

**Aus der Universitätsklinik für Anaesthesiologie und
Intensivmedizin Tübingen
Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. Northoff**

**Charakterisierung von Ionenkanal- und Tyrosinkinase-
Inhibitoren hinsichtlich ihrer Wirkung auf die
intrazelluläre Vermehrung von Legionellen**

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

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

**vorgelegt von
Nicole Hechtel
aus
Würzburg**

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. B. Neumeister

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. U. Schumacher

„Denkt an die Elektrolyte“

Karl („Herr Lehmann“)

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	5
<hr/>	
I.1 Geschichtlicher Hintergrund	5
I.2 Mikrobiologie des Erregers	6
I.2.1 Mikrobiologische Identifizierung	6
I.2.2 Taxonomie	6
I.2.3 Kultur	6
I.3 Epidemiologie	7
I.3.1 Inzidenz	7
I.3.2 Reservoir und Infektionsweg	7
I.4 Diagnostik	8
I.4.1 Serologischer und molekularbiologischer Nachweis	8
I.4.2 Antikörpernachweis	8
I.4.3 Kultur	9
I.5 Klinik	9
I.5.1 Pontiac-Fieber	9
I.5.2 Legionellenpneumonie	9
I.6 Therapie	10
I.7 Pathogenese	11
I.8 Virulenzfaktoren	11
I.9 Fragestellung:	13
Welchen Einfluß haben Proteintyrosinkinase- und Ionenkanal-Inhibitoren auf die infizierte Zelle bzw. auf das intrazelluläre Wachstum von Legionellen?	
II. Material und Methoden	17
<hr/>	
II.1 Legionellen	17

II.1.1 Materialien für die Erhaltung und Anzucht von Legionellen	18
II.1.2 Legionellenkultur	18
II.2 Zellkultur	18
II.2.1 Materialien und Chemikalien für die Zellkultur	19
II.2.2 Zellkultur	20
II.3 Inhibitoren	21
II.3.1 Inhibitorengruppe 1	21
II.3.2 Inhibitorengruppe 2	22
II.3.3 Inhibitorengruppe 3	22
II.3.4 Inhibitorengruppe 4	23
II.3.5 Inhibitorengruppe 5	23
II.4 Infektionsversuche	24
II.4.1 Geräte und Materialien für die Infektionsversuche	24
II.4.2 Infektion von MM6-Zellen mit <i>L. pneumophila</i>	26
II.4.3 Negativkontrolle uninfizierter MM6-Zellen	27
II.4.4 Infektion peripherer Monozyten	28
II.4.5 Negativkontrolle uninfizierter peripherer Monozyten	29
II.4.6 Phagozytose Assay	29
II.4.7 Legionellen-Überlebenskurve	30
II.4.8 Statistische Auswertung der gezählten Kolonien	31
II.5 Konfokalmikroskopie	31
II.5.1 Materialien und Geräte für die Konfokalmikroskopie	31
II.5.2 Durchführung	32
III. Ergebnisse	34
<hr/>	
III.1 Infektionsversuche: Tyrosinkinase-Inhibitoren	34
III.2 Infektionsversuche: Östrogenrezeptoragonisten/-Antagonisten	36
III.3 Infektionsversuche: Inhibitoren verschiedener Calciumkanäle	37
III.4 Infektionsversuche mit Inhibitoren weiterer Ionenkanäle	40
III.5 Folgeversuche mit vielversprechenden Substanzen	43

III.5.1 Phagozytose Assay	45
III.5.2 Legionellen-Überlebenskurve	46
III.5.3 Infektion peripherer Monozyten	48
III.6 Konfokalmikroskopie	50
<u>IV. Diskussion</u>	<u>53</u>
IV.1 Die Rolle der Proteintyrosin-Kinase (PTK) bei Infektionen mit <i>L. pneumophila</i>	53
IV.1.1 Die Rolle der Proteintyrosin-Phosphorylierung (PTP) bei intrazellulären Erregern	53
IV.1.2 Die Wirkung von PTK-Inhibitoren und deren inaktiven Strukturanaloga auf das Wachstum von <i>L. pneumophila</i>	56
IV.1.3 Weitere Wirkungsmechanismen des PTK-Inhibitors Genistein	57
IV.2 Die Rolle von Ionen bzw. Ionenkanälen bei Infektionen mit <i>L. pneumophila</i>	59
IV.2.1 Untersuchung weiterer Mechanismen, die zu einer Wachstumshemmung von <i>L. pneumophila</i> führen können	59
IV.2.2 Die Rolle von Calcium bei der Vermehrung von <i>L. pneumophila</i>	63
<u>V. Zusammenfassung</u>	<u>67</u>
<u>VI. Literaturverzeichnis</u>	<u>70</u>
Anhang	
Abkürzungsverzeichnis	83
Danksagung	85
Lebenslauf	86

I. Einleitung

I.1 Geschichtlicher Hintergrund

Das Bakterium *Legionella (L.) pneumophila* kann zwei Krankheitsbilder hervorrufen. Das weitaus schwerwiegendere Krankheitsbild ist unter der Bezeichnung „Legionärskrankheit“ (engl. Legionnaires` disease) bekannt. Der Begriff läßt sich auf die Umstände zurückführen, unter denen das Bakterium zum ersten Mal auftrat bzw. später isoliert und beschrieben wurde (Ruckdeschel und Ehret, 1993; Neumeister *et al.*, 1996). Im Jahr 1976 kam es während eines US-Kriegsveteranentreffens in Philadelphia, USA, zu 221 Pneumonieerkrankungen mit ungeklärter Ursache. 34 der Erkrankten verstarben. Trotz intensiver Nachforschungen gelang es zunächst nicht die Ursache dieser Epidemie zu identifizieren. Der Nachweis dieses Erregers wurde auch als „die größte epidemiologische Herausforderung des Jahrhunderts“ (Weisse, 1992) bezeichnet.

Nach 6 Monaten konnten Wissenschaftler vom „Center for Disease Control“ (CDC) in Atlanta mit entsprechenden Anzuchtmethoden „rickettsienähnliche“ Mikroorganismen isolieren. Durch weitere serologische Untersuchungen in der darauffolgenden Zeit konnten die Mikroorganismen den Krankheitsausbrüchen eindeutig zugeordnet werden. Der Nachweis dieser Mikroorganismen erfolgte mittels indirektem Immunfluoreszenztest (Fraser *et al.*, 1977; McDade *et al.*, 1977). Dennoch blieb das Reservoir der Infektion unentdeckt, da damals keine umwelt- oder wasserhygienischen Untersuchungen durchgeführt wurden.

Nach der Entdeckung von *L. pneumophila* konnten in der folgenden Zeit durch Untersuchung eingefrorener Patientenserum retrospektiv weitere ungeklärte Fälle im Zusammenhang mit Lungenentzündungen und Fieber eindeutig dem neu entdeckten Erreger zugeordnet werden.

Durch die Möglichkeit der Anzucht von *L. pneumophila* auf synthetischen Agarnährböden konnten immer mehr Spezies dieser Gattung aus Patientenmaterial und der Umwelt isoliert und beschrieben werden (Winn, 1988).

I.2 Mikrobiologie des Erregers

I.2.1 Mikrobiologische Identifizierung

Legionellen sind gramnegative Stäbchen. Sie wachsen aerob und sind mono- oder lophotrich begeißelt und haben weder eine Kapsel noch bilden sie Sporen.

Sie besitzen ein Lipopolysaccharid, das durch einen hohen Anteil verzweigter Fettsäuren charakterisiert ist. Mit der Gram-Färbung lassen sich Legionellen nur schlecht anfärben, bessere Ergebnisse erzielt man mit der Giménez-Färbung (Karbolfuchsin-Malachitgrün-Färbung) und mittels direkter Immunfluoreszenz (Neumeister *et al.*, 1996). Im Gewebe kann man Legionellen auch gut durch Silberimprägnationsfärbung darstellen (Pounder, 1983; Tseng und Renner, 1983).

I.2.2 Taxonomie

Die Gattung *Legionella* wird in 42 Spezies mit 64 Serogruppen unterteilt (Benson und Fields, 1998). Die Spezies sind sich morphologisch sehr ähnlich, unterscheiden sich in ihrer Virulenz allerdings sehr. Fünfzig bis 80 % aller Legionellosen werden durch *L. pneumophila* verursacht (Reingold *et al.*, 1984; Breiman und Butler, 1998). Von *L. pneumophila* sind 15 Serogruppen bekannt.

I.2.3 Kultur

Legionellen stellen sehr spezielle Anforderungen an mikrobiologische Medien. Da sie keine Zucker und Fette spalten können, beziehen sie ihre Energie aus Aminosäuren, welche direkt verwertet bzw. durch Proteolyse zugänglich gemacht werden. *In vitro* werden sie auf BCYEalpha-Agar angezüchtet. Dieser Agar enthält L-Cystein, Eisenpyrophosphat, alpha-Ketoglutarat, Aktivkohle und Hefeextrakt. Es muß ein pH-Wert von 6,85-6,95 vorliegen. Die Anzuchtbedingungen liegen bei 30-37°C, 5% CO₂ und 80% Luftfeuchtigkeit. Es dauert bei agaradaptierten Legionellen 2-3 Tage, bei einer Primärkultur bis zu 10 Tage, bis Kolonien heranwachsen. Die Kolonien erscheinen rund und milchig. Sie können weißlich-gelb bis leicht blau-rosa erscheinen.

I.3 Epidemiologie

I.3.1 Inzidenz

Bis zu 22,5% aller Pneumonien werden durch Legionellen verursacht (Neumeister *et al.*, 1996). Damit gehören sie zu den häufigsten ambulant erworbenen Pneumonien (Fang *et al.*, 1990; Fine *et al.*, 1990). Fünfundachtzig Prozent der Legionellenpneumonien werden durch *L. pneumophila* SG 1, 10% durch *L. pneumophila* SG 6 verursacht (Reingold *et al.*, 1984). Auch bei Patienten mit Pontiac-Fieber wurde am häufigsten *L. pneumophila* SG 1 als Erreger identifiziert (Neumeister *et al.*, 1996).

I.3.2 Reservoir und Infektionsweg

Legionellen finden sich ubiquitär in Süßwasser wie auch in technischen Wassersystemen. Sie leben obligat intrazellulär in Amöben und anderen Protozoen. Somit stellen amöbenverseuchte Wassersysteme akute Gefahr einer Legionellenkontamination dar. Eine Wassertemperatur von 25°-49°C (Wadowsky *et al.*, 1985) fördert zusätzlich das intrazelluläre Wachstum der Bakterien. Als Infektionsquellen sind besonders Klimaanlage, Duschen, Schwimmbäder und medizinische Verneblergeräte bekannt. Kommt es zu einer Legionellenkontamination, gestaltet sich deren Bekämpfung als äußerst schwierig. Für eine Abtötung der Legionellen müsste das Wasser eine Temperatur von mindestens 60°C haben. In großen Warmwasser-Systemen wie in Krankenhäusern, Wohn- und Hotelkomplexen ist dies nur schwer zu erreichen. Deswegen werden in diesen Systemen häufiger Legionellenkontaminationen nachgewiesen als in deutlich kleineren Systemen wie z. B. in Warmwasser-Systemen von Einfamilienhäusern (Bhopal, 1995). Auch die Bekämpfung von Legionellen mit Chlor ist nicht mehr effektiv, da inzwischen auch chlorresistente Legionellenstämme bekannt sind. Auch UV-Strahlung führt nicht zu einer sicheren Abtötung der Legionellen. Hierfür dürfte ein konjugatives Plasmid verantwortlich sein, das eine Resistenz gegenüber UV-Licht vermittelt (Tully, 1991).

Eine Infektion mit Legionellen erfolgt durch Inhalation von 1-5 µm grossen Aerosolen oder Aspiration von Legionellen-verseuchtem Wasser (Hoge und Breiman, 1991; Wright *et al.*, 1989; Blatt *et al.*, 1993; Yu, 1993; Venezia *et al.*, 1994). Eine Übertragung von Mensch zu Mensch ist nicht bekannt. Somit sind auch keine speziellen hygienischen Maßnahmen wie z. B. die Quarantäne eines Patienten nötig.

I.4 Diagnostik

I.4.1 Serologischer und molekularbiologischer Antigennachweis

Der Nachweis von Antigenen von *L. pneumophila* SG1 erfolgt aus dem Urin mittels ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay) oder Latexagglutination (Berdal *et al.*, 1979; Tang *et al.*, 1989; Bernander *et al.*, 1994; Williams und Lever, 1995). Das Antigen wird bei einer Legionelleninfektion früh ausgeschieden, persistiert aber nach einer Antibiotikatherapie über Wochen im Körper.

Auch die PCR-Untersuchung respiratorischer Sekrete durch Amplifikation spezifischer Gensequenzen verschiedener Legionellenspezies ist möglich. Die PCR-Untersuchung ist aufgrund ihrer erhöhten Sensitivität ein Standard-Verfahren (Starnbach *et al.*, 1989; Maiwald *et al.*, 1994; Maiwald *et al.*, 1995; Matsiota-Bernard *et al.*, 1994). Der Nachweis von Legionellen durch Gensonden (Neumeister *et al.*, 1996) ist für den Nachweis aus Wasser- oder Kulturproben ausreichend. Bei verschiedenen Patientenproben sind mit diesem Verfahren allerdings viele falsch-positive Ergebnisse beobachtet worden (Laussucq *et al.*, 1988; Pasculle *et al.*, 1989).

I.4.2 Antikörpernachweis

Mittels verschiedener Antikörper gegen *L. pneumophila* und andere Legionellenspezies können die Erreger durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (Wilkinson *et al.*, 1979). Die Validität dieses Routinetests beträgt 75%, die Spezifität 100% (Wilkinson und Fikes, 1981). Ein vierfacher

Titeranstieg gilt als signifikant. Allerdings können 4-10 Wochen vergehen bis die Antikörperantwort durch einen Titeranstieg messbar ist.

I.4.3 Kultur

Die Kultur von Legionellen aus Umwelt- und Patientenmaterial stellt nach wie vor das etablierteste Diagnoseverfahren dar und ist unerlässlich. Hierzu werden mehrere Selektivmedien verwendet. Des Weiteren muß man von einer niedrigen und stark schwankenden Sensitivität, 9-70%, ausgehen (Ehret, 1995). Auch falsch-positive Ergebnisse in der Sputum-Diagnostik aufgrund des Trinkens von legionellenkontaminierten Wassers müssen berücksichtigt werden. Als Kontrolle kann eine Subkultur auf Blutagar angelegt werden; hierauf wachsen Legionellen nicht, da Blutagar nicht das für das Wachstum von Legionellen wichtige Cystein enthält.

I.5 Klinik

I.5.1 Pontiac-Fieber

Das Pontiac-Fieber ist eine milde Variante der Legionärskrankheit. Sie tritt besonders häufig bei Menschen mit einem intakten Immunsystem auf. Es ist eine akute Erkrankung, die einem grippalen Effekt ähnlich sein kann. Die Inkubationszeit beträgt 48h. Typischen Symptome der Erkrankung sind Übelkeit, Myalgie, Fieber, Schüttelfrost, Kopfschmerzen und trockener Husten. Eine Pneumonie konnte hierbei nicht beobachtet werden. Eine Genesung erfolgt innerhalb von Tagen, auch ohne Antibiotikatherapie.

I.5.2 Legionellenpneumonie

Die Legionellenpneumonie ist die schwerste Form der Legionärskrankheit. Sie tritt besonders bei Menschen mit einem geschwächten Immunsystem auf. Als Risikofaktoren gelten insbesondere Organtransplantation, Nierendialyse, Kortikosteroidtherapie, Cyclosporintherapie und Chemotherapie (Davis und Winn, 1987). Allgemein zählen auch Tabakkonsum, chronische Lungenerkrankungen, Alkoholismus, Diabetes mellitus, das männliche

Geschlecht und ein Alter über 50 Jahre zu den Risikofaktoren für eine Legionellenpneumonie (Davis und Winn, 1987). Die Inkubationszeit beträgt 2-10 Tage. Die Symptome sind Übelkeit, Müdigkeit, Kopf- und Gliederschmerzen, Schüttelfrost, Fieber, trockener Husten und Durchfall. Das Vorhandensein einer relativen Bradykardie gilt als wichtiger differenzialdiagnostischer Hinweis (Fraser *et al.*, 1977; Kirby *et al.*, 1980). Auch neurologische Symptome wie Verwirrtheit und Halluzinationen können auftreten. Der anfängliche trockene Husten verschlimmert sich. Radiologisch sind alveoläre, konfluierende Verschattungen erkennbar. Pathologisch läßt sich eine multifokale, fibrinopurulente Alveolitis und Bronchiolitis diagnostizieren. Extrapulmonale Manifestationen finden sich in Nieren und Herz. Hierbei kann es zu einer intestinalen Nephritis, Tubulusnekrose und zu aktuellem Nierenversagen kommen (Neumeister *et al.*, 1996). Ebenfalls kann eine Perikarditis und Myokarditis auftreten (Neumeister *et al.*, 1996). In der Regel heilen Legionellenpneumonien mit ihren Sekundärmanifestationen folgenlos ab.

I.6 Therapie

Bei der Therapie gilt Erythromycin als das Antibiotikum der Wahl. Es wird aber zunehmend von neueren Makroliden wie z. B. Azithromycin abgelöst, da neuere Makrolide eine höhere In-vitro-Aktivität besitzen (Stout und Yu, 1997).

Auch Quinolone sind wirksame Therapeutika. Sie sind deswegen so interessant, weil sie keine Wechselwirkungen mit Immunsuppressiva wie Cyclosporin oder Tacrolimus aufzeigen (Harrison *et al.*, 2001).

Rifampicin ist ebenfalls wirksam, es wird allerdings aufgrund der Möglichkeit einer Resistenzbildung nicht als Monotherapie eingesetzt. Eine Kombinationstherapie mit Quinolonen oder Makroliden kommt häufig bei schweren Erkrankungsfällen zum Einsatz.

I.7 Pathogenese

Bei der Pathogenese ist die Vermehrung von Legionellen in alveolaren Makrophagen (Horwitz und Silverstein, 1980) von essentieller Bedeutung. Die Legionellen gelangen als Aerosol in die Lunge. Dort bindet die C3-Komponente des Komplementsystems an eine Untereinheit des major outer membrane protein (MOMP) der Legionellen. Somit können sie zur Komplementaktivierung, sie erfolgt auf alternativem oder klassischem Weg, führen (Bellinger-Kawahara und Horwitz, 1990; Mintz *et al.*, 1992; Mintz *et al.*, 1995). Die darauf folgende Phagozytose von *L. pneumophila* läuft in einer ungewöhnlichen Art und Weise ab. Bei der sogenannten „Coiling-Phagozytose“ werden die Legionellen von Pseudopodien der Makrophagen eingewickelt und aufgenommen (Horwitz und Maxfield, 1984; Payne und Horwitz, 1987; Marra *et al.*, 1990). Diese Art der Phagozytose ist nur bei *L. pneumophila* SG 1 zu finden. Andere Serogruppen und Spezies werden konventionell phagozytiert. Nach der Aufnahme in die Zelle ist die Hemmung des „oxidative burst“ durch die Legionellen für deren Überleben wichtig, damit die Produktion von Sauerstoffradikalen eingeschränkt wird (Horwitz, 1992). Die Hemmung des „oxidative burst“ wird nur bei virulenten, nicht aber bei avirulenten Stämmen beobachtet (Jepras und Fitzgeorge, 1986; Summersgill *et al.*, 1990; Rajagopalan-Levasseur *et al.*, 1992). Diese Fähigkeit ist besonders wichtig, da Legionellen geringe Katalase-, Glutathionperoxidase- und Glutathionreduktase-Aktivität besitzen und deswegen Sauerstoffradikalen gegenüber sehr empfindlich sind.

Nach der Phagozytose ist das Phagosom der Legionellen umgeben von Ribosomen. Es kommt nur in geringem Umfang und mit grosser Verzögerung zu einer Fusion mit Lysosomen. Zu einem späteren Zeitpunkt ist das Phagosom in Mitochondrien eingebettet.

I.8 Virulenzfaktoren

Für Legionellen sind verschiedene Virulenzfaktoren bekannt und im Laufe der Zeit wurden immer weitere Faktoren charakterisiert.

Als wichtiger Virulenzfaktor gilt die Zink-Metalloprotease (Major Secretory Protein) (Dreyfuß und Iglewski, 1986; Breiman und Horwitz, 1987). Diese Protease hat wie auch andere Endo- und Exopeptidasen zytotoxische und hämolytische Aktivität, die z. B. zur Degradation von alpha-Antitrypsin (Conlan *et al.*, 1988; Keen und Hoffman, 1989) oder zur Destruktion von befallenen Phagozyten (Rechnitzer *et al.*, 1989a; Rechnitzer *et al.*, 1989b) führen kann. Auch der Genlocus *mip* ist ein wichtiger Virulenzfaktor. Er ist kodiert für das Protein *mip* (Macrophage Infectivity Potentiator), eine Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase (Ciancotto *et al.*, 1989), welche Einfluß auf die Infektiosität und das intrazelluläre Überleben von Legionellen nach Phagozytose in Amöben und Monozyten hat (Engleberg *et al.*, 1989; Ciancotto *et al.*, 1990; Bangsberg *et al.*, 1991). Das Vorhandensein der Genloci *icm* (Intracellular Multiplication Locus) (Marra *et al.*, 1992) und *dot* (Defect In Organelle Trafficking-Locus) (Berger und Isberg, 1993; Berger *et al.*, 1994) sind entscheidend für die intrazelluläre Vermehrung von Legionellen.

Ein weiterer Virulenzfaktor ist Legiolysin. Als ein Hämolyysin (Bender *et al.*, 1991) ist es verantwortlich für Hämolyse, Pigmentbildung, Fluoreszenz und Lichtschutz (Rdest *et al.*, 1991; Wintermeyer *et al.*, 1991; Wintermeyer *et al.*, 1994).

Wichtig für den Eisenmetabolismus, der bei Legionellen essentiell ist, ist *micp* (Major Iron Containing Protein) (Mengaud und Horwitz, 1993), *fur* (Ferric Uptake Regulation Protein) (Hickey und Ciancotto, 1994) und die periplasmatische Eisenreduktase (Johnson *et al.*, 1991).

Ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor ist das bakterielle LPS (Lipopolysaccharid). Es besteht größtenteils aus verzweigten Fettsäuren (Wong und Herscowitz, 1979; Ciesielski *et al.*, 1986; Conlan und Ashworth, 1986) und einer hydrophoben O-Kette (Otten *et al.*, 1986; Sonesson *et al.*, 1989; Petitjean *et al.*, 1990). Es führt zu einer klassischen Komplementaktivierung (Mintz *et al.*, 1992) und trägt zur Serogruppenspezifität bei (Moll *et al.*, 1992).

I.9 Wissenschaftliche Fragestellung: Welchen Einfluß haben Proteintyrosinkinase-Inhibitoren und Ionenkanal-Inhibitoren auf die infizierte Zelle bzw. auf das intrazelluläre Wachstum von *Legionella pneumophila*?

Protein-Tyrosinkinasen (PTK) katalysieren die Phosphorylation von Tyrosinresten. Damit sind sie wichtig für verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden und können auf Schlüsselfunktionen der Zelle wie Proliferation oder Differenzierung Einfluss nehmen. Proteine, die durch PTK phosphoryliert werden, können zudem das erzeugte Signal auf andere Signalkaskaden übertragen und dadurch weitere Moleküle wie G-Proteine, Inositoltriphosphat oder die Freisetzung von intrazellulärem Calcium beeinflussen.

Für Legionellen wie auch verschiedene andere intrazelluläre Erreger wurde ein Einfluss von PTK-Inhibitoren auf die Aufnahme der Erreger in die Zelle gezeigt. Eine verminderte Aufnahme in die Wirtszellen nach Zugabe eines PTK-Inhibitors wurde bei *Campylobacter jejuni* (Wooldridge *et al.*, 1996), *Yersinien* (Rosenshine *et al.*, 1992) und *Escherichia (E.) coli* (Palmer *et al.*, 1997) beobachtet. Bei Infektionen mit *E. coli* wurde zudem eine gesteigerte Proteintyrosin-Phosphorylierung (PTP) beobachtet (Palmer *et al.*, 1997). Eine gesteigerte PTP konnte auch bei *Helicobacter pylori* nachgewiesen werden (Segal *et al.*, 1996).

Bei Infektionen mit *Coxiella burnetii*, ein sehr eng mit *L. pneumophila* verwandtes Bakterium, konnte gezeigt werden, dass bei virulenten Erregern eine frühe PTK-Aktivierung vorliegt, während Infektionen mit avirulente Erreger nicht zu einer Aktivierung der PTK führen (Meconi *et al.*, 2001). Eine frühe Aktivierung von Tyrosinkinasen durch eine Interaktion zwischen Erreger und Wirtszelle konnte auch bei *Mycobacterium leprae* und *Mycobacterium bovis* nachgewiesen werden (Lima *et al.*, 2001).

Hierdurch wird offensichtlich, dass die PTK-Aktivierung bzw. deren Hemmung einen großen Einfluß auf intrazelluläre Erreger und deren Aufnahme in die Wirtszelle hat. Auch für *L. pneumophila* wurde gezeigt, dass sie zum einen die PTK nach Aufnahme in die Zelle aktivieren und zum anderen durch PTK-

Inhibitoren in ihrer Aufnahme in die Zelle gehemmt werden (Coxon *et al.*, 1998). Des Weiteren konnte für *L. pneumophila* und *E. coli* der Nachweis erbracht werden, dass die Menge an phosphorylierten Proteinen mit Tyrosinresten 48h nach der Infektion und während der intrazellulären Wachstumsphase deutlich erhöht ist. Eine Hemmung der PTP führt im Fall von *L. pneumophila* auch zu einer Hemmung der intrazellulären Vermehrung (Susa und Marre, 1999). Aufgrund dieser Ergebnisse ist eine genauere Untersuchung der Wirkung verschiedener PTK-Inhibitoren auf die intrazelluläre Legionellenvermehrung erforderlich.

Weitere, bislang nicht untersuchte, wichtige Mechanismen, deren Hemmung einen bedeutenden Einfluss auf das intrazelluläre Wachstum von Legionellen haben könnte, sind Ionenkanäle. Interessant dabei ist, dass die Funktion der Ionenkanäle in Bezug auf die Pathogenese von *L. pneumophila* noch nicht hinreichend untersucht wurde. Unter den Ionen nimmt Calcium eine besonders wichtige Stellung ein.

Calcium, wie auch calciumbindende Proteine, sind in die verschiedenen Zellprozesse involviert (Norris *et al.*, 1991). Calcium ist aufgrund seines schnellen Regulationsvermögens ein universeller und bedeutender Transmitter (Williams, 2002). Das intrazelluläre Calcium kann – abhängig vom Zelltyp und vom Signal – durch verschiedene Mechanismen ansteigen. Ein Calciumanstieg kann zum einen durch Calciumeinstrom von extrazellulär über verschiedene Kanäle, zum anderen durch intrazelluläre Freisetzung aus Calciumspeichern erfolgen (Dominguez, 2004). Zu einer Abnahme der Calciumkonzentration kann es durch ATP-abhängige Calciumkanäle, Calciumaustauscher und Calciumbindende Proteine (CaBPs) kommen (Dominguez, 2004). Diese Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration sind verbunden mit den verschiedensten Zellprozessen, wie z.B. Genexpression, Zellzyklus, Differenzierung, Metabolismus und Pathogenese (Dominguez, 2004). Auch in verschiedene bakterielle Prozesse, wie unter anderem die Regulation der Proteinphosphorylierung, ist Calcium mit eingebunden und wird ähnlich reguliert wie in Zellen (Norris *et al.*, 1996).

Leider gibt es kaum umfassenden Untersuchungen, welche die Funktion von Calcium in Bakterien bzw. in Wirtszellen intrazellulärer Bakterien genauer beschreiben. Vereinzelt wurde die Rolle von Calcium bei intrazellulären Erregern untersucht. Bei Versuchen mit *E. coli* konnte gezeigt werden, dass freies, intrazelluläres Calcium die Expression verschiedener Gene in *E. coli* reguliert. Einige dieser Genen scheinen selbst in die Calciumregulation involviert zu sein, wie z. B. Acp (acyl carrier protein), das Calcium bindet (Holland et al., 1999). Des Weiteren scheint die Häufigkeit der Zellteilung über den freien Calciumspiegel beeinflussbar zu sein. Verschiedene Calciumkanal-Inhibitoren führten zu einer verminderten Zellteilungsrate (Holland et al., 1999).

Für andere intrazelluläre Erreger konnte sogar nachgewiesen werden, dass eine Hemmung der Calciumkanäle Einfluss auf das intrazelluläre Wachstum dieser Erreger hat. Bei *Ehrlichia risticii* und *Chlamydia trachomatis* konnte gezeigt werden, dass es unter Anwendung von Calcium-Inhibitoren zu einer Hemmung des intrazellulären Wachstums kommt (Rikihisa et al., 1995; Shainkin-Kestenbaum et al., 1989). Bei *Mycobacterium avium* erniedrigt ein künstlicher Calciumanstieg deren intrazelluläre Vitalität (Malik et al., 2000).

Aufgrund der hier dargelegten Ergebnisse ist eine Untersuchung verschiedener Inhibitoren von Calciumkanälen sowie verschiedener PTK-Inhibitoren bei *L. pneumophila* indiziert. Der Wirkungsmechanismus einzelner PTK-Inhibitoren könnte durch genauere Versuche gezeigt werden und so der Effekt auf die Vermehrung von *L. pneumophila* erklärt werden.

Allerdings sind für den in der vorliegenden Arbeit verwendeten PTK-Inhibitor - Genistein - weitere Wirkungsmechanismen bekannt. Es wurden verschiedene Wechselwirkungen auf die Östrogenrezeptoren alpha und beta beobachtet (Morito et al., 2001). Hierbei steht besonders die Wirkung als Östrogen-Agonist im Vordergrund (Rickard et al., 2003). Genistein führt auch zu einer Hemmung der L-Type Calciumkanäle (Yokoshiki et al., 1996). Hierbei wurde auch eine Abnahme des L-Typ-abhängigen Calciumeinstroms beobachtet (Yokoshiki et

al., 1996; Kusaka und Sperelakis, 1995). Es konnte auch eine Hemmung der Kaliumkanäle sowie ein verminderter Kaliumeinstrom nach Genisteinzugabe beobachtet werden (Chiang *et al.*, 2002; Ogata *et al.*, 1997). Um die wachstumshemmende Wirkung des PTK-Inhibitors zu charakterisieren werden auch diese möglichen Mechanismen untersucht.

Auch die eindeutigen Ergebnisse von Calciumkanal-Inhibitoren auf das Wachstum einiger intrazelluläre Erreger lässt vermuten, dass bei der intrazellulären Vermehrung von *L. pneumophila* ebenfalls Calcium eine wichtige Rolle spielt. Eine genaue Untersuchung der verschiedenen Calciumkanäle und -transporter in dieser Hinsicht wäre sehr interessant. Des Weiteren bietet sich eine Untersuchung weiterer Ionenkanäle an, um einen Überblick darüber zu erhalten, welche Ionen essentiell für das intrazelluläre Wachstum von *L. pneumophila* sind.

II. Material und Methoden

II.1 Bakterien

In den vorliegenden Versuchen wurden folgende Legionellenspezies und Legionellenserogruppen verwendet:

Legionella pneumophila Serogruppe 1, Subtyp Pontiac, weniger als 3 Agarpassagen. Sie stammt aus Patientenisolat aus München, freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Ruckdeschel zur Verfügung gestellt.

Legionella pneumophila Serogruppe 1, Subtyp Pontiac, GFP, versehen mit einem Expressionsplasmid für das grün-fluoreszierende Protein (EGFP) (Kohler *et al.*, 2000). Das Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. M. Steinert (Institut für molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Legionella steigerwaltii GFP, versehen mit einem Expressionsplasmid, codiert für das grün-fluoreszierende Protein (EGFP) (Kohler *et al.*, 2000). Das Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. M. Steinert (Institut für molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

II.1.1 Materialien für die Erhaltung und Anzucht von Legionellen

Tabelle II.1: Materialien für die Erhaltung und Anzucht von Legionellen

Lysiertes Pferdeblut	Oxoid, Wesel
Hefeextrakt	Oxoid, Wesel
Legionella-Agar-Basis CM 655	Oxoid, Wesel
Legionella-Wachstumssupplement, bestehend aus ACES, Eisen- pyrophosphat, L-Cystein, alpha- Ketoglutarat	Oxoid, Wesel
Columbia-Blutagar (Kontroll-Agar)	Oxoid, Wesel
Petrischalen (Durchmesser 9 cm)	Sarstedt, Nümbrecht

Zusammensetzung des BCYEalpha-Agars

25 g Legionella-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 ACES, 0,25 g Eisenpyrophosphat, 0,4 g L-Cystein und 1,0 g alpha-Ketoglutarat in 100 ml Aqua dest. besteht, steril filtriert zugegeben.

II.1.2 Legionellenanzucht

Die Legionellen lagerten in lysiertem Pferdeblut bei -70 °C. Nach dem Auftauen wurden sie auf BCYEalpha-Agar bei 37 °C und 5 % CO₂ für 5 bis 6 Tage angezüchtet. Für die Versuche wurden frische, 5-Tage-alte Subkulturen auf BCYEalpha-Agar verwendet. Als Kontrolle der Reinkultur diente eine Subkultur auf Columbia-Blutagar auf dem Kontaminanten jedoch keine Legionellen wachsen können.

II.2 Zellkultur

Die hier verwendeten Mono Mac 6-Zellen wurden als Zelllinie aus Monozyten einer monozytären Leukämie etabliert (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1988).

II.2.1 Materialien und Chemikalien für die Zellkultur

Tabelle II.2: Technische Geräte für die Zellkultur

Sterile Werkbank	Heraeus, München
Zentrifuge	Beckman, München
CO ₂ -Brutschrank	Heraeus, München
Photometer Ultraspec 2000	Pharmacia, Freiburg
Mikroskop IMT2	Olympus
Vortex	Bender und Hobein, Zürich

Tabelle II.3: Materialien und Chemikalien für die Zellkultur

Zellkulturflaschen, 75 cm ³	Costar, Bodenheim
24-Loch-Platten	Costar, Bodenheim
6-Loch-Platten	Greiner, Frickenhausen
Einmalpipetten (in ml): 1, 2, 5, 10, 25, 50	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen, Standarttips, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Cup, 2 ml, safelok	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Cup, 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Millex-GP Filter-Unit, 0,22 µm Porengröße	Millipore, Molsheim, Frankreich
Falcon Tubes 2070, Blue max. 50 ml, Polypropylene	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Neubauer-Zählkammer	Bender und Hobein, Zürich
Gentamicin, 50 mg/ml	Invitrogen, Eggenstein
RPMI 1640	Invitrogen, Eggenstein
L-Gutamin 10%	Invitrogen, Eggenstein
Nicht-essentielle Aminosäuren (L-Alanin, L-Asparagin, L-Asparaginsäuren, L-Glutaminsäure, Glycin, L-Prolin, L-Serin)	Invitrogen, Eggenstein
Fötale-Kälber-Serum (Myoclone super plus)	Invitrogen, Eggenstein

OPI-Supplement (Oxalacetat-Pyruvat-Insulin)	Sigma, München
DMSO	Sigma, München

Kulturmedium

Einer Flasche RPMI 1640 wurden 50 ml entnommen. 50 ml Fötale-Kälber-Serum wurden dazugegeben. Anschließend wurden 5 ml L-Glutamin, 5 ml OPI, das zuvor in 10 ml destilliertem Wasser gelöst wurde, und 5 ml nicht-essentielle Aminosäuren steril filtriert zugegeben.

Infektionsmedium

In eine Flasche RPMI 1640 wurden 5 ml Glutamin, 5 ml OPI, welches zuvor in 10 ml destilliertem Wasser gelöst wurde, und 5 ml nicht-essentielle Aminosäuren steril filtriert zugegeben.

II.2.2 Anzucht von MM6-Zellen

Die Mono Mac 6-Zellen wurden als Suspensionskultur bei 37 °C und 5 % CO₂ gehalten und zweimal pro Woche umgesetzt. Es wurde regelmäßig eine lichtmikroskopische Kontrolle auf Verunreinigung sowie eine Sterilkontrolle unter Verwendung von Columbia-Blutagar durchgeführt. Des Weiteren wurde darauf geachtet, daß die Zellen gleichmäßig geformt und nicht verklumpt waren. Flaschen mit verklumpten Zellen wurden weder weiterpassagiert noch für einen Versuch verwendet. Nach maximal 30 Passagen wurden Mono Mac 6-Zellen aus der eingefrorenen Reserve aufgetaut. Dafür wurden zu Beginn mehrere hundert Kulturflaschen als Reserve gleichartiger, synchronisierter Zellen eingefroren: der Inhalt einer gut bewachsenen Flasche wurde bei 400 x g für 10 min. zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 3 ml eiskaltem Zellkulturmedium, dem 10 % DMSO zugesetzt wurden, resuspendiert. Je 1 ml wurde in ein Kryoröhrchen gefüllt und in einer Nalgene Einfrierbox, die eine Einfrierrate von konstant 1°C pro Minute gewährleistet, bei 80°C eingefroren.

Zum Auftauen wurden die Röhrrchen aus dem Stickstoff in der Hand schnell erwärmt, mit Zellkulturmedium in Bluecap-Röhrrchen auf 20 ml aufgefüllt und bei 400 x g für 10 min. zentrifugiert. Die Zellen wurden in 20 ml Medium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Danach konnten die in 10 ml Medium resuspendierten Zellen in eine kleine Zellkulturflasche gegeben und weiter passagiert werden.

II.3 Inhibitoren

Folgende Inhibitoren wurden, wenn nicht anders angegeben, von Tocris Cookson Limited (Ellisville, MO, USA) bezogen. Die jeweiligen Arbeitskonzentrationen wurden aus den angegebenen Publikationen entnommen.

Aus den Inhibitoren wurden mit den angegebenen Lösungsmitteln Stammlösungen hergestellt.

II.3.1 Inhibitorengruppe 1: PTK-Inhibitor

Genistein	PTK-Inhibitor Arbeitskonzentration (Ak): 100 µM (Susa und Marre, 1999; Wang <i>et al.</i> , 1997; Yokoshiki <i>et al.</i> , 1996) Lösungsmittel (Lm): DMSO
Genistin	Inaktives Analogon von Genistein, PTK betreffend Ak: 100 µM (Nakazawa und Ohno, 2003); Lm: DMSO Sigma-Aldrich
Daidzein	Inaktives Analogon von Genistein, PTK betreffend Ak: 100 µM (Wang <i>et al.</i> 1997; Nakazawa und Ohno, 2003); Lm: DMSO Sigma-Aldrich

Herbimycin PTK-Inhibitor
Ak: 2 μ M (Nagaishi *et al.* 1999); Lm: DMSO
Sigma-Aldrich

II.3.2 Inhibitorengruppe 2: Calcium-Inhibition 1

Benzamil hydrochl. Blocker des Natrium/Calcium-Austauschers
Ak: 50 μ M (Giacometti *et al.*, 2000; Collett *et al.*, 2002)
Lm: steriles Wasser
Sigma-Aldrich

Nifedipin L-Typ Calciumkanal-Inhibitor
Ak: 50 μ M (Rikihisa *et al.*, 1995); Lm: DMSO
Sigma-Aldrich

Dantrolen Inhibition der Ryanodin-Rezeptoren
Ak: 50 μ M (Mine *et al.*, 1987; Kojima *et al.*, 1985)
Lm: DMSO
Sigma-Aldrich

EGTA Calcium Chelator
Ak: 1 mM (Rikihisa *et al.*, 1995); Lm: steriles Wasser
Sigma-Aldrich

II.3.3 Inhibitorengruppe 3: Calcium-Inhibition 2

Verapamil hydrochl. L-Typ Calciumkanal-Blocker
Ak: 100 μ M (Rikihisa *et al.*, 1995); Lm: DMSO

Diltiazem hydrochl. L-Typ Calciumkanal-Blocker
Ak: 100 μ M (Rikihisa *et al.*, 1995); Lm: steriles Wasser

A23187, freie Säure Calcium Ionophor
Ak: 0,5 μ M (Garzoni *et al.*, 2003); Lm: DMSO

Flunarizin Blocker des T-typ Calcium-Natrium-Austauschers
Ak: 10 µM (Rikihisa *et al.*, 1995); Lm: DMSO;
Sigma-Aldrich

II.3.4 Inhibitorengruppe 4: Östrogenrezeptoren

ICI 182,780 Östrogenrezeptor-Antagonist
(Faslodex) Ak: 100 nM (Song *et al.*, 2001); Lm: DMSO

DPN Östrogenrezeptor-Agonist (beta - spezifisch)
Ak: 1 µM (Tsai *et al.*, 2004); Lm: steriles Wasser

PPT Östrogenrezeptor-Agonist (alpha - spezifisch)
Ak: 1 µM (Tsai *et al.*, 2004); Lm: DMSO

Tamoxifen citrat Östrogenrezeptor-Antagonist/Agonist
Ak: 0,5 mM (Chen und Wong, 2004); Lm: DMSO

Dequalinium dichl. Blocker Calcium-aktivierender Kaliumkanäle
Ak: 1 µM (Abdul und Hoosein, 2002); Lm: steriles Wasser

Iberiotoxin Blocker Calcium-aktivierter Kaliumkanäle
Ak: 150 nM (Flink und Atchison, 2003)
Lm: steriles Wasser

II.3.5 Inhibitorengruppe 5: Inhibition diverser Ionenkanäle

9-AC Chloridtransporter-Inhibitor
Ak: 1 mM (Malinowska, 1990); Lm: DMSO

QX 314 Blocker spannungsabhängiger Natriumkanäle
Ak: 5 mM (Hu *et al.*, 2002); Lm: steriles Wasser

SKF96365 hydrochl. Inhibitor von rezeptorvermitteltem Calcium Einstrom
 Ak: 20 µM (Ma und Pan, 2003; Pan *et al.*, 2002)
 Lm: steriles Wasser

Glibenclamide Blocker ATP-abh. Kaliumkanäle durch intrazellulären Calciumanstieg
 Ak: 20 µM (Dupré-Aucouturier *et al.*, 2002; Koh *et al.*, 1998); Lm: DMSO

II.4 Infektionsversuche

II.4.1 Geräte und Materialien für die Infektionsversuche

Tabelle II.4: Technische Geräte für die Infektionsversuche

Zentrifuge	Beckman, München
CO ₂ Water-Jacket Incubator	Heraeus, Hanau
Sterile Werkbank	Heraeus, Hanau
Photometer Ultrospec 2000	Pharmacia, Freiburg
Lichtmikroskop	Zeiss, Jena
Invert-Mikroskop IMT-2	Olympus
Pipettboy	Hirschmann,
Vortex	Bender und Hobein, Zürich
Spiralplattierer	dws Meintrup, Laehden-Holte
Ultraschall-Bad	Sonorex
Schüttel-Inkubator	Biosan
Erlenmeyer Schüttelkolben	

Tabelle II.5: Materialien und Chemikalien für die Infektionsversuche

Einmal-Pipetten (in ml): 1, 2, 5, 10, 25, 50	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturflaschen 75 cm ³	Costar, Bodenheim

Falcon Tubes 2070, Blue max. 50 ml, Polypropylene	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Falcon Tubes 2095, max. 15 ml, Polystyrene	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Einmalspritzen: 2 ml, 5 ml, 25 ml	B/Braun, Melsungen
Neubauer-Zählkammer	Bender und Hobein, Zürich
Millex-GP Filter-Unit, 0,22 µm Porengröße	Millipore, Molsheim, Frankreich
24 Well all culture cluster	Costar, Wessel
Pipettenspitzen, Standarttips: 100µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen, 10µl	Eppendorf, Hamburg
Küvetten	Sarstedt, Nürnberg
Impfeschlingen, 10 µl	Sarstedt, Nürnberg
Eppendorf-Cup, 2 ml, safelok	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Cup, 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
6 Well Platte	Greiner, Frickenhausen
Falcon Röhrchen 2052, max. 5 ml, Polystyrene	Falcon, Becton Dickinson, Hamburg
Gentamicin, 50 mg/ml	Invitrogen, Eggenstein
BCYEalpha-Agarplatten	Biotest
Hefeextrakt	Oxid, Wesel
L-Gutamin 10%	Invitrogen, Eggenstein
Nicht-essentielle Aminosäuren (L-Alanin, L-Asparagin, L-Asparaginsäuren, L-Glutaminsäure, Glycin, L-Prolin, L-Serin)	Invitrogen, Eggenstein
Fötale-Kälber-Serum (Myoclon super plus)	Invitrogen, Eggenstein
OPI-Supplement (Oxalacetat-Pyruvat-Insulin)	Sigma, München
Ficoll, Lymphozyten Separationsmedium	PAA, Coelbe
PBS	Invitrogen, Eggenstein
Monocyte Isolation Kit	MiltenyiBiotec

Human Macrophage Medium	PAA, Coelbe
Trypanblau (0,4 %)	Sigma, München
RPMI 1640	Invitrogen, Eggenstein

II. 4.2 Infektion von MM6-Zellen mit *Legionella pneumophila*

Vorbereitung der MM6-Zellen

Die benötigte Anzahl an MM6-Zellen (Richtwert: 1 Kulturflasche von 25 ml enthält $\sim 25 \times 10^6$ Zellen) wurde in Falcon Tubes pipettiert und bei 400 x g für 10 min. abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 25 ml RPMI gelöst und erneut zentrifugiert. Die Bestimmung der genauen Zellzahl erfolgte durch Lösen des Pellets in 10 ml RPMI, wobei mit der Pipette das genaue Volumen bestimmt wurde. Es wurden 100 μ l Zellsuspension mit 900 μ l RPMI in ein Eppendorf-Cup gegeben und gut gemischt. Hiervon wurden 100 μ l mit 100 μ l Trypanblaulösung (0,4 %) in einem weiteren Eppendorf-Cup vermischt. Diese Lösung wurde in eine Neubauerzählkammer gegeben. Die nicht angefärbten Zellen wurden in allen 4 Eckquadraten bestimmt.

Der Mittelwert der Eckquadrate : 5 (Faktor für die Neubauerkammer), mit 10 multipliziert (Verdünnungsfaktor des RPMIs) und mit dem festgestellten Resuspensionsvolumen in ml der zuvor abzentrifugierten Zellen multipliziert ergibt eine Zellzahl. Diese entspricht einer Gesamtzellzahl von $X \times 10^5$ Zellen. Nun konnte man die gewünschte Zellzahl abzentrifugieren.

Vorbereitung der Legionellen

Die Legionellen wurden mit einer Impföse von der BCYEalpha-Agarplatte entnommen, in einem Falcon Tube in RPMI gelöst und auf eine optische Dichte (OD) von 0,2 im Photometer eingestellt. Der Nullabgleich erfolgte gegen RPMI. Bei einer OD von 0,2 enthält die Suspension 3×10^8 koloniebildende Einheiten (KBE/ml). Die benötigte Menge der Suspension wurde bei maximaler Leistung der Zentrifuge für 15 min. abzentrifugiert.

Durchführung

Die abzentrifugierten MM6-Zellen wurden in Infektionsmedium (siehe Zellkultur) gelöst. Diese Suspension wurde nun auf das Legionellenpellet gegeben und vorsichtig mit der Pipette vermischt. Der Ansatz wurde in die Vertiefung einer 6-Loch-Platte pipettiert und 2h bei 37°C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit fand die Phagozytose der Legionellen statt. Nach 2h wurde zum Abtöten der nicht-phagozytierten Legionellen 4,5 ml Gentamicinlösung (100µg/ml) dazugegeben und eine weitere Stunde inkubiert. Anschließend wurde das Gentamicin ausgewaschen. Hierfür wurde die Suspension aus der Vertiefung der 6-Loch-Platte in ein Falcon Tube überführt, mit RPMI auf 25 ml aufgefüllt und bei 400 x g für 10 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dieser Waschschrift wurde 3 mal durchgeführt. Das Pellet wurde in Infektionsmedium auf eine Konzentration von 2 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt und in eine 24-Loch-Platte mit Doppelwerten für die Werte 0h, 24h, 48h und 72h pipettiert und die entsprechende Zeit bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ im Brutschrank belassen.

Ausplattieren der verschiedenen Zeitwerte

Nach 0h, 24h, 48h und 72h wurden die jeweiligen Ansätze in ein Eppendorf-Cup pipettiert. Die mit Legionellen infizierten MM6-Zellen wurden durch Zugabe von 1 ml destilliertem Wasser für 5 min. im Ultraschallbad lysiert. Die lysierten Ansätze wurden gemischt und je nach Zeitwert verdünnt (0h keine Verdünnung, 24h Verdünnung 1:10, 48h Verdünnung 1:100, 72h Verdünnung 1:100).

Die Ansätze wurden mit dem Spiralplattierer auf BCYEalpha-Agarplatten ausplattiert und für 5-7 Tage bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die sichtbaren Kulturen konnten schließlich ausgezählt werden. Hierbei mußten entsprechenden Verdünnungen bei der Berechnung der kolonienbildenden Einheiten pro Milliliter (CFU/ml) berücksichtigt werden.

II. 4.3 Negativkontrolle uninfizierter MM6-Zellen

Zur Kontrolle der Totzellzahl der MM6-Zellen wurden uninfizierte MM6-Zellen parallel zur Infektion der gleichen Behandlung unterzogen.

Nach Bestimmung der genauen Anzahl von MM6-Zellen wurde eine entsprechende Anzahl für die Negativkontrolle ebenfalls abzentrifugiert. Auch hier folgte eine Inkubationszeit von 2h in Infektionsmedium. Dann wurden ebenfalls 4,5 ml Gentamicinlösung (100 µg/ml) zugegeben und eine weitere Stunde Inkubation folgte. Anschließend wurde auch die Negativkontrolle 3 mal gewaschen, in Infektionsmedium gelöst und in eine 24-Loch-Platte gegeben.

Die Bestimmung der Totzellzahl erfolgte nach 0h, 24h, 48h und 72h. Dafür wurden 100 µl der Negativkontrolle mit 100 µl Trypanblaulösung (0,4 %) in einem Eppendorf-Cup gemischt und in eine Neubauerzählkammer gegeben. Das Verhältnis der toten (blauen) gegenüber den lebenden (ungefärbten) Zellen wurde bestimmt.

II. 4.4 Infektion peripheren Monozyten mit *Legionella pneumophila*

Vorbereitung peripherer Monozyten

Humane periphere Monozyten wurden aus Buffy Coats von Blutspendern gewonnen, eine Einverständniserklärung der Spender wurde vorher eingeholt. Hierzu wurde ein Lymphozyten-Separations-Medium (PAA, Coelbe, Deutschland) und das Monozyten Isolation Kit II (Miltenyi Biotec) verwendet. Protokoll siehe Miltenyi Biotec.

Nach erfolgreicher Isolation wurden die aus einem Buffy Coat gewonnenen Monozyten über Nacht in 30 ml humanem Makrophagen-Medium, das mit L-Glutamin versetzt wurde, bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ im Brutschrank aufbewahrt.

Am nächsten Morgen wurden die Monozyten bei 400 x g für 10 min. zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 25 ml RPMI gelöst und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt 3 mal wiederholt. Die Bestimmung der genauen Zellzahl erfolgte durch Resuspendieren des Pellets in 10 ml RPMI, wobei mit der Pipette das genaue Volumen bestimmt wurde. Vorgehen siehe Zellzahlbestimmung MM6 (II. 4.2).

Vorbereitung der Legionellen

Siehe Vorbereitung der Legionellen bei Infektion mit MM6-Zellen (II. 4.2).

Durchführung

Die Infektion von peripheren Monozyten mit Legionellen entspricht dem Vorgehen bei der Infektion von MM6-Zellen mit Legionellen (II. 4.2).

Ausplattieren der verschiedenen Zeitwerte

Das Ausplattieren der verschiedenen Zeitwerte entspricht dem Vorgehen bei der Infektion von MM6-Zellen mit Legionellen (II. 4.2).

II. 4.5 Negativkontrolle uninfizierter peripherer Monozyten

Das Vorgehen entspricht dem Vorgehen bei der Negativkontrolle uninfizierter MM6-Zellen (siehe II. 4.3) mit der Ausnahme, dass uninfizierten Monozyten, wie auch infizierten Monozyten, in Kulturmedium gelöst in die 24-Loch-Platte pipettiert wurden und nicht in Infektionsmedium gelöst wurden.

II. 4.6 Phagozytose Assay

Mit einem Phagozytose Assay kann die Phagozytoserate analysiert werden. In dem vorliegenden Fall wurden die getesteten Substanzen auf ihren Einfluß auf die Phagozytose von Legionellen in MM6-Zellen untersucht.

Die Vorbereitungen der Legionellen und MM6-Zellen entsprechen der Vorbereitung bei der Infektion (siehe II. 4.2).

Durchführung

Uninfizierten MM6-Zellen wurden 30 min. in einer 6-Loch-Platte bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ mit Infektionsmedium, das mit der jeweils zu testenden Substanz versetzt war, inkubiert.

Nach dieser 30 minütigen Inkubationszeit wurden die MM6-Zellen auf das Legionellenpellet gegeben und durch Vortexen gut gemischt. Der Ansatz wurde nun in eine 6-Loch-Platte pipettiert und 2h bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 4,5 ml

Gentamicinlösung (100µl/ml) zugegeben und der Ansatz wurde eine weitere Stunde inkubiert. Dann wurde der Ansatz in ein Falcon Tube pipettiert, mit RPMI auf 25 ml aufgefüllt und bei 400 x g für 10 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dieser Vorgang wurde noch 2 mal wiederholt.

Das Pellet wurde in Infektionsmedium (1 ml pro Infektionsansatz) resuspendiert und in eine 24-Loch-Platte mit Doppelwerten für die Werte 0h, 24h, 48h und 72h pipettiert und die entsprechende Zeit bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ im Brutschrank belassen.

Ausplattieren der verschiedenen Zeitwerte

Nach 0h, 24h, 48h und 72h wurden die jeweiligen Ansätze mit je 1 ml destilliertem Wasser in ein Eppendorf-Cup pipettiert und 5 min. unter Ultraschalleinwirkung lysiert. Die lysierten Ansätze wurden gevortext und je nach Zeitwert verdünnt (0h keine Verdünnung, 24h Verdünnung 1:10, 48h Verdünnung 1:100, 72h Verdünnung 1:100).

Die Ansätze wurden mit Hilfe des Spiralplattierers auf BCYEalpha-Agarlatten ausplattiert. Diese inkubierten 5-7 Tage bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ im Brutschrank. Die sichtbaren Kulturen konnten schließlich gezählt werden. Hierbei mußten die entsprechenden Verdünnungen bei der Berechnung der kolonienbildenden Einheiten pro Milliliter (CFU/ml) berücksichtigt werden.

II. 4.7 Legionellen-Überlebenskurve

Der Ansatz der Legionellen-Überlebenskurve erfolgte in Flüssigkultur mit BYE-Medium.

BYE-Medium

9 g Hefe wurden in 900 ml destilliertem Wasser gelöst und 40 min. autoklaviert. Nach Abkühlen des Mediums wurde das hitzeempfindliche (Legionella) Supplement zugegeben, welches zuvor in sterilem, destilliertem Wasser gelöst wurde.

Vorbereitung der Legionellen

Um eine optimale Wachstumskurve zu erhalten wurden die Legionellen in einer Übernachtkultur angezüchtet. Hierfür wurden mit einer Impföse Legionellen von der BCYEalpha-Agarplatte abgenommen und diese in 30 ml BYE-Bouillion in einem Erlenmeyer-Schüttelkolben suspendiert. Die Legionellen wurden über Nacht im Schüttel-Inkubator bei 37°C und einer Geschwindigkeit von 220 R.P.M. angezüchtet.

Durchführung

In einem Erlenmeyer-Schüttelkolben wurden 30 ml BYE-Bouillion pipettiert. Die benötigte Anzahl der Legionellen, die aus der Übernachtkultur dazugegeben wurden, entspricht einer OD₅₇₈ von 0,02. Im Schüttel-Inkubator wurde die Flüssigkultur 2 Tage angezüchtet.

Bestimmung der Legionellen-Anzahl

Die Bestimmung der Legionellen-Anzahl erfolgte nach 0h, 8h, 24h, 28h und 32h. Dabei wurde aus der Flüssigkultur 1 ml entnommen und im Photometer gegen BYE-Bouillion gemessen.

II.4.8 Statistische Auswertung der gewachsenen Kolonien

Die Anzahl der Bakterien (CFU/ml) wurde durch die Maximum-Likelihood-Methode unter Annahme der Poissonverteilung ermittelt.

II.5 Konfokalmikroskopie

II.5.1 Materialien und Geräte für die Konfokalmikroskopie

Tabelle II.6: Geräte für die Konfokalmikroskopie

True Confocal Scanner TCS SP II	Leica, Heidelberg
Deckglas	Science Services, München
Objektträger	Science Services, München

Tabelle II.7: Materialien für die Konfokalmikroskopie

Calcium Orange, long-wavelength Calcium Indicator	Molecular Probes, Leiden
Pluronic 127	Molecular Probes, Leiden
Hank`s Balanced Salt Solution (HBSS)	Invitrogen, Eggenstein

II.5.2 Durchführung

Infektion von MM6-Zellen mit GFP-Legionellen

Die Infektion erfolgte wie oben beschrieben (siehe II. 4.2). Die infizierten, in Infektionsmedium gelösten Zellen wurden 48h bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Färbung der infizierten Zellen

Nach 48h wurden die Zellen bei 400 x g für 5 min. zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 25 ml HBSS mit Calcium und Magnesium gelöst und bei 400 x g für 5 min. erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Das nun gewonnene Pellet wurde in 2,5 ml HBSS gelöst.

Das verwendete Calcium orange ist ein Calcium-Indikator für lange Wellenlängen. Die Anregungswellenlänge liegt bei 549 nm, die Emissionswellenlänge bei 576 nm. Das in 2 µl DMSO gelöste Calcium Orange (100 µg) wurde mit 1 µl Pluronic versetzt. Diese Lösung wurde nun zu dem gelösten Pellet gegeben und bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ unter Schütteln 20 min. inkubiert.

Anschließend wurde die Lösung mit 25 ml HBSS verdünnt und bei 400 x g für 5 min. zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, und das Pellet in 100 µl HBSS gelöst.

Messung

Ein Tropfen der gefärbten Zellen wurde auf einen Objektträger appliziert. Die Messung erfolgte unter folgenden Einstellungen mit einem C-Apo x 63 Öl-Immersion Objektiv:

Wellenlänge EGFP (Anregen der Legionellen-Phagosomen):

$\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$

Wellenlänge Calcium Orange:

$\lambda_{\text{ex}} = 543 \text{ nm}$

Gain Calcium Orange: 810, 7

Offset Calcium Orange: - 96, 2

Legionelleninfizierte MM6-Zellen konnten anhand der bakteriellen EGFP-Fluoreszenz lokalisiert werden. Nach Fokussieren der Optik in die Phagosomenebene wurden Bilder der bakteriellen EGFP-Fluoreszenz und anschliessend der Calciumorange-Fluoreszenz der ganzen Zelle in getrennten Kanälen der Laserscan-Evaluations-Software aquiriert und anschliessend ausgewertet.

III. Ergebnisse

III.1 Infektionsversuche mit Tyrosinkinase-Inhibitoren

In den ersten Versuchen wurden verschiedene Tyrosinkinase-Inhibitoren getestet. Nach Infektion von MM6-Zellen mit Legionellen wurden die in Infektionsmedium gelösten Inhibitoren appliziert. Nach 0h, 24h, 48h und 72h wurden diese Ansätze ausplattiert. Zu sehen ist die DMSO-Kontrolle mit einem normalen intrazellulären Legionellenwachstum. Dabei fand über 72h eine Vermehrung von 1×10^2 auf $2,3 \times 10^7$ statt.

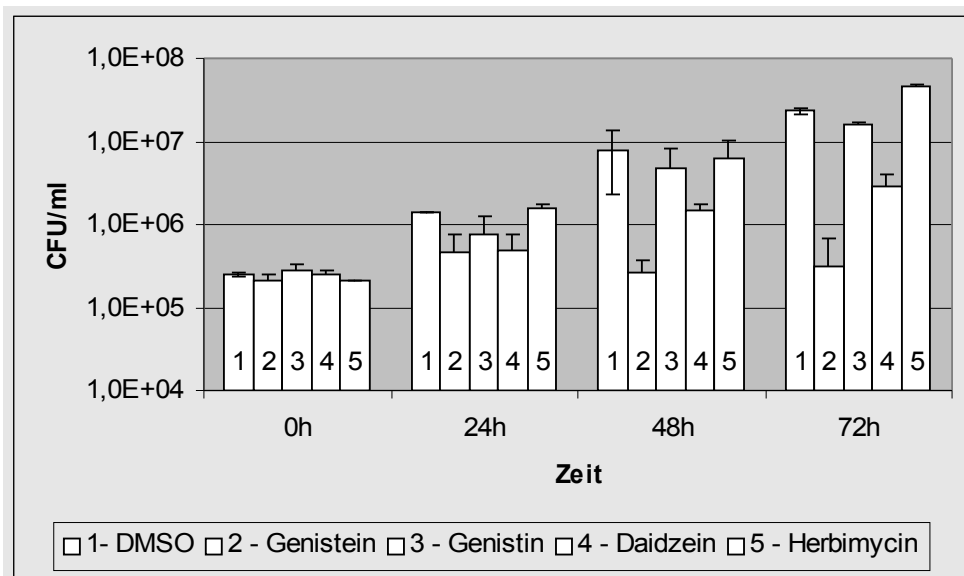


Abb. 1: Infektion von MM6-Zellen mit Tyrosinkinase-Inhibitoren bzw. deren Analoga

Der TK-Inhibitor Genistein zeigte eine deutliche Wachstumshemmung intrazellulärer Legionellen. Es war keine Wachstumssteigerung über 72h zu beobachten, das Wachstum lag nach 72h unter 1×10^6 und entsprach somit dem 0h-Wert. Herbimycin, ein weiterer TK-Inhibitor, zeigte dagegen keine Wachstumshemmung. Das hier beobachtete Wachstum lag nach 72h mit $4,6 \times 10^7$ sogar über dem normalen Legionellenwachstum.

Die Infektionsversuche mit inaktiven Strukturanaloga des Genisteins in Bezug auf die TK-Aktivität zeigten eine unterschiedlich starke Wachstumshemmung. Genistin zeigte eine leichte Hemmung. Nach 72h lag das Wachstum mit $1,6 \times 10^7$ leicht unter dem normalen Legionellenwachstum mit $2,3 \times 10^7$. Bei Daidzein hingegen war eine deutliche Wachstumshemmung zu beobachten. Nach 72h lag das Wachstum mit $2,9 \times 10^6$ deutlich unter dem normalen Legionellenwachstum.

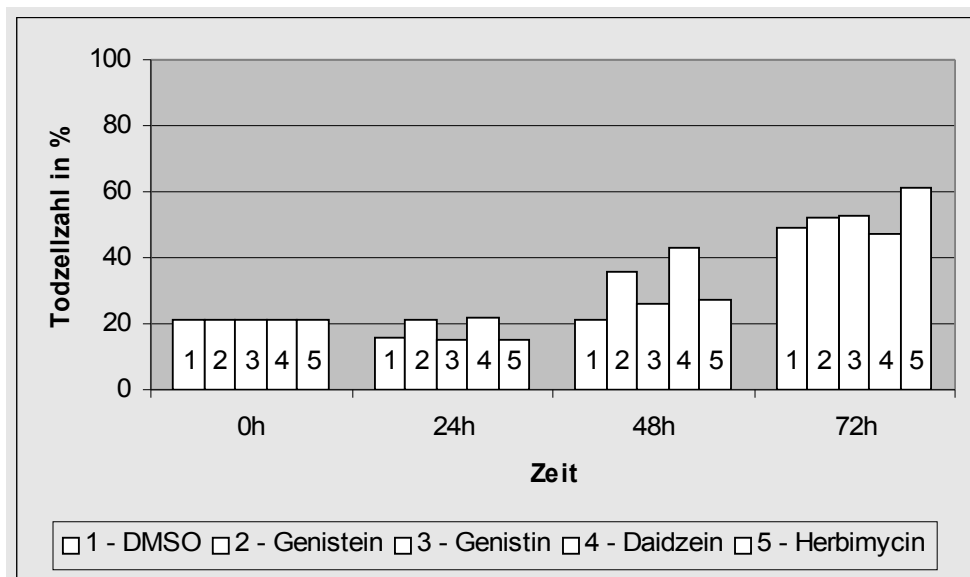


Abb. 2: Lebendkontrolle der Infektion (Abb. 1)

Betrachtet man hierzu die Totzellzahl uninfizierter MM6-Zellen kann man erkennen, dass diese nach 72h bei etwa 50% lag. Besonders Genistein, Genistin und Daidzein lagen mit 52%, 53% und 47% dicht beieinander. Herbimycin hatte eine etwas erhöhte Totzellzahl und lag bei 61%.

III.2 Infektionsversuche mit Östrogenrezeptoragonisten/-Antagonisten

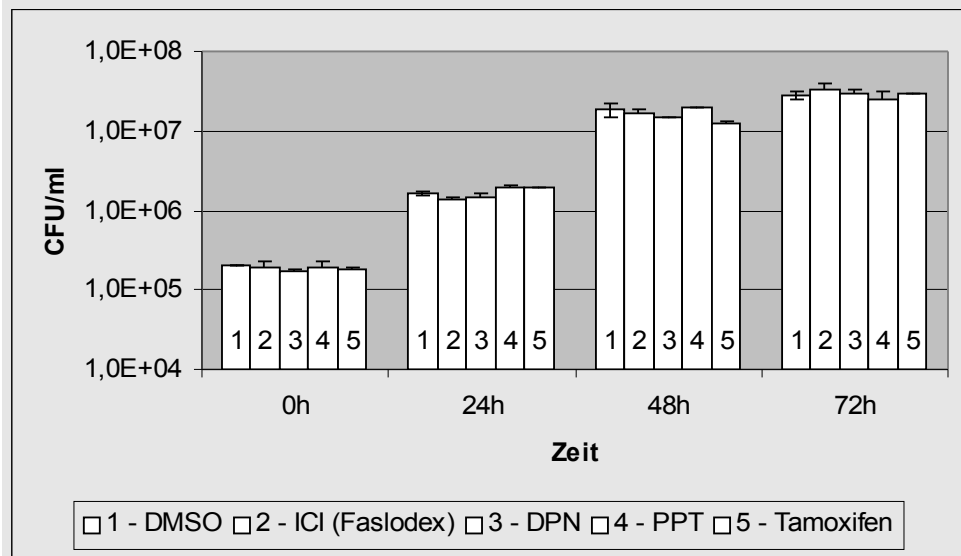


Abb. 3: Infektion von MM6-Zellen mit Östrogenrezeptor-Agonisten und -Antagonisten

Die bekannten Effekte von Genistein auf Östrogenrezeptoren wurden als möglicher Mechanismus in Bezug auf die beobachtete Wachstumshemmung vermutet. Zur genaueren Untersuchung dieser Effekte wurden Östrogenrezeptoragonisten, wie auch -Antagonisten verwendet. Die Infektionen mit Östrogenrezeptoragonisten und -Antagonisten zeigten während 72h keinen Einfluß auf das Wachstum intrazellulärer Legionellen. Die DMSO-Kontrolle hatte sich um 1×10^2 auf $2,8 \times 10^7$ vermehrt. ICI (Faslodex) als Östrogenrezeptor-Antagonist lag mit dem 72h-Wert bei $3,3 \times 10^7$. Etwas niedriger lagen DPN als beta-spezifischer Östrogenrezeptor-Agonist und PPT als alpha-spezifischer Östrogenrezeptor-Agonist. Hier lagen die 72h-Werte bei $2,9 \times 10^7$ bzw. $2,5 \times 10^7$. Tamoxifen, ein Östrogenrezeptor-Antagonist bzw. -Agonist, lag mit seinem 72h-Wert bei $2,9 \times 10^7$.

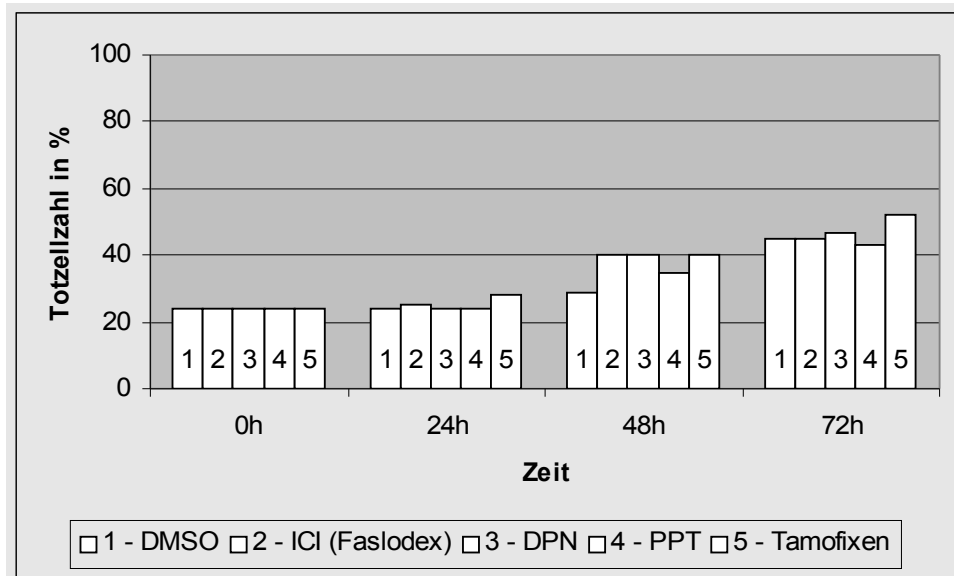


Abb. 4: Lebendkontrolle der Infektion (Abb. 3)

Wirft man hier einen Blick auf die Totzellzahl, kann man erkennen, dass diese bei den unbehandelten MM6-Zellen bei 47% lag. Alle weiteren Substanzen lagen ebenfalls unter 50%, wobei Tamoxifen mit 52% die größte Totzellzahl induzierte.

III.3 Infektionsversuche mit Inhibitoren verschiedener Calciumkanäle

Die Inhibitoren der verschiedenen Calciumkanäle wurden in zwei Gruppen untersucht. In der ersten Gruppe wurden Benzamil (ein Inhibitor des Natrium-Calcium-Austauschers), Nifedipin (ein Calcium-Ionenkanal-Blocker), Dantrolen (hemmt intrazellulär Ryanodin-Rezeptoren) und EGTA (ein Calcium-Chelatoren) untersucht. In der zweiten Gruppe wurden Verapamil und Diltiazem (L-Typ Calcium-Ionenkanal-Blocker), A 23187 (ein Calcium-Ionophor) und Flunarizin (ein Inhibitor des Natrium-Calcium-Austauschers) verwendet.

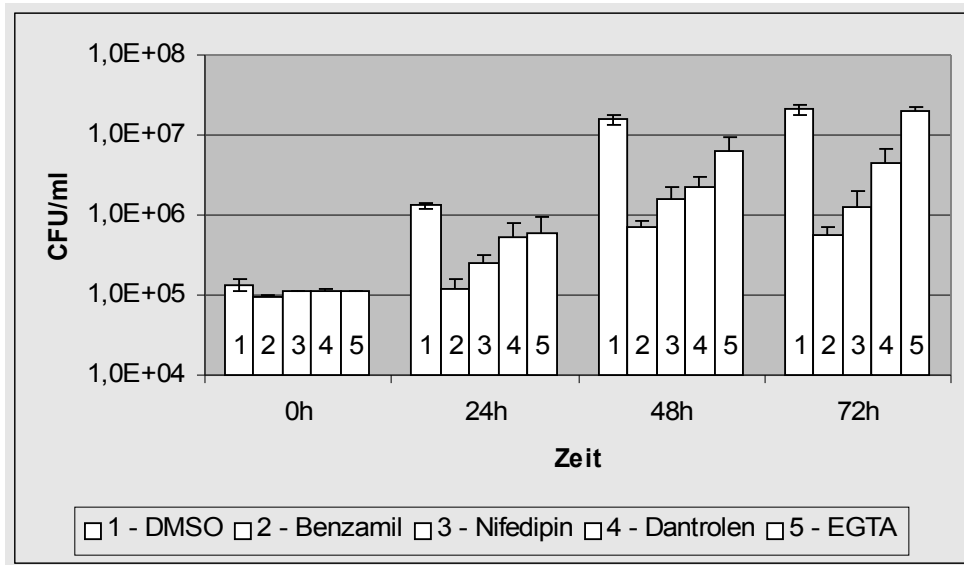


Abb. 5: Infektion von MM6-Zellen mit Inhibitoren verschiedener Calciumkanäle
Gruppe 1

Bei der ersten Gruppe war bei der Kontrollinfektion mit DMSO ein normales Legionellenwachstum über 72h von $2,2 \times 10^7$ zu erkennen. Benzamil als Inhibitor des Natrium-Calcium-Austauschers und Nifedipin als Calcium-Ionenkanal-Blocker zeigten nach 72h eine deutliche Wachstumshemmung. Benzamil lag mit einem 72h-Wert bei $5,7 \times 10^5$ und Nifedipin bei $1,2 \times 10^6$. Der Ryanodin-Rezeptor-Blocker Dantrolen zeigte auch eine Wachstumshemmung, die mit einem 72h-Wert von $4,5 \times 10^6$ im Vergleich zum normalen Legionellenwachstum bei 72h um 1×10^1 niedriger lag. EGTA als Calcium-Chelat-Bildner ließ mit einem 72h-Wert von $1,9 \times 10^7$ keine Wachstumshemmung erkennen.

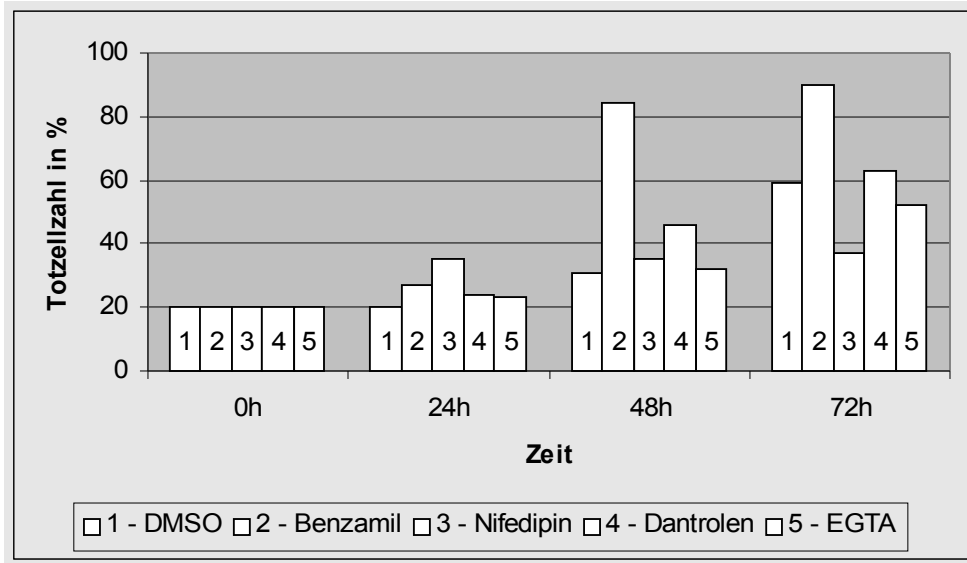


Abb. 6: Lebendkontrolle der Infektion (Abb.5)

Betrachtet man die Totzellzahl, kann man erkennen, dass die DMSO-Kontrolle bei 55% lag. Dantrolen mit 63% und EGTA mit 52% lagen auf einem Level. Benzamil war auf 90% angestiegen. Nifedipin dagegen lag unter 40%.

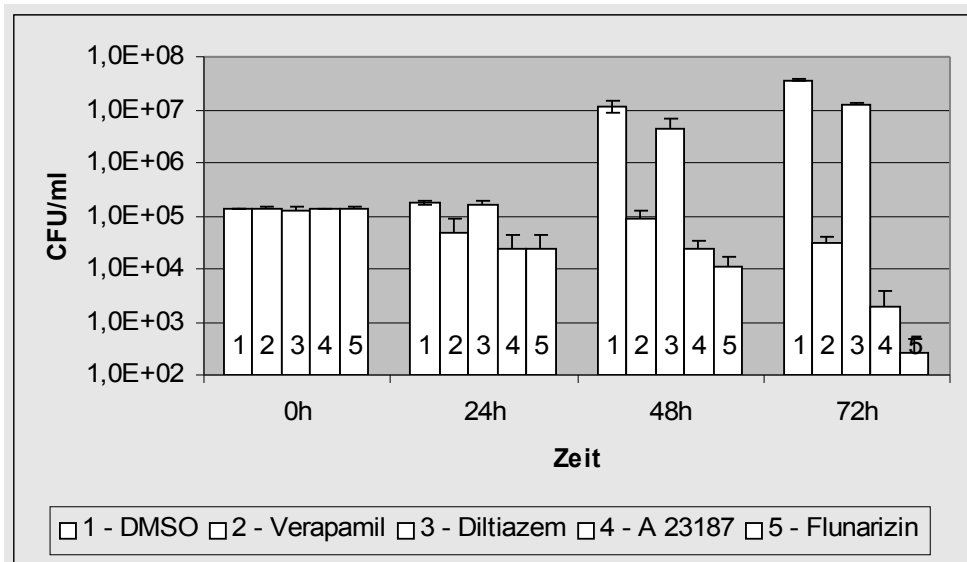


Abb. 7: Infektion von MM6-Zellen mit Inhibitoren verschiedener Calciumkanäle
Gruppe 2

Bei der zweiten Gruppe war auch ein normales, intrazelluläres Legionellenwachstum unter DMSO mit einem 72h-Wert von $3,6 \times 10^7$ zu

erkennen. Zu einer ausgeprägten Wachstumshemmung kam es beim Calcium-Ionophore A 23187 und bei Flunarizin, einem Inhibitor des Natrium-Calcium-Austauschers. Der 72h-Wert von A 23186 lag bei $1,8 \times 10^3$, der von Flunarizine bei $2,6 \times 10^2$. Der Calcium-Ionenkanal-Blocker Verapamil hemmte ebenfalls deutlich das Legionellenwachstum, hier lag der 72h-Wert bei $7,4 \times 10^3$. Diltiazem als weiterer Calcium-Ionenkanal-Blocker hemmte mit einem 72h-Wert von $1,4 \times 10^7$ ebenfalls das intrazelluläre Legionellenwachstum.

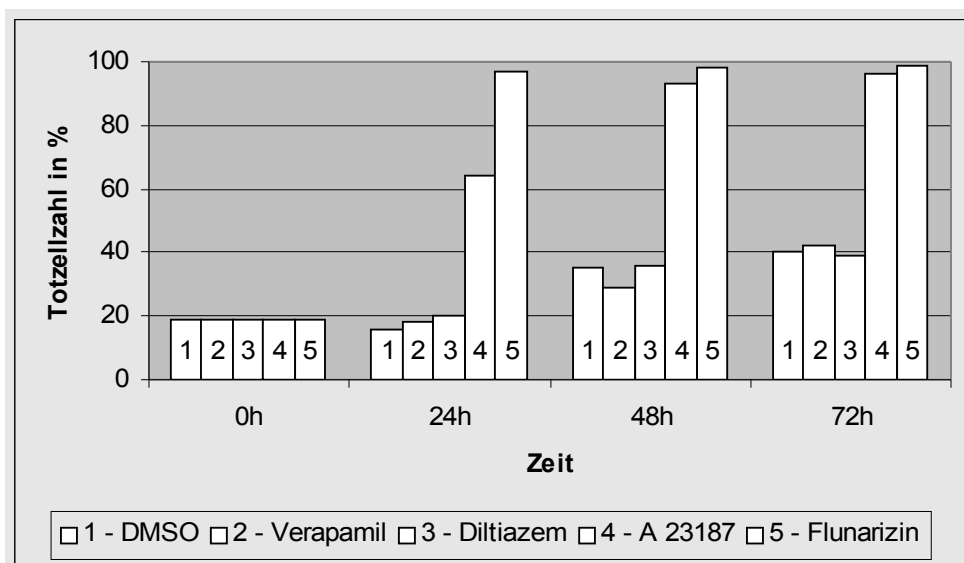


Abb. 8: Lebendkontrolle der Infektion (Abb. 7)

Bei Betrachtung der Totzellzahl kann man erkennen, dass die DMSO-Kontrolle bei 40% lag. Verapamil und Diltiazem lagen mit 42% bzw. 39% ebenfalls in diesem Bereich. A 23187 und Flunarizin hatten dagegen beide eine Totzellzahl von über 90%.

III.4 Infektionsversuche mit Inhibitoren weiterer Ionenkanäle

Zum einen wurden zwei Substanzen, die beide den Calcium-aktivierten Kaliumkanal blocken, Dequalinium und Iberotoxin, untersucht. Zum anderen wurden Substanzen mit verschiedenen Wirkungen untersucht: 9-AC (ein Chloridkanal-Inhibitor), QX 314 (ein Natriumkanal-Inhibitor), SKF 96365 (hemmt

den rezeptorvermittelten Calcium-Einstrom) und Glibenclamide (ein Blocker des ATP-abhängigen Kaliumkanals).

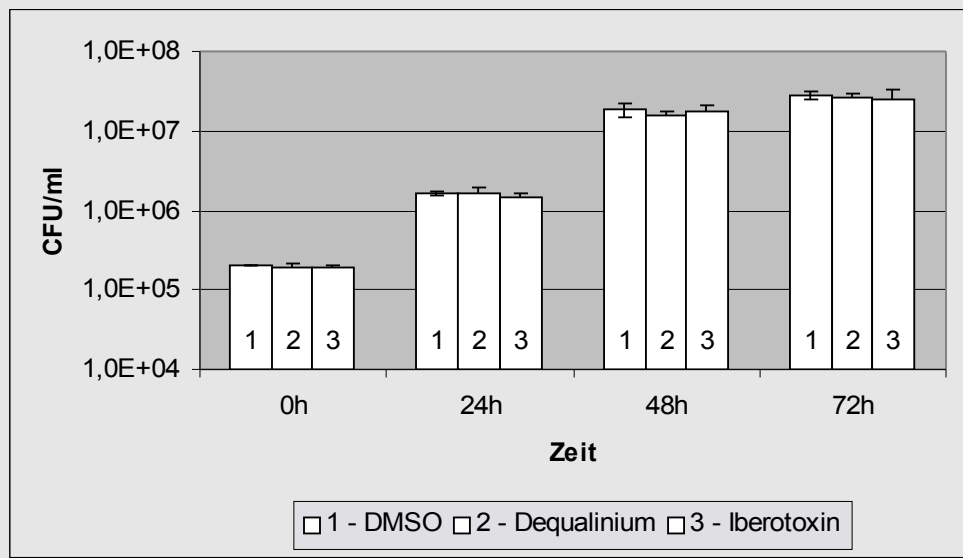


Abb. 9: Infektion von MM6-Zellen mit Inhibitoren von Kaliumkanälen

Bei diesem Ansatz konnte man ein normales intrazelluläres Legionellenwachstum mit einem 72h-Wert von $2,8 \times 10^7$ erkennen. Beide Kaliumkanal-Blocker, Dequalinium und Iberotoxin, zeigten keinen wachstumshemmenden Effekt. Dequalinium lag nach 72h bei $2,7 \times 10^7$ und Iberotoxin bei $2,5 \times 10^7$.

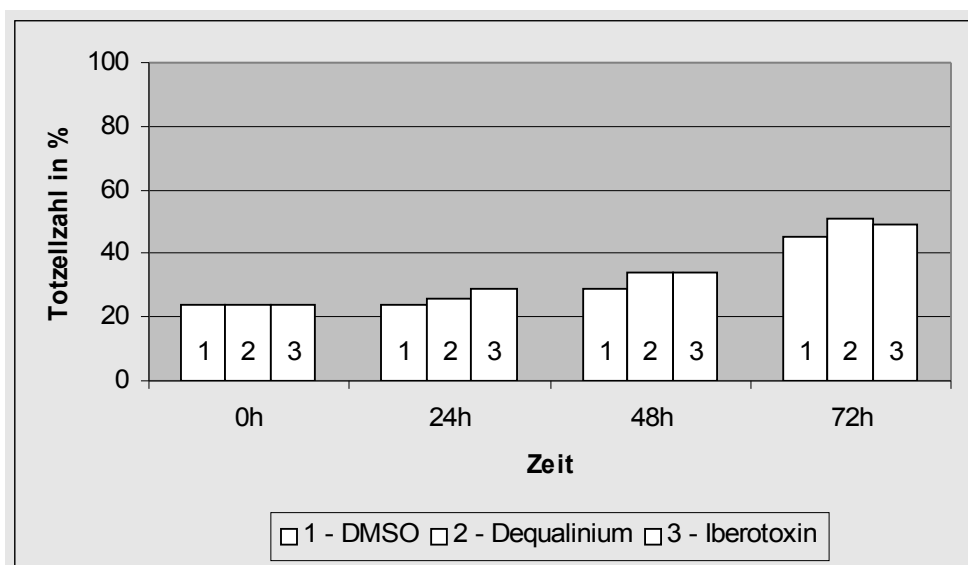


Abb. 10: Lebendkontrolle der Infektion (Abb. 9)

Die Totzellzahl lag bei der Kontrolle nach 72h bei 45%. Die Inhibitoren induzieren ebenfalls eine Totzellzahl in diesem Bereich (51% bzw. 49%).

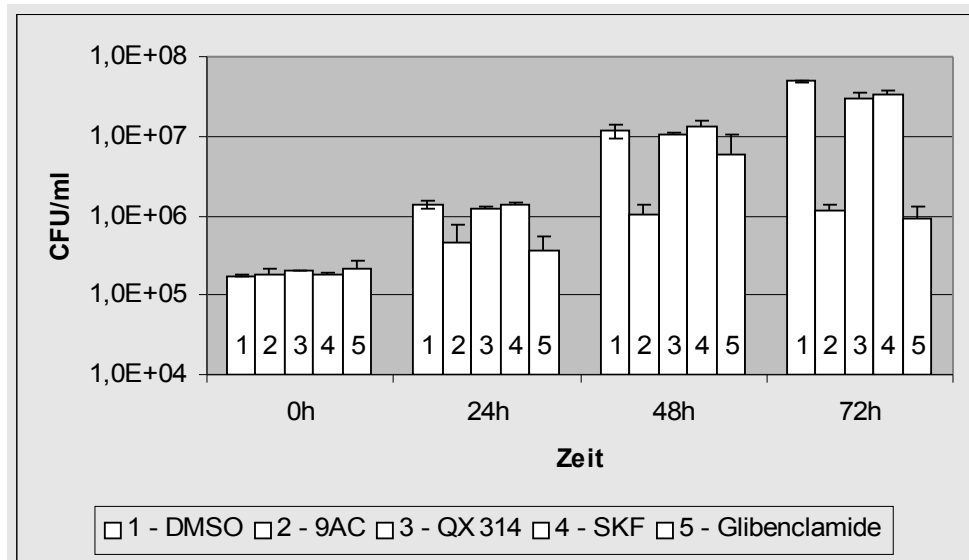


Abb. 11: Infektion von MM6-Zellen mit Inhibitoren verschiedener Ionenkanäle

Bei dieser Infektion konnte man nach 72h ein normales intrazelluläres Legionellenwachstum von $4,9 \times 10^7$ beobachten. Der Chloridkanal-Inhibitor 9-AC und der Kaliumkanal-Blocker Glibenclamide zeigten beide eine deutliche Wachstumshemmung. Beide Substanzen hemmten das Wachstum um etwa das Fünfzehnfache. Bei 9-AC beobachtete man nach 72h ein Legionellenwachstum von $1,1 \times 10^6$, bei Glibenclamide von $9,1 \times 10^5$. Dagegen hatten der Natriumkanal-Inhibitor QX 314 und der Calciuminhibitor SKF nur wenig Einfluß auf das intrazelluläre Wachstum von Legionellen. Sie zeigten nach 72h ein Legionellenwachstum von $2,9 \times 10^7$ bzw. $3,2 \times 10^7$ und waren somit nicht deutlich erniedrigt.

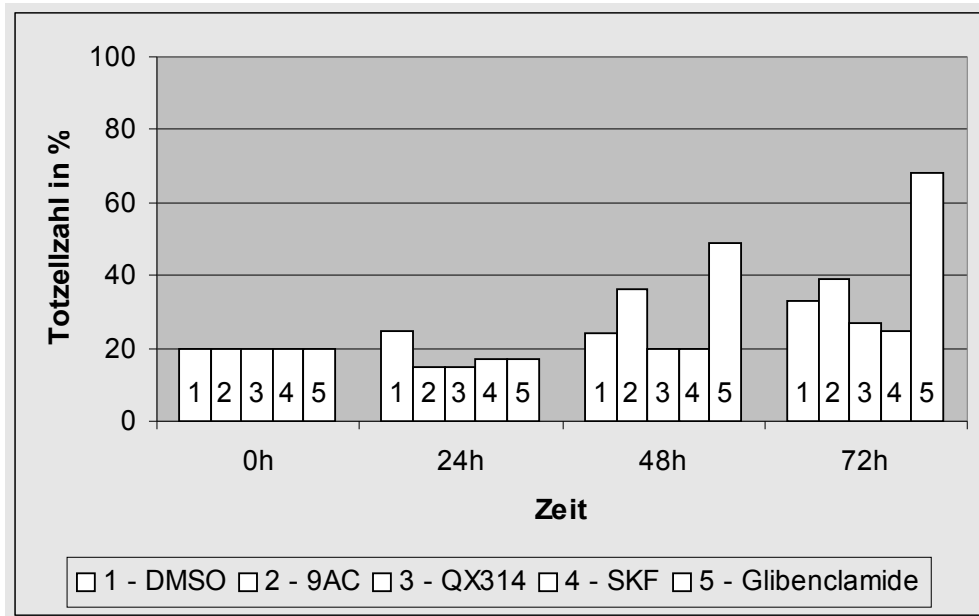


Abb. 12: Lebendkontrolle der Infektion (Abb. 11)

Ein Blick auf die Totzellzahl läßt erkennen, dass Glibenclamide mit 68% deutlich über der Totzellzahl der unbehandelten MM6-Zellen mit 33% lag. Die übrigen Substanzen lagen im Bereich von 25-40%.

III.5 Folgeversuche mit vielversprechenden Substanzen

Vielversprechende Substanzen sind diejenigen Substanzen, die zum einen eine deutliche Hemmung des intrazellulären Legionellenwachstums verursachen, aber deren Totzellzahl nicht zu hoch war, sondern auf einem Level mit der DMSO-Kontrolle.

Aus dem Versuch mit den Tyrosinkinase-Inhibitoren kommen daher Genistein und auch Daidzein in Frage. Genistin zeigte dagegen nur einen leicht hemmenden Effekt auf das Wachstum. Herbimycin hatte keinen hemmenden Effekt auf das Wachstum, im Gegenteil, es war im Vergleich zur Kontrolle ein vermehrtes Wachstum zu beobachten. Da Genistein und Daidzein auch eine akzeptable Totzellzahl erreichten sind diese beiden Substanzen sehr vielversprechend.

Aus dem Versuch mit den Östrogenrezeptor-Agonisten bzw. -Antagonisten ist keine Substanz vielversprechend, da es hier nicht zu einer Wachstumshemmung kam.

Aus dem ersten Versuch mit verschiedenen Calciumkanal-Inhibitoren kommen Nifedipin und Dantrolen in Frage. Beide hatten einen deutlichen hemmenden Effekt auf das intrazelluläre Legionellenwachstum und lagen mit ihrer Totzellzahl in einem niedrigen Bereich. Zwar besaß Benzamil auch einen starken wachstumshemmenden Effekt, aber die Totzellzahl war mit 90% zu hoch. In verschiedenen Versuchen war keine verminderte Totzellzahl zu beobachten. EGTA hatte keinen Effekt auf das Wachstum der Legionellen.

Im zweiten Versuch mit verschiedenen Calciumkanal-Inhibitoren konnte man bei allen getesteten Substanzen eine Hemmung des intrazellulären Wachstums erkennen. Allerdings sind die Substanzen A 23187 und Flunarizine nicht brauchbar, da beide eine Totzellzahl von nahezu 100% hatten, die auch in weiteren Versuchen nicht geringer war. Somit gehören aus dieser Gruppe nur Verapamil und Diltiazem zu den vielversprechenden Substanzen.

Aus dem ersten Versuch mit weiteren Ionenkanal-Inhibitoren konnte bei beiden Blockern des Calcium-aktivierenden Kaliumkanals keine Hemmung beobachtet werden.

Aus dem zweiten Versuch mit weiteren Ionenkanal-Inhibitoren hatten die Substanzen 9-AC und Glibenclamide einen hemmenden Effekt auf das Legionellenwachstum. Beachtete man aber die Totzellzahl, musste man erkennen, dass diese bei Glibenclamide viel zu hoch lag. Deswegen ist aus dieser Gruppe nur 9-AC eine vielversprechende Substanz.

Zusammenfassend ergeben sich 2 Gruppen von vielversprechenden Substanzen:

- Gruppe 1 Genistein (Tyrosinkinase-Inhibitor)
- Daidzein (inakt. Analogon von Genistein in Bezug auf TK-Aktivität)
- Nifedipin (Calcium-Ionenkanal-Blocker)
- Dantrolen (Inhibitor intrazellulärer Ryanodin-Rezeptoren)

- Gruppe 2 Verapamil (Calcium-Ionenkanal-Blocker)
- Diltiazem (Calcium-Ionenkanal-Blocker)
- 9-AC (Chloridkanal-Inhibitor)

Mit diesen Substanzen wurden weitere Versuche durchgeführt, um den hemmenden Effekt auf das intrazelluläre Legionellenwachstum zu bestätigen und um andere Wirkungen, die zu einer scheinbaren Wachstumshemmung führen könnten, auszuschließen.

III.5.1 Phagozytose Assay

Einer der wichtigsten Folgeversuche war der Phagozytose Assay. Mittels dieses Assays konnte gezeigt werden, ob die Substanzen einen hemmenden Effekt auf die Phagozytose der Legionellen durch die potentiellen Wirtszellen hatten. Hierfür wurden MM6-Zellen zunächst mit den Inhibitoren 30 Min. inkubiert, anschließend wurden Legionellen appliziert. Es wurden auch 0h-, 24h-, 48h- und 72h-Werte ausplattiert.

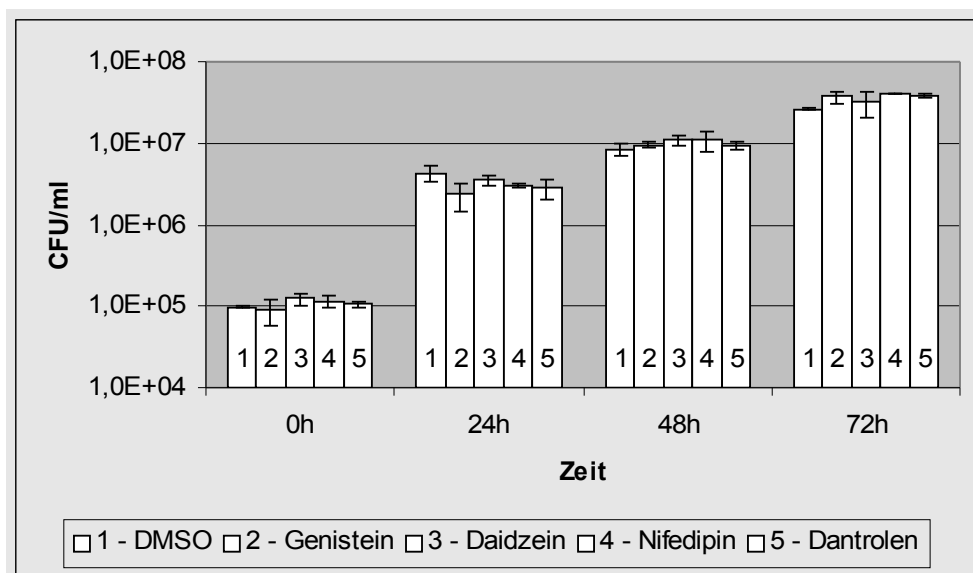


Abb. 13: Phagozytose Assay mit Inhibitoren der Gruppe 1

Der Infektionsansatz zeigte keine Phagozytosehemmung. Nach 72h konnte ein normales Legionellenwachstum von $2,6 \times 10^7$ beobachtet werden. Genistein, Nifedipin und Dantrolen zeigten nach 72h mit einem Legionellenwachstum von

$3,7 \times 10^7$, $4,0 \times 10^7$ und $3,8 \times 10^7$ ein normales Wachstum. Man konnte bei allen ein leicht erhöhtes Legionellenwachstum erkennen. Daidzein war mit einem Legionellenwachstum von $3,7 \times 10^7$ nicht deutlich erhöht.

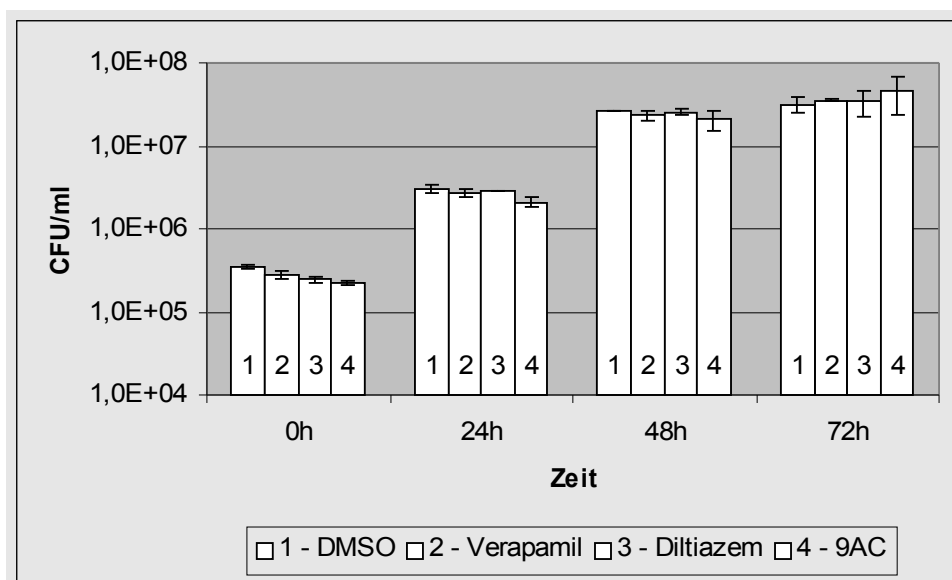


Abb. 14: Phagozytose Assay mit Inhibitoren der Gruppe 2

Der Ansatz zeigte nach 72h ebenfalls keine Hemmung der Phagozytose. Ein normales Legionellenwachstum von $3,2 \times 10^7$ konnte nach 72h beobachtet werden. Alle weiteren Substanzen zeigten ebenfalls keine Wachstumshemmung. Nach 72h lag auch hier keine signifikante Abweichung vom normalen Legionellenwachstum vor.

III.5.2 Legionellen-Überlebenskurve

Mit der Legionellen-Überlebenskurve konnte gezeigt werden, ob ein direkter Effekt der Substanzen auf die Legionellen vorhanden ist. Hierfür wurden die Legionellen in einer Flüssigkultur ohne Wirtszellen mit den Substanzen inkubiert. Die Substanzen sollten über den Wirtsorganismus auf die Legionellen wirken und nicht direkt. Eine bakteriozide Wirkung sollte nicht vorliegen.

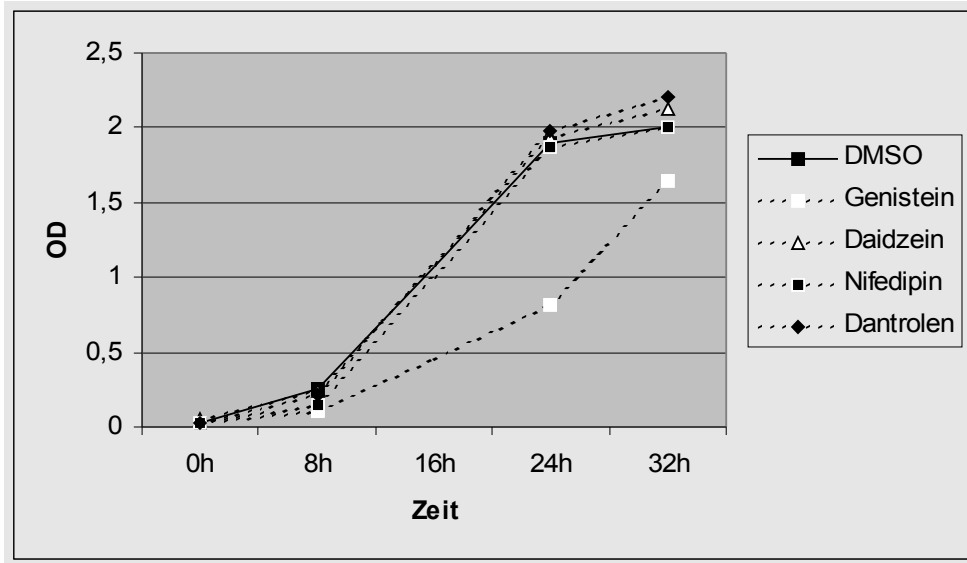


Abb. 15: Legionellen-Überlebenskurve mit Inhibitoren der Gruppe 1

In diesem Ansatz wurde eine Wachstumskurve unter Behandlung mit DMSO beobachtet. Ein Anstieg der optischen Dichte (OD) erfolgte nach etwa 8h. Nach 24h war mit der OD von 1,9 der Höhepunkt des Wachstums erreicht. Bis 32h nach Beginn folgte ein weiterer Anstieg auf 2,0. Die Substanzen Daidzein, Nifedipin und Dantrolen hatten einen ähnlichen Verlauf, nach 32h war eine OD von 2,1 , 2,0 bzw. 2,2 zu erkennen. Genistein dagegen stieg langsam an, nach 24h war ein Anstieg auf 0,8 zu erkennen. Die Kultur erreichte aber nach 32h einen Höhepunkt von 1,7.

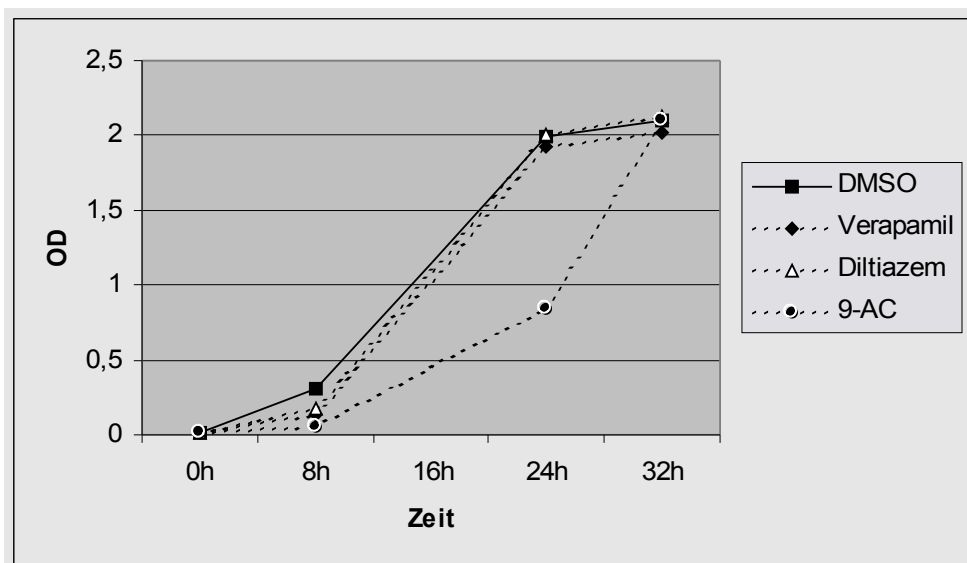


Abb. 16: Legionellen-Überlebenskurve mit Inhibitoren der Gruppe 2

In diesem Ansatz war in der Kontrolle ein normales Wachstum mit einem 32h-Wert von 2,0 zu sehen. Die Substanzen Verapamil und Diltiazem hatten einen ähnlichen Verlauf. Ihr 32h-Wert betrug 2,0 bzw. 2,1. 9-AC allerdings stieg langsamer an und erreichte bei 32h ein Wachstum von 2,1.

III.5.3 Infektion peripherer Monozyten

Mit der Infektion von peripheren Monozyten soll gezeigt werden, dass die Inhibitoren auch in peripheren Monozyten, als Beispiel für ausdifferenziert Zellen, wirken.

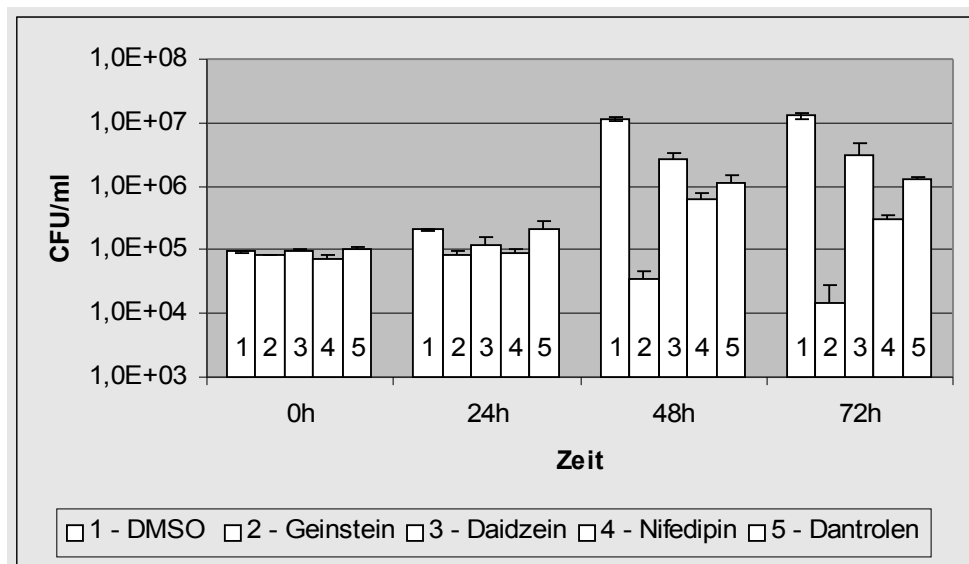


Abb. 17: Infektion von peripheren Monozyten mit Inhibitoren der Gruppe 1

In diesem Ansatz kann man erkennen, dass das normale intrazelluläre Legionellenwachstum der Kontrolle nach 72h einen Wert von $1,3 \times 10^7$ erreichte. Die getesteten Substanzen zeigten alle eine Wachstumshemmung, die aber nach 72h unterschiedlich stark ausgeprägt war. Genistein und Nifedipin zeigten eine deutliche Hemmung, Genistein mit einem Legionellenwachstum von $1,5 \times 10^4$ nach 72h und Nifedipin mit $2,9 \times 10^5$. Bei Daidzein und Dantrolen konnte man nach 72h ein Legionellenwachstum von $3,1 \times 10^6$ bzw. $1,3 \times 10^6$ erkennen. Dies stellt eine deutliche Wachstumshemmung dar.

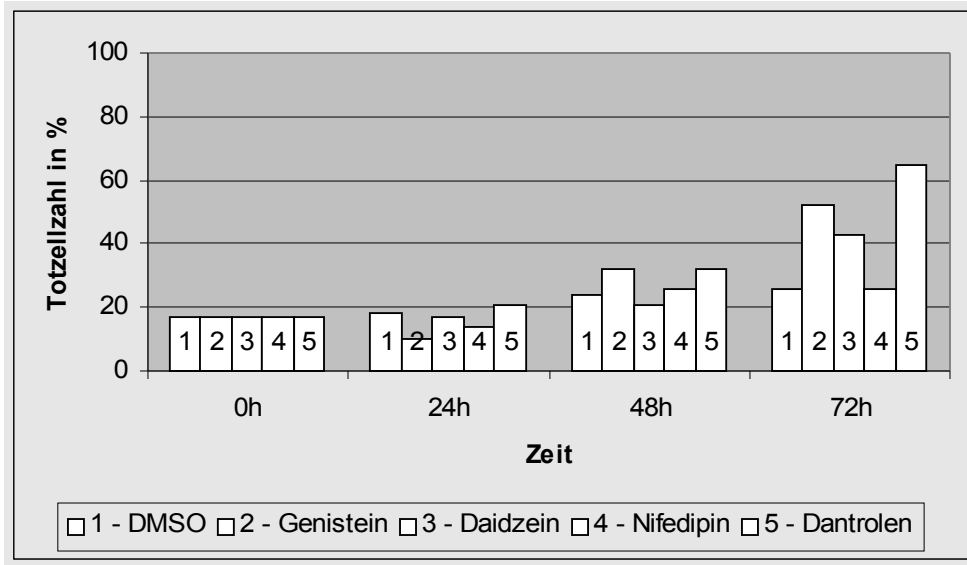


Abb. 18: Lebendkontrolle der Infektion (Abb. 17)

Die Totzellzahl der unbehandelten MM6-Zellen betrug 26% nach 72h beobachtet werden. Nifedipin zeigte mit 26% einen optimalen Wert. Daidzein und Genistein lagen mit 43% und 52% etwas höher. Die Substanz Dantrolen zeigte allerdings mit 65% eine hohe Totzellzahl.

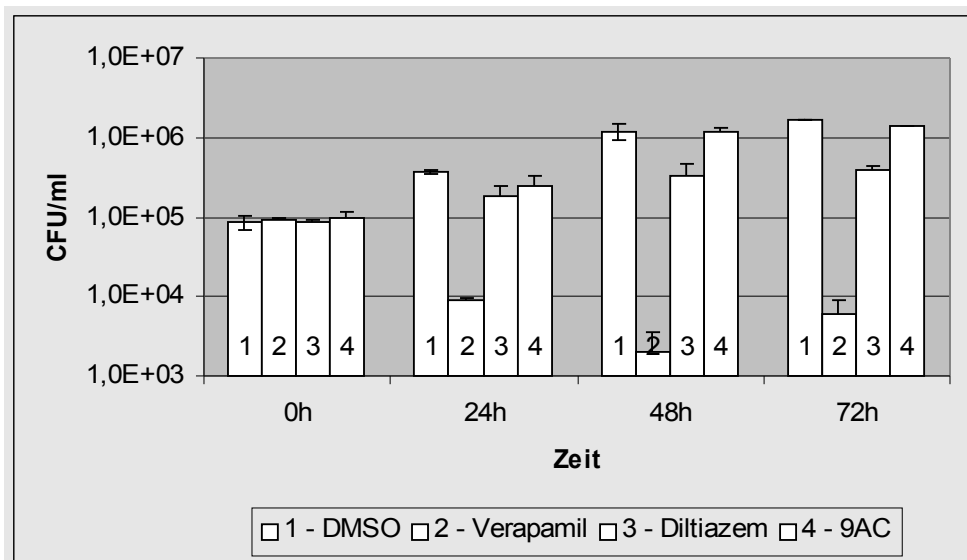


Abb. 19: Infektion von peripheren Monozyten mit Inhibitoren der Gruppe 2

In diesem Ansatz kann man erkennen, dass das normale intrazelluläre Legionellenwachstum im Kontrollansatz nach 72h einen Wert von $1,7 \times 10^6$

erreichte. Bei Verapamil war eine deutliche Wachstumshemmung, bei einem Wachstum von $6,0 \times 10^3$ nach 72h, zu sehen. Diltiazem zeigte nach 72h ein Legionellenwachstum von $3,8 \times 10^5$. Bei 9-AC zeigte sich ein Legionellenwachstum von $1,4 \times 10^6$.

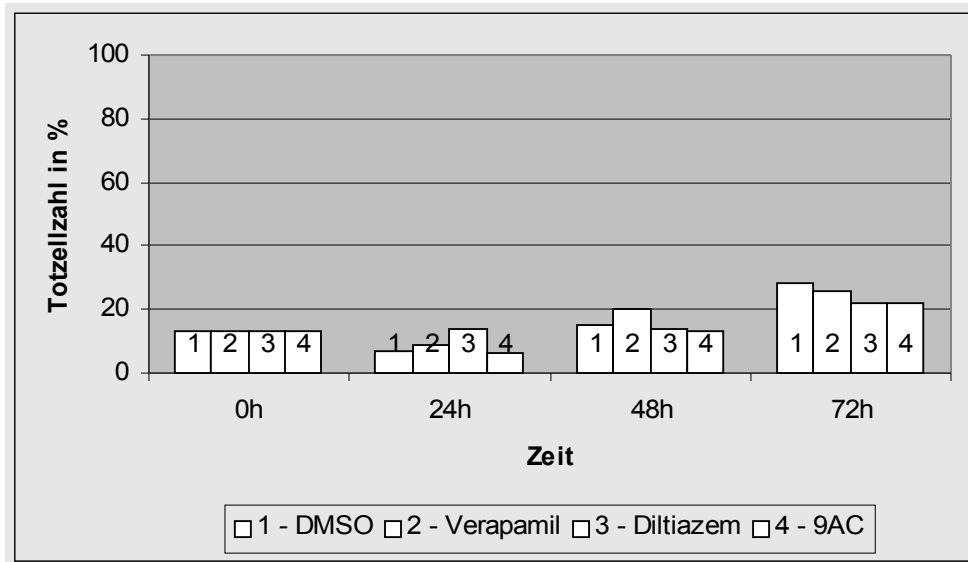


Abb. 20: Lebendkontrolle der Infektion (Abb. 19)

Nach 72h lag der Totzellanteil der Kontrolle bei 28%. Der Totzellanteil der getesteten Substanzen war mit 22-26% in einem ähnlich Bereich.

III.6 Konfokalmikroskopie

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der Konfokalmikroskopie versucht, eine genauere Darstellung des intrazellulären Calciums in mit *L. pneumophila* infizierten Zellen wie in nicht-infizierten Zellen zu erhalten. Hierfür wurden GFP-markierte Legionellen für die Infektion von MM6-Zellen verwendet. Anschließend wurde eine Calcium Orange-Färbung zur Darstellung des intrazellulären Calciums und dessen Konzentration in den verschiedenen Zellkompartimenten durchgeführt.

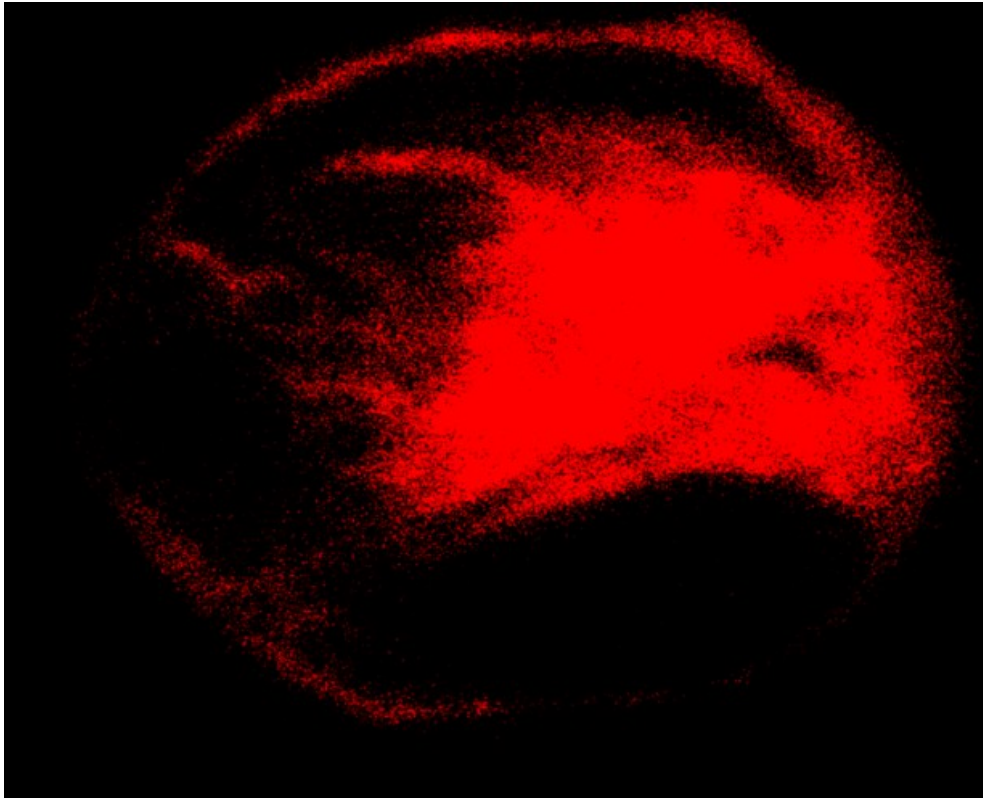


Abb. 21: Uninfizierte Zelle: Intrazelluläres Calcium Orange

In Abb. 21 ist eine uninfizierte MM6-Zelle zu sehen. Die Rotfärbung entspricht dem Calcium im Inneren der Zelle. Es ist zu erkennen, dass das Calcium kompartimentiert ist und nicht den kompletten Intrazellulärraum ausfüllt. Die Zellmembran ist als roter Saum zu erkennen.

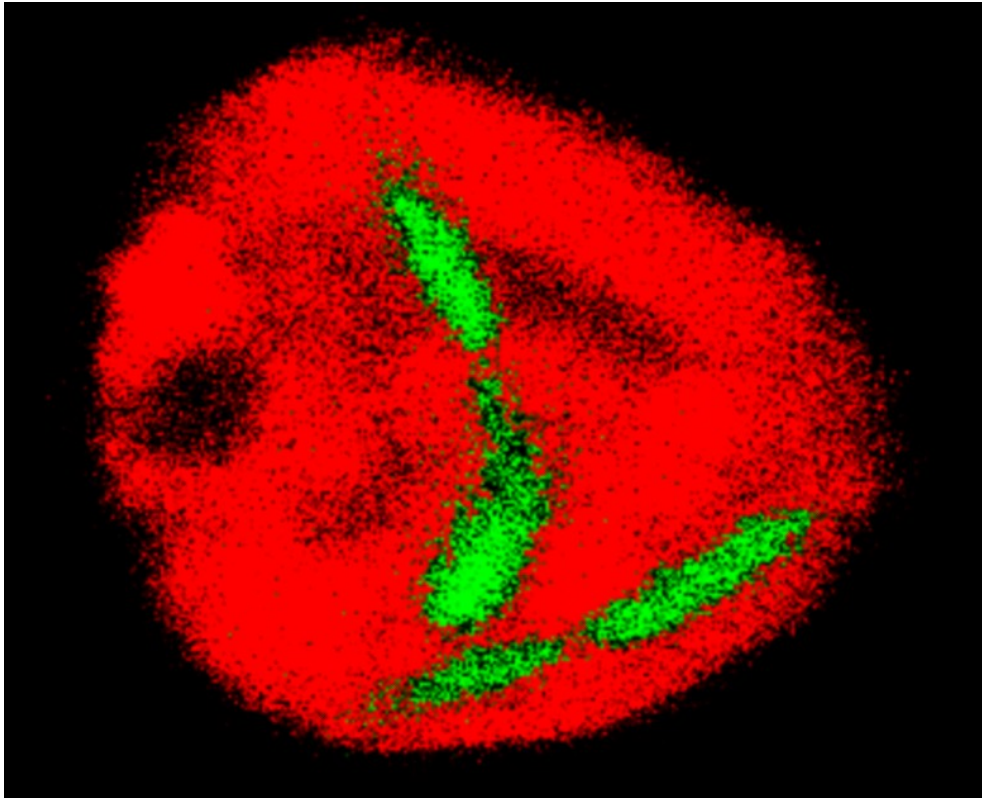


Abb. 22: Infizierte Zelle: Intrazelluläres Calcium Orange; GFP-markierte Legionellen

In Abb. 22 ist eine mit GFP-Legionellen infizierte MM6-Zelle zu erkennen. Die grün erscheinenden Legionellen sind in der Zelle verteilt. Das rot erscheinende Calcium ist im Gegensatz zur uninfizierten MM6-Zelle vollkommen anders verteilt. Es ist deutlich zu sehen, dass sich das Calcium im gesamten Intrazellulärraum ausgebreitet und nicht nur in den einzelnen Zellkompartimenten verteilt ist. Das Calcium dehnt sich fast auf die ganze Zelle aus, mit Ausnahme einer runden Struktur links, vermutlich des Zellkerns, sowie einer nur mit wenig Calcium versehenen, länglichen Struktur im rechten oberen Bereich neben den längs angeordneten Legionellen.

IV. Diskussion

IV.1 Die Rolle der Proteintyrosin-Kinase (PTK) bei Infektionen mit *Legionella pneumophila*

IV.1.1 Die Rolle der Proteintyrosin-Phosphorylierung (PTP) bei intrazellulären Erregern

Wie in der Fragestellung in der Einleitung angesprochen, spielt die Protein-Phosphorylierung bei der Signaltransduktion eine sehr wichtige Rolle (Bliska und Falkow, 1993).

In vielen Bakterienspezies konnten Vorgänge, bei denen die Phosphorylierung von Proteinen bedeutsam ist, nachgewiesen werden. Hierbei werden drei Hauptgruppen von Enzymen, die Phosphorylierungsreaktionen in Proteinen katalysieren, unterschieden: Protein-Histidin-Kinasen, Protein-Serin/Threonin-Kinasen und Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK) (Cozzone, 1993). Besonders in Hinsicht auf bakterielle Infektionen kann ein Zusammenhang zwischen PTP und der Pathogenität von Bakterien vermutet werden (Cozzone *et al.*, 2004). Die PTP ist hierbei wichtig für die Produktion von Virulenzfaktoren.

Bei verschiedenen intrazellulären Bakterienspezies ist ein Zusammenhang zwischen der PTP und der Infektion der Wirtszelle nachgewiesen. Hierbei sind besonders die PTK der Wirtszelle von Bedeutung. Intrazelluläre Erreger nutzen diese zelluläre Signaltransduktion, um die Wirtszelle ihren Bedürfnissen anzupassen (Bliska und Falkow, 1993).

Eine frühe Aktivierung von PTK durch eine Interaktion zwischen Erreger und Wirtszelle konnte bei *Mycobacterium leprae* und *Mycobacterium bovis* gezeigt werden (Lima *et al.*, 2001). Bei *Helicobacter pylori*, wie auch *Escherichia coli*, konnte eine gesteigerte PTP nach deren Bindung an Wirtszellen gezeigt werden (Segal *et al.*, 1996; Palmer *et al.*, 1997). Bei *Chlamydia trachomatis* kann eine gesteigerte PTP während der Aufnahme in die Wirtszelle beobachtet werden (Birkelund *et al.*, 1994).

Eine signifikante Verminderung der intrazellulären Aufnahme von *Campylobacter jejuni*, von *Yersinen*, wie auch von *E. coli*, wurde nach Zugabe von PTK-Inhibitoren beobachtet (Wooldridge *et al.*, 1996; Rosenshine *et al.*, 1992; Palmer *et al.*, 1997).

Bei *Coxiella burnetii*, einem sehr eng mit *L. pneumophila* verwandten Bakterium, führt eine Infektion zur Aktivierung der PTK in Monozyten. Hier wurde zudem gezeigt, dass virulente Erreger eine frühe PTK-Aktivierung verursachen, während avirulente Erreger zu keiner Aktivierung der PTK führen (Meconi *et al.*, 2001).

Es wurde ein Zusammenhang zwischen der PTK und Proteinen des Zytoskeletts vermutet (Palmer *et al.*, 1997). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass eine Neuordnung des Zytoskeletts essentiell für die Aufnahme verschiedener intrazellulärer Erreger ist, wie z.B. bei *Coxiella burnetii*, *Helicobacter pylori* und *Shigella* und in diesem Zusammenhang eine gesteigerte PTP zu beobachten ist (Meconi *et al.*, 2001; Segal *et al.*, 1996; Dumenil *et al.*, 2000).

Ebenso konnte für *Salmonella typhimurium* gezeigt werden, dass nach dessen Aufnahme PTP stimuliert wird (Galan *et al.*, 1992). Eine verminderte Aufnahme von *Salmonella typhimurium* unter Einwirkung von PTK-Inhibitoren konnte jedoch nicht beobachtet werden (Rosenshine *et al.*, 1994).

Aufgrund dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass die PTK eine wichtige Funktion bei der Infektion und Vermehrung von intrazellulären Erregern einnimmt.

Bei der Infektion von Makrophagen mit *L. pneumophila* wurde eine Proteinphosphorylierung beobachtet, die im Zusammenhang mit der Bindung des Bakteriums an die Zellwand vermutet wurde (Yamamoto *et al.*, 1992). Diese Proteinphosphorylierung konnte nicht bei avirulenten Legionellen, sowie *Pseudomonas aeruginosa* und *Salmonella typhimurium* nachgewiesen werden (Yamamoto *et al.*, 1992). Auch bei der intrazellulären Vermehrung von *L. pneumophila* steht eine Aktivierung der PTK und die deutlich ansteigende PTP

im Vordergrund (Coxon *et al.*, 1998). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Expression von Tyrosinphosphorproteinen, die in nicht-infizierten Wirtszellen von *L. pneumophila* nur gering ist, während einer Infektion dieser Zellen mit *L. pneumophila* deutlich ansteigt (Susa und Marre, 1999). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass die PTP eine bedeutende Rolle bei der intrazellulären Vermehrung von *L. pneumophila* spielt. Aufgrund der Ergebnisse aus der vorliegenden Dissertation kann jedoch festgestellt werden, dass PTP beim Infektionsvorgang bzw. der intrazellulären Replikation von *L. pneumophila* keine erkennbare Rolle spielen.

Für die Untersuchung der PTP eignet sich besonders Genistein. Genistein ist ein Isoflavon aus der Gruppe der Phytoöstrogene. Phytoöstrogene sind nicht-steroidale Pflanzenverbindungen, die eine östrogen-ähnliche, biologische Aktivität besitzen (Cos *et al.*, 2003). Die Gruppe der Isoflavone ist eine von vier Untergruppen der Phytoöstrogene. Von Isoflavonen ist schon seit längerem bekannt, dass sie an Östrogenrezeptoren binden und somit die östrogenvermittelte Signaltransduktion beeinflussen (Martin *et al.*, 1978). Neben dem Einfluss auf Östrogenrezeptoren werden noch weitere Effekte auf die Signaltransduktion vermutet (Barnes, 2004).

Erstmals wurde die Isolierung des Isoflavons Genistein als ein spezifischer PTK-Inhibitor 1986 beschrieben. In diesem Zusammenhang sollte Genistein als potentielle Antitumor-Substanz untersucht werden und für die Untersuchung von PTK in Zellen verwendet werden (Ogawara *et al.*, 1986). Es wurde nachgewiesen, dass Genistein sehr spezifisch alle Unterklassen der PTKs hemmt und so gut wie keinen Einfluß auf die serin- bzw. threoninspezifischen Proteinkinasen hat (Akiyama *et al.*, 1986).

Durch die Verwendung von Genistein konnte eine Hemmung des intrazellulären Wachstums von Legionellen erzielt werden (Susa und Marre, 1999). Zudem wurde gezeigt, dass die Wachstumshemmung weder auf eine verminderte Aufnahme der Bakterien in die Zellen zurückzuführen ist, noch auf eine toxische Wirkung auf Bakterien. Die mit Genistein behandelten Legionellen sind

vergleichbar virulent wie die nicht-behandelten Legionellen (Susa und Marre, 1999).

Allerdings konnte der Wirkungsmechanismus von Genistein in diesem Zusammenhang noch nicht geklärt werden. Hierzu werden mehrere Hypothesen aufgestellt. Zum einen wird - aufgrund der gehemmten PTP und der dadurch eingeschränkten Signaltransduktion - eine verminderte Aufnahme von Nährstoffen vermutet, die während der Vermehrung benötigt werden. Zum anderen wird spekuliert, dass durch diese Unterbrechung der Signaltransduktion Legionellen die Möglichkeit entzogen wird, das intrazelluläre Milieu für die Vermehrung zu nutzen und ihren Bedürfnissen anzupassen (Susa und Marre, 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde auf diesen Ergebnissen aufgebaut und die Wirkungsweise von Genistein auf die intrazelluläre Replikationsfähigkeit von Legionellen detaillierter untersucht.

IV.1.2 Die Wirkung von PTK-Inhibitoren und deren inaktiven Strukturanaloga auf das Wachstum von *Legionella pneumophila*

Die aus der Publikation von Susa und Marre (1999) nunmehr mit *Mono Mac 6*-Zellen (MM6) reproduzierten Infektionsversuche von monozytären Zellen mit *L. pneumophila* in Gegenwart von Genistein zeigten eine deutliche intrazelluläre Wachstumshemmung der Bakterien. Die zusätzlich durchgeführten Infektionsversuche mit Herbimycin, einem weiteren PTK-Inhibitor, zeigten dagegen keinen Einfluß auf das intrazelluläre Legionellenwachstum. Zudem wurden Kontrollen mit den Substanzen Genistin und Daidzein durchgeführt.

Genistin und Daidzein gehören zur Gruppe der Isoflavone und sind Strukturanaloga von Genistein. Für beide konnte nachgewiesen werden, dass sie inaktiv in Bezug auf die PTK-Inhibition sind (Sargeant *et al.*, 1993; Hamakawa *et al.*, 1999). Somit sind die beiden Substanzen als Negativkontrolle für Genistein bezüglich des Effektes auf die PTK sehr gut geeignet. Ein

hemmender Effekt von Genistin und Daidzein auf das intrazelluläre Legionellenwachstum wurde daher nicht erwartet.

Bei den vorliegenden Infektionsversuchen mit *L. pneumophila* wurde allerdings bei beiden Substanzen eine signifikante Wachstumshemmung gegenüber intrazellulären Legionellen in MM6-Zellen und in humanen Makrophagen beobachtet. Insbesondere Daidzein zeigte eine sehr deutliche Hemmung des intrazellulären Legionellenwachstums. Nun stellt sich die Frage, inwieweit die PTK-Inhibition bei der beobachteten Wachstumshemmung eine Rolle spielt bzw. spielen kann.

Da Genistin und Daidzein als Negativkontrolle von Genistein in Hinsicht auf die PTK-Inhibition etabliert sind, muss vermutet werden, dass als ursächlicher Wirkungsmechanismus der intrazellulären Wachstumshemmung von *L. pneumophila* andere Mechanismen in Betracht kommen. Nur so könnte die hier vorliegende intrazelluläre Wachstumshemmung von *L. pneumophila* unter Daidzein und Genistein erklärt werden.

IV.1.3 Weitere Wirkungsmechanismen des PTK-Inhibitors Genistein

Wie in den Versuchen gezeigt wurde, kann die Hemmung des Legionellenwachstums durch Genistein nicht nur auf Grund der PTK-Hemmung zustande gekommen sein. Um nun den ursächlichen Wirkungsmechanismus von Genistein in Bezug auf die hier durchgeführten Infektionsversuche auf den Grund zu gehen, wurde nach weiteren bekannten Einflüssen von Genistein auf die zelluläre Signaltransduktion in der Literatur gesucht.

Zu den wichtigsten nachgewiesenen Wirkungsweisen von Genistein gehört die Hemmung der L-Typ Calciumkanäle. Eine Hemmung dieser Kanäle durch Genistein wurde an Muskelzellen von Ratten gezeigt (Yokoshiki *et al.*, 1996; Kusaka und Sperelakis, 1995). Diese Versuche zeigen allerdings nicht, welche ursächliche Wirkungsweise hinter dem hemmenden Effekt von Genistein auf die L-Typ Calciumkanäle steht. Es wird offengelassen, ob die Hemmung der Calciumkanäle tyrosinkinaseabhängig oder -unabhängig verläuft. Als

ursächliche Wirkungsweisen werden zum einen eine Phosphorylierung der Kanäle durch die PTK in Betracht gezogen, zum anderen wird eine direkte, sterische Hemmung der Kanäle durch Genistein vermutet (Yokoshiki *et al.*, 1996). Weitere Versuche deuten allerdings darauf hin, dass die Hemmung der L-Typ Calciumkanäle direkt erfolgt (Chiang *et al.*, 1996). Später konnte unter Verwendung weiterer PTK-Inhibitoren, die zu keiner Hemmung der Calciumkanäle führten, eine Tyrosinkinase-unabhängige Hemmung dieser Calciumkanäle in Muskelzellen gezeigt werden (Belevych *et al.*, 2002).

Eine hemmende Wirkung von Genistein auf Kaliumkanäle in Muskelzellen konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Chiang *et al.*, 2002; Ogata *et al.*, 1997). In verschiedenen Versuchen wurde gezeigt, dass die Hemmung dieser Kaliumkanäle Tyrosinkinase-unabhängig verläuft (Washizuka *et al.*, 1998).

Auch Natriumkanäle werden durch Genistein gehemmt. In Muskelzellen wurde eine Hemmung der „schnellen“ Natriumkanäle durch Genistein beobachtet (Wang *et al.*, 2003). In neuronalen Zellen von Ratten konnte sogar gezeigt werden, daß die Hemmung der Natriumkanäle durch Genistein nicht über eine Hemmung der PTK erfolgt, sondern Tyrosinkinase-unabhängig verläuft (Paillart *et al.*, 1997). In neuronalen Zellen von Ratten konnte man ebenfalls eine deutlich verminderte Calciumaufnahme über Natrium/Calcium-Austauscher nach Behandlung mit Genistein nachweisen (Wang *et al.*, 1997).

Genistein wirkt aber nicht nur auf Ionenkanäle. Auch in Bezug auf Östrogenrezeptoren konnten verschiedene Effekte von Genistein nachgewiesen werden. In fetalen Osteoblasten konnte gezeigt werden, dass Genistein an die Östrogenrezeptoren alpha und beta bindet und als schwacher Agonist wirkt (Rickard *et al.*, 2003). In Versuchen mit Bakterienkulturen konnte gezeigt werden, dass die Bindungsaffinität von Genistein an die Östrogenrezeptoren alpha und beta vergleichbar mit der Bindungsaffinität von 17beta-Östradiol an diese Rezeptoren ist (Morito *et al.*, 2001). Hier zeigt sich deutlich, dass Genistein auch als Agonist für beide Östrogenrezeptoren in Frage kommt.

Allerdings gab es auch Versuche, die eine bevorzugte Aktivierung des Östrogenrezeptors beta im Vergleich zum Östrogenrezeptor alpha durch Genistein zeigten (Kostelac *et al.*, 2003). Dies macht deutlich, dass besonders auch eine getrennte Untersuchung der verschiedenen Östrogenrezeptoren notwendig ist. Des Weiteren konnte für Genistein, wie auch für andere Phytoöstrogene, eine agonistische Wirkung auf östrogen-ähnliche Rezeptoren (ERRs) gezeigt werden (Suetsugi *et al.*, 2003).

Die verschiedenen Wirkungsmechanismen, die hier aufgeführt wurden, zeigen, dass die wachstumshemmende Wirkung von Genistein durchaus auch auf eine andere Ursache als auf die Hemmung der PTK zurückgeführt werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurden diese verschiedenen Effekte von Genistein, Hemmung verschiedener Ionenkanäle, sowie der aktivierende Einfluß auf die verschiedenen Östrogenrezeptoren, genauer untersucht. Dadurch soll die ursächliche, wachstumshemmende Wirkung von Genistein näher charakterisiert werden.

Da die genauen Pathogenesemechanismen von *L. pneumophila* noch nicht vollständig geklärt sind, wurden alle hier aufgeführten Wirkungsweisen von Genistein als wachstumshemmender Einfluß in Betracht gezogen und untersucht.

IV.2 Die Rolle von Ionen bzw. Ionenkanälen bei Infektionen von *Legionella pneumophila*

IV.2.1 Untersuchung weiterer Mechanismen, die zu einer Wachstumshemmung von *Legionella pneumophila* führen können

Die Vermutung, dass die vorliegende Wachstumshemmung aufgrund östrogenvermittelter Signaltransduktion erfolgt, konnte in den Infektionsversuchen nicht bestätigt werden. Weder die Infektionen unter Einfluß von unspezifischen Östrogenrezeptor-Inhibitoren, noch diese unter Einfluß von Inhibitoren, spezifisch für die Östrogenrezeptoren alpha bzw. beta, zeigten ein vermindertes Wachstum. Auch die Anwendung von Östrogenrezeptor-Agonisten zeigte keinen Einfluss auf das intrazelluläre Legionellenwachstum.

In der Literatur sind auch keine Zusammenhänge zwischen Östrogen und der intrazellulären Vermehrung von *L. pneumophila* zu finden. Allerdings ist bei anderen Erregern, wie z.B. *Chlamydia trachomatis*, ein Zusammenhang zwischen Östrogen und der intrazellulären Aufnahme und Vermehrung gezeigt worden (Bose und Goswami, 1986). Dies scheint aber nicht auf *L. pneumophila* zuzutreffen.

In den nächsten Infektionsversuchen der vorliegenden Arbeit wurden durch verschiedene Calciumkanal-Blocker ein Einfluss von Calcium auf das intrazelluläre Legionellenwachstum untersucht.

Nifedipin, Verapamil und Diltiazem, die, wie auch Genistein, spezifisch L-Typ Calciumkanäle blockieren, zeigten dabei eine deutliche intrazelluläre Wachstumshemmung der Legionellen, ohne dabei die Wirtszellvitalität zu beeinträchtigen.

Aber auch bei den Infektionen mit Dantrolen, einem Ryanodin-Rezeptor-Inhibitor, konnte eine Hemmung des intrazellulären Legionellenwachstums beobachtet werden, während die Vitalität der Wirtszelle nicht beeinträchtigt wurde. Ryanodin-Rezeptoren (RYR) spielen eine wichtige Rolle bei intrazellulären Calciumspeichern und steuern eine schnelle und massive Calciumausschüttung (Zhao *et al.*, 2001). Sie werden in drei Gruppen unterteilt, RYR1, RYR2 und RYR3, wobei RYR1 und RYR3 von Dantrolen gehemmt werden. Besonders RYR3 ist hier wichtig, da dieser in nichtmuskulärem Gewebe und anderen Zellen vorkommt, während RYR1 besonders im Skelettmuskel zu finden ist (Zhao *et al.*, 2001).

Die Untersuchung des Calcium Ionophor A23187 zeigte eine deutlich zu hohe Totzellzahl, aufgrund dessen war das intrazelluläre Legionellenwachstum nicht verwertbar.

Zusätzlich wurden der Calcium-Chelatbildner EGTA und SKF 96365, ein Inhibitor des rezeptorvermittelten Calciumeinstroms, untersucht. Hierbei konnte allerdings keine Einfluß auf das intrazelluläre Legionellenwachstum beobachtet werden.

Die Untersuchung weiterer Ionenkanäle zeigte dagegen keine signifikante Wachstumshemmung.

In Gegenwart der Natrium/Calcium-Austausch-Blocker, Benzamil und Flunarizine, wurde ebenfalls eine zu hohe Totzellzahl beobachtet. Das beobachtete intrazelluläre Legionellenwachstum ist somit nicht verwertbar.

Bei den Infektionen unter einem Natriumkanal-Inhibitor, QX 314, war dagegen kein signifikanter Einfluss auf das Legionellenwachstum zu erkennen.

Unter der Anwendung verschiedener Kaliumkanal-Inhibitoren, Dequalinium, Iberotoxin, konnte ebenfalls kein wachstumshemmender Effekt beobachtet werden. Glibenclamide, ein weiterer Kaliumkanal-Inhibitor, zeigte eine zu hohe Totzellzahl, weswegen das beobachtete intrazelluläre Legionellenwachstum nicht aussagekräftig ist.

Um einen umfassenden Überblick von Ionenkanal-Inhibitoren auf das Legionellenwachstum zu bekommen, wurde neben den oben genannten Ionenkanälen noch ein Chloridkanal-Inhibitor, 9-AC, untersucht. Dieser führte zu einer Wachstumshemmung von Legionellen und gleichzeitig zu keiner Beeinträchtigung der Vitalität der Wirtszellen.

Über den Effekt von Chlorid bzw. seiner Hemmung ist wenig bekannt. Die Tatsache, dass Chlorid für sehr viele verschiedene molekulare Prozesse wichtig ist, von Membranstabilisierung bis hin zur intrazellulären Signaltransduktion, macht deutlich, dass die hier beobachtete Wachstumshemmung viele Ursachen haben kann (Jentsch und Gunther, 1997).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in der vorliegenden Arbeit das weitere Augenmerk auf die intrazelluläre Wachstumshemmung, die durch eine Blockade verschiedener Calciumkanäle (L-Typ Calciumkanäle und intrazelluläre Calciumkanäle, eingebunden in die Signaltransduktion von RYR) hervorgerufen wurde, gerichtet und näher untersucht.

In Phagozytose-Assays konnte gezeigt werden, dass die L-Typ Calciumkanal-Inhibitoren Verapamil und Nifedipin, Dantrolen als RYR-Inhibitor, Genistein und das Genistein-Analogon Daidzein die Aufnahme der Legionellen in die Wirtszellen nicht hemmen. Die Anzahl aufgenommener Legionellen unter

Inhibitorenbehandlung entsprach der Anzahl aufgenommener Legionellen unter Inhibitor-freien Bedingungen im Kontrollansatz. Diese Ergebnisse, mit MM6 als Wirtszelle, widersprechen zum einen der Beobachtung, dass PTK-Inhibitoren die Aufnahme von *L. pneumophila* in Monozyten blockieren (Coxon *et al.*, 1998). Zum anderen werden diese Ergebnisse aber von der Feststellung unterstützt, dass PTP für die intrazelluläre Aufnahme von *L. pneumophila* nicht relevant ist (Susa und Marre, 1999).

In Legionellen-Überlebenskurven konnte gezeigt werden, dass die oben genannten Inhibitoren keinen direkten Einfluss auf die Vitalität von Legionellen haben, d.h. nicht toxisch auf *L. pneumophila* wirkten. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung des intrazellulären Legionellenwachstums durch die oben genannten Inhibitoren auch in Infektionsversuchen mit humanen, peripheren Monozyten zu beobachten waren. Somit ist auch der Nachweis erbracht, dass die Inhibitoren in ausdifferenzierten Zellen des humanen Systems einen Einfluss auf das intrazelluläre Wachstum von *L. pneumophila* hatten.

Zusammenfassend ist über die vorliegenden Ergebnisse zu sagen, dass die beobachtete Hemmung des intrazellulären Legionellenwachstums unter Genistein wie auch unter Daidzein, dessen inaktivem Analogon in Bezug auf die PTK-Hemmung, auf einen anderen Mechanismus der Wachstumshemmung als die vermutete PTK-Hemmung schliessen lässt. Aufgrund der Tatsache, dass Genistein, wie oben gezeigt, einen hemmenden Einfluss auf Calciumkanäle hat, wurde unter anderem vermutet, dass dieser Mechanismus für die Wachstumshemmung verantwortlich sein kann.

Für Daidzein findet man unterschiedliche Aussagen in Bezug auf eine hemmende Wirkung auf L-Typ Calciumkanäle. Zum einen konnte, wie bei Genistein, ein hemmender Effekt auf L-Typ Calciumkanäle beobachtet werden (Yokoshiki *et al.*, 1996; Chiang *et al.*, 1996), zum anderen konnte ein im Vergleich zu Genistein verminderter hemmender Effekt auf diese Calciumkanäle gezeigt werden (Ogura *et al.*, 1999). Im Widerspruch zu diesen

Ergebnissen steht die Beobachtung, dass Daidzein keinen Einfluss auf L-Typ Calciumkanäle hat (Liu und Sperelakis, 1997). Unter der Annahme, dass Daidzein einen hemmenden Einfluss auf L-Typ Calciumkanäle hat, könnte die beobachtete, deutliche Wachstumshemmung von *L. pneumophila* unter Daidzein erklärt werden.

Die vorliegenden Versuche mit Inhibitoren der L-Typ Calciumkanäle, sowie einem Inhibitor der RYR, zeigten ebenfalls eine deutliche intrazelluläre Wachstumshemmung von *L. pneumophila* in MM6-Zellen und in humanen Makrophagen. Dies deutet darauf hin, dass die Konzentration an freiem Calcium im Zytoplasma der Wirtszelle bzw. die intrazelluläre Calcium-Ausschüttung eine entscheidende Rolle bei der intrazellulären Vermehrung von *L. pneumophila* spielt.

IV.2.2 Die Rolle von Calcium bei der Vermehrung von *Legionella pneumophila*

Da über die Rolle von Calcium bei der Vermehrung von Legionellen nicht viel bekannt ist, stehen momentan nur Informationen zu anderen intrazellulären Erregern in Bezug auf die Funktion von Calcium bei deren Infektion als Ausgangspunkt zu Verfügung. Calcium wird in Bezug auf den klassischen endosomalen Abbauweg phagozytierter Partikel die Triggerfunktion der Phagosomenreifung zugesprochen (Vieira *et al.*, 2002). Dies deutet darauf hin, dass intrazelluläre bakterielle Erreger, welche in Phagozyten trotz intrazellulären Calciumanstiegs überleben, in zumindest teilweise reifenden Phagosomen überlebens- und vermehrungsfähig bzw. u. U. sogar von diesen Reifungsprozessen abhängig sind.

Für *Ehrlichia risticii* konnte gezeigt werden, dass Inhibitoren der Calcium-Ionenkanäle zu einer Hemmung der Aufnahme, aber auch zu einer Hemmung der intrazellulären Vermehrung führen (Rikihisa *et al.*, 1995). Bei *Chlamydia trachomatis* konnte ebenfalls eine intrazelluläre Wachstumshemmung durch einen Inhibitor der Calcium-Ionenkanäle beobachtet werden (Shainkin-Kestenbaum *et al.*, 1989).

Für *Yersinia enterocolitica* konnte gezeigt werden, dass Ryanodin-Rezeptor-Inhibitoren zu einer Hemmung des von Yersinien benötigten, intrazellulären Calciumanstiegs führen (Saha *et al.*, 2005).

Auch bei *E. coli* spielt das intrazelluläre freie Calcium eine bedeutende Rolle für verschiedene intrazelluläre Prozesse, wie z. B. Genexpression und Zellteilung (Holland *et al.*, 1999).

Die hier beispielhaft genannten Bakterien werden nach ihrer Phagozytose mit einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration konfrontiert. Dies trifft praktisch auf alle phagozytierten Bakterien zu. Eine Ausnahme hierbei bilden jedoch Mycobacterien.

Bei der Aufnahme von *Mycobacterium avium* in die Wirtszelle wird normalerweise kein Anstieg an freiem zytoplasmatischem Calcium in der Wirtszelle beobachtet. Bei diesem Bakterium führt ein künstlicher intrazellulärer Calciumanstieg, welcher einem Stimulus zur Phagosomenreifung gleichkommt, zu einer erniedrigten intrazellulären Vitalität (Malik *et al.*, 2000). Somit nimmt *M. avium* eine Sonderstellung unter den intrazellulären Erregern ein, da es in der Lage ist, den intrazellulären Calcium-Anstieg und die damit drohende, für *M. avium* tödliche Phagosomenreifung aktiv zu verhindern. Für die anderen hier genannten intrazellulären Erreger konnte dagegen gezeigt werden, dass die Vermehrung bei erhöhtem Calciumspiegel stattfindet bzw. von erhöhten Calciumkonzentrationen abhängig ist.

Durch diese Daten wird die Vermutung gestützt, dass Calcium auch für die intrazelluläre Vermehrung von *L. pneumophila* essentiell sein könnte und dass durch L-Typ Calciumkanal-Inhibitoren das intrazelluläre Wachstum durch eine Verminderung des intrazellulären Calciums gehemmt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen intrazellulärem Calciumanstieg in der Wirtszelle und einer Infektion dieser Zelle mit *L. pneumophila* eingehend untersucht. Mittels Konfokalmikroskopie konnte ein deutlicher Unterschied zwischen einer mit *L. pneumophila* infizierten Zelle und

einer uninfizierten Zelle in Hinsicht auf die Konzentration und Verteilung von intrazellulärem Calcium beobachtet werden.

In infizierten Zellen ist eine deutliche Flutung des gesamten Intrazellulärraums mit großen Mengen an Calcium zu beobachten. Es ist somit kein Unterschied in der Calciumkonzentration zwischen den verschiedenen Kompartimenten der Zelle auszumachen. In uninfizierten Zellen hingegen ist kaum Calcium im Zytosol zu erkennen. Vielmehr befindet sich das intrazelluläre Calcium in scharf begrenzten Bereichen der Zelle, es ist kompartimentiert. Bei diesen Bereichen handelt es sich offensichtlich um intrazelluläre Calciumspeicher. Es könnte sich hierbei um das endoplasmatische Retikulum bzw. um Lysosomen handeln.

Daraus kann abgeleitet werden, daß die Infektion mit Legionellen bzw. deren Phagozytose einen Anstieg des intrazellulären Calciums bewirkt.

Gerade der unspezifische intrazelluläre Calciumanstieg während einer Infektion kann die Wirkung der verschiedenen, in der vorliegenden Arbeit verwendeten Calcium-Inhibitoren erklären. Sowohl bei den L-Typ Calciumkanal-Inhibitoren Nifedipin, Verapamil und Diltiazem, die einen Calciumeinstrom von außen hemmen bzw. hierdurch den Nachschub an Calcium für intrazelluläre Speicher unterbinden, als auch bei dem RYR-Blocker Dantrolen, der eine Calciumausschüttung aus den intrazellulären Calciumspeichern hemmt, konnte eine Wachstumshemmung gezeigt werden.

In diesem Kontext erhalten die vorliegenden Ergebnisse für den PTK-Inhibitor Genistein und dessen inaktives Analogon in Bezug auf die PTK, Daidzein, eine vollkommen andere Bedeutung. Da für beide Substanzen ein hemmender Effekt auf die L-Typ Calciumkanäle nachgewiesen werden konnte (Yokoshiki *et al.*, 1996; Chiang *et al.*, 1996) und die vorliegenden Ergebnisse eine Wachstumshemmung unter L-Typ Calciumkanal-Inhibitoren zeigten, kann auch für Genistein und Daidzein vermutet werden, dass deren wachstumshemmende Wirkung auf *L. pneumophila* aufgrund der Hemmung der L-Typ Calciumkanäle erfolgte.

Diese Theorie würde besonders die Wirkungsweise von Daidzein erklären. Daidzein kann als inaktives Strukturanalogon keine Hemmung der PTK bewirken, somit muss die Wachstumshemmung von *L. pneumophila* auf einem anderen Mechanismus basieren. Da Genistein als Inhibitor der PTK wie auch der L-Typ Calciumkanäle fungiert, könnte hier eine Wachstumshemmung von *L. pneumophila* aufgrund beider Mechanismen vermutet werden. Hierbei sollte man aber die vorliegenden Ergebnisse von Herbimycin nicht außer Acht lassen. Unter Herbimycin, einem weiterer PTK-Inhibitor, konnte keine Wachstumshemmung von *L. pneumophila* beobachtet werden. Außerdem ist für Herbimycin bekannt, dass es keinen hemmenden Einfluss auf Calciumkanäle besitzt (Ohta *et al.*, 2000). Die nicht beobachtete Wachstumshemmung von *L. pneumophila* kann durch den fehlenden Einfluss auf Calciumkanäle erklärt werden.

Durch die vorliegenden Ergebnisse für Genistein, aber besonders auch Daidzein und Herbimycin, wie auch für die verschiedenen Calciumkanal-Inhibitoren wird die Theorie gestützt, dass die beobachtete Wachstumshemmung von *L. pneumophila* unter Genistein nicht durch eine Hemmung von PTK, sondern durch eine Hemmung verschiedener Calciumkanäle verursacht wird.

Ausserdem konnte die Bedeutung der intrazellulären Calciumkonzentration für die intrazelluläre Vermehrung von *L. pneumophila* und deren Überleben gezeigt werden.

V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von PTK- und Ionenkanal-Inhibitoren auf das intrazelluläre Wachstum von *L. pneumophila* in *Mono Mac 6*-Zellen (MM6) untersucht. Es ist bekannt, dass PTK-Inhibitoren auf intrazelluläre Erreger, wie auch Legionellen, einen hemmenden Einfluß haben. Da die genauen Mechanismen dieser Effekte aber nicht geklärt sind, wurde die beobachtete Wachstumshemmung in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht. Des Weiteren wurde der Einfluß der intrazellulären Konzentrationsänderung verschiedener Ionen auf die intrazelluläre Vermehrung von *L. pneumophila* erörtert. Über deren Einfluß auf das intrazelluläre Legionellenwachstum ist wenig bekannt und ihre Untersuchung könnte in dieser Hinsicht sehr aufschlußreich sein.

In den vorliegenden Versuchen wurde unter dem PTK-Inhibitor Genistein eine intrazelluläre Wachstumshemmung von *L. pneumophila* beobachtet. Zur weiteren Untersuchung wurden Versuche mit einem weiteren PTK-Inhibitor, Herbimycin, gemacht. Hierbei konnte allerdings keine intrazelluläre Wachstumshemmung von *L. pneumophila* beobachtet werden. Anschließend wurden Infektionsversuche mit Genistein-Analoga, Genistin und Daidzein, angesetzt, die aber in Bezug auf die PTK-Inhibition inaktiv sind. Hierbei wurde eine deutliche intrazelluläre Wachstumshemmung von *L. pneumophila* beobachtet.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass die PTK-Inhibition nicht für die beobachtete intrazelluläre Wachstumshemmung von *L. pneumophila* verantwortlich ist.

Da von Genistein weitere Einflüsse auf die intrazelluläre Signaltransduktion bekannt sind, die in der vorliegenden Arbeit aufgelistet wurden, wurden diese Mechanismen untersucht.

Hierbei wurden verschiedene Östrogenrezeptoragonisten wie auch – antagonist, sowie Inhibitoren, die an verschiedenen Ionenkanälen bzw.

Transportern wirken (Natrium/Calcium-Austauscher, L-Typ Calciumkanal, Ryanodin-Rezeptoren, Calcium Chelator, Calcium Ionophore, T-Typ Calciumkanal, Calcium-aktivierte Kaliumkanäle, ATP-abhängige Kaliumkanäle, Natriumkanäle, Chloridtransporter) verwendet.

Bei den Versuchen zeigte sich, dass Inhibitoren des L-Typ Calciumkanals (Nifedipin, Verapamil und Diltiazem), sowie der Ryanodin-Rezeptoren (Dantrolen), welche die Ausschüttung von Calcium aus den intrazellulären Speichern steuern, eine deutliche Wachstumshemmung von *L. pneumophila* bewirkten. Zur weiteren Untersuchung wurden mit diesen Substanzen Phagozytose Assays und Legionellen-Überlebenskurven angesetzt. Mit den Phagozytose Assays konnte gezeigt werden, dass diese Substanzen keine Hemmung der Phagozytose - und dadurch ein vermeintlich vermindertes Wachstum - bewirkten. Mit den Legionellen-Überlebenskurven konnte gezeigt werden, dass die Substanzen nicht bakterizid auf die Legionellen wirken. Die Wirkung dieser Substanzen muß somit über die Wirtszelle und deren Signaltransduktion erfolgen. Zusätzlich wurde der Einfluß der Substanzen auf mit *L. pneumophila* infizierten humanen Monozyten beobachtet. Auch hier war, wie bei den Infektionsversuchen mit MM6-Zellen, eine deutliche intrazelluläre Wachstumshemmung zu erkennen.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wurde vermutet, dass intrazelluläres Calcium beim intrazellulären Wachstum von Legionellen eine Schlüsselfunktion einnimmt. Durch Hemmung der Calciumzufuhr durch L-Typ Calciumkanäle, wie auch durch Hemmung der Ryanodin-Rezeptoren, wurde eine Wachstumshemmung beobachtet. In weiteren Versuchen wurden mit Hilfe der Konfokalmikroskopie die intrazelluläre Calciumverteilung in nicht-infizierten MM6-Zellen und mit *L. pneumophila* infizierten MM6-Zellen dargestellt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass bei nicht-infizierten MM6-Zellen intrazelluläres Calcium in wenigen Zellbereichen kompartimentiert ist. Bei mit *L. pneumophila* infizierten Zellen dagegen war das intrazelluläre Calcium fast im kompletten Intrazellulärraum verteilt.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass Genistein höchst wahrscheinlich als Inhibitor der L-Typ Calciumkanäle und nicht als PTK-Inhibitor das intrazelluläre Wachstum von *L. pneumophila* hemmt. Zudem wurde durch die Wachstumshemmung unter dem RYR-Inhibitor, wie auch durch die Immunfluoreszenzbilder, welche die intrazelluläre Calciumverteilung zeigen, deutlich gemacht, dass intrazelluläres Calcium eine bedeutende Rolle bei der Vermehrung von *L. pneumophila* spielt.

VI. Literaturliste

Abdul, M., Hoosein, N. (2002). Expression and activity of potassium ion channels in human prostate cancer. *Cancer Lett.* 186:99-105.

Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S.-I., Itoh, N., Shibuya, M., Fukami, Y. (1986). Genistein, a Specific Inhibitor of Tyrosine-specific Protein Kinases. *J. Biol. Chem.* 262:5592-5.

Bangsborg, J.M., Cianciotto, N.P., Hindersson, P. (1991). Nucleotide sequence analysis of the *Legionella micdadei* mip gene, encoding a 30-kilodalton analog of the *Legionella pneumophila* Mip protein. *Infect. Immun.* 59:3836-40.

Barnes, S. (2004). Soy isoflavones--phytoestrogens and what else? *J. Nutr.* 134:1225S-1228S.

Belevych, A., Warriar, S., Harvey, R.D. (2002). Genistein Inhibits Cardiac L-Type Ca²⁺ Channel Activity by a Tyrosine Kinase-Independent Mechanism. *Mol. Pharmacol.* 62:554-565.

Bellinger-Kawahara, C., Horwitz, M.A. (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.* 172:1201-10.

Bender, L., Ott, M., Debes, A., Rdest, U., Heesemann, J., Hacker, J. (1991). Distribution, expression, and long-range mapping of legiolysin gene (lly)-specific DNA sequences in legionellae. *Infect. Immun.* 59:3333-6.

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

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

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

Berger, K.H., Merriam, J.J., Isberg, R.R. (1994). Altered intracellular targeting properties associated with mutations in the *Legionella pneumophila* dotA gene. *Mol. Microbiol.* 14:809-22.

Bernander, S., Gastrin, B., Lofgren, S., Olinder-Nielsen, A.M. (1994). *Legionella* urinary antigen in early disease. *Scand. J. Infect. Dis.* 26(6):777-8.

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

Birkelund, S., Johnson, H., Christiansen, G. (1994). Chlamydia trachomatis Serovar L2 Induces Protein Tyrosine Phosphorylation during Uptake by HeLa Cells. *Infect. Immun.* 62:4900-4908.

Bose, S.K., Goswami, P.C. (1986). Enhancement of adherence and growth of Chlamydia trachomatis by estrogen treatment of HeLa cells. *Infect Immun.* 53:646-50.

Blatt, S.P., Parkinson, M.D., Pace, E., Hoffman, P., Dolan, D., Lauderdale, P., Zajac, R.A., Melcher, G.P. (1993). Nosocomial Legionnaires' disease: aspiration as a primary mode of disease acquisition. *Am. J. Med.* 95:16-22.

Bliska, J.B., Falkow, S. (1993). The role of host tyrosine phosphorylation in bacterial pathogenesis. *Trends Genet.* 9:85-9.

Breiman, R.F., Horwitz, M.A. (1987). Guinea pigs sublethally infected with aerosolized Legionella pneumophila develop humoral and cell-mediated immune responses and are protected against lethal aerosol challenge. A model for studying host defense against lung infections caused by intracellular pathogens. *J. Exp. Med.* 165:799-811.

Breiman, R.F., Butler, J.C. (1998). Legionnaires' disease: clinical, epidemiological, and public health perspectives. *Semin. Respir. Infect.* 13:84-9.

Chen, W.F., Wong, M.S. (2004). Genistein enhances insulin-like growth factor signaling pathway in human breast cancer (MCF-7) cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89:2351-9.

Chiang, C.E., Chen, S.A., Chang, M.S., Lin, C.I., Luk, H.N. (1996). Genistein directly inhibits L-type calcium currents but potentiates cAMP-dependent chloride currents in cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223:598-603.

Chiang, C.E., Luk, H.N., Chen, L.L., Wang, T.M., Ding, P.Y. (2002). Genistein inhibits the inward rectifying potassium current in guinea pig ventricular myocytes. *J. Biomed. Sci.* 9:321-6.

Cianciotto, N.P., Eisenstein, B.I., Mody, C.H., Toews, G.B. und Engleberg, N.C. (1989). A Legionella pneumophila gene encoding a species-specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection. *Infect. Immun.* 57:1255-62.

Cianciotto, N.P., Eisenstein, B.I., Mody, C.H., und Engleberg, N.C. (1990). A mutation in the mip gene results in an attenuation of Legionella pneumophila virulence. *J. Infect. Dis.* 162:121-6.

Ciesielski, C.A., Blaser, M.J., Wang, W.L. (1986). Serogroup specificity of *Legionella pneumophila* is related to lipopolysaccharide characteristics. *Infect. Immun.* 51:404.

Collett, A., Ramminger, S.J., Olver, R.E., Wilson, S.M. (2002). *Alveolar Epithelial Ion and Fluid Transport* beta-Adrenoceptor-mediated control of apical membrane conductive properties in fetal distal lung epithelia. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 282:L621-L630.

Conlan, J.W., Ashworth, L.A. (1986). The relationship between the serogroup antigen and lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila*. *J. Hyg. (Lond).* 96:39-48.

Conlan, J.W., Williams, A., Ashworth, L.A. (1988). Inactivation of human alpha-1-antitrypsin by a tissue-destructive protease of *Legionella pneumophila*. *J. Gen. Microbiol.* 134:481-7.

Cos, P., De Bruyne, T., Apers, S., Vanden Berghe, D., Pieters, L., Vlietinck, A.J. (2003). Phytoestrogens: recent developments. *Planta Med.* 69:589-99.

Coxon, P.Y., Summersgill, J.T., Ramirez, J.A., Miller, R.D. (1998). Signal Transduction during *Legionella pneumophila* Entry into Human Monocytes. *Infect. Immun.* 66:2905-13.

Cozzone, A.J. (1993). ATP-dependent protein kinases in bacteria. *J. Cell. Biochem.* 51:7-13.

Cozzone, A.J., Grangeasse, C., Doublet, P., Duclos, B. (2004). Protein phosphorylation on tyrosine in bacteria. 181:171-81.

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

Dominguez, D.C. (2004). Calcium signalling in bacteria. *Mol. Microbiol.* 54:291-7.

Dreyfus, L.A., Iglewski, B.H. (1986). Purification and characterization of an extracellular protease of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 51:736-43.

Dumenil, G., Sansonetti, P., Tran Van Nhieu, G. (2000). Src tyrosine kinase activity down-regulates Rho-dependent responses during *Shigella* entry into epithelial cells and stress fibre formation. *J. Cell Sci.* 113:71-80.

Dupré-Aucouturier, S., Penhoat, A., Rougier, O., Bilbaut, A. (2002). ACTH-induced Cl⁻ current in bovine adrenocortical cells: correlation with cortisol secretion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282:E355-E365.

Ehret, W. (1995). Diagnose von Legionelleninfektion. *Internist (Berl).* 36:106-13.

- Engleberg, N.C., Carter, C., Weber, D.R., Cianciotto, N.P., Eisenstein, B.I. (1989). DNA sequence of mip, a Legionella pneumophila gene associated with macrophage infectivity. *Infect. Immun.* 57:1263-70.
- Fang, G.D., Fine, M., Orloff, J., Arisumi, D., Yu, V.L., Kapoor, W., Grayston, J.T., Wang, S.P., Kohler, R., Muder, R.R. et al. (1990). New and emerging etiologies for community-acquired pneumonia with implications for therapy. A prospective multicenter study of 359 cases. *Medicine (Baltimore)* 69:307-16.
- Fine, M.J., Orloff, J.J., Arisumi, D., Fang, G.D., Arena, V.C., Hanusa, B.H., Yu, V.L., Singer, D.E., Kapoor, W.N. (1990). Prognosis of patients hospitalized with community-acquired pneumonia. *Am J Med.* 88:1N-8N.
- Flink, M.T., Atchison, W.D. (2003). Iberotoxin-induced block of Ca²⁺-activated K⁺ channels induces dihydropyridine sensitivity of ACh release from mammalian motor nerve terminals. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305:646-52.
- Fraser, D.W., Tsai, T.R., Orenstein, W., Parkin, W.E., Beecham, H.J., Sharrar, R.G., Harris, J., Mallison, G.F., Martin, S.M., McDade, J.E., Shepard, C.C., und Brachman, P.S. (1977). Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N. Engl. J. Med.* 297:1189-97.
- Galan, J.E., Pace, J., Hayman, M.J. (1992). Involvement of the epidermal growth factor receptor in the invasion of cultured mammalian cells by Salmonella typhimurium. *Nature.* 357:588-9.
- Garzoni, L.R., Masuda, M.O., Capella, M.M., Lopes, A.G., de Meirelles, Mde N. (2003). Characterization of [Ca²⁺]_i responses in primary cultures of mouse cardiomyocytes induced by Trypanosoma cruzi trypomastigotes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98:487-93.
- Giacometti, A., Cirioni, O., Barchiesi, F., Ancarani, F., Scalise, G. (2000). *In vitro* anti-cryptosporidial activity of cationic peptides alone and in combination with inhibitors of ion transport systems. *J. Antimicrob. Chemother.* 45:651-654.
- Hamakawa, T., Woodin, M.A., Bjorgum, M.C., Painter, S.D., Takasaki, M., Lukowiak, K., Nagle, G.T., Syed, N.I. (1999). Excitatory synaptogenesis between identified Lymnaea neurons requires extrinsic trophic factors and is mediated by receptor tyrosine kinases. *J. Neurosci.* 19:9306-12.
- Harrison T.R., Tinsley, R., Fauci, A.S., Braunwald, E., Kasper, D.L., Isselbacher, K.J., Wilson, J.D., Martin, J.B. (2001). Harrison's Principles of Internal Medicine. 15. Auflage. McGraw-Hill, Inc., New York.
- Hickey, E.K., Cianciotto, N.P. (1994). Cloning and sequencing of the Legionella pneumophila fur gene. *Gene.* 27;143:117-21.

- Hoge, C.W., Breiman, R.F. (1991). Advances in the epidemiology and control of Legionella infections. *Epidemiol. Rev.* 13:329-40.
- Holland, I.B., Jones, H.E., Campell, A.K., Jacq, A. (1999). An assessment of the role of intracellular free Ca²⁺ in *E. coli*. *Biochimie.* 81:901-7.
- Horwitz, M.A., und Silverstein S.C. (1980). Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiplies intracellularly in human monocytes. *J. Clin. Invest.* 66:441-50.
- Horwitz, M.A., Maxfield, F.R. (1984). Legionella pneumophila inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *J. Cell Biol.* 99:1936-43.
- Horwitz, M.A. (1992). Interactions between macrophages and Legionella pneumophila. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 181:265-82.
- Hu, G.-Y., Biró, Z., Hill, R.H., Grillner, S. (2002). Intracellular QX-314 Causes Depression of Membrane Potential Oscillations in Lamprey Spinal Neurons During Fictive Locomotion. *J. Neurophysiol.* 87:2676-2683.
- Jentsch, T.J., Gunther, W. (1997). Chloride channels: an emerging molecular picture. *Bioessays.* 19:117-26.
- Jepras, R.I., Fitzgeorge, R.B. (1986). The effect of oxygen-dependent antimicrobial systems on strains of Legionella pneumophila of different virulence. *J. Hyg. (Lond).* 97:61-9.
- Johnson, W., Varner, L., Poch, M. (1991). Acquisition of iron by Legionella pneumophila: role of iron reductase. *Infect. Immun.* 59:2376-81.
- Keen, M.G., Hoffman, P.S. (1989). Characterization of a Legionella pneumophila extracellular protease exhibiting hemolytic and cytotoxic activities. *Infect. Immun.* 57:732-8.
- Kirby, B.D., Snyder, K.M., Meyer, R.D., Finegold, S.M. (1980). Legionnaires' disease: report of sixty-five nosocomially acquired cases of review of the literature. *Medicine (Baltimore).* 59:188-205.
- Koh, S.D., Bradley, K.K., Rae, M.G., Keef, K.D., Horowitz, B., und Sanders, K.M. (1998). Basal Activation of ATP-Sensitive Potassium Channels in Murine Colonic Smooth Muscle. *Cell.* 75:1793-1800.
- Kohler, R., Bubert, A., Goebel, W., Steinert, M., Hacker, J., Bubert, B. (2000). Expression and use of the green fluorescent protein as a reporter system in Legionella pneumophila. *Mol. Gen. Genet.* 262:1060-9.

- Kojima, I., Kojima, K., Rasmussen, H. (1985). Effects of ANG II and K⁺ on Ca efflux and aldosterone production in adrenal glomerulosa cells. *Am. J. Physiol.* 248:E36-43.
- Kostelac, D., Rechkemmer, G., Briviba, K. (2003). Phytoestrogens Modulate Binding Response of Estrogen Receptors alpha and beta to the Estrogen Response Element. *J. Agric. Food Chem.* 51:7632-35.
- Kusaka, M., und Sperelakis, N. (1995). Inhibition of L-type calcium current by genistein, a tyrosine kinase inhibitor, in pregnant rat myometrial cells. *Biochim Biophys Acta.* 1240:196-200.
- Laussucq, S., Schuster, D., Alexander, W.J., Thacker, W.L., Wilkinson, H.W., Spika, J.S. (1988). False-positive DNA probe test for *Legionella* species associated with a cluster of respiratory illnesses. *J. Clin. Microbiol.* 26:1442-4.
- Lima, C.S., Ribeiro, M.L., Souza, L.A., Sardella, A.B., Wolf, V.M., Pessolani, M.C.V. (2001). Intracellular signals triggered during association of *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium bovis* BCG with human monocytes. *Microb. Pathog.* 31:37-45.
- Liu, H., Sperelakis, N. (1997). Tyrosine kinases modulate the activity of single L-type calcium channels in vascular smooth muscle cells from rat portal vein. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75:1063-8.
- Ma, J., und Pan, Z. (2003). Junctional membrane structure and store operated calcium entry in muscle cells. *Front. Biosci.* 8:242-255.
- Maiwald, M., Kissel, K., Srimuang, S., von Knebel Doeberitz, M., Sonntag, H.G. (1994). Comparison of polymerase chain reaction and conventional culture for the detection of legionellas in hospital water samples. *J. Appl. Bacteriol.* 76:216-25.
- Maiwald, M., Schill, M., Stockinger, C., Helbig, J.H., Luck, P.C., Witzleb, W., Sonntag, H.G. (1995). Detection of *Legionella* DNA in human and guinea pig urine samples by the polymerase chain reaction. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 14:25-33.
- Malik, Z.A., Denning, G.M., Kusner, D.J. (2000). Inhibition of Ca²⁺ Signaling by *Mycobacterium tuberculosis* Is Associated with Reduced Phagosome-Lysosome Fusion and Increased Survival within Human Macrophages. *J. Exp. Med.* 191:287-302.
- Malinowska, D.H. (1990). Cl⁻ channel blockers inhibit acid secretion in rabbit parietal cells. *Am. J. Physiol.* 259:G536-43.

- Marra, A., Horwitz, M.A., Shuman, H.A. (1990). The HL-60 model for the interaction of human macrophages with the Legionnaires' disease bacterium. *J. Immunol.* 144:2738-44.
- Marra, A., Blander, S.J., Horwitz, M.A., und Shuman, H.A. (1992). Identification of a *Legionella pneumophila* locus required for a intracellular multiplication in human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9607-11.
- Martin, P.M., Horwitz, K.B., Ryan, D.S., McGuire, W.L. (1978). Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. *Endocrinology.* 103:1860-7.
- Matsiota-Bernard, P., Pitsouni, E., Legakis, N., Nauciel, C. (1994). Evaluation of commercial amplification kit for detection of *Legionella pneumophila* in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 32:1503-5.
- McDade, J.E., Shepard, C.C., Fraser, D.W., Tsai, T.R., Redus, M.A., und Dowdle, W.R. (1977). Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N. Engl. J. Med.* 297:1197-203.
- Meconi, S., Capo, C., Remacle-Bonnet, M., Pommier, G., Raoult, D., Mege, J. (2001). Activation of Protein Tyrosine Kinases by *Coxiella burnetii*: Role in Actin Cytoskeleton Reorganization and Bacterial Phagocytosis. *Infect. Immun.* 69:2520-2526.
- Mengaud, J.M., Horwitz, M.A. (1993). The major iron-containing protein of *Legionella pneumophila* is an aconitase homologous with the human iron-responsive element-binding protein. *J. Bacteriol.* 175:5666-76.
- Mine, T., Kojima, I., Kimura, S., Ogata, E. (1987). Assessment of the role of Ca²⁺ mobilization from intracellular pool(s), using dantrolene, in the glycogenolytic action of alpha-adrenergic stimulation in perfused rat liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 927:229-34.
- Mintz, C.S., Schultz, D.R., Arnold, P.I., Johnson, W. (1992). *Legionella pneumophila* lipopolysaccharide activates the classical complement pathway. *Infect. Immun.* 60:2769-76.
- Mintz, C.S., Arnold, P.I., Johnson, W., Schultz, D.R. (1995). Antibody-independent binding of complement component C1q by *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 63:4939-43.
- Moll, H., Sonesson, A., Jantzen, E., Marre, R., Zahringer, U. (1992). Identification of 27-oxo-octacosanoic acid and heptacosane-1,27-dioic acid in *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiol. Lett.* 76:1-6.

Morito, K., Hirose, T., Kinjo, J., Hirakawa, T., Okawa, M., Nohara, T., Ogawa, S., Inoue, S., Muramatsu, M., Masamune, Y. (2001). Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. *Biol. Pharm. Bull.* 24:351-6.

Nagaishi, K., Adachi, R., Matsui, S., Yamaguchi, T., Kasahara, T., Suzuki, K. (1999) Herbimycin A inhibits both dephosphorylation and translocation of cofilin induced by opsonized zymosan in macrophagelike U937 cells. *J. Cell Physiol.* 180:345-54.

Nakazawa, K., Ohno, Y. (2003). Block by Phytoestrogens of Recombinant Human Neuronal Nicotinic Receptors. *J. Pharmacol. Sci.* 93:118-121.

Neumeister, B., Woerndle, S., und Bartmann, P. (1996). Effects of different surfactant preparations on bacterial growth in vitro. *Biol. Neonate.* 70:128-34.

Norris, V., Chen, M., Goldberg, M., Voskuil, J., McGurk, G., Holland, I.B. (1991). Calcium in bacteria: a solution to which problem? *Mol. Microbiol.* 5:775-8.

Norris, V., Grant, S., Freestone, P., Canvin, J., Sheikh, F.N., Toth, I., Trinei, M., Modha, K., Norman, R.I. (1996). Calcium signalling in bacteria. *J. Bacteriol.* 178:3677-82.

Ogata, R., Kitamura, K., Ito, Y., Nakano, H. (1997). Inhibitory effects of genistein on ATP-sensitive K⁺ channels in rabbit portal vein smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 122:1395-404.

Ogawara, H., Akiyama, T., Ishida, J., Watanabe, S., Suzuki, K. (1986). A specific inhibitor for tyrosine protein kinase from *Pseudomonas*. *J. Antibiot. (Tokyo).* 39:606-8.

Ogura, T., Shuba, L.M., McDonald, T.F. (1999). L-type Ca²⁺ current in guinea pig ventricular myocytes treated with modulators of tyrosine phosphorylation. *Am. J. Physiol.* 276:H1724-33.

Ohta, T., Yasuda, W., Hasegawa, A., Ito, S., Nakazato, Y. (2000). Effects of inhibitors for tyrosine kinase and non-selective cation channel on capacitative Ca(2⁺) entry in rat ileal smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 387:211-20.

Otten, S., Iyer, S., Johnson, W., Montgomery, R. (1986). Serospecific antigens of *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.* 167:893-904.

Paillart, C., Carlier, E., Guedin, D., Dargent, B., Couraud, F. (1997). Direct block of voltage-sensitive sodium channels by genistein, a tyrosine kinase inhibitor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280:521-6.

Palmer, L.M., Reilly, T.J., Utsalo, S.J., Donnenberg, M.S. (1997). Internalization of *Escherichia coli* by Human Renal Epithelial Cells Is Associated with Tyrosine Phosphorylation of Specific Host Cell Proteins. *Infect. Immun.* 65:2570-75.

- Pan, Z., Yang, D., Nagaraj, R.Y., Nosek, T.A., Nishi, M., Takeshima, H., Cheng, und H., Ma, J.. (2002). Dysfunction of store-operated calcium channel in muscle cells lacking *mg29*. *Nat. Cell Biol.* 4:379-383.
- Pasculle, A.W., Veto, G.E., Krystofiak, S., McKelvey, K., Vrsalovic, K. (1989). Laboratory and clinical evaluation of a commercial DNA probe for the detection of *Legionella* spp. *J. Clin. Microbiol.* 27:2350-8.
- Payne, N.R., Horwitz, M.A. (1987). Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors. *J. Exp. Med.* 166:1377-89.
- Petitjean, F., Dournon, E., Strosberg, A.D., Hoebeke, J. (1990). Isolation, purification and partial analysis of the lipopolysaccharide antigenic determinant recognized by a monoclonal antibody to *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Res. Microbiol.* 141:1077-94.
- Pounder, D.J. (1983). Warthin-Starry for *Legionella*. *Am. J. Clin. Pathol.* 80:276.
- Rajagopalan-Levasseur, P., Dournon, E., Vilde, J.L., Pocard, J.J. (1992). Differences in the respiratory burst of human polymorphonuclear leukocytes induced by virulent and avirulent *Legionella pneumophila* serogroup 1. *J. Biolumin. Chemilumin.* 7:109-16.
- Rdest, U., Wintermeyer, E., Ludwig, B., Hacker, J. (1991). Legiolysin, a new hemolysin from *L. pneumophila*. *Zentralbl. Bakteriol.* 274:471-4.
- Rechnitzer, C., Diamant, M., Pedersen, B.K. (1989a). Inhibition of human natural killer cell activity by *Legionella pneumophila* protease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis.* 8:989-92.
- Rechnitzer, C., Tvede, M., Doring, G. (1989b). A rapid method for purification of homogeneous *Legionella pneumophila* cytotoxic protease using fast protein liquid chromatography. *FEMS Microbiol. Lett.* 50:39-44.
- Reingold, A.L., Thomason, B.M., Brake, B.J., Thacker, L., Wilkinson, H.W., und Kuritsky, J.N. (1984). *Legionella pneumophila* in the United States: the distribution of serogroups and species causing human illness. *J. Infect. Dis.* 149:819.
- Rickard, D.J., Monroe, D.G., Ruesink, T.J., Khosla, S., Riggs, B.L., Spelsberg, T.C. (2003). Phytoestrogen genistein acts as an estrogen agonist on human osteoblastic cells through estrogen receptors alpha and beta. *J. Cell Biochem.* 89:633-46.
- Rikihisa, Y., Zhang, Y., Park, J. (1995). Role of Ca^{2+} and Calmodulin in Ehrlichial Infection in Macrophages. *Infect. Immun.* 63:2310-2316.

- Rosenshine, I., Duronio, V., Finlay, B.B. (1992). Tyrosine Protein Kinase Inhibitors Block Invasin-Promoted Bacterial Uptake by Epithelial Cells. *Infect. Immun.* 60:2211-17.
- Rosenshine, I., Ruschkowski, V., Foubister, V., Finlay, B.B. (1994). *Salmonella typhimurium* Invasion of Epithelial Cells: Role of Induced Host Cell Tyrosine Protein Phosphorylation. *Infect. Immun.* 62:4969-4974.
- Ruckdeschel, G., und Ehret, W. (1993). *Legionella* infection. *Ergeb. Inn. Med. Kinderheilkd.* 61:207-302.
- Sargeant, P., Farndale, R.W., Sage, S.O. (1993). ADP- and thapsigargin-evoked Ca²⁺ entry and protein-tyrosine phosphorylation are inhibited by the tyrosine kinase inhibitors genistein and methyl-2,5-dihydroxycinnamate in fura-2-loaded human platelets. *J. Biol. Chem.* 268:18151-6.
- Segal, E.D., Falkow, S., Tompkins, L.S. (1996). Helicobacter pylori attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangement and tyrosine phosphorylation of host cell proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:1259-64.
- Shainkin-Kestenbaum, R., Winikoff, Y., Kol, R., Chaimovitz, C., Sarov, I. (1989). Inhibition of growth of Chlamydia trachomatis by the calcium antagonist verapamil. *J. Gen. Microbiol.* 135:1619-23.
- Sonesson, A., Jantzen, E., Bryn, K., Larsson, L., Eng, J. (1989). Chemical composition of a lipopolysaccharide from Legionella pneumophila. *Arch. Microbiol.* 153:72-8.
- Song, R.X., Mor, G., Naftolin, F., McPherson, R.A., Song, J., Zhang, Z., Yue, W., Wang, J., Santen, R. (2001). Effect of Long-Term Estrogen Deprivation on Apoptotic Responses of Breast Cancer to 17beta-Estradiol. *J. Natl. Cancer Inst.* 93:1714-23.
- Starnbach, M.N., Falkow, S., Tompkins, L.S. (1989). Species-specific detection of Legionella pneumophila in water by DNA amplification and hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 27:1257-61.
- Stout, J.E., Yu, V.L. (1997). Legionellosis. *N. Engl. J. Med.* 337:682-7.
- Suetsugi, M., Su, L., Karlsberg, K., Yuan, Y., Chen, S. (2003). Flavone and Isoflavone Phytoestrogens Are Agonists of Estrogen-Related Receptors. *Mol. Cancer Res.* 1:981-991.
- Summersgill, J.T., Raff, M.J., Miller, R.D. (1990). Interactions of virulent and avirulent Legionella pneumophila with human monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 47:31-8.

Susa, M., Marre, R. (1999). *Legionella pneumophila* Invasion of MRC-5 Cells Induces Tyrosine Protein Phosphorylation. *Infect. Immun.* 67:4490-98.

Tang, P.W., Toma, S., Rajkumar, W.D. (1989). Detection of urinary antigens of *Legionella pneumophila* serogroup 12 by broad-spectrum enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 27:783-4.

Tsai, H.W., Katzenellenbogen, J.A., Katzenellenbogen, B.S., Shupnik, M.A. (2004). Protein kinase A activation of estrogen receptor alpha transcription does not require proteasome activity and protects the receptor from ligand-mediated degradation. *Endocrinology.* 145:2730-8.

Tseng, C.H., und Renner E.D. (1983). A new staining method for *Legionella pneumophila*. *Am. J. Clin. Pathol.* 79:377-8.

Tully, M. (1991). A plasmid from a virulent strain of *Legionella pneumophila* is conjugative and confers resistance to ultraviolet light. *FEMS Microbiol. Lett.* 69:43-8.

Venezia, R.A., Agresta, M.D., Hanley, E.M., Urquhart, K., und Schoonmaker, D. (1994). Nosocomial legionellosis associated with aspiration of nasogastric feedings diluted in tap water. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 15:529-33.

Vieira, O.V., Botelho, R.J., Grinstein S. (2002). Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem. J.* 366:689-704.

Wadowsky, R.M., Wolford, R., McNamara, A.M., und Yee, R.B. (1985). Effect of temperature, pH, and oxygen level on the multiplication of naturally occurring *Legionella pneumophila* in potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:1197-205.

Wang, C., Davis, N., Colvin, R.A. (1997). Genistein Inhibits Na⁺/Ca²⁺Exchange Activity in Primary Rat Cortical Neuron Culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233:86-90.

Wang, Y., Wagner, M.B., Kumar, R., Cheng, J., Joyner, R.W. (2003). Inhibition of fast sodium current in rabbit ventricular myocytes by protein tyrosine kinase inhibitors. *Pflugers Arch.* 446:485-91.

Washizuka, T., Horie, M., Obayashi, K., Sasayama, S. (1998). Genistein inhibits slow component delayed-rectifier K currents via a tyrosine kinase-independent pathway. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30:2577-90.

Weisse, A.B. (1992). A plague in Philadelphia. The story of Legionnaires' disease. *Hosp. Pract.* 27:151-4.

Wilkinson, H.W., Farshy, C.E., Fikes, B.J., Cruce, D.D., Yealy, L.P. (1979). Measure of immunoglobulin G-, M-, and A-specific titers against *Legionella pneumophila* and inhibition of titers against nonspecific, gram-negative bacterial

antigens in the indirect immunofluorescence test for legionellosis. *J. Clin. Microbiol.* 10:685-9.

Wilkinson, H.W., Fikes, B.J. (1981). Detection of cell-associated or soluble antigens of *Legionella pneumophila* serogroups 1 to 6, *Legionella bozemanii*, *Legionella dumoffii*, *Legionella gormanii*, and *Legionella micdadei* by staphylococcal coagglutination tests. *J. Clin. Microbiol.* 14:322-5.

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

Williams, R.J. (2002). Calcium. *Methods Mol. Biol.* 172:21-49.

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

Wintermeyer, E., Rdest, U., Ludwig, B., Debes, A., Hacker, J. (1991). Characterization of legiolysin (Ily), responsible for haemolytic activity, colour production and fluorescence of *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* 5:1135-43.

Wintermeyer, E., Flugel, M., Ott, M., Steinert, M., Rdest, U., Mann, K.H., Hacker, J. (1994). Sequence determination and mutational analysis of the Ily locus of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 62:1109-17.

Wong, D.M., Herscowitz, H.B. (1979). Immune activation by T-independent antigens: lack of effect of macrophage depletion on the immune response to TNP-LPS, PVP and dextran. *Immunology.* 37:765-75.

Wooldridge, K.G., Williams, P.H., Ketley, J.M. (1996). Host signal transduction and endocytosis of *Campylobacter jejuni*. *Microb. Pathog.* 21:299-305.

Wright, J.B., Athar, M.A., van Olm, T.M., Wootliff, J.S., Costerton, J.W. (1989). Atypical legionellosis: isolation of *Legionella pneumophila* serogroup 1 from a patient with aspiration pneumonia. *J. Hosp. Infect.* 13:187-90.

Yamamoto, Y., Klein, T.W., Shinomiya, H., Nakano, M., Friedman, H. (1992). Infection of macrophages with *Legionella pneumophila* induces phosphorylation of a 76-kilodalton protein. *Infect. Immun.* 60:3452-5.

Yokoshiki, H., Sumii, K., Sperelakis, N. (1996). Inhibition of L-type Calcium Current in Rat Ventricular Cells by the Tyrosine Kinase Inhibitor, Genistein and its Inactive Analog, Daidzein. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 28:807-814.

Yu, V. L. (1993). Could aspiration be the major mode of transmission for *Legionella*? *Am. J. Med.* 95:13-5.

Zhao, F., Li, P., Chen, S.R., Louis, C.F., Fruen, B.R. (2001). Dantrolene inhibition of ryanodine receptor Ca²⁺ release channels. Molecular mechanism and isoform selectivity. *J. Biol. Chem.* 276:13810-6.

Ziegler-Heitbrock, H.W., Thiel, E., Futterer, A., Herzog, V., Wirtz, A., Riethmuller, G. (1988). Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int. J. Cancer.* 41:456-61.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abh.	abhängig
ACES	N-2-Acetamino-2-aminoethane-sulphonic-acid
Acp	acyl carrier protein
Ak	Arbeitskonzentration
BCYE	Buffered charcoal yeast extract agar
BYE	Buffered yeast extract agar
bzw.	beziehungsweise
CaBPs	Calcium-bindende Proteine
CDC	Center for Disease Control
CFU	Colony forming units
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
dest.	destilliert
dichl.	dichlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>dot</i>	Defect In Organelle Trafficking-Locus
<i>E.</i>	Escherichia
EGFP	Expressionsplasmid für das grün-fluoreszierende Protein
engl.	Englisch
ERRs	Estrogen Related Receptors
et al.	et alteri
<i>fur</i>	Ferric Uptake Regulation Protein
g	Erdbeschleunigung (9,81...)
g	Gramm
h	Stunde
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
hydrochl.	hydrochlorid
<i>icm</i>	Intracellular Multiplication Locus
KBE	Koloniebildende Einheiten

<i>L.</i>	Legionella
Lm	Lösungsmittel
LPS	Lipopolysaccharid
max.	maximal
<i>micp</i>	Major Iron Containing Protein
mg	Miligramm
Min	Minuten
<i>mip</i>	Macrophage Infectivity Potentiator
ml	Mililiter
mm	Milimeter
mM	Milimol
MM6	Mono Mac 6
MO	Montana
<i>M.</i>	Mycobacterium
nM	Nanomol
OD	Optische Dichte
OPI	Oxalacetat-Pyruvat-Insulin
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PTK	Protein-Tyrosinkinase
PTP	Proteintyrosin-Phosphorylierung
R.P.M.	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RYR	Ryanodin-Rezeptor
SG	Serogruppe
TCS	True Confocal Scanner
TK	Tyrosinkinase
UV	Ultraviolett
z. B.	zum Beispiel
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromol

Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Neumeister für ihre unermüdliche Unterstützung und ihre vielseitige Förderung.

Hagen Wieland möchte ich für seinen geduldigen Einsatz und seine Hilfestellung - besonders aus dem entfernten Freising - danken.

Besonderer Dank geht an Marion Faigle. Als leitende MTA hatte sie stets den Überblick und hat mir besonders auch bei Kleinigkeiten auf die Sprünge geholfen.

Schließlich möchte ich mich noch bei denjenigen bedanken, die mir die Arbeit an der Dissertation sehr erleichtert haben; Nadja, Daniela und Johannes aus der Arbeitsgruppe Infektionsbiologie, meinen unvergesslichen Mitbewohnern und Freunden, sowie ganz besonders meinen Eltern.

Für die finanzielle Unterstützung möchte ich mich beim Graduiertenkolleg „Zellbiologische Mechanismen immunassoziierter Prozesse“ (GK 794) bedanken.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Nicole Hechtel
Geburtsdatum: 10. Juli 1980
Geburtsort: Würzburg

Ausbildung

Schule: Fanny-Leicht-Gymnasium Stuttgart
Abschluß: Abitur, Juni 2000

Hochschule: Eberhard-Karls-Universität Tübingen,
Studium der Humanmedizin, Beginn WS 2000/01

Examina: Ärztliche Vorprüfung, Herbst 2002
Erster Abschnitt der Ärztl. Prüfung, Herbst 2003
Zweiter Abschnitt der Ärztl. Prüfung, Frühjahr 2006
15.05.2007: Dritter Abschnitt der Ärztl. Prüfung

Ausland: Staatliche Lomonosov Universität Moskau,
Russische Föderation, WS 2004/05

Praktisches Jahr: Reutlingen (Gynäkologie und Chirurgie)
Zofingen, Schweiz (Innere Medizin)

seit Juli 2007 Assistenzärztin an der Frauenklinik der
Technischen Universität Dresden