirkungsstätte, transloziert.

Diese MHC-Klasse-I-vermittelte Antigenpräsentation spielt eine entscheidende Rolle bei der unspezifischen Immunabwehr durch NK-Zellen und der spezifischen Immunabwehr durch T-Zellen (Maksymowych et al. 2000). Daher haben verschiedene Mikroorganismen Strategien entwickelt, um insbesondere der höchsteffizienten spezifischen T-Zell-Abwehr durch Reduktion der MHC-Klasse-I auf ihren Wirtszellen zu entgehen. Dies wird bei vielen Viren durch eine Blockade der gesamten Proteinsynthese ihrer Wirtszelle erreicht. Daneben haben aber einige Mikroorganismen auch spezifische Mechanismen entwickelt, um die Antigenpräsentation via MHC-Klasse-I zu vermindern. Da es dabei zu einer Pathogenitätszunahme der Keime durch Umgehen immunologischer Abwehr kommt, spricht man in diesem Zusammenhang auch von so genannten Immunescape-Mechanismen oder Immunevasion (siehe Tab. 1.2).

Tab. 1.2: Immunevasion einiger Mikroorganismen durch Modifikation der Antigenpräsentation über MHC-Klasse-I auf humanen Zellen

Mikroorganismus	Modifikation der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation	Referenz
Viren		
Herpes simplex virus	ICP47-Protein → bindet an TAP und blockiert die Protein-bindende Domäne des Transporters	(York et al. 1994; Hill et al. 1995; Ahn et al. 1996b; Tomazin et al. 1996)
Humanes Cytomegalie Virus	• Glykoprotein (gp) UL18: Homolog der schweren Kette der MHC-Klasse-I, MHC-Klasse-I mit gpUL18 inhibieren NK-Zellen mediierte Zielzelllyse	(Reyburn et al. 1997)
	• US3 hält MHC-Klasse-I im ER zurück → Translokationsstop	(Ahn et al. 1996a)
	• US2 und US11 Rücktransport von MHC-Klasse-I vom ER ins Zytosol → Abbau im Proteasom	(Wiertz et al. 1996a; Wiertz et al. 1996b)
	• pp65 → phosphoryliert CMV-Antigene →Proteolysestop	(Gilbert et al. 1996)
	• US6 → bindet an TAP und blockt Peptid Import	(Ahn et al. 1997)
Adenoviren	E3/19kDa-Genprodukt → Translokationsstop für MHC-Klasse-I vom ER in Golgi-Apparat und Expressionsstop von MHC-Klasse-I durch TAP-Bindung als Tapasin-Inhibitor	(Bennett et al. 1999)
Eppstein Barr Virus	EBNA-1 → Inhibition der Antigen-Prozessierung	(Levitskaya et al. 1995)
Human Immunodeficiency Virus	• Vpu → Inhibition der MHC-Klasse-I-Assemblierung	(Kerkau et al. 1997)
	• Nef → Inhibition der MHC-Klasse-I-Expression	(Piguet et al. 1999)
Bakterien		
Chlamydia trachomatis	• Inhibition der MHC-Klasse-I-Expression durch Abbau des Transskriptionsfaktors RFX5	(Zhong et al. 2000)
	• Inhibition der MHC-Klasse-I-Expression bei infizierten humanen Monozyten durch Sekretion von IL-10	(Caspar-Bauguil et al. 2000)

Am Maus-Modell wurde auch für *Toxoplasma gondii* (Luder et al. 1998), *Listeria monocytogenes (Schuller et al. 1998)* und *Leishmania donovani* (Reiner et al. 1987) eine Inhibition der MHC-Klasse-I-Expression beschrieben.

1.9 Fragestellung

MHC-Klasse-I haben zwei wesentliche Funktionen. Zum einen vermitteln sie spezifisch – über Präsentation von Fremdantigenen – die Erkennung von infizierten Zellen durch zytotoxische CD8-T-Zellen. Zum anderen führt eine veränderte Expression unspezifisch zu einer Aktivierung von NK-Zellen über KIRs.

Aus Kap. 1.8.4 geht die Bedeutung von MHC-Klasse-I bei der Pathogenese vieler Mikroorganismen hervor. Versuche aus unserer Arbeitsgruppe zeigen auch für *L. pneumophila* eine Reduktion der MHC-Klasse-I-Expression humaner Makrophagen. Diese Veränderung ist bei Infektion mit nichtreplikativen Legionellenspezies nicht feststellbar und daher offenbar virulenzabhängig. Zur Rolle der CD8-T-Zell-Antwort bei einer Legionellose liegen bisher keine Erkenntnisse vor. Es liegt nahe, dass die beobachtete Reduktion der MHC-Klasse-I-Expression der Monozyten der Grund für die Ineffektivität der zytotoxischen T-Zell-Abwehr bei einer Legionellose sein könnte. Eine weitere Folge der Reduktion von MHC-Klasse-I könnte die Aktivierung von NK-Zellen sein, welche dann die Infektion begrenzen.

Zur Klärung der Frage, welche Bedeutung diesem Mechanismus bei der Pathogenese der Legionärskrankheit zukommt, wurde in der vorliegenden Arbeit die Aktivierung von NK-Zellen bei Koinkubation mit *L. pneumophila*-infizierten humanen Monozyten untersucht. Als Indikator der NK-Zell-Aktivität wurde das wichtige Effektorzytokin IFN-γ in einem intrazellulären Zytokinassay bestimmt. Ziel der Arbeit war die Klärung folgender zwei Fragen:

- Gibt es eine IFN-γ-Antwort von NK-Zellen bei Koinkubation mit durch *L. pneumophila*-infizierten humanen Monozyten? Wenn ja:
- Korreliert die IFN-γ-Sekretion der NK-Zellen mit der MHC-Klasse-I-Reduktion auf koinkubierten Zielzellen?

Untersucht wird damit die Hypothese, dass die beobachtete MHC-Klasse-I-Reduktion auf Monozyten noch nicht ausreicht, um bei koinkubierten NK-Zellen eine relevante Stimulation zu bewirken. Mithin würde auch *L. pneumophila* durch Modifikation der MHC-Klasse-I einen Immunevasionsmechanismus aufweisen.

2. Material und Methoden

2.1 Legionellen

2.1.1 Materialien und Chemikalien

Es kamen zwei verschiedene Spezies der *Legionellaceae* zum Einsatz:

- *L. pneumophila* SG 1 *Pontiac* (*L1P*) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Gotthardt Ruckdeschel/Universität München)
- *L. steigerwaltii* (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. B. Fields/*CDC*/Atlanta/USA)

Für die Anzucht und Kultur der Legionellen wurden folgende Materialien und Chemikalien eingesetzt (siehe Tab. 2.1).

Tab. 2.1: Materialien und Chemikalien zur Legionellenanzucht

Materialien/ Chemikalien	**Hersteller**
Lysiertes Pferdeblut	Oxoid, Wesel, Deutschland
Hefeextract	
Legionella-Agar-Basis CM 655	
Legionella-Wachstumssupplement	
Columbia-Blutagar (Kontroll-Agar)	
Impfschlingen, 10 µl	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Petrischalen (Durchmesser 9 cm)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland

2.1.2 Legionellenmedien

Zusammensetzung des BCYEα-Agars nach Edelstein (Edelstein 1981, 1982):

25 g Legionellen-Agar-Basis CM655 wurden in 900 ml Aqua dest. gelöst und 15 min bei 121°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde das Wachstumssupplement, das aus 10 g N-2-Acetamino-2aminothane-sulphonic-acid (ACES), 0,25 g Eisenpyrophosphat,

0,4 g L-Cystein und 1,0 g α-Ketoglutarat besteht, in 100 ml Aqua dest. gelöst und steril filtriert zugegeben.

Zusammensetzung der BYE-Bouillon nach Edelstein (Edelstein 1981) (Edelstein 1982):

1 g Hefeextrakt wurde in 1 l Aqua dest. gelöst und 15 min. bei 121°C autoklaviert. Danach wurde Wachstumssupplement, bestehend aus 0,2 g L-Cystein, 0,125 g Eisenpyrophosphat, 0,5 g α-Ketoglutarat und 1,0 g KOH (pH-Einstellung auf 6,9) zugegeben. Die gesamte Bouillon wurde anschließend steril filtriert und portioniert.

2.1.3 Legionellenkultur

Aus einer bei -70°C in lysiertem Pferdeblut eingefrorenen Legionellen Vorratslösung wurden die für die Versuche benötigten Stämme durch schnelles Erwärmen aufgetaut, unter sterilen Bedingungen auf eine BCYE-Platte gegeben und mit einer Einmalimpföse verteilt. Die so beimpften BCYE-Platten wurden 2 bis 4 Tage bei 37°C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2 bebrütet. Danach wurde je eine Subkultur als 3-Ösen-Ausstrich hergestellt und erneut 4 bis 7 Tage bebrütet. Hierauf konnten die Legionellen für den Infektionsversuch verwendet werden. Als Kontrolle der Reinkultur diente eine Subkultur auf Columbia-Blutagar, auf welchem zwar eventuelle Kontaminanten, jedoch keine Legionellen wachsen konnten.

2.2 Zellkultur der K-562-Zelllinie

2.2.1 Geräte und Materialien

Für die Zellkultur der K-562-Zellen kamen die in Tab. 2.2 und 2.3 gelisteten Geräte und Materialien zum Einsatz.

Tab. 2.2: Geräte

Technische Geräte	**Hersteller**
Zentrifuge (TI-6)	Beckmann, München, Deutschland
CO_2 Water-Jacket-Incubator	Multimed Wicker, Kirchheim unter Teck, Deutschland

Sterile Werkbank	Kendro, Langenselbold, Deutschland
Lichtmikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
Vortex	Bender und Holbein, Zürich, Schweiz
Pipettboy	Hirschmann, Neckartenzlingen, Deutschland
Invertmikroskop IMT-2	Olympus, Hamburg, Deutschland

Tab. 2.3: Materialien

Materialien	**Hersteller**
50 ml-Röhrchen	Falcon, BectonDickinson, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturflaschen 75 cm^2	Costar, Bodenheim, Deutschland
Trypanblau (0,4 %)	Sigma, München, Deutschland

2.2.2 Chemikalien

Die für die K-562-Zellkultur verwendeten Chemikalien sind in Tab. 2.4 dargestellt.

Tab. 2.4: Chemikalien

Chemikalien	**Hersteller**
RPMI 1640-Nährmedium mit 25mm Hepes Buffer, ohne L-Glutamin	Gibco, Eggenstein, Deutschland
L-Glutamin 10 %	
Fötales Kälberserum (Myoclone plus) (FCS)	
OPI-Supplement (Oxalat, Pyruvat und Insulin)	
Nicht essenzielle Aminosäuren 100X (enthält: L-Alanin, L-Asparaginsäure, L-Glutaminsäure, Glycin, L-Prolin, L-Serin)	

2.2.3 Kulturmedium

Die Anzucht und Kultivierung der K-562-Zellen erfolgte in RPMI-1640-Medium mit folgenden Zusätzen:

- 10 % fötales Kälberserum (FCS) (Myoclone plus, 0,5 h bei 56° im Wasserbad inaktiviert)
- 1 % Glutamin

- 1 % nicht essenzielle Aminosäuren
- 1 % OPI-Supplement (Oxalacetat 1 mmol, Pyruvat 1 mmol, Insulin 9 µg/ml)

2.2.4 Kultur

Die K-562-Zellen wurden als Zellsuspension bei 37°C und 5,0 % CO_2 [V/V] Zellkulturflaschen kultiviert. Die Zellen wurden mindestens einmal pro Woche umgesetzt und zwei Tage vor Koinkubation mit NK-Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert.

2.2.5 Passage

Nach einer Bebrütungszeit von maximal sieben Tagen wurde der Inhalt einer Zellkulturflasche nach Prüfung auf Kontamination im Lichtmikroskop in ein steriles 50 ml Falcon-Röhrchen pipettiert und 10 min bei 250 x g ($g=9{,}81 m/s^2$) zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die pelletierten Zellen in 5 ml Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden je 1 ml der Zellsuspension mit je 24 ml Kulturmedium in frische Kulturflaschen pipettiert. Beim jedem Umsetzen wurde ein Teil der Mutterlösung auf einer Blutagarplatte zur Prüfung auf Kontamination ausgestrichen und im Inkubator bei 37°C und 5,0 % CO_2 [V/V] inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten auf Kontamination kontrolliert.

2.3 Zellisolationen

2.3.1 Geräte und Materialien

Sowohl die Effektorzellen, also die natürlichen Killerzellen, als auch die Targetzellen, also die Monozyten wurden aus so genannten *Buffy Coats*, d. h. aus den leukozytären Restzellen aus 500 ml Frischblut isoliert. Bei den Zellisolationen kamen außer den in Tab. 2.2 und 2.3 aufgelisteten Geräten und Materialien folgende Utensilien zum Einsatz:

Tab. 2.5: Geräte und Materialien für die Zellisolation

Geräte und Materialien	**Hersteller**
Transferpette-8	Brand, Wertheim, Deutschland

DPC MicroMix 5	Promega, Mannheim, Deutschland
Vortex	Bender und Hobein, Zürich, Schweiz
Neubauer-Zählkammer	
Einmal-Pipetten	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcon Tubes 2095, 15 ml, Polypropylene	Falcon, BectonDickinson, Heidelberg, Deutschland
Falcon Röhrchen 2052, Polystyrene max. 5 ml	
Eppendorf-Cup, 2 ml, safelock	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.3.2 Chemikalien

Außer den in Tab. 2.4 aufgeführten Chemikalien kamen bei den Isolationen folgende Chemikalien zum Einsatz:

Tab. 2.6: Chemikalien für die Isolation

Chemikalien	**Hersteller**
Destilliertes Wasser (Aqua dest.), Zellkultur getestet	Gibco, Eggenstein, Deutschland
Phosphat buffered Saline (PBS)	
Cell Negativ Isolation Kit/NK-Zellen	Dynal, Hamburg, Deutschland
Negative Cell Isolation Kit/Monozyten	Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Negative Cell Isolation Kit/NK-Zellen	
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma, München, Deutschland
LSM1077-Lymphozytentrennmedium	PAA, Cölbe, Deutschland

2.3.3 Isolation von peripheren mononukleären Zellen aus dem *Buffy Coat*

Die verwendeten *Buffy Coats* stammten von gesunden Spendern der Abteilung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Tübingen, welche schriftlich ihr Einverständnis für eine Verwendung ihrer Leukozyten für wissenschaftliche Zwecke erteilt hatten. Das Vollblut wurde mit CPD-SAG-Mannitol vermischt und nach Separation von Erythrozyten und Plasma zum *Buffy Coat* verarbeitet.

Ein *Buffy Coat* enthält die auf 50 ml konzentrierten Leukozyten aus einem halben Liter Frischblut. Zuerst wurde dieses Zellkonzentrat in 50 ml-Röhrchen gefüllt und 1:1 mit

Phosphat buffered Saline (PBS) verdünnt. Dann wurden jeweils 25 ml des Gemisches in 50 ml Röhrchen über 20 ml Lymphozytenseperationsmedium geschichtet. Durch die sich anschließende Zentrifugation bei 1000 x g für 20 min wurden die in der Interphase zwischen Seperationsmedium und Plasma verbleibenden mononukleären Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) von den pelletierten Erythrozyten getrennt.
Die separat abgeernteten PBMCs wurden dreimal mit PBS gewaschen und bei 400 ,180 ,100 x g zentrifugiert. Da diesen niedrigen Geschwindigkeiten nur die PBMCs nicht aber die Thrombozyten pelletiert werden, verblieb ein Großteil Thrombozyten im Überstand und wurde mit diesem abgegossen.
Die in PBS resuspendierten PBMC wurden dann mithilfe der Zählkammer quantifiziert und für die beiden Isolationen aliquotiert. Die Ausbeute aus einem *Buffy Coat* schwankte in der Regel zwischen 5-9 x 10^8 Zellen.

2.3.4 Isolation von Natürlichen Killerzellen aus PBMC

Für die NK-Zellisolation wurden Isolationskits von Dynal bzw. Miltenyi verwendet. Das dabei angewandte Prinzip der Negativ-Depletion beruht auf der magnetischen Entfernung unerwünschter Zellen aus einer Zellsuspension. Möglich wird dies durch die Bindung der nicht benötigten Zellen an Antikörper, welche mit magnetisch-aktiven Kügelchen (*beads*) gekoppelt sind.
Zur Zellsuspension mit den PBMC wurde ein Antikörper-Cocktail gegeben, der Antikörper enthielt, welche gegen charakteristische CD-Moleküle der unerwünschten Zellpopulationen gerichtet waren. Nach Auswaschung des Antikörper-Cocktails wurde in einem zweiten Schritt mit einem weiteren Antikörper inkubiert, der gegen den Fc-Teil des ersten Antikörpers gerichtet war und ein magnetisch aktives Konjugat trug. Durch Verwendung eines Magneten konnten nun die markierten Zellen über *beads*-gekoppelte Antikörper depletiert, also entfernt werden. Übrig blieb die erwünschte Zellpopulation, deren garantierter Reinheitsgrad mind. 80 % betrug (Romani et al. 1996). Da der Anteil der NK-Zellen an allen PBMC ca. 5 % beträgt, wurde entsprechend dem jeweiligen Versuchsansatz das Zwanzigfache der benötigten NK-Zell-Menge an PBMC für die Isolation eingesetzt. Für die Miltenyi-Isolation wurden die PBMC zunächst in 80 µl

Puffer (PBS von Gibco, Eggenstein, Deutschland mit 0,5 % BSA) je eingesetzte 10^7 Zellen in 50 ml-Röhrchen resuspendiert. Dazu wurden 20 µl des Antikörper-Cocktails je 10^7 Zellen gegeben. Nun wurde 10 min bei 6°C inkubiert. Danach wurden die Antikörper in 2 Waschschritten durch Spülen mit 35 ml Puffer, Zentrifugieren bei 400 x g für 10 min und Abgießen des Überstandes entfernt. Nun wurden je 20 µl *beads*-gekoppelte Antikörper und 80 µl Puffer pro 10^7 Zellen hinzugegeben. Nach 15 min Inkubation bei 6°C wurden die *beads*-gekoppelten Antikörper in einem Waschschritt entfernt. Die Zellen wurden nun mit 500 µl Puffer je 10^8 Zellen resuspendiert und über VarioMACS-Säulen von Miltenyi in dem dazugehörigen Magneten von den unerwünschten, *beads*-markierten Zellen befreit. Nachdem die Zellsuspension die Säulen durchlaufen hatte, enthielt sie vor allem NK-Zellen, welche dann nochmals bei 400 x g zentrifugiert wurden.

Bei Verwendung des Dynal-Isolationskits wurden die Zellen in 100 µl Puffer (PBS mit 0,1 % BSA), 20 µl FCS und 20 µl Antikörper-Cocktail je 10^7 Zellen resuspendiert und für 10 min bei 6°C inkubiert. Danach wurden die Antikörper in 2 Waschschritten durch Spülen mit 35 ml Puffer, Zentrifugieren bei 500 x g für 8 min und Abgießen des Überstandes entfernt. Nun wurden 0,95 ml Puffer und 50 µl *beads*-gekoppelte Antikörper je 10^7 Zellen hinzugegeben. Nach 10 min Inkubation bei 6°C wurde die Zellsuspension resuspendiert und mit 500 µl Puffer je 10^7 Zellen aufgefüllt. Die Röhrchen wurden nun in den entsprechenden Magnet von Dynal gestellt. Nach 2 min wurde die Zellsuspension in ein weiteres leeres Röhrchen im Magnet umpipettiert. Nach weiteren 2 min wurde die nun reine NK-Zellsuspension abpipettiert und bei 400 x g für 10 min zentrifugiert.

Die so isolierten NK-Zellen wurden in Kulturmedium (siehe Kap. 2.2.3) resuspendiert und in Zellkulturflaschen bei 37°C und 5,0 % CO_2 [V/V] inkubiert.

2.3.5 Isolation von Monozyten aus PBMC

Für die Isolierung der Monozyten wurde ein Isolationskit von Miltenyi verwendet (zum Prinzip der Negativ-Depletion siehe Kap. 2.3.4).

Der Monozyten-Anteil an allen PBMC liegt bei ca. 30 %. Entsprechend wurde etwa das 3,5fache der benötigten Monozyten-Menge an PBMC für die Isolation eingesetzt. Die präparierten PBMC wurden zunächst in 80 µl Puffer (PBS mit 0,5 % BSA) je eingesetz-

te Zellen in 50 ml-Röhrchen resuspendiert. Dazu wurden 20 µl des Antikörper-Cocktail je 10^7 Zellen gegeben. Nun wurde 10 min bei 6°C inkubiert. Danach wurden die Antikörper in 2 Waschschritten durch Spülen mit 35 ml Puffer, Zentrifugieren bei 400 x g für 10 min und Abgießen des Überstandes entfernt. Nun wurden je 20 µl *beads*-gekoppelte Antikörper und 80 µl Puffer pro 10^7 Zellen hinzugegeben. Nach 15 min Inkubation bei 6°C wurden die *beads*-gekoppelten Antikörper in einem Waschschritt entfernt. Die Zellen wurden nun mit 500 µl Puffer je 10^8 Zellen resuspendiert und über VarioMACS-Säulen von Miltenyi in dem dazugehörigen Magneten von den unerwünschten, *beads*-markierten Zellen befreit. Nachdem die Zellsuspension die Säulen durchlaufen hatte, enthielt sie vor allem Monozyten, welche dann nochmals bei 400 x g zentrifugiert wurden.

Die so isolierten Monozyten wurden in Kulturmedium (siehe Kap. 2.2.3) resuspendiert und bei 37°C und 5,0 % CO_2 [V/V] inkubiert.

2.4 Infektion der Monozyten und Aktivierung der Natürlichen Killerzellen

2.4.1 Geräte, Materialien und Chemikalien

Für die Infektion benötigte Geräte und Materialien siehe Tab. 2.7 und 2.8.

Tab. 2.7: Geräte für die Infektion

Geräte	**Hersteller**
Ultrospec 2000	Pharmacia, Freiburg, Deutschland

Tab. 2.8: Materialien und Chemikalien für die Infektion

Materialien/ Chemikalien	**Hersteller**
Küvette	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Gentamycin 50 mg/ml	Gibco, Eggenstein, Deutschland
Interleukin-2, Humanes, rekombinantes	Sigma, München, Deutschland
6-Well-Platte	Greiner, Frickenhausen, Deutschland

2.4.2 Infektionsmedium

Für die Infektion wurde Kulturmedium (siehe Kap. 2.2.3) ohne FCS-Zusatz verwandt.

2.4.3 Infektion und Aktivierung

Die erste Charge der Monozyten wurde innerhalb von höchstens 12 h nach Isolation mit Legionellen infiziert (Infektionszeitpunkt 1). Dazu wurden ca. 5 Tage alte Legionellen von BCYE-Agar in RPMI resuspendiert und im Fotometer auf eine optische Dichte von 0,2 (+/-0,02) bei 578 nm eingestellt. Bei diesem Extinktionswert enthält die Suspension ca. $3x10^8$ koloniebildende Einheiten. Gemäß der Menge der zu infizierenden Monozyten wurden Aliquots entsprechender Volumina entnommen und separat bei 1000 x g für 15 min zentrifugiert, aufgeschüttelt und in 1,5 ml Infektionsmedium resuspendiert.
Die zu infizierenden Monozyten wurden mit 400 x g zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes und behutsamem Vortexen wurden die resuspendierten Legionellen zugegeben. Daraufhin wurden die Ansätze in eine sterile 6-Loch-Platte pipettiert und bei 37°C und 5 % [V/V] für 2 h inkubiert. Nun wurden zu jedem Ansatz 4,5 ml einer Lösung von in RPMI gelöstem Gentamycin mit einer Konzentration von c = 100 цg/ml zugegeben und eine weitere Stunde inkubiert.
Anschließend wurden die Kavitäten der Lochplatte mit RPMI gespült und die Suspension in zwei Waschschritten inklusive zehnminütigem Zentrifugieren bei 400 x g vom Gentamycin befreit. Anschließend wurden die infizierten Zellen wieder in Kulturmedium resuspendiert und inkubiert.
Aufgrund der Variation der Infektionsdosis von einmal 10 Bakterien pro Monozyt (10:1) und einem alternativen Ansatz mit einem 1:1-Verhältnis wurden jeweils bis zu 2 Aliquots je Infektionszeitpunkt benötigt. Die Ansätze des ersten Infektionszeitpunktes wurden 48 h lang inkubiert. 24 h später wurde eine weitere Charge von Monozyten infiziert (Infektionszeitpunkt 2), welche nach Infektion zusammen mit den anderen Ansätzen noch 24 h Inkubationszeit hatte. Die Infektionen wurden mit *L. pneumophila* SG 1 *pontiac* (*L1P*) durchgeführt. Da apathogene Legionellen bei infizierten humanen Monozyten zu keiner nennenswerten Reduktion der MHC-Klasse-I auf der Oberfläche führen, wurden zu Vergleichszwecken zum Infektionszeitpunkt 1 auch ein Teil der Monozyten mit der bisher nicht als humanpathogen bekannten Spezies *L. steigerwaltii* im Verhältnis 10:1 infiziert. Eine zeitliche Übersicht über die verschiedenen Etappen der Zellprozessierung bietet Tab. 2.9.

	Zeit in h	Zellpräparationen						
Zellisolation aus *Buffy Coat*	Ca. -12	Monozyten						NK-Zellen
		Splitting						
		iMo10/48	iMo1/48	iMo10/24	iMo1/24	iMo10/48st	Mo	
Infektion 1 mit *L1P*	0	X	X	-	-	-	-	-
Infektion mit *L. steigerwaltii*		-	-	-	-	X	-	
Aktivierung mit IL-2		-						X
Infektion 2 mit *L1P*	24	-	-	X	X	-	-	-
Ansatz der Koinkubation	48	X	X	X	X	X	X	X
Koinkubation	48+ 1-24	X	X	X	X	X	X	X
→ Danach: Antikörpermarkierung und FACS-Analyse								

Tab. 2.9: Zeitlicher Versuchsablauf. Nicht dargestellt ist die Prozessierung der K-562, die zum Koinkubationszeitpunkt aufbereitet und verwendet wurden.

Legende: iMo10/48 - 10:1-*L1P*-infizierte Monozyten/48 Stunden Infektionsdauer;
iMo1/48 - 1:1-*L1P*-infizierte Monozyten/48 Stunden Infektionsdauer;
iMo10/24 - 10:1-*L1P*-infizierte Monozyten/24 Stunden Infektionsdauer;
iMo1/24 - 1:1-*L1P*-infizierte Monozyten/24 Stunden Infektionsdauer;
iMo10/48st - 10:1-*L.steigerwaltii*-infizierte Monozyten/48 Stunden Infektionsdauer;
Mo - uninfizierte Monozyten.

Zum Infektionszeitpunkt wurde die NK-Zellsuspension mit 250 U/ml IL-2 angereichert. Aus den NK-Zellen wurden also durch IL-2-Aktivierung so genannte Lymphokin-aktivierte-Killerzellen (LAK). Mit diesem gestaffelten Vorgehen waren 48 h nach Infektionszeitpunkt 1 alle benötigen Monozytenansätze sowie die aktivierten NK-Zellen von einem Spender (autologes System) aufgearbeitet.

Bei den Versuchen zur Dosisbestimmung der IL-2-Aktivierung wurden ebenfalls 48 h vor dem Ansatz der Koinkubation mehrere Fraktionen von NK-Zellen mit unterschiedlichen Dosen von rekombinantem Interleukin-2 (0, 100, 250, 500 U/ml) supplementiert.

2.5 Ansatz der Koinkubation und Antikörpermarkierung

2.5.1 Geräte und Materialien

Es kamen die in Tab. 2.10 aufgeführten Geräte und Materialien zur Anwendung.

Tab. 2.10: Geräte und Materialien zum Versuchsansatz

Geräte/Materialien	**Hersteller**
FACScan	BectonDickinson, Heidelberg, Deutschland
Power MAC G4	AppleMacintosh, Cork, Irland
DPC MicroMix5	Promega, Mannheim, Deutschland
Transferpette-8	Brand, Wertheim, Deutschland
Eppendorf-Cup, 2 ml, safelock	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcon Röhrchen2052, Polystyrene 5 ml	Falcon, BectonDickinson, Heidelberg, Deutschland
96-well-plate	Costar, Cambridge, Vereinigte Staaten von Amerika
MS1-Minishaker	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.5.2 Chemikalien

Folgende Chemikalien und Antikörper kamen zur Anwendung (siehe Tab. 2.11):

Tab. 2.11: Chemikalien und Antikörper

Chemikalien	**Hersteller**
Türckslösung	Sigma, München, Deutschland
Trypanblau (0,4 %)	
Ionomycin, Calcium Salt (I-0634)	
Cytofix/Cytoperm Plus™ (with GolgiStopTM™)	PharMingen/BD, Heidelberg, Deutschland
Anti-CD3-PerCP (Perinidin Chlorophyll Protein) (No.345766)	BectonDickinson, Heidelberg, Deutschland
Anti-IgG1-PerCP (No.345817)	
Anti-IFN-γ-FITC (Fluorescein Isothiocyanat) (No.554700)	
Anti-IgG1-FITC(No.554679)	
Mouse Anti Human CD56:RPE (R.Phycoerythrin)	Serotec, Düsseldorf, Deutschland
Mouse IgG2b NEGATIVE CONTROL:RPE	
Mouse Anti Human CD69:FITC	
Mouse IgG2a NEGATIVE CONTROL:FITC	
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma, München, Deutschland

2.5.3 Einstellen der Zellzahl, Vitaliätsprüfung und Koinkubation

Die Effektorzellen, also die NK-Zellen, wurden vor der Koinkubation mittels Trypanblau-Färbung auf ihre Vitalität getestet. Dabei färben sich solche Zellen an, die nicht mehr stoffwechselaktiv sind. Es wurden jeweils 100 Zellen in drei Eckquadraten ausgezählt und der Anteil der blaugefärbten Zellen an 100 gemittelt. Zur Ermittlung des Anteils vitaler Zellen wurde dieser Mittelwert von 100 % subtrahiert.

Danach wurden sowohl NK-Zellen als auch Monozyten bei 250 x g für 10 min zentrifugiert und in Kulturmedium resuspendiert. Die Zellzahl dieser Suspensionen wurde nach Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer auf 2 x 10^6/ml eingestellt. Die K-562 wurden bei 200 x g für 10 min zentrifugiert und nun in Kulturmedium auf eine Zelldichte von 1 x 10^6/ml eingestellt. Alle Targetzellen (uninfizierte und infizierte Monozyten sowie K-562) wurden vor der Koinkubation mit einer Dosis von 30 Gy mit γ-Strahlung bestrahlt, um die Alloreaktivität auf ein Minimum zu reduzieren (Uberti et al. 1992). Damit wurden eventuelle kompensatorische Gegenregulationen – insbesondere der Monozyten – welche zu einer Verminderung der IFN-γ-Anwort der NK-Zellen führen können, reduziert. Die natürlichen Killerzellen wurden nun mit den verschiedenen Targetzellen in eine 96-*well*-Platte zusammenpipettiert. Dabei kamen jeweils 120 µl von Effektor- und Targetzellen in ein *well*. Das Verhältnis NK-Zellen:Monozyten betrug jeweils 1:1 und das Verhältnis NK-Zellen:K-562 1,5:1 betrug, sodass pro *well* 2,4 x 10^5 NK-Zellen und Monozyten und in den K-562-Ansätzen entsprechend 1,6 x 10^5 Tumorzellen eingesetzt wurden. Bei den Tumorzellen der Linie K-562 handelt es sich um Zellen mit einem Vielfachen des Durchmessers von NK-Zellen. Aus sterischen Gründen wurde daher ein Verhältnis von NK-Zellen/K-562 von 1,5:1 etabliert. Der für den intrazellulären Zytokin-Nachweis essenzielle Proteinexportstop wurde gemäß der Anleitung von BectonDickinson für den ‚Cytofix/Cytoperm Plus™ (with GolgiStop™)-Kit' durch Zugabe von 1,6 µl Monensinlösung mit einer Endkonzentration c = 1,3 µM im *well* bewerkstelligt. Zur maximalen Stimulation der NK-Zellen wurden einem gesonderten Ansatz statt einer Targetzellsuspension 120 µl Kulturmedium, 6,25 µl PMA-Lösung sowie 2,5 µl einer Ionomycin-Lösung zugegeben. Die finalen Konzentrationen im *well* betrugen damit für PMA c = 25 ng/ml und für Ionomycin c = 2 µg/ml (Mendes et al. 2000). Zur Kontrolle wurden sämtliche Versuchsansätze doppelt durchgeführt. Um den Verlauf

der IFN-γ-Produktion nach verschiedenen Koinkubationszeitpunkten darstellen zu können (nach 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24 h), wurden entsprechend viele Ansätze pipettiert. Die anschließende Koinkubation erfolgte bei 37°C und 5 % [V/V] im Inkubator. Die einzelnen Ansätze wurden nach Ablauf ihrer jeweiligen Koinkubationsdauer in eine andere 96-*well*-Platte umpipettiert. Dabei wurde jeder Ansatz in 2 Fraktionen aufgeteilt, wovon jeweils eine mit spezifischen Antikörpern und eine mit den entsprechenden Isotyp-Antikörpern markiert wurde (zur Isotypkontrolle siehe Kap. 2.5.4). Die für die Dosierung der Antikörper entscheidende Gesamtzellzahl betrug nach dieser Auftrennung insgesamt maximal 2,4 x 10^5 Zellen pro *well*. Zur Kontrolle der Basalsekretion der NK-Zellen an IFN-γ ohne Stimulus wurden auch unsimulierte NK-Zellen angesetzt. Um den Stimulationseffekt der infizierten Monozyten von einer möglichen direkten Stimulation durch freie Bakterien abgrenzen zu können, wurden zu einigen NK-Zell-Ansätzen zum Zeitpunkt der Koinkubation statt Targetzellen eine Bakteriensuspension mit 2,4 x 10^6 bwz. 2,4 x 10^7 *L1P*, also etwa dem 10fachen bzw. 100fachen der NK-Zellzahl, zugegeben.

2.5.4 Intrazellulärer Zytokinassay

Die Zellen wurden nun gemäß dem Protokoll des ‚Cytofix/Cytoperm Plus™ (with GolgiStop™)-Kit' von BectonDickinson in einem Mehrschritt-Verfahren mit Antikörpern markiert (verwendete Antikörper siehe Tab. 2.10). Die Zellen wurden zunächst im so genannten Markierungspuffer (PBS [Gibco] mit 1 % FCS [Gibco] und 0,09 % Na-Azide [Sigma]) resuspendiert und dann bei 600 x g für 5 min zentrifugiert.

Dann erfolgte zur Identifizierung der NK-Zellen in einem ersten Schritt eine Markierung mit den Oberflächenmarkern Anti-CD3 (mit Konjugatfarbstoff: PerCP) und Anti-CD56 (mit Konjugatfarbstoff: PE). Die Menge an eingesetztem Antikörper richtet sich nach der Zellzahl und wird für jeden Antikörper vom Hersteller empfohlen. Für max. 2,4 x 10^5 Zellen wurden entsprechend 5 µl des CD3-Antikörpers und 2,5 µl des CD56-Antikörpers gelöst in 50 µl Markierungspuffer eingesetzt. Nach 30 min Inkubation bei 4°C im Dunkeln wurden die Zellen zweimal gewaschen mit Cytofix/Cytoperm™-Lösung fixiert und permeabilisiert. Im Anschluss wurde in einem zweiten Schritt intrazelluläres IFN-γ (1 µl pro *well*) mit einem weiteren intrazellulär bindenden Antikörper

markiert. Der verwendete IFN-γ-Antikörper (Konjugat: FITC) wurde in 50 µl Perm/Wash™-Lösung zugegeben. Nach zweimaligem Auswaschen dieses Antikörpers wurden die Zellen in Markierungspuffer resuspendiert und in FACS-taugliche Röhrchen umgefüllt.

Antikörper besitzen neben ihren beiden spezifischen Bindungsstellen auch eine unspezifische – den Fc-Teil, welcher die Isotypklasse bestimmt. Bindung der Antikörper über ihren Fc-Teil führt in der Analyse zu falsch-positiven Ergebnissen und muss daher vom Messergebnis abgezogen werden. Zur Erfassung des Anteils der unspezifischen Bindung am Messergebnis, wurde die zweite Fraktion jedes Ansatzes – die Isotypkontrolle – parallel mit den entsprechenden Isotyp-Antikörpern markiert. Diese Isotyp-Antikörper besitzen zwar den gleichen Fc-Teil wie der zugehörige spezifische Antikörper, entbehren jedoch der spezifischen Bindungsstelle am Fab-Teil.

Bei der Verwendung von Anti-CD69 (mit Konjugatfarbstoff: FITC) statt IFN-γ als Aktivitätsmarker wurde dieser zusammen mit den anderen Oberflächenmarkern zugegeben. Auf eine intrazelluläre Markierung konnte dann verzichtet werden.

2.6 Durchflusszytometrische Analyse

2.6.1 Exkurs Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) werden Einzelzellereignisse erfasst und anhand morphologischer und farblicher Eigenschaften analysiert.

Ein Durchflusszytometer (Aufbau siehe Abb. 2.1) besteht aus einer hydrodynamischen und einer photometrischen Einheit. Die hydrodynamische Einheit bündelt die zu analysierende Probe derart, dass bei Passage des Strahlenganges in der Durchflusszelle zu einem Zeitpunkt x jeweils nur ein Einzelzellereignis y erfasst wird. Der einfallende Laser wird nun in zwei Hauptrichtungen abgelenkt: Die Ablenkung um nur wenige Grad von der Einfallsrichtung bezeichnet man als Vorwärtsstreuung (*forward scatter*, FSC).

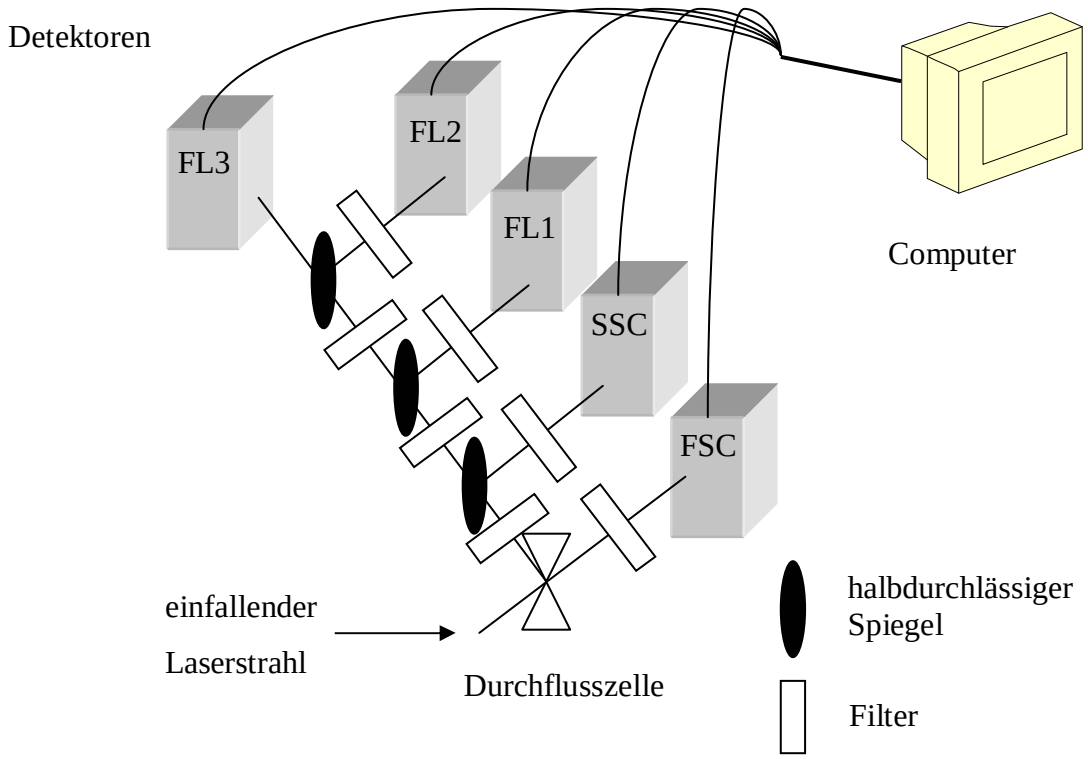

Abb. 2.1: Aufbau eines Durchflusszytometers

Der FSC steht für die Größe der zu analysierenden Partikel. Die seitliche Ablenkung, also mit einem Ausfallswinkel von 90°, wird als Seitwärtsstreuung (*sideward scatter*, SSC) bezeichnet und ist ein Maß für die Granulariät, also die intrazelluläre Komplexität zellulärer Strukturen. Über diese beiden rein morphologischen Eigenschaften hinaus lassen sich im Durchflusszytometer Fluoreszenzemissionen bestimmter Wellenlängen mithilfe spezifischer Detektoren erkennen und nach ihrer Intensität quantifizieren. Besitzen die zu untersuchenden Zellen keine ausreichende Autofluoreszenz in diesen Wellenlängenbereichen, so besteht die Möglichkeit, sie mit spezifischen Farbstoffen zu markieren und so für das Gerät detektierbar zu machen. Solche Fluoreszenzfarbstoffe werden durch den Laserstrahl der photometrischen Einheit angeregt und emittieren dabei Licht einer bestimmten Wellenlänge, das von spezifischen Fluoreszenz-Detektoren (FL) erkannt wird. Moderne Geräte sind dabei in der Lage, Fluoreszenzen in mindestens drei verschiedenen Wellenlängenbereichen zu erfassen.

2.6.2 FACS-Analyse der intrazellulären IFN-γ-Aktivität

Die Messung der Fluoreszenzaktivität der Farbstoff-konjugierten Antikörper erfolgte innerhalb von 6 h an einem FACScan-Durchflusszytometer (BectonDickinson). Dieses Gerät verfügt über 1024 Kanäle sowie Detektoren für den FSC, den SSC und drei Fluoreszenzbereiche (FL1-3). Die Exzitation erfolgt mittels eines 1,5 mW Argonlasers mit Laserlicht der Wellenlänge 488 nm. Die Detektion der Farbemissionen geschieht bei 530 nm (grün) für FL1, bei 585 nm (orange) für FL2 sowie bei >630 nm (rot) für FL3. Das Gerät gestattet es, Schwankungen der Zellzahl durch Variation der Durchflussgeschwindigkeit zwischen 12 µl/min und 60 µl/min zu kompensieren.

Die Daten wurden an einem mit dem FACScan verbundenen Power MAC G4 (Apple-Macintosh) mit der CellQuestPro-Software Version 4.0.2 (BectonDickinson) gewonnen und analysiert. Die Unterscheidung der drei Fluoreszenzmarker wird durch ihre voneinander verschiedenen Emissionsspektren mit unterschiedlichen Emissionsmaxima möglich. Mit Emissionsmaximum ist dabei jene Wellenlänge gemeint, auf der der größte Anteil des Lichtes emittiert wird. Das Emissionsmaximum des an den IFN-γ-Antikörper gebundenen Konjugatfarbstoffs *Fluorescein Isothiocyanat* (FITC) betrug 519 nm und war damit mit dem FL1-Detektor erfassbar. Dagegen weisen die Emissionsspektren von *Phycoerythrin* (gekoppelt an Anti-CD56-PE) und *perinidin chlorophyll protein* (gekoppelt an Anti-CD3-PerCP) Maxima bei 578 nm und 675 nm auf und konnten entsprechend den Detektionswellenlängen mit den Detektoren für FL2 bzw. FL3 gemessen werden.

NK-Zellen lassen sich anhand ihrer oberflächlichen Differenzierungsantigene als Zellen des Phänotyps CD3-/CD56+ charakterisieren (Robertson et al. 1990). Sie wurden dementsprechend als CD3-/CD56+ -Lymphozyten definiert und durch elektronisches *gating* selektiert. Wie in Abb. 2.2 dargestellt, ist die Lymphozytenpopulation beim Messen von PBMCs im Dotplot SSC gegen FCS links unterhalb der Monozytenpopulation zu finden. Lymphozyten sind also kleiner und weniger granuliert als Monozyten. Unter einem Dotplot versteht man die zweidimensionale Darstellung von 2 Messwerten gegeneinander in einem Koordinatensystem mit variabel einstellbaren Achsen. Dabei können die Achsenparameter je nach Bedarf unter den fünf gemessenen Parametern (FSC, SSC,

FL1, FL2, FL3) gewählt werden. In einem Histogramm wird ein bestimmter Parameter gegen seine Häufigkeit aufgetragen.

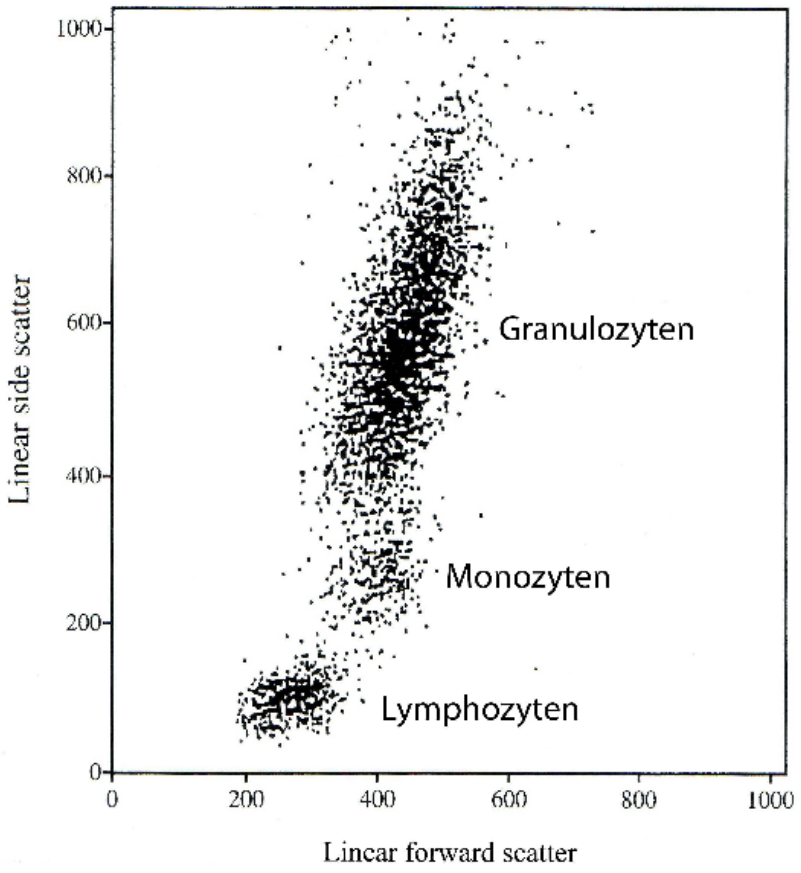

Abb. 2.2: Dotplot-Diagramm mit den klassischen PBMC-Populationen aus (McCarthy et al. 2001)

Zur besseren gleichzeitigen Darstellung der NK-Zellen mit den um ein Vielfaches größeren K-562 wurde für den FSC/SSC-Dotplot generell eine logarhitmische Achseneinteilung gewählt. Bei der Aquisition wurden die Lymphozyten durch das Ziehen einer Region 1 (R1) um die Lymphozytenpopulation im FSC/SSC-Dotplot selektiert. Die Zellen aus G1= R1 wurden in einem zweiten Dotplot CD3 (FL3) gegen CD56 (FL2) dargestellt. In diesem Dotplot wurde um die CD3-/CD56+Zellen eine Region 2 (R2) gezogen.

Tab. 2.12: Gewählte FACScan-Regionen

Name	Selektion im Dotplot	Entspricht
R 1	FSC/SSC	Lymphozytenplot
R 2	FL2/FL3	CD3-/CD56+ Zellen

Tab. 2.13: Gewählte Gates bei der Daten-Akquisition und Analyse

Name	Logische Formel	Entspricht
G 1	R 1	Gesamtzahl der Lymphozyten
G 2	R 2	CD3-CD56+Zellen
G 3	R 1 und R 2	NK-Zellen

Die Schnittmenge G3= R1und R2 entsprach nun den Lymphozyten mit Phänotyp CD3-/CD56+ – also den Natürlichen Killerzellen – und wurde in einem dritten Dotplot FL1 (IFN-γ)/FL2 (CD56) dargestellt (siehe Abb. 2.3) und ausgewertet.

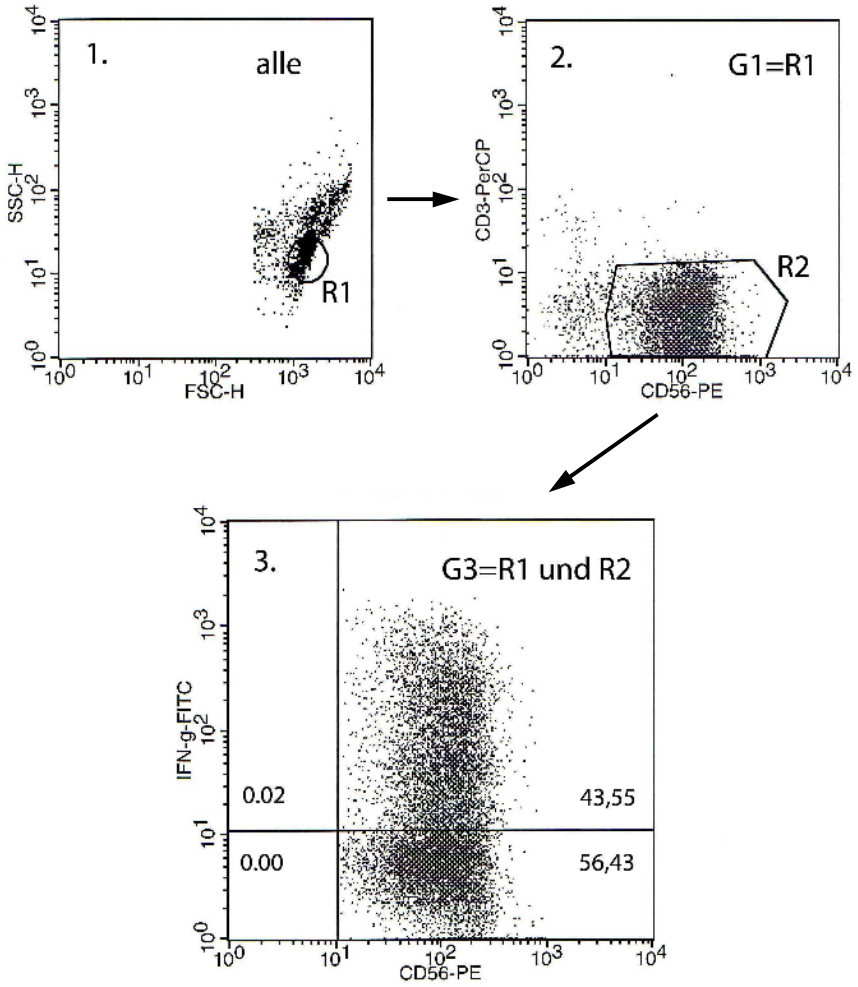

Abb. 2.3: NK-Zell-Selektion und Quadrantenanalyse – NK-Zellen mit infizierten Monozyten: 1. Setzen von R1 im FSC/SSC-Dotplot um Lymphozyten (dargestellt sind alle Zellen); 2. Setzen von R2 im CD56/CD3-Dotplot um CD56+/CD3-Lymphozyten (dargestellt ist G1= R1) und 3. Ermittlung des Stimulationswertes durch Darstellung der Schnittmenge G3= R1und R2 im CD56/IFN-γ-Dotplot (Der Quadrantmarker ist wurde anhand von Isotypkontrollen auf n<1 % positive Ereignisse gesetzt.); Im dargestellten Ansatz beträgt der Anteil IFN-γ-positiver NK-Zellen 43,55 %.

Aus Gründen der Zweckmäßigkeit wurden nur Ereignisse in die Messung einbezogen, welche oberhalb eines bestimmten FSC-Grenzwertes, also oberhalb einer bestimmten Größe lagen. Man sieht das auf Abb. 2.3 im SSC/FSC-Dotplot: links von einem Wert FSC $\approx 10^{2,25}$ sind keine Ereignisse registriert. Dies ist notwendig, da sonst selbst kleinste subzelluläre Fragmente als Ereignisse erfasst würden, die die Messung erschweren und zugleich nicht von Interesse sind.

Zu Beginn jeder Messung wurden die Detektorwerte während der Analyse ANTI-Isotyp-markierter Zellen so variiert, dass die Ereignisse in den FL2/FL3- und FL1/FL2-Dotplots zu 99 % eine geringere Fluoreszenzaktivität als 10^1 besaßen. In den Histogrammen von FL1, 2 und 3 wurde bei der Einstellung außerdem auf eine möglichst symmetrische Balkenverteilung zwischen 0 und 1×10^1 sowie einem Maximum bei ca. $0{,}5 \times 10^1$ geachtet. Anhand einiger ausgewählter Proben wurden die optimalen Kompensationswerte eingestellt.

Dies ist erforderlich, da sich die Emissionspektren der einzelnen Farbstoffe in den Übergangsbereichen überlappen und es somit zu Doppeldetektionen kommen kann, wenn z. B. eine Zelle mit PE-Markierung Licht am unteren Rande des Spektrums emittiert und dann nicht nur von ihrem entsprechenden FL2-Detektor, sondern auch vom spektral-benachbarten FL1-Detektor erfasst wird. Die Software gestattet das Herausrechnen dieser Analyse-Fehler durch die Kompensationswerte.

Danach wurden zunächst Ansätze mit NK-Zellen ohne Monensin-Zusatz (Proteinexport-Blocker) sowie ohne Stimulus gemessen. Der Quadrantmarker, der eine prozentuale Aufschlüsselung der Einzelzellereignisse je Quadrant in Bezug auf die Gesamtereigniszahl gestattet, wurde anhand der Isotypkontrollansätze im FL1 (ANTI-IFN-γ)/FL2 (ANTI-CD56)-Dotplot so gesetzt, dass nicht mehr als 1 % der Ereignisse im rechten oberen Quadranten und damit IFN-γ positiv waren. Mit einem Quadrant-Marker im FL3 (ANTI-CD3)/FL2 (ANTI-CD56)-Dotplot war es außerdem möglich, über den Anteil der CD3-/CD56+Zellen an R1 – der Lymphozytenpopulation –, den Reinheitsgrad der NK-Zellen zu beurteilen. Nun wurden von jedem Ansatz 10000 Ereignisse im *gate* 3 mit G3= R1und R2 durchgemessen.

2.6.3 Statistische Analyse

Alle Stimulationswerte bezeichnen den Anteil IFN-γ-positiver NK-Zellen an der NK-Gesamtzellzahl. Zur Auswertung und Interpretation der Daten wurden Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) berechnet. Die Entscheidung, ob es sich bei den Differenzen der Prozentsätze an IFN-γ-positiven NK-Zellen nach Stimulation mit uninfizierten und infizierten Monozyten um signifikante Unterschiede handelte oder nicht, wurde anhand eines t-Tests für gepaarte Stichproben getroffen. Ergebnisse galten als signifikant verschieden, wenn mindestens die Signifikanzebene $p<0,05$ festgestellt werden konnte. Ab einem Wert $p<0,05$ liegt die Irrtumswahrscheinlichkeit α unter 5 %. Werte gelten als signifikant voneinander verschieden.

3. Ergebnisse

3.1 Experimentelles Vorgehen

Um die Aktivität der NK-Zellen als Reaktion auf Stimulierung durch MHC-Klasse-I reduzierte Monozyten – interpretieren zu können, mussten zunächst geeignete Kontrollen gefunden werden. In Vorversuchen wurde zunächst PMA als chemische Positivkontrolle etabliert, da durch diese Substanz eine maximal mögliche IFN-γ-Produktion bei NK-Zellen zu induziert werden kann. Die Tumorzelllinie K-562 ist eine MHC-Klasse-I negative Zelle und war daher eine geeignete zelluläre Positivkontrolle zum Nachweis der Aktivitätszunahme von NK-Zellen bei Koinkubation mit Zellen mit aberrantem MHC-Klasse-I-Besatz (Mendes et al. 2000). Diese Tumorzelllinie wurde 1970 von einer 53-jährigen Patientin mit chronisch-myeloischer Leukämie (CML) während der Blastenkrise aus einem Pleuraerguss gewonnen und gewann wissenschaftlich schnell an Bedeutung als hochsensitives Target bei *in vitro* NK-Zell-Assays (Lozzio et al. 1975). Da zunächst bei den MHC-Klasse-I-negativen K-562 keine nennenswerte Stimulation festgestellt werden konnte, wurde zur Steigerung der Zytokin-Anwort der NK-Zellen IL-2 eingesetzt (Henney et al. 1981; Mendes et al. 2000).

Ein Problem stellte die Stabilität der infizierten Monozyten während der Koinkubation dar. So wurden trotz des Einsatzes von Legionellen gleichen Alters (5 Tage bei Infektionszeitpunkt 1) und einer standardisierten Zellzahl von 2×10^6/ml während der FACS-Analyse z. T. deutliche Unterschiede der Monozytenlokalisation im FSC/SSC-Dotplot festgestellt. Gemäß der Abb. 2.2 befinden sich Monozyten bei der Darstellung von PBMC im FSC/SSC-Dotplot links oberhalb der Lymphozytenpopulation. In Abb. 2.4 sind auf der rechten Seite zwei Dotplots mit prominenter NK-Zellpopulation und deutlicher Monozytenpopulation zu sehen. FSC und SSC sind logarithmisch aufgetragen. Im linken Dotplot-Diagramm zeigt sich die Monozytenpopulation deutlich verändert: Sie ist auf der FSC-Achse im Verhältnis zum NK-Zell-Plot nach links und auf der SSC-Achse nach unten verschoben. Darüber hinaus wirkt der Plot aufgelockert und heterogener als in der rechten Hälfte der Abbildung. Das Ausmaß der Veränderung wirkt durch die logarithmische Auftragung eher weniger stark, als es eine lineare Darstellung

veranschaulicht hätte. Die logarithmische Achseneinteilung erwies sich jedoch insgesamt als vorteilhaft, da die K-562 deutlich größer sind als NK-Zellen und Monozyten. Sie wären daher in der linearen Achseneinteilung nicht vollständig zur Darstellung gekommen. Aus der Tatsache, dass in Abb. 2.4 in den beiden rechten Dotplots rechts oberhalb der NK-Zellen kaum noch Monozyten lokalisiert sind wird deutlich, dass sich in diesen Ansätzen kaum noch intakte Monozyten befanden, sondern bestenfalls geschrumpfte oder gar fragmentierte Zellen.

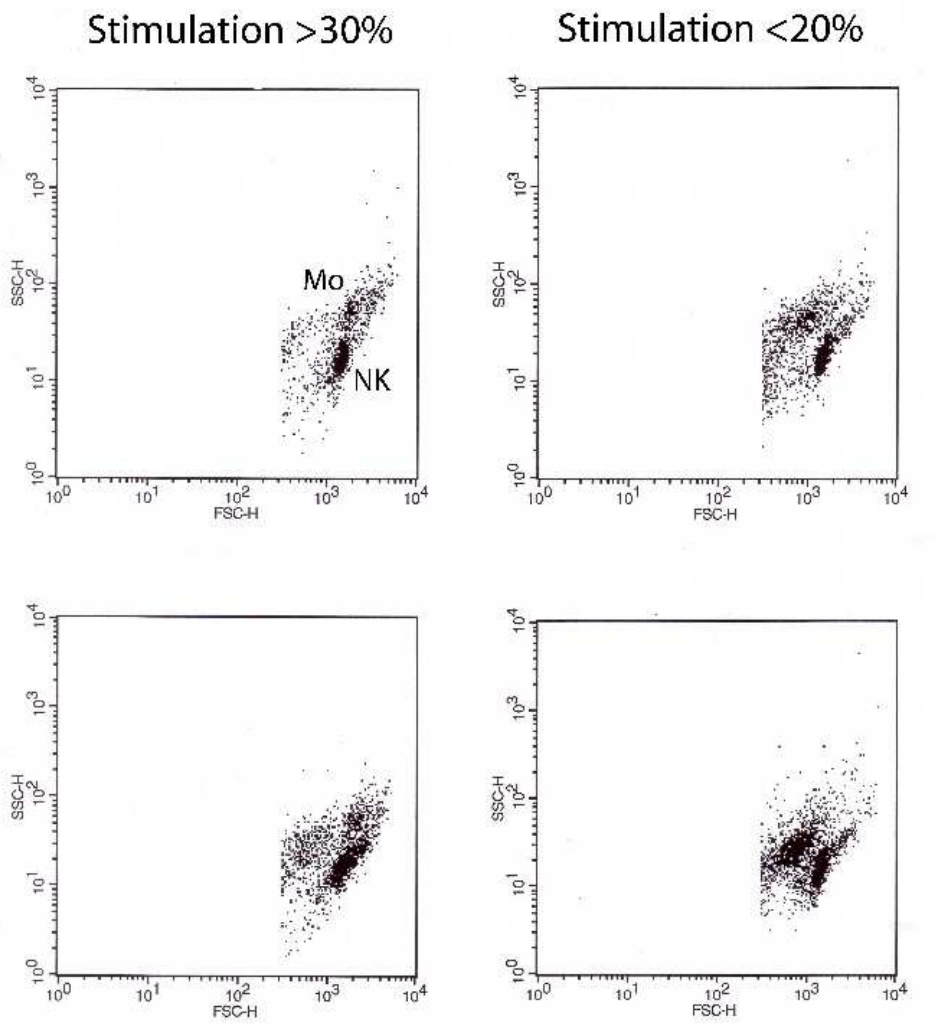

Abb. 2.4: Vier Ansätze mit NK-Zellen und iMo10/48 nach 4 Stunden Koinkubationsdauer; in den beiden linken Dotplots lag der gemessene Anteil an IFN-γ-positiven NK-Zellen über 30 %, in den beiden rechten Versuchsansätzen produzierten höchstens 20 % der NK-Zellen IFN-γ.

Die Gründe für die teilweise zu geringe Stabilität der infizierten Monozyten sind in der individuellen Variabilität der Spender und der Komplexität des Versuchsaufbaus zu su-

chen. Der Zustand der Monozyten zum Zeitpunkt der FACS-Analyse wurde von folgenden – von Spender zu Spender – verschiedenen Eigenschaften beeinflusst:

- der Überlebenswahrscheinlichkeit der Monozyten in Zellkultur,
- der Anfälligkeit der Monozyten für die Infektion,
- der Interaktion mit den autologen NK-Zellen und
- der mechanischen Belastbarkeit der Monozyten.

Resnick et al. haben jedoch den Zusammenhang zwischen Zytotoxizität von IL-2-aktivierten NK-Zellen gegen infizierte Monozyten und dem Verhältnis von Effektorzellen zu Targetzellen eindeutig nachgewiesen (Resnick et al. 1988).

In der Tat blieben Stimulationswerte derart klassifizierter Versuchsreihen durchweg unter 20 % und erreichten damit kaum die Hälfte der Versuche mit gemäß Abb. 2.2 ‚korrekt' lokalisierten Monozyten-Plots.

Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse bei möglichst konstantem Effektor-Target-Verhältnis zu gewährleisten, wurden daher nur solche Versuchsansätze in die Analyse einbezogen, die nach einer Koinkubationsdauer von 4 Stunden noch deutliche und rechts oberhalb des NK-Zell-Plots lokalisierte Monozyten-Plots im FSC/SSC-Dotplot rechts aufwiesen (Doppelplotkriterium).

Zur Kontrolle des Einflusses von freien Bakterien auf die NK-Zell-Stimulation wurden zusätzliche NK-Zell-Ansätze mit Suspensionen von *L. pneumophila* versetzt.

Laut Angaben des Herstellers sind bei Einsatz von Monensin über einen längeren Zeitraum (t>12 Stunden) für die Zellen unter Umständen toxische Effekte zu erwarten. Daher wurde die Vitalität nach Zugabe von Monensin in verschiedenen Dosen über die gesamte Koinkubationsdauer von bis zu 24 Stunden geprüft. Vorversuche mit einem alternativen Exportblocker (Brefeldin A von Sigma) zeigten gegenüber der Verwendung von Monensin keine Erhöhung der Detektion von intrazellulären Zytokinen.

3.2 Vitalität der NK-Zellen in Kultur und Überlebensrate nach Monensinzugabe

Die NK-Zellen wurden zum Koinkubationszeitpunkt, nach 48 Stunden, auf Vitalität mittels Trypanblau-Färbung untersucht. Dabei konnten in drei unabhängigen Versuchen Vitalitätsraten von ≥95 % festgestellt werden. In einer weiteren Versuchsreihe wurden den NK-Zellen entsprechend dem Versuchssetting verschiedene Konzentrationen an

Monensin (1/ 1,3/ 2/ 4 und 10 µM) zugesetzt. Nach Ablauf der maximalen Koinkubationsdauer von 24 Stunden waren nach Monensinzugabe in der zur Koinkubation eingesetzten Konzentration von 1,3 µM ebenfalls noch ≥95 % der NK-Zellen vital. Bei Monensin 10 µM waren es noch ≥91 % aller NK-Zellen.

3.3 Eignung des Aktivitätsmarkers CD69

Versuche mit Verwendung von FITC-markierten ANTI-CD69-Antikörpern führten zu keinem Ergebnis, da schon unstimulierte NK-Zellen eine hohe CD69-Expression (65,1 %) zeigten und somit eine Aktivitätszunahme bei der Positivkontrolle nicht gut ablesbar war (siehe Abb. 3.1).

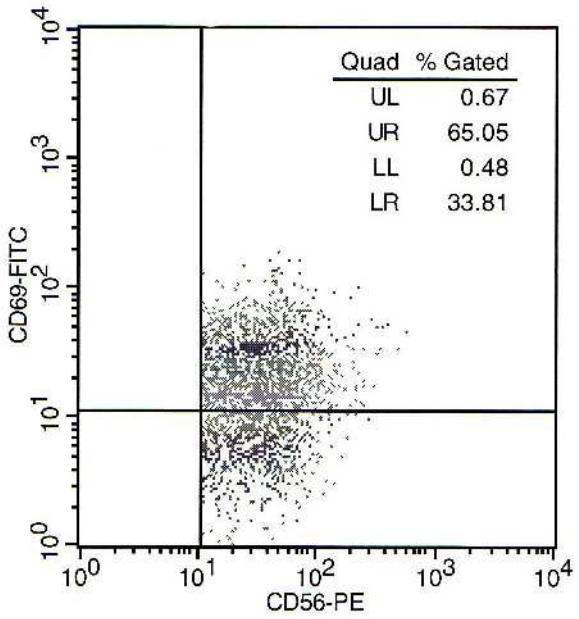

Abb. 3.1: IL-2-aktivierte NK-Zellen ohne Stimulus im CD56/CD69-Dotplot; Quadrantenbezeichnungen: UL_upper left, UR_upper right, LL_lower left, LR_lower right; Es sind 65,05 % der NK-Zellen positiv für CD69.

3.4 Dosisbestimmung von IL-2

Alle Stimulationswerte in den Kap. 3.4, 3.5 und 3.6 geben den Anteil IFN-γ-positiver NK-Zellen an der NK-Gesamtzellzahl in % wieder!

Bei der Etablierung der zellulären Positivkontrolle K-562 konnte zunächst nur eine äußerst geringe IFN-γ-Sekretion im Sinne einer Stimulation von NK-Zellen gemessen werden. Eine Aktivierung mit verschiedenen Dosen an IL-2 führte dann zu einer für eine Positivkontrolle brauchbaren Stimulierung der NK-Zellen (siehe Abb. 3.2).

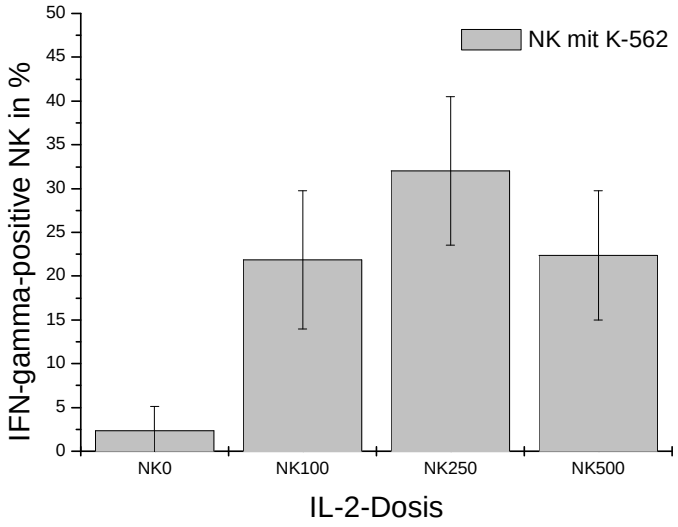

Abb. 3.2: Stimulation unterschiedlich aktivierter NK-Zellen durch K-562 nach einer Koinkubationsdauer von vier Stunden; Mittelwerte ± SD aus vier Versuchen

Der Anteil IFN-γ-positiver NK-Zellen nach vierstündiger Koinkubation mit K-562 konnte durch Aktivierung mit IL-2 gegenüber nicht aktivierten Zellen von 2,4 % auf 21,9 % (100 U/ml) bzw. 32,0 % (250 U/ml) gesteigert werden. Zu einer optimalen Stimulation mit 32,0 % IFN-γ-positiven NK-Zellen führte eine Zugabe von 250 U/ml IL-2. Eine mögliche Erklärung für den Abfall der Stimulationsrate bei 500 U/ml liegt in einer zunehmenden Lyse der K-562 durch stärker aktivierte NK-Zellen.

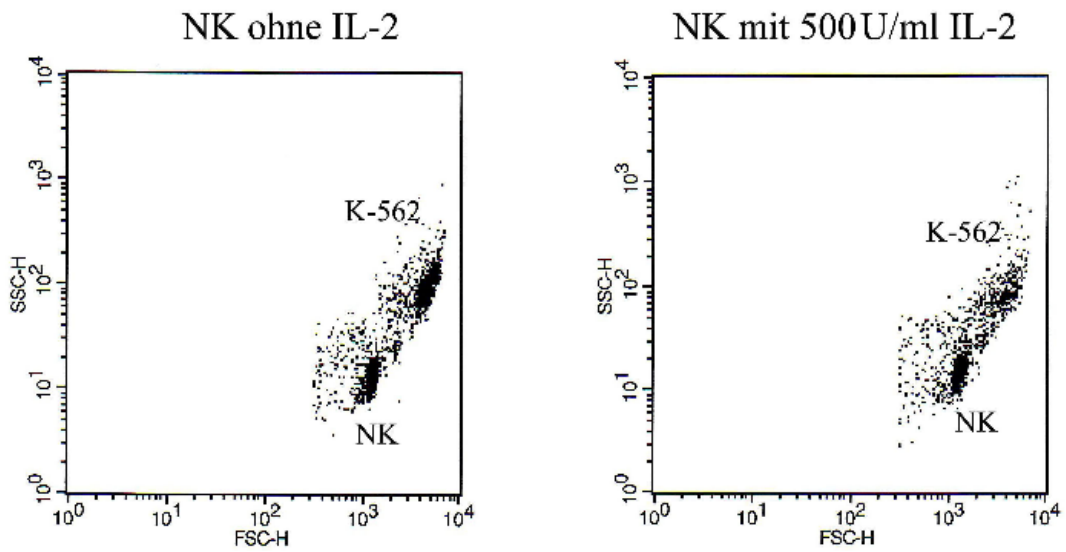

Abb. 3.3: Vergleich der K-562-Plots im FSC/SSC-Dotplot nach vier Stunden Koinkubation mit unaktivierten NK-Zellen (links) und mit 500 U/ml IL-2-aktivierten NK-Zellen rechts

Auf Abb. 3.3 ist der K-562-Plot im rechten Diagramm nach vier Stunden Koinkubation mit 500 U/ml IL-2-aktivierten NK-Zellen deutlich weniger intensiv als im linken, gleichwohl bei beiden Messungen jeweils 10000 Ereignisse im G3 gezählt wurden und die Zellen im gleichen Zellzahlverhältnis eingesetzt worden waren. Eine relative Abnahme der K-562-Zellzahl führte offenbar zu geringerer IFN-γ-Sekretion der NK-Zellen.

3.5 Die Positivkontrollen – Stimulation mit der Tumorzelle K-562 und mit PMA

Bei der Koinkubation von NK-Zellen mit K-562 im Verhältnis 1,5:1 (siehe Abb. 3.4) waren in Vorversuchen nach vier Stunden 33,8 % aller NK-Zellen positiv für IFN-γ. Die SDs betrugen zwischen 2,6 % für den 12-Stunden-Wert und 5,6 % für den 1-Stunden-Wert. Im weiteren Verlauf der Koinkubation sank der Anteil IFN-γ positiver Zellen kontinuierlich bis auf 14,3 % nach 24 Stunden ab.

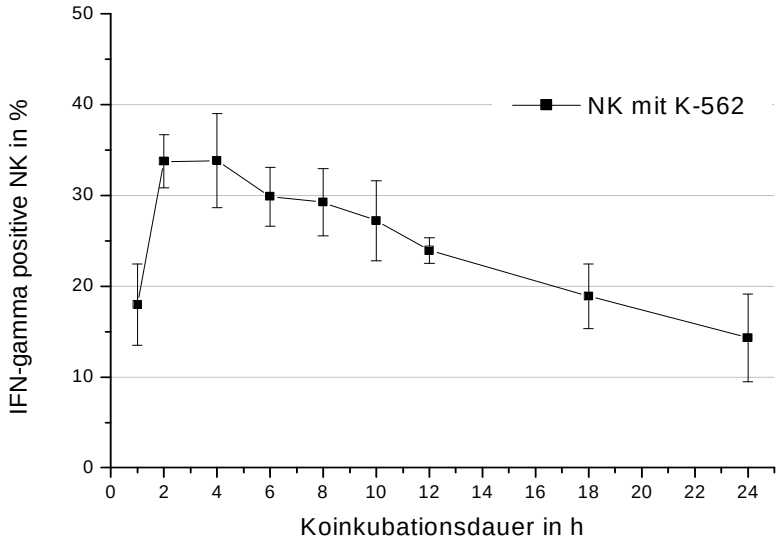

Abb. 3.4: Kinetik der K-562-Stimulation; Mittelwerte ± SD aus drei Versuchen

Zur Ermittlung der maximal möglichen IFN-γ-Sekretion wurde chemisch durch Zugabe von PMA c = 25 ng/ml stimuliert. Die Inkubationsdauer betrug fünf Stunden. Im Mittel von drei Versuchen wurden dabei Stimulationswerte von 76,85 % IFN-γ-positiver NK-Zellen erreicht (SD = 10,50 %).

3.6 Festlegung auf den 6-Stunden-Wert als Vergleichswert

Bei drei Vorversuchen mit 10:1-*L1P*-infizierten Monozyten wurde ein Anstieg des Anteils IFN-γ-positiver NK-Zellen von 36,3 % nach zwei Stunden Koinkubation auf 45,1 % nach sechs Stunden mit einem Abfall auf 39,5 % nach zehn Stunden festgestellt. Die Kontrolle mit uninfizierten Monozyten (siehe Abb. 3.5 Dreieck mit Ankerlinie) ergab nach sechsstündiger Koinkubation einen Anteil von 14,7 % an IFN-γ-positiven NK-Zellen.

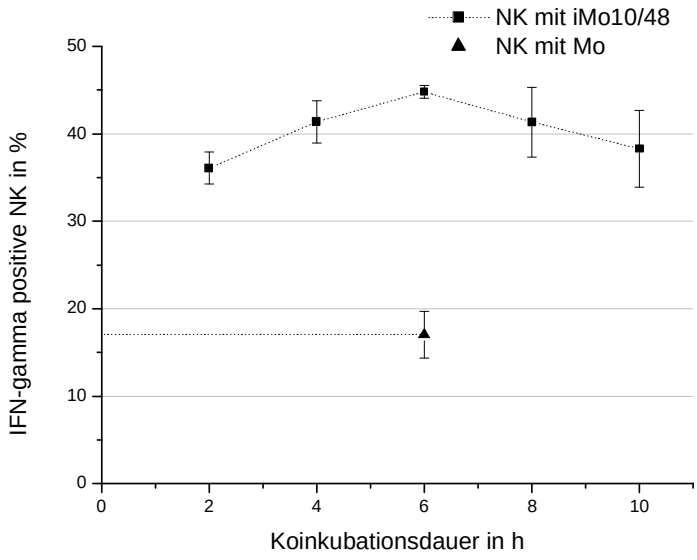

Abb. 3.5: Stimulation mit iMo10/48 nach 2-, 4-, 6-, 8-, und 10-stündiger Koinkubation sowie mit Mo nach sechs Stunden Koinkubation; Mittelwerte mit SD aus drei Versuchen
Legende der eingesetzten Stimuli:

iMo10/48	- 10:1-*L1P*-infizierte Monozyten/48 Stunden Infektionsdauer;
Mo	- uninfizierte Monozyten

Da nicht nur die gemittelten Werte, sondern auch die Einzelwerte aller drei Versuche ein Maximum der IFN-γ-positiven NK-Zellen nach sechs Stunden Koinkubation aufwiesen, wurden bei weiteren Versuchen die Vergleichsansätze der 24 Stunden Infektion iMo10/24 und iMo1/24 sowie der Infektionsansatz mit *L. steigerwaltii* iMo10/48*st* jeweils nach sechs Stunden Koinkubation mit NK-Zellen markiert und gemessen.

3.7 Kinetik der intrazellulären IFN-γ-Sekretion der NK-Zellen nach 1- bis 24-stündiger Koinkubation mit Mo, iMo1/48, iMo10/48 sowie Vergleichswerte iMo1/24, iMo10/24, iMo10/48st nach 6-stündiger Koinkubation

Auf den Verlauf der IFN-γ-Antwort der NK-Zellen nach Stimulation mit Monozyten soll zunächst anhand der Diagramme der einzelnen Versuche eingegangen werden.

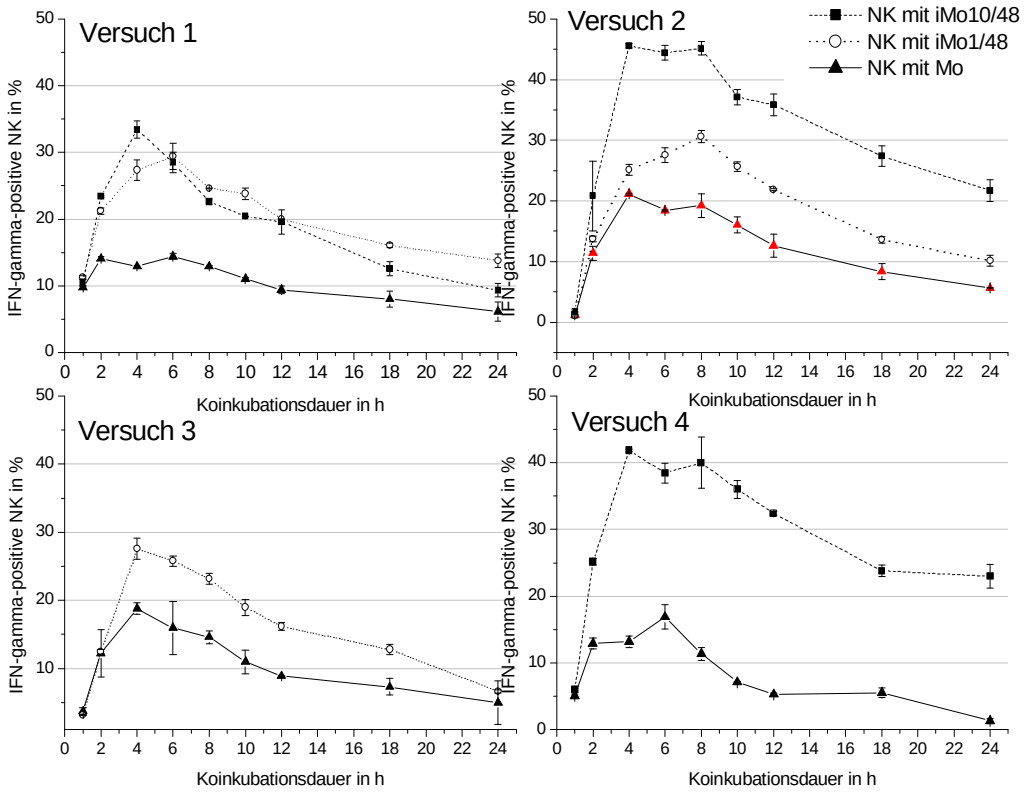

Abb. 3.6: Einzelversuchsübersicht: Stimulationen mit iMo10/48, iMo1/48 und Mo; Mittelwert und SD von zwei Werten; In allen Versuchen unterscheiden sich die Werte nach Stimulation mit uninfizierten Monozyten und infizierten Monozyten signifikant ($p<0.01$).
Legende der eingesetzten Stimuli:

iMo10/48	- 10:1-*L1P*-infizierte Monozyten/48 Stunden Infektionsdauer;
iMo1/48	- 1:1-*L1P*-infizierte Monozyten/48 Stunden Infektionsdauer;
Mo	- uninfizierte Monozyten

In Abb. 3.6 sind vier Verlaufsdiagramme zu sehen. Bei Versuch 3 konnte die Stimulation mit 10:1-infizierten Monozyten aufgrund des Doppelplotkriteriums (siehe Kap. 2.7) nicht gewertet werden. In Versuch 4 wurde aufgrund einer zu geringen Monozyten-

Ausbeute aus der Isolation auf die 1:1-Infektion verzichtet und nur die 10:1-Infektion durchgeführt.

Bei allen vier Versuchen ergab die Koinkubation mit uninfizierten Monozyten (Mo) einen im Vergleich zur Stimulation mit der Tumorzelle K-562 deutlich flacheren Verlauf der IFN-γ-Antwort-Rate. Zwei der Einzelversuchskurven (Versuche2 und 3) ergaben ein Maximum an IFN-γ-positiven NK-Zellen nach vier Stunden. In den Versuchen 1 und 4 erreichte der Anteil ein Maximum bei sechs Stunden. Die Maximal-Werte lagen dabei zwischen 14,4 % (Versuch 1) und 21,15 % (Versuch 2).

Stimulation mit 10:1-*L1P*-infizierten Monozyten nach 48 Stunden Infektionsdauer (iMo10/48) erbrachten in drei Versuchen absolute Maxima bei 4 Stunden (33,4; 45,6 und 41,8 %). Bei den Versuchen 2 und 4 sieht man zwischen vier und acht Stunden einen plateauartigen Kurvenverlauf. Der 6-Stunden-Wert kann daher als repräsentativ für die Phase höchster Stimulation gewertet werden.

Der Kurvenverlauf der Stimulation mit 1:1-*L1P*-infizierten Monozyten zeigt im Vergleich zur Stimulation mit uninfizierten Monozyten einen deutlich höheren Anteil an zur IFN-γ-Sekretion angeregten NK-Zellen mit Maximalwerten von 29,4 % (Versuch 1 nach sechs Stunden), 30,6 % (Versuch 2 nach acht Stunden) und 27,6 % (Versuch 3 nach vier Stunden), erreicht aber nicht den Level der Stimulation mit 10:1-*L1P*-infizierten Monozyten.

In Abb. 3.7 sind die Einzelversuchsergebnisse der Versuche 1-4 in einem Diagramm zusammengefasst. Trotz großer Standardabweichungen, vor allem in der iMo10/48-Kurve, wird die Steigerung des Anteils IFN-γ-positiver NK-Zellen bei Koinkubation mit 48 Stunden 1:1- und 10:1-*L1P*-infizierten Monozyten gegenüber Koinkubation mit uninfizierten Monozyten auf mehr als das Doppelte deutlich. Die Überprüfung der Differenzen der Werte aller drei Kurven ergab signifikante Unterschiede ($p<0,001$).

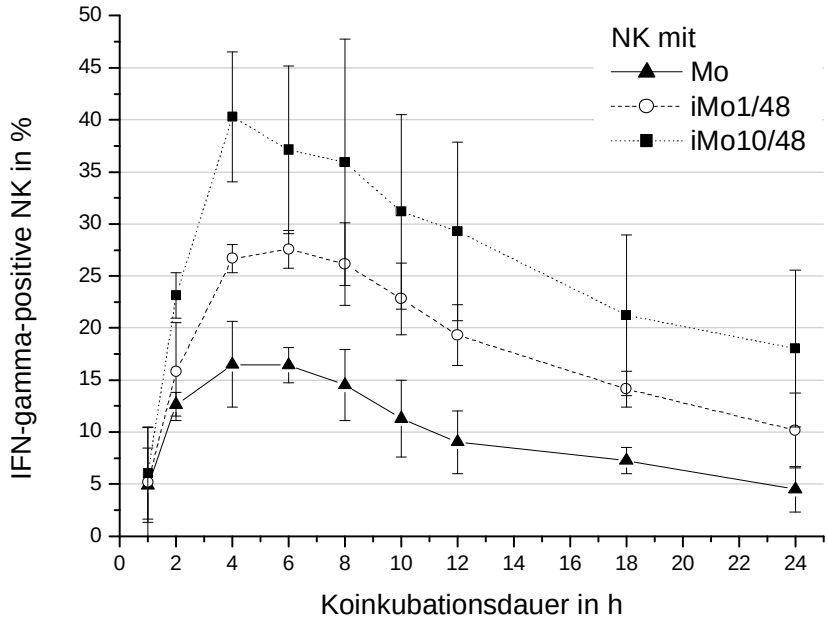

Abb. 3.7: Kinetik der Stimulationswerte über 24 Stunden. Mittelwerte von drei (iMo10/48, iMo1/48) bzw. vier (Mo) Versuchen ± SD. Die drei Kurven unterscheiden sich jeweils signifikant voneinander ($p<0,001$).
Legende der eingesetzten Stimuli:

iMo10/48	- 10:1-*L1P*-infizierte Monozyten/48 Stunden Infektionsdauer;
iMo1/48	- 1:1-*L1P*-infizierte Monozyten/48 Stunden Infektionsdauer;
Mo	- uninfizierte Monozyten

Eine Zusammenstellung der Mittelwerte aller 6-Stunden-Werte ist in Abb. 3.8 zu sehen. Die Werte stammen aus den vier unanhängigen Versuchen 1-4. Beim K-562-Wert wurde das Maximum nach vier Stunden dargestellt. Der PMA-Wert gibt die Stimulation nach fünf Stunden wieder. Zu einigen Werten liegen jeweils nur die Daten aus drei Versuchen vor (siehe Tab. 3.1). Die fehlenden Werte konnten aufgrund zu geringer Zellzahlen in den entsprechenden Versuchen nicht durchgeführt werden. Dabei waren entweder die PBMC-Zellzahlen nach Isolation der *Buffy Coats* nicht ausreichend um alle Isolationen im nötigen Umfang durchzuführen oder es waren nach Ablauf der vollen Infektionsdauer nicht genügend infizierte Monozyten auszählbar.

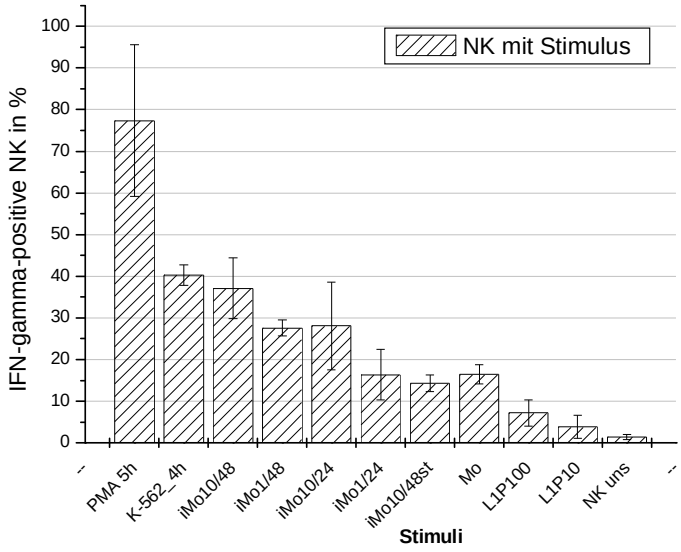

Abb. 3.8: Vergleichswerte nach sechs Stunden (außer bei PMA und K-562) mit verschiedenen Stimuli. Mittelwerte aus je drei Versuchen (K-562, iMo10/48, iMo1/48, iMo10/24, iMo10/48st, NK uns) bzw. vier Versuchen (PMA-, iMo1/24-, Mo-, *L1P*100, *L1P*10) ± SD.
Legende der eingesetzten Stimuli:

iMo10/48	- 10:1-*L1P*-infizierte Monozyten/48 Stunden Infektionsdauer;
iMo1/48	- 1:1-*L1P*-infizierte Monozyten/48 Stunden Infektionsdauer;
iMo10/24	- 10:1-*L1P*-infizierte Monozyten/24 Stunden Infektionsdauer;
iMo1/24	- 1:1-*L1P*-infizierte Monozyten/24 Stunden Infektionsdauer;
iMo10/48st	- 10:1-*L.steigerwaltii*-infizierte Monozyten/48 Stunden Infektionsdauer;
Mo	- uninfizierte Monozyten;
K-562	- K-562-Zellen;
L1Px	- Suspension mit x-facher Bakteriendosis;
Uns	- ohne Stimulus

Aus den Daten (siehe Tab. 3.2) geht hervor, dass Monozyten, welche nur für 24 Stunden mit *L1P* infiziert waren, zu einer deutlich geringeren Stimulation der NK-Zellen führten. 10:1-infizierte Monozyten nach 24 Stunden Infektion stimulierten im Durchschnitt nur noch 28,1 % der NK-Zellen im Gegensatz zu 37,1 % nach 48 Stunden Infektion. 24 Stunden 1:1-*L1P*-infizierte Monozyten bewirkten bei den NK-Zellen genau dieselbe IFN-γ-Antwort wie uninfizierte Monozyten.

Ansatz NK-Zellen mit	Mittelwert in % (Anzahl der Versuche)	SD in %
PMA	77,4 (4)	18,1
K-562	40,3 (3)	2,5

iMo10/48	37,1 (3)	7,3
iMo1/48	27,6 (3)	2,0
iMo10/24	28,1 (3)	10,6
iMo1/24	16,4 (4)	6,1
iMo10/48 st	14,3 (3)	2,0
Mo	16,4 (4)	2,3
L1P 100	7,2 (4)	3,1
L1P 10	3,8 (3)	2,8
NK-Zellen uns	1,4 (3)	0,7

Tab.3.2: Daten zu Abb. 3.8; alle Werte nach sechs Stunden Koinkubationsdauer; außer PMA-Wert: fünf Stunden und K-562-Wert: vier Stunden
Legende der eingesetzten Stimuli:

iMo10/48	- 10:1-*L1P*-infizierte Monozyten/48 Stunden Infektionsdauer;
iMo1/48	- 1:1-*L1P*-infizierte Monozyten/48 Stunden Infektionsdauer;
iMo10/24	- 10:1-*L1P*-infizierte Monozyten/24 Stunden Infektionsdauer;
iMo1/24	- 1:1-*L1P*-infizierte Monozyten/24 Stunden Infektionsdauer;
iMo10/48st	- 10:1-*L.steigerwaltii*-infizierte Monozyten/48 Stunden Infektionsdauer;
Mo	- uninfizierte Monozyten;
K-562	- K-562-Zellen;
L1Px	- Suspension mit x-facher Bakteriendosis;
Uns	- ohne Stimulus

Mit *L. steigerwaltii* infizierte Monozyten riefen mit 14,3 % sogar eine noch etwas geringere Stimulation als die uninfizierten Monozyten hervor. Die Kontrolle mit Zugabe von einer 100fachen Dosis *L. pneumophila* SG 1 zum Koinkubationszeitpunkt stimulierte 7,2 % der NK-Zellen. Die 10fache Legionellendosis für zu 3,8 %iger Stimulation. NK-Zellen, welche ohne jeglichen Stimulus belassen wurden, sezernierten sechs Stunden nach Proteinexportblockade zu 1,4 % IFN-γ.

Es konnte also eine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung für die positiven Kontrollstimulantien, die Legionellen-Infektionsdosis und die Infektionsdauer sowie für die Virulenz der eingesetzten *Legionella*-Spezies erarbeitet werden.

4. Diskussion

4.1 Ergebnisüberblick

Ein zentrales Anliegen der vorliegenden Arbeit war die Klärung der Rolle von NK-Zellen bei der frühen Abwehrreaktion auf eine *L. pneumophila*-Infektion. Bisher unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass es im Zuge einer Infektion mit *L. pneumophila* bei humanen Monozyten zu einer Abnahme der exprimierten MHC-Klasse-I kommt. Da die CD8-T-Zell-Antwort durch von MHC-Klasse-I präsentierte Antigene vermittelt wird, sollte sie – wenn überhaupt – nur in abgeschwächter Form möglich sein. In der Tat gibt es bislang keine Evidenz für eine von CD8-T-Zellen vermittelte Abwehr bei einer Legionellose. Allerdings existieren auch keine Veröffentlichungen, die dem Vorhandensein einer CD8-T-Zell-Antwort widersprechen. Eine generelle Reduktion der MHC-Klasse-I ist jedoch für die humane Immunantwort auf Mikroorganismen nicht nur von Nachteil, da NK-Zellen dank inhibitorischer Rezeptoren, den KIRs, quantitative Veränderungen im MHC-Klasse-I-Besatz auf Zielzellen erkennen und diese unschädlich machen. Untersucht wurde daher, ob mit verschiedenen Legionellenspezies infizierte Monozyten bei NK-Zellen eine Stimulation in Form einer IFN-γ-Expression bewirken.

Aus den Ergebnissen ergibt sich eine direkt proportionale Abhängigkeit zwischen MHC-Klasse-I-Reduktion und dem Level der IFN-γ-Expression. Mit *L. pneumophila*-infizierte Monozyten bewirken über Downregulation der MHC-Klasse-I eine deutliche Zunahme der IFN-γ-Expression in NK-Zellen. Die Zunahme ist umso stärker, je länger die Monozyten infiziert waren. Infektion mit der nicht humanpathogenen *L. steigerwaltii* bewirkt keinen Anstieg der IFN-γ-Expression. Abb. 4.1 verdeutlicht den dadurch erstmals belegten Zusammenhang:

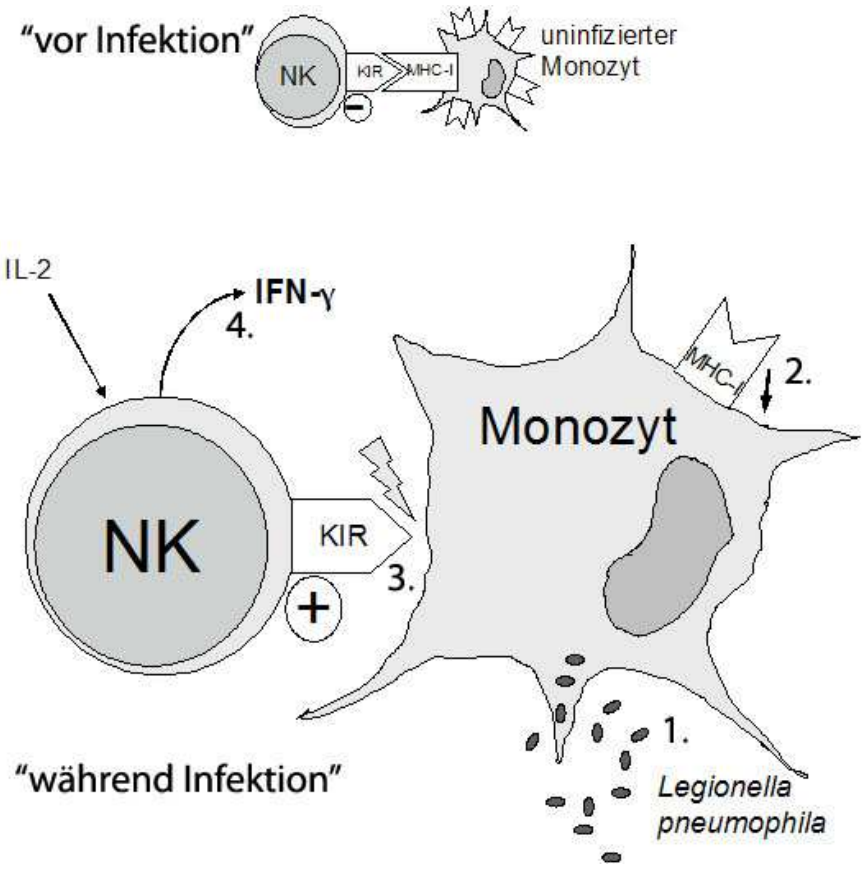

Abb. 4.1: Stimulation von IL-2-aktivierten NK-Zellen durch infizierte Monozyten

Nicht-infizierte Monozyten (in Abb. 4.1 oben) weisen eine normale MHC-I-Konfiguration auf. Ihre MHC-Klasse-I interagieren mit den KIR der NK-Zellen (vereinfacht dargestellt) und stabilisieren so den Aktivitätslevel der NK-Zellen auf niedrigem Niveau. Im Zuge einer Infektion mit *L. pneumophila* (1.) kommt es zur Reduktion der MHC-Klasse-I (2.) auf den Monozyten. Bei Koinkubation mit NK-Zellen sind nicht mehr genügend MHC-Klasse-I vorhanden, um mit den KIR zu interagieren (3.). Die Folge ist eine Stimulation der NK-Zellen zur Sekretion von IFN-γ (4.).

Zur Einordnung der Ergebnisse sollen im Folgenden Überlegungen über bekannte Mechanismen der natürlichen und adaptiven Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene im Allgemeinen und gegen *L. pneumophila* im Speziellen angestellt werden.

4.2 Die Zytokin-regulierte natürliche Immunabwehr bei Legionellose

4.2.1 Beteiligte Komponenten der Immunabwehr

Die erste Station der natürlichen Immunabwehr bei einer Legionellose sind gewebsständige Alveolar-Makrophagen, welche durch IFN-γ und TNF-α sowie durch aufgenommene Pathogene aktiviert werden (Friedman et al. 2002). TNF-α wird von Makrophagen selbst sowie von NK-Zellen gebildet (Arata et al. 1993b; McHugh et al. 2000). Über die Beteiligung von neutrophilen Granulozyten wird spekuliert. Sie könnten durch TNF-α und IFN-γ stimuliert werden und über die Sekretion von IL-2 wirken sowie direkte bakterizide Aktivität vermitteln (Blanchard et al. 1989; Park et al. 2000). Während einer Legionellen-Infektion sezernieren Makrophagen IL-12 und IL-18, welche die Differenzierung von T-Helfer-1-Zellen (TH-1-Zellen) aus T-Helfer-0-Zellen fördern und diese zur Sekretion von IFN-γ und IL-2 stimulieren (Smith 1988; Park et al. 2000). Durch IL-12, welches auch von infizierten dendritischen Zellen (DC) gebildet wird, werden NK-Zellen stimuliert (Neild et al. 2003). Da T-Lymphozyten zur adaptiven Immunabwehr zählen, handelt es sich dabei gewissermaßen um eine Schnittstelle zwischen natürlicher und adaptiver Immunantwort (siehe Abb. 4.2).

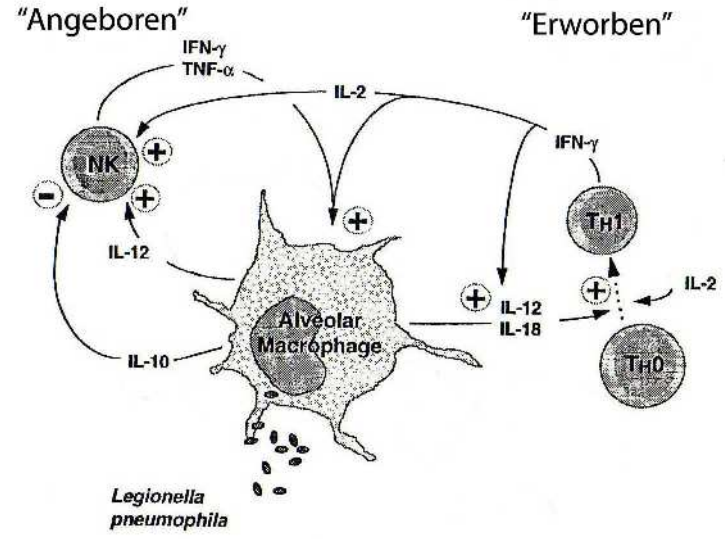

Abb. 4.2: Zytokin-mediierte Immunantwort bei Infektion mit *L. pneumophila* nach Park (2000)

Das von TH-1-Zellen gebildete IL-2 stellt zusammen mit dem von Makrophagen sezernierten IL-12 den Hauptstimulus für NK-Zellen dar. Einige Autoren konnten mit *in*

vitro Versuchen zeigen, dass eine aus *L. pneumophila* isolierte Protease in der Lage ist, IL-2 zu deaktivieren(Rechnitzer et al. 1989b; Hell et al. 1993; Mintz et al. 1993). Damit könnte auch unter physiologischen Bedingungen die wichtige NK-Zell-Aktivierung verzögert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass *L. pneumophila* die LPS-induzierte Sekretion von IL-12 durch Makrophagen drosselt (Matsunaga et al. 2001). Somit scheint es *L. pneumophila* zu gelingen, die Wirkung der beiden wesentlichen NK-Zell-aktivierenden Zytokine im Zuge einer Infektion abzuschwächen.

Ein weiteres wichtiges Effektorzytokin stellt das IFN-γ dar. Es wird von NK-Zellen, TH-1-Zellen und Makrophagen gebildet (siehe Abb. 4.2) (Park et al. 2000; Salins et al. 2001). Der adaptive Teil der Immunantwort auf eine Legionellose nimmt den Weg über die TH-1-Zellen. Diese hemmen via IFN-γ die Proliferation von TH-2-Zellen (Friedman et al. 2002). Jedoch wurde auch für das von TH-2-Zellen sezernierte IL-4 eine protektive Rolle bei der Abwehr von *L. pneumophila* durch Makrophagen nachgewiesen (Arata et al. 1993a; Friedman et al. 2002).

4.2.2 Aktivierung von NK-Zellen

NK-Zellen werden im Verlauf einer bakteriellen Infektion durch von Makrophagen gebildetes IL-12 aktiviert. Allgemein gilt nebem IL-12 auch IL-18 als Stimulus der IFN-γ-Sekretion von NK-Zellen. Allerdings gibt es bislang keinen experimentellen Beleg für diesen Mechanismus im Rahmen einer Legionellose. Insbesondere IL-12 und TNF-α bewirken zusammen eine hohe Ausschüttung von IFN-γ durch NK-Zellen (Tripp et al. 1993; Hunter et al. 1994). Aktivierung von NK-Zellen wird u. a. über IL-12 von der Typ 2 NO-Synthetase mediiert (Diefenbach et al. 1999). Sie dient, ähnlich der Reaktion auf Viren (siehe Kap. 1.8.3), der frühen Begrenzung der Infektion vor dem Beginn der adaptiven Immunantwort der T-Lymphozyten mittels Zytokin-Produktion. Außerdem erkennen NK über KIRs, CD94 und NKG2 Zielzellen mit aberranter MHC-Klasse-I-Expression und werden so stimuliert. Daher führen von Pathogenen induzierte Modifikation der MHC-Klasse-I nicht nur zu einer Abschwächung der CD8-T-Zell-Erkennung, sondern auch zu erhöhter Anfälligkeit der infizierten Zellen gegenüber NK-Zell-vermittelter Abwehr.

Aktivierte NK-Zellen produzieren die Zytokine IFN-γ, TNF-α, den Granulozyten/Makrophagen stimulierenden Faktor GM-CSF sowie die Makrophagen inflammatorischen Proteine 1α und β (MIP-1α und MIP-1β) (Trinchieri 1989; Chan et al. 1991; Bluman et al. 1996; Biron 1997; Oliva et al. 1998).

Es ist inzwischen eine weit verbreitete Ansicht, dass die Ausschüttung von IFN-γ durch NK-Zellen wichtig für die unspezifische Abwehr von intrazellulären Pathogenen ist (Bancroft 1993; Ismail et al. 2002). Abb. 4.2 von Paul und Skerrett aus dem Jahr 2000 stellt diesen Mechanismus auch als Bestandteil des Zytokin-Netzwerkes der Immunsituation während einer Legionellose dar. Paul und Skerrett stützen sich dabei auf Untersuchungen von Blanchard et al. aus dem Jahre 1989, in der die Autoren zu dem Schluss gelangen, dass NK-Zellen in der frühen Phase einer *L. pneumophila*-Infektion, insbesondere bei Erstkontakt, die Hauptquelle für IFN-γ seien (Blanchard et al. 1989). Die IFN-γ -sezernierenden Zellen wurden jedoch nicht isoliert, sondern lediglich über Phänotypisierung ihrer CD-Moleküle identifiziert. Antikörper gegen den NK-Zell-spezifischen Marker CD56 kamen nicht zum Einsatz. Eine zuverlässige Unterscheidung zwischen T-Lymphozyten und NK-Zellen, wie sie von der in dieser Arbeit eingesetzten Isolation mittels Negativ-Depletion geleistet wird, war nicht möglich. Friedman erwähnt in seinem Review 2002 über *L. pneumophila* zwar die NK-Zellen als Quelle des IFN-γ, bleibt jedoch die Angabe einer Referenz schuldig (Friedman et al. 2002). Die intrazelluläre IFN-γ-Detektion im Zuge dieser Arbeit stellt daher den ersten expliziten Nachweis für die Bildung dieses Zytokins durch IL-2-aktivierte NK-Zellen in einem humanen *L. pneumophila* Infektionsmodell dar.

Die Zytokine IL-12 und IL-18 scheinen den Anstieg der IFN-γ-Produktion in Mäusen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* während einer Legionelleninfektion zu mediieren (Okamura et al. 1998; Salins et al. 2001).

Unter synergistischer Stimulation mit IL-12 und IL-18 wird IFN-γ außer von NK-Zellen auch von T-Lymphozyten produziert (Brieland et al. 1998; Okamura et al. 1998; Yoshimoto et al. 1998; Brieland et al. 2000). Nach längerem oder wiederholtem Kontakt mit *L. pneumophila* fallen unter peripheren Lymphozyten vor allem CD4+ TH-1-Zellen als IFN-γ-Produzenten auf (Kitsukawa et al. 1995). NK-Zellen sind jedoch an

dieser Stimulation indirekt beteiligt, indem sie Makrophagen über IFN-γ zur Produktion der Zytokine IL-12 und IL-18 anregen (siehe Abb. 4.2). Diese wirken dann wiederum auf TH-1-Zellen.

Ebenso essenziell für die IFN-γ-Produktion von NK-Zellen scheint IL-15 zu sein, das ebenfalls von Monozyten, aber auch von anderen Zellen gebildet wird. Ein gegen IL-15 gerichteter Antikörper unterdrückt die IFN-γ-Antwort humaner NK-Zellen auf bakterielles LPS in Zellkultur (Carson et al. 1994; Carson et al. 1995; Fehniger et al. 1999). Eine Bedeutung von IL-15 bei einer Legionellose wurde bisher nicht nachgewiesen.

In vitro führt eine Aktivierung von NK-Zellen zu einer gesteigerten NK-Zell-mediierten Zytotoxizität (Henney et al. 1981). Im Rahmen von viralen oder bakteriellen Infektionen sind Indizien für eine NK-Zell-mediierte Lyse von Zielzellen allerdings spärlich. So halten beispielsweise Biron et al. 1999 fest, dass es bei viralen Infektionen bisher kaum Hinweise auf NK-Zell-mediierte Zytotoxizität gibt (Biron et al. 1999). Beträchtlich größer sind die Informationen zur Rolle des von NK-Zellen gebildeten IFN-γ bei der Abwehr von Viren.

Ähnliches gilt für die Legionellose: NK-Zell-mediierte Zytotoxizität konnte bisher nicht nachgewiesen werden; IFN-γ hingegen kommt bei der Reaktion des Immunsystems auf eine *L. pneumophila*-Infektion eine große Bedeutung zu.

4.2.3 Immunregulatorisch, antiinfektiös, antiproliferativ – zur Schlüsselrolle des Effektorzytokins IFN-γ bei der Immunabwehr einer Legionellose

IFN-γ defiziente Knock-out-Mäuse weisen nach nasaler Infektion mit *L. pneumophila* nicht nur klinisch-schwerere Krankheitsverläufe und eine größere Mortalitätsrate auf, sondern zeigen auch eine insgesamt verminderte Zytokin-Produktion (Shinozawa et al. 2002). Intrazellulär gebildetes IFN-γ ist ein entscheidendes Effektorzytokin während einer Legionellose (Salins et al. 2001).

Rekombinates IFN-γ ist imstande, intrazelluläres Wachstum von *L. pneumophila* in Monozyten zu verhindern (Bhardwaj et al. 1986; Gebran et al. 1994c). Das Verständnis dieser Wirkung, insbesondere die Suche nach Mechanismen ist Gegenstand fortwährender Forschung. Ein eher schwach wirksamer Mechanismus von IFN-γ in Monozyten besteht in einer Herunterregulierung von Komplement-Rezeptor-mediierter Phagozytose

(Horwitz 1992). Ein weiterer Mechanismus ist die Induktion von Stickstoffmonoxid in Monozyten, das sich in zellfreien Modellen als toxisch für Legionellen erwiesen hat (Summersgill et al. 1992).

Es ist bekannt, dass bei Mäusen eine Infektion mit *Leishmania major* (*L. major*) über eine Expansion von TH-1-Zellen eine Sekretion von IFN-γ hervorruft, welches dann infizierte Makrophagen aktiviert (Louis et al. 1998). IFN-γ aktiviert die Typ-2 Stickstoffmonoxid-Synthetase (NOS2) der Makrophagen, welche für *L. major* toxische Stickstoffintermediate produziert (Assreuy et al. 1994). Mäuse, welche kein IFN-γ produzieren können, zeigen eine deutlich verschlechterte Abwehr gegen *L. major* (Wei et al. 1995). Außerdem wird IFN-γ während einer Infektion mit *L. major* auch von NK-Zellen sezerniert (Scharton et al. 1993).

Obwohl auch bei humanen Makrophagen für *L. major* eine Stickstoffmonoxid-vermittelte Keimreduktion festgestellt werden konnte (Vouldoukis et al. 1995), lassen andere Versuche mit menschlichen Modellen Zweifel an der Bedeutung der IFN-γ induzierten Produktion von Stickstoffmonoxid durch Monozyten im Rahmen antimikrobieller Reaktionen aufkommen (Jensen et al. 1988; Schneemann et al. 1993; Matsuzaki et al. 1995; Yamamoto et al. 1996). Für die humane Legionellose hat die Produktion von NO wahrscheinlich gar keine Bedeutung (Neumeister et al. 2001).

Synergistisch zu IFN-γ wirkt TNF-α, welches ebenfalls zu einer Erhöhung der NO-Produktion in Makrophagen führt. Bei Rattenzellen vermindert eine Blockade der NO-Bereitstellung im *L. pneumophila* Infektionsmodell die Wirkung von IFN-γ und TNF-α (Skerrett et al. 1996a).

Ein für die Legionellose entscheidender Mechanismus von IFN-γ könnte in der Restriktion des in Monozyten verfügbaren Eisens liegen (Byrd et al. 1989; Gebran et al. 1994a; Gebran et al. 1994b; Gebran et al. 1994c).

Darüber hinaus besitzt IFN-γ noch eine Reihe von anderen Wirkungen. So erhöht es in Monozyten die Bildung der Zytokine IL-1β, IL-6 und IL-8. Diese haben jedoch in humanen Monozyten keinen Einfluss auf die Legionellenvermehrung (Neumeister et al. 1998b).

Aufgrund der antiproliferativen Wirkungen auf *L. pneumophila* wurden therapeutische Wirksamkeitsversuche von exogen zugeführtem, rekombinant hergestelltem IFN-γ durchgeführt. So konnte *in vivo* der Infektionsverlauf bei Ratten, deren IFN-γ-Produktion zuvor mit Kortikosteroiden vermindert worden war, sowie bei IFN-γ defizienten Knock-out Mäusen positiv beeinflusst werden (Skerrett et al. 1994; Heath et al. 1996b). Der Einsatz von IFN-γ zusätzlich zur Antibiotikatherapie von infizierten humanen Monozyten erbrachte jedoch keinen Synergismus bei der Bekämpfung von *L. pneumophila* (Bhardwaj et al. 1988). Neuere Untersuchungen an Mäusen, die mit muriner IFN-γ-cDNA mittels adenoviraler Vektoren transfiziert worden waren, ergaben ebenso wie eine Behandlung mittels rekombinantem IFN-γ eine erhöhte Resistenz mit schnellerer Eliminierung von applizierten Legionellen (Deng et al. 2001; Salins et al. 2001).

Auch beim Menschen konnte die Bedeutung von IFN-γ bei der Begrenzung einer Legionelleninfektion nachgewiesen werden. Funai et al. führten 1997 dazu Untersuchungen mit Patienten durch, welche durch eine Infektion mit Humanem-T-Zell-Leukämie-Virus-1 (HTLV-1) eine erhöhte konstitutive IFN-γ-Produktion aufwiesen. Infektion mit *L. pneumophila* bewirkte bei PBMCs dieser Patienten einen stärkeren Anstieg der IFN-γ-Spiegel. Durch Neutralisation des IFN-γ mittels monoklonaler Antikörper konnte die Hemmung der Legionellenvermehrung aufgehoben werden (Funai et al. 1997). Damit scheint dem Level der endogenen konstitutiven IFN-γ-Produktion eine Bedeutung bei der Anfälligkeit für eine *L. pneumophila*-Infektion zuzukommen. Niedrige konstitutive IFN-γ-Spiegel stellen also gewissermaßen einen Prädispositionsfaktor für eine Legionellose dar. Unterstützt wird diese These durch neueste Untersuchungen mit Patienten nach einer überstandenen Legionellose. Die PBMCs dieser Patienten zeigen nach Stimulation mit LPS eine niedrigere IFN-γ-Antwort als die Zellen der Vergleichsgruppe, welche aus exponierten, jedoch nicht erkrankten Personen rekrutiert worden war (Lettinga et al. 2003). Damit lassen sich auch die bekannten Risikofaktoren einer Legionellose erklären: Nikotinkonsum, Kortikoidtherapie und ein hohes Alter gehen mit niedrigeren IFN-γ-Spiegeln einher.

Versuche mit IFN-γ defizienten Knock-out-Mäusen, deren Wild-Stämme (ohne Mutation) eine hohe Resistenz gegenüber *L. pneumophila* aufwiesen, zeigten die Unfähigkeit dieser Tiere, eine Infektion mit *L. pneumophila* wirksam einzudämmen (Heath et al. 1996b; Skerrett et al. 1996b). Damit erscheinen der Level der IFN-γ-Produktion bei einer Legionellose und das Ausmaß der davon mediierten Zunahme an antimikrobieller Aktivität der Monozyten entscheidend für den Infektionsverlauf zu sein (Friedman et al. 2002).

Als zelluläre Quelle des IFN-γ wurden NK-Zellen und TH-1-Zellen identifiziert. Die Stimulierung von TH-1-Zellen zur IFN-γ-Produktion erfolgt jedoch verzögert, da erst die Zytokin-vermittelte Differenzierung von TH-0-Zellen in TH-1-Zellen erfolgen muss (Smith 1988; Park et al. 2000). Dem hier gezeigten Mechanismus der IFN-γ-Produktion durch IL-2-aktivierte NK-Zellen dürfte somit entscheidende Bedeutung bei der frühen Eindämmung der Infektion zukommen.

4.2.4 Rolle des TNF-α

Eng verknüpft mit der protektiven Wirkung von IFN-γ ist ein anderes bereits erwähntes Gewebshormon: das Zytokin TNF-α. Es wird von humanen, mit *L. pneumophila*-infizierten Makrophagen IFN-γ-abhängig sezerniert (Blanchard et al. 1989; Matsiota-Bernard et al. 1993). Ähnlich wie IFN-γ, jedoch weniger stark, vermag TNF-α das intrazelluläre Wachstum von *L. pneumophila* in humanen Makrophagen zu hemmen. Obwohl sich bei der kombinierten Applikation beider Zytokine kein Synergismus nachweisen ließ, kam es nach Blockade der TNF-α-Expression zu einer Abschwächung der inhibitorischen IFN-γ-Effekte auf das Legionellenwachstum (Matsiota-Bernard et al. 1993). Das lässt die IFN-γ-Wirkung als teilweise TNF-α-vermittelt erscheinen.

Im Zuge einer Legionelleninfektion sind bei Nagern *in vivo* erhöhte TNF-α Spiegel vor allem in der Lunge, nicht jedoch im Serum detektierbar. Sekretionsquelle des TNF-α sind die alveolären Makrophagen (Blanchard et al. 1987a; Skerrett et al. 1997).

Ebenso wie bei IFN-γ scheinen konstitutiv erhöhte TNF-α-Spiegel, wie z. B. bei einer HTLV-I-Infektion, einen Schutz vor einer Infektion mit *L. pneumophila* darzustellen

(Funai et al. 1997). Der Level der endogenen TNF-α-Produktion ist somit gleichfalls bedeutsam für die Anfälligkeit gegenüber einer *L. pneumophila*-Infektion.

4.3 Methodische Einschätzung und Bewertung der Ergebnisse

Die Ergebnisse zeigen deutlich eine Erhöhung der IFN-γ-Produktion der NK-Zellen bei Koinkubation mit infizierten Monozyten. Eine weitere Frage war, ob die MHC-Klasse-I-Reduktion auf den mit *L. pneumophila*-infizierten Monozyten Ursache für die IFN-γ-Produktion ist.

Das angewandte Versuchsmodell wurde konzipiert, um diesen Mechanismus zu untersuchen. Möglich wurde dies durch eine Isolierung der beiden Zelltypen aus ihrem physiologischen Zusammenhang, der durch ein ausgefeiltes Wechselspiel aus direkter Zell-Zell-Interaktion und konsekutiver Zytokin-Exzitation bzw. Inhibition gekennzeichnet ist (siehe Kap. 4.2). Zusätzlich modifiziert und vereinfacht wurde die Zellinteraktion durch die Versuchsbedingungen: die IL-2-Aktivierung der NK-Zellen, die Bestrahlung der Zielzellen und die Blockade des Proteinexports durch Monensin während der Koinkubation. Trotz dieser Modifikationen, durch welche der vermutete Mechanismus isoliert werden sollte, erscheint die Existenz additiver Stimulierung nicht nur aufgrund obiger Reflexionen zum Zytokinnetzwerk als wahrscheinlich. Sie wird vielmehr von dem Befund gestützt, dass K-562-Zellen die NK-Zellen nur etwa gleich stark stimulierten (40,3 %) wie die infizierten Monozyten (37,1 %). K-562-Zellen exprimieren überhaupt keine MHC-Klasse-I. Dagegen weisen die durch *L. pneumophila*-infizierten Monozyten nur eine maximal 50%ige Reduktion ihrer MHC-Klasse-I auf. Die ähnlich hohen Stimulationsraten deuten darauf hin, dass bei infizierten Monozyten eventuell nur ein Teil der Stimulation mit der Downregulation ihrer MHC-Klasse-I erklärbar ist.

Der Befund, dass IL-2-aktivierte NK-Zellen sogar im autologen System eine nicht unerhebliche Aktivität gegenüber uninfizierten Monozyten zeigen, bestätigt Versuche von Blanchard et al. aus dem Jahre 1987 (Blanchard et al. 1987b). Blanchard et al. benutzten in ihren Zytotoxizitätsversuchen ein ähnliches *L. pneumophila*-Infektionsmodell mit humanen peripheren Leukozyten. Damals wurden im *Chromrelease* bei einem 50:1 Effektor:Target-Verhältnis 15,4 % der nicht-infizierten Monozyten zerstört.

Die Simulation des Beitrags freier Legionellen an der Stimulation der NK-Zellen in der Koinkubation dürfte mit dem Zusatz einer 100fachen Dosis an *L. pneumophila* zu den NK-Zellen eher großzügig bemessen sein, da Legionellen als fakultativ intrazelluläre Keime kaum extrazelluläres Wachstum in Zellkultur zeigen und die tatsächliche Menge freier Legionellen im Koinkubationsansatz wahrscheinlich eher im Bereich zwischen dem 10fachen (Stimulationswert = 3,8 %) und dem 100fachen (Stimulation = 7,2 %) der eingesetzten NK-Zellen lag.

Die geringe Zunahme der Stimulation mit nicht MHC-Klasse-I-geminderten Targets, wie den mit apathogenen *L. steigerwaltii* infizierten Monozyten gegenüber der deutlichen Zunahme nach Stimulation mit *L. pneumophila* infizierten Monozyten ist jedoch ein starker Hinweis, dass die NK-Zellen – wie in Abb.4.1 dargestellt – auch über ihre KIRs aktiviert werden.

Dass die partiell MHC-Klasse-I-geminderten, infizierten Monozyten beinahe gleich stark stimulieren wie die MHC-Klasse-I-losen K-562-Zellen, lässt die Existenz zusätzlicher, durch die Infektion induzierter Stimuli vermuten. Am wahrscheinlichsten ist dabei Stimulation über den bekannten NK-Aktivator IL-12. Eine experimentelle Abgrenzung der KIR-Stimulation von einer Stimulation über von infizierten Monozyten gebildetes IL-12 wäre durch den Einsatz eines IL-12-neutralisierenden monoklonalen Antikörpers realisierbar und würde weitere Klärung bringen.

Insgesamt kann damit die gemessene Stimulation von NK-Zellen durch infizierte Monozyten zumindest teilweise als Resultat der NK-Zell-spezifischen ‚Nicht-Erkennung' der infektionsbedingt MHC-Klasse-I-geminderten Zielzellen angesehen werden.

4.4 Bedeutung und Einordnung der Ergebnisse

Die Wirkung von Zytokinen wie IFN-γ beschränkt sich *in vivo* nicht nur auf direkte Effekte, wie z. B. das Verhindern der Replikation von *L. pneumophila* in Makrophagen. Sie muss vielmehr immer als Teil des großen Zytokin-Netzwerkes der angeborenen Immunität und erworbenen Immunität verstanden werden.

Zytokine haben das Potential zur Übernahme von Schlüsselrollen durch Triggern von entscheidenden Abwehrmechanismen bei der angeborenen Immunantwort. Sie können

direkt oder durch Beeinflussung anderer Zytokine oder Chemokine, welche für die chemotaktische Anlockung immunkompetenter Zellen sorgen, modulierend auf die Immunabwehr wirken. Die Wirkungsweise von Zytokinen besteht also in einer interdependenten Immunregulation, was die vollständige Aufklärung der Wirkung einzelner Substanzen mit den verfügbaren Methoden so diffizil, um nicht zu sagen unmöglich macht.

Über die Bedeutung einer Stimulierung von NK-Zellen mit anschließender Freisetzung von IFN-γ im Zuge einer Legionellose gibt es bisher nur sehr bruchstückhafte Evidenzen.

Hauptwirkung von IFN-γ bei einer Legionelleninfektion ist die Aktivierung von Makrophagen und die Erhöhung ihrer antimikrobiellen Aktivität. Den quantitativ bedeutsamsten Anteil an der IFN-γ-Produktion leisten TH-1-Zellen. Sie entstehen im Zuge einer Infektion durch Differenzierung aus TH-0-Zellen (siehe Abb. 4.3).

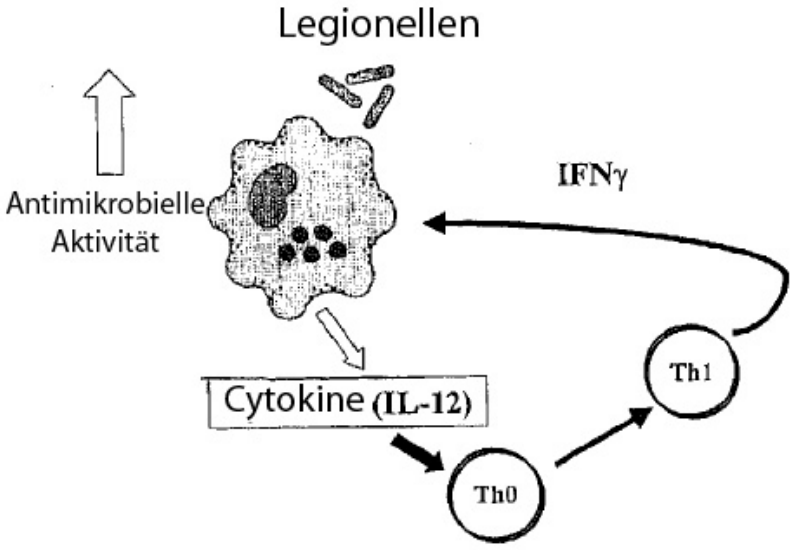

Abb. 4.3: Induktion von TH-1-Zellen zur Produktion von IFN-γ durch *Legionella*-infizierte Makrophagen (Friedman et al. 2002)

Die TH-1-Zell-Bildung aus TH-0-Zellen erfolgt jedoch erst auf die IL-12-Aktivierung und wie unter Kap. 4.2.1 dargelegt, schwächt *L. pneumophila* die IL-12-Produktion und verlangsamt damit die IFN-γ-Bildung aus TH-1-Zellen zusätzlich. Dem von NK-Zellen

gebildeten IFN-γ dürfte somit in den frühen Phasen einer Infektion eine entscheidende Rolle bei der Begrenzung der Legionellenvermehrung zukommen.
Bei der Beurteilung der aufgestellten Hypothese eines neuen Immunevasionsmechanismus von *L. pneumophila* durch Induktion einer MHC-Klasse-I-Reduktion auf infizierten Monozyten ist eine differenzierte Betrachtungsweise angezeigt:
Obwohl man davon ausgehen kann, dass es *L. pneumophila* dadurch gelingt, eine CD8-T-Zell-Antwort abzuschwächen, führt im Gegenzug die beobachtete Stimulierung von NK-Zellen zu einer Verstärkung der Immunabwehr. Allerdings war die IFN-γ-Antwort nur bei NK-Zellen zu beobachten, welche mit IL-2-aktiviert worden waren. Das Zustandekommen einer ähnlich starken IL-2-Aktivierung *in vivo* darf jedoch bezweifelt werden, zumal *L. pneumophila* in der Lage ist, IL-2 durch seine Proteasen zu degradieren. Insgesamt könnte die MHC-Klasse-I-Reduktion damit durchaus einen Vorteil für *L. pneumophila* bedeuten, insbesondere wenn sie neben Monozyten auch auf anderen wichtigen T-Zell-Abwehr mediierenden Zellen, wie z. B. den DC, zu finden wäre.
Eine abschließende Klärung dieser Frage ist von in-vivo-Experimenten zur NK-Zell-Aktivität während einer Legionellose zu erwarten. Durch Infektion von Monozyten mit *L. pneumophila*-Mutanten, die nicht mehr in der Lage sind, eine MHC-Klasse-I-Reduktion zu induzieren, könnte ferner durch Koinkubation mit CD8-T-Zellen der vermutete Einfluss auf die CD8-T-Zell-Antwort untersucht werden.

Ismail weist in seinem kürzlich erschienenen Review auf den Zusammenhang zwischen der Lokalisation von intrazellulären Pathogenen und der Gewichtung der adaptiven Immunantwort nach TH-1-Zell- bzw. CD8-T-Zell-Dominanz hin. So werden Antigene von zytosolisch lokalisierten Pathogenen, wie Rickettsien, endogen über MHC-Klasse-I präsentiert. Ihre Abwehr ist daher vornehmlich CD8-T-Zell-mediiert. Dagegen werden Antigene von Keimen wie Chlamydien, welche in phagosomalen, lysosomalen oder endosomalen Kompartimenten proliferieren, exogen über MHC-Klasse-II präsentiert. Dies hat eine überwiegend TH-1-Zell-mediierte Abwehr zu Folge (Kayser et al. 1998; Ismail et al. 2002). Es gibt auch Hinweise auf MHC-Klasse-I-vermittelte Präsentation von exogenen Antigenen aus Endosomen, welche mittels Regurgitation ins Zytosol gelangen (Harding et al. 1994). Die bisher bekannten Mechanismen zur adaptiven Immunantwort

bei einer Legionellose (siehe Kap. 4.2) sprechen jedoch vor allem für eine TH-1-Zell-Gewichtung, wie sie nach Ismail et al. (2002) aufgrund der intrazellulären Lokalisation von Legionellen im Phagosom und der damit favorisierten Peptid-Präsentation via MHC-Klasse-II zu erwarten wäre. Neueste Untersuchungen im Maussystem scheinen diesen Weg der TH-1-Zell-Aktivierung über MHC-Klasse-II präsentierte Antigene zu bestätigen. Als Antigen-präsentierende Zellen wurden DC bestimmt (Neild et al. 2003). Möglich ist aber auch, dass das Überwiegen TH-1-Zell-mediierter, adaptierter Immunabwehr Resultat der MHC-Klasse-I-Downregulation ist.
Es ist interessant, dass MHC-Klasse-II-Moleküle auf humanen Makrophagen während einer Infektion mit *L. pneumophila* nicht herunterreguliert werden (unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe). Dagegen wird die MHC-Klasse-I-Expression humaner Makrophagen von Legionellen reguliert. Das pathogenetische Wirkungspotential dieses Mechanismus könnte mit Untersuchungen über die Existenz bzw. über das Ausmaß einer MHC-Klasse-I-Präsentation von Legionellen-Antigenen bei Infektion mit nicht MHC-Klasse-I-reduzierenden Legionellen-Mutanten und eine dadurch mediierte CD8-T-Zell-Antwort eingeschätzt werden.

Leider sind eventuell wirksame Mechanismen der adaptiven Immunantwort auf eine Legionellose insgesamt bisher nur unzureichend geklärt. Antikörper werden erst Wochen nach den ersten klinischen Symptomen und nur von bis zu 50 % der Infizierten in nennenswertem Ausmaß gebildet und fördern dann zwar die Aufnahme von Legionellen in Makrophagen, verhindern jedoch nicht ihre intrazelluläre Vermehrung (Horwitz et al. 1981; Friedman et al. 2002). Die Bedeutung der humoralen adaptiven Immunantwort ist daher eher als gering zu bewerten. Über die Rolle zellulärer Komponenten der adaptiven Immunantwort liegen bisher vor allem Informationen zur IFN-γ-Stimulation durch TH-1-Zellen vor. CD8-T-Zell-mediierte Zytotoxizität könnte – möglicherweise verstärkt durch eine TH-1-Zell Stimulation – vor allem für die endgültige Entfernung der Keime und eine raschere Eliminierung beim Zweitkontakt mit *L. pneumophila* verantwortlich sein (Friedman et al. 2002).

Durch die vorliegenden Untersuchungen konnte erstmals eine Sekretion von IFN-γ durch NK-Zellen nach Kontakt mit durch *L. pneumophila*-infizierten Monozyten gezeigt werden. Die Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass die beobachtete MHC-Klasse-I-Reduktion ursächlich mit der NK-Zell-Stimulation in Zusammenhang steht. Andere Wirkungen der von *L. pneumophila* induzierten Inhibition der MHC-Klasse-I-Expression sind bisher nicht bekannt. Es besteht daher Aufklärungsbedarf hinsichtlich des Zusammenhangs erhöhter MHC-Klasse-I-Reduktion speziell bei humanpathogenen Legionellenspezies, wie *L. pneumophila*, und einer eventuell verminderten Aktivierung von CD8-T-Zellen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Stimulation von IL-2-aktivierten NK-Zellen durch mit *L. pneumophila*-infizierte Monozyten untersucht. Als Aktivitätsmarker wurde IFN-γ in einem intrazellulären Zytokinassay mit Farbstoff-konjugierten Antikörpern markiert und mithilfe der Durchflusszytometrie ausgewertet.

Ausgangspunkt bildeten Resultate aus unserem Labor, nach denen mit *L. pneumophila*-infizierte Monozyten nach 24 bzw. 48 Stunden Infektionsdauer eine zunehmend verminderte Expression ihrer MHC-Klasse-I aufwiesen. Nach Infektion mit nicht als humanpathogen bekannten Legionellenspezies wie *L. steigerwaltii* konnte keine Reduktion der MHC-Klasse-I bei infizierten Monozyten festgestellt werden. NK-Zellen erkennen Zielzellen mit einer aberranten MHC-Klasse-I-Konfiguration über *Killer-Inhibitory-Receptors* und werden so aktiviert. Ziel war es, das zu erwartende Ausmaß dieser Aktivierung im Rahmen einer Legionellose zu klären und damit einen weiteren Baustein zum Verständnis der Immunabwehrmechanismen gegen diesen Pneumonie-Erreger zu liefern.
Das Versuchssetting umfasste ein Infektionsmodell mit aus humanem peripherem Blut isolierten Monozyten. Bei der Infektion kamen *L. pneumophila* SG 1 *Pontiac* und als Vertreter nicht humanpathogener Spezies *L. steigerwaltii* zum Einsatz. Aus dem gleichen Blutzellkonzentrat wurden neben Monozyten mittels Antikörperdepletion auch NK-Zellen isoliert. Diese wurden mit rekombinantem Interleukin-2 aktiviert.

Nach Isolation wurden die Monozyten infiziert und die NK-Zellen aktiviert. 48 Stunden später wurden die Monozyten durch Bestrahlung inaktiviert und mit den NK-Zellen koinkubiert. Nach verschiedenen Koinkubationszeitpunkten von 1 bis 24 Stunden wurden dann die NK-Zellen mithilfe eines intrazellulären Zytokin-Assays markiert und im Durchflusszytometer gemessen.

Erstmals konnte gezeigt werden, dass IL-2-aktivierte NK-Zellen durch Koinkubation mit *L. pneumophila*-infizierten Monozyten zur Produktion von IFN-γ stimuliert werden. Es waren im Vergleich mit uninfizierten Monozyten mehr als doppelt so viele NK-Zellen IFN-γ positiv. Analog zur MHC-Klasse-I-Reduktion waren die Stimulationswerte nach 48 Stunden Infektionsdauer im Vergleich zur 24-Stunden-Infektion stärker und bei Infektion mit einer avirulenten Legionellenspezies schwächer.

Entscheidender Faktor der Immunabwehr im Rahmen einer Legionellose ist die Produktion von IFN-γ, welches die Erhöhung antimikrobioller Aktivität von Makrophagen mediiert. Die gefundenen Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von NK-Zellen als IFN-γ-Produzent insbesondere während der frühen Phase einer Legionelleninfektion vor dem Einsetzen der TH-1-Zell-Antwort.

6. Literaturverzeichnis

[Format: Autoren (Publikationsjahr). „Titel der Arbeit“ Titel der Zeitschrift (Abkürzung nach Index medicus) Bandnummer: Seitenzahl erste-letzte.]

Abu Kwaik, Y. (1996). "The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic reticulum." Appl Environ Microbiol 62(6): 2022-8.

Abu Kwaik, Y., B. I. Eisenstein, et al. (1993). "Phenotypic modulation by *Legionella pneumophila* upon infection of macrophages." Infect Immun 61(4): 1320-9.

Ahn, K., A. Angulo, et al. (1996a). "Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process." Proc Natl Acad Sci U S A 93(20): 10990-5.

Ahn, K., A. Gruhler, et al. (1997). "The ER-luminal domain of the HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP." Immunity 6(5): 613-21.

Ahn, K., T. H. Meyer, et al. (1996b). "Molecular mechanism and species specificity of TAP inhibition by herpes simplex virus ICP47." Embo J 15(13): 3247-55.

Arata, S., C. Newton, et al. (1993a). "*Legionella pneumophila* growth restriction in permissive macrophages cocultured with nonpermissive lipopolysaccharide-activated macrophages." Infect Immun 61(12): 5056-61.

Arata, S., C. Newton, et al. (1993b). "*Legionella pneumophila* induced tumor necrosis factor production in permissive versus nonpermissive macrophages." Proc Soc Exp Biol Med 203(1): 26-9.

Arnouts, P. J., M. R. Ramael, et al. (1991). "*Legionella pneumophila* peritonitis in a kidney transplant patient." Scand J Infect Dis 23(1): 119-22.

Assreuy, J., F. Q. Cunha, et al. (1994). "Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*." Eur J Immunol 24(3): 672-6.

Bancroft, G. J. (1993). "The role of natural killer cells in innate resistance to infection." Curr Opin Immunol 5(4): 503-10.

Bandyopadhyay, P. and H. M. Steinman (1998). "*Legionella pneumophila* catalase-peroxidases: cloning of the katB gene and studies of KatB function." J Bacteriol 180(20): 5369-74.

Bauer, S., V. Groh, et al. (1999). "Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA." Science 285(5428): 727-9.

Bellinger-Kawahara, C. and M. A. Horwitz (1987). "The major outer membrane protein is a prominent acceptor molecule for complement C3 on *Legionella pneumophila*." Clin Res(35): 468A.

Bellinger-Kawahara, C. and M. A. Horwitz (1990). "Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome MOMP complexes by human monocytes." J Exp Med(172): 1201-1210.

Benin, A. L., R. F. Benson, et al. (2002a). "An outbreak of travel-associated Legionnaires disease and Pontiac fever: the need for enhanced surveillance of travel-associated legionellosis in the United States." J Infect Dis 185(2): 237-43.

Benin, A. L., R. F. Benson, et al. (2002b). "Trends in legionnaires disease, 1980-1998: declining mortality and new patterns of diagnosis." Clin Infect Dis 35(9): 1039-46.

Bennett, E. M., J. R. Bennink, et al. (1999). "Cutting edge: adenovirus E19 has two mechanisms for affecting class I MHC expression." J Immunol 162(9): 5049-52.

Benson, R. F. and B. S. Fields (1998). "Classification of the genus *Legionella*." Semin Respir Infect 13(2): 90-9.

Berdal, B. P., C. E. Farshy, et al. (1979). "Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine by enzyme-linked immunospecific assay." J Clin Microbiol 9(5): 575-8.

Berg, J., J. Tymoczko, et al. (2003). "Biochemie." Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg - Berlin 5.Auflage.

Berger, K. H. and R. R. Isberg (1993). "Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in *Legionella pneumophila*." Mol Microbiol 7(1): 7-19.

Bernander, S., B. Gastrin, et al. (1994). "*Legionella* urinary antigen in early disease." Scand J Infect Dis 26(6): 777-8.

Bhardwaj, N. and M. A. Horwitz (1988). "Interferon-gamma and antibiotics fail to act synergistically to kill *Legionella pneumophila* in human monocytes." J Interferon Res 8(3): 283-93.

Bhardwaj, N., T. W. Nash, et al. (1986). "Interferon-gamma-activated human monocytes inhibit the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*." J Immunol 137(8): 2662-9.

Bhopal, R. (1995). "Source of infection for sporadic Legionnaires' disease: a review." J Infect 30(1): 9-12.

Bibb, W. F., R. J. Sorg, et al. (1981). "Recognition of a second serogroup of *Legionella* longbeachae." J Clin Microbiol 14(6): 674-7.

Biron, C. A. (1997). "Activation and function of natural killer cell responses during viral infections." Curr Opin Immunol 9(1): 24-34.

Biron, C. A., K. B. Nguyen, et al. (1999). "Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines." Annu Rev Immunol 17: 189-220.

Blanchard, D. K., J. Y. Djeu, et al. (1987a). "Induction of tumor necrosis factor by *Legionella pneumophila*." Infect Immun 55(2): 433-7.

Blanchard, D. K., H. Friedman, et al. (1989). "Induction of interferon-gamma and tumor necrosis factor by *Legionella pneumophila*: augmentation of human neutrophil bactericidal activity." J Leukoc Biol 45(6): 538-45.

Blanchard, D. K., H. Friedman, et al. (1988). "Role of gamma interferon in induction of natural killer activity by *Legionella pneumophila* in vitro and in an experimental murine infection model." Infect Immun 56(5): 1187-93.

Blanchard, D. K., W. E. Stewart, 2nd, et al. (1987b). "Cytolytic activity of human peripheral blood leukocytes against *Legionella pneumophila*-infected monocytes: characterization of the effector cell and augmentation by interleukin 2." J Immunol 139(2): 551-6.

Bluman, E. M., K. J. Bartynski, et al. (1996). "Human natural killer cells produce abundant macrophage inflammatory protein-1 alpha in response to monocyte-derived cytokines." J Clin Invest 97(12): 2722-7.

Bohte, R., R. van Furth, et al. (1995). "Aetiology of community-acquired pneumonia: a prospective study among adults requiring admission to hospital." Thorax 50(5): 543-7.

Boshuizen, H. C., S. E. Neppelenbroek, et al. (2001). "Subclinical *Legionella* infection in workers near the source of a large outbreak of Legionnaires disease." J Infect Dis 184(4): 515-8.

Brenner, D. J., A. G. Steigerwalt, et al. (1988). "*Legionella pneumophila* serogroup Lansing 3 isolated from a patient with fatal pneumonia, and descriptions of L. *pneumophila* subsp. *pneumophila* subsp. nov., L. *pneumophila* subsp. fraseri subsp. nov., and L. *pneumophila* subsp. pascullei subsp. nov." J Clin Microbiol 26(9): 1695-703.

Brenner, D. J., A. G. Steigerwalt, et al. (1980). "*Legionella bozemani* sp. nov. and *Legionella dumoffii* sp.nov:classification of two additional species of *Legionella* associated with human pneumonia." Curr Microbiol 4: 111-116.

Brenner, D. J., A. G. Steigerwalt, et al. (1985). "Ten new species of *Legionella*." Int J Syst Bacteriol 35: 50-9.

Brieland, J. K., C. Jackson, et al. (2000). "Immunomodulatory role of endogenous interleukin-18 in gamma interferon-mediated resolution of replicative *Legionella pneumophila* lung infection." Infect Immun 68(12): 6567-73.

Brieland, J. K., D. G. Remick, et al. (1995). "In vivo regulation of replicative *Legionella pneumophila* lung infection by endogenous tumor necrosis factor alpha and nitric oxide." Infect Immun 63(9): 3253-8.

Brieland, J. K., D. G. Remick, et al. (1998). "In vivo regulation of replicative *Legionella pneumophila* lung infection by endogenous interleukin-12." Infect Immun 66(1): 65-9.

Byrd, T. F. and M. A. Horwitz (1989). "Interferon gamma-activated human monocytes downregulate transferrin receptors and inhibit the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* by limiting the availability of iron." J Clin Invest 83(5): 1457-65.

Carson, W. E., J. G. Giri, et al. (1994). "Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor." J Exp Med 180(4): 1395-403.

Carson, W. E., M. E. Ross, et al. (1995). "Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro." J Clin Invest 96(6): 2578-82.

Caspar-Bauguil, S., B. Puissant, et al. (2000). "*Chlamydia pneumoniae* induces interleukin-10 production that down-regulates major histocompatibility complex class I expression." J Infect Dis 182(5): 1394-401.

CDC, C. f. D. C. a. P. (1997). "Case definitions for infectious conditions under public health surveillance." MMWR Morb Mortal Wkly Rep 46: 1-55.

Chan, S. H., B. Perussia, et al. (1991). "Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers." J Exp Med 173(4): 869-79.

Christie, P. J. (2001). "Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines." Mol Microbiol 40(2): 294-305.

Christie, P. J. and J. P. Vogel (2000). "Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells." Trends Microbiol 8(8): 354-60.

Cianciotto, N. P. (2001). "Pathogenicity of *Legionella pneumophila*." Int J Med Microbiol 291(5): 331-43.

Cianciotto, N. P., B. I. Eisenstein, et al. (1990). "A mutation in the mip gene results in an attenuation of *Legionella pneumophila* virulence." J Infect Dis 162(1): 121-6.

Cianciotto, N. P., B. I. Eisenstein, et al. (1989). "A *Legionella pneumophila* gene encoding a species-specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection." Infect Immun 57(4): 1255-62.

Cianciotto, N. P. and B. S. Fields (1992). "*Legionella pneumophila* mip gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A 89(11): 5188-91.

Ciesielski, C. A., M. J. Blaser, et al. (1986). "Serogroup specificity of *Legionella pneumophila* is related to lipopolysaccharide characteristics." Infect Immun 51(2): 397-404.

Cirillo, S. L., J. Lum, et al. (2000). "Identification of novel loci involved in entry by *Legionella pneumophila*." Microbiology 146 (Pt 6): 1345-59.

Coers, J., J. C. Kagan, et al. (2000). "Identification of Icm protein complexes that play distinct roles in the biogenesis of an organelle permissive for *Legionella pneumophila* intracellular growth." Mol Microbiol 38(4): 719-36.

Cunha, B. A. (1998). "Clinical features of legionnaires' disease." Semin Respir Infect 13(2): 116-27.

Darelid, J., S. Lofgren, et al. (2003). "*Legionella pneumophila* serogroup 1 antibody kinetics in patients with Legionnaires' disease: implications for serological diagnosis." Scand J Infect Dis 35(1): 15-20.

Davis, G. S. and W. C. Winn, Jr. (1987). "Legionnaires' disease: respiratory infections caused by *Legionella* bacteria." Clin Chest Med 8(3): 419-39.

Davis, G. S., W. C. Winn, Jr., et al. (1981). "Legionnaires Disease. Infections caused by *Legionella pneumophila* and *Legionella*-like organisms." Clin Chest Med 2(1): 145-66.

Deng, J. C., K. Tateda, et al. (2001). "Transient transgenic expression of gamma interferon promotes *Legionella pneumophila* clearance in immunocompetent hosts." Infect Immun 69(10): 6382-90.

Diefenbach, A., H. Schindler, et al. (1999). "Requirement for type 2 NO synthase for IL-12 signaling in innate immunity." Science 284(5416): 951-5.

Dietrich, C., K. Heuner, et al. (2001). "Flagellum of *Legionella pneumophila* positively affects the early phase of infection of eukaryotic host cells." Infect Immun 69(4): 2116-22.

Drozanski, W. (1956). "Fatal bacterial infection in soil amoeba." Acta Microbiol Pol 5: 315-17.

Edelstein, M. A. (1993). "Legionnaires' disease." Clin Infect Dis 16: 741-749.

Edelstein, P. H. (1981). "Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens." J Clin Microbiol 14(3): 298-303.

Edelstein, P. H. (1982). "Comparative study of selective media for isolation of *Legionella pneumophila* from potable water." J Clin Microbiol 16(4): 697-9.

Edelstein, P. H. (1987). "The laboratory diagnosis of Legionnaires' disease." Semin Respir Infect 2(4): 235-41.

Edelstein, P. H. (1998). "Antimicrobial chemotherapy for Legionnaires disease: time for a change." Ann Intern Med 129(4): 328-30.

Ehret, W. (1995). "Diagnostik der Legionelleninfektion." Internist Berl(36): 106-113.

EWGLI (2003). European working group of *Legionella* Infections: http://www.ewgli.org**:** Cited 01/09/2003.

Fang, G. D., M. Fine, et al. (1990). "New and emerging etiologies for community-acquired pneumonia with implications for therapy. A prospective multicenter study of 359 cases." Medicine (Baltimore) 69(5): 307-16.

Fang, G. D., V. L. Yu, et al. (1989). "Disease due to the *Legionella*ceae (other than *Legionella pneumophila*). Historical, microbiological, clinical, and epidemiological review." Medicine (Baltimore) 68(2): 116-32.

Fehniger, T. A., W. E. Carson, et al. (1999). "Costimulation of human natural killer cells is required for interferon gamma production." Transplant proc 31(3): 1476-8.

Fenves, A. Z. (1985). "Legionnaires' disease associated with acute renal failure: a report of two cases and review of the literature." Clin Nephrol 23(2): 96-100.

Fields, B. S. (1996). "The molecular ecology of *Legionella*e." Trends Microbiol 4(7): 286-90.

Fields, B. S. (1997). "*Legionella*e and Legionnaires' disease." C.J.Hurst, G.R.Knudsen, M.J.McInerney, L.D.Stetzenbach and M.V.Walter (ed.), Manual of environmental microbiology, American Society for Microbiology, Washington D.C. 1: 666-675.

Fields, B. S., R. F. Benson, et al. (2002). "*Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation." Clin Microbiol Rev 15(3): 506-26.

File, T. M., Jr. and J. S. Tan (1992). "Community-acquired pneumonia. The changing picture." Postgrad Med 92(8): 197-8, 201-8, 211-4.

Fine, M. J., J. J. Orloff, et al. (1990). "Prognosis of patients hospitalized with community-acquired pneumonia." Am J Med 88(5N): 1N-8N.

Fischer, G., H. Bang, et al. (1992). "Mip protein of *Legionella pneumophila* exhibits peptidyl-prolyl-cis/trans isomerase (PPlase) activity." Mol Microbiol 6(10): 1375-83.

Flieger, A., S. Gong, et al. (2000a). "Novel phospholipase A activity secreted by *Legionella* species." J Bacteriol 182(5): 1321-7.

Flieger, A., S. Gong, et al. (2000b). "Phospholipase A secreted by *Legionella pneumophila* destroys alveolar surfactant phopholipids." FEMS Microbiol Lett 188: 129-133.

Flieger, A., S. Gong, et al. (2001). "Novel lysophospholipase A secreted by *Legionella pneumophila*." J Bacteriol 183(6): 2121-4.

Fraser, D. W., T. R. Tsai, et al. (1977). "Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia." N Engl J Med 297(22): 1189-97.

Friedman, F., R. Widen, et al. (1984a). "Lymphoid cell blastogenesis as an in vitro indicator of cellular immunity to *Legionella pneumophila* antigens." J Clin Microbiol 19(6): 834-7.

Friedman, H., R. Widen, et al. (1984b). "*Legionella pneumophila*-induced blastogenesis of murine lymphoid cells in vitro." Infect Immun 43(1): 314-9.

Friedman, H., Y. Yamamoto, et al. (2002). "*Legionella pneumophila* pathogenesis and immunity." Semin Pediatr Infect Dis 13(4): 273-9.

Friedman, M., T. W. Klein, et al. (1983). "*Legionella pneumophila*-induced suppression of macrophage spreading in vitro." Infect Immun 42(1): 421-3.

Fumarola, D. and S. Pece (1992). "Multiple organ involvement by *Legionella pneumophila*: pathogenic mechanisms." Eur J Epidemiol 8(1): 142-3.

Funai, N., Y. Shimamoto, et al. (1997). "Marked inhibition of the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in monocytes isolated from carriers of human T lymphotrophic virus type I." J Leukoc Biol 61(2): 133-40.

Gao, L. Y. and Y. Abu Kwaik (1999). "Apoptosis in macrophages and alveolar epithelial cells during early stages of infection by *Legionella pneumophila* and its role in cytopathogenicity." Infect Immun 67(2): 862-70.

Gao, L. Y., O. S. Harb, et al. (1997). "Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa." Infect Immun 65(11): 4738-46.

Gao, L. Y., O. S. Harb, et al. (1998). "Identification of macrophage-specific infectivity loci (mil) of *Legionella pneumophila* that are not required for infectivity of protozoa." Infect Immun 66(3): 883-92.

Gao, L. Y. and Y. A. Kwaik (2000). "The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba polyphaga* by *Legionella pneumophila*." Environ Microbiol 2(1): 79-90.

Garduno, R. A., E. Garduno, et al. (1998). "Surface-associated hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model." Infect Immun 66(10): 4602-10.

Gebran, S. J., C. Newton, et al. (1994a). "Macrophage permissiveness for *Legionella pneumophila* growth modulated by iron." Infect Immun 62(2): 564-8.

Gebran, S. J., Y. Yamamoto, et al. (1994b). "Differences and similarities in permissive A/J versus non-permissive BALB/c murine macrophages infected with *Legionella pneumophila*: the role of iron." FEMS Immunol Med Microbiol 9(1): 7-14.

Gebran, S. J., Y. Yamamoto, et al. (1994c). "Inhibition of *Legionella pneumophila* growth by gamma interferon in permissive A/J mouse macrophages: role of reactive oxygen species, nitric oxide, tryptophan, and iron(III)." Infect Immun 62(8): 3197-205.

Gilbert, M. J., S. R. Riddell, et al. (1996). "Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product." Nature 383(6602): 720-2.

Glick, T. H., M. B. Gregg, et al. (1978). "Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects." Am J Epidemiol 107(2): 149-60.

Gomez-Lus, P., B. S. Fields, et al. (1993). "Comparison of arbitrarily primed polymerase chain reaction, ribotyping, and monoclonal antibody analysis for subtyping *Legionella pneumophila* serogroup 1." J Clin Microbiol 31(7): 1940-2.

Gupta, S. K., T. F. Imperiale, et al. (2001). "Evaluation of the Winthrop-University Hospital criteria to identify *Legionella pneumonia*." Chest 120(4): 1064-71.

Hagele, S., J. Hacker, et al. (1998). "*Legionella pneumophila* kills human phagocytes but not protozoan host cells by inducing apoptotic cell death." FEMS Microbiol Lett 169(1): 51-8.

Hales, L. M. and H. A. Shuman (1999). "*Legionella pneumophila* contains a type II general secretion pathway required for growth in amoebae as well as for secretion of the Msp protease." Infect Immun 67(7): 3662-6.

Hammer, B. K. and M. S. Swanson (1999). "Co-ordination of *Legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp." Mol Microbiol 33(4): 721-31.

Harb, O. S. and Y. Abu Kwaik (2000). "Characterization of a macrophage-specific infectivity locus (milA) of *Legionella pneumophila*." Infect Immun 68(1): 368-76.

Harding, C. V. and R. Song (1994). "Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules." J Immunol 153(11): 4925-33.

Harrison, T. G. and A. G. Taylor (1982). "A rapid microagglutination test for the diagnosis of *Legionella pneumophila* (serogroup 1) infection." J Clin Pathol 35: 1028-1031.

Harrison, T. G. and A. G. Taylor (1988). "Timing of seroconversion in Legionnaires' disease." Lancet 2(8614): 795.

Hart, C. A. and T. Makin (1991). "*Legionella* in hospitals: a review." J Hosp Infect 18 Suppl A: 481-9.

Heath, C. H., D. I. Grove, et al. (1996a). "Delay in appropriate therapy of *Legionella* pneumonia associated with increased mortality." Eur J Clin Microbiol Infect Dis 15(4): 286-90.

Heath, L., C. Chrisp, et al. (1996b). "Effector mechanisms responsible for gamma interferon-mediated host resistance to *Legionella pneumophila* lung infection: the role of endogenous nitric oxide differs in susceptible and resistant murine hosts." Infect Immun 64(12): 5151-60.

Hebert, G. A., A. G. Steigerwalt, et al. (1980). "*Legionella micdadei* species nova: classification of a third species of *Legionella* associated with human pneumonia." Curr Microbiol 3: 255-257.

Helbig, J. H., S. Bernander, et al. (2002). "Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups." Eur J Clin Microbiol Infect Dis 21(10): 710-6.

Helbig, J. H., P. C. Luck, et al. (2001). "Immunolocalization of the Mip protein of intracellularly and extracellularly grown *Legionella pneumophila*." Lett Appl Microbiol 32(2): 83-8.

Hell, W., A. Essig, et al. (1993). "Cleavage of tumor necrosis factor-alpha by *Legionella* exoprotease." Apmis 101(2): 120-6.

Henney, C. S., K. Kuribayashi, et al. (1981). "Interleukin-2 augments natural killer cell activity." Nature 291(5813): 335-8.

Hervas, J. A., P. Lopez, et al. (1988). "Multiple organ system failure in an infant with *Legionella* infection." Pediatr Infect Dis J 7(9): 671-3.

Hill, A., P. Jugovic, et al. (1995). "Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity." Nature 375(6530): 411-5.

Hoge, C. W. and R. F. Breiman (1991). "Advances in the epidemiology and control of *Legionella* infections." Epidemiol Rev 13: 329-40.

Hooper, T. L., F. K. Gould, et al. (1988). "Ciprofloxacin: a preferred treatment for *Legionella* infections in patients receiving cyclosporin A." J Antimicrob Chemother 22(6): 952-3.

Horwitz, M. A. (1983a). "Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes." J Exp Med 158(4): 1319-31.

Horwitz, M. A. (1983b). "The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes." J Exp Med 158(6): 2108-26.

Horwitz, M. A. (1984). "Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil." Cell 36(1): 27-33.

Horwitz, M. A. (1992). "Interactions between macrophages and *Legionella pneumophila*." Curr Top Microbiol Immunol 181: 265-82.

Horwitz, M. A. and F. R. Maxfield (1984). "*Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes." J Cell Biol 99(6): 1936-43.

Horwitz, M. A. and S. C. Silverstein (1980). "Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiples intracellularly in human monocytes." J Clin Invest 66(3): 441-50.

Horwitz, M. A. and S. C. Silverstein (1981). "Interaction of the legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) with human phagocytes. II. Antibody promotes binding of *L. pneumophila* to monocytes but does not inhibit intracellular multiplication." J Exp Med 153(2): 398-406.

Horwitz, M. A. and S. C. Silverstein (1983). "Intracellular multiplication of Legionnaires' disease bacteria (*Legionella pneumophila*) in human monocytes is reversibly inhibited by erythromycin and rifampin." J Clin Invest 71(1): 15-26.

Hunter, C. A., C. S. Subauste, et al. (1994). "Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha." Infect Immun 62(7): 2818-24.

Ismail, N., J. P. Olano, et al. (2002). "Current status of immune mechanisms of killing of intracellular microorganisms." FEMS Microbiol Lett 207(2): 111-20.

Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." Annu Rev Immunol 20: 197-216.

Janeway, C. j. (2002). Immunologie, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg - Berlin.

Jensen, W. A., R. M. Rose, et al. (1988). "Cytokine activation of antibacterial activity in human pulmonary macrophages: comparison of recombinant interferon-gamma and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." Cell Immunol 117(2): 369-77.

Jensen, W. A., R. M. Rose, et al. (1987). "In vitro activation of the antibacterial activity of human pulmonary macrophages by recombinant gamma interferon." J Infect Dis 155(3): 574-7.

Johnson, J. T., V. L. Yu, et al. (1985). "Nosocomial legionellosis in surgical patients with head-and-neck cancer: implications for epidemiological reservoir and mode of transmission." Lancet 2(8450): 298-300.

Joseph, C. (2002). Surveillance of Legionnaires' disease in Europe. Washington,DC, ASM Press.

Kagan, J. C. and C. R. Roy (2002). "*Legionella* phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites." Nat Cell Biol 4(12): 945-54.

Kashuba, A. D. and C. H. Ballow (1996). "*Legionella* urinary antigen testing: potential impact on diagnosis and antibiotic therapy." Diagn Microbiol Infect Dis 24(3): 129-39.

Katz, S. M. and J. M. Hammel (1987). "The effect of drying, heat, and pH on the survival of *Legionella pneumophila*." Ann Clin Lab Sci 17(3): 150-6.

Kayser, F., K. Bienz, et al. (1998). Medizinische Mikrobiologie, Thieme-Verlag.

Kerkau, T., I. Bacik, et al. (1997). "The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpu protein interferes with an early step in the biosynthesis of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules." J Exp Med 185(7): 1295-305.

Kilvington, S. and J. Price (1990). "Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure." J Appl Bacteriol 68(5): 519-25.

Kirby, B. D., K. M. Snyder, et al. (1980). "Legionnaires' disease: report of sixty-five nosocomially acquired cases of review of the literature." Medicine (Baltimore) 59(3): 188-205.

Kirby, J. E., J. P. Vogel, et al. (1998). "Evidence for pore-forming ability by *Legionella pneumophila*." Mol Microbiol 27(2): 323-36.

Kitsukawa, K., A. Nakamoto, et al. (1995). "Interferon-gamma (IFN-gamma) production by human T lymphocytes upon *Legionella pneumophila* stimulation in vitro." Clin Exp Immunol 99(1): 76-81.

Klein, J. (1975). "Many questions (and almost no answers) about the phylogenetic origin of the major histocompatibility complex." Adv Exp Med Biol 64: 467-78.

Kool, J. L., J. C. Carpenter, et al. (1999). "Effect of monochloramine disinfection of municipal drinking water on risk of nosocomial Legionnaires' disease." Lancet 353(9149): 272-7.

Kramer, M. H. and T. E. Ford (1994). "Legionellosis: ecological factors of an environmentally 'new' disease." Zentralbl Hyg Umweltmed 195(5-6): 470-82.

Kronenberg, M. and L. Gapin (2002). "The unconventional lifestyle of NKT cells." Nat Rev Immunol 2(8): 557-68.

Lettinga, K. D., S. Weijer, et al. (2003). "Reduced interferon-gamma release in patients recovered from Legionnaires' disease." Thorax 58(1): 63-7.

Levitskaya, J., M. Coram, et al. (1995). "Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1." Nature 375(6533): 685-8.

Liles, M. R., P. H. Edelstein, et al. (1999). "The prepilin peptidase is required for protein secretion by and the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*." Mol Microbiol 31(3): 959-70.

Liles, M. R., T. A. Scheel, et al. (2000). "Discovery of a nonclassical siderophore, legiobactin, produced by strains of *Legionella pneumophila*." J Bacteriol 182(3): 749-57.

Liles, M. R., V. K. Viswanathan, et al. (1998). "Identification and temperature regulation of *Legionella pneumophila* genes involved in type IV pilus biogenesis and type II protein secretion." Infect Immun 66(4): 1776-82.

Locksley, R. M., R. F. Jacobs, et al. (1982). "Susceptibility of *Legionella pneumophila* to oxygen-dependent microbicidal systems." J Immunol 129(5): 2192-7.

Louis, J., H. Himmelrich, et al. (1998). "Regulation of protective immunity against *Leishmania major* in mice." Curr Opin Immunol 10(4): 459-64.

Lozzio, C. B. and B. B. Lozzio (1975). "Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome." Blood 45(3): 321-34.

Luck, P. C., J. H. Helbig, et al. (1989). "Isolation of *Legionella pneumophila* serogroup 3 from pericardial fluid in a case of pericarditis." Infection 17(6): 388-90.

Luder, C. G., T. Lang, et al. (1998). "Down-regulation of MHC class II molecules and inability to up-regulate class I molecules in murine macrophages after infection with *Toxoplasma gondii*." Clin Exp Immunol 112(2): 308-16.

Lüneberg, E., B. Mayer, et al. (2001). "Chromosmal insertion and excision of a 30 kb unstable genetic element is responsible for phase variation of lipopolysaccharide and other virulence determinants in *Legionella pneumophila*." Mol Microbiol 39: 1259-1271.

Lüneberg, E., U. Zähringer, et al. (1998). "Phase-variable expression of lipopolysaccharide contributes to the virulence of *Legionella pneumophila*." J Exp Med 188: 49-60.

Macfarlane, J. T., R. G. Finch, et al. (1981). "Pittsburgh pneumonia agent and legionellosis in Nottingham." Br Med J (Clin Res Ed) 283(6301): 1222.

Macfarlane, J. T., A. C. Miller, et al. (1984). "Comparative radiographic features of community acquired Legionnaires' disease, pneumococcal pneumonia, *mycoplasma pneumonia*, and psittacosis." Thorax 39(1): 28-33.

Mackenzie, C. (1987). "Communication disorders in Legionnaires' disease." Br J Disord Commun 22(3): 253-62.

Maksymowych, W. P. and K. P. Kane (2000). "Bacterial modulation of antigen processing and presentation." Microbes Infect 2(2): 199-211.

Mandelboim, O., H. T. Reyburn, et al. (1996). "Protection from lysis by natural killer cells of group 1 and 2 specificity is mediated by residue 80 in human histocompatibility leukocyte antigen C alleles and also occurs with empty major histocompatibility complex molecules." J Exp Med 184(3): 913-22.

Marra, A., S. J. Blander, et al. (1992). "Identification of a *Legionella pneumophila* locus required for intracellular multiplication in human macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A 89(20): 9607-11.

Marra, A., M. A. Horwitz, et al. (1990). "The HL-60 model for the interaction of human macrophages with the Legionnaires' disease bacterium." J Immunol 144(7): 2738-44.

Marrie, T. J., S. Tyler, et al. (1999). "Analysis of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates by pulsed-field gel electrophoresis." J Clin Microbiol 37(1): 251-4.

Marston, B. J., H. B. Lipman, et al. (1994). "Surveillance for Legionnaires' disease. Risk factors for morbidity and mortality." Arch Intern Med 154(21): 2417-22.

Marston, B. J., J. F. Plouffe, et al. (1997). "Incidence of community-acquired pneumonia requiring hospitalization. Results of a population-based active surveillance Study in Ohio. The Community-Based Pneumonia Incidence Study Group." Arch Intern Med 157(15): 1709-18.

Matsiota-Bernard, P., C. Lefebre, et al. (1993). "Involvement of tumor necrosis factor alpha in intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in human monocytes." Infect Immun 61(12): 4980-3.

Matsunaga, K., T. W. Klein, et al. (2001). "*Legionella pneumophila* suppresses interleukin-12 production by macrophages." Infect Immun 69(3): 1929-33.

Matsuzaki, M., Y. Shimamoto, et al. (1995). "Intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in HL-60 cells functionally differentiated in response to 22-oxacalcitriol." J Leukoc Biol 57(4): 574-80.

Mayock, R., B. Skale, et al. (1983). "*Legionella pneumophila* pericarditis proved by culture of pericardial fluid." Am J Med 75(3): 534-6.

McCarthy, D. and M. Macay (2001). Cytometric Analysis of Cell Phenotyp and Function, Oxford University Press.

McDade, J. E., C. C. Shepard, et al. (1977). "Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease." N Engl J Med 297(22): 1197-203.

McHugh, S. L., C. A. Newton, et al. (2000). "Tumor necrosis factor induces resistance of macrophages to *Legionella pneumophila* infection." Proc Soc Exp Biol Med 224(3): 191-6.

McKinney, R. M., R. K. Porschen, et al. (1981). "*Legionella longbeachae* species nova, another etiologic agent of human pneumonia." Ann Intern Med 94(6): 739-43.

Mendes, R., K. V. Bromelow, et al. (2000). "Flow Cytometric Visualization of Cytokine Production by CD3-CD56+ NK Cells and CD3+ and CD56+ NK-T Cells in Whole Blood." Cytometry 39: 72-78.

Meyer, R. D. (1983). "*Legionella* infections: a review of five years of research." Rev Infect Dis 5(2): 258-78.

Mintz, C. S., B. S. Fields, et al. (1992). "Isolation and characterization of a conjugative plasmid from *Legionella pneumophila*." J Gen Microbiol 138 (Pt 7): 1379-86.

Mintz, C. S., R. D. Miller, et al. (1993). "*Legionella pneumophila* protease inactivates interleukin-2 and cleaves CD4 on human T cells." Infect Immun 61(8): 3416-21.

Monforte, R., R. Estruch, et al. (1988). "Delayed seroconversion in Legionnaire's disease." Lancet 2(8609): 513.

Monforte, R., F. Marco, et al. (1989). "Multiple organ involvement by *Legionella pneumophila* in a fatal case of Legionnaires' disease." J Infect Dis 159(4): 809.

Muder, R. R. and V. L. Yu (2002). "Infection due to *Legionella* species other than *L. pneumophila*." Clin Infect Dis 35(8): 990-8.

Muder, R. R., V. L. Yu, et al. (1983). "Nosocomial Legionnaires' disease uncovered in a prospective pneumonia study." Jama 249(23): 3184-8.

Nagai, H., J. C. Kagan, et al. (2002). "A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on *Legionella* phagosomes." Science 295(5555): 679-82.

Nagai, H. and C. R. Roy (2001). "The DotA protein from *Legionella pneumophila* is secreted by a novel process that requires the Dot/Icm transporter." Embo J 20(21): 5962-70.

Nash, T. W., D. M. Libby, et al. (1988). "IFN-gamma-activated human alveolar macrophages inhibit the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*." J Immunol 140(11): 3978-81.

Natarajan, K., N. Dimasi, et al. (2002). "Structure and function of natural killer cell receptors: multiple molecular solutions to self, nonself discrimination." Annu Rev Immunol 20: 853-85.

Neild, A. L. and C. R. Roy (2003). "*Legionella* reveal dendritic cell functions that facilitate selection of antigens for MHC class II presentation." Immunity 18(6): 813-23.

Nelson, D. P., E. R. Rensimer, et al. (1984). "Cardiac legionellosis." Chest 86(6): 807-8.

Neumeister, B. (1996). "Legionelleninfektionen- Epidmiologie, Diagnostik, Klinik und Pathogenese." Clin Lab 42: 715-729.

Neumeister, B., V. Bach, et al. (2001). "Induction of iNOS in human monocytes infected with different *Legionella* species." FEMS Microbiol Lett 202(1): 31-8.

Neumeister, B., M. Faigle, et al. (2002). "*Legionella pneumophila* induces apoptosis via the mitochondrial death pathway." Microbiology 148(Pt 11): 3639-50.

Neumeister, B., M. Faigle, et al. (1998a). "Low endotoxic potential of *Legionella pneumophila* lipopolysaccharide due to failure of interaction with the monocyte lipopolysaccharide receptor CD14." Infect Immun 66(9): 4151-7.

Neumeister, B., A. Kleihauer, et al. (1998b). "Induction of cytokines and expression of surface receptors in Mono Mac 6 cells after infection with different *Legionella* species." Apmis 106(2): 319-33.

Neumeister, B., S. Schoniger, et al. (1997). "Multiplication of different *Legionella* species in Mono Mac 6 cells and in *Acanthamoeba castellanii*." Appl Environ Microbiol 63(4): 1219-24.

Nguyen, M. H., J. E. Stout, et al. (1991a). "Legionellosis." Infect Dis Clin North Am 5(3): 561-84.

Nguyen, M. L. and V. L. Yu (1991b). "*Legionella* infection." Clin Chest Med 12(2): 257-68.

O'Connell, W. A., L. Dhand, et al. (1996). "Infection of macrophage-like cells by *Legionella* species that have not been associated with disease." Infect Immun 64(10): 4381-4.

Okamura, H., S. Kashiwamura, et al. (1998). "Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18." Curr Opin Immunol 10(3): 259-64.

Oliva, A., A. L. Kinter, et al. (1998). "Natural killer cells from human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals are an important source of CC-chemokines and suppress HIV-1 entry and replication in vitro." J Clin Invest 102(1): 223-31.

Park, D. R. and S. J. Skerrett (1996). "IL-10 enhances the growth of *Legionella pneumophila* in human mononuclear phagocytes and reverses the protective effect of IFN-gamma: differential responses of blood monocytes and alveolar macrophages." J Immunol 157(6): 2528-38.

Park, D. R. and S. J. Skerrett (2000). Cytokines in *Legionella pneumophila* Infections. Cytokins in pulmonary disease:infection and inflammation. S. Nelson. New York, Karger. **141:** 155-188.

Payne, N. R. and M. A. Horwitz (1987). "Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors." J Exp Med 166(5): 1377-89.

Pedro-Botet, M. L., Z. Velaseca, et al. (2001). "Erythromycin vs fluoroquinolones in the treatment of Legionnaires' disease." 41st ICAAC; Chicago.

Petitjean, F., E. Dournon, et al. (1990). "Isolation, purification and partial analysis of the lipopolysaccharide antigenic determinant recognized by a monoclonal antibody to *Legionella pneumophila* serogroup 1." Res Microbiol 141(9): 1077-94.

Piguet, V., O. Schwartz, et al. (1999). "The downregulation of CD4 and MHC-I by primate lentiviruses: a paradigm for the modulation of cell surface receptors." Immunol Rev 168: 51-63.

Plouffe, J. F. and I. M. Baird (1981). "Lymphocyte transformation to *Legionella pneumophila*." J Clin Lab Immunol 5(3): 149-52.

Plouffe, J. F. and I. M. Baird (1982). "Lymphocyte blastogenic responses to *L. pneumophila* in acute Legionellosis." J Clin Lab Immunol 7(1): 43-4.

Polesky, A. H., J. T. Ross, et al. (2001). "Identification of *Legionella pneumophila* genes important for infection of amoebas by signature-tagged mutagenesis." Infect Immun 69(2): 977-87.

Pruckler, J. M., L. A. Mermel, et al. (1995). "Comparison of *Legionella pneumophila* isolates by arbitrarily primed PCR and pulsed-field gel electrophoresis: analysis from seven epidemic investigations." J Clin Microbiol 33(11): 2872-5.

Rechnitzer, C. and J. Blom (1989a). "Engulfment of the Philadelphia strain of *Legionella pneumophila* within pseudopod coils in human phagocytes. Comparison with other *Legionella* strains and species." Apmis 97(2): 105-14.

Rechnitzer, C., M. Diamant, et al. (1989b). "Inhibition of human natural killer cell activity by *Legionella pneumophila* protease." Eur J Clin Microbiol Infect Dis 8(11): 989-92.

Reiner, N. E., W. Ng, et al. (1987). "Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products." J Immunol 138(6): 1926-32.

Resnick, M., N. Roguel, et al. (1988). "Lysis of murine macrophages infected with intracellular pathogens by interleukin 2-activated killer (LAK) cells in vitro." Cell Immunol 113(1): 214-9.

Reyburn, H. T., O. Mandelboim, et al. (1997). "The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells." Nature 386(6624): 514-7.

Rigby, E. W., J. F. Plouffe, et al. (1997). "Stability of *Legionella* urinary antigens over time." Diagn Microbiol Infect Dis 28(1): 1-3.

Robertson, M. J., M. A. Caligiuri, et al. (1990). "Human natural killer cell adhesion molecules. Differential expression after activation and participation in cytolysis." J Immunol 145(10): 3194-201.

Robey, M., W. O'Connell, et al. (2001). "Identification of *Legionella pneumophila* rcp, a pagP-like gene that confers resistance to cationic antimicrobial peptides and promotes intracellular infection." Infect Immun 69(7): 4276-86.

Romani, N., D. Reider, et al. (1996). "Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability." J Immunol Methods 196(2): 137-51.

Rossier, O. and N. P. Cianciotto (2001). "Type II protein secretion is a subset of the PilD-dependent processes that facilitate intracellular infection by *Legionella pneumophila*." Infect Immun 69(4): 2092-8.

Rowbotham, T. J. (1993). "*Legionella*-like amoebal pathogens." J.M. Barbaree, R.F.Breimann and A.P.Dufour (ed.), *Legionella*: current status and emerging perspectives. American Society for Microbiology, Washington, D.C.: 137-140.

Roy, C. R. and L. G. Tilney (2002). "The road less traveled: transport of *Legionella* to the endoplasmic reticulum." J Cell Biol 158(3): 415-9.

Ruckdeschel, G. and W. Ehret (1993). "[*Legionella* infection]." Ergeb Inn Med Kinderheilkd 61: 207-302.

Ruehlemann, S. A. and G. R. Crawford (1996). "Panic in the potting shed. The association between *Legionella longbeachae* serogroup 1 and potting soils in Australia." Med J Aust 164(1): 36-8.

Ruf, B., D. Schurmann, et al. (1989). "The incidence of *Legionella* pneumonia: a 1-year prospective study in a large community hospital." Lung 167(1): 11-22.

Sabria, M. and V. L. Yu (2002). "Hospital-acquired legionellosis: solutions for a preventable infection." Lancet Infect Dis 2(6): 368-73.

Salins, S., C. Newton, et al. (2001). "Differential induction of gamma interferon in *Legionella pneumophila*-infected macrophages from BALB/c and A/J mice." Infect Immun 69(6): 3605-10.

Scharton, T. M. and P. Scott (1993). "Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice." J Exp Med 178(2): 567-77.

Schneemann, M., G. Schoedon, et al. (1993). "Nitric oxide synthase is not a constituent of the antimicrobial armature of human mononuclear phagocytes." J Infect Dis 167(6): 1358-63.

Schoenen, D., R. Schulze-Robbecke, et al. (1988). "[Microbial contamination of water by pipe and tubing material. 2. Growth of *Legionella pneumophila*]." Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [B] 186(4): 326-32.

Schoonmaker, D., T. Heimberger, et al. (1992). "Comparison of ribotyping and restriction enzyme analysis using pulsed-field gel electrophoresis for distinguishing *Legionella pneumophila* isolates obtained during a nosocomial outbreak." J Clin Microbiol 30(6): 1491-8.

Schuller, S., S. Kugler, et al. (1998). "Suppression of major histocompatibility complex class I and class II gene expression in *Listeria monocytogenes*-infected murine macrophages." FEMS Immunol Med Microbiol 20(4): 289-99.

Selander, R. K., R. M. McKinney, et al. (1985). "Genetic structure of populations of *Legionella pneumophila*." J Bacteriol 163(3): 1021-37.

Shinozawa, Y., T. Matsumoto, et al. (2002). "Role of interferon-gamma in inflammatory responses in murine respiratory infection with *Legionella pneumophila*." J Med Microbiol 51(3): 225-30.

Skerrett, S. J., G. J. Bagby, et al. (1997). "Antibody-mediated depletion of tumor necrosis factor-alpha impairs pulmonary host defenses to *Legionella pneumophila*." J Infect Dis 176(4): 1019-28.

Skerrett, S. J. and T. R. Martin (1992). "Recombinant murine interferon-gamma reversibly activates rat alveolar macrophages to kill *Legionella pneumophila*." J Infect Dis 166(6): 1354-61.

Skerrett, S. J. and T. R. Martin (1994). "Intratracheal interferon-gamma augments pulmonary defenses in experimental legionellosis." Am J Respir Crit Care Med 149(1): 50-8.

Skerrett, S. J. and T. R. Martin (1996a). "Roles for tumor necrosis factor alpha and nitric oxide in resistance of rat alveolar macrophages to *Legionella pneumophila*." Infect Immun 64(8): 3236-43.

Skerrett, S. J. and C. B. Wilson (1996b). "Transgenic mice lacking interferon-gamma fail to clear *Legionella pneumophila* stimulation in vitro." Am J Respir Crit Care Med 153: A694.

Smith, K. A. (1988). "Interleukin-2: inception, impact, and implications." Science 240(4856): 1169-76.

Smith-Somerville, H. E., V. B. Huryn, et al. (1991). "Survival of *Legionella pneumophila* in the cold-water ciliate *Tetrahymena vorax*." Appl Environ Microbiol 57(9): 2742-9.

Steele, T. W. (1989). "Legionnaires' disease in South Australia, 1979-1988." Med J Aust 151(6): 322, 325-6, 328.

Stone, B. J. and Y. Abu Kwaik (1998). "Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells." Infect Immun 66(4): 1768-75.

Stout, J. E., Y. E. Lin, et al. (2000). "Survey of hospitals using copper-silver ionization for control of *Legionella*." 5th International Conference on *Legionella*; Ulm, Germany.

Sturgill-Koszycki, S. and M. S. Swanson (2000). "*Legionella pneumophila* replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles." J Exp Med 192(9): 1261-72.

Summersgill, J. T., L. A. Powell, et al. (1992). "Killing of *Legionella pneumophila* by nitric oxide in gamma-interferon-activated macrophages." J Leukoc Biol 52(6): 625-9.

Susa, M., J. Hacker, et al. (1996). "De novo synthesis of *Legionella pneumophila* antigens during intracellular growth in phagocytic cells." Infect Immun 64(5): 1679-84.

Swanson, M. S. and B. K. Hammer (2000). "*Legionella pneumophila* pathogesesis: a fateful journey from *amoebae* to macrophages." Annu Rev Microbiol 54: 567-613.

Swanson, M. S. and R. R. Isberg (1995). "Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic reticulum." Infect Immun 63(9): 3609-20.

Tan, M. J., J. S. Tan, et al. (2002). "Legionnaires disease with bacteremic coinfection." Clin Infect Dis 35(5): 533-9.

Tateda, K., J. C. Deng, et al. (2003). "Hyperoxia mediates acute lung injury and increased lethality in murine *Legionella pneumonia*: the role of apoptosis." J Immunol 170(8): 4209-16.

Tatlock, H. (1944). "A Rickettsio-like organism recovered from guinea pigs." Proc Soc Exp Biol Med 57: 95-99.

Thomas, D. L., L. M. Mundy, et al. (1993). "Hot tub legionellosis. Legionnaires' disease and Pontiac fever after a point-source exposure to *Legionella pneumophila*." Arch Intern Med 153(22): 2597-9.

Tilney, L. G., O. S. Harb, et al. (2001). "How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane." J Cell Sci 114(Pt 24): 4637-50.

Tomazin, R., A. B. Hill, et al. (1996). "Stable binding of the herpes simplex virus ICP47 protein to the peptide binding site of TAP." Embo J 15(13): 3256-66.

Trinchieri, G. (1989). "Biology of natural killer cells." Adv Immunol 47: 187-376.

Tripp, C. S., S. F. Wolf, et al. (1993). "Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist." Proc Natl Acad Sci U S A 90(8): 3725-9.

Tyndall, R. L. and E. L. Domingue (1982). "Cocultivation of *Legionella pneumophila* and free-living *amoebae*." Appl Environ Microbiol 44(4): 954-9.

Uberti, J., F. Martilotti, et al. (1992). "Human lymphokine activated killer (LAK) cells suppress generation of allospecific cytotoxic T cells: implications for use of LAK cells to prevent graft-versus-host disease in allogeneic bone marrow transplantation." Blood 79(1): 261-8.

Valsangiocomo, C., F. Baggi, et al. (1995). "Use of amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Legionella pneumophila* and application to epidemiological studies." J Clin Microbiol 33: 1716-1719.

Van Belkum, A., H. Maas, et al. (1996). "Serotyping, ribotyping, PCR-mediated ribosomal 16S-23S spacer analysis and arbitrarily primed PCR for epidemiological studies on *Legionella pneumophila*." Res Microbiol 147(5): 405-13.

Venkataraman, C., B. J. Haack, et al. (1997). "Identification of a Gal/GalNAc lectin in the protozoan Hartmannella vermiformis as a potential receptor for attachment and invasion by the Legionnaires' disease bacterium." J Exp Med 186(4): 537-47.

Virchow, J. C. and H. Just (1995). "Diagnose und Therapie der Legionärs-Pneumonie." Intensivmed(32): 397-408.

Viswanathan, V. K., S. Kurtz, et al. (2002). "The cytochrome c maturation locus of *Legionella pneumophila* promotes iron assimilation and intracellular infection and contains a strain-specific insertion sequence element." Infect Immun 70(4): 1842-52.

Vogel, J. P., H. L. Andrews, et al. (1998). "Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*." Science 279(5352): 873-6.

Vouldoukis, I., V. Riveros-Moreno, et al. (1995). "The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxid induced after ligation of the FceRII/CD23 surface antigen." Proc Natl Acad Sci U S A 92: 7804-08.

Wadowsky, R. M., R. Wolford, et al. (1985). "Effect of temperature, pH, and oxygen level on the multiplication of naturally occurring *Legionella pneumophila* in potable water." Appl Environ Microbiol 49(5): 1197-205.

Weeratna, R., D. A. Stamler, et al. (1994). "Human and guinea pig immune responses to *Legionella pneumophila* protein antigens OmpS and Hsp60." Infect Immun 62(8): 3454-62.

Wei, X. Q., I. G. Charles, et al. (1995). "Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase." Nature 375(6530): 408-11.

Weisse, A. B. (1992). "A plague in Philadelphia. The story of Legionnaires' disease." Hosp Pract (Off Ed) 27(6): 151-4, 157, 161-8 passim.

Weissgerber, P., M. Faigle, et al. (2003). "Investigation of mechanisms involved in phagocytosis of *Legionella pneumophila* by human cells." FEMS Microbiol Lett 219(2): 173-9.

Whitaker Dowling, P., J. N. Dowling, et al. (1986). "Interferon inhibits the growth of *Legionella micdadei* in mouse L cells." J Interferon Res 6(2): 107-14.

Wiertz, E. J., T. R. Jones, et al. (1996a). "The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol." Cell 84(5): 769-79.

Wiertz, E. J., D. Tortorella, et al. (1996b). "Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction." Nature 384(6608): 432-8.

Wilkinson, H. W., D. D. Cruce, et al. (1981). "Validation of *Legionella pneumophila* indirect immunofluorescence assay with epidemic sera." J Clin Microbiol 13(1): 139-46.

Wilkinson, H. W., B. J. Fikes, et al. (1979). "Indirect immunofluorescence test for serodiagnosis of Legionnaires disease: evidence for serogroup diversity of Legionnaires disease bacterial antigens and for multiple specificity of human antibodies." J Clin Microbiol 9(3): 379-83.

Williams, A. and M. S. Lever (1995). "Characterisation of *Legionella pneumophila* antigen in urine of guinea pigs and humans with Legionnaires' disease." J Infect 30(1): 13-6.

Winn, W. C., Jr. (1988). "Legionnaires disease: historical perspective." Clin Microbiol Rev 1(1): 60-81.

Wynckel, A., O. Toupance, et al. (1991). "[Treatment of legionellosis with ofloxacin in kidney transplanted patients. Lack of interaction with cyclosporin A]." Presse Med 20(7): 291-3.

Yamamoto, Y., T. W. Klein, et al. (1996). "Immunoregulatory role of nitric oxide in *Legionella pneumophila*-infected macrophages." Cell Immunol 171(2): 231-9.

Yamamoto, Y., T. W. Klein, et al. (1992). "Infection of macrophages with *Legionella pneumophila* induces phosphorylation of a 76-kilodalton protein." Infect Immun 60(8): 3452-5.

Yokoyama, W. M. and W. E. Seaman (1993). "The Ly-49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells: the NK gene complex." Annu Rev Immunol 11: 613-35.

York, I. A., C. Roop, et al. (1994). "A cytosolic herpes simplex virus protein inhibits antigen presentation to CD8+ T lymphocytes." Cell 77(4): 525-35.

Yoshida, S., Y. Mizuguchi, et al. (1985). "Effects of tetracyclines on experimental *Legionella pneumophila* infection in guinea-pigs." J Antimicrob Chemother 16(2): 199-204.

Yoshimoto, T., K. Takeda, et al. (1998). "IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production." J Immunol 161(7): 3400-7.

Yu, V. L., T. R. Beam, Jr., et al. (1987). "Routine culturing for *Legionella* in the hospital environment may be a good idea: a three-hospital prospective study." Am J Med Sci 294(2): 97-9.

Yu, V. L., F. J. Kroboth, et al. (1982). "Legionnaires' disease: new clinical perspective from a prospective pneumonia study." Am J Med 73(3): 357-61.

Zhong, G., L. Liu, et al. (2000). "Degradation of transcription factor RFX5 during the inhibition of both constitutive and interferon gamma-inducible major histocompatibility complex class I expression in chlamydia-infected cells." J Exp Med 191(9): 1525-34.

7. Anhang-Wertetabellen

Alle Werte betreffen den Anteil IFN-γ-positiver NK-Zellen an der NK-Gesamtzellzahl.

Tab. 7.1: Vorversuche: Stimulierung von mit verschiedenen IL-2-Dosen aktivierten NK-Zellen mit K-562-Zellen

Vorversuch		0 U/ml	100 U/ml	250 U/ml	500 U/ml
0-1	Wert 1	0,84	31,76	37,49	30,6
	Wert 2	1,81	34,37	40,91	33,3
0-2	Wert 1	0,15	13,81	40,51	12,77
	Wert 2	0,19	14,5	39,61	12,77
0-3	Wert 1	0,83	18,03	22,35	20,73
	Wert 2	1,61	15,08	20,93	21,5
0-4	Wert 1	6,92	23,66	27,23	22,33
	Wert 2	6,61	23,33	27,02	24,89
MW		2,37	21,85	32,01	22,36
SD		2,78	7,91	8,48	7,38

Tab. 7.2: Vorversuche: Kinetik der IFN-γ-Produktion nach Koinkubation mit K-562 zu verschiedenen Zeitpunkten von 1-24 Stunden

Vorversuch		**1h**	**2h**	**4h**	**6h**	**8h**	**10h**	**12h**	**18h**	**24h**
0-5	Wert 1	17,96	34,41	32,13	27,04	26,94	23,68	23,43	18,35	13,96
	Wert 2	19,23	35,36	32,82	27,71	27,02	23,93	26,05	18,1	13,48
0-6	Wert 1	22,92	32,46	30,17	28,22	26,79	25,76	23,09	15,25	9,73
	Wert 2	22,38	29,99	27,98	28,27	27,04	24,28	22,31	15,36	8,82
0-7	Wert 1	12,24	38,32	41,93	33,53	35,36	31,83	23,59	23,66	20,81
	Wert 2	13,22	32,01	38,02	34,46	32,31	33,77	25,1	22,71	19,03
MW		17,99	33,76	33,84	29,87	29,24	27,21	23,93	18,91	14,31
SD		4,49	2,92	5,19	3,24	3,69	4,43	1,38	3,58	4,83

Tab. 7.3: Vorversuche: Stimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat

Vorversuche		PMA 5h
0-5	Wert 1	60,73
	Wert 2	66,56
0-6	Wert 1	76,71
	Wert 2	75,35
0-7	Wert 1	88,66
	Wert 2	93,09
MW		76,85
SD		10,50

Tab. 7.4: Vorversuche: IFN-γ-Sekretion nach Koinkubation mit 10:1-*L1P*-infizierten Monozyten

		+iMo10-48					+Mo
Vorversuche		2h	4h	6h	8h	10h	6h
0-8	Wert 1	-	43,36	45,66	45,73	42,14	15,45
	Wert 2	-	41,4	46,21	44,45	41,84	14,74
0-9	Wert 1	35,62	40,57	43,92	37,63	36,54	16,42
	Wert 2	34,67	38,07	44,72	37,95	32,5	17,04
0-10	Wert 1	35,65	43,99	44,4	45,73	40,59	13,14
	Wert 2	39,25	42,95	45,73	43,2	43,39	11,41
MW		36,30	41,72	45,11	42,45	39,50	14,70
SD		2,02	2,20	0,89	3,73	4,16	2,11

Tab. 7.5: Vollversuche 1-4:

Versuchsansatz	IL-2-Dosis in U/ml	t in h	Wert 1	Wert 2	Mittelwert	Standard-abwei-chung	Doppel-plot-kriterium Ja/nein
Versuch 1							
NK+Mo	250	1	9,91	9,52	9,72	0,28	ja
	250	2	14,27	13,88	14,08	0,28	
	250	4	13,02	12,82	12,92	0,14	
	250	6	14,14	14,70	14,42	0,40	
	250	8	13,01	12,78	12,90	0,16	
	250	10	11,15	10,93	11,04	0,16	
	250	12	8,99	9,81	9,40	0,58	
	250	18	8,84	7,19	8,02	1,17	
	250	24	7,18	5,11	6,15	1,46	
NK+iMo1-48	250	1	11,09	11,42	11,26	0,23	ja
	250	2	21,56	20,91	21,24	0,46	
	250	4	28,39	26,27	27,33	1,50	
	250	6	27,99	30,78	29,39	1,97	
	250	8	24,60	24,65	24,63	0,04	
	250	10	24,44	23,16	23,80	0,91	
	250	12	19,94	19,96	19,95	0,01	
	250	18	15,81	16,33	16,07	0,37	
	250	24	13,04	14,50	13,77	1,03	
NK+iMo10-48	250	1	10,13	10,83	10,48	0,49	ja
	250	2	23,48	23,28	23,38	0,14	
	250	4	32,52	34,33	33,43	1,28	
	250	6	27,38	29,53	28,46	1,52	
	250	8	22,91	22,32	22,62	0,42	
	250	10	20,37	20,46	20,42	0,06	
	250	12	20,89	18,28	19,59	1,85	
	250	18	11,82	11,35	12,59	1,08	
	250	24	10,04	8,64	9,34	0,99	
NK+PMA	250	5	88,34	78,40	83,37	7,03	-
NK+iMo1-24	250	6	25,69	-	25,69	-	-
NK+iMo st (10-48)	250	6	-	-	-	-	-
NK+K-562	250	6	38,20	44,93	41,57	4,76	-
NK+*L1P*100	250	6	10,86	11,22	11,04	0,25	-
NK+*L1P*10	250	6	7,44	7,01	7,23	0,30	-
Versuch 2							
NK+Mo	250	1	0,81	1,51	1,16	0,49	ja
	250	2	12,22	10,57	11,395	1,17	
	250	4	21,03	21,27	21,15	0,17	
	250	6	18,50	18,39	18,445	0,08	
	250	8	17,85	20,63	19,24	1,97	
	250	10	15,11	17,03	16,07	1,36	
	250	12	11,28	13,97	12,625	1,90	
	250	18	7,37	9,28	8,325	1,35	
	250	24	5,65	5,62	5,635	0,02	
NK+iMo1-48	250	1	1,06	1,2	1,13	0,10	ja
	250	2	14,1	13,38	13,74	0,51	

	250	4	24,51	25,76	25,135	0,88	
	250	6	28,43	26,73	27,58	1,20	
	250	8	31,35	29,94	30,645	1,00	
	250	10	26,25	25,06	25,655	0,84	
	250	12	21,75	21,95	21,85	0,14	
	250	18	13,22	13,99	13,605	0,54	
	250	24	9,5	10,75	10,125	0,88	
NK+iMo10-48	250	1	1,78	1,66	1,72	0,08	ja
	250	2	24,91	16,71	20,81	5,80	
	250	4	45,83	45,33	45,58	0,35	
	250	6	43,55	45,28	44,415	1,22	
	250	8	45,94	44,38	45,16	1,10	
	250	10	36,22	38,02	37,12	1,27	
	250	12	34,6	37,13	35,865	1,79	
	250	18	28,57	26,21	27,39	1,67	
	250	24	22,99	20,44	21,715	1,80	
NK+PMA	250	5	88,1	87,93	88,015	0,12	-
NK+iMo1-24	250	6	15,79	15,35	15,57	0,31	-
NK+iMo10-24	250	6	35,66	32,35	33,955	2,41	-
NK+iMo st(10-48)	250	6	17,60	15,75	16,68	1,31	-
NK+K-562	250	4	37,49	40,91	39,20	2,42	-
NK+K-562	250	6	33,23	33,12	33,175	0,08	-
NK+*L1P*100	250	6	4,96	4,51	4,735	0,32	-
NK+*L1P*10	250	6	1,35	1,24	1,295	0,08	-
Versuch 3							
NK+Mo	250	2	9,75	14,69	12,22	3,49	ja
	250	4	18,18	19,37	18,76	0,84	
	250	6	13,19	18,71	15,95	3,90	
	250	8	13,93	15,23	14,58	0,92	
	250	10	12,19	9,75	10,97	1,73	
	250	12	8,92	8,86	8,89	0,04	
	250	18	8,14	6,41	7,28	1,22	
	250	24	7,24	2,69	4,97	3,22	
NK+iMo1-48	250	1	3,18	3,11	3,15	0,05	ja
	250	2	12,24	12,71	12,48	0,33	
	250	4	28,67	26,46	27,57	1,56	
	250	6	25,23	26,30	25,77	0,76	
	250	8	23,72	22,59	23,16	0,80	
	250	10	18,13	19,80	18,97	1,18	
	250	12	16,53	15,77	16,15	0,54	
	250	18	13,32	12,23	12,76	0,77	
	250	24	6,43	6,81	6,62	0,27	
NK+iMo10-48	250	1	(2,79)	(2,87)	(2,83)	0,06	nein
	250	2	(9,78)	(9,95)	(9,87)	0,12	
	250	4	(16,65)	(14,18)	(15,42)	1,75	
	250	6	(14,18)	(14,72)	(14,45)	0,38	
	250	8	(10,53)	(11,56)	(11,05)	0,73	
	250	10	(8,48)	(7,97)	(8,23)	0,36	
	250	12	(7,76)	(7,40)	(7,58)	0,25	
	250	18	(5,72)	(6,40)	(6,06)	0,48	
	250	24	(3,65)	(3,64)	(3,65)	0,01	
NK+PMA	250	5	90,08	88,44	89,26	1,16	-
NK+iMo1-24	250	6	13,91	13,49	13,70	0,30	-

NK+iMo10-24	250	6	15,67	13,44	14,555	1,58	-
NK+iMost10-48	250	6	13,74	12,42	13,08	0,93	-
NK+K-562	250	4	40,51	39,61	40,06	0,64	-
NK+K-562	250	6	-	-	-	.	-
NK+*L1P*100	250	6	8,63	9,32	8,98	0,49	-
NK+*L1P*10	250	6	-	-	-	.	-
Versuch 4							
NK+Mono	250	1	4,96	5,15	5,05	0,13	ja
	250	2	12,31	13,52	12,91	0,86	
	250	4	12,57	13,77	13,17	0,85	
	250	6	15,58	18,19	16,89	1,85	
	250	8	12,06	10,68	11,37	0,98	
	250	10	7,21	7,02	7,12	0,13	
	250	12	5,14	5,43	5,29	0,21	
	250	18	6,03	5,03	5,53	0,71	
	250	24	1,53	1,10	1,31	0,30	
NK+iMo1-48	250	1	-	-	-	-	-
	250	2	-	-	-	-	
	250	4	-	-	-	-	
	250	6	-	-	-	-	
	250	8	-	-	-	-	
	250	10	-	-	-	-	
	250	12	-	-	-	-	
	250	18	-	-	-	-	
	250	24	-	-	-	-	
NK+iMo10-48	250	1	6,10	5,82	5,96	0,20	ja
	250	2	24,82	25,50	25,16	0,48	
	250	4	41,72	41,93	41,83	0,15	
	250	6	37,41	39,52	38,47	1,49	
	250	8	37,28	42,71	39,99	3,84	
	250	10	36,94	35,06	36,00	1,33	
	250	12	32,60	32,23	32,41	0,26	
	250	18	23,18	24,40	23,79	0,86	
	250	24	24,24	21,72	22,98	1,78	
NK+PMA	250	5	44,61	52,88	48,74	5,84	-
NK+iMo1-24	250	6	12,18	8,92	10,55	2,31	-
NK+iMo10-24	250	6	35,28	36,05	35,66	0,54	-
NK+iMo st (10-48)	250	6	13,74	12,42	13,08	0,93	-
NK+K-562	250	4	38,70	44,65	41,67	4,21	-
NK+K-562	250	6	35,88	31,74	33,81	2,93	-
NK+*L1P*100	250	6	3,86	4,13	4,00	0,14	-
NK+*L1P*10	250	6	2,55	3,37	2,96	0,41	-

Danksagung

Ich danke Frau Privatdozentin Dr. Birgid Neumeister, die mir durch ihre kompetente Betreuung von den ersten strategischen Diskussionen bis zur Endkorrektur des Manuskriptes ein jederzeit verlässlicher Rückhalt war.

Für die Übernahme der Zweikorrektur danke ich Frau Privatdozentin Dr. Ulrike Schumacher vom Institut für Mikrobiologie.

Für die Zusammenarbeit im Labor möchte ich insbesondere Frau Marion Faigle meinen Dank aussprechen, die mir nicht nur bei der Erarbeitung des technischen Know-hows zur Seite gestanden hat, sondern meine Arbeit auch mit manch zündender Idee bereichert hat. Mein Dank geht auch an Dr. rer. nat. Hagen Wieland und Dr. rer. nat. Sascha Kristian für die vielen interessanten Fachsimpeleien und die entspannte Atmosphäre an der Werkbank.

Zu Dank verpflichtet fühle ich mich auch Dr. med. Daniel Herr, Dr. phil. Almut Mehling; Sabine Jentzsch und Mark Stemmler für die kritische Durchsicht des Manuskriptes und allen anderen die durch Diskussionen zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Ein ganz großes Dankeschön an dieser Stelle nach Dresden an meine Mutter, von der ich mein Leben lang bedingungslose Unterstützung erfahren habe und deren Beistand – nicht zuletzt in materieller Hinsicht – die Realisation eines solchen Projektes erst möglich gemacht hat.

Lebenslauf

Name	Mainka
Vorname	Alexander
Geboren am	25. August 1977
in	Dresden
Schule	1984-1988, Grundschule
	1988-1996, Gymnasium „Kreuzschule“ Dresden
Sozialdienste	10/1996-01/1998, „Anderer Dienst im Ausland“ für die „Association Terre et Ciel“ in Eygalayes/Frankreich
	02/1998-09/1998, Co-worker im “Camphill Village Copake USA Inc.” in Copake/NY/USA
Studium	seit 10/1998 Studium der Humanmedizin an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br.
	10/2001-03/2002, Studium an der „Université Louis Pasteur“ in Strasbourg/Frankreich
	04/2002-03/2003, wissenschaftliche Tätigkeit im Rahmen einer Doktorarbeit in der Forschungsgruppe von Frau PD Dr. Neumeister am Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums in Tübingen
Examina	08/2000, Physikum
	08/2001, Erstes Staatsexamen
	04/2004 Zweites Staatsexamen
	3.Mai 2005 Drittes Staatsexamen