



Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Eidgenössisches Departement für
Umwelt, Verkehr, Energie und Kommunikation UVEK
Bundesamt für Energie BFE

WACHSTUMSREGULATION VON *LEGIONELLA* *PNEUMOPHILA* IN BIOFILMEN UND AMÖBEN

Schlussbericht

Ausgearbeitet durch

Prof. Dr. Hubert Hilbi, ETH Zürich, Institut für Mikrobiologie
Wolfgang-Pauli-Strasse 10, HCI G405, 8093 Zürich
hilbi@micro.biol.ethz.ch, <http://www.micro.biol.ethz.ch>

Impressum

Datum: Dezember 2006

Im Auftrag des Bundesamt für Energie, Forschungsprogramm „Rationelle Energienutzung in Gebäuden“

Mühlestrasse 4, CH-3063 Ittigen

Postadresse: CH-3003 Bern

Tel. +41 31 322 56 11, Fax +41 31 323 25 00

www.bfe.admin.ch

BFE-Projektleiter: Bereichsleiter Andreas Eckmanns, Andreas.Eckmanns@bfe.admin.ch

Projektnummer: 100 579 (KTI 6629.2)

Bezugsort der Publikation: www.energieforschung.ch

Für den Inhalt und die Schlussfolgerungen ist ausschliesslich der Autor dieses Berichts verantwortlich.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	1
1. Ausgangslage	2
2. Ziel der Arbeit	3
3. Methoden	3
4. Ergebnisse	4
5. Diskussion	8
6. Schlussfolgerungen	8
Referenzen	9

Zusammenfassung

Legionellen (*Legionella pneumophila*) sind die Erreger der Legionärskrankheit, einer schweren Lungenentzündung. In der Umwelt besiedeln die Bakterien Biofilme und vermehren sich in Amöben, die sich normalerweise von Bakterien ernähren. Im vorliegenden Projekt werden diese Prozesse molekular- und zellbiologisch untersucht, um letztlich die Besiedelung von Wassersystemen durch Legionellen einzudämmen. Insbesondere soll das Projekt dazu beitragen Energieschonende Alternativen zur thermischen Legionellen-Dekontamination zu etablieren.

Projekt 1: Biofilmbildung von *Legionella pneumophila*

Die Biofilmbildung von *L. pneumophila* wurde in statischen und dynamischen Systemen unter Verwendung von komplexen Nährmedien untersucht. Unter statischen Bedingungen hafteten sowohl Legionellen-Sämme aus der Umwelt als auch Patienten-Isolate an Oberflächen und bildeten Biofilme in Zellkultur-Platten aus Polystyrol. Eine kontinuierliche Zunahme der Biofilm-Masse an Oberflächen wurde nur gemessen, solange die Bakterien im Nährmedium wuchsen. Die Bildung der Biofilme war teilweise genetisch bedingt, da *L. pneumophila*-Bakterien, die einen Defekt in einem Regulations-Gen (*fliA*) tragen, in der Biofilmbildung beeinträchtigt waren. In einem dynamischen Flusskammer-System hafteten die Legionellen anfänglich an Polystyrol- und Glas-Oberflächen, wurden jedoch im Verlauf der Experimente kontinuierlich ausgewaschen. Die Geschwindigkeit des Auswaschens war abhängig von der Fliessgeschwindigkeit und wurde durch Biofilme von Umweltbakterien positiv oder negativ beeinflusst. Die Wechselwirkungen von Legionellen mit bestimmten Umweltbakterien scheint daher ihre Persistenz in Biofilmen zu definieren.

Projekt 2: Wachstumsregulation von *Legionella pneumophila* in Amöben

Im Genom von *L. pneumophila* finden sich die *lqs*-Gene welche vermutlich Gen-Regulation mittels eines spezifischen Signal-Moleküls („Autoinducer“) vermitteln. Das Regulator-Gen dieses Gen-Clusters (*lqsR*) wurde molekularbiologisch eliminiert und die Mutante charakterisiert. Das Produkt des Gens beeinflusst die Wechselwirkungen zwischen Legionellen und Amöben und ist insbesondere während der Aufnahme der Bakterien durch die Amöben wichtig. Das Gen *lqsA* wird für die Bildung des Signalmoleküls benötigt. Das sekretierte „Autoinducer“-Molekül kann im Darmbakterium *Escherichia coli* produziert und in Bakterien-Überständen mittels eines bakteriellen Reporter-Stammes detektiert werden.

Die in diesem Projekt erarbeiteten Tests können dazu verwendet werden, die Wirkung von nicht-thermischen Alternativen (Antibiotika, Chemikalien und biologischen Verbindungen) auf die Inaktivierung von Legionellen in Biofilmen und die Biofilmbildung von Legionellen zu prüfen.

Abstract

Legionella pneumophila is the causative agent of Legionnaires' disease, a severe pneumonia. In the environment, the bacteria colonize biofilms and replicate within amoebae, which normally feed on bacteria. In the current project, these processes are analyzed on a molecular and cellular level, with the ultimate goal to inhibit the colonization of water systems by *Legionella*. Specifically, the project should contribute to establish energy saving alternatives to thermal *Legionella* decontamination protocols.

Project 1: Formation of biofilms by *Legionella pneumophila*

The formation of biofilms by *L. pneumophila* was analyzed in static and dynamic systems using a complex growth medium. Under static conditions, environmental as well as clinical *L. pneumophila* isolates adhered to surfaces and formed biofilms on polystyrene tissue culture plates. An increase of bacterial mass on surfaces was observed only as long as the bacteria grew in liquid medium. The formation of biofilms was in part genetically controlled, since *L. pneumophila* defective for a regulatory gene (*fliA*) was impaired for biofilm formation. In a dynamic flow chamber system, *L. pneumophila* initially adhered to polystyrene and glass surfaces, but was continuously washed out in the course of the experiments. The rate of detachment correlated with the flow rate and was negatively or positively influenced by the presence of biofilms produced by environmental bacteria. Thus, the interactions of *L. pneumophila* with environmental bacteria appear to define its persistence in biofilms.

Project 2: Growth regulation of *Legionella pneumophila* in amoebae

The genome of *L. pneumophila* harbors a gene cluster, the *lqs* genes, which presumably mediate gene regulation via a specific signaling molecule termed „autoinducer“. The gene encoding a putative regulator (*lqsR*) was deleted from the genome, and the mutant was characterized. The gene product was found to play a role in the interactions between *L. pneumophila* and amoeba, in particular during uptake of the bacteria by the amoebae. The *lqsA* gene is required for the synthesis of the signaling molecule. The secreted „autoinducer“ can be produced in the enteric bacterium *Escherichia coli* and detected in supernatants of the bacteria by using a bacterial reporter strain.

The assays established in this project may be used to test non-thermal alternatives (antibiotics, chemicals and biological compounds) for the inactivation of *Legionella* in biofilms and biofilm formation by *Legionella*.

1. Ausgangslage

Die Sanitär-, Heizungs- und Energie-Branche sieht sich in zunehmendem Maße Problemen ausgesetzt, die durch Kontamination wasserführender Systeme mit Legionellen entstehen. So wurden zum Beispiel in einer im September dieses Jahres durchgeföhrten Untersuchung des Magazins „K-Tipp“ in 5 von 25 Proben zum Teil massiv überschrittene Grenzwerte festgestellt (Arnold, 2006).

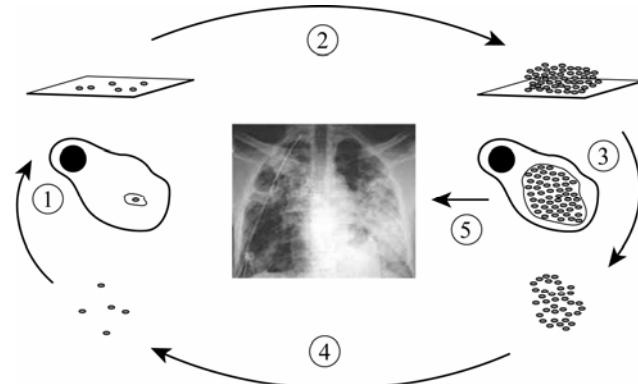
Die vorgeschlagenen Lösungsansätze sind häufig einseitig und wissenschaftlich wenig fundiert. Der SVGW (Schweizerischer Verein der Gas- und Wasserfachmänner) empfiehlt eine starke Erhöhung der Betriebstemperatur, um Legionellen-Kontaminationen zu reduzieren oder zu verhindern. Diese Methode ist Energie-intensiv, häufig ineffizient und nur kurzfristig erfolgreich und fördert zudem Kalkablagerungen und Temperaturschäden in den wasserführenden Systemen. Energie-sparende, nachhaltige und innovative Alternativen zur thermischen Dekontamination werden kaum berücksichtigt.

Legionella pneumophila ist der Erreger der Legionärskrankheit. Diese schwere Lungenentzündung trifft bevorzugt ältere und immun-geschwächte Personen und verläuft in 5-20% der Fälle tödlich. Legionellen leben weit verbreitet in Boden und Wasser, wo sie sich in Amöben vermehren und Biofilme besiedeln (Abb. 1). Amöben und Biofilme schützen die opportunistisch pathogenen Legionellen vor physikalischen, chemischen, und antibiotischen Einflüssen. Die Bakterien werden durch Inhalation von feinen Wassertröpfchen (Aerosolen) aus kontaminierten Wasseranlagen, z.B. Kühltürmen, Duschen oder Sprudelbädern übertragen, jedoch nicht von Mensch zu Mensch. Eine

Voraussetzung für die Pathogenität von Legionellen ist ihre Eigenschaft, sich intrazellulär in Makrophagen (Immunzellen) der menschlichen Lunge zu vermehren. Sowohl Amöben als auch Makrophagen sind so genannte „Phagozyten“ (Fresszellen), in denen sich die Legionellen mit einem ähnlichen Mechanismus vermehren (Albers *et al.*, 2005; Hilbi *et al.*, 2001; Hilbi, 2003; Hilbi, 2006; Hilbi *et al.*, eingereicht; Otto *et al.*, 2004; Roy and Tilney, 2002; Segal *et al.*, 1998; Segal and Shuman, 1999; Vogel *et al.*, 1998; Weber *et al.*, 2006).

Besiedlung und Bildung von Biofilmen durch Legionellen sind gegenwärtig molekularbiologisch nicht untersucht. Es gab bisher ebenfalls keine Studien, die sich mit Dichte-abhängiger Gen-Regulation („quorum sensing“) durch sekretierte Signal-Moleküle von Legionellen befassen. Diese Art der Gen-Regulation spielt für Biofilmbildung und Virulenz von anderen pathogenen Bakterien eine entscheidende Rolle.

Abb. 1. Lebenszyklus von Legionellen in der Umwelt und Übertragung auf den Menschen. ① Legionellen besiedeln in der Umwelt Oberflächen oder Amöben und ② bilden Biofilme oder vermehren sich intrazellulär. ③ Die Bakterien werden freigesetzt, ④ überleben für längere Zeit in der Umwelt und kolonisieren erneut Oberflächen oder Amöben. ⑤ Durch Inhalation von kontaminierten Aerosolen gelangen Legionellen in die Lunge, vermehren sich in Makrophagen und können die Legionärskrankheit verursachen.



2. Ziel der Arbeit

Die bestehenden Unsicherheiten in Bezug auf Dekontamination von Legionellen-verseuchten Wasser-Systemen lassen sich nur ausräumen, indem Lebensweise und Nischen der Legionellen in der Umwelt in vertieftem Masse beforscht werden. Im vorliegenden Projekt wird das Wachstum von Legionellen in Biofilmen und Amöben analysiert. In späteren Phasen des Projektes sollen die molekularen Grundlagen erhöhter Resistenz von Legionellen in Biofilmen und Amöben gegenüber keimabtötenden Verfahren untersucht werden. Außerdem sollen neue Wege gefunden werden, um Biofilmbildung zu verhindern und somit die Wirksamkeit von sterilisierenden Verfahren zu erhöhen.

Um die Biofilmbildung und Zell-Zell-Kommunikation von Legionellen mittels genetischen, biochemischen und zellbiologischen Methoden zu analysieren, sollen (i) Testsysteme für die Biofilmbildung im Labor entwickelt, (ii) die Biofilmbildung von *Legionella*-Mutanten getestet, (iii) bakterielle Zell-Zell-Kommunikations-Wege erforscht, sowie (iv) die entsprechenden Signal-Moleküle und Zielgene identifiziert werden.

In einer späteren Phase des Projektes sollen Inhibitoren von *Legionella*-Biofilmbildung und Wachstum in Amöben identifiziert und getestet werden. Gelingt es, Biofilmbildung und Zell-Zell-Kommunikation zu unterbinden, wird mit hoher Wahrscheinlichkeit die Resistenz von Legionellen gegenüber keimabtötenden Verfahren erniedrigt und somit die Effizienz der Dekontamination von Legionellen-verseuchten Wassersystemen erhöht.

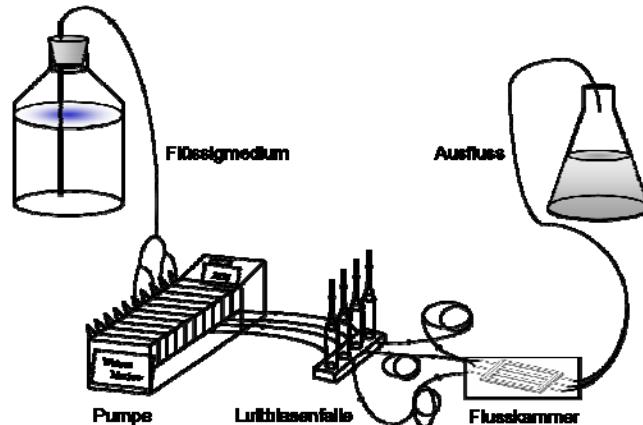
3. Methoden

Im vorliegenden Projekt wurden Methoden etabliert, um Adhäsion (Bindung) von Legionellen an Oberflächen und Biofilmbildung unter statischen Bedingungen mittels einer Kristall-Violett Färbung zu quantifizieren. Zu diesem Zweck wurden die Legionellen für 5 Tage in 96-Kammer-

Zellkulturplatten aus verschiedenen Kunststoffen in einem komplexen Wachstumsmedium (AYE) wachsen gelassen („aufrechtes“ System). Anschliessend wurden die planktonischen (freischwimmenden) Bakterien entfernt und die sessilen (adhärierenden) Bakterien mit einer Kristall-Violett-Lösung angefärbt. In diesem Test ist die Menge an gebundenem Farbstoff proportional zur Anzahl der Bakterien. Ausserdem wurde das Wachstum der Legionellen mittels optischer Dichte im Spektralphotometer bei 600 nm gemessen. Um auszuschliessen, dass es sich bei dem gemessenen Biofilm bloss um passiv sedimentierte Bakterien handelt, wurde ein Teil der Versuche auch in 96-Kammer-Zellkulturplatten durchgeführt, die am Deckel einen Kunststoffstift enthalten, auf dem sich der Biofilm bildete („inverses“ System).

Um die Besiedelung und Bildung von Biofilmen bei kontinuierlichen Fliessgeschwindigkeiten zu analysieren, wurde ein Flusskammer-System etabliert. An der Dänischen Technischen Universität haben Prof. S. Molin und seine Mitarbeiter ein System entwickelt, das die Analyse der bakteriellen Biofilmbildung unter reproduzierbaren Bedingungen bei konstanter Fliessgeschwindigkeit erlaubt (Abb. 2). In unserer Arbeitsgruppe wurde dieses System etabliert, um Legionellen-Biofilme dynamisch zu beschreiben, mithin also Besiedlung, Bildung, und Abbau von Biofilmen, Interaktionen mit Amöben, oder die Wirkung von antibiotischen Einflüssen auf Biofilme in Echtzeit mikroskopisch zu untersuchen. Die Kammern des Systems wurden für eine gewisse Zeit mit Bakterien inokuliert, bevor Wachstumsmedium mit einer konstanten Geschwindigkeit durch das System gepumpt wurde. Zu diesem Zweck wurden Legionellen verwendet, die ein grün-fluoreszierendes Protein produzieren, welches mittels Fluoreszenz-Mikroskopie detektiert werden kann. Sollte die Adhäsion von Legionellen an vorgeformte Biofilme analysiert werden, wurden verschiedene Umweltbakterien dem System zugesetzt, und der entstandene Biofilm nach einem Tag mit Legionellen inokuliert. Auf diese Weise konnte die dreidimensionale Architektur von Legionellen-Biofilmen, sowie die Persistenz der Legionellen in An- und Abwesenheit von anderen Umweltbakterien unter Flussbedingungen analysiert werden.

Abb. 2. Analyse der Biofilmbildung im Flusskammer-System. Das Flusskammer-System besteht aus einem Reservoir mit Flüssigmedium, das über eine Peristaltik-Pumpe und Luftblasenfalle bei konstanter Fliessgeschwindigkeit durch die Flusskammer gepumpt wird. In der Flusskammer adhärieren die Bakterien an einem Deckglas oder an den Kunststoff-Oberflächen. Die Bildung eines dreidimensionalen Biofilms wird mittels eines Fluoreszenz-Mikroskops in Echtzeit beobachtet, aufgezeichnet und am Computer rekonstruiert.



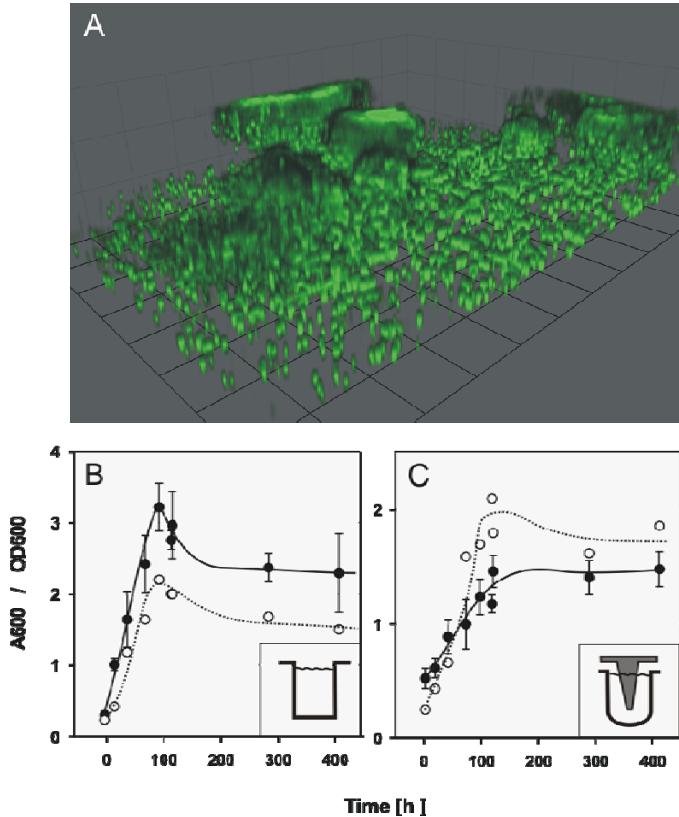
Die verwendeten Bakterienstämme, Amöben, Nährmedien, Methoden, Tests und Reagenzien sind ausführlich in der Fachzeitschrift „Applied and Environmental Microbiology“ beschrieben (Mampel et al., 2006a). Um die Genetik der Biofilmbildung und Wachstums-Regulation in Amöben zu analysieren wurden molekularbiologische Standard-Methoden angewandt: Klonierung und chromosomale Deletion von Genen, phänotypische Charakterisierung von Mutanten und Gen-Expressions-Analysen. Ausserdem wurden die Wechselwirkungen zwischen Legionellen und Amöben zellbiologisch charakterisiert, insbesondere die Aufnahme von Legionellen durch Amöben und die intrazelluläre Vermehrung der Bakterien.

4. Ergebnisse

1. Adhäsion und Biofilmbildung von Legionellen auf Kunststoff- und Glas-Oberflächen

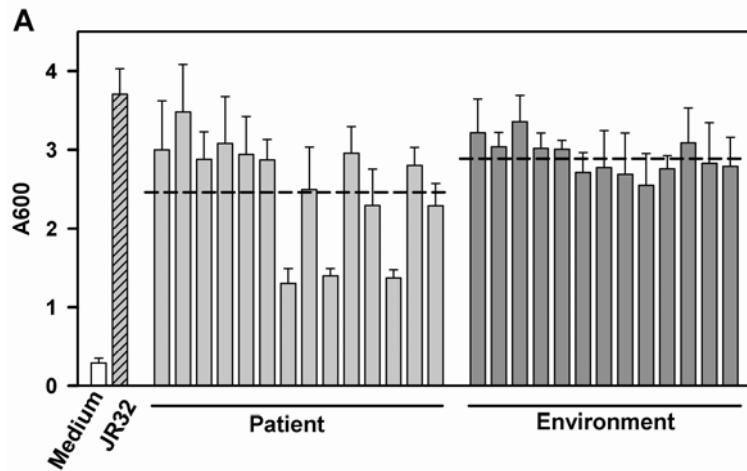
Adhäsion von Bakterien an Oberflächen ist eine Voraussetzung für die Biofilmbildung. Die Adhäsion von Legionellen an Kunststoff-Oberflächen wurde mittels Immunofluoreszenz-Mikroskopie analysiert (Abb. 3A) oder mittels einer optimierten Kristall-Violett-Färbung in 96-Kammer-Zellkulturplatten quantifiziert (Mampel *et al.*, 2006a). Die effizienteste Adhäsion wurde in Polystyrol-96-Kammer-Zellkulturplatten mit exponentiell wachsenden Legionellen als Inokulum gemessen (Abb. 3B). Adhäsion fand in allen getesteten Nährmedien (und in Wasser) statt, und scheint umgekehrt proportional zum Nährstoffreichtum des Mediums und dem bakteriellen Wachstum zu sein. Außerdem korrelierte die Vermehrung der frei schwimmenden (planktonischen) Bakterien mit der Zunahme der Masse der Oberflächen-gebundenen (sesshaften) Bakterien. Ähnliche Resultate wurden in 96-Kammer-Zellkulturschalen erhalten, die am Deckel einen Kunststoffstift enthielten, auf dem sich der Biofilm bildete. Daher scheint die Biofilmbildung von Legionellen unter diesen Bedingungen ein aktiver Prozess zu sein, und nicht nur passive Sedimentation. Bei 37 °C wurde etwa 30% weniger Biofilm gebildet als bei 23 °C oder 30 °C. In diesem Bereich und unter den gewählten Bedingungen ist die Temperatur-Abhängigkeit der Biofilmbildung daher gering.

Abb. 3. Biofilmbildung von *L. pneumophila* unter statischen Bedingungen in komplexem Nährmedium. (A) Konfokale Laser-Fluoreszenz-Mikroskopie eines repräsentativen Biofilmbereichs. Bakterien des Legionellen Wildtyp-Stammes JR32 (markiert mit grün-fluoreszierendem Protein, GFP) wuchsen auf Glassboden-Zellkulturschalen. Einheitszelle, 13 μm . Wachstum von frei schwimmenden oder Oberflächen-gebundenen Legionellen (B) in aufrechten oder (C) inversen 96-Kammer-Zellkulturschalen in komplexem AYE-Nährmedium. Das Wachstum von planktonischen oder sesshaften Legionellen wurde durch die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600} ; ○) oder Kristall-Violett-Färbung (A_{600} ; ●) ermittelt. Die Experimente wurden mindestens drei Mal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.



Klinische *L. pneumophila*-Isolate unterschieden sich nicht von Umwelt-Isolaten bezüglich ihrer Adhäsion an Polystyrol-96-Kammer-Zellkulturplatten (Abb. 4). Daraus lässt sich schliessen, dass zwischen dem Ort der Isolierung eines *L. pneumophila*-Stammes (Patient, Kühlurm, Wasser) und der Adhäsionsstärke keine Korrelation besteht. *L. pneumophila*-Serogruppen unterscheiden sich in der Pathogenität und anderen Eigenschaften. In verschiedenen *L. pneumophila*-Serogruppen fanden sich jedoch sowohl stark als auch schwach adhäsierende Isolate. Damit konnte gezeigt werden, dass keine Korrelation zwischen Serogruppe und Biofilmbildung besteht. Die Adhäsion von *L. pneumophila* JR32, einem Wildtyp-Stamm, der routinemässig im Labor verwendet wird, lag auf dem Niveau der fünf am stärksten adhäsierenden Isolate. Somit eignet sich dieser Stamm gut für detaillierte Untersuchungen zur Biofilmbildung.

Abb. 4. Biofilmbildung auf Kunststoff-Oberflächen von *L. pneumophila*-Isolaten aus Patienten und Umwelt. Biofilmbildung wurde mittels Kristall-Violett-Färbung in 96-Kammer-Zellkulturplatten quantifiziert. Die gepunktete Linie stellt die durchschnittliche Akkumulation von Biomasse der Patienten-, respektive Umwelt-Isolate dar. Die Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt.



Der Kristall-Violett-Test eignet sich gut, um die genetischen Voraussetzungen von Adhäsion und Biofilmbildung von Legionellen zu untersuchen, da sehr viele Bakterienstämme oder Mutanten gleichzeitig analysiert werden können. Interessanterweise produzierte eine *L. pneumophila*-Mutante, der das *fliA*-Regulations-Gen fehlt, etwa 30% weniger Biofilm, was darauf schliessen lässt, dass genetische Komponenten in der Biofilmbildung eine Rolle spielen (Tabelle 1; Mampel *et al.*, 2006a). Verschiedene andere definierte Mutanten, denen Oberflächen-Strukturen fehlen (Geisseln, Pili, „Icm/Dot“ oder „Lvh“ Transport-System), waren bezüglich ihrer Adhäsion nicht beeinträchtigt.

<i>L. pneumophila</i> Mutante	Relevante Charakteristika	Biofilmbildung [%] ¹	Std-Abw. [%]
BS100	$\Delta piliE_L$ (Typ IV pili fehlen)	105	11
Corby KH3	$\Delta flaA$ (Flagellen fehlen)	104	22
GS28-K	Δlvh (Lvh T4ASS ² fehlt)	106	15
GS3011	$\Delta icmT$ (Icm/Dot T4BSS ² nicht funktionell)	80	15
LELA2883	$\Delta dotB$ (Icm/Dot T4BSS ² nicht funktionell)	102	9
LELA2883-28	$\Delta dotB\Delta lvh$ (Icm/Dot T4BSS, Lvh T4ASS ² nicht funktionell)	104	10
LM1376	$\Delta rpoS$ (Sigma-Faktor RpoS (σ^{38}) fehlt)	110	15
MB410	$\Delta fliA$ (Sigma-Faktor FliA (σ^{28}) fehlt)	68	15
MB413	$\Delta letA$ ("Response regulator" LetA (GacA) fehlt)	97	13
MB464	$\Delta csrA/p206-csrA$ (CsrA, ein mRNA-bindender, globaler Repressor/ essentieller Aktivator der Replikation, unter der Kontrolle des P_{tac} -Promotors exprimiert); + IPTG, - IPTG	94; 122	11; 16

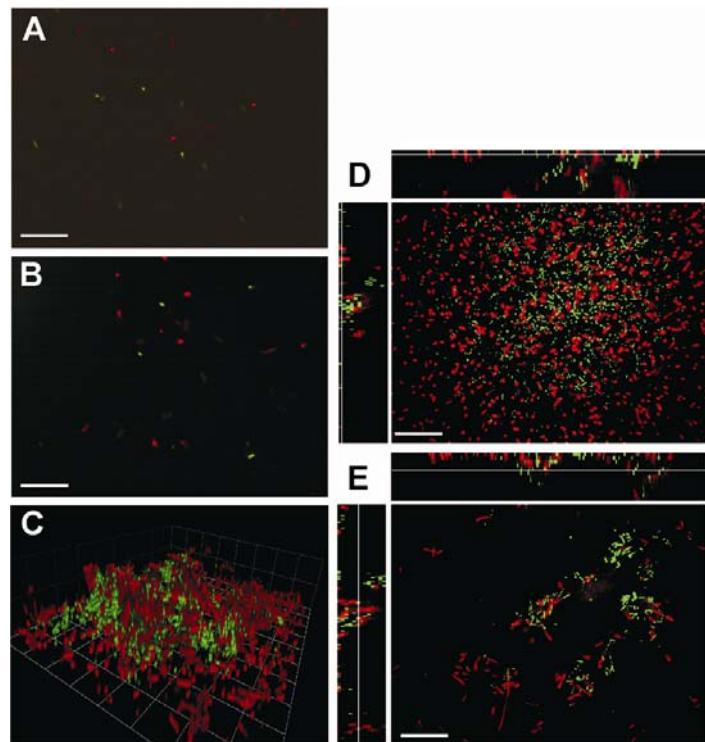
Tabelle 1 (vorhergehende Seite). Biofilmbildung durch definierte *L. pneumophila*-Mutanten.

¹ Als Referenz wurde der jeweilige isogene Wildtyp-Stamm verwendet (AA100, Corby, JR32, Lp02).

² T4ASS, T4BSS: Typ IVA oder Typ IVB Sekretions-System.

Wurde das Medium im inversen 96-Kammer-Zellkulturplatten-System zwei Mal pro Tag ausgetauscht, fand keine Akkumulation von Legionellen-Biomasse an die Kunststoff-Oberfläche mehr statt. Daher scheint das Wachstum von planktonischen (freischwimmenden) Legionellen eine Voraussetzung für die Zunahme der adhärierenden Bakterienmasse und der Biofilmbildung zu sein. Dieses Phänomen wurde auch auf Glas-Oberflächen beobachtet (Abb. 5, Mampel *et al.*, 2006a). Um Biofilmbildung mittels Fluoreszenz-Mikroskopie zu analysieren, wurden Legionellen, die ein rot- oder grün-fluoreszierendes Protein produzieren für drei Tage im Nährmedium gezüchtet. Ko-Kultivierung von grün- oder rot-fluoreszierenden *L. pneumophila* JR32 ergab, dass die einzelnen Bakterien statistisch verteilt waren und sich keine Mikro-Kolonien von klonal gewachsenen Bakterienaggregaten bildeten. Dieses Ergebnis und andere Resultate lassen vermuten, dass planktonisches Wachstum die Voraussetzung für die Biofilmbildung von *L. pneumophila* ist und die Legionellen auf Oberflächen nicht oder nur sehr langsam wachsen.

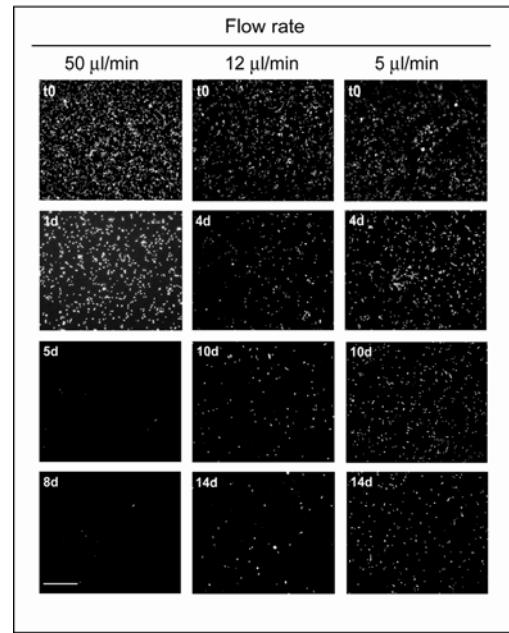
Abb. 5. Verteilung von grün- und rot-fluoreszierenden *L. pneumophila* in statischen oder quasi-statischen Ko-Kulturen in komplexem AYE-Nährmedium. Konfokale Laser-Mikroskopie von GFP-(grün) oder DsRed-produzierenden (rot) Legionellen auf der Oberfläche einer Glasboden-Zellkulturschale. (A) Zur Anfangszeit der Inokulation mit *L. pneumophila*, oder (B) nach drei Tagen unter quasi-statischen Bedingungen (zwei Mal Medienwechsel pro Tag). (C) dreidimensionale Rekonstruktion und Z-Achsen-Schnitte (D) auf Höhe der Oberfläche oder (E) durch Biofilm-Aggregate, die nach drei Tagen Wachstum unter statischen Bedingungen (kein Medienwechsel) gebildet wurden. Massstab, 10 µm (A, B, D, E). Einheitszelle, 13 µm (C).



2. Biofilmbildung von Legionellen im Flusskammer-System

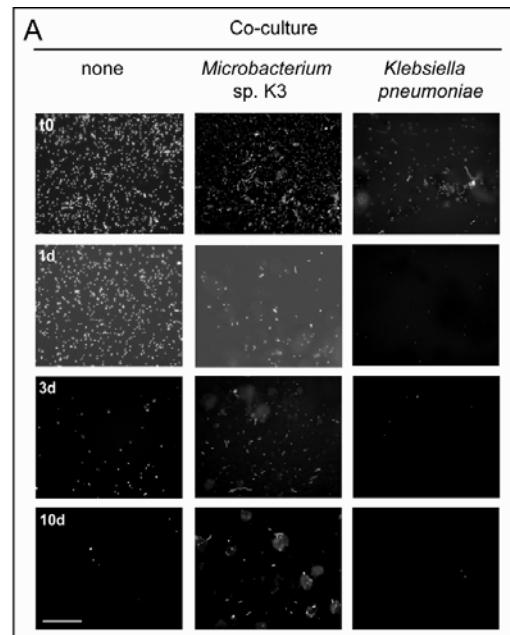
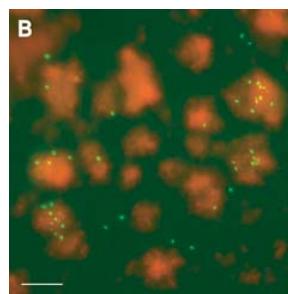
Versuche mit dem Flusskammer-System (Abb. 2) zeigten, dass Legionellen unter verschiedenen Bedingungen (einmalige/kontinuierliche Inokulierung von exponentiell wachsenden Kulturen in verschiedenen Verdünnungen, Medien, Temperatur, Flussrate) unter dynamischen Flussbedingungen anfänglich adhärieren und Aggregate bilden. Unter den meisten getesteten Bedingungen wurden die Legionellen jedoch über mehrere Tage kontinuierlich ausgewaschen, ohne dreidimensionale, Pilz-förmige Biofilme zu bilden, wie sie z.B. von Pseudomonaden bekannt sind (Abb. 6).

Abb. 6. Adhäsion von *L. pneumophila* im Flusskammer-System. Das Flusskammer-System wurde mit den angegebenen Durchflussraten (5-50 μ l/min) mit 1:10 verdünntem AYE-Medium gespült und mit Legionellen inkuliert, die GFP (grün fluoreszierendes Protein) produzieren. Die grün-fluoreszierenden Legionellen adhärieren anfangs in den Flusskammern, werden aber proportional zur Flussgeschwindigkeit über mehrere Tage hinweg aus dem System ausgewaschen.



Um den Einfluss von Umwelt-Bakterien auf die Persistenz von *L. pneumophila* im Flusskammer-System zu untersuchen, wurden zunächst Biofilme durch eine Reihe von Bakterien gebildet, und anschliessend mit *L. pneumophila* angeimpft. Die Legionellen adhärierten an Biofilme, die von *Microbacterium* sp., *Empedobacter breve* oder *Acinetobacter baumanii* gebildet wurden, nicht jedoch an Biofilme, die von *Pseudomonas* spp., *Corynebacterium glutamicum* oder *Klebsiella pneumoniae* gebildet wurden (Abb. 7; Mampel *et al.*, 2006a).

Abb. 7. Effekte von definierten Biofilmen auf die Persistenz und Lokalisation von *L. pneumophila* im Flusskammer-System. (A) *Microbacterium* sp. erhöht und *Klebsiella pneumoniae* erniedrigt die Persistenz von GFP-produzierenden *L. pneumophila* in Flusskammern, die mit einer Flussgeschwindigkeit von 50 μ l/min und 1:10 verdünntem AYE-Medium gespült wurden. Massstab, 50 μ m. (B) Fluoreszenz-Mikroskopie einer *Microbacterium*-*Legionella* Ko-Kultur, die 14 Tage nach Inkulturierung mit dem Farbstoff SYTO62 angefärbt wurde. Einzelne grün-fluoreszierende Legionellen lokalisieren bevorzugt auf dem *Microbacterium* sp. biofilm (rot). Massstab, 30 μ m.



3. Signal-Molekül-abhängige Gen-Regulation

Im Genom von *L. pneumophila* finden sich vier Gene, die grosse Ähnlichkeit mit einem Dichte-abhängigen Genregulations-System des Cholera-Erregers *Vibrio cholerae* haben. Das *Vibrio*-System (Cholera quorum sensing, *cqs*) spielt eine Rolle in der Regulation von Virulenz und Biofilmbildung. Die entsprechende Region im *L. pneumophila*-Genom wurde *lqs* (Legionella quorum sensing) genannt (Abb. 8). Um die *lqs*-Region zu charakterisieren, wurden die 4 Gene im *L. pneumophila* Genom als Cluster und einzeln deletiert und die Mutanten untersucht. Die *L. pneumophila* *lqsR*-Deletions-Mutante zeigt einen Wachstumsdefekt in Amöben, der auf eine erniedrigte Aufnahme der Bakterien durch die Amöben zurückzuführen ist. Mittels Gen-Expressions-Analyse der *lqsR*-Mutante wurde eine Reihe von Genen identifiziert, die durch *LqsR* reguliert werden.

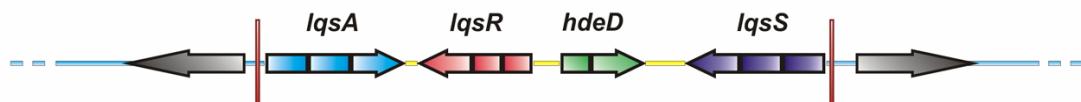


Abb. 8. Das *lqs*-Gen-Cluster in *L. pneumophila*. Die chromosomale Legionella quorum sensing (*lqs*) region kodiert für eine vermutete Signal-Molekül-Synthase (*LqsA*), ein Signal-Übertragungs-Protein (*LqsS*) und einen Regulations-Faktor (*LqsR*). Die Funktion von *HdeD* ist unbekannt.

LqsA und das *Vibrio*-Homolog *CqsA* sind Pyridoxal-Phosphat-abhängige Enzyme, die heterolog im Darmbakterium *Escherichia coli* produziert, ein sekretiertes Signal-Molekül produzieren. Um das von der *LqsA* Synthase produzierte Signal-Molekül zu identifizieren, wurde ein *Vibrio* Reporter-Stamm verwendet, dem die *CqsA* Signal-Molekül-Synthase fehlt. Der Reporter-Stamm produziert nach Zugabe des *Legionella* oder *Vibrio* Signal-Moleküs Licht. Interessanterweise scheint das *L. pneumophila*-Signal-Molekül mit dem unbekannten *Vibrio* Signal-Molekül verwandt zu sein, da der *Vibrio* Reporter-Stamm nach Zugabe von Kulturüberstand eines *E. coli* Bakteriums, das *LqsA* oder *CqsA* herstellt, in beiden Fällen Licht produziert. Das *L. pneumophila*-Signal-Molekül kann mittels Hochdruck-Flüssig-Chromatographie (HPLC) angereichert werden, ist aber zurzeit nicht identifiziert.

5. Diskussion

Im Rahmen des vorliegenden Projekts wurden Methoden etabliert, um in aufrechten und inversen 96-Kammer-Zellkulturplatten die Adhäsion und Biofilmbildung von Legionellen an Kunststoff-Oberflächen zu quantifizieren. Klinische *L. pneumophila* Isolate und Umwelt-Isolate adhärieren in ähnlichem Umfang an Polystyrol-Oberflächen. Die Adhäsion ist genetisch gesteuert, da in Abwesenheit des Regulator-Gens *fliA* die Biofilmbildung beeinträchtigt ist. Außerdem wurde die Bildung oder Besiedlung von Biofilmen durch Legionellen im Flusskammer-System untersucht. Unter kontinuierlichen Flussbedingungen wurden die Legionellen ausgewaschen, können jedoch in vorgeformten Biofilmen über einen längeren Zeitraum persistieren. In allen Versuchen wurde ein komplexes Nährmedium verwendet, das die Vermehrung der Legionellen gewährleistet.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie liefern Evidenzen, dass sich auch unter günstigen Wachstumsbedingungen Legionellen hauptsächlich in der Flüssigkultur (oder in Amöben) und nicht an Oberflächen (oder in Biofilmen) vermehren. Außerdem scheinen spezifische Wechselwirkungen mit Umweltbakterien die Persistenz der Legionellen in Biofilmen zu definieren. Die Resultate unterstreichen die Bedeutung von Biofilmen und Amöben für das Überleben der Legionellen in der Umwelt. Eine erfolgreiche Bekämpfung von Legionellen in Wassersystemen scheint daher nur möglich zu sein, wenn Biofilme und Amöben ebenfalls eliminiert werden.

6. Schlussfolgerungen

Der im Rahmen dieses Projektes etablierte Kristall-Violett-Test in statischen Systemen kann verwendet werden, um definierte *Legionella*-Mutanten hinsichtlich ihrer Oberflächenbesiedlung und Biofilmbildung zu analysieren. Diese Methode kann ebenfalls Verwendung finden, um in einem Suchtest Gene zu identifizieren, die eine Rolle für die Adhäsion und Biofilmbildung von Legionellen spielen. Dazu würden 5000-10000 einzeln isolierte Zufalls-Mutanten (z.B. Transposon-Mutanten) auf ihre Fähigkeit hin geprüft im statischen Adhäsions-Test Biofilme zu bilden. Die Biofilmbesiedelung im kontinuierlichen Flusskammer-System kann angewandt werden, um Wechselwirkungen von Legionellen mit anderen Umwelt-Bakterien in Echtzeit mikroskopisch zu analysieren. Die Etablierung der statischen und dynamischen Legionellen Biofilm-Modelle erlaubt ausserdem, das Verhalten der Biofilme in Bezug auf Wechselwirkungen mit Amöben und gegenüber physikalischen, chemischen oder antibiotischen Einflüssen zu untersuchen.

Der in dieser Arbeit etablierte Reporter-Test für das *L. pneumophila* LqsA-produzierte Signal-Molekül wird verwendet, um das Signal-Molekül anzureichern und zu identifizieren. Die strukturelle Identifizierung des Signal-Moleküls ist Voraussetzung dafür, entsprechende Wirkstoffe herzustellen, die möglicherweise Überleben und Vermehrung von Legionellen in Amöben und Biofilmen verhindern.

Die Etablierung von Tests zur Biofilmbildung von Legionellen und Persistenz von Legionellen in Biofilmen von Umweltbakterien ist eine Voraussetzung, um die Hemmung von Biofilmbildung, respektive die Zerstörung von Biofilmen, zu analysieren. Insbesondere können in diesen Systemen nicht-thermische Alternativen zur Inaktivierung von Legionellen in Biofilmen geprüft werden. So können die erarbeiteten Tests dazu verwendet werden, Antibiotika, Chemikalien und Biologische Verbindungen zu testen hinsichtlich ihres Potentials, Legionellen in Biofilmen abzutöten oder Biofilmbildung zu verhindern. Auf diese Weise können die neu etablierten Tests einen Beitrag leisten, um Energie-schonende Alternativen zur Bekämpfung von Biofilmbildung und Biofilmbesiedelung von Legionellen zu identifizieren und zu charakterisieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Manuskripte im Fachzeitschriften publiziert (Mampel *et al.*, 2006a, Mampel *et al.*, 2006b, Hilbi, 2006). Ein Manuskript ist eingereicht (Hilbi *et al.*, eingereicht) und zwei weitere Manuskripte sind zurzeit in Vorbereitung. Diese Manuskripte umfassen Experimente zur Herstellung, Charakterisierung und Komplementierung der *lqsR*-Mutante, sowie Arbeiten zur Charakterisierung des LqsA-Proteins und des von diesem Enzym produzierten Signal-Moleküls.

Referenzen

- Arnold, M. (2006) Duschen, die krank machen. *K-Tipp* **14/2006**: 3.
- Albers, U., Reus, K., Shuman, H.A., and Hilbi, H. (2005) The amoebae plate test implicates a parologue of *lpxB* in the interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*. *Microbiology* **151**: 167-182.
- Hilbi, H., Segal, G., and Shuman, H.A. (2001) Icm/dot-dependent upregulation of phagocytosis by *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* **42**: 603-617.
- Hilbi, H. (2003) Fressen und gefressen werden - vom Umgang pathogener Bakterien mit Phagozyten. *Quartalheft der Naturforschenden Gesellschaft Zürich* **148**: 113-121.
- Hilbi, H. (2006) Von Pathogenen und Phosphoinositiden. *BIOspektrum* **07/2006**: 710-712.
- Hilbi, H., Weber, S. S., Ragaz, C., Nyfeler, Y. & Urwyler, S. Environmental predators as models for bacterial pathogenesis. *Environ. Microbiol.* (Manuskript eingereicht).
- Mampel, J., Spirig, T., Weber, S., Haagensen, J. A. J., Molin, S., and Hilbi, H. (2006a). Planktonic replication is essential for biofilm formation of *Legionella pneumophila* in a complex medium under static and dynamic flow conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 2885-2895.

- Mampel, J., Spirig, T., Weber, S. S., Haagensen, J. A. J., Molin, S., and Hilbi, H. (2006b). Biofilm formation of *Legionella pneumophila* in complex medium under static and dynamic flow conditions. In *Legionella: state of the art 30 years after its recognition*. N. P. Cianciotto *et al.* (eds.), ASM Press, Washington, D.C., pp. 398-402.
- Otto, G.P., Wu, M.Y., Clarke, M., Lu, H., Anderson, O.R., Hilbi, H., Shuman, H.A., and Kessin, R.H. (2004) Macroautophagy is dispensable for intracellular replication of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Microbiol* **51**: 63-72.
- Roy, C.R., and Tilney, L.G. (2002) The road less traveled: transport of *Legionella* to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **158**: 415-419.
- Segal, G., Purcell, M., and Shuman, H.A. (1998) Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 1669-1674.
- Segal, G., and Shuman, H.A. (1999) *Legionella pneumophila* utilizes the same genes to multiply within *Acanthamoeba castellanii* and human macrophages. *Infect Immun* **67**: 2117-2124.
- Vogel, J.P., Andrews, H.L., Wong, S.K., and Isberg, R.R. (1998) Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science* **279**: 873-876.
- Weber, S., Ragaz, C., Reus, K., Nyfeler Y., and Hilbi, H. (2006). *Legionella pneumophila* exploits PI(4)P to anchor secreted effector proteins to the replicative vacuole. *PLoS Pathog.* **2**: e46.