

Received: 2005.09.09
Accepted: 2005.10.19
Published: 2006.01.18

Patogeneza i czynniki wirulencji pałeczek z rodziny *Legionellaceae*

Pathogenesis and virulence determinants of the family *Legionellaceae*

Marta Palusińska-Szys, Wincenty J. Drożański

Zakład Mikrobiologii Ogólnej, Instytutu Mikrobiologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Streszczenie

Bakterie z rodziny *Legionellaceae* są obligatoryjnie wewnątrzkomórkowymi pasożytami pierwotniaków. Niektóre gatunki, głównie *Legionella pneumophila*, w określonych warunkach mogą wywoływać u ludzi ciężką postać zapalenia płuc. Do infekcji najczęściej dochodzi w wyniku inhalacji bakterii zawartych w skażonej wodzie rozprzestrządzonej w aerozolu.

Legionelle w fazie inwazyjnej, uwolnione z komórki gospodarza do środowiska wodnego, mogą przez długi okres przeżyć w stanie anabiozy. Adaptacja do życia w tak odmiennych środowiskach jak żywa komórka i woda jest możliwa dzięki kontrolowanej ekspresji genów regulujących cechy morfologiczne, fizjologiczne i biochemiczne bakterii.

Opisano proces inwazji i cykl życiowy pałeczek legionella w komórkach pierwotniaków i ssaków. Opis cyklu infekcyjnego oparto na obserwacjach mikroskopowych. Identyfikację czynników wirulencji oparto na wynikach analizy genów i ich produktów metodą technik genetycznych i molekularnych. Bakterie z fazy inwazyjnej wchłonięte, najczęściej za pośrednictwem spiralnej fagocytozy, przez komórke gospodarza są umiejscowione w endosomach, które przez długi okres nie ulegają fuzji z lizosomami. W powstałych parazytosomach legionelle przechodzą proces transformacji z fazy inwazyjnej do fazy replikacyjnej. Omówiono rolę czynników wirulencji na proces dojrzewania niszy replikacyjnej oraz wpływ zmieniających się warunków w czasie rozwoju bakterii w komórce gospodarza na transformację z fazy replikacyjnej do fazy inwazyjnej.

Słowa kluczowe:

Legionellaceae • wewnątrzkomórkowe patogeny • chorobotwórczość • determinanty wirulencji

Summary

Legionellae are Gram-negative obligate intracellular parasites of unicellular animal organisms, some of which are sometimes able to cause an acute and severe pneumonia in humans. Legionellae are capable of surviving for long periods in water when between hosts. Their adaptation to these quite diverse environments seems to be accomplished by morphological and biochemical pathway changes.

It has been well established that humans coexisted with these bacteria for a long period of time, and it is only recently that our industrial technology provided these organisms with the means of causing infection. This review describes the invasion process and the life cycle of Legionellae in both protozoan and mammalian cells. Our understanding of the infection cycle of Legionellae is primarily based on observations by transmission and scanning EM and by contrast phase and

fluorescence microscopy. The identification of virulence determinants by molecular techniques is also discussed.

The bacteria enter the host cell mainly by coiling phagocytosis and reside within unique phagosomes which, during the first hours of infection, are isolated from the endosomal pathway. Within the protected vacuole the mature infectious forms of *Legionellae* convert to replicative forms that no longer express virulence traits. Evidence is provided on how the biogenesis of the replication niche is determined. The virulence factors that arrest phagosome maturation during intracellular replication are also described. The status of our current knowledge on the means by which *Legionellae* successfully infect the host cells to cause disease is discussed.

Key words: *Legionellae* • intracellular pathogens • pathogenicity • virulence determinants

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_60/8507.pdf

Word count: 7442

Tables: 1

Figures: 7

References: 187

Adres autorki: dr Marta Palusińska-Szys, Zakład Mikrobiologii Ogólnej, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin, e-mail: martasz@biotop.umcs.lublin.pl

Wykaz skrótów: **Csr** – nadrzędny regulator metabolizmu węglowodanów (carbon storage regulator); **CAP** – pila typu IV (competence and adherence pili); **Dot** – zaburzenia w kierowaniu organelli (defect for organelle trafficking); **FlaA** – rzęskowy czynnik sigma polimerazy RNA (σ^{28}); **Hsp 60** – białko szoku termicznego (mitochondrial 60-kDa heat shock protein); **Icm** – wewnątrzkomórkowe namnażanie (intracellular multiplication); **LAMP1, LAMP2** – białka błonowe związane z lizosomami (lysosomal-associated membrane protein 1, 2); **LetA/S** – białka regulatorowe dwuskładnikowego układu regulatorowego (LetA – białko regulatorowe, LetS – białko sensorowe); **MIF** – dojrzałe formy infekcyjne (mature infection form); **Mil** – *loci* infekcyjności makrofagów (macrophage specific infectivity loci); **Mip** – czynnik zwiększający infekcyjność makrofagów (macrophage infectivity potentiator); **MOMP** – główne białko membrany zewnętrznej (major outer membrane protein); **Rab5, Rab7** – rodzina białek biorących udział w kierowaniu docelowym i fuzji (Rab proteins); **RelA** – syntetaza guanozyny 3', 5'-bis-pirofosforanu (ppGpp) (guanosine 3', 5'-bis-pyrophosphate (ppGpp) synthetase); **Rib** – czynnik wewnątrzkomórkowego uwalniania bakterii (release of intracellular bacteria); **RpoN** – czynnik sigma polimerazy RNA (σ^{54}); **RpoS** – czynnik sigma polimerazy RNA (σ^{38}); **RpoD** – czynnik sigma polimerazy RNA (σ^{70}); **SpoT** – ppGpp 3'-pirofosfohydrolaza (ppGpp 3'-pyrophosphohydrolase)

WPROWADZENIE

Geneza rodziny *Legionellaceae* jest związana z odkryciem i opisaniem nowego czynnika etiologicznego nietypowej pneumonii ludzi, która zdarzyła się w lipcu 1976 roku w Filadelfii [122]. Wśród uczestników konwentu Legionu Amerykańskiego zorganizowanego w dwusetną rocznicę podpisania Deklaracji Niepodległości Stanów Zjednoczonych wystąpiła epidemia nietypowego zapalenia płuc, w wyniku której 34 osób zmarło [74,122]. Nowa choroba została opisana jako legioneloza, a bakteria – czynnik etiologiczny choroby, dla upamiętnienia okoliczności w jakich doszło do infekcji oraz powinowactwa bakterii do makrofagów alveolarnych i komórek nabłonkowych pęcherzyków płucnych, uzyskała nazwę rodzajową *Legionella* i nazwę gatunkową *pneumophila* [32].

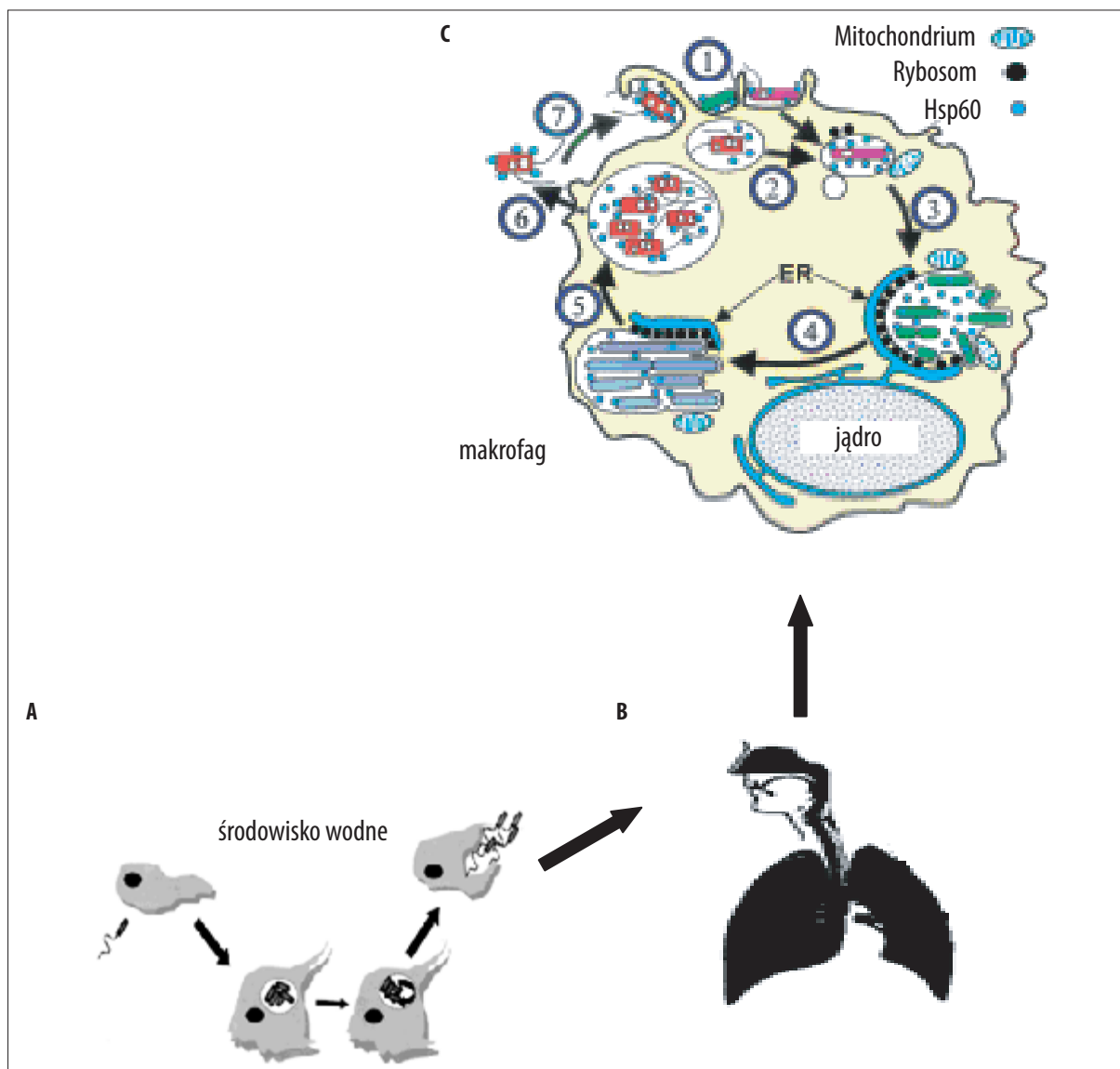
Rodzina *Legionellaceae* utworzona początkowo dla jednego gatunku, obecnie obejmuje 49 gatunków oraz 70 grup serologicznych, w tym dwadzieścia gatunków wyizolowanych bezpośrednio od chorych na nietypowe zapale-

nie płuc lub gorączkę Pontiac [68]. Cechą wspólną bakterii włączonych do rodziny *Legionellaceae* jest pasożytniczy tryb życia wewnątrz określonych gatunków jednokomórkowych organizmów holozoicznych oraz w komórkach żer-nych ssaków [3,169].

Ekologia

Naturalnym środowiskiem występowania bakterii z rodziny *Legionellaceae* jest woda [16,66,68]. Metodą posiewu na podłoże BCYE oraz amplifikacji 16SrRNA wykazano obecność bakterii w 80% badanych zbiorników wodnych [16,116]. Próbkę wody pobrane w szpitalach Paryża były skażone w 71% amebami i w 45% *Legionella pneumophila* [136].

W 1980 roku Rowbotham pierwszy zwrócił uwagę na wolno żyjące pełzaki, występujące powszechnie w zbiornikach wodnych i w glebie jako na gospodarza, w którym może proliferować *Legionella pneumophila* [151]. Badania prowadzone od 1980 roku wskazują, że bakterie z rodziny *Legionellaceae* są protozoontami i że ameby z rodza-



Ryc. 1. Cykl życiowy *L. pneumophila* [wg 61,68; za zgodą]; A – główne fazy rozwoju w pierwotniakach; B – infekcja dróg oddechowych człowieka bakteriami zawartymi w aerozolu; C – cykl rozwojowy w makrofagach: 1 – spiralna i klasyczna fagocytoza bakterii, 2 – powstawanie niszy replikacyjnej, 3 – opłaszczanie parazytosomów przez retikulum endoplazmatyczne, 4 – faza intensywnej replikacji bakterii w komórce, 5 – w makrofagach hodowanych *in vitro* dochodzi do powstania dojrzałych postaci infekcyjnych, 6 – niszczenie membrany wakuoli i uwolnienie bakterii z zakażonej komórki, 7 – nowa runda replikacyjna

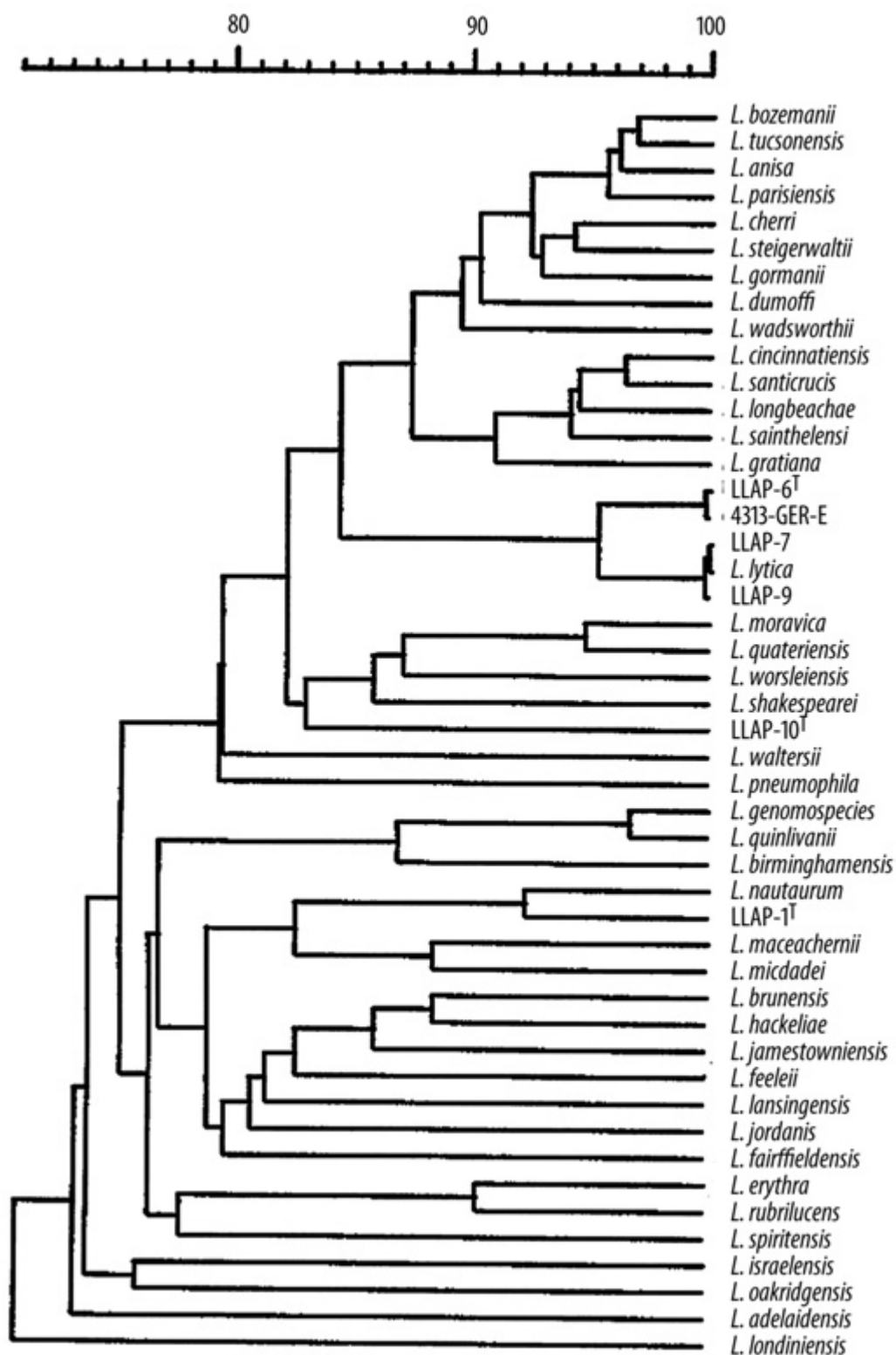
ju *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Echinamoeba*, jak też postaci ameboidalne *Dictyostelium discoideum* oraz orzęski z rodzaju *Tetrahymena* są naturalnym gospodarzem wewnątrzkomórkowych obligatoryjnych pasożytów nie tylko z rodziny *Legionellaceae*, lecz także *Odyseaceae* i *Parachlamydiaceae* [83,124,138,184].

Bakterie uwolnione z komórki gospodarza do wody są w stanie anabiozy i mogą w tym krańcowo odmiennym środowisku przeżyć przez okres 180 dni, a nawet roku tworząc razem z innymi mikroorganizmami biofilm [119,133,155,164].

Legionelle do wzrostu wymagają ściśle określonych warunków fizykochemicznych, możliwych do spełnienia tylko

wewnątrz komórki gospodarza. W warunkach laboratoryjnych bakterie rosną w wąskim przedziale pH (6,2–7,2), na pożywkach bogatych w aminokwasy i sole żelaza [62,146]. Duże stężenie, wymaganych do wzrostu składników pokarmowych w tym L-cysteiny jest trudne do osiągnięcia poza komórką gospodarza, zatem legionelle nie mogą skutecznie konkurować z heterotroficznymi bakteriami o krótkim okresie generacji nie tylko o pokarm, ale i o tlen.

W organizmie człowieka, wirulentne gatunki i szczepy pałeczek legionella zachowują się jak oportunistyczne patogeny zdolne do proliferacji wewnątrz makrofagów alveolarnych, w komórkach nabłonkowych typu I i II pęcherzyków płucnych, w monocytach i w fibroblastach. U osób z supresją immunologiczną wywołują uogólnione objawy cho-



Ryc. 3. Dendrogram przedstawiający związki filogenetyczne między gatunkami rodziny *Legionellaceae* w oparciu o podobieństwo sekwencji genu kodującego białko Mip [wg 5; za zgodą]; LLAP1 – *Legionella drozanskii*, LLAP6 – *Legionella rowbothamii*, LLAP10 – *Legionella fallonii*, LLAP7, 9 – *Legionella lytica*, 4313-GER-E – szczep wyizolowany przez dra R. Michela z Instytutu Ernst-Rodenwaldt, Koblencja, Niemcy

Tabela 1. Cechy różnicujące rodzaje w obrębie rodziny *Legionellaceae*

Test	<i>Legionella</i>	<i>Tatlockia</i>	<i>Fluoribacter</i>
Stopień homologii DNA (%)			
- <i>L. pneumophila</i> (15 serogrup)	69–95	–	–
- <i>T. micdadei</i> (2 gatunki)	0–8	71–90	–
- <i>Fluoribacter</i>	0–14	0–10	74–94
Zawartość par G+C (mol%)	38,8	44,3	40,4
Kolor kolonii	biały do jasnozielonego	niebieskoszary	pastelowo-zielony
Fluorescencja kolonii (niebiesko-biała)	–	–	+
Brązowy pigment	+	–	+
Hydroliza skrobi	+	–	+
B-laktamaza	+	–	+
Żelatynaza	+	–	+
Hydroliza hipuranów	+	–	+
Ubichinony	Q12/11/13	Q10/I 1/12/13	Q9/10/11/12
Główne kwasy tłuszczowe (%)			
– 1 2-Metylotetradekanowy	11–20	39–40	24–31
– 1 4-Metylopentadekanowy	32–42	10–11	14–20
– 14-Metylo-cis-9-pentadekenowy	2–13	śladowa ilość	śladowa ilość
– cis-9, 10 metyloheksadekanowy	13–15	9–10	11–16
– 14-Metyloheksadekanowy	5–11	22–25	12–24

gatunkiem powodującym chorobę legionistów i gorączkę Pontiac [19]. W Kanadzie *L. pneumophila* serogrupa 6 zajmuje drugie miejsce [172]. W Australii legionelozę często wywołuje *L. longbeachae* [53].

Przypadki legionelozy obejmujące jednocześnie dużą grupę osób na ograniczonej przestrzeni zdarzają się rzadko. W ostatnich latach duże ognisko legionelozy odnotowano w Holandii w 1999 r. – 188 przypadków [49], w tym samym roku w Belgii zachorowały 93 osoby [48], a w 2001 roku w Hiszpanii 449 osób uległo infekcji [77]. Pojedyncze przypadki zachorowań na legionelozę, głównie u osób starszych z supresją immunologiczną występują częściej [47,60].

Badania nad rolą czynników determinujących inwazyjność i wirulencję są prowadzone na modelu *L. pneumophila* serogrupa 1 – bakterią najczęściej izolowaną od chorych na legionelozę.

Istotne znaczenie w patogenezie mają interakcje między fagotroficznym gospodarzem i jego wewnątrzkomórkowym pasożytem. Sposób przenikania bakterii do komórki gospodarza oraz czynniki niezbędne do opanowania swoistej mikroniszy jaką jest wakuola trawienna są uwarunkowane cechami genetycznymi prokariotycznego ksenobionta i eukariotycznego gospodarza oraz ekspresją genów wirulencji pod wpływem czynników środowiskowych.

Główne problemy, związane z wewnątrzkomórkowym pasożytnictwem, wymagające wyjaśnienia to:

- co warunkuje penetrację pałeczek legionella do komórki gospodarza,
- jak dochodzi do blokady mechanizmów bakteriobójczych,
- jakie cechy bakterii warunkują odporność na czynniki bakteriobójcze i bakteriolityczne,
- jakie związki pokarmowe, niezbędne do życia bakterii, dostarcza komórka gospodarza,
- jak bakterie podtrzymują funkcje metaboliczne gospodarza, umożliwiające stały dopływ składników pokarmowych,
- jakie czynniki ułatwiają proliferację nowych generacji.

Poznanie biologii pałeczek legionella, szczególnie czynników determinujących wirulencję, wymaga użycia odpowiedniego gospodarza, zmutowanych szczepów bakterii oraz metod stosowanych w genetyce eksperymentalnej i biologii komórki. Najczęściej stosowanym modelowym gospodarzem są pierwotniaki (*Hartmannella vermiformis*, *Acanthamoeba castellanii*, *A. polyphaga*, *Tetrahymena pyriformis*), komórki ssaków (HeLa, U937, Vero), zwierzęta doświadczalne, przede wszystkim świnki morskie, które reagują na infekcję podobnie jak ludzie z supresją immunologiczną. Wyniki badań genetycznych łącznie z bada-

niami epidemiologicznymi i cytologicznymi wskazują, że cechy fenotypowe, determinujące zdolności do przeżycia i namnażania się w pierwotniakach, są również niezbędne do podtrzymania wzrostu bakterii w komórkach żernych ssaków [169]. Bakterie pasażowane na podłożu BCYE ulegają atenuacji, są słabiej fagocytowane i mniej wirulentne. Bakterie izolowane z ameb są wysoce inwazyjne i wirulentne nie tylko względem komórek żernych ssaków *in vitro*, ale też wysoce patogenne dla świnek morskich [41,66].

A. Fagocytoza – czynniki adhezyjne

W patogenezie pałeczek legionella ważną rolę odgrywa zdolność bakterii do kolonizacji komórek układu oddechowego człowieka. Przyleganie *L. pneumophila* do komórek eukariotycznych następuje za pośrednictwem swoistych struktur i cząstek umiejscowionych na powierzchni bakterii.

Fagocytoza *L. pneumophila* przez komórki żerne ssaków, w obecności surowicy zawierającej oprócz dopełniacza swoiste przeciwciała, zachodzi z udziałem receptorów CR1 i CR3 umiejscowionych na powierzchni makrofagów [141]. Składnik C3 dopełniacza związany z receptorem komórki żernej wykazuje duże powinowactwo do głównego białka (MOMP) ściany komórkowej *L. pneumophila*, co warunkuje szybką fagocytozę [18]. Mutanty defektywne w genie *ompS* kodującym białko MOMP są słabo fagocytowane [93]. Białko MOMP umożliwia adhezję bakterii do komórek U937 nawet w środowisku pozbawionym surowicy, co wskazuje na istotną rolę tego białka w przyleganiu bakterii do komórki gospodarza [111].

Adhezja *L. pneumophila* do komórek linii U-937, MRC-5 oraz makrofagów alveolarnych świnek morskich może również zachodzić z udziałem powierzchniowych białek, innych niż MOMP, wiązanych przez struktury glikolipidowe gospodarza [82].

Komórki *L. pneumophila* namnożone w amebach, w przeciwieństwie do bakterii z hodowli na BCYE mogą wnikać do monocytów krwi obwodowej bez udziału dopełniacza. Ważnym czynnikiem ułatwiającym wnikanie bakterii do komórki gospodarza są pile [166]. *L. pneumophila* wytwarza dwa rodzaje pili – długie (typu IV) i krótkie [166]. Pile typu IV „CAP” są uniwersalnym ligandem, umożliwiającym adhezję *L. pneumophila* do wszystkich typów komórek. Mutanty w genie *pilE*, pozbawione pili typu IV są słabo fagocytowane zarówno przez ludzkie komórki nabłonkowe jak i przez ameby [166]. Receptorem fimbrii CAP u *H. vermiformis* jest lektyna [88,174].

Białko szoku termicznego (Hsp60), obecne na powierzchni *L. pneumophila* może też ułatwiać adhezję do komórek nabłonkowych [78,91,92]. Białko Hsp60, kodowane przez gen *htpB* jest indukowane w czasie wzrostu bakterii w makrofagach, a także *in vitro*, w odpowiedzi na obecność nadtenku wodoru, pod wpływem podwyższonej temperatury oraz szoku osmotycznego [78,91,92]. Oczyszczone białko Hsp60 ułatwia nie tylko fagocytozę bakterii, ale też kuleczek lateksowych przez komórki HeLa [79].

W literaturze często podkreśla się swoisty sposób wchłaniania bakterii z rodziny *Legionellaceae* zarówno przez

komórki ssaków, jak i przez pierwotniaki [28,99,100]. Fagocytoza „spiralna” określana jako coiling phagocytosis jest głównym sposobem wchłaniania *L. pneumophila*. Ten typ fagocytozy nie jest jednak charakterystyczny tylko dla pałeczek legionella, w podobny sposób są fagocytowane *Leishmania donovani*, *Borrelia burgdorferi*, krętki i świdrowce [35,147,148]. W procesie spiralnej fagocytozy bakterie zostają owinięte przez jednostronnie powstające filopodium i wciągnięte do wnętrza komórki. Fagocytoza spiralna nie jest jedynym sposobem wnikania legionell. Wchłanianie *L. pneumophila* przez monocyty i makrofagi, a także ameby może zachodzić też w procesie klasycznej fagocytozy [28,82,99,120,145]. *L. pneumophila* szczep Filadelfia 1 wnika do komórek U937 i *A. castellanii* w procesie spiralnej fagocytozy, ale po opsonizacji swoistymi przeciwciałami zostaje wchłonięty w wyniku klasycznej fagocytozy [120]. W klasycznej fagocytozie plazmolemma tworzy przestrzenne pseudopodium w postaci „kubka”, który w wyniku fuzji stykającej się błony komórkowej zamyka bakterię i wchłania do wnętrza komórki. *L. pneumophila* szczep Knoxville 1 i *L. micdadei* są wchłaniane głównie w procesie klasycznej fagocytozy [145].

Sposób fagocytozy nie ma istotnego wpływu na dalszy los pochłoniętych bakterii. Legionelle wchłonięte w procesie klasycznej fagocytozy również zachowują zdolność do replikacji w komórkach gospodarza [1,3,145]. Sposób fagocytozy wynika z właściwości fizykochemicznych makromolekuł występujących na powierzchni bakterii. Warstwa zewnętrzna ściany komórkowej *L. pneumophila* serogrupa 1 szczep Filadelfia 1 ma charakter hydrofobowy. Hydrofobowość *L. pneumophila* wynika z obecności lipofilnego lipopolisacharydu, który pokrywa całą powierzchnię komórki. Budowa chemiczna i aktywność biologiczna lipopolisacharydu legionell różni się zasadniczo od endotoksyn występującej w komórkach innych Gram-ujemnych bakterii [185].

B. Wewnątrzkomórkowy los bakterii

Przeżycie lub nie bakterii w kontakcie z komórką eukariotyczną, szczególnie z komórką predysponowaną do niszczenia bakterii, zależy od zespołu czynników warunkujących adaptację do tak ekstremalnych warunków, jakie występują w tym wyjątkowo nieprzyjawnym, ale bogatym w składniki pokarmowe środowisku. Często już pierwszy etap, wnikanie bakterii do komórki gospodarza jest wspomagany nie tylko obecnością, na powierzchni bakterii, czynników ułatwiających adhezję, ale jest też wynikiem czynnej ingerencji bakterii w strukturę błony komórkowej gospodarza. Czynnikiem działającym destrukcyjnie na błonę komórkową gospodarza są cytolityczne białka wytwarzane przez legionelle. Cytolizyny, po wbudowaniu do błony komórkowej, tworzą kanały paraliżujące prawidłowe funkcjonowanie membrany cytoplazmatycznej a w konsekwencji też membrany fagosomów. Modyfikacja cech fizykochemicznych plazmolemmy i powstawanie transmembranowych kanałów ułatwia nie tylko przenikanie bakterii do komórki ssaków i pierwotniaków, ale też penetrację bakterii z fagosomów do cytosolu. Transmembranowe kanały ułatwiają też przepływ związków pokarmowych z cytosolu do zmodyfikowanej wakuoli wypełnionej proliferującymi bakteriami. Nadmierne wytwarzanie białek działających destrukcyjnie na warstwę fosfolipidową membrany

może prowadzić do cytolizy komórki gospodarza i przedwczesnego zniszczenia niszy replikacyjnej stwarzającej dogodne warunki do rozwoju bakterii. Wydzielanie cytotoksycznych białek – cytolizyn jest indukowane przez czynniki środowiskowe wywierające wpływ na ekspresję genów wirulencji [126,169].

Białka odpowiedzialne za powstawanie kanałów w błonie mają istotny udział w ostatecznej lokalizacji bakterii w zakażonej komórce. Bakterie z rodzaju *Listeria*, *Schigella*, *Escherichia*, *Actinobacillus* i *Rickettsia* przenikają z fagosomów do cytosolu, *Coxiella burnetti*, *Chlamydia tracheomatis*, *Mycobacterium leprae* i *Mycobacterium tuberculosis*, bakterie niewrażliwe na działanie enzymów lizosomalnych, proliferują w wakuoli trawiennej (fagolizosomach). Liczne gatunki legionell realizują proces eksploatacji komórki gospodarza w wakuoli, której proces transformacji do fagosomu został czasowo zablokowany [169].

B1. Dojrzwanie niszy replikacyjnej

W procesie klasycznej fagocytozy, komórki żerne wchłaniają pojedyncze bakterie i zamykają w wakuoli powstałej z plazmolemy. W tak powstałej wakuoli, warstwa zewnętrzna plazmolemy zostaje umiejscowiona wewnątrz wakuoli i ściśle przylega do bakterii. Parazytosomy, zawierające wirulentne szczepy *L. pneumophila* nie ulegają przekształceniu w wakuole trawienne – „fagosomy”. Wyrazem blokady procesów związanych z przekształcaniem fagosomu w parazytosom jest brak w błonie parazytosomu białek pochodzenia lizosomalnego (LAMP1, LAMP2, Rab5, katepsyna D) [43,97,153].

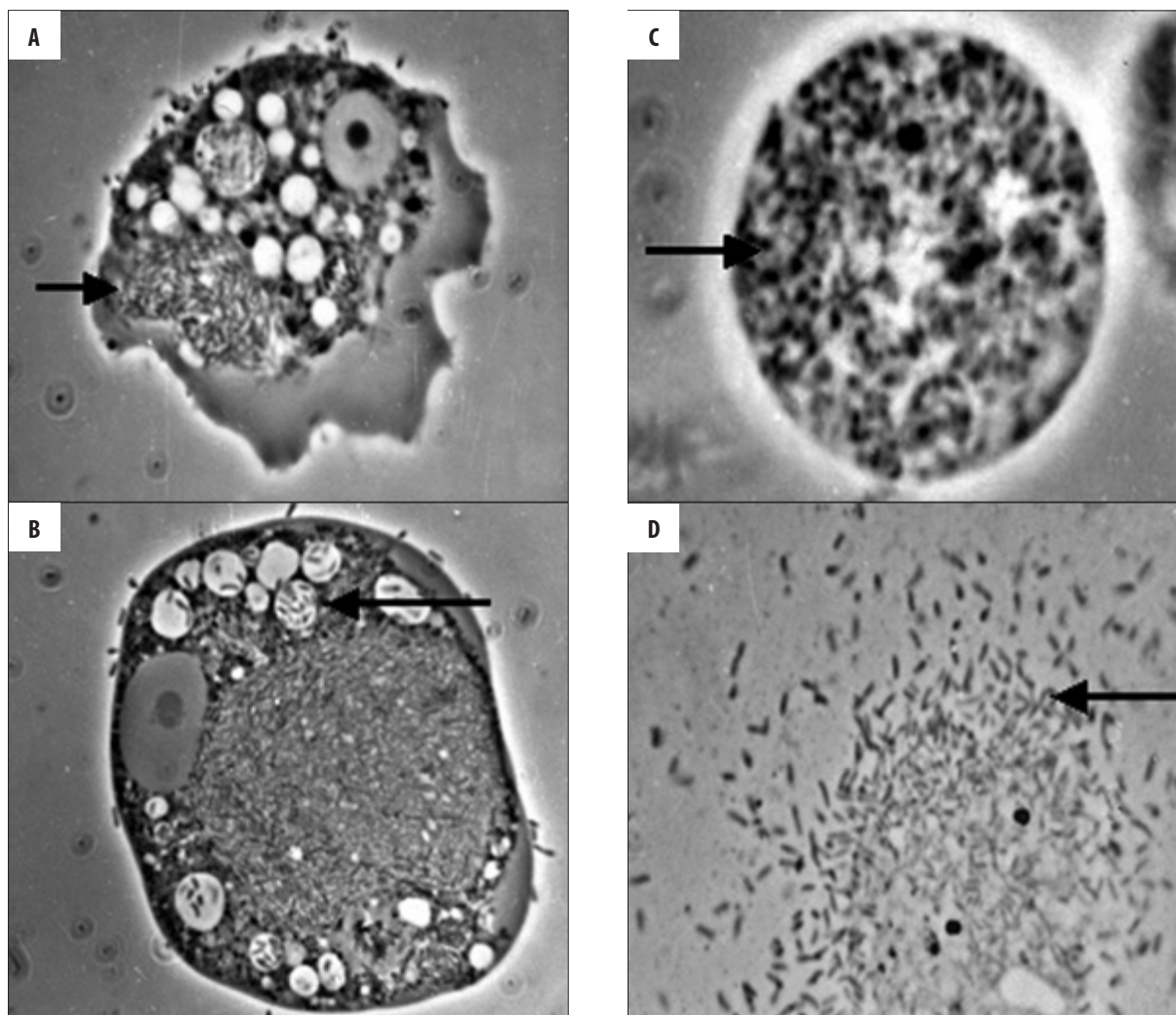
Wakuole, których proces dojrzwania w fagosomy został zablokowany, ulegają opłaszczeniu przez membrany retikulum endoplazmatycznego [4,97,98,153,169]. Blokada procesów fuzji lizosomów z wakuolą, zawierającą *L. pneumophila* prowadzi do powstania niszy replikacyjnej, do której składniki odżywcze przenikają przez kanały o średnicy <3 nm, utworzone z białek pochodzenia bakteryjnego. Remodulacja wakuoli, zawierającej *L. pneumophila*, w niszę replikacyjną i związana z tym blokada procesów odpowiedzialnych za dojrzwanie fagosomu jest wynikiem obecności na powierzchni bakterii białek kodowanych przez geny wirulencji, umiejscowione w operonie systemu transportowego typu IV [117,153,157,158,159,160,171].

W procesie spiralnej fagocytozy, komórki *L. pneumophila* są izolowane przez kilka warstw błony powstałej z plazmolemy [128]. W ten sposób są wchłaniane zarówno żywe komórki wirulentnych, jak i awirulentnych szczepów *L. pneumophila* oraz bakterie martwe zabite wysoką temperaturą lub formaliną [99]. Wirulentne szczepy *L. pneumophila* zamknięte w parazytosomach powstałych w procesie spiralnej fagocytozy blokują, przez okres 8–12 godzin, fuzję wakuoli z lizosomami, co w następstwie powoduje zahamowanie procesów prowadzących do zmiany pH z obojętnego na kwaśny, kumulacji enzymów trawiennych, a w konsekwencji wyłączenie parazytosomu z procesu transformacji w wakuolę trawienną. Fagosomy zawierające awirulentne lub martwe komórki bardzo szybko przejmują funkcje wakuoli trawiennej. Treść fagosomu ulega zakwaszeniu a białka membrany recyrkulacji [167]. Niskocząsteczkowe białko Rab5, o aktywności GTP-azy, którego obecność uła-

twia fuzję membran, pojawia się na powierzchni wakuoli w pierwszej kolejności. Pojawienie się białek, LAMP1, LAMP2 i katepsyny D, związanych z membraną lizosomów oraz obniżenie pH wakuoli uaktywnia hydrolazy lizosomalne i prowadzi do szybkiego strawienia bakterii [63,162]. Jedynie wirulentne szczepy *L. pneumophila* z fazy inwazyjnej mają wpływ na proces remodulacji parazytosomu w niszę replikacyjną. Przeobrażenie parazytosomu, zawierającego komórki wirulentnych szczepów *L. pneumophila* fazy inwazyjnej, jest procesem wielostopniowym. Zewnętrzna warstwa membrany parazytosomu już po 15 min zostaje pokryta drobnymi pęcherzykami, które utrudniają łączenie się białek gospodarza z powierzchnią parazytosomu, co blokuje procesy związane z dojrzewaniem wakuoli trawiennej [28,42,97,99]. Fuzja parazytosomów z lizosomami jest przez wiele godzin skutecznie blokowana zarówno w zakażonych amebach, jak i w komórkach fagocytarnych ssaków [97,99,100,167]. W makrofagach membrany parazytosomów, w pierwszym okresie transformacji w niszę replikacyjną, nie zawierają białek pochodzenia lizosomalnego [42,43,153]. Parazytosomy *A. castellanii*, w tej fazie infekcji, również nie łączą się z lizosomami i nie zawierają kwaśnej fosfatazy i ferrytyny [28]. Dalsze zmiany w komórce gospodarza polegają na opłaszczeniu parazytosomu przez błony retikulum endoplazmatycznego i zagęszczeniu mitochondrii wokół wakuoli zawierającej bakterie. Proces tworzenia „koperty” z błon retikulum endoplazmatycznego, wokół parazytosomu przebiega podobnie do procesu formowania autofagosomów, które służą do trawienia i egzocytozy uszkodzonych organeli [52,166,170]. Przed uformowaniem autofagosomu, bakterie zamknięte w wakuoli nie rozmnażają się, a jedynie utrzymują przy życiu – są w stanie anabiozy. W dalszym etapie przekształcania parazytosomu w autofagosom dochodzi do stopniowej kumulacji w błonie parazytosomu białek pochodzenia lizosomalnego oraz – według Sturgill-Koszyckiego i Swansona [167] – obniżenia kwasowości wakuoli do pH 5,6. Po 8–12 godzinach od zakażenia, bakterie ze stanu anabiozy przechodzą w stan fizjologicznegożywienia, komórki z fazy lag przechodzą do fazy replikacyjnej. W wyniku eksponencjalnego wzrostu, dochodzi do wyczerpania składników pokarmowych, zniszczenia niszy replikacyjnej i przejścia bakterii do fazy inwazyjnej [2,17,98,167].

Obserwacje dotyczące zmiany pH w parazytosomach, pod koniec fazy lag, z obojętnego na kwaśny oraz resuscytacji bakterii w kwaśnym środowisku i ich proliferacja mogą mieć znaczenie w pełniejszym zrozumieniu biologii *L. pneumophila*, wymagają jednak dalszych szczegółowych badań, ponieważ są niezgodne z wynikami uzyskanymi przez innych badaczy [26,100,181].

L. pneumophila w fazie inwazyjnej toleruje kwaśne środowisko, przeżywa nawet przez krótki okres w pH 2,0, ale proces replikacji bakterii na pożywce BCYE jest możliwy w wąskim zakresie pH (6,9–7,2) [27]. Z pracy Halesa i Shummana [85] wynika, że przeżywalność w pH 3,0 komórek *L. pneumophila*, szczep J.R.32 i jego mutantu w genie *ropS*, z fazy eksponencjalnej jest 10 000 razy mniejsza w porównaniu z przeżywalnością bakterii z fazy stacjonarnej, również *L. pneumophila* szczep Lp02, po namnożeniu na pożywce ACES w pH 6,9 i inkubacji przez 4 godziny w pH 5,6, w eksponencjalnej fazie wzrostu był bardzo wrażliwy na bakteriofagowe działanie pH, jakie występuje w wakuoli [167].



Ryc. 4. Zdjęcia z mikroskopu kontrastowo-fazowego wybranych etapów infekcji i rozwoju *L. lytica* w *A. castellanii*. Opis w tekście. Strzałką zaznaczono bakterie

Inne gatunki legionell, których los w komórce gospodarza został częściowo poznany, rozwiązują proces formowania niższej replikacyjnej w sposób o wiele bardziej destrukcyjny.

Legionelle z grupy *Fluoribacter*, których kolonie na podłożu BCYE fluoryzują pod wpływem promieni UV, fazę replikacyjną realizują w cytosolu po uprzednim zniszczeniu membrany parazytosomu [54, 55, 56, 120].

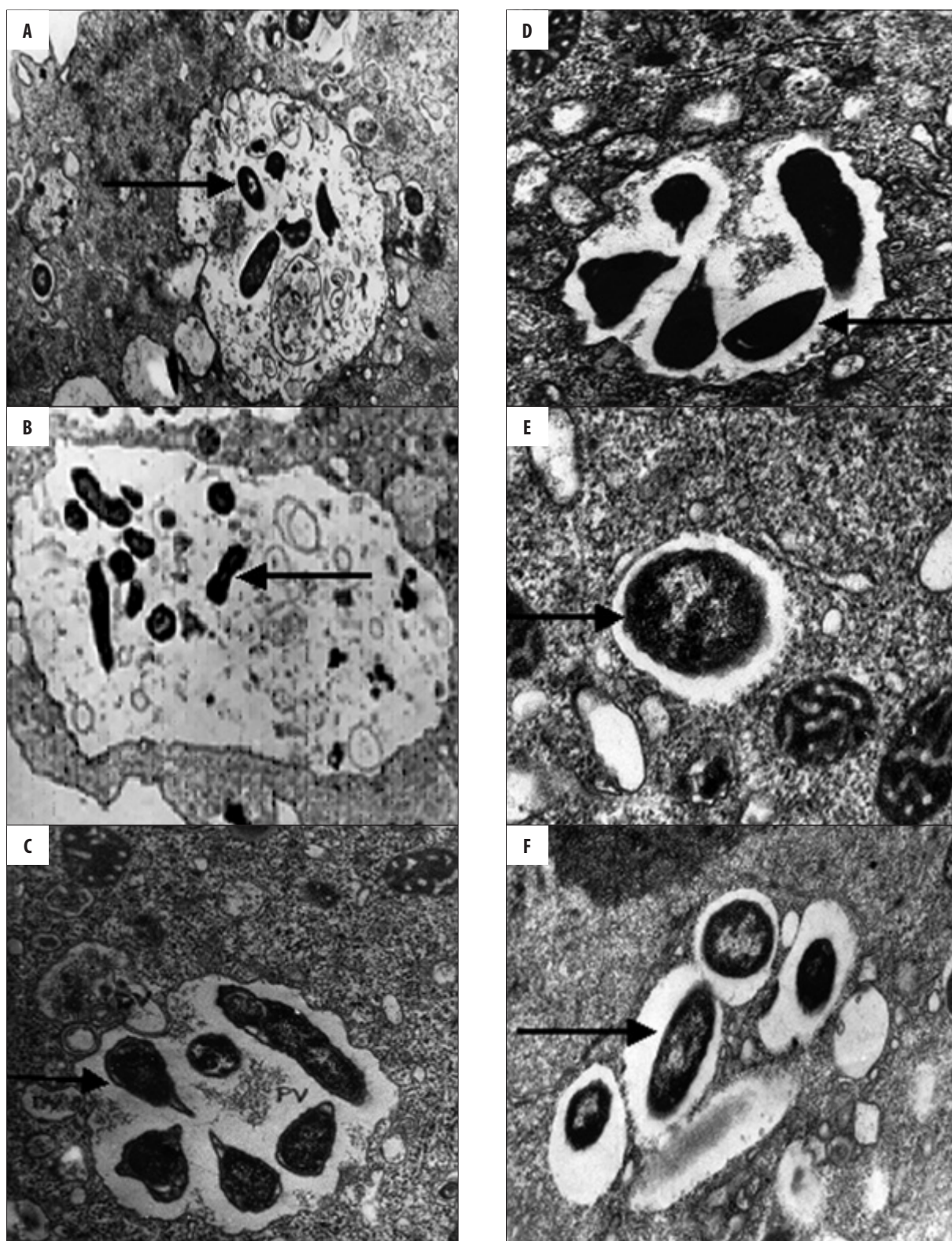
Legionella dumoffi – bakteria wyizolowana w 1979 r. z wody jest patogenna dla ludzi, wywołuje pneumonię o ostrym przebiegu i wysokiej śmiertelności. W warunkach laboratoryjnych namnaża się bardzo dobrze w komórkach Vero i w makrofagach krwi obwodowej myszy A/J. Obserwacje nad rozwojem *L. dumoffi* szczep Tex-KL w komórkach Vero wykazały, że bakterie we wczesnej fazie infekcji wydostają się z endosomu do cytoplazmy i proliferują w cytosolu [120].

Legionella lytica, również z grupy *Fluoribacter* jest reprezentowana przez cztery szczepy w tym jeden szczep LLAP-3 wyizolowany z płwociny osoby chorej na pneumonię [25,75]. *L. lytica* namnaża się bardzo dobrze w *A. castellanii* i *A. polyphaga* oraz w komórkach U937. *L. lytica*

jest potencjalnie patogenna dla ludzi, na co wskazuje pozytywna reakcja z przeciwciałami występującymi w surowicy chorych na pneumonię o nieustalonej etiologii [20,33,123]. Obrazy uzyskane z obserwacji w mikroskopie kontrastowo-fazowym i mikroskopie transmisyjnym pozwalają odtworzyć kolejne etapy rozwoju *L. lytica* w *A. castellanii* [56].

Komórki *L. lytica*, podobnie jak *L. pneumophila* są fagocytowane pojedynczo i bezpośrednio po wnikięciu są szczelnie izolowane w fagosomach od organelli gospodarza. Po około 2 do 4 godzin od zakażenia widoczne są wyraźnie powiększone parazytosomy, zawierające zaledwie po kilka bakterii oraz liczne fragmenty luźno ułożonej membrany. Na tym wczesnym etapie infekcji, urzęsione bakterie obecne w powiększonych parazytosomach zachowują zdolność do aktywnego ruchu są zatem jeszcze w fazie dojrzałych form infekcyjnych. Sześć–osiem godzin od zakażenia parazytosomy, w wyniku fuzji z lizosomami są powiększone do patologicznych rozmiarów i zawierają zaledwie po kilka bakterii, które utraciły zdolność ruchu.

Na tym etapie infekcji treść parazytosomów ulega zakwaszeniu do pH 5,0 a bakterie przechodzą proces transfor-



Ryc. 5. Zdjęcia z transmisyjnego mikroskopu elektronowego przedstawiające wybrane fazy rozwoju *L. lytica* w *A. castellanii*. Opis w tekście. Strzałką zaznaczono bakterie

macji ze stanu anabiozy do fazy replikacyjnej. Po 10–12 godzinach od zakażenia objętość parazytosomów stopniowo maleje, pH wakuoli powraca do obojętnego, średnia liczba bakterii przypadająca na wakuolę nie zwiększa

się, pojawiają się natomiast wyraźne zmiany w strukturze membrany parazytosomów. Zmiany destrukcyjne w membranie parazytosomów prowadzą stopniowo do jej atrofii czego wyrazem jest pojawienie się ziarnistych składni-

ków cytoplazmy wewnątrz wakuoli. Bakterie nieosłonięte membraną parazytosomu ulegają rozprzestrzenianiu w cytoplazmie, w której znajdują warunki rozwoju dzięki stałemu dopływowi składników pokarmowych i optymalnemu pH.

W tej fazie infekcji są widoczne w cytoplazmie pojedynczo ułożone bakterie nieosłonięte membraną parazytosomu. Proces replikacji bakterii przebiega w bezpośrednim kontakcie z cytoplazmą. Przejście bakterii z wakuoli do cytosolu nie paraliżuje procesów fizjologicznych i metabolizmu gospodarza. Ameby zachowują naturalną organizację struktur komórkowych, podział na ekto- i endoplazmę, zdolność do ruchu, procesy związane z metabolizmem komórki też nie są zakłócone. Zapotrzebowanie na tlen, w przeliczeniu na komórkę, utrzymuje się na stałym poziomie. Szybko zachodzące procesy podziałowe bakterii prowadzą do powstania mikrokolonii, które są umiejscowione w lakunach cytoplazmatycznych.

Z czasem bakterie wypełniają całą komórkę gospodarza. Postępujący proces dezorganizacji komórki gospodarza prowadzi do uwolnienia enzymów autolitycznych, których produkty są dodatkowym źródłem pokarmu dla bakterii. Wyczerpanie składników pokarmowych stwarza warunki stresowe i wymusza uruchomienie mechanizmów adaptacyjnych, które prowadzą do transformacji bakterii z fazy wegetatywnej do fazy inwazyjnej. W wyniku eksploatacji komórki gospodarza i zniszczeniu plazmolemy bakterie uwalniają się do środowiska.

B2. Morfologiczne i fizjologiczne adaptacje do życia w ekstremalnych warunkach

W cyklu życiowym legionell występują na przemian dwie fazy: faza replikacyjna i faza inwazyjna. Przejście bakterii z jednej fazy do drugiej odbywa się wyłącznie w żywych aktywnie metabolizujących komórkach gospodarza. Pełny cykl rozwojowy jest realizowany w dwóch krańcowo różnych środowiskach, w komórkach określonego gatunku pierwotniaka lub w komórkach żernych ssaka oraz w wodzie. Zdolność do przeżycia w warunkach stresowych, jakie występują w obu tych środowiskach jest wyrazem odpowiedzi bakterii na sygnały wywierające wpływ na ekspresję genów determinujących określony fenotyp. Adaptacja do życia w tak skrajnie odmiennych warunkach, jakie występują w żywej aktywnie metabolizującej komórce gospodarza a następnie w środowisku wodnym, które charakteryzuje głęboki deficyt związków odżywczych oraz duża fluktuacja czynników fizykochemicznych wymaga istotnych zmian w morfologii i fizjologii bakterii.

Postaci inwazyjne, które w środowisku wodnym są w stanie anabiozy, po wnikięciu do komórki gospodarza i remodulacji wakuoli, zawierającej bakterie w niszę replikacyjną przechodzą w fazie lag z życia utajonego do fazy wegetatywnej. W czasie wielogodzinnego okresu adaptacji do nowego środowiska, postaci inwazyjne, które mają wiele cech wspólnych z postaciami przetrwalnymi bakterii przechodzą ze stanu letargu do fazy replikacyjnej. W środowisku bogatym w składniki pokarmowe, jakie stwarza komórka gospodarza tracą aktywność cytotoksyczną, urzęsienie, wrażliwość na sól i wiele innych cech charakterystycz-

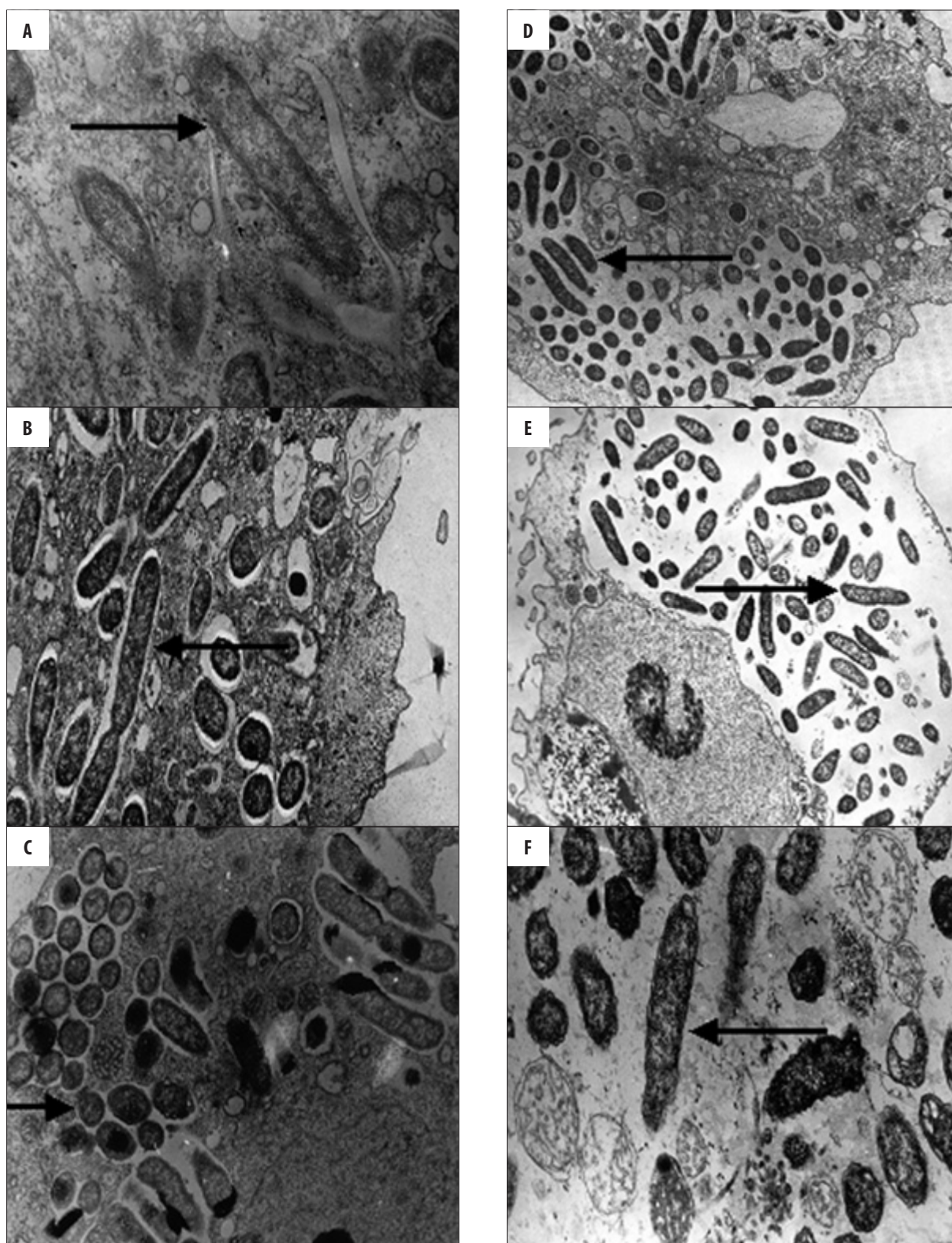
nych dla postaci infekcyjnych, niezbędnych do przetrwania w wodzie [6,34]. Postaci inwazyjne charakteryzujące się dużym pleomorfizmem, w komórce gospodarza w wyniku zachodzących procesów resuscytacji, a następnie podziałów komórkowych przyjmują kształt cienkich pałeczek typowych dla Gram-ujemnych bakterii [61]. W tej fazie rozwoju, w cytoplazmie bakterii, występują poza nukleoidem i drobnymi inkluzjami liczne rybosomy. Warstwa okrywająca komórkę zawiera osłonę zewnętrzną i błonę cytoplazmatyczną, obie grubości 7,5 nm, oraz strefę perioplazmatyczną bez wyraźnie widocznej warstwy mureinowej. Bieguny komórki są zwężone. Podziały zachodzą w wyniku przewężenia bez tworzenia przegrody między potomnymi komórkami. W fazie replikacyjnej procesy związane z syntezą rzęsek, beta hydroksymasłanu oraz białek odpowiedzialnych za dojrzewanie niszy replikacyjnej są zablokowane, wzrasta natomiast wrażliwość na niskie pH [12, 34,43,61,86,102,152,167,181].

Pod koniec fazy replikacyjnej (eksponencjalnego wzrostu) bakterie zmieniają fenotyp, są mniejsze, urzęsione i zawierają ziarna polimeru kwasu beta hydroksymasłowego. W procesie przechodzenia z fazy wegetatywnej do fazy transmisyjnej, określanej też jako faza infekcyjna lub stacjonarna, dochodzi do ekspresji licznych nowych cech morfologicznych i fizjologicznych niezbędnych bakterii do wydostania się z wyeksploatowanej komórki gospodarza i przeżycia w środowisku wodnym, a po ponownym wnikięciu do nowego gospodarza i przełamaniu jego mechanizmów obronnych do wytworzenia niszy replikacyjnej.

Procesy zachodzące w fazie transmisyjnej są niezmiernie ważne dla pełnej ekspresji cech niezbędnych do przeżycia w dalszych etapach cyklu rozwojowego. Pełne ujawnienie się cech decydujących o biologicznym przetrwaniu nowej progenitury zależy w dużym stopniu od presji selekcyjnej, jaką stwarza komórka gospodarza, a także od środowiska zewnętrznego, które ma istotny wpływ na procesy zachodzące u obu partnerów układu – gospodarza i jego pasażera.

Głównym czynnikiem aktywującym procesy fenotypowej remodulacji bakterii z fazy posteksponencjalnego wzrostu do fazy infekcyjnej jest brak pokarmu w wyeksploatowanej komórce gospodarza. Zmiana cech fenotypowych jest skutkiem działania sygnałów kontrolujących procesami transkrypcji i translacji produktów materiału genetycznego. W pełni dojrzałe postaci infekcyjne (MIF) powstają pod koniec cyklu rozwojowego w komórkach odpowiedniego gospodarza pod warunkiem, że czynniki środowiskowe są optymalne dla życia obu partnerów [61,80].

Dojrzałe postaci infekcyjne po uwolnieniu z komórki gospodarza do wody są zdolne do przeżycia w stanie letargu długi okres między gospodarzami [113,140,164] utrzymując wysoką inwazyjność i wirulencję nie tylko względem pierwotniaków i komórek żernych ssaków *in vitro*, ale też dużą patogenność dla świnek morskich [40,41,67]. Postaci infekcyjne charakteryzuje mała aktywność metaboliczna, poza komórką gospodarza są żywe, ale niezdolne do tworzenia kolonii [133,140,164]. W obecności związków energetycznych, aminokwasów i kwasów cyklu Krebsa nie wykazują zwiększonego, ponad oddychanie endogenne, zapotrzebowania na tlen [79,90,173].



Ryc. 6. Zdjęcia z transmisyjnego mikroskopu elektronowego przedstawiające wybrane fazy rozwoju *L. lytica* w *A. castellanii*. Opis w tekście. Strzałką zaznaczono bakterie

Bakterie hodowane *in vitro* do późnej fazy stacjonarnej nie tworzą dojrzałych postaci infekcyjnych, są słabo fagocytowane i mniej wirulentne, są natomiast bardziej wrażliwe na bakteriobójcze działanie czynników środowisko-

wych [61,79]. Bakterie hodowane *in vivo* w warunkach ekstremalnych również nie tworzą w pełni dojrzałych postaci infekcyjnych zdolnych do przeżycia w wodzie i wywołania infekcji [61,79]. Dojrzewanie postaci infekcyjnych

w warunkach optymalnych dla rozwoju pasożyta i jego gospodarza nie jest procesem synchronicznym, zatem miot komórek potomnych nie jest jednorodny. Heterogenność populacji bakterii powoduje, że oprócz postaci w pełni wyposażonych do życia przez długi okres w stanie anabiozy występują komórki, których proces transformacji do form transmisyjnych nie został zakończony, ich przeżywalność i infekcyjność jest mała [61]. Czynnikiem wywierającym wpływ na proces dojrzewania postaci transmisyjnych jest m.in. temperatura. Synteza rzęsek, jednego z markerów fazy inwazyjnej, przebiega bez zakłóceń w temperaturze 30°C, ale jest zahamowana w temperaturze 41°C [139]. Morfogenezę bakterii w makrofagach osób chorych na legionelozę jest w wyniku podwyższonej temperatury ciała chorego i apoptozy, kontrolowanej śmierci komórek gospodarza, zahamowana na wczesnym etapie transformacji do postaci infekcyjnych [79,132]. Poznanie procesów związanych z dojrzewaniem postaci infekcyjnych pozwala zrozumieć dlaczego legionelozę nie jest chorobą zakaźną.

Postaci transmisyjne charakteryzuje duże zróżnicowanie cech morfologicznych, występują komórki zawierające wielowarstwową błonę okrywającą, komórki z zagęszczoną warstwą wewnętrzną błony oraz komórki o nieregularnym kształcie i zagęszczonej cytoplazmie [61]. Dojrzałe postaci transmisyjne przyjmują kształt krótkich grubych pałeczek o zaokrąglonych biegunkach, na których są umiejscowione rzęski [58,61,79,90]. Obecność rzęsek w tej fazie cyklu rozwojowego ułatwia bakterii wydostanie się z komórki gospodarza i dyspersję w środowisku wodnym [4, 6,34,51,64,86,87,115,151]. Wewnątrz postaci infekcyjnych (MIF) powstają ziarna złożone z polimeru kwasu beta hydroksymasłowego, który stanowi źródło energii ułatwiającej przetrwanie w środowisku wodnym [84,102].

Bakterie w fazie transmisyjnej zwiększają odporność na zewnątrzkomórkowy stres [12,13,87,115]. W tej fazie cyklu rozwojowego następuje wytwarzanie cytotoksycznych białek, odpowiedzialnych za powstawanie kanałów w membranie gospodarza umożliwiających wydostawanie się bakterii z wyeksploatowanej komórki [6,34,108]. Dojrzałe postaci infekcyjne są uzbrojone w białka systemu sekrecyjnego typu IV, które po wnikięciu do nowego gospodarza blokują fuzję parazytosomów z lizosomami, zatem biorą udział w formowaniu niszy replikacyjnej, która umożliwia namnażanie [6, 12,22,86,87,111,153,157,167,175]. W błonie okrywającej postaci infekcyjne wzrasta zawartość białka MagA-chroniącego komórkę przed stresem oksydacyjnym oraz białek FlaA, Mip, Hsp60, MOMP, DotO, DotH ważnych dla procesu adhezji i wnikania do komórek żernych [18,39,79,86,90,91,180]. *L. pneumophila* w fazie postekspenencjalnej (PE) wytwarza melaninopodobny pigment, który chroni komórkę w środowisku wodnym przed działaniem promieniowania UV [165,176,179,182]. Bakterie w fazie infekcyjnej są odporne na niskie pH i temperaturę do 60°C [34,86,152].

C. Genetyczna kontrola transformacji z fazy replikacyjnej do infekcyjnej

Badania nad genetyczną kontrolą procesów transformacji są prowadzone głównie w warunkach laboratoryjnych na odpowiednio dobranych pożywkach, co nie oddaje w pełni warunków jakie panują w komórce gospodarza [12,85, 87,89,101,113,186].

Ekspresja genów odpowiedzialnych za procesy związane z transformacją jest odpowiedzią bakterii na sygnały płynące ze środowiska zewnętrznego, takie jak wyczerpanie składników niezbędnych do życia, zmiana pH, temperatury, dostępność do tlenu, żelaza i magnezu [85].

Pod koniec eksponencjalnej fazy wzrostu (E) pod wpływem małego stężenia aminokwasów dochodzi do kumulacji wolnego, niezwiązanego z aminokwasami tRNA, co w konsekwencji prowadzi do aktywacji rybosomalnego enzymu RelA [86]. Enzym RelA *L. pneumophila* jest w 44% identyczny i w 63% podobny do białka RelA, występującego w komórkach *E. coli* [85,87,186]. W fazie transmisyjnej enzym RelA prowadzi do przekształcenia GTP do guanozyny 3'5' bispriofosforanu (ppGpp) [86]. Duże stężenie alarmonu ppGpp zwalnia kaskadę białek regulacyjnych w tym sigma czynników: RpoS (σ^S/σ^{38}), FliA (σ^{28}) i RpoN (σ^{54}), oraz białek LetA/S i LetE działających na procesy posttranslacyjne [12,64,85,87,115].

Mutanty *relA* namnażają się dobrze zarówno w amebach jak i makrofagach, ale hodowane do późnej fazy stacjonarnej nie kumulują ppGpp ani też nie ujawniają cech transmisyjnych w tym urzęsienia i zdolności do wytwarzania pigmentu osłaniającego przed działaniem UV i syntezy flageliny [34,185]. Defekty cech transmisyjnych u mutantów *relA* nie są jednak tak wyraźnie widoczne jak u mutantów w genach *letA* lub *rpoS* [86,87,185]. Jest zatem bardzo prawdopodobne, że *L. pneumophila* dysponuje co najmniej dwoma szlakami kontroli poziomu alarmonu ppGpp. Alternatywne wewnątrzkomórkowe sygnały mogą np. stymulować, niezbędne dla żywotności bakterii, białko SpotT, które wykazuje aktywność zarówno pyrofosfohydrolazy, jak i syntetazy ppGpp [186]. Enzym SpotT jest w 52% identyczny i w 70% podobny do białka SpotT *E. coli* [186]. Nie wykazano jednak, żeby mutanty z delecją w genie *relA* wytwarzały wykrywalne ilości alarmonu [186].

Wyniki badań biochemicznych i genetycznych prowadzone na modelu *E. coli* wskazują, że ppGpp, jako globalny regulator procesów transmisyjnych, wpływa na konkurencję między sigma czynnikami o miejsce przyłączenia do polimerazy mRNA, zatem duże stężenie alarmonu w komórkach *L. pneumophila* może destabilizować oddziaływanie głównego sigma czynnika $\sigma^D(\sigma^{70})$ fazy wegetatywnej na polimerazę RNA, a w konsekwencji ułatwiać sigma czynnikom fazy transmisyjnej wejście na jego miejsce [105,130]. Sigma czynniki fazy transmisyjnej sterując polimerazą mRNA uczestniczą w regulacji ekspresji genów odpowiedzialnych za przeżywalność *L. pneumophila* w komórkach gospodarza oraz w warunkach stresowych [12,85,87,89,101,115]. W fazie transmisyjnej odbywa się synteza rzęsek, wzrost odporności na stres oksydacyjny i osmotyczny, odporność na niskie pH oraz wytwarzanie białek tworzących kanały w membranie gospodarza, które ułatwiają wydostanie się bakterii z wyeksploatowanej komórki [6,7,34,85,108,152].

Z pracy Bachmana i Swansona [13] wynika, że funkcje sigma czynnika RpoS u *L. pneumophila* są nietypowe w porównaniu z jego homologami występującymi u innych Gram-ujemnych bakterii:

- odporność *L. pneumophila* na stres oksydacyjny i osmotyczny oraz wrażliwość na niskie pH wzrasta w fazie PE, ale nie są to cechy zależne od RpoS [12,13,85],

- RpoS indukuje odporność osmotyczną w fazie replikacyjnej [13,85].
- w komórkach *E. coli* zawartość transkryptu rpoS w fazie stacjonarnej wzrasta dziesięciokrotnie natomiast w komórkach *L. pneumophila* transkrypt rpoS, wysoki w fazie E, zanika prawie całkowicie w fazie posteksponencjalnej [13].
- w komórkach *Pseudomonas fluorescens* i *E. coli* białka homologiczne z Let A/S indukują transkrypt rpoS natomiast w komórkach *L. pneumophila* rpoS RNA pod wpływem LetA/S w fazie PE ulega destabilizacji, ale jego produkt – białko RpoS jest kumulowane [13,85].
- w fazie eksponencjalnego wzrostu, gdy stężenie alarmu jest małe gen rpoS hamuje ekspresję cech transmisyjnych [12,13]. W tym czasie transkrypty genów *fliA* i *fliA* są na bardzo niskim poziomie a bakterie nie wytwarzają rzęsek, nie są cytotoksyczne i infekcyjne [13].

W fazie PE RpoS zwiększa aktywność genów *fliA*, *fliA* i *mip*, odpowiedzialnych za wytwarzanie czynników umożliwiających infekcję ameb i makrofagów oraz syntezę białek biorących udział w powstaniu niszy replikacyjnej [50,69,79,87]. Sigma czynnik FliA (σ^{28}) aktywuje w fazie PE geny umiejscowione na operonie rzęskowym w tym gen *fliA*, odpowiedzialny za syntezę flageliny oraz geny wywierające wpływ na cytotoksyczność w kontakcie z komórką gospodarza, a także geny sterujące procesami fuzji parazytozomów z lizosomami i replikacji w amebach [50,64,87,89,129]. Indukcja genu *fliA* w fazie PE jest zależna od ekspresji genów regulatorowych fenotypu transmisyjnego: *rpoS*, *letA*, *letS*, *letE* [13,129]. U mutantów *rpoS*, *letA*, *letS* nie dochodzi do syntezy mRNA na genie *fliA*. Region *letE* niezbędny do maksymalnej ekspresji genów fenotypu transmisyjnego nie koduje białka, a jedynie regulatorowy RNA [87]. Mutanty w genach *rpoS* i *letA* nie namnażają się w *A. castellanii* [12,50,85,115].

Białka LetA/S osłabiają represję procesów transkrypcyjnych wywieraną przez CsrA, co powoduje aktywację genów fazy transmisyjnej zależnie i niezależnie od sigma czynnika FliA, a także stabilizację transkryptów promujących syntezę czynników transformacji do fazy PE [64,129].

Białko CsrA (carbon storage regulator) wykryte w 1993 r. w komórkach *E. coli* jest globalnym represorem fenotypu transmisyjnego i głównym aktywatorem wewnątrzkomórkowej replikacji *L. pneumophila* [64,129,130,150]. W 2001 r. Fettes i wsp. wykryli gen *csrA* w komórkach *L. pneumophila* i wykazali, że jego obecność blokuje ekspresję cech charakterystycznych dla fazy PE, w tym syntezę rzęsek, wytwarzanie pigmentu chroniącego komórkę przed promieniowaniem UV, odporność na podwyższoną temperaturę i szok osmotyczny, zmianę kształtu komórki, powstawanie dojrzałych postaci infekcyjnych (MIF), a także cytotoksyczność, wrażliwość na sól i zdolność do wytworzenia wakuoli osłaniającej bakterie przed działaniem enzymów lizosomalnych [64,129,130].

Represja cech transmisyjnych przez CsrA w fazie E, umożliwia replikację bakterii. Mutanty *csrA* w zakażonych komórkach gospodarza utrzymują się przez wiele godzin przy życiu, ale nie namnażają się i ulegają stopniowej degradacji. CsrA funkcjonuje jako modulator translacji i stabilności mRNA. Białko CsrA wiąże się z mRNA blisko

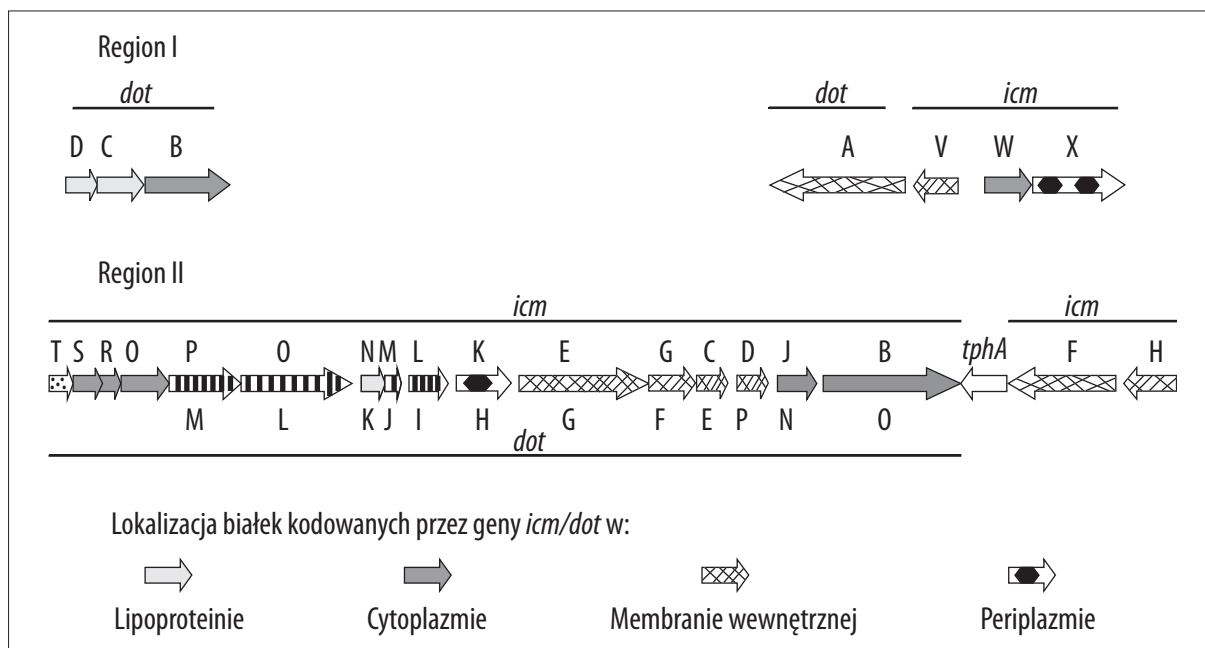
miejsca jego przyłączenia do rybosomu, co prowadzi do destabilizacji transkryptu. CsrB jest niekodującym regulatorowym RNA, który w licznych kopiach może sekwestrować (neutralizować) białko CsrA i tym samym indukować białka efektorowe fazy transmisyjnej. CsrA i niekodujący represorowy – csrB funkcjonują jako posttranskrypcyjny system regulacyjny. Po wyczerpaniu pokarmu i kumulacji alarmu białka LetA/S blokują aktywność CsrA za pośrednictwem indukcji csrB [129,130].

Białka regulatorowe działają niezależnie i kontrolują różne aspekty transmisji [130]. Sigma czynnik RpoS sterując mRNA prowadzi do transkrypcji genów odpowiedzialnych za przeżywalność bakterii w fazie stacjonarnej i w warunkach stresowych. Natomiast białka LetA/S odpowiedzialne za kontrolę procesów posttranskrypcyjnych działając na translację osłabiają działanie regulacyjne białka CsrA.

D. Cechy determinujące wirulencję

Badania nad rolą cech fenotypowych oraz genów determinujących wirulencję legionell względem komórek i organizmów, w których bakterie mogą realizować cykl rozwojowy prowadzą do licznych spekulacji nad ewolucją wewnątrzkomórkowych patogenów. Narastająca ilość publikacji sugeruje, że gatunki pałeczek legionella chorobotwórcze dla ssaków, w tym dla człowieka, nabyły cechy wirulencji w procesie pasożytniczego trybu życia w określonych grupach pierwotniaków [3,65,169]. Znane są gatunki pałeczek legionella, w tym gatunki patogenne dla ludzi, które mogą namnażać się w temperaturze 37°C i w wyższej oraz gatunki, dla których 35°C jest temperaturą restrykcyjną. Oprócz gatunków, które zakażają i proliferują w szerokim zakresie komórek eukariotycznych zdolnych do fagocytozy występują gatunki np. *L. anisa*, która namnaża się tylko w *Hartmannella vermiformis* [67]. *L. drancourtii* jest wewnątrzkomórkowym pasożytem *A. polyphaga*, ale nie rośnie nawet na pożywkach stosowanych do hodowli innych legionell [112]. Interakcja między jednokomórkowym gospodarzem i jego pasożytem w różnych warunkach ekologicznych, stwarza wyjątkową presję selekcyjną wymuszającą akwizycję cech umożliwiających przeżycie określonych gatunków legionell w komórkach żernych ssaków.

W 1989 r. wykryto, metodą mutagenazy transpozonowej, pierwszy gen odpowiedzialny za wirulencję *L. pneumophila* [38,59]. Gen *mip* (macrophage infectivity potentiator) koduje w komórkach *L. pneumophila* białko o m.c. 24 kDa. Czynnik wirulencji Mip wpływa na infekcyjność bakterii względem pierwotniaków i makrofagów [38,39,59]. Mip jest białkiem z N-terminalną sekwencją sygnałną odcinaną podczas transportu przez błonę cytoplazmatyczną. Białko Mip *L. pneumophila* jest zbudowane z dwóch domen połączonych strukturą o charakterze α -helisy. Region C-terminalny charakteryzuje się aktywnością peptydylo-propylo cis/trans izomerazy, a koniec N-terminalny odpowiada za stabilizację całej struktury [69,110]. Gen odpowiedzialny za syntezę białek klasy Mip występuje powszechnie w rodzinie *Legionellaceae* [37,39] i jest bardzo pomocny w taksonomii tej grupy bakterii [143,144]. Ciężar cząsteczkowy białka Mip poszczególnych gatunków jest różny i wynosi 24-31 kDa. Mechanizm działania białka Mip nie został w pełni wyjaśniony. Białko podobne do Mip występuje również w komórkach *Chlamydia trachomatis* [114], *Ch.*

Ryc. 7. Mapa genów *dot/icm* [wg 156,161]

psittaci [149], *Coxiella burnettii* [125], *Trypanosoma cruzi* [131] i *E. coli* [96].

W ostatnich latach dużo uwagi poświęcono wyjaśnieniu roli genów *dot/icm* (defective for organelle trafficking/intracellular multiplication) w ekspresji cech odpowiedzialnych za wirulencję legionell, a szczególnie *L. pneumophila* [9,23,29,104,108,117,142,157,159,171]. Uzyskanie transpozowanych mutantów niezdolnych do wewnątrzkomórkowej replikacji umożliwiło odkrycie genów systemu sekrecyjnego, odpowiedzialnych za pasożytniczy styl życia legionell w żywych komórkach i w organizmach ssaków [57,76,117]. System sekrecyjny *dot/icm* legionell wywodzi się z systemu sekrecyjnego typu IV, który bierze udział w koniugacyjnym przenoszeniu DNA i białek między bakteriami [36]. *L. pneumophila* wykorzystuje ten system transportu do przenoszenia makromolekuł do komórki gospodarza [6,157,158,175].

Geny *dot/icm* są niezbędne do prawidłowego rozwoju bakterii w zakażonych komórkach [117]. Na 121 awirulentnych mutantów *L. pneumophila* 89 miało wspólny fenotyp – były defektywne w genach *pmi* (protozoa and macrophage infectivity) pozostałe 32 mutanty *mil* (macrophage infectivity loci) były niezdolne do replikacji w makrofagach, ale charakteryzowały się dzikim fenotypem względem pierwotniaków [76]. Mutanty *rib* (release of intracellular bacteria) były defektywne w tworzeniu kanałów w plazmolemie, zatem nie były w stanie wydostać się z komórki gospodarza, ale mogły się w niej namnażać [6,126,127]. System sekrecyjny *dot/icm* jest odpowiedzialny za powstawanie dwóch typów kanałów, w parazytosomach i w plazmolemie gospodarza, które funkcjonują na różnych etapach infekcji [6,45,107,126,129].

Biogeneza niszy replikacyjnej, powstawanie kanałów w błonach pierwotniaków i komórek ssaków oraz transport białek efektorowych, które wywierają wpływ na fuzję parazy-

tosomów z lizosomami są sterowane przez geny systemu *dot/icm* [6,23,29,36,44,45,108,135,142,157,161].

Geny *dot/icm* wpływające na wewnątrzkomórkową replikację legionell są umiejscowione na dwóch regionach chromosomu [157,175]. Region I zawiera siedem genów (*icmV*, *-W*, *-X* i *dotA*, *B*, *C*, *D*). Region II zawiera 18 genów (*icmT*, *-S*, *-R*, *-Q*, *-P*, *-O*, *-N*, *-M*, *-L*, *-K*, *-E*, *-G*, *-C*, *D*, *-J*, *-B*, *-F*, *-H*) [9,127,142,157,159,156,175]. Analiza komplementacyjna genów wykazała, że są one zorganizowane w dziewięciu jednostkach transkrypcyjnych (*icm TS*, *icmR*, *icmQ*, *icmPO*, *icmNMLKEGCD*, *icmJB*, *tphA-icmF*, *icmWX* i *icmV-dotA*) [23,29,142,157,175].

Geny kompleksu *dot/icm* determinują trzy odmienne kategorie fenotypowe:

- geny kontrolujące główny aparat transportowy [36],
- geny kontrolujące białka odpowiedzialne za powstawanie kanałów w plazmolemie, przylegające bezpośrednio do bakterii [107,108] oraz białka ułatwiające wydostanie się bakterii z wyeksploatowanej komórki gospodarza [45,107,108,128],
- geny, których produkty – białka efektorowe kontrolują proces remodelacji membrany fagosomów [45].

Geny systemu *icm/dot* zidentyfikowane w komórkach *L. pneumophila* występują również w genomie innego wewnątrzkomórkowego pasożyta, a mianowicie czynnika etiologicznego gorączki Q – *Coxiella burnettii*. Ta Gram-ujemna bakteria zaliczona do γ podgrupy w obrębie *Proteobacteria* ewolucyjnie jest blisko spokrewniona z legionellami. Obecność genów *icm/dot* w genomie *C. burnettii* wskazuje, że obie bakterie wykorzystują podobne mechanizmy wirulencji [187].

Brak jest informacji o mechanizmach regulujących wirulencję w poszczególnych fazach cyklu rozwojowego oraz kontrolujących ekspresję genów *dot/icm*, wiadomo jedynie,

że czynnik *rpoS* wpływa na wirulencję. Mutacje w tym genie prowadzą do atenuacji bakterii i utraty zdolności do replikacji w komórkach gospodarza [85,86,186].

Poznanie funkcji białek kodowanych przez geny *dot/icm* może mieć istotne znaczenie w zrozumieniu molekularnych mechanizmów zmieniających dojrzewanie fagosomów, formułowanie niszy umożliwiającej namnażanie bakterii oraz powstawanie kanałów w błonie parazytosomu i plazmolemmie gospodarza na różnych etapach infekcji [45,107,128]. Funkcje poszczególnych białek Dot/Icm, z nielicznymi wyjątkami nie są znane. Białko DotA zostało wyizolowane i opisane jako pierwsze [22,23]. Jest to polipeptydowe białko membrany złożone z ośmiu hydrofobowych domen transmembranowych [153,155]. Białko DotA zapobiega fuzji fagosomów z lizosomami [155, 179]. Mutanty *dotA* są defektywne we wszystkich aktywnościach związanych z kompleksem Dot/Icm [22, 23, 46, 104, 108, 109]. Membrany fagosomów zawierających mutanty *dotA* już po pięciu minutach są opłaszczane przez LAMP1, podczas gdy membrany fagosomów otaczające dziki (rodzicielski) szczep *L. pneumophila* przez wiele godzin nie kumulują białka LAMP1 i LAMP2, ani też białka Rab7 [22,23,153,155,171,178]. Ekspresja genu *dotA* odbywa się jeszcze przed fagocytozą bakterii przez makrofagi. Białko DotA jest wydzielane do płynu pochodzącego w czasie wzrostu *L. pneumophila* na płynnym podłożu [135].

Periplazmatyczne białko IcmX uczestniczy w biogenezie niszy replikacyjnej [121]. W hodowli na podłożu płynnym *L. pneumophila* wydziela skrócone białko IcmX do supernatantu, ale brak jest danych wskazujących na transport białka do komórek eukariotycznych.

IcmS i IcmW to małe białka biorące udział w remodulacji fagosomów zawierających *L. pneumophila*, mogą też funkcjonować jako chaperony (białka opiekuńcze), ułatwiające transport białek przez system sekrecyjny typu IV [44,135]. Fagosomy zawierające mutanty *icmS* i *icmW* ulegają fuzji z lizosomami, ale jednocześnie mogą ulegać częściowej remodulacji [44,128].

Małe kwaśne białko IcmR zawierające hydrofobową α -helisę na C-terminalnym końcu pełni prawdopodobnie funkcję białka opiekuńczego dla białka IcmQ [44]. Mutanty *icmR* blokują częściowo transformację fagosomów zawierających *L. pneumophila* do fagolizosomów, co może wskazywać, że IcmR jest kofaktorem białka efektorowego IcmQ [44,128]. Mutanty *icmQ*, podobnie jak mutanty *dotA* i *icmX*, są całkowicie awirulentne [44].

Białka DotH/IcmK i DotO/IcmB są zasocjowane z frakcją membranową bakterii i uczestniczą w adhezji do powierzchni makrofagów [177]. Białka te są związane ze strukturami włóknistymi występującymi na komórkach *L. pneumophila* po inkubacji bakterii w makrofagach szpiku kostnego myszy. Geny *dotH* i *dotO* umiejscowione w regionie drugim pełnią istotną rolę w sterowaniu procesami replikacji bakterii i powstawaniu niszy replikacyjnej [9]. Białko DotH złożone z 360 aminokwasów ma hydrofobowy N-terminalny koniec, który pełni rolę sygnałną i ułatwia transport białka przez błonę cytoplazmatyczną. Białko DotO zbudowane z 1009 aminokwasów jest również eksportowane z komórki *L. pneumophila*. Powierzchniowe białka DotH i DotO znikają

po fagocytozie bakterii przez makrofagi i pojawiają się ponownie pod koniec eksponencjalnej fazy wzrostu. Obecność białek DotH i DotO na powierzchni bakterii stymuluje proces fagocytozy, ułatwia wyciek bakterii z fagosomu oraz kolejną rundę infekcji makrofagów [177]. Jest bardzo prawdopodobne, że makrofagi stymulują proces syntezy białek (DotH i DotO) ściany komórkowej bakterii [177].

LidA jest kolejnym białkiem efektorowym eksportowanym z komórki *L. pneumophila* przez system sekrecyjny *dot/icm* [46]. Białko LidA zasocjowane z warstwą zewnętrzną membrany fagosomów jest istotnym stymulatorem wewnątrzkomórkowej replikacji, a w hodowli na pożywkach wpływa na dużą żywotność bakterii [46]. Translokacja białka LidA z bakterii do membrany fagosomu następuje bezpośrednio po kontakcie *L. pneumophila* z komórką żerną, co pozwala wnioskować, że system sekrecyjny białka przez bakterię jest bardzo wydajny. LidA, obecne na powierzchni membrany fagosomu, uczestniczy w gromadzeniu pęcherzyków wokół parazytosomu i biogenezie wakuoli replikacyjnej [46]. LidA pełni też ważną rolę w sprawnym funkcjonowaniu białek systemu sekrecyjnego *dot/icm* i wpływa na integralność komórki bakteryjnej. Mutanty *lidA* charakteryzuje mała witalność [46].

Obecne na powierzchni komórki białka szoku termicznego Hsp60, kodowane przez gen *hspB* i GroEL są indukowane w czasie wzrostu legionell w makrofagach [2,78,79,92]. Wzmoczona synteza białka Hsp60 zachodzi też w warunkach stresowych, wywołanych obecnością nadtlenu wodoru, podwyższonej temperatury lub szoku osmotycznego [91]. Białko Hsp60 ułatwia fagocytozę bakterii oraz kuleczek lateksowych przez komórki HeLa, a także optymalizuje infekcyjność [79].

Ważną grupę białek, wywierających wpływ na wirulencję, są enzymy: metaloproteaza cynkowa, lipaza, kwaśna fosfataza, fosfolipaza A, fosfolipaza C, lizofosfolipaza A, legiolizyna i RNA-za [10,11,13,14,15,70,71,72,106,183].

Badania porównawcze przeprowadzone na 27 szczepach reprezentujących 16 gatunków legionell wyizolowanych od chorych (20 szczepów) i ze środowiska (7 szczepów) wskazują na brak wyraźnej korelacji między wirulencją dla ludzi a występowaniem określonego zespołu cech fenotypowych [7]. W oparciu o cytopatogenność dla makrofagów U937 wyodrębniono dwie główne grupy legionell. Grupa pierwsza o cytopatogenności 70–100% obejmowała tylko sześć szczepów, w tym cztery na osiem badanych szczepów *L. pneumophila*, jeden szczep *L. micdadei* i jeden szczep *L. dumoffii*. Grupę drugą o małej cytopatogenności (0–49%) tworzyły pozostałe bakterie. Nie stwierdzono korelacji między cytopatogennością legionell dla makrofagów a występowaniem trzech innych cech fenotypowych – zdolnością do replikacji w makrofagach, indukcją apoptozy/fragmentacją DNA i tworzeniem cytoliptycznych kanałów [7].

Wszystkie gatunki legionell mają geny *dot/icm* oraz gen *miP*, a także są zdolne do replikacji w komórkach fagocytarnych ssaków i w określonych gatunkach pierwotniaków. Zespół cech fenotypowych bakterii oraz warunki środowiskowe determinują predyspozycje do życia w określonym organizmie.

- [1] Abu Kwaik Y.: The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic reticulum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996; 62: 2022–2028
- [2] Abu Kwaik Y., Eisenstein B.I., Engleberg N.C.: Phenotypic modulation by *Legionella pneumophila* upon infection of macrophages. *Infect. Immun.*, 1993; 61: 1320–1329
- [3] Abu Kwaik Y., Gao L.Y., Stone B.J., Harb O.S.: Invasion of mammalian and protozoan cells by *Legionella pneumophila*. *Bull. Inst. Pasteur.*, 1998; 96: 237–242
- [4] Abu Kwaik Y., Pederson L.: The use of differential display-PCR to isolate and characterize a *Legionella pneumophila* locus induced during the intracellular infection of macrophages. *Mol. Microbiol.*, 1996; 21: 543–556
- [5] Adeleke A.A., Fields B.S., Benson R.F., Daneshvar M.I., Pruckler J.M., Ratcliff R.M., Harrison T.G., Weyant R.S., Birtles R.J., Raoult D., Halablab M.A.: *Legionella drozanskii* sp. nov., *Legionella rowbothamii* sp. nov. and *Legionella fallonii* sp. nov.: tree unusual new *Legionella* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2001; 51: 1151–1160
- [6] Alli O.A., Gao L.Y., Pederson L.L., Zink S., Radulic M., Doric M., Abu Kwaik Y.: Temporal pore formation-mediated egress for macrophages and alveolar epithelial cells by *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.*, 2000; 68: 6431–6440
- [7] Alli O.A., Zink S., von Lackum N.K., Abu Kwaik Y.: Comparative assessment of virulence traits in *Legionella* spp. *Microbiology*, 2003; 149: 631–641
- [8] Almirall J., Bolibar I., Vidal J., Sauca G., Coll P., Niklasson B., Bartolome M., Balanzo X.: Epidemiology of community-acquired pneumonia in adults: a population-based study. *Eur. Respir. J.*, 2000; 15: 754–763
- [9] Andrews H.L., Vogel J.P., Isberg R.R.: Identification of linked *Legionella pneumophila* genes essential for intracellular growth and evasion of the endocytic pathway. *Infect. Immun.*, 1998; 66: 950–958
- [10] Aragon V., Kurtz S., Flieger A., Neumeister B., Cianciotto N.P.: Secreted enzymatic activities of wild-type and *hldD*-deficient *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.*, 2000; 68: 1855–1863
- [11] Aragon V., Rossier O., Cianciotto N.P.: *Legionella pneumophila* genes that encode lipase and phospholipase C activities. *Microbiology*, 2002; 148: 2223–2231
- [12] Bachman M.A., Swanson M.S.: RpoS co-operates with other factors to induce *Legionella pneumophila* virulence in the stationary phase. *Mol. Microbiol.*, 2001; 40: 1201–1214
- [13] Bachman M.A., Swanson M.S.: Genetic evidence that *Legionella pneumophila* RpoS modulates expression of the transmission phenotype in both the exponential phase and the stationary phase. *Infect. Immun.*, 2004; 72: 2468–2476
- [14] Baine W.B.: Cytolytic and phospholipase C activity in *Legionella* species. *J. Gen. Microbiol.*, 1985; 131: 1383–1391
- [15] Baine W.B.: A phospholipase C from the Dallas 1E strain of *Legionella pneumophila* serogroup 5: purification and characterization of conditions for optimal activity with an artificial substrate. *J. Gen. Microbiol.*, 1988; 134: 489–498
- [16] Barker J., Brown M.R.: Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiol.*, 1994; 140: 1253–1259
- [17] Barker J., Lambert P.A., Brown M.R.: Influence of intra-amoebic and other growth conditions on the surface properties of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.*, 1993; 61: 3503–3510
- [18] Bellinger-Kawahara C., Horwitz M.A.: 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.*, 1990; 172: 1201–1210
- [19] Benin A.L., Benson R.F., Besser R.E.: Trends in legionnaires disease, 1980–1998: declining mortality and new patterns of diagnosis. *Clin. Infect. Dis.*, 2002; 35: 1039–1046
- [20] Benson R.F., Drozanski W.J., Rowbotham T.J., Fields B.S., Bialkowska I., Losos D.: Serologic evidence of infection with 9 *Legionella*-like amoebal pathogen in pneumonia patients. *Proceedings of the 95th Annual General Meeting of the American Society for Microbiology*. Washington D.C. USA, 1995, abstr. C-200
- [21] Benson R.F., Fields B.S.: Classification of the genus *Legionella*. *Semin. Respir. Infect.*, 1998; 13: 90–98
- [22] Berger K.H., Isberg R.R.: Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.*, 1993; 7: 7–19
- [23] Berger K.H., Merriam J.J., Isberg R.R.: Altered intracellular targeting properties associated with mutations in the *Legionella pneumophila* *dotA* gene. *Mol. Microbiol.*, 1994; 14: 809–822
- [24] Berk S.G., Ting R.S., Turner G.W., Ashburn R.J.: Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998; 64: 279–286
- [25] Birtles R.J., Rowbotham T.J., Raoult D., Harrison T.G.: Phylogenetic diversity of intra-amoebal legionellae as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison. *Microbiol.*, 1996; 142: 3525–3530
- [26] Bitar D.M., Molmeret M., Abu Kwaik Y.: Molecular and cell biology of *Legionella pneumophila*. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2004; 293: 519–527
- [27] Bopp C.A., Sumner J.W., Morris G.K., Wells J.G.: Isolation of *Legionella* spp from environmental water samples by low-pH treatment and use of a selective medium. *J. Clin. Microbiol.*, 1981; 13: 714–719
- [28] Bozue J.A., Johnson W.: Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infect. Immun.*, 1996; 64: 668–673
- [29] Brand B.C., Sadosky A.B., Shuman H.A.: The *Legionella pneumophila* *icm* locus: a set of genes required for intracellular multiplication in human macrophages. *Mol. Microbiol.*, 1994; 14: 797–808
- [30] Brenner D.J.: Classification of the legionellae. *Semin. Respir. Infect.*, 1987; 2: 190–205
- [31] Brenner D.J., Steigerwalt A.G., Eppe P., Bibb W.F., McKinney R.M., Starnes R.W., Colville J.M., Selander R.K., Edelstein P.H., Moss C.W.: *Legionella pneumophila* serogroup Lansing 3 isolated from a patient with fatal pneumonia, and description of *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* subsp. nov., *L. pneumophila* subsp. *fraseri* subsp. nov., and *L. pneumophila* subsp. *pasculli* subsp. nov. *J. Clin. Microbiol.*, 1988; 26: 1695–1703
- [32] Brenner D.J., Steigerwalt A.G., McDade J.E.: Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. *Ann. Intern. Med.*, 1979; 90: 656–658
- [33] Butler C.A., Benson R.F., Drozanski W.J., Rowbotham T.J., Bialkowska I., Losos D.: Pneumonia associated with *Legionella*-like amoebal pathogen [LLAP] infection. Patient characteristics and clinical manifestation. *Proceedings of the 35th Interscience Conference on Antimicrobial Agent and Chemotherapy*. Amer. Soc. Microbiol. San Francisco, California, USA, 1995, abstr. K-61
- [34] Byrne B., Swanson M.S.: Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. *Infect. Immun.*, 1998; 66: 3029–3034
- [35] Chang K.P.: *Leishmania donovani*: promastigote-macrophage surface interactions *in vitro*. *Exp. Parasitol.*, 1979; 48: 175–189
- [36] Christie P.J., Vogel J.P.: Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol.*, 2000; 8: 354–360
- [37] Cianciotto N.P., Bangsberg J.M., Eisenstein B.I., Engleberg N.C.: Identification of mip-like genes in the genus *Legionella*. *Infect. Immun.*, 1990; 58: 2912–2918
- [38] Cianciotto N.P., Eisenstein B.I., Mody C.H., Toews G.B., Engleberg N.C.: A *Legionella pneumophila* gene encoding a species-specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection. *Infect. Immun.*, 1989; 57: 1255–1262
- [39] Cianciotto N.P., Fields B.S.: *Legionella pneumophila* *mip* gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992; 89: 5188–5191
- [40] Cirillo J.D., Cirillo S.L., Yan L., Bermudez L.E., Falkow S., Tompkins L.S.: Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.*, 1999; 67: 4427–4434
- [41] Cirillo J.D., Falkow S., Tompkins L.S.: Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect. Immun.*, 1994; 62: 3254–3261
- [42] Clemens D.L., Horwitz M.A.: Membrane sorting during phagocytosis: selective exclusion of major histocompatibility complex molecules but not complement receptor CR3 during conventional and coiling phagocytosis. *J. Exp. Med.*, 1992; 175: 1317–1326

- [43] Clemens D.L., Lee B.Y., Horwitz M.A.: Deviant expression of Rab5 on phagosomes containing the intracellular pathogens *Mycobacterium tuberculosis* and *Legionella pneumophila* is associated with altered phagosomal fate. *Infect. Immun.*, 2000; 68: 2671–2684
- [44] Coers J., Kagan J.C., Matthews M., Nagai H., Zuckman D.M., Roy C.R.: Identification of Icm protein complexes that play distinct roles in the biogenesis of an organelle permissive for *Legionella pneumophila* intracellular growth. *Mol. Microbiol.*, 2000; 38: 719–736
- [45] Coers J., Monahan C., Roy C.R.: Modulation of phagosome biogenesis by *Legionella pneumophila* creates an organelle permissive for intracellular growth. *Nat. Cell Biol.*, 1999; 1: 451–453
- [46] Conover G.M., Derre I., Vogel J.P., Isberg R.R.: The *Legionella pneumophila* LidA protein: a translocated substrate of the Dot/Icm system associated with maintenance of bacterial integrity. *Mol. Microbiol.*, 2003; 48: 305–321
- [47] Costa S.F., Newbaer M., Santos C.R., Basso M., Soares I., Levin A.S.: Nosocomial pneumonia: importance of recognition of aetiological agents to define an appropriate initial empirical therapy. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2001; 17: 147–150
- [48] De Schrijver K., Dirven K., Van Bouwel K., Mortelmans L., Van Rossom P., De Beukelaar T., Vael C., Fajo M., Ronveaux O., Peeters M.F., Van der Zee A., Bergmans A., Leven M., Goossens H.: An outbreak of Legionnaire's disease among visitors to a fair in Belgium in 1999. *Public Health*, 2003; 117: 117–124
- [49] Den Boer J.W., Yzerman E.P., Schellekens J., Lettinga K.D., Boshuizen H.C., Van Steenberghe J.E., Bosman A., Van den Hof S., Van Vliet H.A., Peeters M.F., Van Ketel R.J., Speelman P., Kool J.L., Conyn-Van Spaendonck M.A.: A large outbreak of Legionnaires' disease at a flower show, the Netherlands, 1999. *Emerg. Infect. Dis.*, 2002; 8: 37–43
- [50] Derre I., Isberg R.R.: *Legionella pneumophila* replication vacuole formation involves rapid recruitment of proteins of the early secretory system. *Infect. Immun.*, 2004; 72: 3048–3053
- [51] Dietrich C., Heuner K., Brand B.C., Hacker J., Steinert M.: Flagellum of *Legionella pneumophila* positively affects the early phase of infection of eukaryotic host cells. *Infect. Immun.*, 2001; 69: 2116–2122
- [52] Dorn B.R., Dunn W.A.Jr., Progluske-Fox A.: Bacterial interactions with the autophagic pathway. *Cell. Microbiol.*, 2002; 4: 1–10
- [53] Doyle R.M., Steele T.W., McLennan A.M., Parkinson I.H., Manning P.A., Heuzenroeder M.W.: Sequence analysis of the mip gene of the soilborne pathogen *Legionella longbeachae*. *Infect. Immun.*, 1998; 66: 1492–1499
- [54] Drożański W.: Observation on the intracellular infection of amoebae by bacteria. *Acta Microbiol. Polon.*, 1963; 12: 9–24
- [55] Drożański W.: Fatal bacterial infection of small free-living amoebae and related organisms. *Eucarya Medica. Inter. Congress*, 1965; 91: 321–330
- [56] Drożański W., Chmielewski T.: Electron microscopic studies of *Acanthamoeba castellanii* infected with obligate intracellular bacterial parasite. *Acta Microbiol. Pol.*, 1979; 28: 123–133
- [57] Edelstein P.H., Edelstein M.A., Higa F., Falkow S.: Discovery of virulence genes of *Legionella pneumophila* by using signature tagged mutagenesis in a guinea pig pneumonia model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96: 8190–8195
- [58] Elliott J.A., Johnson W.: Immunological and biochemical relationships among flagella isolated from *Legionella pneumophila* serogroups 1, 2, and 3. *Infect. Immun.*, 1981; 33: 602–610
- [59] Engleberg N.C., Carter C., Weber D.R., Cianciotto N.P., Eisenstein B.I.: DNA sequence of *mip*, a *Legionella pneumophila* gene associated with macrophage infectivity. *Infect. Immun.*, 1989; 57: 1263–1270
- [60] Fang G.D., 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., Brachman P.S., Vickers R.M.: New and emerging etiologies for community-acquired pneumonia with implications for therapy. A prospective multicenter study of 359 cases. *Medicine*, 1990; 69: 307–316
- [61] Faulkner G., Garduno R.A.: Ultrastructural analysis of differentiation in *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.*, 2002; 184: 7025–7041
- [62] Feeley J.C., Gorman G.W., Weaver R.E., Mackel D.C., Smith H.W.: Primary isolation media for Legionnaires disease bacterium. *J. Clin. Microbiol.*, 1978; 8: 320–325
- [63] Feng Y., Press B., Wandinger-Ness A.: Rab7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J. Cell Biol.*, 1995; 131: 1435–1452
- [64] Fettes P.S., Forsbach-Birk V., Lynch D., Marre R.: Overexpression of a *Legionella pneumophila* homologue of the *E. coli* regulator *csrA* affects cell size, flagellation, and pigmentation. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2001; 291: 353–360
- [65] Fields B.S.: The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol.* 1996, 4, 286–290
- [66] Fields B.S.: Legionellae and Legionnaires' disease. *Manual of Environmental Microbiology*. Ed. Hurst C. J., red.: American Society for Microbiology Press, Washington D. C., 1997, 666–675
- [67] Fields B.S., Barbaree J.M., Sanden G.N., Morrill W.E.: Virulence of a *Legionella anisa* strain associated with Pontiac fever: an evaluation using protozoan, cell culture, and guinea pig models. *Infect. Immun.*, 1990; 58: 3139–3142
- [68] Fields B.S., Benson R.F., Besser R.E.: Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2002; 15: 506–526
- [69] Fischer G., Bang H., Ludwig B., Mann K., Hacker J.: Mip protein of *Legionella pneumophila* exhibits peptidyl-prolyl-*cis-trans* isomerase (PPIase) activity. *Mol. Microbiol.*, 1992; 6: 1375–1383
- [70] Flioger A., Gong S., Faigle M., Deeg M., Bartmann P., Neumeister B.: Novel phospholipase A activity secreted by Legionella species. *J. Bacteriol.*, 2000; 182: 1321–1327
- [71] Flioger A., Gong S., Faigle M., Mayer H., Kehrer U., Mussotter J., Bartmann P., Neumeister B.: Phospholipase A secreted by *Legionella pneumophila* destroys alveolar surfactant phospholipids. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2000; 188: 129–133
- [72] Flioger A., Gong S., Faigle M., Stevanovic S., Cianciotto N.P., Neumeister B.: Novel lysophospholipase A secreted by Legionella pneumophila. *J. Bacteriol.*, 2001; 183: 2121–2124
- [73] Fox K.F., Brown A.: Properties of the genus *Tatlockia*. Differentiation of *Tatlockia (Legionella) maceachernii* and *micdadei* from each other and from other legionellae. *Can. J. Microbiol.*, 1993; 39: 486–491
- [74] 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., Brachman P.S.: Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N. Engl. J. Med.*, 1977; 297: 1189–1197
- [75] Fry N.K., Warwick S., Saunders N.A., Embley T.M.: The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family *Legionellaceae*. *J. Gen. Microbiol.*, 1991; 137: 1215–1222
- [76] Gao L.Y., Stone B.J., Brieland J.K., Abu Kwaik Y.: Different fates of *Legionella pneumophila* pmi and mil mutants within macrophages and alveolar epithelial cells. *Microb. Pathog.*, 1998; 25: 291–306
- [77] Garcia-Fulgueiras A., Navarro C., Fenoll D., Garcia J., Gonzales-Diego P., Jimenez-Bunuelas T., Rodriguez M., Lopez R., Pacheco F., Ruiz J., Segovia M., Balandron B., Pelaz C.: Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain. *Emerg. Infect. Dis.*, 2003; 9: 915–921
- [78] Garduño R.A., Faulkner G., Trevors M.A., Vats N., Hoffman P.S.: Immunolocalization of Hsp60 in *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.*, 1998; 180: 505–513
- [79] Garduño R.A., Garduño E., Hoffman P.S.: Surface-associated Hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model. *Infect. Immun.*, 1998; 66: 4602–4610
- [80] Garduno R.A., Garduno E., Hiltz M., Hoffman P.S.: Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms. *Infect. Immun.*, 2002; 70: 6273–6283
- [81] Garrity G.M., Brown A., Vickers R.M.: *Tatlockia* and *Fluoribacter* two new genera of organisms resembling *Legionella pneumophila*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1980; 30: 609–614
- [82] Gibson F.C. III, Tzianabos A.O., Rodgers F.G.: Adherence of Legionella pneumophila to U-937 cells, guinea-pig alveolar macrophages, and MRC-5 cells by a novel, complement-independent binding mechanism. *Can. J. Microbiol.*, 1994; 40: 865–872
- [83] Greub G., Raoult D.: Parachlamydiaceae: potential emerging pathogens. *Emerg. Infect. Dis.*, 2002; 8: 625–630
- [84] Greub G., Raoult D.: Morphology of *Legionella pneumophila* according to their location within Hartmanella vermiformis. *Res. Microbiol.*, 2003; 154: 619–621
- [85] Hales L.M., Shuman H.A.: The *Legionella pneumophila rpoS* gene is required for growth within *Acanthamoeba castellanii*. *J. Bacteriol.*, 1999; 181: 4879–4889
- [86] Hammer B.K., Swanson M.S.: Co-ordination of *Legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp. *Mol. Microbiol.*, 1999; 33: 721–731
- [87] Hammer B.K., Tateda E.S., Swanson M.S.: A two-component regulator induces the transmission phenotype of stationary-phase *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.*, 2002; 44: 107–118
- [88] Harb O.S., Venkataraman C., Haack B.J., Gao L.Y., Abu Kwaik Y.: Heterogeneity in the attachment and uptake mechanisms of the Legionnaires' disease bacterium, *Legionella pneumophila*, by protozoan hosts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998; 64: 126–132

- [89] Heuner K., Dietrich C., Sriwan C., Steinert M., Hacker J.: Influence of the alternative σ^{28} factor on virulence and flagellum expression of *Legionella pneumophila*. Infect. Immun., 2002; 70: 1604–1608
- [90] Hiltz M.F., Sisson G.R., Brassinga A.K., Garduno E., Garduno R.A., Hoffman P.S.: Expression of magA in *Legionella pneumophila* Philadelphia-1 is developmentally regulated and a marker of formation of mature intracellular forms. J. Bacteriol., 2004; 186: 3038–3045
- [91] Hoffman P.S., Butler C.A., Quinn F.D.: Cloning and temperature-dependent expression in *Escherichia coli* of a *Legionella pneumophila* gene coding a genus-common 60-kilodalton antigen. Infect. Immun., 1989; 57: 1731–1739
- [92] Hoffman P.S., Houston L., Butler C.A.: *Legionella pneumophila* htpAB heat shock operon: nucleotide sequence and expression of the 60-kilodalton antigen in *L. pneumophila*-infected HeLa cells. Infect. Immun., 1990; 58: 3380–3387
- [93] Hoffman P.S., Ripley M., Weeratna R.: Cloning and nucleotide sequence of a gene (ompS) encoding the major outer membrane protein of *Legionella pneumophila*. J. Bacteriol., 1992; 174: 914–920
- [94] Hookey J.V., Birtles R.J., Saunders N.A.: Intergenic 16S rRNA gene (rDNA)-23 rDNA sequence length polymorphisms in members of the family *Legionellaceae*. J. Clin. Microbiol., 1995; 33: 2377–2381
- [95] Hookey J.K., Saunders N.A., Fry N.K., Birtles R.J., Harrison T.G.: Phylogeny of *Legionellaceae* based small-subunit ribosomal DNA sequences and proposal of *Legionella lytica* comb. nov. for *Legionella*-like amoebal pathogens. Int. J. Syst. Bacteriol., 1996; 46: 526–531
- [96] Horne S.M., Young D.: *Escherichia coli* and other species of the *Enterobacteriaceae* encode a protein similar to the family of Mip-like FK506-binding proteins. Arch. Microbiol., 1995; 163: 357–365
- [97] Horwitz M.A.: The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. J. Exp. Med., 1983; 158: 2108–2126
- [98] Horwitz M.A.: Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. J. Exp. Med., 1983; 158: 1319–1331
- [99] Horwitz M.A.: Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. Cell, 1984; 36: 27–33
- [100] Horwitz M.A., Maxfield F.R.: *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. J. Cell Biol., 1984; 99: 1936–1943
- [101] Jacobi S., Schade R., Heuner K.: Characterization of the alternative sigma factor σ^{54} and the transcriptional regulator FleQ of *Legionella pneumophila*, which are both involved in the regulation cascade of flagellar gene expression. J. Bacteriol., 2004; 186: 2540–2547
- [102] James B.W., Mauchline W.S., Dennis P.J., Keevil C.W., Wait R.: Poly-3-hydroxybutyrate in *Legionella pneumophila*, an energy source for survival in low-nutrient environments. Appl. Environ. Microbiol., 1999; 65: 822–827
- [103] Joseph C.A.: Legionnaires' disease in Europe 2000–2002. Epidemiol. Infect., 2004; 132: 417–424
- [104] Joshi A.D., Sturgill-Koszycki S., Swanson M.S.: Evidence that Dot-dependent and -independent factors isolate the *Legionella pneumophila* phagosome from the endocytic network in mouse macrophages. Cell. Microbiol., 2001; 3: 99–114
- [105] Joshi A.D., Swanson M.S.: Comparative analysis of *Legionella pneumophila* and *Legionella micdadei* virulence traits. Infect. Immun., 1999; 67: 4134–4142
- [106] Keen M.G., Hoffman P.S.: Characterization of a *Legionella pneumophila* extracellular protease exhibiting hemolytic and cytotoxic activities. Infect. Immun., 1989; 57: 732–738
- [107] Kirby J.E., Isberg R.R.: Legionnaires' disease: the pore macrophage and the legion of terror within. Trends Microbiol., 1998; 6: 256–258
- [108] Kirby J.E., Vogel J.P., Andrews H.L., Isberg R.R.: Evidence for pore-forming ability by *Legionella pneumophila*. Mol. Microbiol., 1998; 27: 323–336
- [109] Ko K.S., Hong S.K., Lee H.K., Park M.Y., Kook Y.H.: Molecular evolution of the dotA gene in *Legionella pneumophila*. J. Bacteriol., 2003; 185: 6269–6277
- [110] Köhler R., Fanghänel J., König B., Lüneberg E., Frosch M., Rahfeld J.U., Hilgenfeld R., Fischer G., Hacker J., Steinert M.: Biochemical and functional analyses of the Mip protein: influence of the N-terminal half and of peptidylprolyl isomerase activity on the virulence of *Legionella pneumophila*. Infect. Immun., 2003; 71: 4389–4397
- [111] Krinos C., High A.S., Rodgers F.G.: Role of the 25 kDa major outer membrane protein of *Legionella pneumophila* in attachment to U-937 cells and its potential as a virulence factor for chick embryos. J. Appl. Microbiol., 1999; 86: 237–244
- [112] La Scola B., Birtles R.J., Greub G., Harrison T.J., Ratcliff R.M., Raoult D.: *Legionella drancourtii* sp. nov., a strictly intracellular amoebal pathogen. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2004; 54: 699–703
- [113] Lee J.V., West A.A.: Survival and growth of *Legionella species* in the environment. Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser., 1991; 20: 121S–129S
- [114] Lundemose A.G., Birkelund S., Fey S.J., Larsen P.M., Christiansen G.: *Chlamydia trachomatis* contains a protein similar to the *Legionella pneumophila* mip gene product. Mol. Microbiol., 1991; 5: 109–115
- [115] Lynch D., Fieser N., Glogglar K., Forsbach-Birk V., Marre R.: The response regulator LetA regulates the stationary-phase stress response in *Legionella pneumophila* and is required for efficient infection of *Acanthamoeba castellanii*. FEMS Microbiol. Lett., 2003; 219: 241–248
- [116] Manz W., Amann R., Szewzyk R., Szewzyk U., Stenstrom T.A., Hutzler R., Schleifer K.H.: In situ identification of *Legionellaceae* using 16S rRNA targeted oligonucleotide probes and microscopy. Microbiology, 1995; 141: 29–39
- [117] Marra A., Blander S.J., Horwitz M.A., Shuman H.A.: Identification of a *Legionella pneumophila* locus required for intracellular multiplication in human macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992; 89: 9607–9611
- [118] Marston B.J., Plouffe J.F., File T.M.Jr., Hackman B.A., Salstrom S.J., Lipman H.B., Kolczak M.S., Breiman R.F.: Incidence of community-acquired pneumonia requiring hospitalization. Results of a population-based active surveillance study in Ohio. The Community-Based Pneumonia Incidence Study Group. Arch. Intern. Med., 1997; 157: 1709–1718
- [119] Martinelli F., Caruso A., Moschini L., Turano A., Scarcella C., Speziani F.: A comparison of *Legionella pneumophila* occurrence in hot water tanks and instantaneous devices in domestic, nosocomial, and community environments. Curr. Microbiol., 2000; 41: 374–376
- [120] Maruta K., Ogawa M., Miyamoto H., Izu K., Yoshida S.I.: Entry and intracellular localization of *Legionella dumoffii* in Vero cells. Microb. Pathog., 1998; 24: 65–73
- [121] Matthews M., Roy C.R.: Identification and subcellular localization of the *Legionella pneumophila* lcmX protein: a factor essential for establishment of a replicative organelle in eukaryotic host cells. Infect. Immun., 2000; 68: 3971–3982
- [122] McDade J.E., Shepard C.C., Fraser D.W., Tsai T.R., Redus M.A., Dowdle W.R.: Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. N. Engl. J. Med., 1977; 297: 1197–1203
- [123] McNally C., Hackman B., Fields B.S., Plouffe J.F.: Potential importance of *Legionella species* as etiologies in community acquired pneumonia (CAP). Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 2000; 38: 79–82
- [124] Michel R., Müller K.D., Amann R., Schmid E.N.: *Legionella*-like slender rods multiplying within a strain of *Acanthamoeba sp.* isolated from drinking water. Parasitol. Res., 1998; 84: 84–88
- [125] Mo Y.Y., Cianciotto N.P., Mallavia L.P.: Molecular cloning of a *Coxiella burnetii* gene encoding a macrophage infectivity potentiator (Mip) analogue. Microbiology, 1995; 141: 2861–2871
- [126] Molmeret M., Abu Kwaik Y.: How does *Legionella pneumophila* exit the host cell? Trends Microbiol., 2002; 10: 258–260
- [127] Molmeret M., Alli O.A., Zink S., Flieger A., Cianciotto N.P., Abu Kwaik Y.: icm T is essential for pore formation-mediated egress of *Legionella pneumophila* from mammalian and protozoan cells. Infect. Immun., 2002; 70: 69–78
- [128] Molmeret M., Bitar D.M., Han L., Abu Kwaik Y.: Cell biology of the intracellular infection by *Legionella pneumophila*. Microbes Infect., 2004; 6: 129–139
- [129] Molofsky A.B., Swanson M.S.: *Legionella pneumophila* CsrA is a pivotal repressor of transmission traits and activator of replication. Mol. Microbiol., 2003; 50: 445–461
- [130] Molofsky A.B., Swanson M.S.: Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. Mol. Microbiol., 2004; 53: 29–40
- [131] Moro A., Ruiz-Cabello F., Fernandez-Cano A., Stock R.P., Gonzalez A.: Secretion by Trypanosoma cruzi of a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase involved in cell infection. EMBO J., 1995; 14: 2483–2490
- [132] Muller A., Hacker J., Brand B.C.: Evidence for apoptosis of human macrophage-like HL-60 cells by *Legionella pneumophila* infection. Infect. Immun., 1996; 64: 4900–4906
- [133] Murga R., Forster T.S., Brown E., Pruckler J.M., Fields B.S., Donlan R.M.: Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. Microbiology, 2001; 147: 3121–3126

- [134] Nagai H., Kagan J.C., Zhu X., Kahn R.A., Roy C.R.: A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on *Legionella* phagosomes. *Science*, 2002; 295: 679–682
- [135] Nagai H., Roy C.R.: The DotA protein from *Legionella pneumophila* is secreted by a novel process that requires the Dot/Icm transporter. *EMBO J.*, 2001; 20: 5962–5970
- [136] Nahapetian K., Challemel O., Beurtin D., Dubrou S., Gounon P., Squinazi F.: The intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in protozoa from hospital plumbing systems. *Res. Microbiol.*, 1991; 142: 677–685
- [137] Neumeister B., Reiff G., Faigle M., Dietz K., Northoff H., Lang F.: Influence of *Acanthamoeba castellanii* on intracellular growth of different *Legionella* species in human monocytes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000; 66: 914–919
- [138] Newsome A.L., Scott T.M., Benson R.F., Fields B.S.: Isolation of amoeba naturally harboring a distinctive *Legionella* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998; 64: 1688–1693
- [139] Ott M., Messner P., Heesemann J., Marre R., Hacker J.: Temperature-dependent expression of flagella in *Legionella*. *J. Gen. Microbiol.*, 1991; 137: 1955–1961
- [140] Paszko-Kolva C.M., Shahamat M., Colwell R.R.: Long term survival of *Legionella pneumophila* serogroup: under low-nutrient conditions and associated morphological changes. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1992; 102: 45–55
- [141] Payne N.R., Horwitz M.A.: Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptor. *J. Exp. Med.*, 1987; 166: 1377–1389
- [142] Purcell M., Shuman H.A.: The *Legionella pneumophila* icmGCDJBF genes are required for killing of human macrophages. *Infect. Immun.*, 1998; 66: 2245–2255
- [143] Ratcliff R.M., Donnellan S.C., Lanser J.A., Manning P.A., Heuzenroeder M.W.: Interspecies sequence differences in the Mip protein from the genus *Legionella*: implications for function and evolutionary relatedness. *Mol. Microbiol.*, 1997; 25: 1149–1158
- [144] Ratcliff R.M., Lanser J.A., Manning P.A., Heuzenroeder M.W.: Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the *mip* gene. *J. Clin. Microbiol.*, 1998; 36: 1560–1567
- [145] Rechnitzer C., Blom J.: Engulfment of the Philadelphia strain of *Legionella pneumophila* within pseudopod coils in human phagocytes. Comparison with the other *Legionella* strains and species. *APMIS*, 1989; 97: 105–114
- [146] Ristroph J.D., Hedlund K.W., Gowda S.: Chemically defined medium for *Legionella pneumophila* growth. *J. Clin. Microbiol.*, 1981; 13: 115–119
- [147] Rittig M.G., Burmester G.R., Krause A.: Coiling phagocytosis: when the zipper jams, the cup is deformed. *Trends Microbiol.*, 1998; 6: 384–88
- [148] Rittig M.G., Schroppel K., Seack K.H., Sander U., N'Diaye E.N., Maridonneau-Parini I., Solbach W., Bogdan C.: *Coiling phagocytosis* of trypanosomatids and fungal cells. *Infect. Immun.*, 1998; 66: 4331–39
- [149] Rockey D.D., Chesebro B.B., Heinzen R.A., Hackstadt T.: A 28 kDa major immunogen of *Chlamydia psittaci* shares identity with Mip proteins of *Legionella* spp. and *Chlamydia trachomatis* – cloning and characterization of the *C. psittaci* *mip*-like gene. *Microbiology*, 1996; 142: 945–953
- [150] Romeo T.: Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol. Microbiol.*, 1998; 29: 1321–1330
- [151] Rowbotham T.J.: Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J. Clin. Pathol.*, 1980; 33: 1179–1183
- [152] Rowbotham T.J.: Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man. *Isr. J. Med. Sci.*, 1986; 22: 678–689
- [153] Roy C.R., Berger K.H., Isberg R.R.: *Legionella pneumophila* DotA protein is required for early phagosome trafficking decisions that occur within minutes of bacterial uptake. *Mol. Microbiol.*, 1998; 28: 663–674
- [154] Roy C.R., Isberg R.R.: Topology of *Legionella pneumophila* DotA: an inner membrane protein required for replication in macrophages. *Infect. Immun.*, 1997; 65: 571–578
- [155] Schofield G.M., Locci R.: The persistence of *Legionella pneumophila* in non-sterile, sterile and artificial hard waters and their growth pattern on tap washer fittings. *J. Appl. Bacteriol.*, 1985; 59: 519–527
- [156] Segal G., Feldman M., Zusman T.: The Icm/Dot type-IV secretion systems of *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2005; 29: 65–81
- [157] Segal G., Purcell M., Shuman H.A.: 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*, 1998; 95: 1669–1674
- [158] Segal G., Russo J.J., Shuman H.A.: Relationships between a new type IV secretion system and the *icmldot* virulence system of *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.*, 1999; 34: 799–809
- [159] Segal G., Shuman H.A.: Characterization of a new region required for macrophage killing by *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.*, 1997; 65: 5057–5066
- [160] Segal G., Shuman H.A.: How is the intracellular fate of the *Legionella pneumophila* phagosome determined?: *Trends Microbiol.*, 1998; 6: 253–255
- [161] Segal G., Shuman H.A.: *Legionella pneumophila* utilizes the same genes to multiply within *Acanthamoeba castellanii* and human macrophages. *Infect. Immun.*, 1999; 67: 2117–2124
- [162] Soldati T., Rancano C., Geissler H., Pfeffer S.R.: Rab7 and Rab9 are recruited onto late endosomes by biochemically distinguishable processes. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 25541–25548
- [163] Statistical abstract of the U.S., 108 ed. U.S. Depart. of Commerce Bureau of Census, Washington 1988
- [164] Steinert M., Emödy L., Amann R., Hacker J.: Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997; 63: 2047–2053
- [165] Steinert M., Engelhard H., Flugel M., Wintermeyer E., Hacker J.: The Lly protein protects *Legionella pneumophila* from light but does not directly influence its intracellular survival in *Hartmannella vermiformis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995; 61: 2428–2430
- [166] Stone B.J., Abu Kwaik Y.: Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infect. Immun.*, 1998; 66: 1768–1775
- [167] Sturgill-Koszycki S., Swanson M.S.: *Legionella pneumophila* replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. *J. Exp. Med.*, 2000; 192: 1261–1272
- [168] Stypułkowska-Misiurewicz H., Pancer K.: Legionelloza w Polsce w latach 2001–2002 na tle sytuacji epidemiologicznej w Europie. *Przegl. Epidemiol.*, 2003; 57: 599–606
- [169] Swanson M.S., Hammer B.K.: *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2000; 54: 567–613
- [170] Swanson M.S., Isberg R.R.: Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic reticulum. *Infect Immun.*, 1995; 63: 3609–3620
- [171] Swanson M.S., Isberg R.R.: Identification of *Legionella pneumophila* mutants that have aberrant intracellular fates. *Infect. Immun.*, 1996; 64: 2585–2594
- [172] Tang P., Krishnan M.: *Legionellosis* in Ontario Canada. Laboratory aspect. *Legionella*: Current status and emerging perspectives, red.: Barbaree J.M., Breiman R.F., Dufour A.P. American Society for Microbiology Press, Washington D. C., 1993, 163–168
- [173] Tompkins L.S., Loutit J.S.: Detection of *Legionella* by molecular methods. *Legionella*: Current status and emerging perspectives red.: Barbaree J.M., Breiman R.F., Dufour A.P. American Society for Microbiology Press, Washington D.C., 1993, 163–168
- [174] Venkataraman C., Haack B.J., Bondada S., Abu Kwaik Y.: Identification of a Gal/GalNAc lectin in the protozoan *Hartmannella vermiformis* as a potential receptor for attachment and invasion by the Legionnaires' disease bacterium. *J. Exp. Med.*, 1997; 186: 537–547
- [175] Vogel J.P., Andrews H.L., Wong S.K., Isberg R.R.: Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science*, 1998; 279: 873–876
- [176] Warren W.J., Miller R.D.: Growth of Legionnaires disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in chemically defined medium. *J. Clin. Microbiol.*, 1979; 10: 50–55
- [177] Watarai M., Andrews H.L., Isberg R.R.: Formation of a fibrous structure on the surface of *Legionella pneumophila* associated with exposure of DotH and DotO proteins after intracellular growth. *Mol. Microbiol.*, 2001; 39: 313–329
- [178] Wiater L.A., Dunn K., Maxfield F.R., Shuman H.A.: Early events in phagosome establishment are required for intracellular survival of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.*, 1998; 66: 4450–4460
- [179] Wiater L.A., Sadosky A.B., Shuman H.A.: Mutagenesis of *Legionella pneumophila* using Tn903 dIIacZ: identification of a growth-phase-regulated pigmentation gene. *Mol. Microbiol.*, 1994; 11: 641–653

- [180] Wieland H., Faigle M., Lang F., Northoff H., Neumeister B.: Regulation of the *Legionella mip*-promotor during infection of human monocytes. FEMS Microbiol. Lett., 2002; 212: 127–132
- [181] Wieland H., Goetz F., Neumeister B.: Phagosomal acidification is not a prerequisite for intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in human monocytes. J. Infect. Dis., 2004; 189:1610–1614
- [182] Wintermeyer E., Flugel M., Ott M., Steinert M., Rdest U., Mann K.H., Hacker J.: Sequence determination and mutational analysis of the *lly* locus of *Legionella pneumophila*. Infect. Immun., 1994; 62: 1109–1117
- [183] Wintermeyer E., Rdest U., Ludwig B., Debes A., Hacker J.: Characterization of legiolysin (*lly*), responsible for haemolytic activity, colour production and fluorescence of *Legionella pneumophila*. Mol. Microbiol., 1991; 5: 1135–1143
- [184] Yamamoto H., Sugiura M., Kusunoki S., Ezaki T., Ikeda M., Yabuuchi E.: Factors stimulating propagation of *Legionellae* in cooling tower water. Appl. Environ. Microbiol., 1992; 58: 1394–1397
- [185] Zähringer U., Knirel Y.A., Lindner B., Helbig J.H., Sonesson A., Marre R., Rietschel E.T.: The lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1 (strain Philadelphia 1): chemical structure and biological significance. Prog. Clin. Biol. Res., 1995; 392: 113–139
- [186] Zusman T., Gal-Mor O., Segal G.: Characterization of a *Legionella pneumophila* *relA* insertion mutant and roles of RelA and RpoS in virulence gene expression. J. Bacteriol., 2002; 184: 67–75
- [187] Zusman T., Yerushalmi G., Segal G.: Functional similarities between the *icm/dot* pathogenesis systems of *Coxiella burnetii* and *Legionella pneumophila*. Infect. Immun., 2003; 71: 3714–3723