

**Untersuchungen zum Invasionsweg und zum Wirtsspektrum
bei freilebenden Amöben:**

**Ein aus *Vannella* sp. isolierter Mikrosporidien-ähnlicher
Endozytobiont als intranukleärer Endoparasit**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Patrick Leander Scheid

aus St. Wendel

Mai 2007

Aus dem Institut für Zoomorphologie Zellbiologie und Parasitologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. H. Mehlhorn

Koreferent: Prof. Dr. A. Harder

Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2007

Danksagung

Herrn Professor Dr. Heinz Mehlhorn danke ich für das Interesse am Thema und für die Möglichkeit dieses Thema im Rahmen der Dissertation bearbeiten zu dürfen.

Herrn Professor Dr. Lothar Zöller danke ich für seine äußerst konstruktive Kritik während der Genese des Manuskripts und für alle Tipps und Anregungen.

Für die hervorragende Arbeit im Zuge der elektronenmikroskopischen Aufnahmen danke ich Frau Gerhild Gmeiner aus der Laborgruppe Elektronenmikroskopie.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Lehrer und Mentor, Herrn Dr. Rolf Michel, für die maßgebliche Begleitung der Arbeit, die ständige Diskussionsbereitschaft und den kontinuierlichen Ansporn im Rahmen der einzelnen wissenschaftlichen Teilaspekte der vorliegenden Untersuchung.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Bedeutung freilebender Amöben.....	1
1.1.1	Freilebende Amöben als Krankheitserreger.....	2
1.1.2	Freilebende Amöben als Wirte und Vehikel für Bakterien und andere Mikroorganismen.....	5
1.1.3	Schutz der Endozytobionten durch die Wirtsamöben.....	9
1.1.4	Die Wirtsamöben: <i>Vannella</i> sp.....	10
1.1.5	Mikrosporidien als Endoparasiten.....	12
1.1.6	Fallbericht und initiale Untersuchungen.....	17
1.1.7	Fragestellungen der Arbeit.....	18
2.	Material und Methoden	20
2.1	Untersuchung zum Infektionsweg.....	20
2.1.1	Kulturrhaltung und Passagierung; Anzucht, Isolierung und Determinierung von freilebenden Amöben.....	20
2.1.2	Überimpfen der infektiösen Endozytobionten zur Sporengewinnung.....	21
2.1.3	Lichtmikroskopische Untersuchungen zum Invasionsweg der Endozytobionten.....	21
2.2	Nachweis der kokkoiden Parasitenstadien mittels Färbungen.....	21
2.3	Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen zur Untersuchung des Invasionsweges der Endozytobionten in die Wirtsamöben (<i>Vannellen</i>).....	26
2.3.1	Überimpfen der infektiösen Sporen (Sporengewinnung).....	27
2.3.2	Präparation der infizierten <i>Vannellen</i> und Gewinnung von Material für die Elektronenmikroskopie.....	27
2.4	Wirtsspektrumsversuche.....	28
2.5	Versuche zur Zeitdauer der Infektionsfähigkeit der Sporen.....	32
3.	Ergebnisse	33
3.1	Untersuchungen zum Infektionsweg von KAun1 in die Wirtsamöben.....	33
3.1.1	Initiale lichtmikroskopische Beobachtungen.....	33
3.1.2	Nachweis der kokkoiden Parasitenstadien mittels Färbungen.....	36
3.1.2.1	Calcofluor-Färbung.....	36
3.1.2.2	Gramfärbung.....	39
3.1.2.3	GIEMSA-Färbung.....	40
3.1.2.4	DiffQuick-Färbung.....	41
3.1.2.5	Kinyoun-Färbung (Tan-Thiam-Hok Verfahren).....	42
3.1.2.6	Trichromfärbung.....	43
3.1.2.7	Modifizierte Trichrom-Färbung.....	44
3.2	Invasionsweg der Endozytobionten / Endoparasiten in die Wirtsamöben (<i>Vannellen</i>): Lichtmikroskopische Ergebnisse.....	45
3.3	Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen zur Untersuchung des Invasionsweges der Endozytobionten in die Wirtsamöben (<i>Vannellen</i>).....	52
3.4	Zeitdauer der Infektionsfähigkeit der Sporen.....	74
3.5	Amöben als Wirtszellen von Mikrosporidien- ähnlichen Organismen; Evaluierung des Wirtsspektrums.....	74
3.5.1	Ergebnisse der Vorversuche.....	75

3.5.2	Ergebnisse der Wirtsspektrumsversuche mit FLA.....	76
3.5.2.1	FLA, bei denen keine Proliferation von KAun1 möglich war.....	77
3.5.2.2	FLA, bei denen die Proliferation von KAun1 erfolgte.....	79
3.5.2.3	FLA mit Besonderheiten während der Kokultivierung mit KAun1.....	94
3.5.3	Ergebnisse der Wirtsspektrumsversuche mit Zellkulturen.....	100
4.	Diskussion.....	104
4.1	Untersuchung des Infektionswegs des Mikrosporidien- ähnlichen Organismus „KAun1“ in die Wirtsamöben (<i>Vannella</i> sp., Stamm Aun0).....	104
4.2	Nachweis der kokkoiden Parasitenstadien mittels Färbungen.....	109
4.3	Taxonomische Zuordnung der Endozytobionten (Systematische Stellung).....	111
4.4	Zeitdauer der Infektionsfähigkeit der Sporen.....	114
4.5	Amöben als Wirtszellen von KAun1 – Wirtsspektrum.....	114
4.6	Bedeutung von Biofilmen für FLA und deren Endozytobionten.....	117
4.7	Beteiligung der Endozytobionten an der Pathogenese.....	121
5.	Ausblick.....	122
6.	Zusammenfassung.....	123
7.	Literaturverzeichnis.....	127
8.	Angaben zu vorpublizierten Ergebnissen.....	138
9.	Lebenslauf.....	139
10.	Erklärung.....	140

1. Einleitung

1.1 Bedeutung freilebender Amöben

Freilebende Nacktamöben (FLA) sind ubiquitär in vielen aquatischen Habitaten und feuchten Böden zu finden. Sie sind wesentliche Bestandteile von ökologischen Lebensgemeinschaften (Biozönosen) in verschiedenen Substraten. Der Mensch ist nahezu ständig in Kontakt mit den in der Umwelt vorkommenden FLA, unter denen es auch pathogene Arten bzw. Stämme gibt. Da FLA in erster Linie Substratbesiedler sind, ist die Vermehrung dieser heterotrophen Organismen an Substrate (Oberflächen und Sedimentablagerungen) sowie an das Vorkommen von geeigneten Nahrungsorganismen gebunden. FLA ernähren sich von Bakterien, Pilzen, Algen und Protozoen sowie je nach Art auch von kleineren Amöben. In der Rhizosphäre spielen sie eine Rolle beim Pflanzenwachstum aufgrund der Mineralisation von organischem Material (Banforth 1985). Einige Arten können sich wechselnden Umweltbedingungen gut anpassen und überleben in den verschiedensten Lebensräumen.

Insbesondere Biofilme dienen als Habitate, wobei die FLA aufgrund ihrer Adhäsivität für Oberflächen bereits bei deren Entstehung beteiligt sein können. Biofilme, die in der Regel zunächst aus oligotrophen Arten gebildet werden, stellen in einem nährstoffarmen System lokale Bereiche hoher Anreicherung von Biomasse dar. Amöben haben die Fähigkeit, die Produktivität von Biofilmen dadurch zu erhöhen, dass sie sich an Oberflächen adhären und extrazelluläre Matrixsubstanzen sowie metabolische Substanzen wie Glucopolysaccharide und Proteine abgeben (Khan und Panjwani 2000). Die FLA können die Dynamik in diesen Biofilmen durch Prädation und bestimmte Synergismen nachhaltig beeinflussen. In einer solchen Biozönose können sich in der Folge auch andere Organismen ansiedeln, darunter auch solche von hygienischer Relevanz. Beispiele für typische Biofilm-Bakterien sind Mykobakterien und Legionellen (Rogers und Keevil 1992).

Für diese und etliche weitere humanpathogene sowie apathogene Bakterien wurde eine intrazelluläre Vermehrung in FLA bereits nachgewiesen.

Solche Mikroorganismen, die an die intrazellulären Bedingungen in den Amöben angepasst sind, finden geeignete Wachstumsbedingungen, ggf. Schutz vor negativen Umwelteinflüssen und nutzen die Verbreitung in der Umwelt durch ihre Wirte.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Systematik der FLA lehnt sich an die Vorgaben der Standardwerke der Rhizopoden an (Page und Siemensma 1991; Mehlhorn und Ruthmann 1992). Der Übersicht halber sind in **Tab.1** nur diejenigen FLA angegeben, die auch in der vorliegenden Untersuchung Verwendung fanden bzw. näher beschrieben wurden.

Tab.1: Taxonomie der verwendeten bzw. näher beschriebenen FLA

Reich: Eucaryota

System: Protozoa (Kollektivbezeichnung)

Phylum: Heterolobosa

Klasse: Schizopyrenidea

 Ordnung: Schizopyrenida

 Familie: Vahlkampfiidae

 Gattung: *Vahlkampfia*

 Gattung: *Naegleria*

 Gattung: *Willaertia*

Phylum: Amoebozoa

Klasse: Lobosea

Unterklasse: Gymnamoebia

 Ordnung: Amoebida (Euamoebida)

 Familie: Hartmannellidae

 Gattung: *Hartmannella*

 Gattung: *Saccamoeba*

 Familie: Thecamoebidae

 Gattung *Thecamoeba*

 Familie: Vannellidae

 Gattung: *Vannella*

 Gattung: *Platyamoeba*

 Familie: Leptomyxiidae

 Gattung: *Balamuthia*

 Ordnung: Acanthopodida

 Familie: Acanthamoebidae

 Gattung: *Acanthamoeba*

1.1.1 Freilebende Amöben als Krankheitserreger

Seit Ende der 60er Jahre des letzten Jahrhunderts wurden in einer Reihe von Fällen bereits verschiedene Spezies von FLA als humanpathogene Organismen beschrieben.

Acanthamoeben

Acanthamoeben sind FLA, die in feuchter Erde (Culbertson 1971), Seen, Flüssen (Tsvetkova et al. 2004), Süßwasseransammlungen, auch in Brack- und Meerwasser sowie sonstigen künstlichen Gewässern, wie z.B. Schwimmbädern, Swimmingpools (Mergeryan 1991), zur Normalfauna gehören und sich von Bakterien und Pilzen in ihrem Umfeld ernähren.

Ihre Zysten können sogar in Staub überdauern. In Klimaanlageanlagen, Befeuchtungsanlagen, Trinkwasserleitungsnetzen (Seal et al. 1999), Mineralwasserflaschen (Penland und Wilhelmus 1999), Augenwaschstationen (Marciano-Cabral und Cabral 2003) sowie in wasserführenden Systemen von Dentaleinheiten bei Zahnärzten, Dialysemaschinen und Kontaktlinsenbehältern (Michel und Just 1984) wurden Acanthamoeben ebenfalls nachgewiesen. Sie können Nasenschleimhaut und Rachenraum von gesunden und von immunsupprimierten Personen besiedeln (Rivera et al. 1984).

Acanthamoeben können durch eine Wunde bzw. andere Läsionen in die Haut eindringen. Es kann eine Infektion der Lunge bzw. eine hämatogene Einschwemmung in andere Organe des Körpers, speziell des Zentralnervensystems erfolgen. Die Acanthamoeben sind dabei in der Lage, sehr gefährliche, meist tödlich verlaufende Infektionen hervorzurufen (Gardner et al. 1991), insbesondere die sog. Granulomatöse Amoebenenzephalitis (GAE). Die vorwiegend bei Patienten mit Immunschwäche auftretende GAE kann Monate lang andauern; auch chronische Verläufe sind beschrieben. Acanthamoeben können, anders als Naeglerien, im Gehirngewebe auch Zystenstadien ausbilden. Da hiervon in der Regel nur Patienten mit geschwächter Immunabwehr betroffen sind, gelten Acanthamoeben als Opportunisten – im Gegensatz zu Naeglerien (siehe unten). Die GAE ist, ebenfalls im Gegensatz zur Naeglerieninfektion, durch fokale, granuläre Gehirnläsionen charakterisiert.

Durch den unsachgemäßen Gebrauch bzw. unzureichende Desinfektion, vor allem von weichen Kontaktlinsen, können Acanthamoeben in die Augenhornhaut eindringen und sehr gefährliche Infektionen verursachen (Witschel et al. 1984). Mehrere Spezies wurden dabei bereits im Zusammenhang mit der Kontaktlinsen - assoziierten Acanthamoebenkeratitis beschrieben, so z.B. *Acanthamoeba castellanii*, *A. polyphaga*, *A. hachetti*, *A. culbertsoni*, *A. rhyssodes*, *A. griffini*, *A. quina*, *A. lugdunensis*, *A. lenticulata* und *A. royreba*.

Voraussetzung für eine Invasion der Kornea ist in der Regel eine Verletzung des Epithels. Der Kontakt erfolgt in kontaminiertem Wasser oder durch nicht ausreichend gereinigte (meist weiche) Kontaktlinsen. Die Trophozoiten der Acanthamoeben dringen in die Kornea, z.B. durch kleinste Läsionen, ein und verursachen eine Keratitis, die sich über Wochen und Monate langsam zur chronisch progressiven, ulzerativen Keratitis entwickelt. Die Fähigkeit von Acanthamoeben, sich an Kontaktlinsen zu adhären sowie der Immunantwort weitgehend zu entgehen, sind wichtige Faktoren in der Pathogenese einer Acanthamoebenkeratitis. Eine weitere Ausprägung der Acanthamoebeninfektion ist die kutane Acanthamoebiasis. Es handelt sich um eine granulomatöse, entzündliche Hautreaktion. Hiervon sind nicht nur immunkompromittierte Personen betroffen.

Ob die Hautläsionen eher den primären Infektionsfokus darstellen oder das Resultat der hämatogenen Streuung aus anderen Bereichen (z.B. Respirationstrakt, ZNS) sind, konnte bislang nicht geklärt werden.

Naeglerien

Die Primäre Amöben-Meningoenzephalitis (PAM(E)) wird nur durch die Art *Naegleria fowleri* bzw. unmittelbare Verwandte hervorgerufen. Die uneinheitlichen, akuten, oft fulminant verlaufenden Infektionen betreffen vor allem Kinder oder immunkompetente junge Erwachsene, die sich vorwiegend beim Schwimmen, Tauchen bzw. Baden in Süßwasser infiziert haben. Die Trophozoiten penetrieren die nasale Mucosa und wandern über die olfaktorischen Nerven in das Frontalhirn, wo sie sich vermehren, ohne jedoch Zysten zu bilden. Die Naeglerieninfektion ist als eine diffuse Meningoenzephalitis charakterisiert. Der Tod setzt gewöhnlich 72 Stunden nach dem Auftreten der ersten Symptome ein. Im Gehirn rufen die Naeglerien eine Entzündung sowie eine massive Gewebszerstörung hervor. Die cerebralen Hemisphären sind geschwollen und ödematös. Im Cortex finden sich viele fokale, superfizielle Haemorrhagien. Der Liquordruck kann erhöht sein; der Liquor erscheint hämorrhagisch und die Zellzahl ist bei fortgeschrittener Erkrankung deutlich erhöht. Die zytopathogenen Mechanismen von *N. fowleri* beinhalten Phagozytose (Trogozytose) sowie die Abgabe von zytolytischen Substanzen (Proteinasen). Naeglerien sind gegenüber den anderen FLA - und hier insbesondere gegenüber den ähnlichen Vahlkampffien - eindeutig durch den Flagellaten-Transformationstest zu unterscheiden. Naeglerienstämme wurden aus Wasseransammlungen o.ä. isoliert, wie z.B. nicht ausreichend gechlorten Schwimmbecken, Süßwasserbehältern, Industrieabwässern; Flüssen, Seen, Kühlwasser und Trinkwasserversorgungsleitungen (Ma et al. 1990). *Naegleria fowleri* ist thermophil, mit Vermehrung bis 45°C und kommt daher vornehmlich in natürlich oder künstlich erwärmten Gewässern vor (Walochnik et al. 2006).

Balamuthia mandrillaris

Die Erstisolierung von *Balamuthia mandrillaris* gelang 1990 aus dem Gehirn eines Mandrills aus dem San Diego Wildlife Park. Bislang sind zahlreiche Fälle einer *B. mandrillaris* – Infektion beim Menschen beschrieben, einige der belegten Fälle wurden initial als Acanthamoebenenzephalitis diagnostiziert (Martinez und Visvesvara 1991). *Balamuthia mandrillaris* wurde anfänglich als leptomyxide Amöbe bezeichnet. Molekularbiologische Untersuchungen haben jedoch ihre Verwandtschaft mit Acanthamoeben ergeben.

Heute gilt sie als weitere humanpathogene FLA, die das Zentralnervensystem befallen kann und bislang ausnahmslos zu tödlich verlaufenden Infektionen führte.

Die Fälle von GAE (Granulomatöse Amöbenenzephalitis), einer subakuten bis chronischen Infektion, weisen auf ein Vorkommen im menschlichen Umfeld hin, eine Hypothese, die durch den Nachweis von Antikörpern in der „normalen“ Human-Population noch gestärkt wird. Wie bei vielen anderen FLA können bei *B. mandrillaris* Trophozoiten und Zysten unterschieden werden. Bislang wurden weltweit über 100 *B. mandrillaris*-Infektionen berichtet, wobei im Gegensatz zu den Infektionen mit Acanthamoeben sowohl immunsupprimierte als auch immunkompetente Personen (insbesondere Kinder) betroffen waren (Gotuzzo et al. 2004). Die Symptomatik gleicht der durch Acanthamoeben verursachten GAE im Sinne einer fokalen granulomatösen Enzephalitis. Nach Aufnahme über den Respirationstrakt oder durch Hautverletzungen verbreitet sich der Erreger auf dem Blutweg oder via Nervus olfactorius (Kiderlen und Laube 2004 sowie Schuster et al. 2004). Zahlreiche Amöben infiltrieren das Gehirn und führen dort zu einer Amöben-Perivasculitis mit Thrombosen der Kapillaren und Mikroinfarkten der Hirnsubstanz. Die ökologische Nische des Erregers ist noch weitgehend unbekannt (Martinez und Visvesvara 2001), nur wenige Isolierungen aus der Umwelt liegen vor, obwohl man davon ausgeht, dass *B. mandrillaris* in Süßwasser bzw. feuchtem Boden ubiquitär vorkommt (Intalaporn et al. 2004).

Sappina diploidea wurde früher aus dem Kot verschiedener Tiere isoliert, in letzter Zeit auch aus Baumrinde und Süßwassertümpeln (Wylezich et al. 2006). In einem Einzelfall wurde die zweikernige Amöbe als Auslöser einer Amöben-assoziierten Enzephalitis beschrieben (Gelman et al. 2003).

Bislang ist unklar, ob auch *Hartmannella* sp. tatsächlich als pathogener Organismus bei Keratitisfällen eine Rolle spielt oder nur als zusätzliche Kontaminante entdeckt werden konnte (De Jonckheere und Brown 1999).

1.1.2 Freilebende Amöben als Wirte und Vehikel für Bakterien und andere Mikroorganismen

Zusätzlich zu ihrer Rolle als Krankheitserreger werden FLA immer öfter als natürliche Wirte und Vehikel für phylogenetisch unterschiedliche intrazelluläre Organismen (Bakterien, Viren und Eukaryonten) beschrieben, wobei einige dieser intrazellulären Organismen auch ein pathogenes Potenzial besitzen (Michel et al. 1994; Horn et al. 2000).

Dieses Phänomen führte in der Folgezeit zu der anschaulichen Bezeichnung „Trojanisches Pferd der Mikroorganismen“ für ebensolche FLA. Es hat sich eingebürgert, bei intrazellulären Organismen - zumindest in der Anfangsphase der Untersuchungen - von Endozytobionten zu sprechen, ohne zunächst auf Eigenschaften wie Parasitismus oder Mutualismus einzugehen. Ein reproduzierbarer Nachweis von infizierten oder infizierbaren Amöben ist mit den klassischen Verfahren der kulturellen Anzucht und mikroskopischen Auswertung gut durchführbar.

Mikroorganismen werden von Amöben normalerweise durch Phagozytose aufgenommen und anschließend in Nahrungsvakuolen (Phagosomen) verdaut. Manche Mikroorganismen jedoch widerstehen sowohl der Einwirkung von Sauerstoffradikalen, dem sauren Milieu als auch den lysosomalen Enzymen in den Phagosomen. Bereits Naegler hatte „Micrococcen“ in FLA beobachtet (Naegler 1910). Page beschrieb 1974 Stäbchen in Saccamoeben. Drozanski hatte 1956 ein obligat intrazelluläres Bakterium als amöbiziden Parasiten in einem aus Erdboden isolierten *Acanthamoeba*-Stamm beschrieben, welches nicht außerhalb von Amöben gezüchtet werden konnte.

Da einige dieser Endozytobionten humanmedizinische Bedeutung haben, sind FLA als potenzielle Vehikel oder Vektoren für die Verbreitung von pathogenen Bakterien anzusehen. Das mögliche Übertragungspotential für pathogene Organismen auf den Menschen steht dabei im Blickpunkt einer medizinisch - parasitologischen Betrachtung.

Vor allem freilebende Amöben der Gattungen *Acanthamoeba* und *Naegleria* wurden neben ihrer Rolle als Krankheitserreger auch als Wirtszellen von verschiedenen pathogenen Bakterienarten beschrieben.

Daher werden diese im Rahmen von Untersuchungen zum Wirtsspektrum - auch im vorliegenden Falle - als potenzielle Wirte standardmäßig mitberücksichtigt.

Amöben mit intrazellulären Pseudomonaden sind ebenfalls in Biofilmen gefunden worden (Michel et al. 1995). Einige Bakterien wie z.B. *Legionella* spp., *Mycobacterium* spp. (Jadin et al. 1968), *Vibrio cholerae* und *Chlamydomphila pneumoniae* haben es geschafft, die Phagozytose innerhalb der FLA zu überleben.

Legionella-verwandte, *Rickettsia*-verwandte und Chlamydien-ähnliche Organismen sind als Endozytobionten bekannt (Birtles et al. 2000).

Sie sind in der Lage, sich innerhalb der Wirtsamöben zu vermehren, wobei sie zusätzlich noch vor Umwelteinflüssen geschützt sind. Von *Holospora* – Bakterien ist bekannt, dass sie sich sogar im Kern des Ziliaten *Paramecium* sp. befinden und vermehren (Görtz und Michel 2003).

Rowbotham (1980) hatte Kokultivierungsversuche von Acanthamoeben mit *Legionella pneumophila* durchgeführt. Er beschrieb, dass FLA als Wirte von Legionellen fungieren können und somit zu deren Verbreitung in der Umwelt beitragen. Die Legionellenvermehrung wird durch die gleichzeitige Präsenz von Amöben gefördert (Boulanger und Edelstein 1995). Nach Kokultivierung von Acanthamoeben und *L. pneumophila* konnte eine höhere Invasivität der Legionellen - auch für Epithelzellen (Infektiosität um den Faktor 100 erhöht) und Makrophagen (Infektiosität um das 10fache gegenüber dem gleichen in-vitro-Stamm erhöht) - festgestellt werden (Cirillo et al. 1994). Die Inhalation von Aerosolen, die Amöben mit intrazellulären Legionellen enthalten, soll besonders effektiv hinsichtlich einer Infektionsinduktion sein (O'Brien und Bophal 1993). Die Vermehrung von Legionellen innerhalb von Protozoen steigert in vivo deren anschließende Fähigkeit, Säugetierzellen zu infizieren (Cirillo et al. 1994). In diesem Zusammenhang wird diskutiert, ob die Legionellen in Vesikeln enthalten sein können, welche von bestimmten Acanthamoeben-Arten produziert werden (Berk et al. 1998). Bei niedrigen Wassertemperaturen sind Amöben in der Lage, die phagozytierten Legionellen zu zerstören, während Warmwasser mit Temperaturen zwischen 37°C und 49°C die intrazelluläre Vermehrung sogar fördert (Smith-Sommerville et al. 1991). Legionellen können sich in 13 verschiedenen Amöbenspezies vermehren (Abu Kwaik et al. 1998). Neben den Legionellen gehören auch Bakterien der Gattungen *Pseudomonas* und *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas* sp.) sowie Flavobakterien und Listerien zu den potenziell Pathogenen (Hoffmann und Michel 2001). *Pseudomonas aeruginosa* wurde aus Acanthamoeben, die sich im Trinkwassernetz eines Krankenhauses befanden, isoliert. Auch *Echinamoeba*-Trophozoiten wiesen Infektionen mit *P. aeruginosa* auf (Michel 1997). In Naeglerien (Michel et al. 1997) und Hartmannellen wurden sogar je zwei verschiedene, bisher nicht identifizierte Endozytobionten in den jeweiligen Isolaten gefunden. In den Folgejahren konnten ähnliche Beobachtungen mit zahlreichen anderen Organismen gemacht werden.

So wurden *Listeria monocytogenes* (Ly und Müller 1990), *Mycobacterium avium* (Steinert et al. 1998), *Ralstonia* (*Burkholderia*) *picketti* (Michel et al. 1997) und *Afipia felis* (La Scola und Raoult 1999) in Acanthamoeben gefunden.

Auch *Burkholderia pseudomallei*, *E. coli*, *Sarcobium lyticum* (Drozanski 1991), *Cytophaga* sp., *Hydrogenophaga* sp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Flavobacterium indologines*, *Pseudomonas stutzeri* und *Pseudomonas saccharophilia* (Hoffmann und Michel 2001) sowie *Francisella tularensis* (Wagner et al. 2006) wurden in Amöben bereits nachgewiesen.

Ehrlichia – ähnliche Organismen wurden bei *Saccamoeba* sp. intrazellulär beschrieben (Michel et al. 1995).

Zudem konnten Legionellen auch in anderen Amöben, wie z.B. *Dictyostelium discoideum*, in vitro vermehrt werden (Hägele et al. 2000).

Chlamydien sind ebenfalls wichtige obligat intrazelluläre, pathogene Organismen. Drei Arten sind als Erreger diverser Krankheitsbilder beim Menschen bekannt. Michel et. al (2004) konnten für Chlamydien-ähnliche Bakterien, wie z.B. *Waddlia chondrophila*, zeigen, dass sich diese Organismen bei Kokultivierungsversuchen in Acanthamoeben, Hartmannellen, Hyperamoeben, Vahlkampfen und *Dictyostelium discoideum* vermehren. Die namensgebende Spezies der neuen Familie der Parachlamydiaceae (Everett et al. 1999) wurde erstmalig im Labor für Medizinische Parasitologie der Bundeswehr Koblenz in Acanthamoeben gefunden (Michel et al. 1994) und als *P. acanthamoebae* beschrieben (Amann et al. 1997). *Simkania nevegensis*, ebenfalls mit Chlamydien verwandt, konnte im Verlauf von Wirtsspektrumversuchen Acanthamoeben, Naeglerien, Hartmannellen sowie *Balamuthia mandrillaris* infizieren (Michel et al. 2005).

Ein weiterer mit Chlamydien verwandter Endozytobiont wurde ebenfalls erstmalig im Koblenzer Labor aus *H. vermiformis* isoliert und später als *Neochlamydia hartmannellae* beschrieben (Horn et al. 2000). Nicht nur potenziell pathogene Bakterienarten sondern auch harmlose ubiquitäre Wasserkeime, wie Angehörige der Gattung *Cytophaga* wurden wiederholt aus Acanthamoeben, die aus verschiedenen Habitaten stammen, isoliert (Schmid et al. 1993). *Acanthamoeba* sp. diente als Wirtsamöbe im Falle des *Parachlamydia*-ähnlichen Endozytobionten UWE25 (Collingro et al. 2004).

Neben Bakterien wurden weitere Mikroorganismen mit Vermehrung in Amöben gefunden: *Cochlonema euryblastum* wurde als endoparasitischer Pilz in *Thecamoeba quadrilineata* beobachtet (Michel und Wylezich 2005). Von Hoffmann et al. (1998) wurden in einem *Vannella cirrifera* - Stamm sich intranukleär entwickelnde Microsporidien-ähnliche Organismen beobachtet und dokumentiert, die anschließend auf dem Ammenstamm *V. miroides* weiterkultiviert wurden. Die Wasserprobe, in der sich die befallenen Vannellen befanden, entstammte einem Leitungsnetz eines Warmwasserkreislaufsystems.

Die eukaryotische Natur dieser Endozytobionten konnte mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie nachgewiesen werden (Hoffmann et al. 1998).

2003 wurde auch ein außergewöhnlich großes Virus („Giant Virus“, Familie Mimiviridae) in Acanthamoeben nachgewiesen (La Scola et al. 2003), welches das bislang größte bekannte Pockenvirus um den Faktor 4 im Durchmesser übertrifft.

1.1.3 Schutz der Endozytobionten durch die Wirtsamöben

Wirtsamöben haben im Bezug auf die intrazellulären Organismen ihre Hauptbedeutung als Vehikel für deren Verbreitung. Aber auch der Schutz vor den üblichen Chlor-Konzentrationen und anderen Bioziden bzw. Desinfektionsverfahren ist insbesondere wichtig, wenn die Organismen auch in Zysten eingeschlossen werden. Barker et al. (1992) zeigten, dass Legionellen aus Amöben um den Faktor 100 resistenter gegen die Biozide PHMB und Benz-Isotiazolon war als der gleiche parallel gezüchtete in-vitro-Stamm. Auch als möglicher Hitzeschutz für die eigentlich als thermosensitiv geltenden Legionellen in Trinkwasserleitungen werden FLA mittlerweile diskutiert (Otto-Karg et al. 2006), wobei sie Biofilmsysteme in Leitungen besiedeln und durch thermische Desinfektionsmaßnahmen nicht ausreichend eliminiert werden können: In experimentellen Untersuchungen zur Effizienz der thermischen Desinfektion wurden planktonische Legionellen mit Legionellen nach Amöbeninfektion verglichen.

Zwei Amöbenarten wurden mit klinischen Legionellenisolaten infiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion der Effekt von Temperatureinwirkung auf die Überlebensfähigkeit der Legionellen getestet. Es zeigten sich deutliche Unterschiede in der Absterbekinetik zwischen Legionellen in Amöben-freiem versus Legionellen in Amöben-haltigem Medium. Die naheliegende Maßnahme zur Bekämpfung unerwünschter Mikroorganismen ist die Anwendung von Desinfektionsmitteln. Sind Biofilme vorhanden, führt dies jedoch häufig nicht zum Erfolg. Es ist bekannt, dass Biofilm-Bakterien eine um ein bis drei Größenordnungen höhere Biozid-Konzentrationen vertragen als in suspendierter Form und dass für ihre Abtötung eine erheblich längere Einwirkzeit benötigt wird (Flemming 1994). Auch Chlor durchdringt Biofilme nur unvollständig, so dass manche Bereiche ungechlort bleiben. Hinsichtlich der Eliminierung von Amöben aus den Trinkwasser- und Hygienebereichen wird zudem über die zum Teil erhebliche Resistenz einiger Arten gegenüber Chlor und anderen Bioziden berichtet. Es wurden Toleranzen bei Acanthamoeben-Trophozoiten bis 1,25 mg/l, bei Zysten bis 50mg/l freies Chlor bei 30 Minuten Einwirkzeit ermittelt. Kilvington und Price (1990) konnten zeigen, dass Legionellen enthaltende Acanthamoebencysten noch gegenüber einer Chlorkonzentration von 50-75 mg/l resistent sind. Naeglerienzysten waren empfindlich gegenüber Chlorkonzentrationen von 2 mg/L freiem Chlor. Zum Teil erhebliche Resistenzen wurden bei einigen Amöbenarten auch gegenüber Silbersalzen (Michel 1985), UV-Bestrahlung sowie Ozonierung (Cursons et al. 1980) festgestellt.

In der Regel werden also die in den Amöben eingeschlossenen Endozytobionten gegenüber derartigen Desinfektionsmaßnahmen geschützt.

1.1.4 Die Wirtsamöben: *Vannella* sp.

Da in der vorliegenden Arbeit unter den FLA insbesondere die Vannellen eine Rolle spielen, sollen diese Wirtsamöben näher betrachtet werden. Vertreter der Klasse Lobosea (Carpenter 1861) besitzen lappenförmige Pseudopodien, bilden jedoch weder Zysten noch ein Flagellatenstadium aus. Die Christae der Mitochondrien sind i.d.R. röhrenförmig (tubulär), und das Golgi-System ist als Stapel abgeflachter Zisternen organisiert. Die Unterklasse Gymnamoeba schließt alle nackten, lobosen, nicht sporenbildenden Amöben ohne Flagellatenstadien und mit tubulären Christae ein und bildet somit eine heterogene Gruppe. In der Familie der Vannellidae findet man in der Regel eine hochdifferenzierte Glycocalyx (Mucoidschicht mit Glycostyli). Uroidformen und Pseudopodien werden nicht ausgebildet.

Die Gattung *Vannella* (Bovee 1965) besteht aus einkernigen Amöben, deren Lokomotionsform sich gewöhnlich eher abgeplattet, fächerförmig bzw. halbkreisförmig mit breitem hyalinem Band (Hyaloplasma) um die Seiten, ohne eigentliche Pseudopodien, darstellt (siehe **Abb. 1,2** und **3**). Das Vorderende der vorrückenden Amöbe als einzelner, breiter, zylindrischer oder flacher Lappen (meist monopodial – selten bei 2 Lappen polypodial) wird hierbei als Lobopodium bezeichnet.

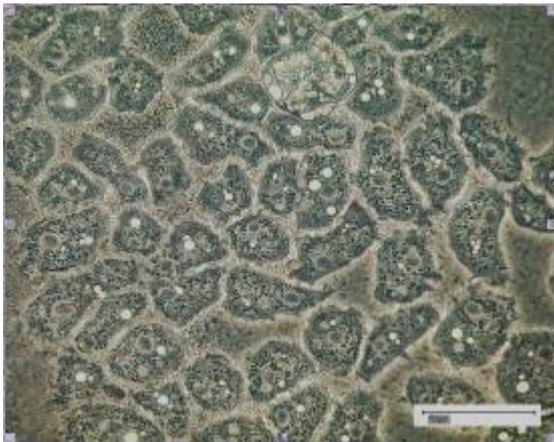


Abb.1: Trophozoiten der Gattung *Vannella*; auf einer Meersalz-Agar-Platte; Lokomotionsform; dicht bewachsene Platte; Phasenkontrast; Bar: 50µm



Abb.2: Einzelne Trophozoiten der Gattung *Vannella*; auf einer Meersalz-Agar-Platte; Lokomotionsform; Phasenkontrast; Bar: 50µm

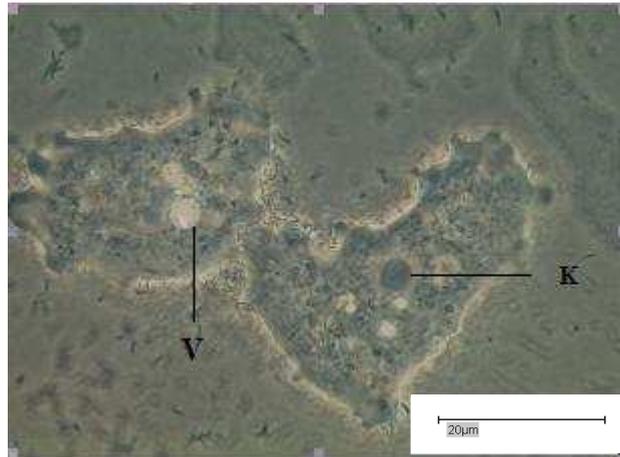


Abb.3: Zwei Trophozoiten der Gattung *Vannella*; auf Meersalzagar; Lokomotionsform; Bei der rechten Amöbe ist der Kern (K), bei der linken die pulsierende Vakuole (V) deutlich zu erkennen; Phasenkontrast; Bar: 20µm

Die Schwebeform oder Schwimmform mit ihren ausstrahlenden, sich merklich verjüngenden, hyalinen Pseudopodien, die sich beim Lösen der Adhäsion und Schweben im Wasser bildet, ist charakteristisch für die Gattung *Vannella* (**Abb. 4, 5**). Diese Scheinfüßchen, eigentlich vorübergehende zytoplasmatische Verlängerungen endogenen Ursprungs, werden als fadenförmige Pseudopodien oder Filopodien bezeichnet. Viele der Organismen mit strahligen („*radiosa*“) Schwebformen, die im Süßwasser vorkommen, gehören der Gattung *Vannella* an.

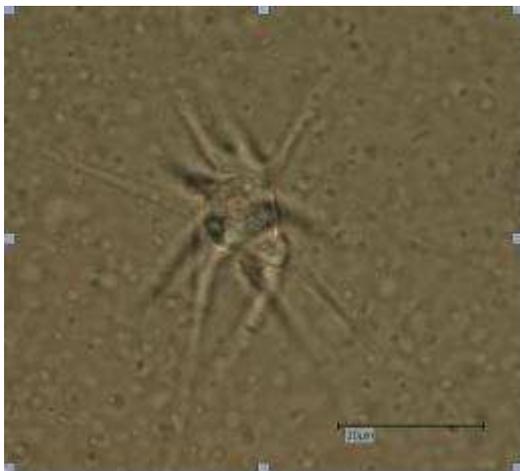


Abb.4: Schwimmform der Gattung *Vannella*; mit Amöbensaline; Pseudopodien werden bereits ausgebildet; Aufnahme; Durchlicht-Hellfeld; Bar: 20µm

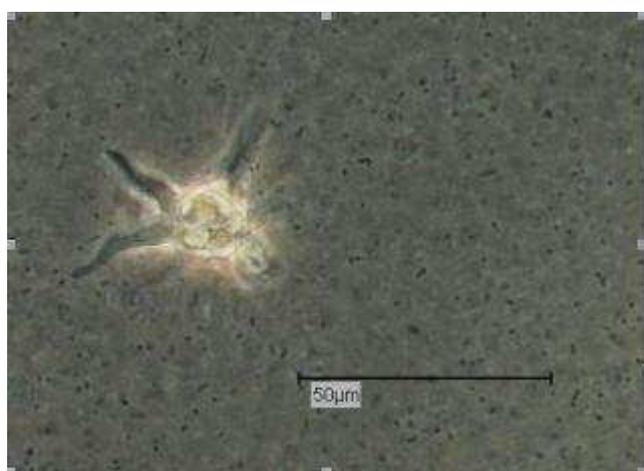


Abb.5: Schwimmform der Gattung *Vannella*; mit Amöbensaline; Pseudopodien werden bereits ausgebildet; Phasenkontrast; Bar: 50µm

Der Trophozoit ist das einzige Stadium der aktiven Amöbe. Sie vermehrt sich durch mitotische Kernteilung und nachfolgende Zellteilung. Zystenbildung ist bei *Vannellen* nicht bekannt. Die amöboide Bewegung und die Plasmaströmung beruhen auf einem Actomyosin-System.

Charakteristisch für diese amöboide Bewegung in der Lokomotionsform ist die Ausbildung von Pseudopodien (Scheinfüßchen) am temporären Vorderende, in die Zytoplasma einströmt. Sie dienen der Fortbewegung wie auch dem Umfließen von Nahrungspartikeln zur Phagozytose (unter Food-Cup-Bildung).

Nach der Phagozytose beginnt in den Phagosomen die Lysis durch Bildung von Phagolysosomen (Phagosom-Lysosom-Fusion). Die Lysosomen sind Zellorganellen, die von einer Biomembran umgeben sind und Verdauungsenzyme enthalten. Sie vermögen bestimmte Makromoleküle durch Hydrolyse abzubauen. Im Inneren der Lysosomen herrscht ein saures Milieu vor. Porenbildende Polypeptide spielen sowohl bei der Phagozytose von Bakterien eine Rolle, als auch bei den Wirkmechanismen auf eukaryotische Zellen, mit denen die Amöben in Kontakt kommen. Bei Acanthamoeben sind diese Mechanismen ebenso wie bei der pathogenen intestinalen *Entamoeba histolytica* beschrieben (Leippe und Herbst 2004).

1.1.5 Mikrosporidien als Endoparasiten

Systematisch werden die Mikrosporidien in den Stamm Microspora, Klasse Microsporea, Ordnung Microsporida eingeordnet. Die taxonomischen Einteilungen variierten in der Vergangenheit, abhängig von der Zugrundelegung diverser morphologischer Kriterien, Größe und Morphologie der Sporen oder Kernzyklus. Das Phylum Microsporidia besteht aus ca. 1300 Mikrosporidienarten in ca. 130 Gattungen. 1990 erfolgte die Trennung in zwei Klassen (Rudimicrosporea und Microsporea) durch Canning (1990). In der Literatur findet sich häufig auch die Unterteilung in Pansporoblastina und Apansporoblastina (Bryan et al. 1990). Sprague et al. (1992) unterteilten das Phylum Microspora in die Klassen Dihaplophasea mit zweikernigen Spezies und die Haplophasea mit einkernigen Spezies während des gesamten Entwicklungsganges. Die weitere taxonomische Einordnung auf Ordnungs- und Familienniveau folgte primär aufgrund der Parasit - Wirtsbeziehungen, der Charakteristika der Sporogonie und der Sporenmorphologie. Die Microspora, die früher als Teil der sog. Cnidospora (Kudo 1966) angesehen wurde, parasitieren intrazellulär in Wirten aus nahezu allen Tierstämmen. Mikrosporidien wurden also lange Zeit zu den (primitiven) Protozoen gestellt. In den letzten Jahren zeigten molekulare Studien, dass diese einzelligen Organismen eng mit den Pilzen verwandt sind, wobei sie dabei - einigen Hypothesen zufolge - substantielle genetische und funktionelle Verluste hingenommen haben, was zudem zum kleinsten Genom der Eukaryonten führte (Mathis 2000).

Die 70S-Ribosomen (bestehend aus einer großen 23S - und einer kleinen 16S Untereinheit (Curgy et al. 1990) der Mikrosporidien zeigen Ähnlichkeiten zu denen der Prokaryonten. Obwohl diese kontroverse Gruppe die nukleäre Organisation von Eukaryonten besitzt, fehlen die meisten für Eukaryonten sonst typischen Organellen. Sie besitzen einen typischen eukaryotischen Kern, ein Endomembransystem sowie ein Zytoskelett (ebenfalls Charakteristika der Eukaryonten), jedoch keine Flagellen, Hydrogenosomen, Lysosomen, Peroxisomen, Kinetosomen, Centriolen- typische Golgiapparate und (zumindest sekundär) Mitochondrien (Charakteristika der Prokaryonten).

Alle Entwicklungsstadien enthalten das raue Endoplasmatische Retikulum und freie Ribosomen. Eine Golgi-Funktion ist jedoch erkennbar durch die Aktivität der Nucleosid-Diphosphatase, die mit der Glykolisierung derjenigen Proteine assoziiert ist, die wiederum den Polartubus bilden.

Im Zytoplasma finden sich 1 oder 2 elektronendichte Körperchen (bodies) mit Vakuolen. Die Bedeutung der elektronendichten Körperchen ist unbekannt.

In neueren Veröffentlichungen werden Mikrosporidien als hoch angepasste (Fast und Keeling 2001), obligate, eukaryotische Parasiten bezeichnet, die durch resistente doppelwandige, Chitin-haltige Sporen übertragen werden (Torres-Fernandez 2001).

In ihrem Lebenszyklus gibt es mehrere morphologische Formen, den Meronten = das proliferative Stadium und die Spore = das Übertragungsstadium.

Der Meront hat eine einfache zelluläre Struktur. Seine Plasmamembran befindet sich in direktem Kontakt mit dem Wirtszytosplasma.

Die Microspora besitzen als übertragungsfähige Stadien grampositive (Collier et al. 1998), säurefeste Sporen (Modie et al. 2003) mit typischen Organellen (**Abb.6**) sowie einer dicken, resistenten Wand. Sie enthalten je einen tubulären Polfaden (Membranstrukturen + Polarfilament = primordialer Polaroplastenkomplex) oder zumindest ein Rudiment davon (Groß 2003).

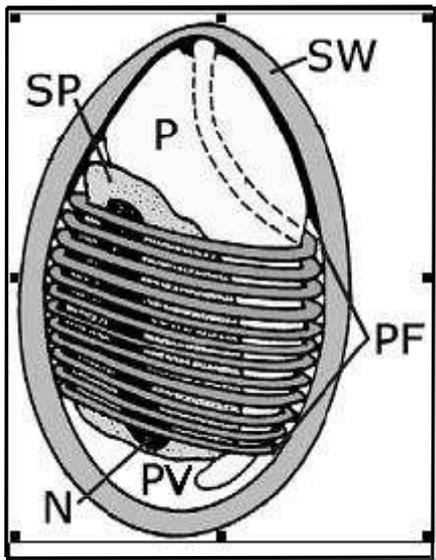


Abb.6 Typische Organellen der Mikrosporidiensporen

- SW: Sporenwand (Endospore, Exospore)
- PF: Polarfilament
- N: Kern
- PV: Vakuole (posterior vacuole)
- P: Polaroplast
- SP: Sporoplasma

(siehe:

www.tulane.edu/~wiser/protozoology/download/aids.pdf)

Der vordere Teil des Polarfilaments verläuft gerade, während der hintere aufgewickelt ist. Der Polartubus (=Polarfilament) und die apikale Organelle, der Kohlehydrat-reiche „anchoring disk complex“ oder Polarsack bilden den Schleuderapparat. Der Polarsack ist für die säurefeste Färbung bei histochemischen Färbungen verantwortlich. Der Polaroplast ist in dem Bereich zu finden, wo der Prolin-reiche Polartubus aufgewunden ist. Innerhalb der Wicklung liegt der Kern. Das perinukleäre Zytoplasma besitzt 70S Ribosomen, Membranen und eine Vakuole. Die Spore ist begrenzt durch eine dreischichtige elektronendichte, proteinhaltige Exospore und eine dickere, elektronenlichte, chitin- und proteinhaltige Endosporenmembranschicht. Nach innen folgt in der Regel eine weitere Membran, das Plasmalemma (Weiss und Vossbrinck 1998). Die Größe der Mikrosporidien sporen variiert je nach Art von 1-10 μm .

Von besonderem Interesse ist die Fähigkeit der Mikrosporidien, in ihre Wirtszellen eindringen zu können:

Der Übertritt des Mikrosporidien-Zytoplasmas in die Wirtszelle erfolgt mit Hilfe des Polfadens (intrusive Invasion), der das Eindringen des unbeweglichen infektiösen Anteils, des Sporoplasmas, in die Wirtszelle ermöglicht („extrusion apparatus“: Schleuderapparat). Die Sporenaktivierung wird durch externe Stimuli hervorgerufen (Dunn et al. 2001).

In einer explosiven, kaum mehr als 1-2 Sekunden dauernden Reaktion auf diese Stimuli, kommt es zu einem Wasserinflux, der wiederum aufgrund des „Schwellens“ des Polaroplasten und der hinteren Vakuole (Schottelius et al. 2000) Veränderungen in der Innenstruktur der Sporen mit pH-Anstieg nach sich zieht. Die Vakuole dehnt sich aus, das Polarfilament (Polfaden) bricht durch die Sporenwand am Polarsack (anchoring disk) und wird in der Regel bei Kontakt mit der Wirtszelle ausgestülpt (invasive Phase).

Durch den Hohlraum des Polfadens gelangt das gesamte Sporoplasma (Kern und Zytoplasma) in ca. 5-30 Sekunden in die Wirtszelle (siehe **Abb. 7**). Nach Entlassen des Sporoplasmas verbleibt eine leere Sporenhülle.

Damit ist die Infektionsphase (incl. Sporenreifung und Eindringen in die Wirtszelle) abgeschlossen.

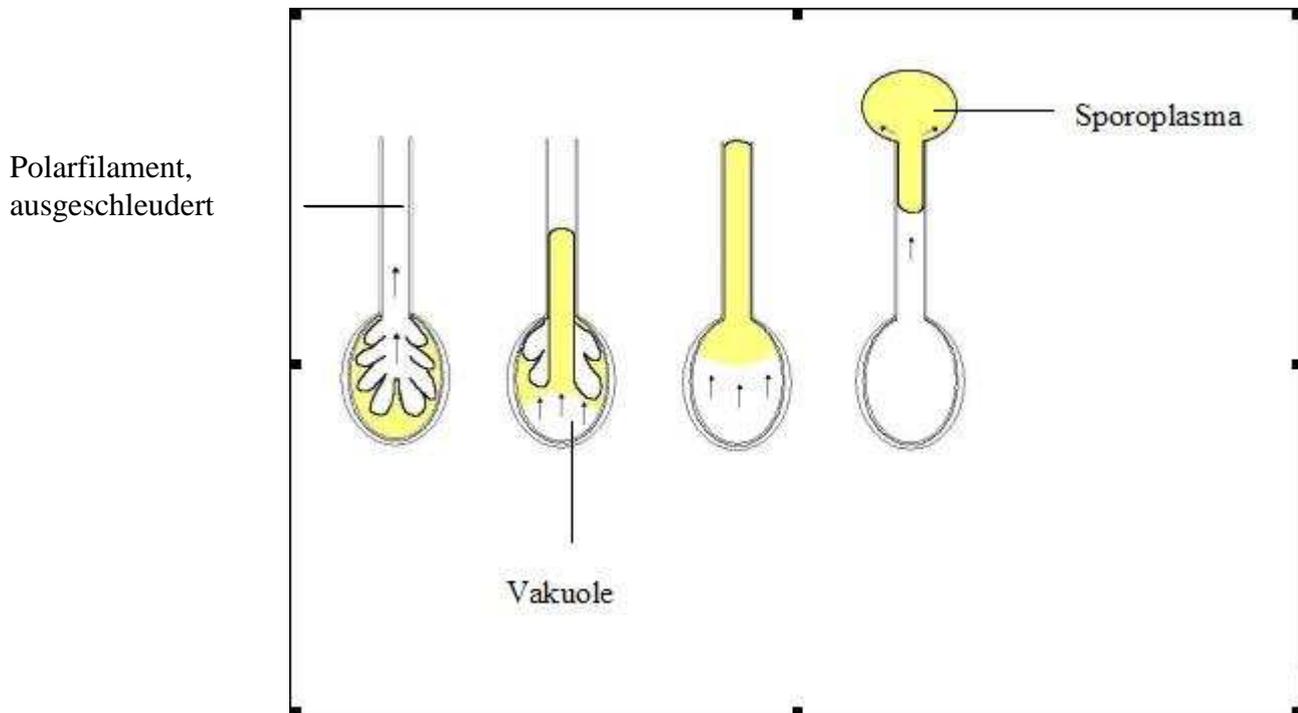


Abb.7: Skizze: Schematische Darstellung des Ablaufs der Inokulation des Mikrosporidienzytoplasmas nach Penetration in die Wirtszelle: Der osmotische Druck steigt im Inneren der Spore und das Polarfilament wird ausgeschleudert. Nach dem Ausschleudern des Polarfilaments penetriert der Polartubus die Wirtszellmembran. Anschließend wird durch das Anschwellen der Vakuole das Sporoplasma in die Wirtszelle inokuliert.

Das Sporoplasma passiert das Polarfilament und gelangt in die Wirtszelle, wo eine asexuelle Reproduktion initialisiert wird. Im Zytoplasma wachsen die Mikrosporidien zu Meronten (Schizonten) heran (Merogonie; Schizogonie; proliferative Phase incl. Replikation (Mehlhorn 2001)). Die heranwachsenden Meronten stimulieren die Wirtszellen und ihre Kerne zur Hypertrophie (Riesenwachstum). Die Meronten sind zu Beginn artspezifisch ein- oder zweikernig und vermehren sich durch Zwei- oder Vielfachteilung bzw. durch Plasmatomie. Sie zeigen noch wenig Differenzierung und sind durch eine Plasmamembran begrenzt. Die Entwicklung während der Merogonie schließt mit den Meronten ab, während die im Laufe der Sporogonie gebildeten Sporoblasten (Sporonten) und schließlich Sporen sukzessive Stadien der Sporogonie (Sporulationsphase incl. Differenzierung) sind. Erste Sporogoniestadien sind die Sporonten. Dabei lagert sich auf der Zelloberfläche der Sporonten eine elektronendichte Schicht ab, die später zur äußeren Schalenschicht (=Exospore) wird.

Nach erfolgter Zellkernteilung und Zytokinese entstehen die Sporoblasten, die sich wieder in die Sporen ausdifferenzieren. Sporonten und Sporoblasten sind reich an rauem und glattem Endoplasmatischem Retikulum. Die erste erscheinende Organelle in den sich ausdifferenzierenden Sporen ist das Polarfilament. Die Sporenentwicklung ist mit der Sekretion einer chitinösen Sporenwand abgeschlossen. Die Entwicklung in der Wirtszelle erfolgt entweder im Zytoplasma oder in einer sogenannten parasitophoren Vakuole, wie es von *Encephalitozoon hellem*, einem obligat intrazellulären Parasiten von Säugetierzellen, bekannt ist, statt (Saliba und Kirk 2000). Die Wirtszelle platzt und die Sporen werden freigesetzt. Merogonie und Sporogonie führen bei einigen Arten zu dimorphen Stadien. Membranen des ER, Ribosomen und vesikuläre Strukturen, assoziiert mit Polarplaques, erscheinen im Zytoplasma der Meronten und Sporonten. Dass Mikrosporidien nicht nur Metazoa, wie z. B. Insekten (z.B. Bienen), sondern auch andere Protozoa, wie z.B. Ciliaten und Apikomplexa, infizieren können, ist beschrieben (Vivares 2001).

Pathogenes Potenzial der Mikrosporidien

Zunehmendes humanmedizinisches Interesse an Mikrosporidien hat wissenschaftliche wie auch medizinische Gründe. Lebererkrankungen, Sinusitis sowie Infektionen des Urogenitaltraktes sind einige von Mikrosporidien ausgelöste Krankheiten. Mikrosporidien werden als opportunistisch pathogen angesehen, seit sie bei Patienten mit AIDS (Bigliardi und Sacchi 2001) gefunden wurden.

Enterocytozoon bieneusi und *Encephalitozoon intestinalis* konnten jedoch auch in immunkompetenten Reisenden mit chronischem (3-6 Wochen dauernden) Reisedurchfall nachgewiesen werden. In einer diesbezüglichen Studie kommen die Autoren zum Schluss, dass die klinischen Symptome einer Mikrosporidieninfektion (Diarrhoe) bei immunkompetenten Personen auf die frühen Infektionsstadien zurückzuführen sind.

Auch nach Therapie persistieren die Mikrosporidien inapparent (Wichro et al. 2005).

Der erste Fall einer Mikrosporidieninfektion wurde 1959 in Japan von Matsubayashi et al. bei einem 9jährigen Jungen beschrieben.

Der erste dokumentierte Fall von intestinaler Mikrosporidiose wurde 1985 *Enterocytozoon bieneusi* zugeschrieben.

Fälle von Hornhautbefall durch Mikrosporidien, meist bei immunsupprimierten Patienten, sind bekannt (Kersten und Althaus 1998; Vivares 2001).

Encephalitozoon hellem, *E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis* (*Septata intestinalis*), *Trachipleistophora hominis*, *Vittaforma corneae* (*Nosema corneum*), *Microsporidium ceylonensis*, *Nosema ocularum*, und *Microsporidium africanum* werden als Auslöser einer Keratokonjunktivitis bzw. einer Hornhautinfektion nicht nur bei immungeschwächten Patienten beschrieben. Es gelingt in der Regel erst spät im Verlauf der Mikrosporidien-Keratitis, z.B. in Hornhautabstrichen (Theng et al. 2001) oder Bindehautabstrichen, den Nachweis der charakteristischen intraepithelialen Erreger zu führen (Cali et al. 1991).

1.1.6 Fallbericht und initiale Untersuchungen

Fallbericht:

Eine 24jährige Frau wurde in der Notfallabteilung der Augenklinik Bonn vorstellig, wobei sie angab, im linken Auge seit 4 Wochen unter Photophobie, Schmerzen und diversen anderen Symptomen zu leiden (Michel et al. 2000). Ihr Visus war derart vermindert, dass sie mit dem linken Auge gerade noch Handbewegungen wahrnehmen konnte.

Die Kornea zeigte ein zentrales, grauweißliches Infiltrat. Korneageschabsel wurde zur Untersuchung auf eine mögliche Acanthamoebenkeratitis eingeschickt.

Die Kontaktlinsen selbst wurden nebst Behälter zum Institut für Parasitologie der Universität Bonn sowie anschließend an das Koblenzer Labor für Medizinische Parasitologie der Bundeswehr geschickt. Mit der Arbeitsdiagnose eines infektiösen Korneageschwüres wurde ein breites Spektrum an antibiotischer Therapie begonnen: 0,9% Gentamycin Augentropfen, 10% Cefalozin Augentropfen. Zusätzlich wurden Brolene[®] Augentropfen (Wirkstoff: Propamidinisothionat 0,1%) verabreicht, um eine potenzielle Acanthamoebenkeratitis mit abdecken zu können. Nach zwei Tagen begann sich das Infiltrat zurückzubilden.

Nach weiteren 16 Tagen war die Infektion abgeheilt und die epitheliale Schicht wieder geschlossen, allerdings mit einer zentralen, discoidalen, weißen Narbe. Die lokale Gabe von Brolene[®] Augentropfen wurde noch einige Wochen fortgesetzt.

Schließlich reduzierte sich die Therapie auf die lokale Unterstützung mit künstlichen Tränen. Der Visus war auf 1/25 aufgrund der zentralen Narbe reduziert. Die Patientin hat jedoch eine Keratoplastik abgelehnt. Sowohl *Pseudomonas aeruginosa* als auch 3 Stämme von FLA konnten nachgewiesen werden, wobei die Bakterien als Hauptursache für die Kornea-Ulzeration angesehen wurden, was durch die erfolgreich durchgeführte Antibiotikatherapie noch bestärkt wurde.

Initial durchgeführte parasitologische Untersuchungen:

Abstriche von beiden Augen der Patientin wurden im Koblenzer Labor per Kultur auf Acanthamoeben oder andere FLA untersucht.

Bei der Untersuchung des Abstriches des rechten Auges ließen sich keine FLA nachweisen. Gleich mehrere FLA konnten jedoch in der Kultur des Abstriches vom linken Auge nachgewiesen werden: *Hartmannella vermiformis* und zwei Vannellenarten, von denen der Stamm mit den kleineren Trophozoiten als *Vannella platypodia* identifiziert werden konnte. Keiner dieser Stämme war ursächlich mit der Keratitis in Verbindung zu bringen. In einer Subkultur der Vannellen zeigten einzelne Trophozoiten große intrazelluläre Aggregationen, die zum Platzen der Zellen innerhalb von 1-2 Tagen führten und dabei eine große Anzahl kokkoider Partikel freisetzten. Nach seiner Isolierung wurde der gleiche Vannellenstamm als parasitenfreie Reinkultur gehalten. In Korneaabstrichen konnten zwar *Pseudomonas aeruginosa*, nicht aber Amöben nachgewiesen werden. Die Kokultivierung des *Vannella*-Stammes mit Geschabsel bzw. Abstrichen aus dem linken Auge führte ebenfalls zur Infektion einiger Trophozoiten wie beim bereits vorher nachgewiesenermaßen infizierten Stamm. Der Endozytobiont wurde in der Folge als KAun1 (K für „Keim“), der Vannellenstamm als VanAun0 (Van für *Vannella*) bezeichnet. In der Folge zu diesen initialen Untersuchungen wurden bereits mehrere Sequenzierungsversuche durchgeführt. Diese sind jedoch alle negativ verlaufen (Rinder et al. 2003). Lediglich Vannellen-DNA (Kern-DNA) wurde sequenziert. Molekularbiologisch ist es also bislang nicht gelungen, die Endozytobionten taxonomisch zuzuordnen.

1.1.7 Fragestellungen der Arbeit

Das Wissen über Endozytobionten von FLA ist sicherlich noch in der Anfangsphase. Durch die Untersuchung an Wirt-Parasit-Modellen soll die Entwicklung von obligat intrazellulären Endozytobionten und ihren Wirten (Endozytobionten - Amöben - Interaktionen) ermöglicht werden. Im gleichen Sinne soll es helfen, in Zukunft weitere Kenntnisse bezüglich der Rolle von FLA als Vehikel von potenziell humanpathogenen Mikroorganismen zu erzielen.

Es war Aufgabe der vorliegenden Untersuchung, einen kürzlich von Vannellen aus Kontaktlinsenbehältern isolierten Endozytobionten hinsichtlich seines Verhaltens in der Wirtsamöbe zu untersuchen. Insbesondere die Aufnahme in die Wirtsamöben und die Entwicklung der Endozytobionten stand dabei im Vordergrund und sollte licht- und transmissionselektronenmikroskopisch dokumentiert werden.

Zudem sollte durch spezifische Färbemethoden eine taxonomische Zuordnung versucht werden, nachdem mehrere Sequenzierungsversuche mit Hilfe von spezifischen Sonden bislang nicht zu aussagekräftigen Ergebnissen geführt hatten. Um Aussagen zur Wirtsspezifität treffen zu können, wurden Wirtsspektrumsversuche mit der umfangreichen (FLA-) Stammsammlung durchgeführt, die im Koblenzer Labor für Versuchszwecke ständig vorgehalten wird.

Von den beschriebenen potenziell pathogenen FLA wurden sowohl Acanthamoeben als auch Naeglerien im Versuch zur Ermittlung des Wirtsspektrums berücksichtigt.

Im weiteren sollten Versuche zur Tenazität (Dauer der Infektiosität der Sporen) sowie Pathogenität in Form von Kokultivierungsversuchen mit humanen bzw. animalischen Zelllinien den Untersuchungsansatz abrunden, zumal es bekannt ist, dass einige Mikrosporidienarten die Kornea infizieren und in Epithelzellen eindringen können, was mit zahlreichen Zelllinien bereits dokumentiert werden konnte.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchungen zum Infektionsweg

2.1.1 Kulturhaltung und Passagierung; Anzucht, Isolierung und Determinierung von freilebenden Amöben

Als Kulturplatten kamen für alle Arten, außer den Vannellen, NN-Agarplatten (1,2% Non-Nutrient-Agar) mit einer Schichtdicke von 0,4 cm in Petrischalen mit Futterbakterien zum Einsatz. *Enterobacter cloacae* wurde in Caso Bouillon (Trypticase-Soja-Bouillon von Becton Dickinson) gegeben, 24 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend bei -4 °C eingefroren. Zum Beimpfen der NN-Agarplatten mit den Futterbakterien wurde die Caso-Bouillon mit *E. cloacae* auf Zimmertemperatur gebracht (Wasserbad). Anschließend wurden mit steriler Pipette 2-3 Tropfen dieses Bakterien-haltigen Bouillons auf die Agarplatte gegeben und mit einem sterilen Drigalsky – Spatel ohne Druck gleichmäßig auf der Platte verteilt. Die Platten konnten anschließend sofort verwendet werden oder im Kühlschrank bis zu 4 Wochen aufbewahrt werden. In unserem Falle wurde die Kultur VanAun0 wie auch alle anderen Vannellenkulturen, die im Rahmen dieser Untersuchungen Verwendung fanden, auf 1,2 %igem NN-Agar unter Zugabe von 1‰ Meersalz mit dem Futterbakterium *Phyllobacterium* sp., Stamm „Mü“ bei 20°C gehalten und vermehrt. Hierbei wurde der Agar mit einer Schichtdicke von etwa 0,3-0,4 cm in Petrischalen gegossen.

Die Amöben, die auf Agar wachsen, wurden durch das Herausschneiden eines Agarblöckchens, das mehrere Trophozoiten (und, falls gebildet, mehrere Zysten) trug, auf frischen Nährboden mit Futterorganismen gebracht. Ziel war die Erzeugung und Haltung einer monoxenischen Amöbenkultur. Sporen der Endozytobionten wurden von älteren bereits beimpften Platten wöchentlich auf 3 Tage alte Amöben-Reinkulturen (gem. Artenspektrum des Wirtsspektrumsversuchs sowie VanAun0) überimpft. Der Flagellatentransformationstest wurde gem. der Anleitung von Page (1988) als Modifikation von De Jonckheeres Methode zur Identifizierung von Naeglerien durchgeführt. Aus einer 2 Tage alten Kultur wurde hierfür ein Agarblöckchen an einer Stelle mit zahlreichen Amöben ausgestochen. Von diesem wurden die Amöben in ca. 1 ml Amöbensaline gelöst und bei den Temperaturen inkubiert, denen die Ausgangsplatten ebenfalls ausgesetzt waren, in unserem Falle also 20°C. Es erfolgte eine stündliche lichtmikroskopische Kontrolle eines Tropfens aus der Amöbensaline (AS), die nunmehr im positiven Falle die Naeglerien enthielt. Da es (Stamm-abhängig) einige Stunden dauern kann, bis die Flagellenbildung einsetzt, wurde die AS-Lösung mit den abgeschwemmten Amöben in einer feuchten Kammer aufbewahrt.

2.1.2 Überimpfen der infektiösen Endozytobionten zur Sporengewinnung

Sporen wurden von älteren Platten der infizierten Vannellen durch Ausstechen eines Agarblöckchens gewonnen. Dieses wurde anschließend auf eine Reinkultur der als Wirte vorgesehenen Amöben (Zielamöben) gebracht und über die Platte verschoben. Die mikroskopische Untersuchung erfolgte je nach gesetztem Zeitintervall. Mindestens 10 Platten mit ausreichend befallenen Amöben wurden zur Sporengewinnung, z.B. für die Elektronenmikroskopie, benötigt. Die Inkubation erfolgte weiter bei 20°C.

2.1.3 Lichtmikroskopische Untersuchungen zum Invasionsweg der Endozytobionten

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden am Leica DM 5000 B - Mikroskop mit der Digital Camera JVC KY-F75U angefertigt. Als Dokumentations- und Archivierungssoftware wurde DISKUS 4.30 der Fa. Hilgers, Königswinter, genutzt.

Da zu Beginn der Arbeiten keine Kenntnisse über die genauen zeitlichen Abfolgen vorlagen, wurden initiale Zeitintervalle festgelegt, die eine Beobachtung des Fortschreitens der Infektion möglich machen sollten: Nach 0,5 Stunden, 1 Stunde, 2 Stunden, 3 Stunden, 8 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden und 72 Stunden ab dem Beginn der Kokultivierung von VanAun0 mit Sporen von KAun1 wurden die Aufnahmen angefertigt. Hierzu wurden die Amöben nach erfolgter Infektion mit den Endozytobionten der Lokomotionsphase direkt auf der Platte, meist unter Zuhilfenahme des Phasenkontrastes, fotografiert.

2.2 Nachweis der kokkoiden Parasitenstadien mittels Färbungen

Alle Aufnahmen wurden auch hier mit der gleichen Kamera unter Nutzung des gleichen Mikroskops angefertigt. Als Dokumentations- und Archivierungssoftware wurde ebenfalls DISKUS 4.30 der Fa. Hilgers, Königswinter genutzt.

Allgemeine Vorbemerkungen zu den Färbungen

Die Morphologie und das färberische Verhalten von Mikroorganismen stellen ein wichtiges Differenzierungsmerkmal dar. Es wird zwischen monochromatischen (einfachen) Färbungen und polychromatischen (mehrfachen) Färbungen unterschieden. Einfachfärbungen erlauben lediglich morphologische Aussagen. Bei Mehrfachfärbungen können aufgrund unterschiedlicher Eigenschaften verschiedener Mikroorganismen weitere differentialdiagnostisch relevante Aussagen zum Färbeverhalten getroffen werden.

Calcofluor-Methode:

Bestimmte Fluoreszenzfarbstoffe aus der Gruppe der Stilbene besitzen eine hohe Affinität für β -glykosidisch verknüpfte Polysaccharide. Dies macht sie zu geeigneten Sonden für den Nachweis von Glucan und Chitin, den dominanten Bestandteilen der Zellwand von Pilzen (Rüchel 1995). Das Fluorochrom Calcofluor Weiß ist ein unspezifischer, fluoreszierender Farbstoff in alkalischer Lösung, der als biologischer Marker bei der Färbung von pflanzlichen Zellwänden verwendet wird und sich daher zur Darstellung von Pilzelementen eignet. Je nach verwendetem Filtersystem fluoresziert es entweder apfelgrün oder intensiv blau-weiß, wenn es Licht der entsprechenden Wellenlänge (300-412 nm) ausgesetzt wird. Die Fluoreszenzmikroskopie mit solchen Aufhellern (optical brightener) erfordert eine Anregung unter 400nm und einen Sperrfilter bei 420 nm Wellenlänge. Die Sporen wurden von älteren Kulturplatten der infizierten Amöben gewonnen. Sämtliche Amöben waren abgestorben und die Sporen konnten gezielt gewonnen werden (siehe Probenvorbereitung für elektronenmikroskopische Aufnahmen). Nach Zentrifugation der Sporen-haltigen Amöbensaline (15 Minuten bei 2500 U/min) wurde ein Tropfen des Sediments auf einen Objektträger gegeben. Nach dem Antrocknen wurde der Bereich des Tropfens mit 100% Methanol bedeckt. Anschließend erfolgte erneut eine Lufttrocknung. Es wurde gerade soviel Kaliumhydroxid-Lösung zugegeben, dass die Probe bedeckt war (10% - KOH). Nach der Zugabe von 1-2 Tropfen Calcofluor White Reagenz blieb die Probe 2 min stehen. Das Deckglas wurde vorsichtig aufgebracht. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte am Mikroskop Leica DM 5000B mit Filtereinstellung „D“ (355-425 nm).

Gram-Färbung

Die Färbung nach Gram ermöglicht die Aufteilung von Bakterien in die „grampositiven“ und „gramnegativen“ Bakterien. Die Farbreaktion ist eng korreliert mit dem Aufbau der Zellwand und weiteren Eigenschaften. Viele basische Teerfarbstoffe liefern bereits ohne Zusätze (Beizen) kontrastreiche und leuchtende Färbungen, die jedoch nur kurze Zeit haltbar sind. Von den synthetischen Teerfarbstoffen, die ohne Beizmittel verwendet werden, wird Gentianaviolett bei der Gram-Färbung insbesondere in der bakteriologischen Routinediagnostik verwendet (Adam und Czihak 1964). Bei Färbungen mit Pararosanilinen (z.B. Gentiana- oder Methylviolett) und Beizung mit Lugolscher Lösung entsteht in der Zelle ein Farbe-Jod-Komplex, der bei grampositiven Bakterien unter der Wirkung eines Entfärbungsmittels in der Zelle festgehalten wird.

Entsprechende Mikroorganismen behalten ihre einmal angenommene blauschwarze (grampositive) Färbung bei. Bei den gramnegativen Bakterien diffundiert der Farbe-Jod-Komplex unter der Einwirkung des Entfärbungsmittels durch die Zellwand nach außen. Bei der nachfolgenden Gegenfärbung, z.B. mit Fuchsin, nehmen die Keime diesen Farbstoff auf und erscheinen dann rot (gramnegativ).

Die Gram-Färbung wurde wie folgt durchgeführt:

- Das Präparat wurde für 1 min in die Färbeküvette mit der Kristallviolettlösung eingestellt
- Anschließend wurde das Präparat für 1 min in die Färbeküvette mit der Lugol'schen Lösung eingestellt
- Das Präparat wurde kurz in die erste Küvette mit Aceton-Alkohol getaucht und leicht geschüttelt
- Das Präparat wurde in die zweite Küvette mit Aceton-Alkohol getaucht und leicht geschüttelt bis keine Farbwolken mehr abgingen
- Das Präparat wurde gut mit Wasser abgespült
- Das Präparat wurde für 1 min in die Färbeküvette mit Safraninlösung eingestellt
- Das Präparat wurde mit Wasser abgespült und zwischen Filterpapierblättchen getrocknet

Danach wurde das Präparat bei 1000facher Vergrößerung mikroskopiert.

Giemsa-Färbung

Die Giemsa-Färbung hat traditionell besondere Bedeutung für die Darstellung von Blutparasiten und verschiedenen anderen Protozoen. Sie ist aber auch, neben der Calcofluor-Färbung, als probate Methode zum Nachweis von humanmedizinisch relevanten, meist jedoch intestinalen Mikrosporidien, beschrieben. Bei korrekter Färbung erscheinen die Präparate zart rötlich-malvenfarben.

Die getrockneten Suspensions-Ausstriche wurden 10 Minuten in Methanol fixiert.

Die Giemsa-Färbung wurde wie folgt durchgeführt:

- Herstellung der Färbelösung: 1 Tropfen Giemsa-Stammlösung (Giemsa-Lösung Fa. Merck) auf 1ml Pufferwasser (Puffer nach Weise). Zuerst wurde die Stammlösung in den Messzylinder getropft und dann die notwendige Menge an Wasser zugegeben
- Die Ausstriche und die Dicken Tropfen wurden auf eine Färbepank gelegt und vollständig mit Farblösung bedeckt
- Die Färbedauer betrug ca. 45 Minuten
- Anschließend wurde die Farblösung mit Wasser abgespült
- Die gefärbten Ausstriche wurden aufrecht an der Luft getrocknet

Diff-Quick-Färbung

Der Diff-Quick-Färbetest ist eine Schnellfärbemethode, deren Ergebnisse mit denen der Giemsa-May-Grünwald (Pappenheim-Methode) gut vergleichbar sind. Im Koblenzer Labor für Medizinische Parasitologie wird sie alternativ oder zusätzlich zur Giemsa-Färbung in der Malariadiagnostik benutzt. Durch mehrmaliges kurzes Eintauchen der luftgetrockneten Blutausrichke in die verschiedenen Lösungen werden diese in nur 15 Sekunden fixiert und gefärbt.

Die Diff-Quick-Färbung wurde wie folgt durchgeführt:

- Die 3 Diff-Quick Lösungen wurden in verschlossenen Eintauchbehältern bereitgestellt
- Die Suspensionen wurden ausgetrichen und anschließend luftgetrocknet
- Die 3 Behälter wurden geöffnet und in folgender Reihenfolge auf Papiertüchern aufgestellt:
Fixierlösung (hellblau) → Färbelösung 1 (rot) → Färbelösung 2 (dunkelblau)
- Der Objektträger mit der getrockneten Suspension wurde einzeln 5 x 1 Sekunden mit einer Pinzette in die Fixierlösung eingetaucht, zwischendurch kurz abgetropft (insbesondere musste darauf geachtet werden, dass bei jedem Schritt auf einem Papiertuch kurz überschüssige Farbe abgetropft wurde, bevor man in den nächsten Eintauchbehälter ging)
- Der Objektträger wurde 5 x 1 sec mit einer Pinzette in die Färbelösung 1 eingetaucht, zwischendurch kurz abgetropft
- Der Objektträger wurde anschließend 5 x 1 sec mit einer Pinzette in die Färbelösung 2 eingetaucht, zwischendurch kurz abgetropft
- Der Objektträger wurde mit Aqua dest. von beiden Seiten abgespült und luftgetrocknet

Zusammensetzung der Lösungen:

Diff-Quick-Färbeset Medion Diagnostics

Diff-Quick I -> Färbelösung I : enthält Eosin Y in Phosphatpuffer, Natriumazid

Diff-Quick II -> Färbelösung II: enthält Thiazin-Farbstoff in Phosphatpuffer

Diff-Fix -> Fixierlösung : enthält Fast-Green in Methanol

Kinyoun-Färbung

Die Kinyoun-Färbemethode wird in der Med. Mikrobiologie zum Nachweis von Mykobakterien sowie in der Parasitologie z.B. zur Anfärbung und zum Nachweis von Cryptosporidien eingesetzt. Das Prinzip zur Färbung säurefester Stäbchen im Rahmen der med. bakteriologischen Diagnostik ist folgendes:

Wachsartige Substanzen (langkettige Fettsäuren: Mykolsäuren) in der Zellhülle bestimmter Bakterien bedingen eine feste Verankerung spezieller Farbstoffe, die auch durch eine Entfärbung mit einem Säure-Alkohol-Gemisch nicht entfernt werden können. Säurefeste Stäbchen färben sich rot an, während die Umgebung eher blau erscheint.

Die Kinyoun-Färbung wurde wie folgt durchgeführt:

- Das Untersuchungsmaterial wurde dünn auf einen entfetteten Objektträger ausgestrichen
- Die Suspension wurde nach dem Trocknen hitzefixiert
- Anschließend wurde das gesamte Präparat mit Kinyoun-Lösung überschichtet
- Es folgten 3 Minuten Einwirkzeit
- Danach wurde vorsichtig 30 sec mit Leitungswasser abgespült
- Das gesamte Präparat wurde mit Gabett-Lösung überschichtet
- Es folgte 1 Minute Einwirkzeit
- Vorsichtig wurde mit Leitungswasser abgespült
- Das Präparat wurde schließlich luftgetrocknet

Das basische Fuchsin der Kinyoun-Lösung (enthält: basisches Fuchsin, Phenol, den. Äthylalkohol, dem. Wasser) färbt alle Bakterien. Die Schwefelsäure der Gabett Lösung (enthält: Methylenblau, konz. Schwefelsäure, den. Äthylalkohol, dem. Wasser) wirkt als Entfärber. Methylenblau bewirkt eine Kontrastfärbung.

Trichromfärbung

Farbenreiche, meist gut haltbare und lichtbeständige Übersichtspräparate erhält man nach Anwendung der Trichrom –Methode. Die Trichromlösung ersetzt bei dieser Färbemethode das Hämatoxylin, gegenüber der Hämatoxylin-Färbung nach Haidenhain. Die Färbetechnik entspricht aber im wesentlichen der Hämatoxylinfärbung. Das Zytoplasma und seine Bestandteile zeigen je nach Feinbau, funktionellem Zustand bei der Fixation und verwendeter Fixationstechnik eine unterschiedliche Affinität (acidophil, basophil und neutrophil) und Aufnahmefähigkeit für bestimmte Farbstoffe (Engelbrecht 1965). Die chemischen und physikalischen Ursachen der Anfärbung von zytoplasmatischen Elementen bei den histologischen Färbungen haben ihre Ursache in der Reaktion von Farbstoff und Zellsubstrat.

Die Trichromfärbung wurde wie folgt durchgeführt:

- Die Suspension wurde dünn über die gesamte Länge des Objektträgers ausgestrichen.
- Danach folgte die 30 minütige Fixierung, noch feucht in Schaudinns Reagenz (Sublimat Alkohol)
- Der Objektträger wurde 10 min in Jodalkohol gestellt (70%iger Alkohol, 2x je 5-6 min)
- Der Objektträger wurde 6-8 Minuten in Trichromfarblösung gestellt
- In den 70%igen Alkohol wurden einige Tropfen Jodlösung gegeben (cognacfarben)
- Der Objektträger wurde 10-20 sec in 90% angesäuerten Alkohol (1 Tropfen Eisessig auf je 10ml Alk.) gestellt
- Der Objektträger wurde 5 min in 96% Alkohol gestellt
- Der Objektträger wurde 8 Minuten in Carbol-Xylol (10g Phenol+ 100ml Xylol) gestellt
- Schließlich wurde er 10 min in Xylol gestellt

Die Herstellung der Färbelösung erfolgte hierbei nach folgender Zusammensetzung:

Chromotrop 2R	0,6g
Lichtgrün SF	0,15g
Fast green FCF	0,15g
Phosphorwolframsäure	0,7g
Eisessig	1,0ml
Aqua dest	100ml

Die trockenen Substanzen wurden in 1ml Eisessig unter gutem Schütteln gelöst.

Anschließend blieb die Lösung 15-30 Minuten bei Raumtemperatur stehen. Es wurden 100ml Aqua dest. hinzugegeben und gerührt bis alle Substanzen gelöst waren, danach folgte die Filtrierung.

Herstellung des Sublimat-Alkohols:

10 ml Ethanol (96%) wurden mit 20 ml gesättigter, wässriger Sublimatlösung (8g HgCl₂ in 100 ml heißem Aqua dest. lösen) und 70 ml Aqua dest. sowie 1 ml Eisessig gemischt.

Modifizierte Trichromfärbung

Im Gegensatz zur bereits beschriebenen Trichromfärbung fand bei dieser modifizierten Trichromfärbung Anilinblau anstatt Lichtgrün und Fast Green Verwendung.

Die Fixierung erfolgte nicht durch Sublimatalkohol sondern durch Methanol. Carbolxylol und Jodalkohol wurden nicht eingesetzt. Ansonsten wurde diese Färbung analog der üblichen, oben beschriebenen, Trichromfärbung durchgeführt. Die modifizierte Trichromfärbung zum Nachweis von Mikrosporidien gilt als praktische bzw. praktikable Methode für die Routinediagnostik, insbesondere für den Nachweis von intestinalen Mikrosporidien. Sie wurde deswegen modifiziert, da bekannt ist, dass die Sporen die Farbstoffe kaum aufnehmen. Daher wurde Chromotrop 2R in 10-fach höherer Konzentration im Vergleich zur üblichen Trichromfärbung eingesetzt (Garcia 2001). Die Sporenwand sollte sich, bei gut abgegrenzten Innenstrukturen, rosa anfärben, wobei Bakterien sich grün anfärben sollten.

2.3 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen zur Untersuchung des Invasionsweges der Endozytobionten in die Wirtsamöben (Vannellen)

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen waren die Voraussetzung für die Entdeckung der Endozytobionten. Elektronenmikroskopische Aufnahmen jedoch sollten Aufschluss über die ultrastrukturelle Organisation sowie zum Invasionsweg der beobachteten kokkoiden Organismen geben.

2.3.1 Überimpfen der infektiösen Sporen (Sporengewinnung)

Analog den Verfahren bei den lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden 0,2-0,3 ml der Sporensuspension durch Filter (5µm; Sartorius) auf die zu beimpfende Platte gebracht. Anschließend wurde diese Suspension ohne Druck auf der Platte verrieben und die Platte bei 20°C inkubiert.

2.3.2 Präparation der infizierten Vannellen und Gewinnung von Material für die Elektronenmikroskopie

2-3 ml Amöbensaline wurde bei Raumtemperatur nach der vorgegebenen Zeit p.i. auf die Platten mit den infizierten Vannellen gegeben. Anschließend wurde die Amöbensaline mit dem Drigalsky – Spatel unter leichtem Druck abgespatelt. Die Amöbensaline mit darin suspendierten Amöben und eventuell vorhandene Sporen wurden mittels steriler Pipette abgehebert und in ein steriles Röhrchen gegeben.

Erneut wurde mit 2-3 ml Amöbensaline nachgespült und ebenso mit dem Drigalsky-Spatel unter leichtem Druck abgespatelt.

Das so gefüllte sterile Röhrchen wurde 10 min bei 2000 U/min ohne Bremsfunktion zentrifugiert.

Anschließend erfolgte das vorsichtige Dekantieren der Amöbensaline ohne Aufwirbeln des Sediments. Während der Zentrifugationsphase erfolgte das Zusammengeben von Lösung A und Lösung B des Karnovsky-Fixans (Karnovsky 1965), nachdem beide Lösungen auf Zimmertemperatur gebracht wurden. Das Karnovsky-Fixans wurde dem Sediment im Verhältnis 1:5 hinzugefügt. Dieses wurde im Fixans wieder aufgewirbelt, um eine komplette Fixierung sicherzustellen. Mindestens eine Stunde lang erfolgte dieser Fixierungsschritt im Kühlschrank. Danach erfolgte eine erneute Zentrifugation (10 min bei 3000 U/min). Nach dem vorsichtigen Dekantieren des Karnovsky-Fixans, wurde dem Sediment Cacodylatpuffer (1 M) zugefügt. Bis zur Weiterverarbeitung in der Elektronenmikroskopie erfolgte die Aufbewahrung im Kühlschrank. Nach erneuter Fixierung und Färbung (Kontrastierung) mit Osmiumtetroxid (OsO₄) sowie Uranylacetat (Nachkontrastierung), wurden die Proben nach Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe (15-100% Ethanol; zur Entwässerung) in ein Kunstharzeinbettungsgemisch nach Spurr eingebettet. Nach ca. 8 Stunden bei 70°C war das gegossene Gemisch auspolymerisiert. Die Ultradünnschnitte wurden elektronenmikroskopisch mit dem Zeiss EM 910 Elektronenmikroskop untersucht.

Folgende Materialien fanden hierbei Verwendung:

Karnovsky-Fixans:

Lösung A: 50 ml Paraformaldehyd 8% (8 g Paraformaldehyd zu 80 ml aqua bidest) wurde auf einem Magnetrührer bis kurz vorm Sieden erhitzt; dann mit 1-3 Tropfen NaOH 1N depolymerisiert bis die Lösung klar erschien. Es folgte die Abkühlung im Wasserbad und das Auffüllen mit Aqua bidest auf 100ml.

Lösung B: 30 ml Cacodylatpuffer (0,2 m entspricht 4,28 g NaCaC/100ml Aqua dest.) bei pH 7,4 zu 20 ml 25% Glutaraldehyd

Amöbensaline:

Stammlösung (1,20 g NaCl; 1,42 g Na₂HPO₄, 1,36 g KH₂PO₄, 0,04 g CaCl₂ x H₂O, 0,04 g MgSO₄ x 7 H₂O) ad 100 ml. Für die Gebrauchslösung wurden je 10 ml der Stammlösungen mit Aqua bidest. auf 1000ml aufgefüllt sowie autoklaviert.

2.4 Wirtsspektrumsversuche

Die Fotodokumentationen wurden mit dem Leica DM 5000 B - Mikroskop durchgeführt. Als Dokumentations- und Archivierungssoftware wurde DISKUS 4.30 der Fa. Hilgers, Königswinter genutzt. Im Rahmen der Zellkulturversuche kam das Invertmikroskop Leica DM IRB zum Einsatz.

Wirtsspektrumsversuche mit FLA

Alle in der vorliegenden Arbeit verwandten FLA entstammten der Stammsammlung des Koblenzer Labors für Med. Parasitologie. Sie wurden im Laufe der Zeit aus den verschiedensten Probeneinsendungen oder eigenen Probennahmen im Rahmen verschiedener Projekte und Untersuchungen isoliert.

Der Nachweis zur Proliferation der Endozytobionten in diesen FLA erfolgte analog zu den bereits beschriebenen Methoden lichtmikroskopisch. Auch die Überimpfung zur Kokultivierung der Sporen mit den potenziellen Wirtsamöben (siehe 2.1.1) und die Gewinnung von Material für weitere elektronenmikroskopische Untersuchungen (siehe 2.3.2) wurde analog zu den oben bereits beschriebenen Verfahren mit den gleichen Geräten, Mikroskopen etc. durchgeführt. Es sei an dieser Stelle also lediglich darauf verwiesen.

Die im Rahmen der Wirtsspektrumsversuche eingesetzten potenziellen Wirtsamöben sind in **Tab.2** dargestellt:

Tab.2: FLA, die im Rahmen der Wirtsspektrumsversuche zum Einsatz kamen

Spezies	Stamm	Herkunft	Isolierung
<i>Acanthamoeba</i> sp.	ChiSan	Kontaktlinsenbehälter	2002
<i>Acanthamoeba</i> sp.	aqua iso2	Gartenteich/Waldesch	2003
<i>Acanthamoeba</i> sp.	Petz	Kontaktlinsenbehälter	2004
<i>Acanthamoeba rhyodes</i>	302-1	Nasenschleimhaut	1981 Michel
<i>Vannella</i> sp.	d'oro	Baumrinde; Cisano/Italien	2003 Michel
<i>Vannella</i> sp.	medagarda	Gardasee	2003 Michel
<i>Vannella miroides</i>	Dent G1	Bundeswehrdentaleinheit/Lahnstein	1995 Michel
<i>Vannella platypodia</i>	vp ash	verrottete Eschenfrüchte/Neuwied	2001 Michel
<i>Vannella platypodia</i>	cis plat	Baumrinde Platane; Cisano/Italien	2003 Michel
<i>Saccamoeba stagnicola</i>	aqss	Zierfisch-Aquarium	2003 Michel
<i>Saccamoeba limax</i>	SL 1	Zierfisch-Aquarium	1994 Michel
<i>Platyamoeba placida</i>	xyz	Zierfisch-Aquarium	2005 Michel
<i>Harmannella vermiformis</i>	A1 HspiGento	Dentaleinheit/Lahnstein	1995 Michel
<i>Naegleria gruberi</i>	aqua iso1	Gartenteich/Waldesch	2003
<i>Thecamoeba quadrilineata</i>	dcH 1	Dachrinne/Melsbach	1988 Michel
<i>Willaertia magna</i>	A1Pw1	Nil/Ägypten	1994 Michel
<i>Tetramitus pararusselli</i> (ehemals als <i>Vahlkampfia ovis</i> bestimmt (De Jonckheere et al. 2005))	Rhodos	Regenwasserpflanze/Rhodos	1994 Michel

Der Nachweis zur Proliferation der Endozytobionten in diesen FLA erfolgte analog zu den bereits beschriebenen Methoden lichtmikroskopisch.

Wirtsspektrumsversuche mit humanen und animalischen Zellkulturen

Eine Infektion einzelner Zellen und die Ausbreitung des Infektionserregers wird generell bei mikroskopischer Inspektion an dem Auftreten charakteristischer zytopathogener Veränderungen (*cytopathic effect*, CPE) der Zellen bzw. des Zellrasens erkannt.

Die von den Kulturplatten mit Amöbensaline abgeschwemmten Sporensuspensionen (ca. 2 ml) wurden zu vorbereiteten Zellkulturen gegeben.

Als Kontaminationsprophylaxe gegen Bakterien wurden zur Eliminierung der Futterbakterien das bei der Untersuchung von Patientenproben bei Verdacht auf eine Virusinfektion ebenfalls verwendete Antibiotika-Gemisch (Penicillin; Streptomycin, Gentamycin; jedoch ohne Amphotericin B) eingesetzt.

Um Kreuzkontaminationen auszuschließen, wurde jede Suspension auf eine separate 24-Vertiefungs - Diagnostikplatte inokuliert. Es wurden grundsätzlich nur gleichmäßig bewachsene, semikonfluente Kulturen verwendet.

Die Kulturen wurden täglich lichtmikroskopisch inspiziert und das Ergebnis protokolliert. Das Kulturmedium wurde wöchentlich erneuert. Die weiteren Maßnahmen (Splitten der Zellen, Anlage von Subkulturen etc.) wurden nach Bedarf vorgenommen.

Im Rahmen dieser Untersuchungen waren zytopathogene Effekte (CPE), Plaquemorphologie und der Zelltropismus des Erregers zu berücksichtigen. Die Beobachtungszeit der Kulturen betrug analog den Verfahren bei Patientenproben in der Virusdiagnostik maximal 3 Wochen. Traten keine erregertypischen CPE auf oder konnte kein Erreger identifiziert und bestätigt bzw. propagiert werden, war das Ergebnis negativ. Traten ausgedehnte toxische Effekte, zytopathische Effekte in den uninfizierten Kontrollen (Mock) oder Kontaminationen mit Bakterien auf, sollte die Untersuchung abgebrochen werden und das Ergebnis entsprechend kommentiert werden.

Verwendete Zelllinien:

MRC-5-Zellen (ATCC Katalog Nr. CCL-171):

Humane diploide Lungenfibroblasten (Medical Research Council-MRC-5) sind adhärent wachsende primäre humane embryonale Fibroblasten. Da die embryonalen Fibroblasten für zahlreiche Viren empfindlich sind, werden sie routinemäßig im Labor für Virusdiagnostik/ Zellkultur der Bundeswehr Koblenz als Screening-Zelllinie im Rahmen der Virusdiagnostik eingesetzt. Als primäre Zelllinie sind sie nur bis etwa Zellkulturpassage 42 passagierbar. Die Aufbewahrung erfolgte bei -70°C sowie in Flüssigstickstoff.

MDCK-Zellen (ATCC Katalog Nr. CCL-34):

Madin Darby Canine Kidney (MDCK) Zellen sind Hunde-Nierenepithelzellen (permanente Zelllinie). Sie entstammen der Niere einer Cockerspanielhündin und wurden 1958 von Madin und Darby in Kultur genommen. MDCK-Zellen bilden nach dem Anheften ein polar differenziertes Epithel auf dem Boden einer Kulturflasche als planer Monolayer. MDCK Zellen sind insbesondere suszeptibel für Influenzavirus-Infektion und können bei Infektion mit bestimmten Influenza A Stämmen einen CPE zeigen. Die Aufbewahrung erfolgte bei -70°C sowie in Flüssigstickstoff.

Sonstige Materialien

Trypsinlösung

Die kommerziell erworbene Trypsinlösung (Trypsin/EDTA; 0,05%/0,02% w/v in PBS ohne Ca^{2+} , Mg^{2+}) wurde bei 4°C aufbewahrt und war gebrauchsfertig. Die Trypsinlösung wurde aufgrund eines möglichen Verlustes von Enzymaktivität nicht bei 37°C, sondern nur bei Raumtemperatur erwärmt. Ausgangspunkt für Diagnostik-Medien war DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium, Bezug über Fa. Invitrogen/Gibco), das in 500 ml Flaschen bei 4°C im Kühlraum gelagert wurde. Sämtliche Zusätze zum DMEM (z.B. Antibiotika-Gemisch oder Glutamin) wurden gebrauchsfertig aliquotiert und bei -20°C gelagert. Neben dem eigentlichen Zellkulturmedium erhielten die Zellen je nach Zelllinie (Vorgabe von ATCC) und gewünschter Wachstumsgeschwindigkeit einen Zusatz von FBS (fetale bovine serum).

Stammzell-Medium

500 ml DMEM
5 ml L-Glutamin (200 mM, 100x)
(im Gebrauch befindliche Flaschen wurden bei 4°C gelagert)

Diagnostik-Medium (während der Kokultivierungsphase)

500 ml DMEM
5 ml L-Glutamin (200 mM, 100x)
5 ml Antibiotic-Antimycotic (PSA)
(im Gebrauch befindliche Flaschen wurden bei 4°C gelagert)

L-Glutamin-Zusatz

200mM, 100x, Fa. Invitrogen/Gibco
100 ml Flaschen wurden bei -20°C gelagert
Gebrauchsfertige 5 ml Aliquots wurden bei -20°C gelagert

Antibiotika (PSA) - Zusatz

- Fa. Invitrogen/Gibco
- enthält Penicillin/Streptomycin/Gentamycin
- wirksam gegen gramnegative und grampositive Bakterien

FBS (fetal bovine serum)

- 500 ml Flaschen FBS wurden bei -80°C gelagert
- 50 ml Aliquots FBS wurden bei -20°C gelagert
- Im Gebrauch befindliche 50 ml Aliquots wurden bei 4°C gelagert

Pufferlösungen

PBS-steril

- Bezug erfolgte über die hauseigene Nährbodenküche; Lagerung bei 4°C
- Fertigpulver für 1 Liter PBS (Sigma)
- Sterilfiltration durch 0,45µm Filter für Zellkulturanwendung oder alternativ Sterilisation im Autoklaven

Amöbensaline:

Zur Herstellung von Amöbensaline wurden Stammlösungen aus folgenden Reagenzien angefertigt:

- 1,20g NaCl
- 1,42g Na₂HPO₄
- 1,36 KH₂PO₄
- 0,04g CaCl₂ x 2H₂O
- 0,04g MgSO₄ x H₂O
- ad 100ml

Für die Gebrauchslösung wurden 10ml der jeweiligen Stammlösungen mit Aqua bidest. ad 1000ml aufgefüllt und anschließend autoklaviert.

Amöbensaline fand in zahlreichen Einzelversuchen verschiedenster Art ihre Anwendung.

2.5 Versuche zur Zeitdauer der Infektionsfähigkeit der Sporen

Um die Dauer der Infektiosität der Sporen einschätzen zu können, wurden gegen Austrocknung mit Parafilm geschützte Kultur-Platten mit befallenen Vannellen bei 20°C im Brutschrank belassen und durch Re-Infektionsversuche der freigewordenen Sporen mit Reinkulturen von VanAun0 auf ihre Infektiosität getestet. Hierbei wurde von diesen Platten zu verschiedenen Zeiten ausgestochene Agarblöckchen mit Sporenhaufen auf eine mit Vannellen bewachsene Agarplatte (Reinkultur VanAun0) überimpft und das Ergebnis anfangs wöchentlich, später monatlich über einen Zeitraum von 26 Monaten lichtmikroskopisch beurteilt. Die Zeitintervalle betragen 1, 2, 3 und 4 Wochen, 2, 3, 6, 10, 12, 16, 20, 24 und 26 Monate

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zum Infektionsweg von KAun1 in die Wirtsamöben

3.1.1 Initiale lichtmikroskopische Beobachtungen

Die einkernigen Wirtsamöben vom Stamm VanAun0 sind im Durchschnitt (Mittelwert) 41,2µm lang (Standardabweichung $s = 4,11$) und 30,8µm breit ($s = 4,20$). Der Kern misst im Durchmesser im Durchschnitt 5,5µm ($s = 0,09$) und beinhaltet einen großen, zentralen Nukleolus. Erste lichtmikroskopische Beobachtungen im Rahmen der initial durchgeführten parasitologischen Untersuchungen (siehe 1.1.6) deuteten auf intrazelluläre Aggregationen und eine Größenzunahme (Hypertrophierung) der infizierten Vannellen hin.

Hier lag also offensichtlich ein Befall mit Endozytobionten vor. Lichtmikroskopisch konnten auch schnell Endozytobionten entdeckt werden, die zuerst in kokkoider Form außen, anschließend organisiert im Inneren der Vannellen, zu erkennen waren. In der Folge wurden auch ruptierte Amöben gefunden, die eine hohe Anzahl der ca. 1µm großen, kokkoiden Organismen auf der Agaroberfläche hinterließen.

Es stellte sich heraus, dass drei grobe Abschnitte der Entwicklung des zeitlichen Ablaufs unterschieden werden konnten: Die Aufnahme der Sporen, die Entwicklung in der Amöbe und die Freisetzung der Parasitenstadien nach Ruptur der Amöbe.

Ein Erkennen der genauen zeitlichen Abfolge anhand der gewählten Intervalle schien jedoch nicht möglich zu sein. Vielmehr konnten zumindest in den älteren Platten, ab 8 Stunden p.i., praktisch alle drei grob definierten Abschnitte gefunden werden, sowohl uninfizierte, frisch infizierte als auch ruptierte Amöben. Offensichtlich ging die Infektion also sehr rasch vor sich. Die Sporen-ähnlichen Gebilde schienen sich hierbei zuerst an der Zellmembran der Vannellen anzulagern (**Abb.8**). Nach dieser Adhäsion gelangten die Sporen ins Zytoplasma der Wirtsamöben. Derartige Stadien konnten in Nahrungsvakuolen beobachtet werden (**Abb.9**). Die folgende eindrucksvolle Phase war eine Veränderung, die im Kern der Amöben zu erkennen war. Die infektiösen Sporen-Stadien waren in den Kern der Wirtsamöbe gelangt. Die Zeitabläufe/Wachstumsraten stellten sich erst im Verlauf der Untersuchungen detaillierter heraus. So konnte nachgewiesen werden, dass die Aufnahme der Sporen durch die Wirtsamöben unmittelbar nach der Kokultivierung erfolgte. Sporen wurden bereits 3-5 Minuten nach Kokultivierung in den Vannellen nachgewiesen.

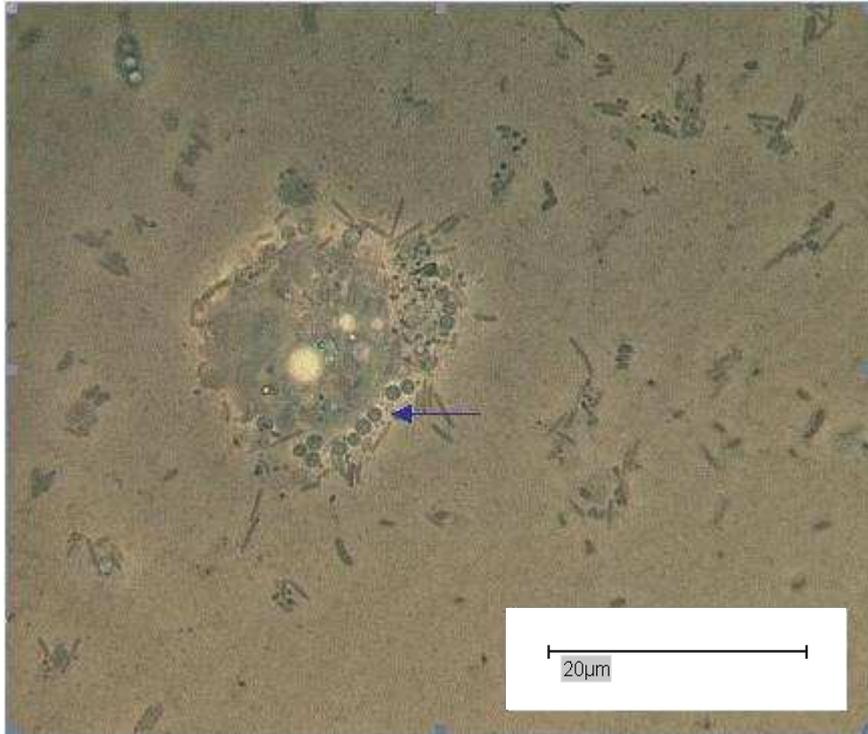


Abb.8: Kokkoide Sporen an der Zellmembran einer Vannelle (Pfeil) sowie auf der Meersalz-Agar-Platte liegend; Phasenkontrast; Bar 20μm

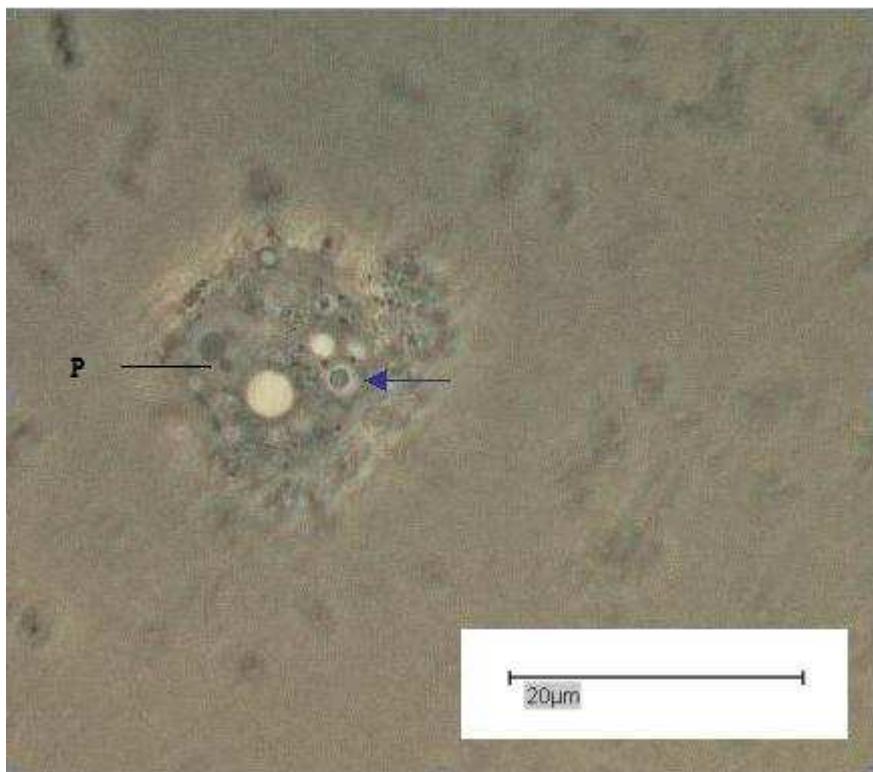


Abb.9: Kokkoide Sporen in einer Vakuole im Zytoplasma der Vannellen (Pfeil) sowie ein Parasit (P) im Kern (Karyoplasma) der Wirtsamöbe; Phasenkontrast; Bar 20μm

Insbesondere in den infizierten Amöben ab 8 Stunden p. i. zeigten sich intrazelluläre, kokkoide Strukturen, die neben der Hypertrophie der Amöbe in der Folge auch deren Tod verursachten.

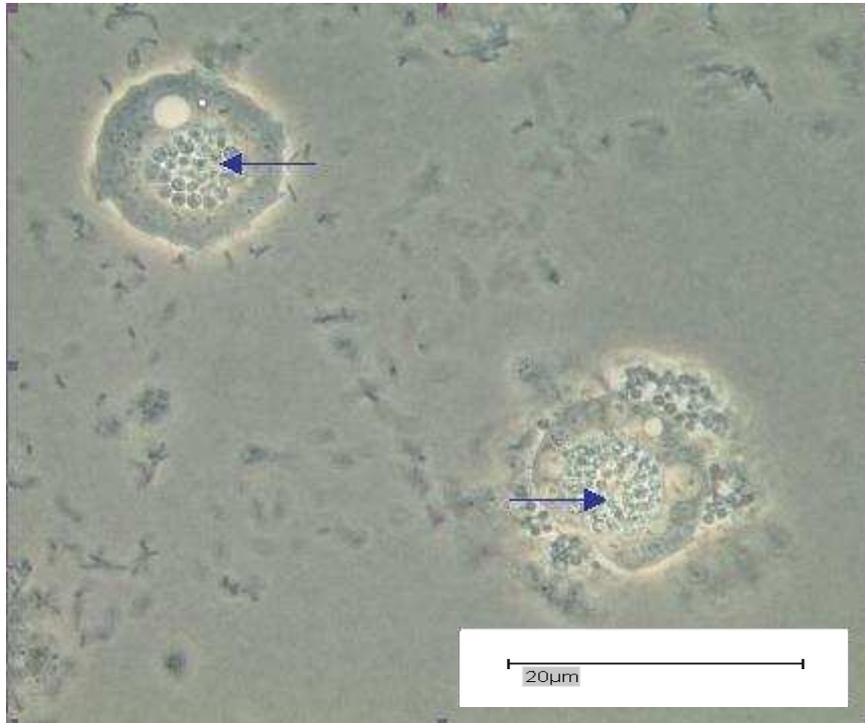


Abb.10: Kokkoide Sporen (Pfeile) im stark dilatierten Kern der Vannellen; Phasenkontrast; Bar 20μm



Abb.11: Kokkoide Sporen im Kern der Vannellen (Pfeil) sowie im Zytoplasma der Vannellen; Phasenkontrast; Bar 20μm

Während zu Beginn (**Abb.9**) noch ein einzelner Parasit im Kern zu erkennen war, lagen in der Folge zahlreiche Sporen nunmehr in der Amöbe vor, wobei lichtmikroskopisch nicht mehr eindeutig festzustellen war, ob die Sporen sich nunmehr (nur) im Kern oder im Zytoplasma der Vannellen befanden (**Abb. 10** und **11**). Die Weiterentwicklung der Endozytobionten inklusive Transport im Zytoplasma sowie Proliferation im Kern war nach 60 Minuten (Intervall 2) erfolgt. Hiernach erfolgte die Ruptur der Wirtsamöben, und die Infektionsphase begann erneut. Dies bedeutet, dass innerhalb einer Stunde nach Aufnahme der Sporen durch die Wirtsamöben die gesamte Entwicklung abgeschlossen war.

3.1.2 Nachweis der kokkoiden Parasitenstadien mittels Färbungen

Lichtmikroskopisch konnten die intrazellulären, kokkoiden Strukturen bereits dargestellt werden (siehe 3.1.1). Insbesondere zur weiteren Eingrenzung der Sporenherkunft sollten nunmehr erst einige Färbungen durchgeführt werden. Da molekularbiologische Untersuchungen bislang keine zielführenden Ergebnisse erbracht hatten, griffen wir in der vorliegenden Arbeit auf klassische Verfahren zurück. Denn die Morphologie und das färberische Verhalten von Mikroorganismen stellen wichtige Differenzierungsmerkmale dar. Ziel war, durch die Färbeergebnisse Hinweise auf die taxonomische Zugehörigkeit der Organismen zu erhalten.

3.1.2.1 Calcofluor-Färbung

Eine mit Amöbensaline abgeschwemmte Suspension von VanAun0 mit KAun1 einer „alten“ Platte (hier 1 Monat nach Infektion) bildet die Ausgangsbasis für die Calcofluor-Färbung (**Abb.12** und **13**). Die Aufnahmen zeigen intensiv fluoreszierende Sporen bei 400facher (**Abb.12**) und 1000facher (**Abb.13**) Vergrößerung. Die Aufnahmen mussten, insbesondere bei der 1000fachen Vergrößerung, sehr rasch angefertigt werden, da die Fluoreszenz äußerst schnell ausbleichte. Um herauszufinden, ob sich auch Sporen in noch intakten Amöben anfärben lassen, wurden 4 Tage alte Platten mit VanAu0 mit KAun1 ebenfalls mit Amöbensaline abgeschwemmt und diese Suspension mit Calcofluor angefärbt. Sehr auffällig sind in **Abb.14** die ausdifferenzierten Sporen in einer noch lebenden, jedoch muribunden Vannelle zu erkennen. **Abb.15** zeigt eine Vannelle kurz nach dem Absterben und der Ruptur. Umrisse der ursprünglichen Amöbe waren noch zu erkennen. Auch diese Aufnahmen mussten, insbesondere bei der 1000fachen Vergrößerung, sehr rasch angefertigt werden, da die Fluoreszenz äußerst schnell ausbleichte.

Die Aufnahmen lieferten somit weitere Hinweise, dass es sich bei den Parasiten nicht um Bakterien sondern eventuell um Pilze handeln könnte.

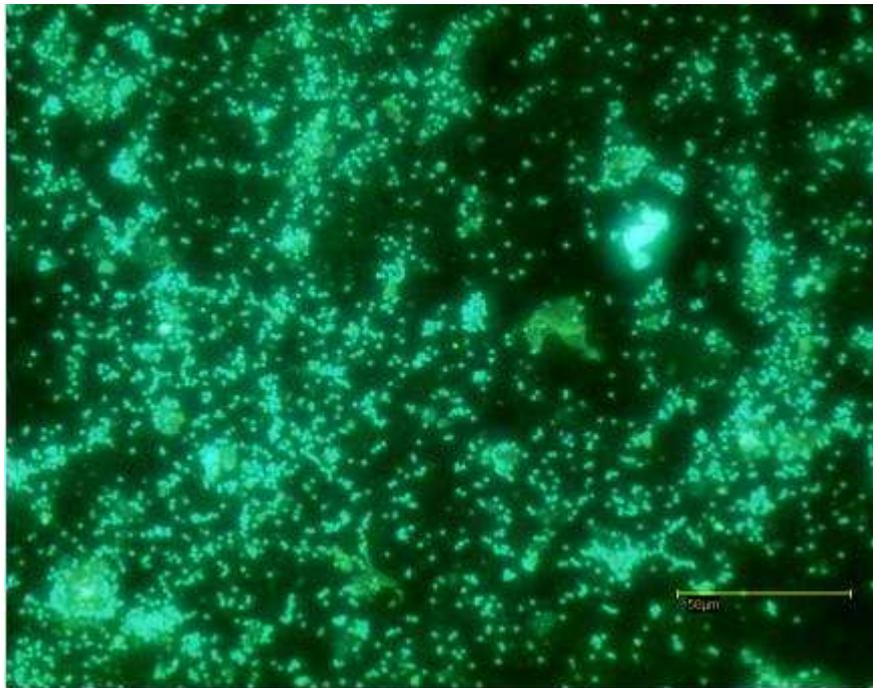


Abb.12 Sporen in einer Abschwemmung mit Amöbensaline von einer „alten“
Platte (1 Monat p.i.); 100-fache Vergrößerung; Fluoreszenz; Filter „D“; Bar: 50μm

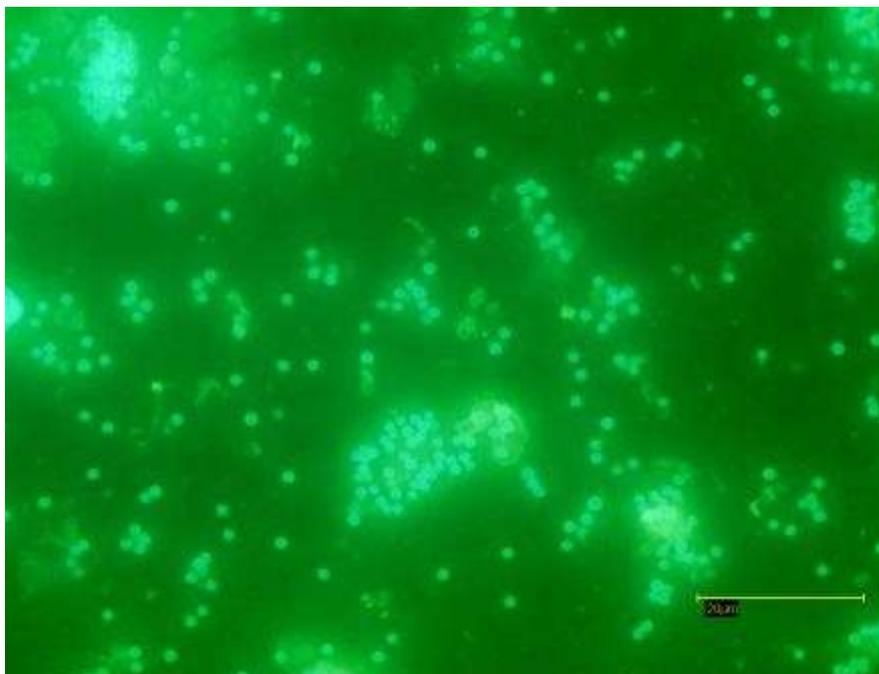


Abb.13: Sporen in einer Abschwemmung mit Amöbensaline von einer „alten“
Platte (1 Monat p.i.); 400-fache Vergrößerung; Fluoreszenz; Filter „D“; Bar: 20μm

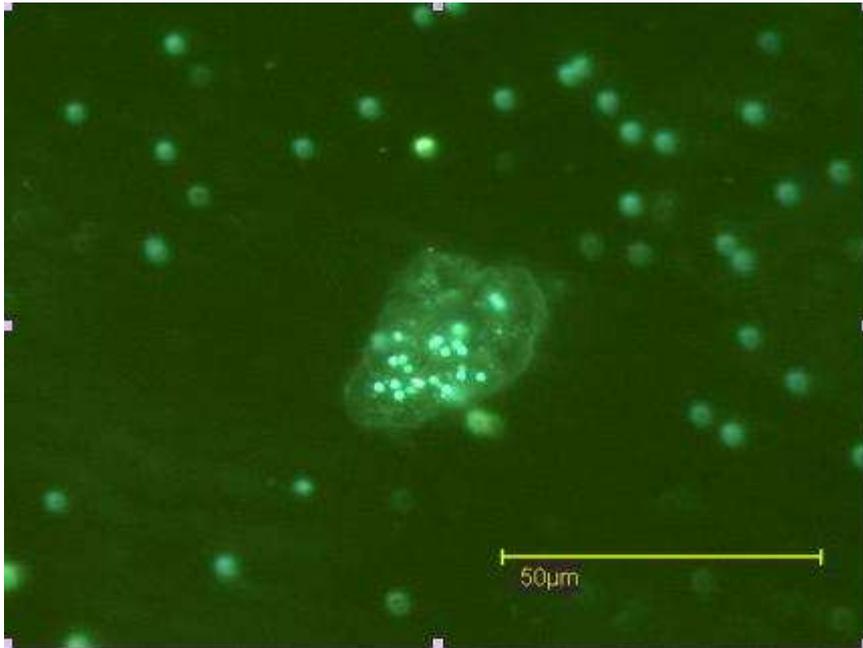


Abb.14: Vannellen-Trophozoiten mit ausdifferenzierten Sporen im Inneren;
Platten: 4 Tage p.i.; Fluoreszenz; Filter „D“; Bar: 50µm

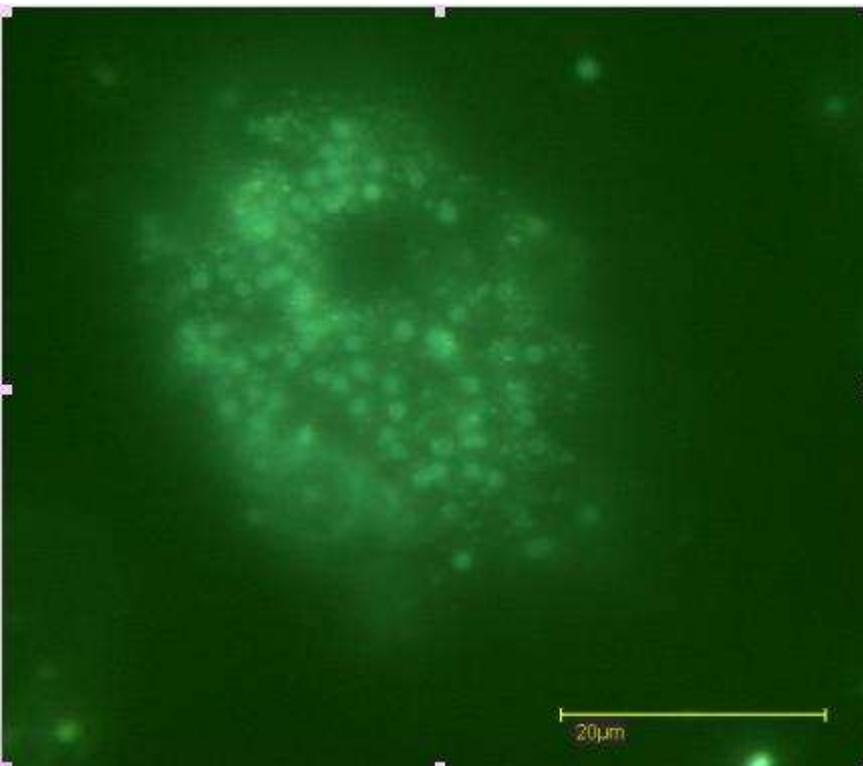


Abb.15: Vannellen-Trophozoiten mit ausdifferenzierten Sporen im Inneren;
Platten: 4 Tage p.i.; Fluoreszenz; Filter „D“; Bar: 20µm

3.1.2.2 Gramfärbung

Abb.16 und **17** zeigen die Ergebnisse der Gramfärbung. Die Sporen färbten sich rot an und konnten somit als gramnegativ eingeordnet werden. Die Färbung wurde 3-fach wiederholt. Viele Bakterien wurden in ähnlicher Farbe mitgefärbt. Die Färbung war kontrastarm. Nur aufgrund der Morphologie der Sporen war es möglich, diese überhaupt zu entdecken bzw. differenzieren.

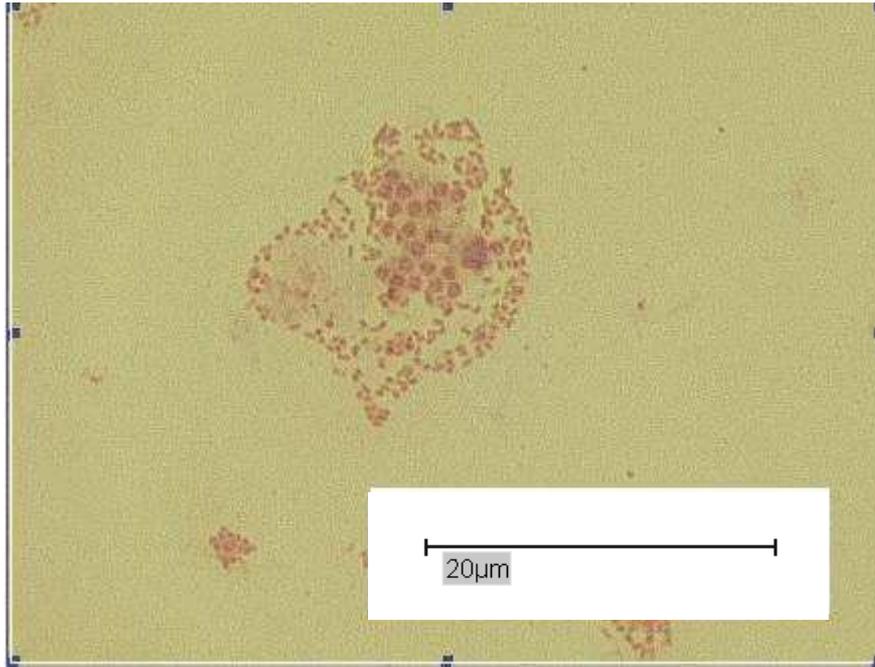


Abb.16 : Die Gramfärbung zeigte im Ergebnis die gramnegativen Sporen; Hellfeld-Durchlicht; Bar 20µm

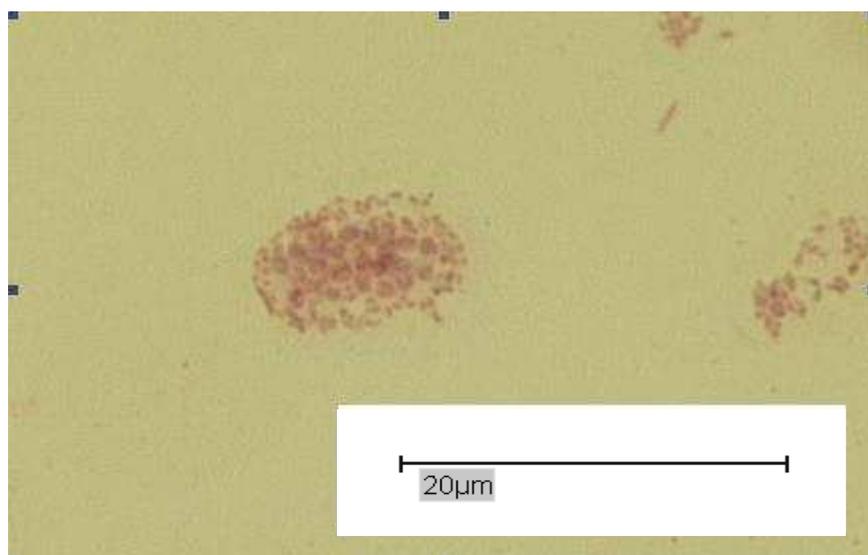


Abb.17: Die Gramfärbung zeigte im Ergebnis die gramnegativen Sporen; Hellfeld-Durchlicht; Bar 20µm

3.1.2.3 Giemsa-Färbung

Die Sporen ließen sich auch in der Giemsa-Färbung gut erkennen, und zwar freiliegend in der Amöbensaline (siehe **Abb.18**) sowie noch intrazellulär in abgeschwemmten und mitfixierten Wirtsamöben (siehe **Abb.19**).

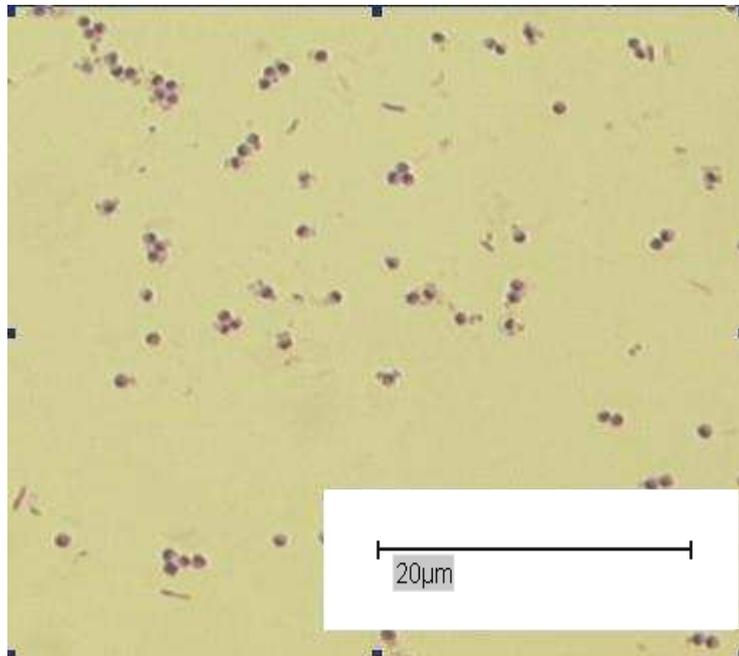


Abb.18: Einzelne Sporen nach Giemsa-Färbung; Hellfeld-Durchlicht; Bar 20μm

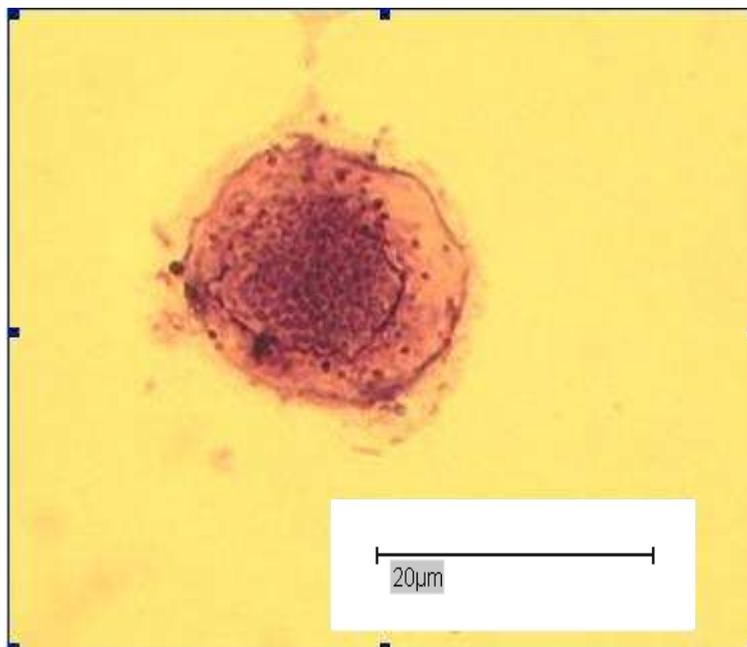


Abb.19: Sporen im Zellinneren; Sporoblast; nach Giemsa-Färbung; Hellfeld-Durchlicht; Bar 20μm

Die Färbeergebnisse waren zufriedenstellend, die Sporen ließen sich mit dieser Färbung gut nachweisen. Die Sporen färbten sich eher bläulich an.

3.1.2.4 Diff-Quick-Färbung

Aufgrund der bläulichen Farbe, im Gegensatz zu den eher rot angefärbten Bakterien, sollte der Kontrast bei dieser Färbung erhöht werden, was die Sporensuche deutlich einfacher machen sollte.

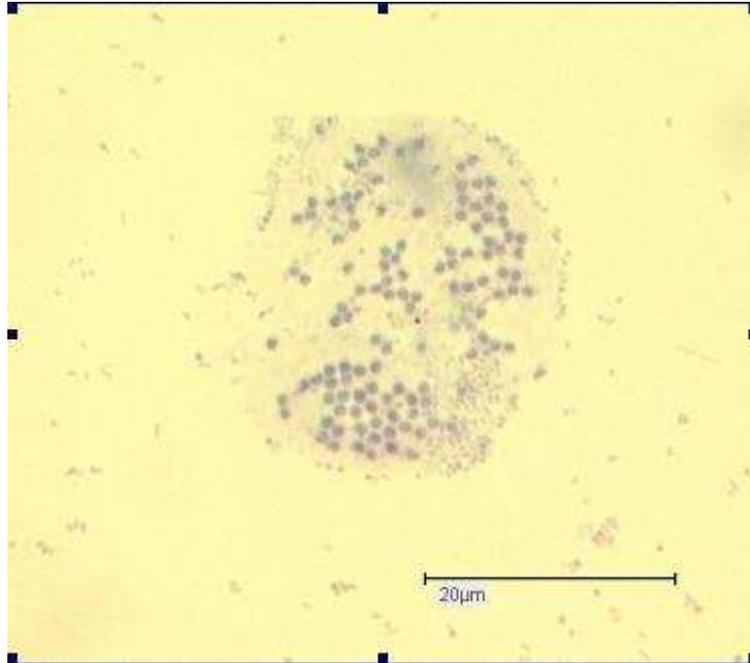


Abb.20: Sporenhaufen nach Diff-Quick-Färbung; Hellfeld-Durchlicht; Bar: 20μm

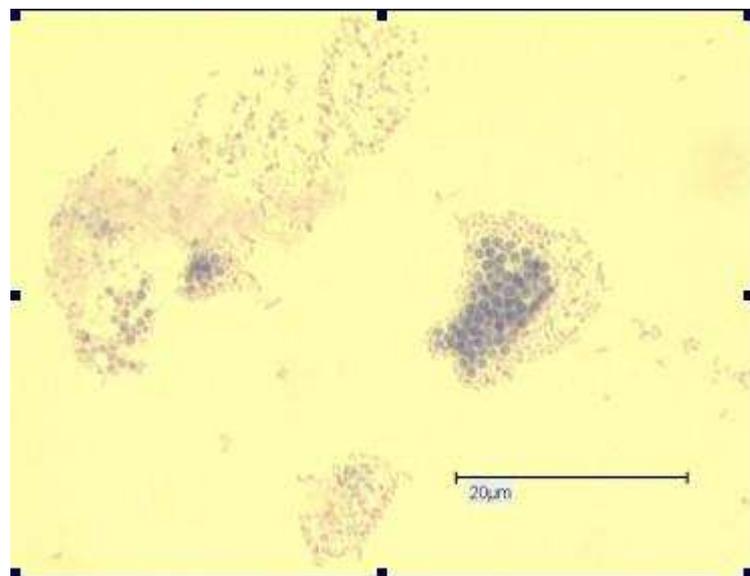


Abb.21: Sporenhaufen bzw. einzelne Sporen nach Diff-Quick-Färbung; Hellfeld-Durchlicht; Bar: 20μm

Die Ergebnisse dieser Schnellfärbemethode für Blutparasiten ähnelten zwar denen der Giemsa-Färbung. Die Anfärbung der Sporen war jedoch deutlich blasser. Eine Innenstruktur war nicht erkennbar (**Abb.20** und **21**).

3.1.2.5 Kinyoun-Färbung (Tan-Thiam-Hok Verfahren)

Die Ergebnisse mit der Färbung für säurefeste Stäbchen (Hok 1952) zeigten durchweg eine schwache bis blasse Färbung der Sporen. Die Innenstrukturen waren nicht erkennbar. Es erforderte relativ lange Durchmusterungszeiten, bis es gelang, die Sporen wie in **Abb.22** und **23** darzustellen.

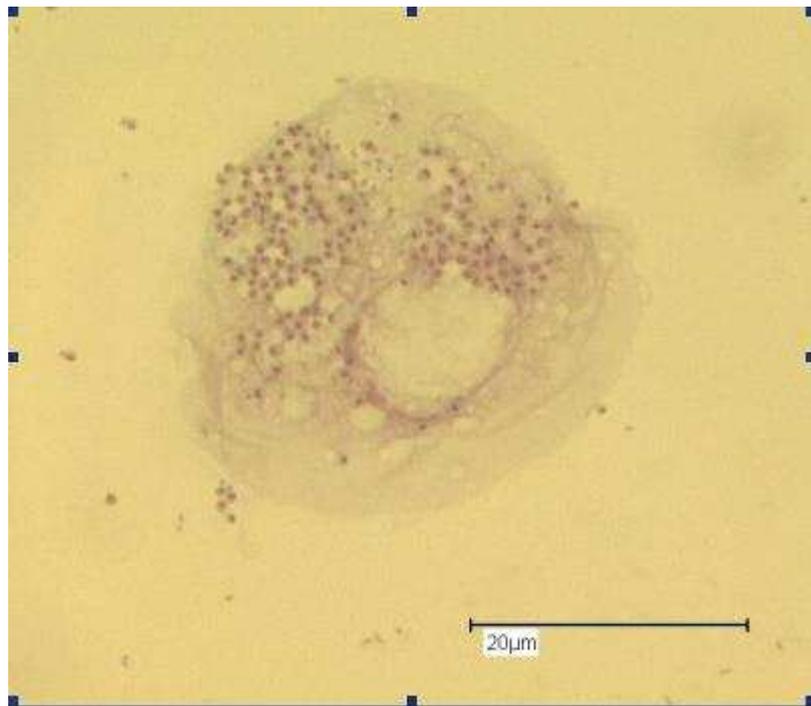


Abb.22: Sporen im Zellinnern (Kinyoun-Färbung); Hellfeld-Durchlicht; Bar 20μm

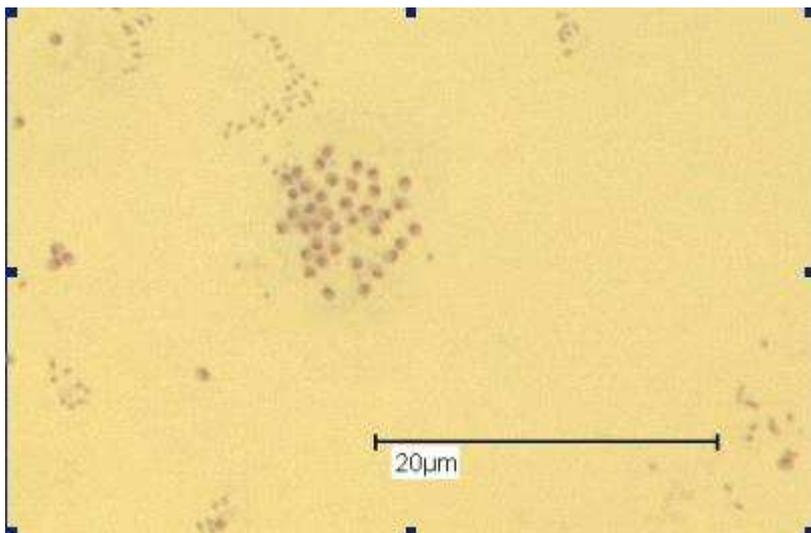


Abb.23: Einzelne Sporen (Kinyoun-Färbung); Hellfeld-Durchlicht; Bar 20μm

Inbesondere die Kontrastarmut erschwerte die Suche nach den kokkoiden Sporen. Eine säurefeste Hülle, wie etwa bei den Cryptosporidien, war offensichtlich nicht vorhanden.

3.1.2.6 Trichromfärbung

Als Ergebnis dieser sonst sehr differenzierenden Färbung war auf den **Abb. 24** und **25** eine sehr schwache, zart rosa Anfärbung der Sporen festzustellen. Innenstrukturen waren nicht erkennbar. Das Auffinden der Sporen war bei dieser Färbung deutlich diffiziler als bei Giemsa- oder Calcofluor-Färbung.

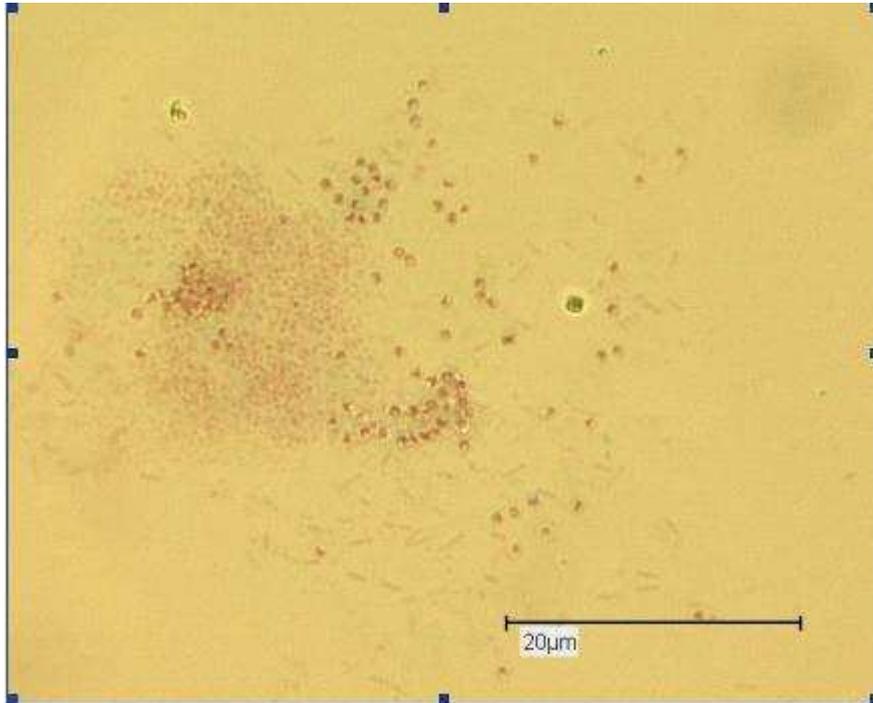


Abb.24: Einzelne Sporen nach Trichromfärbung; Hellfeld-Durchlicht; Bar: 20μm

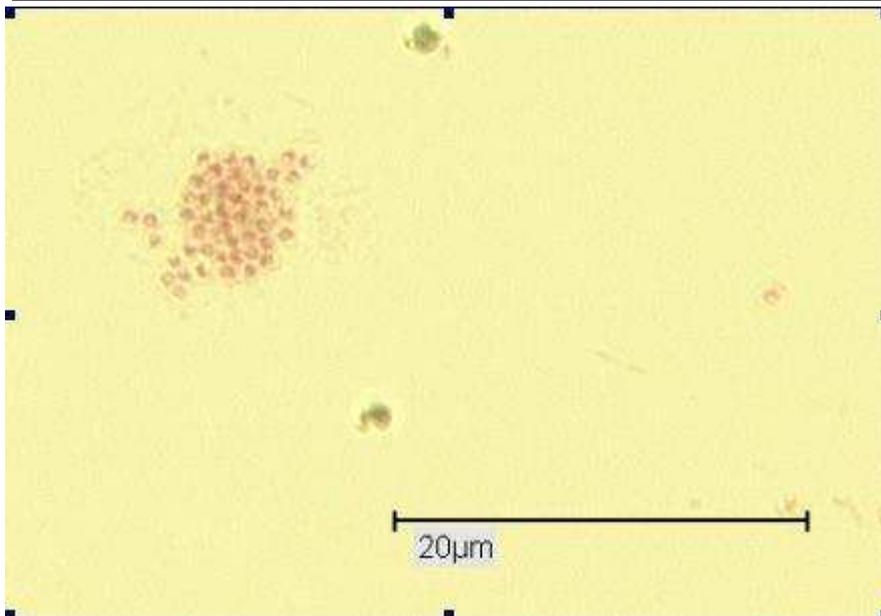


Abb.25: Sporenhaufen nach Trichromfärbung; Hellfeld-Durchlicht; Bar 20μm

3.1.2.7 Modifizierte Trichromfärbung

Auch mit der modifizierten Trichromfärbung waren die Ergebnisse ähnlich denen mit der Standard-Trichromfärbung (siehe **Abb. 26** und **27**). Eine Verbesserung der Färbeintensität oder eine bessere Auflösung der Innenstrukturen waren auch bei der Wiederholung der Färbung nicht erreichbar.

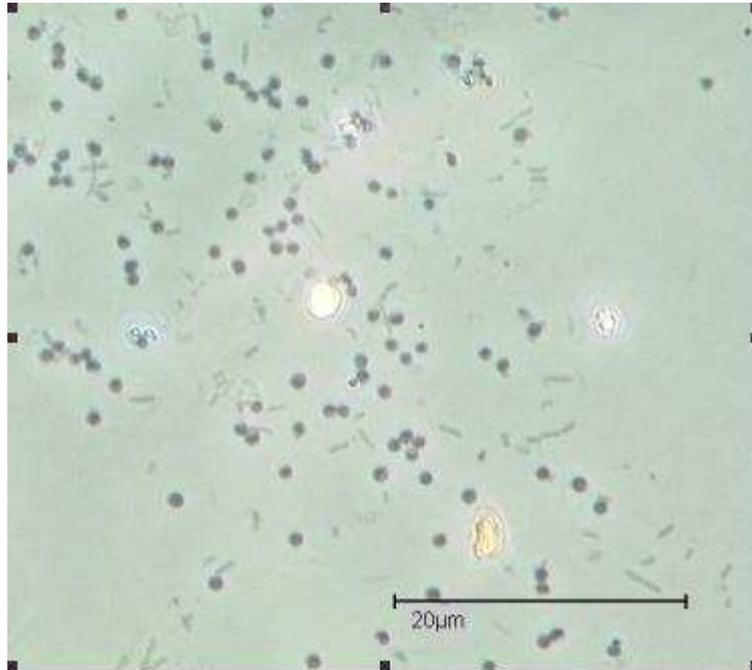


Abb.26: Einzelne Sporen nach der modifizierten Trichromfärbung; Phasenkontrast; Bar: 20 µm

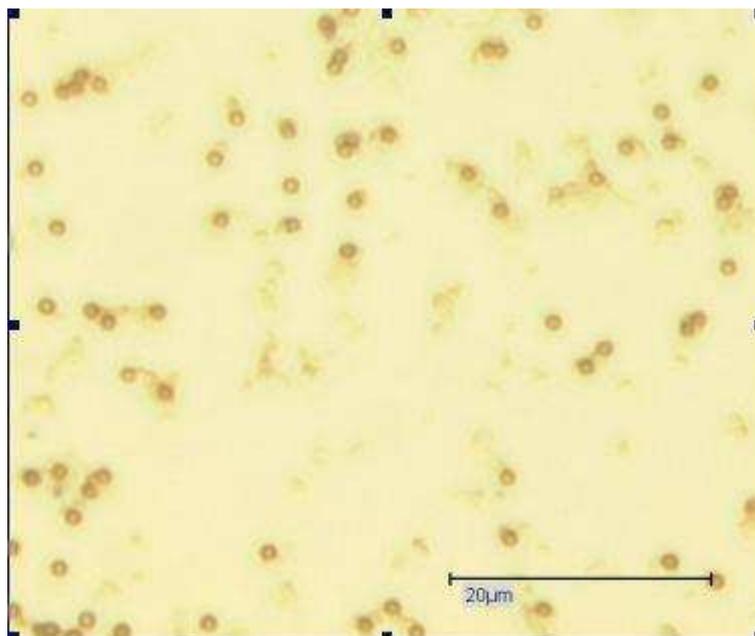


Abb.27: Einzelne Sporen nach der modifizierten Trichromfärbung; Hellfeld-Durchlicht; Bar: 20 µm

3.2 Invasionsweg der Endozytobionten in die Wirtsamöben (Vannellen): Lichtmikroskopische Ergebnisse

Zur detaillierteren Darstellung des Invasionsweges bzw. Invasionsvorganges sowie zum Erkennen von Zwischenstadien o.ä. wurden nach diesen initialen zahlreichen, deskriptiven Färbeversuchen weitere lichtmikroskopische Aufnahmen (z.B. Zeitrafferaufnahmen) angefertigt. In diesen Folgeuntersuchungen konnte alsbald eine Art Anhäufung bzw. Adhäsion der Sporen an der Zellmembran der Vannellen beobachtet werden (siehe **Abb.28**). Durch Zeitrafferaufnahmen und die lichtmikroskopische Beobachtung der infizierten Amöben auf der Kulturplatte selbst, konnte bestätigt werden, dass der Infektionszyklus mit der Phagozytose der kokkoiden Stadien durch die Wirtsamöbe *Vannella* sp., VanAun0 begann.

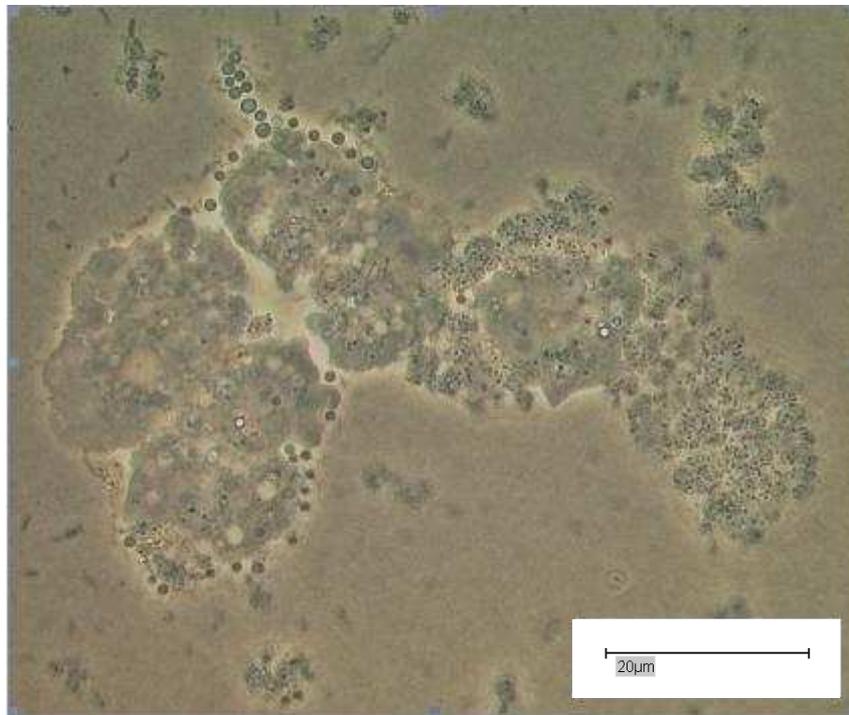


Abb.28: Mehrere Vannellen mit an der Zellwand adhärennten Sporen, Sporen im Zytoplasma sowie bei der Aufnahme in die Amöbe durch Phagozytose; Phasenkontrast, Bar: 20 µm

Bei dieser Phagozytose wurde die partikuläre Nahrung (hier: Sporen) in einer vorübergehenden Einstülpung umflossen und schließlich ganz eingeschlossen. Die aufzunehmenden Partikel wurden zunächst an der Zellmembran angelagert, dann wurden sie unter Food-Cup-Bildung von der Zellmembran umschlossen und als geschlossene Bläschen nach innen gestülpt (**Abb.29**). Nach dem Stadium dieser Aufnahme konnten die Sporen in Vakuolen im Zytoplasma wiedergefunden werden (siehe auch **Abb.9**). Anschließend zeigte sich die Infektion des Kerns (**Abb.30** und **31**). Stadien, die darauf hindeuteten, dass auch das Endosom (Karyosom) hierbei betroffen war, wurden lichtmikroskopisch nicht beobachtet.

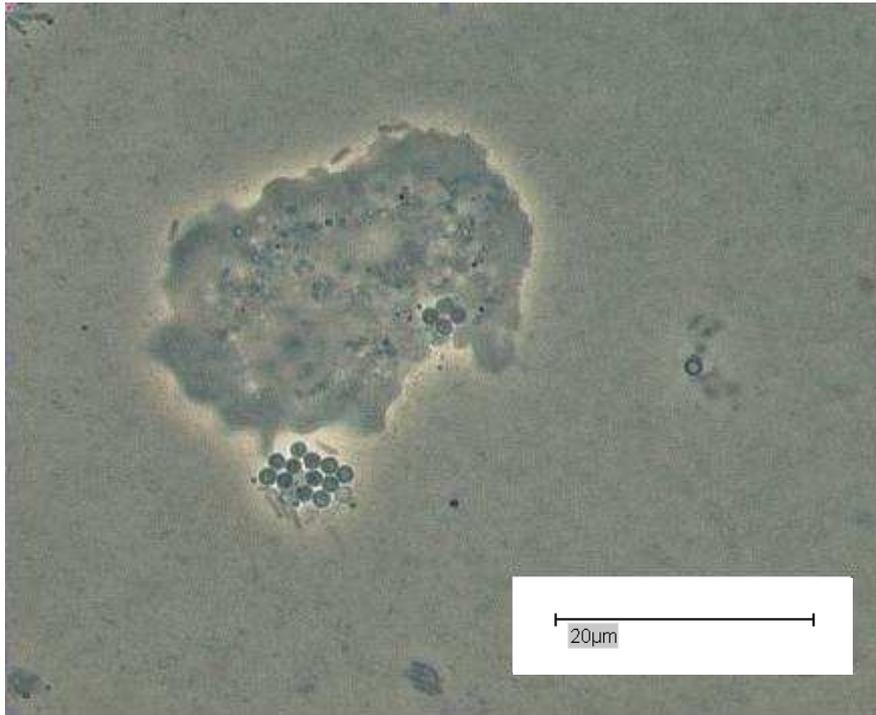


Abb.29: Vannelle bei der Phagozytose von vier Sporen durch Food-Cup-Bildung und Annäherung an einen weiteren Sporenhaufen; Phasenkontrast; Bar: 20 μm

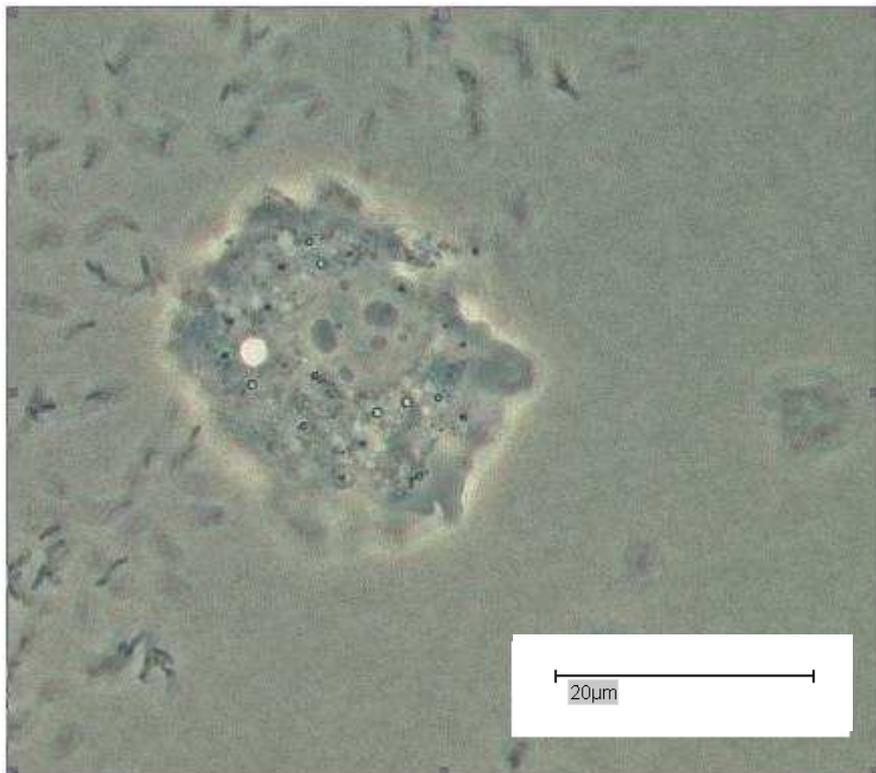


Abb.30: Vannellen-Trophozoit mit ersten Endozytobiontenstadien im Kern; dieser in Teilung befindlich; Phasenkontrast; Bar: 20 μm

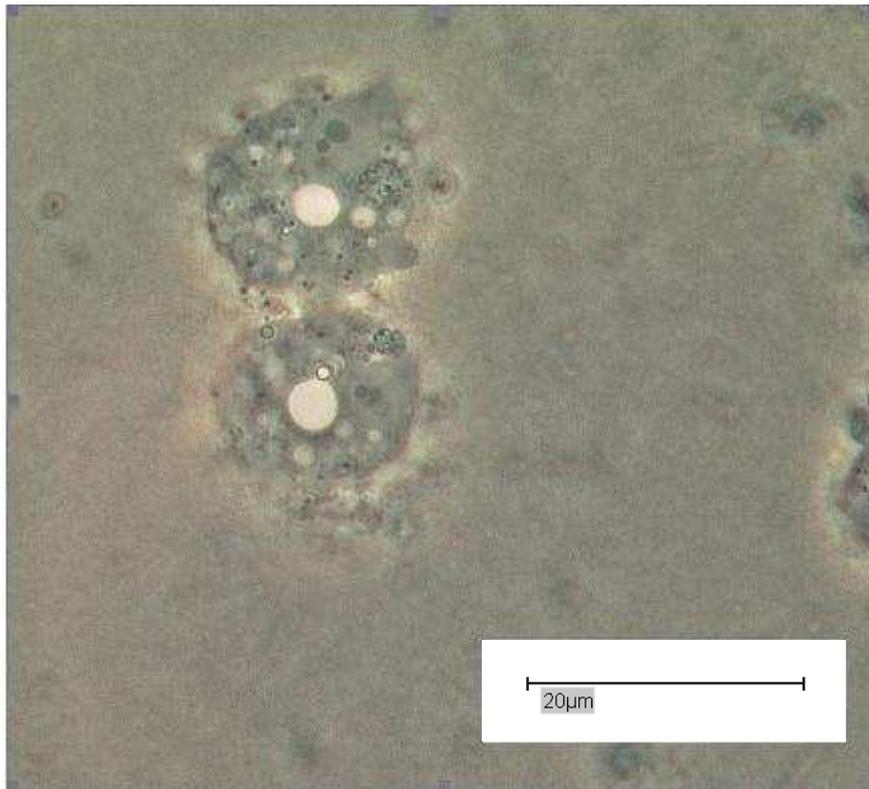


Abb.31: Erste Endozytobiontenstadien im Kern zweier Vannellen-Trophozoiten; Phasenkontrast; Bar 20μm

Abb.32 und **33** belegen, dass sich die Entwicklung im Zellkern fortsetzte, der in der Folge durch starkes Größenwachstum die Kernmembran dehnte und schließlich fast das gesamte Zellinnere der Amöbentrophozoiten ausfüllte. Offensichtlich fand im Kern eine Vermehrung bzw. Proliferation der Eindringlinge statt.

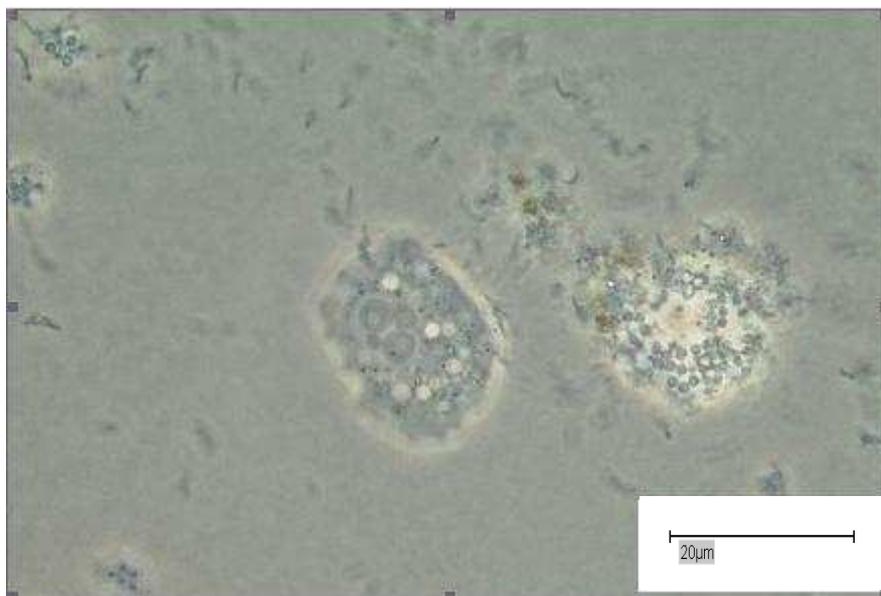


Abb.32: Vannellen-Trophozoiten mit weiter ausdifferenzierten Parasiten; die Kernmembran ist gedehnt, aber noch deutlich zu erkennen; Phasenkontrast; Bar: 20 μm

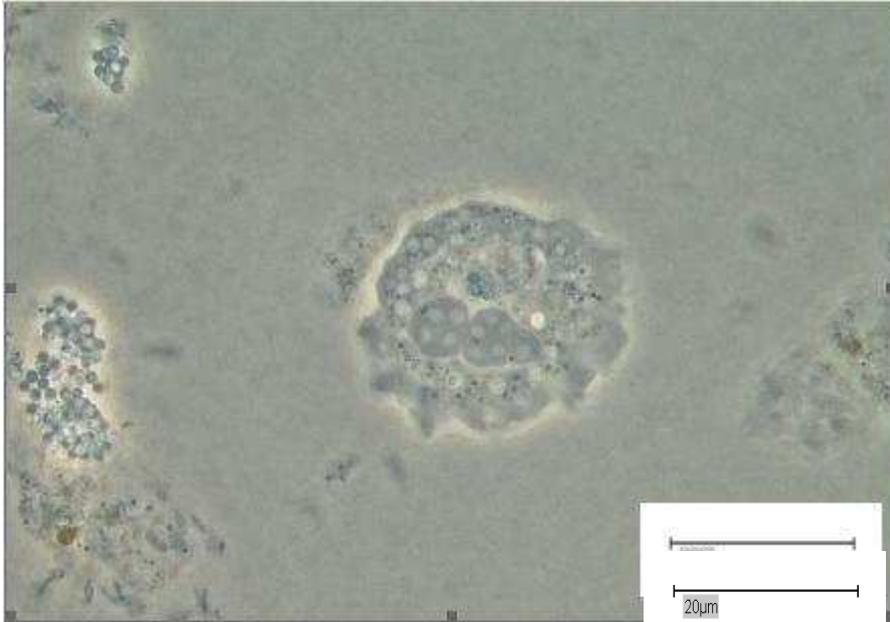


Abb.33: Vannellen-Trophozoiten mit weiter ausdifferenzierten Parasiten; die Kernmembran ist gedehnt, aber noch deutlich zu erkennen; Phasenkontrast; Bar: 20 µm

Weitere Differenzierungsstadien der Endozytobionten im Kern zeigen die **Abb.34, 35** und **36**. Hier handelte es sich um den Befall mit gleich mehreren Endozytobionten im Kern.

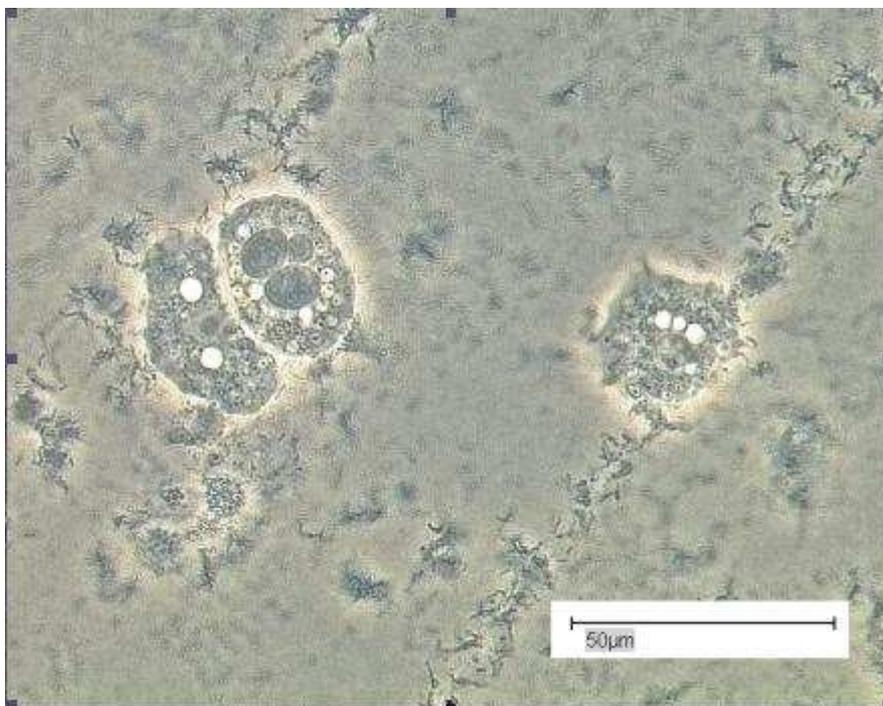


Abb.34 Vannellen-Trophozoiten mit Endozytobiontenbefall im Kern; verschiedene Stadien; Phasenkontrast; Bar: 50 µm

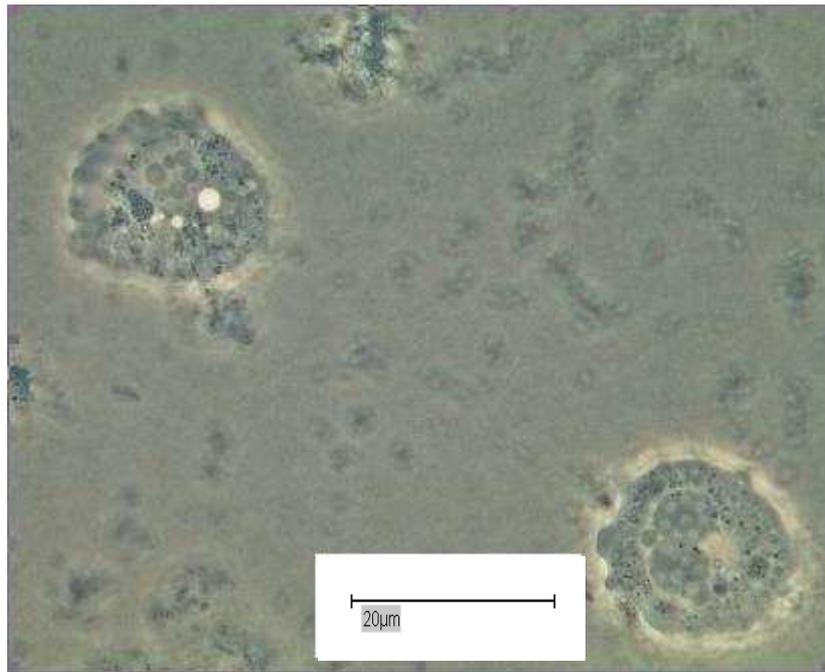


Abb.35: Zwei Vannellen-Trophozoiten mit Endozytobiontenbefall im Kern; bei der unteren Amöbe waren mehrere Endozytobionten zu erkennen; Phasenkontrast; Bar: 20 μm

Die Hypertrophierung des Kerns wurde nunmehr immer deutlicher, was sich in einem starken Größenwachstum der Wirtsamöbe manifestierte. Selbst wenn bereits Endozytobiontenstadien im Kern sichtbar waren, wurden weitere Sporen durch Phagozytose aufgenommen und anschließend im Zytoplasma der Amöbe wiedergefunden.

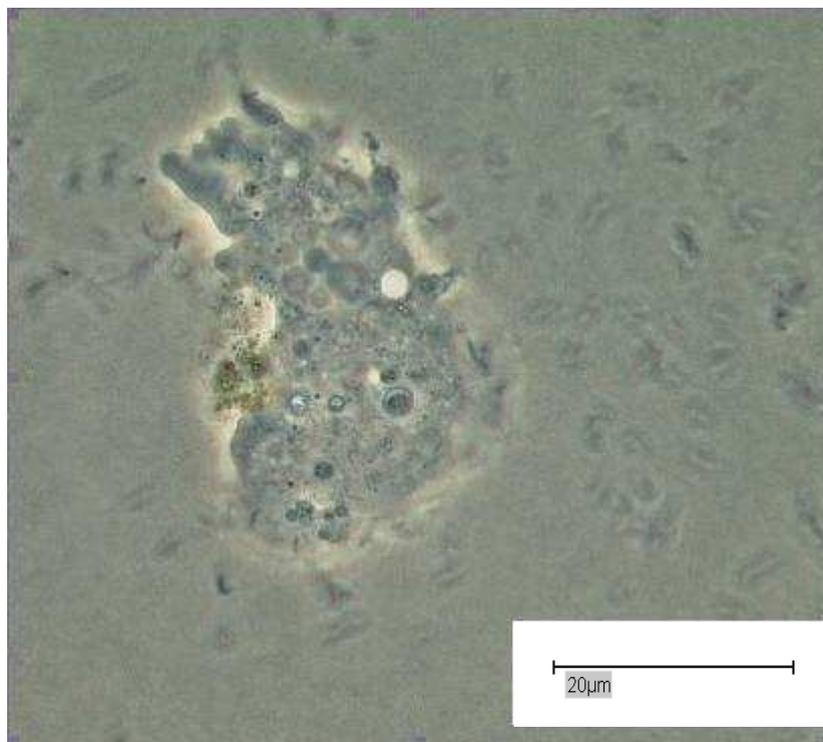


Abb.36: Vannellen-Trophozoit, der sowohl Endozytobiontenstadien im Kern als auch innerhalb des Zytoplasmas enthielt; Phasenkontrast; Bar: 20 μm

Deutlich sind die Amöben mit Kernstadien sowie kürzlich aufgenommenen Sporen im Zytoplasma (**Abb.36**) zu erkennen, ebenso wie Amöben mit Kernstadien und zahlreiche an der Zellmembran adhären Sporen (**Abb.371**).

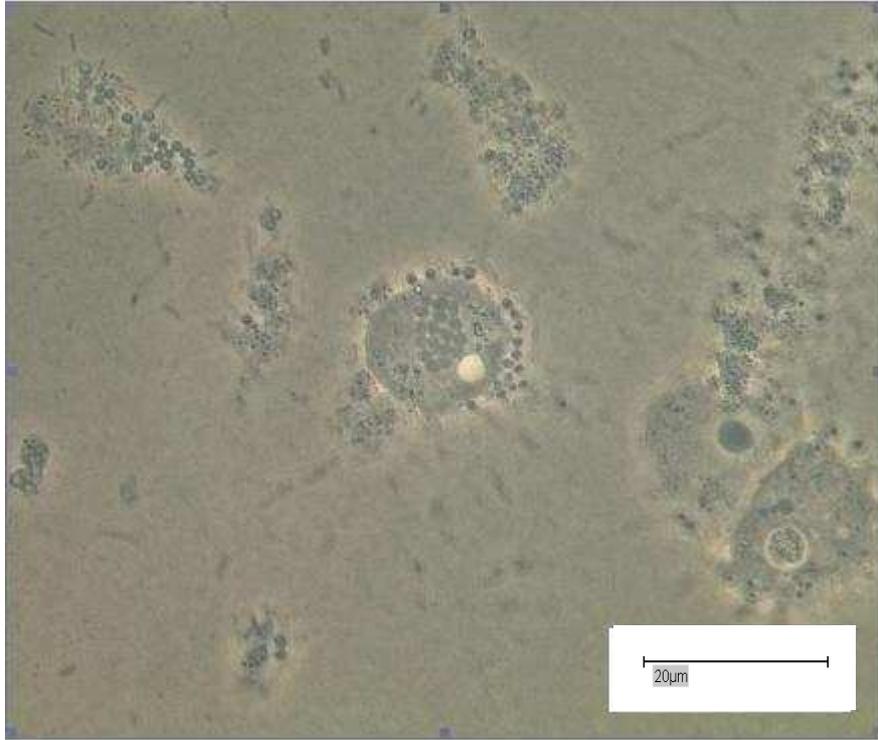


Abb.37: Vannellen-Trophozoit mit Endozytobionten im Kern sowie Sporen an der Zellmembran angelagert; Phasenkontrast; Bar: 20 µm

Zusammenfassend war festzustellen, dass die polymorphen Endozytobiontenstadien im Kern heranwuchsen, bis schließlich das gesamte Kerninnere bis auf das Endosom ausgefüllt war. Die Ausdehnung erfolgte durch Dilatation der Kernmembran, bis ein Großteil der Amöbe mit Ausnahme eines Plasmasaums mit Parasitenstadien gefüllt war.

Die Zeitabläufe/Wachstumsraten konnten auch bei diesen Untersuchungsreihen bestätigt werden. Die Aufnahme der Sporen durch die Wirtsamöben erfolgte unmittelbar nach der Kokultivierung. Phagozytierte Sporen wurden bereits 3-5 Minuten nach Kokultivierung in den Vannellen nachgewiesen. Weiterentwickelte Stadien zeigten sich bereits nach ca. 1 Stunde, deutlich häufiger jedoch in den späteren Zeitintervallen (bis 8 Stunden). Die ersten Beobachtungen konnten also auch in Bezug auf die Wachstumsraten bestätigt werden.



Abb.38: Vannelle nach Ruptur und Freisetzung der Sporen; die Umrisse der Amöbe waren noch zu erkennen; Phasenkontrast; Bar: 20 µm

Daraufhin folgte die Ruptur der Amöbe und die Freisetzung der Sporen (**Abb.38**). Die Umrisse der infizierten Amöben waren auf der Agar-Oberfläche noch als (sporengefüllte) Plaques zu erkennen, die wiederum aus vielen infektiösen Sporen bestanden (**Abb.39** und **40**).

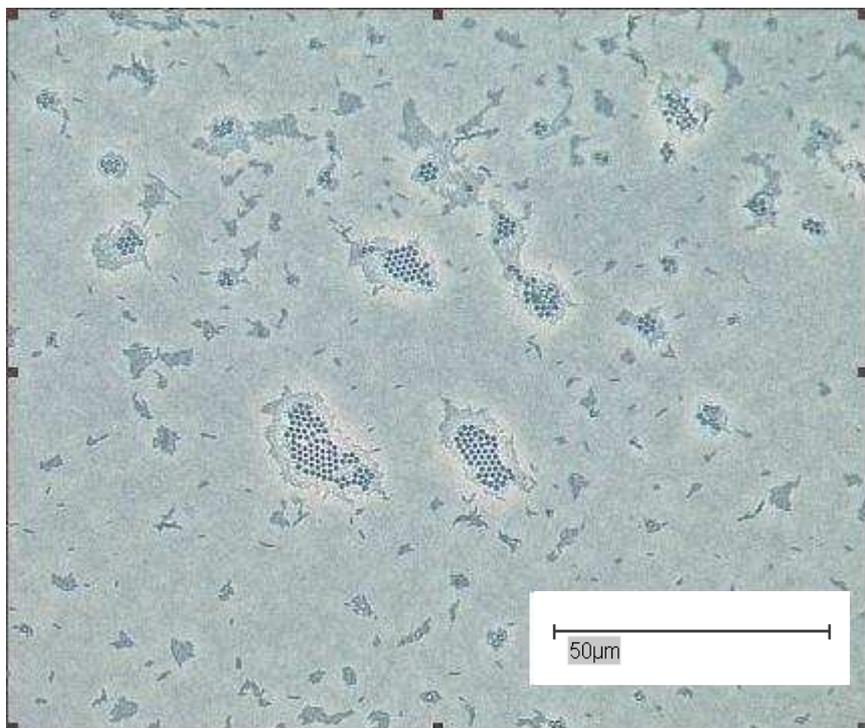


Abb.39: Sporen-Plaques der ruptierten Amöben; die Zellstrukturen der Vannellen waren nicht mehr zu erkennen. Ältere Platten waren übersät mit solchen Plaques; Phasenkontrast; Bar: 50 µm

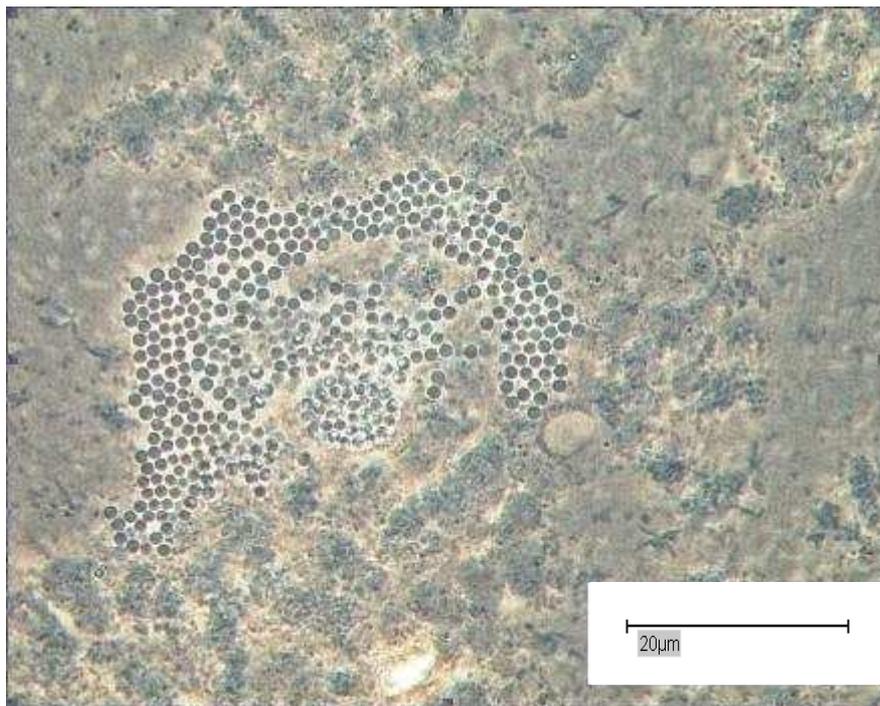


Abb.40: Sporen-Plaques der ruptierten Amöben; die Zellstrukturen der Vannellen waren nicht mehr zu erkennen. Ältere Platten waren übersät mit solchen Plaques; Phasenkontrast; Bar: 20 μm

Diese Plaques bildeten wiederum das Ausgangsmaterial für die Überimpfung auf Vannellen-Reinkulturen zur Passagierung im Rahmen der Stammhaltung, zu Infektionsversuchen oder zur weiteren Beobachtung der intranukleären Endozytobionten. Insbesondere aber dienten sie zur Anfertigung von ausreichend Ausgangsmaterial für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen. Diese wiederum sollten Aufschluss über die Vorgänge an und in den Vannellen, über den Invasionsweg der Endozytobionten in die Wirtsamöben geben und dazu beitragen, die Endozytobionten systematisch (taxonomisch) aufgrund ihrer Morphologie einordnen zu können.

3.3 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen zur Untersuchung des Invasionsweges der Endozytobionten in die Wirtsamöben (Vannellen)

Nachdem die lichtmikroskopischen Untersuchungen eindeutig eine Vermehrung der sich entwickelnden Endozytobionten im Kern gezeigt hatten, sollte der Infektionsweg auch transmissionselektronenmikroskopisch genauer untersucht werden. Insbesondere die Art der Aufnahme, der Weg durch das Zytoplasma der Wirtsamöbe in deren Zellkern und die Einzelheiten der Sporendifferenzierung im Karyoplasma sollten in dieser Untersuchungsphase näher betrachtet werden.

Zudem sollte versucht werden, morphologisch bereits Hinweise auf eine systematische Zuordnung der Endozytobionten zu finden. Die Zeitintervalle wurden in Anlehnung an die Ergebnisse bei den lichtmikroskopischen Untersuchungen mit 0,5, 1, 2, 4, 8 und 24 Stunden nach Kokultivierung festgelegt. Im Folgenden sind die Ergebnisse durch elektronenmikroskopische Aufnahmen dokumentiert:

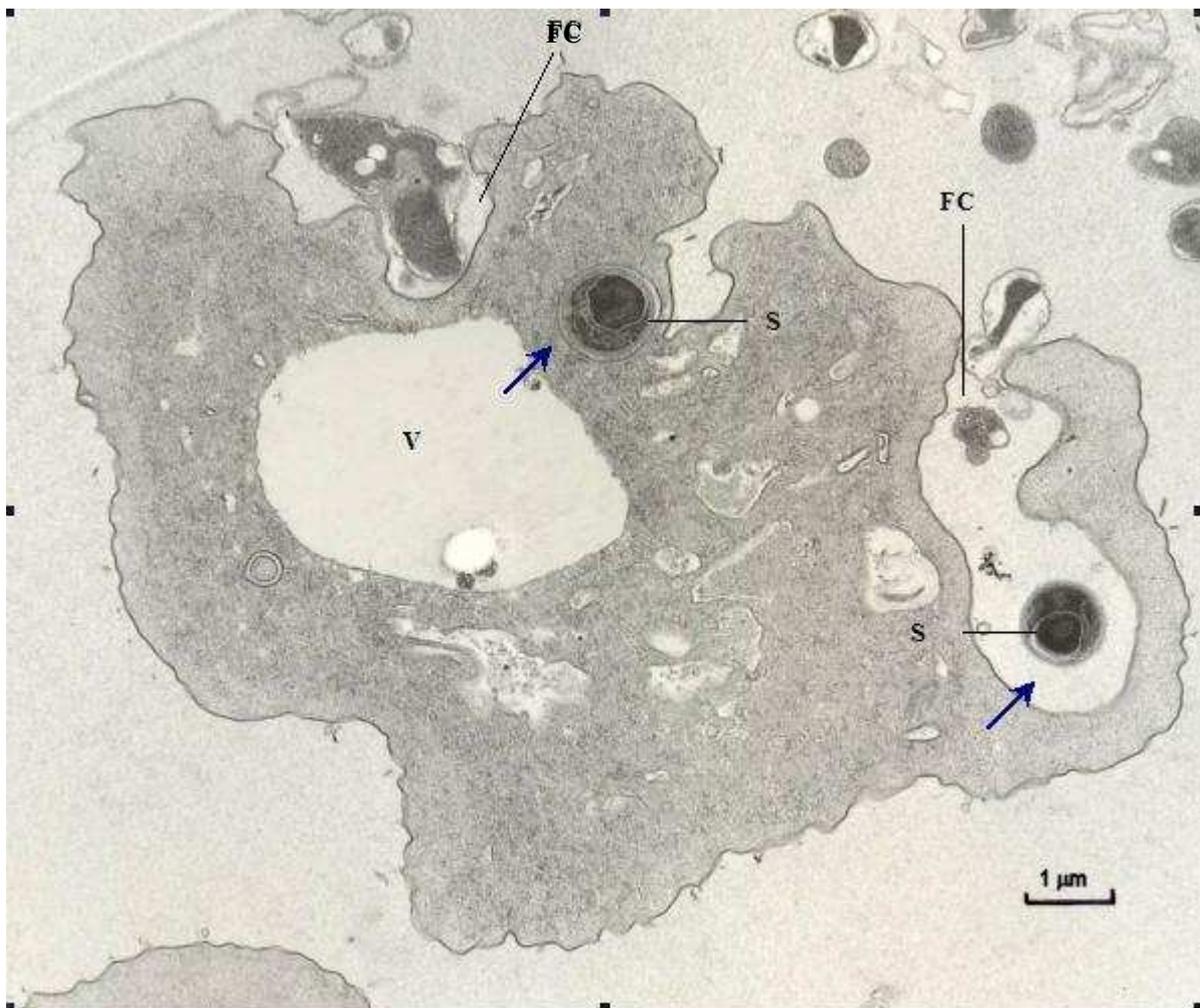


Abb.41: *Vannella* sp. bei der Aufnahme (Pfeil) einer Spore (S) unter Food-Cup-Bildung (FC). Eine weitere Spore (Pfeil) ist bereits ingestiert worden und befindet sich im Zytoplasma; deutlich ist der hyaline Saum im Bereich der Food-Cup zu erkennen; V: Vakuole; Bar: 1µm

Mit Adhäsion und Phagozytose begann die Ingestion. Eine ausgeprägte Food Cup – Bildung war erkennbar (Abb.41 auf der rechten Seite). Eine weitere Spore wurde gerade via Phagozytose aufgenommen, die Zellmembran der Wirtszelle hatte sich hinter der ingestierten Spore wieder geschlossen, die Spore befand sich daher bereits im Zytoplasma der Vannelle.

Die helle Zone nahe der Zellmembran im Bereich der Food Cup deutete auf Mikrofilamentnetze hin.

Ein aktiver Vorgang zum Eindringen in die Wirtszelle konnte auch elektronenmikroskopisch nicht beobachtet werden. Vielmehr konnte auch hier die Aufnahme der Sporen ausschließlich durch Phagozytose nachgewiesen werden. Die lichtmikroskopisch gewonnenen Erkenntnisse konnten also diesbezüglich zweifelsfrei bestätigt werden.

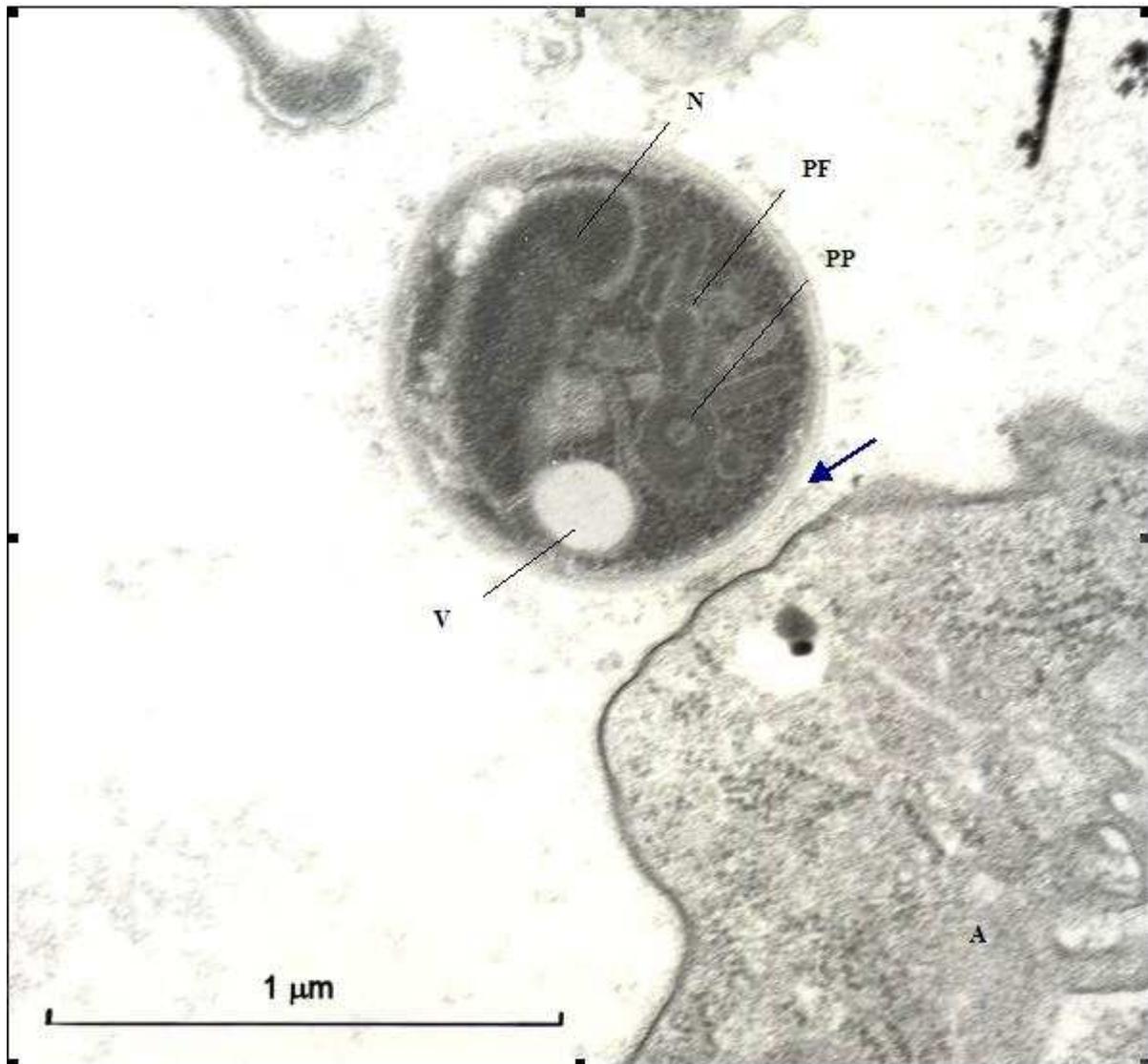


Abb.42: Spore außerhalb der Vanelle an der Zellmembran; Fibrilläre Strukturen (Pfeil) sind zwischen Spore und Zellmembran zu erkennen; die Innenstruktur der Spore deutlich erkennbar; N: Kern; PP: Polaroplast; PF: Polarfilament; V: Vakuole; A: Wirtsamöbe; Bar: 1µm

Abb.42 zeigt eine Spore außerhalb der Vanelle. Die morphologischen Kriterien dieser Sporen zeigten sehr große und eindeutige Ähnlichkeiten zu Mikrosporidiensporen.

Der Sporendurchmesser variierte von 0,9 bis 1,1µm und betrug im Durchschnitt 1,03 µm (s = 0,62).

Deutlich zu erkennen war der große Kern, ein im Vergleich zu den bekannten Mikrosporidien eher irregulär arrangiertes Polarfilament und die Vakuole sowie der Polaroplast (vgl. **Abb.6**).

Der Kerndurchmesser betrug im Durchschnitt (Mittelwert) $0,6\mu\text{m}$ ($s = 0,05$).

Der Polaroplast hatte einen Durchmesser von $0,2\text{-}0,3\mu\text{m}$ (Mittelwert $0,25\mu\text{m}$; $s = 0,03$), die Vakuole einen solchen von $0,25\mu\text{m}$ im Durchschnitt ($s = 0,03$). Das Polarfilament zeigte Dicken von $0,04$ bis $0,07\mu\text{m}$ (Mittelwert: $0,6\mu\text{m}$; $s = 0,01$).

Die Sporenhülle zeigte deutlich eine Unterteilung in die elektronendichte Exospore und die elektronenlichte Endospore. Die Dicke der Sporenwand betrug $0,02$ bis $0,04\mu\text{m}$ (Mittelwert $0,03\mu\text{m}$; $s = 0,01$).

Aufgrund dieser nachgewiesenen morphologischen Besonderheiten wurden die Endozytobionten in der Folge auch als Mikrosporidien- ähnliche Organismen oder „Microsporidian like organisms“ (MLO) bezeichnet.

Charakteristisch war wiederum das Fehlen von Glycostyli auf der Zellmembran dieser Vannellenspezies (**Abb.42**). Diese Glycostyli stellen eigentlich ein typisches Merkmal der Gattung *Vannella* dar (siehe 1.1.4). Eine Art Glycocalyx, die hier evtl. durch einen „simple fuzzy coat“ gebildet wird, lag der Zellmembran auf.

Die erkennbaren fibrillären Strukturen wiesen auf eine Adhäsion der Sporen an der Amöbenmembran hin.

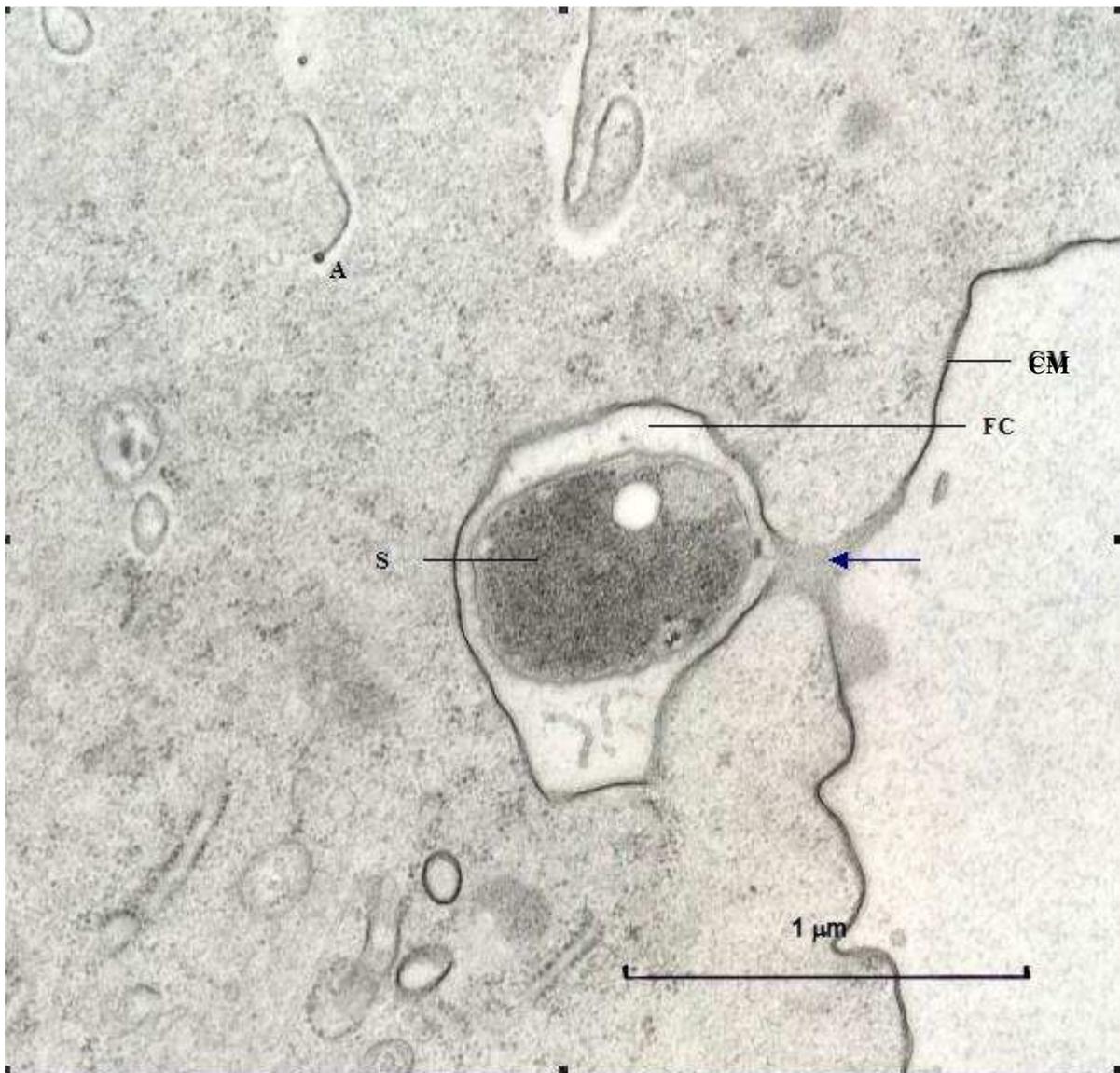


Abb.43: Nach Aufnahme der Spore in der Food Cup (FC) schließt sich die Zellmembran (CM) wieder (Pfeil) und die Spore (S) wird in einer Vakuole ins Amöbenzytoplasma aufgenommen; A: Wirtsamöbe; Bar: 1 μ m

Die Zellmembran floss nach erfolgter Food-Cup-Bildung und Aufnahme der Spore wieder zusammen (**Abb.43**). Die Spore befand sich anschließend im Zytoplasma der Amöben. Hier war wiederum deutlich zu erkennen, dass die Amöbe nicht über Glycostyli verfügte.

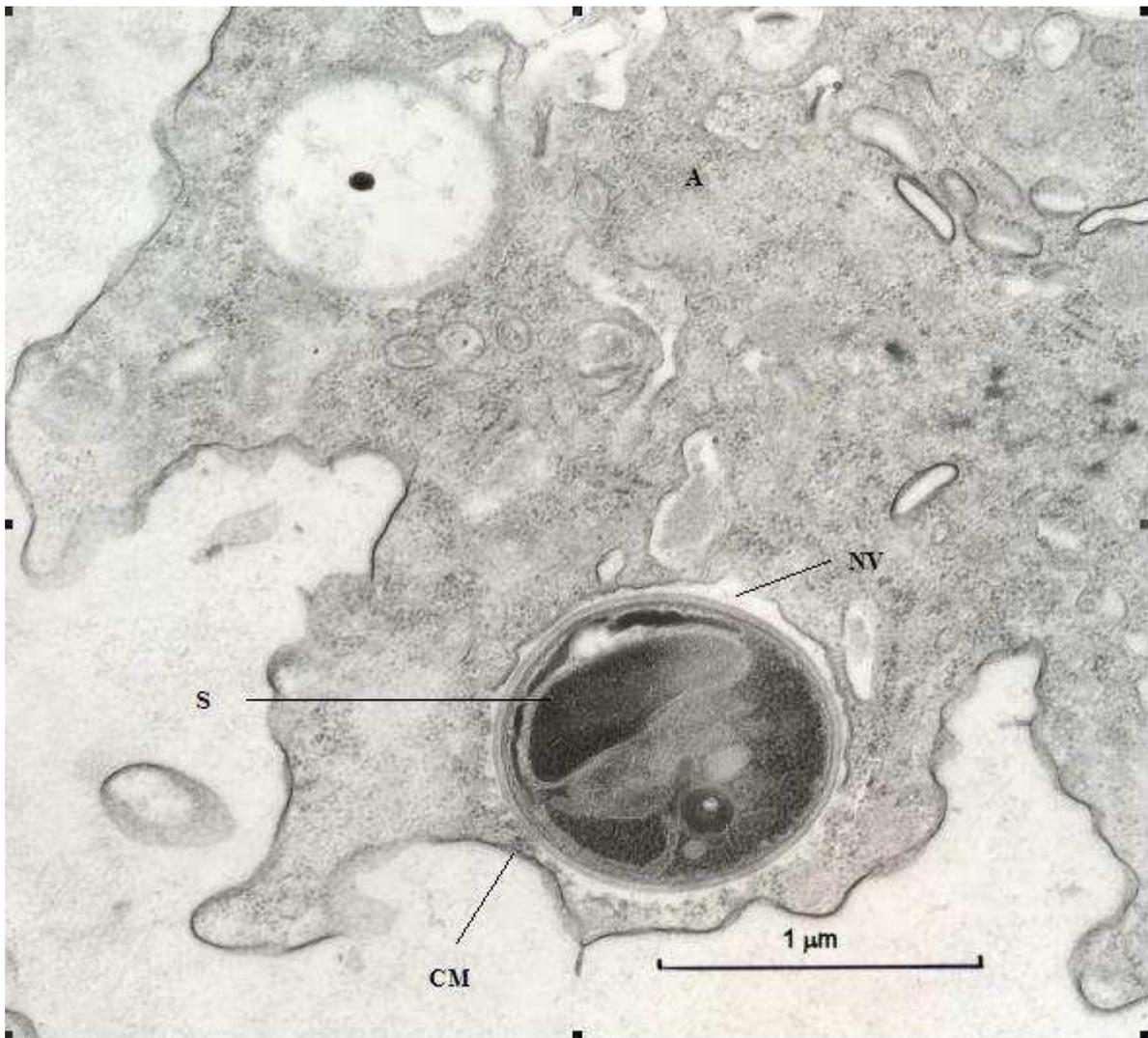


Abb.44: Aufnahme der Spore (S) via Phagozytose und Food-Cup-Bildung ist beendet; Spore im Amöbenzytoplasma; A: Wirtsamöbe; CM: Zellmembran; NV: Nahrungsvakuole; Bar: 1 μm

Die Aufnahme dieser Spore via Phagozytose - und damit die Invasionsphase in die Wirtsamöbe - war soeben abgeschlossen (**Abb.44**).

Sie wurde nun im Zytoplasma der Vannellen in einer englumigen Vakuole transportiert. Auch in dieser Abbildung ist wiederum gut belegt, dass die Wirtsamöben keine Glycostyli ausbildeten, die für die Gattung *Vannella* eigentlich charakteristisch sind.

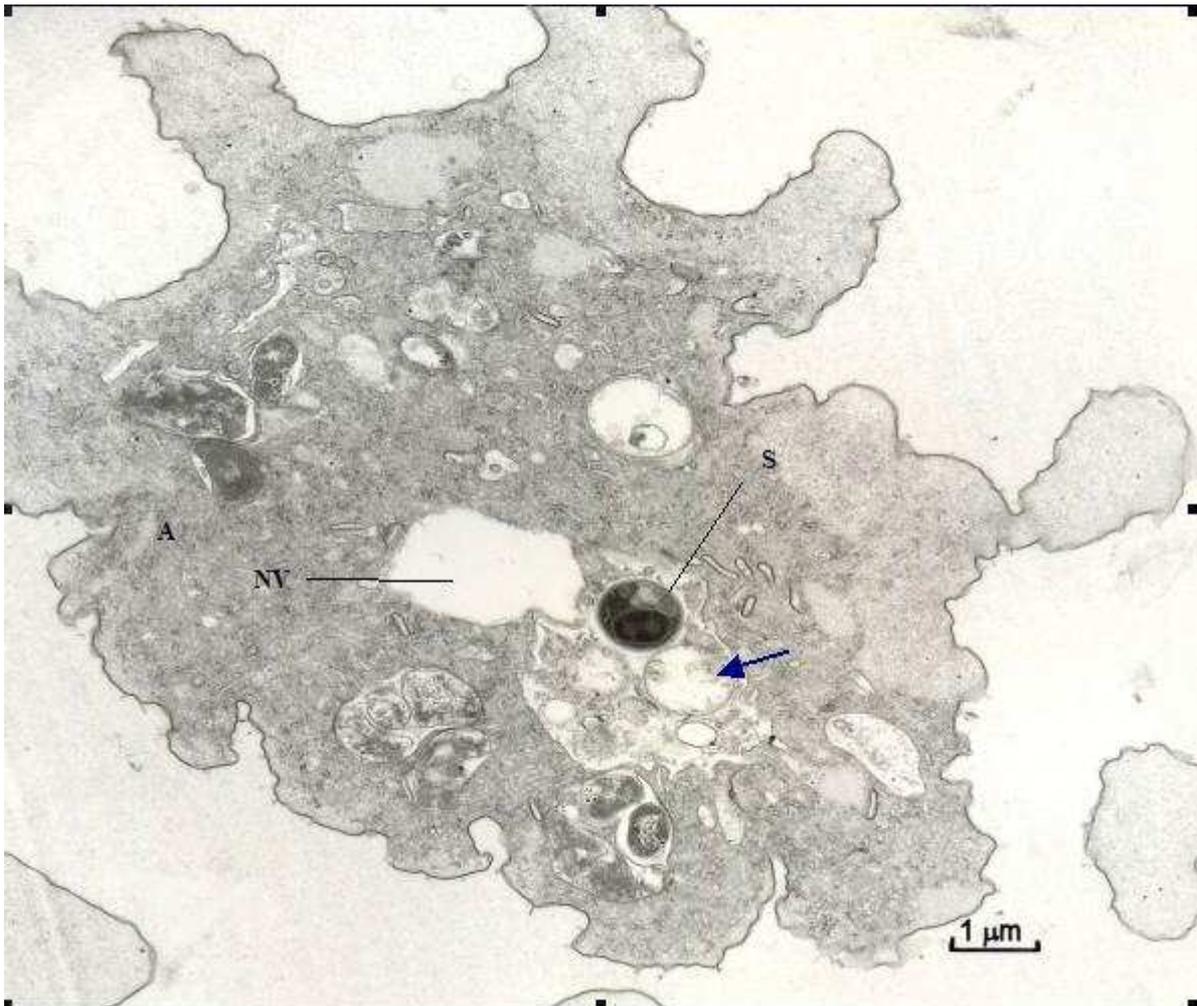


Abb.45: Spore (S) in einem Phagosom im Zytoplasma der Wirtsamöben; von einer weiteren Spore (Pfeil) ist nur noch der Umriss zu erkennen (Ghost); A: Wirtsamöbe; NV: Nahrungsvakuole; Bar: 1μm

In **Abb.45** ist eine intakte Spore in einem Phagosom neben einer offensichtlich leeren Spore zu erkennen. Diese leeren Hüllen wurden als Ghosts bezeichnet.

Die Amöbe selbst war zu diesem Zeitpunkt der Infektion noch sehr aktiv. Eine Beeinträchtigung im Verhalten, etwa der Nahrungsaufnahme, Frequenz der pulsierenden Vakuole im Vergleich zu nicht infizierten Vannellen des gleichen Stammes, konnte durch lichtmikroskopische Beobachtungen bereits ausgeschlossen werden.

Auch bei den im Zytoplasma eingeschlossenen Sporen ließ sich die grundlegende Mikrosporidien- ähnliche Organisationsstruktur erkennen. Auffällig und gut aufgelöst in **Abb.46** ist das irregulär aufgewickelte Polarfilament.

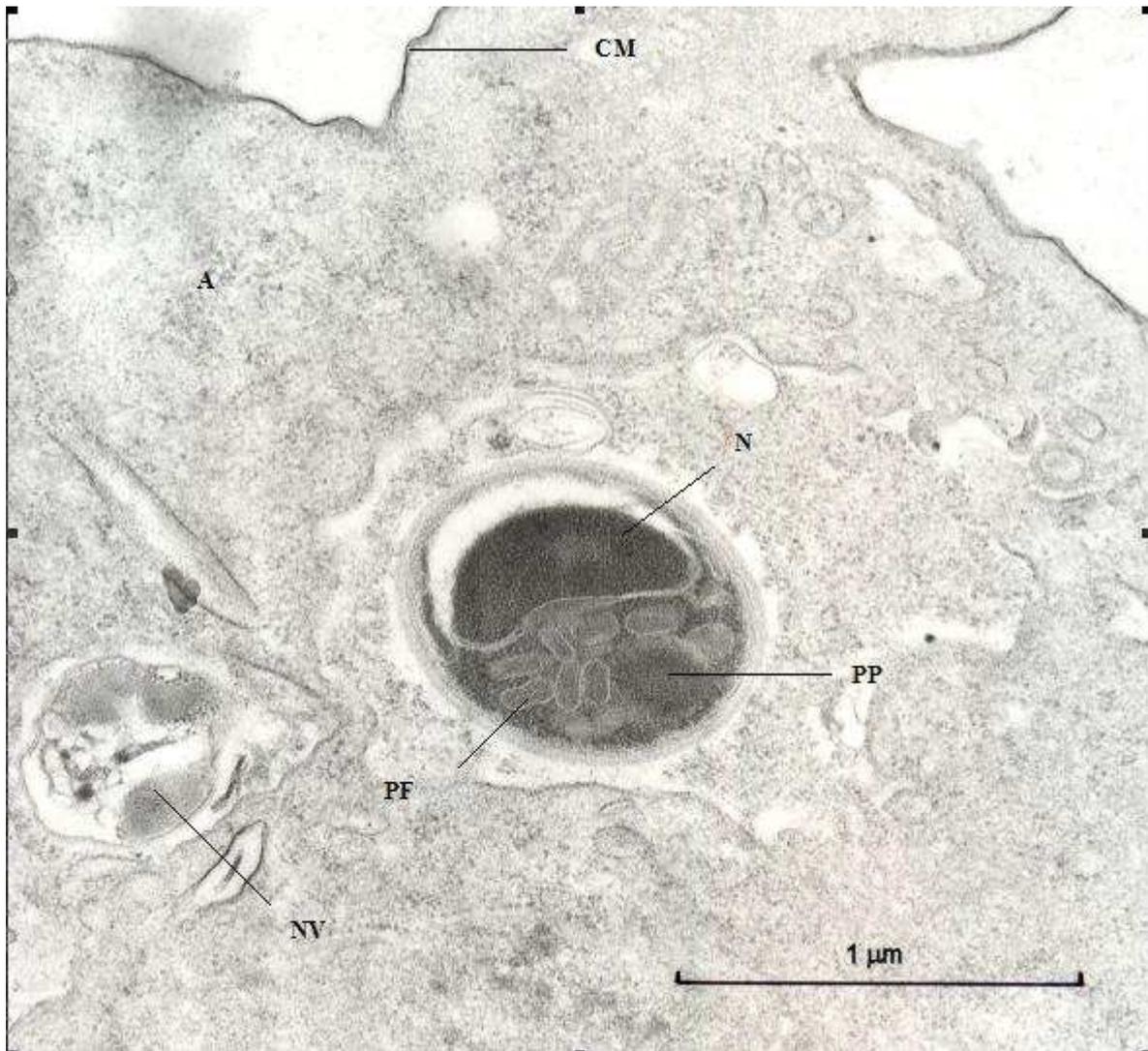


Abb.46: Spore im Zytoplasma der Vannelle; Deutlich sind die einzelnen Strukturen der Sporen zu erkennen; N: Kern; PP: Polaroplast; PF: Polarfilament; CM: Zellmembran; A: Wirtsamöbe; NV: Nahrungsvakuole; Bar: 1μm

Die Sporen der MLO hatten sich bis zu diesem Zeitpunkt morphologisch nicht verändert; der Einsatz des Polarfilamentes wurde nicht beobachtet (vgl. **Abb.7**).

Der erkennbare hellere Saum rund um einige Nahrungsvakuolen weist auf das Vorhandensein von Aktinfilamenten hin, die wiederum typisch für Transportvorgänge sind.

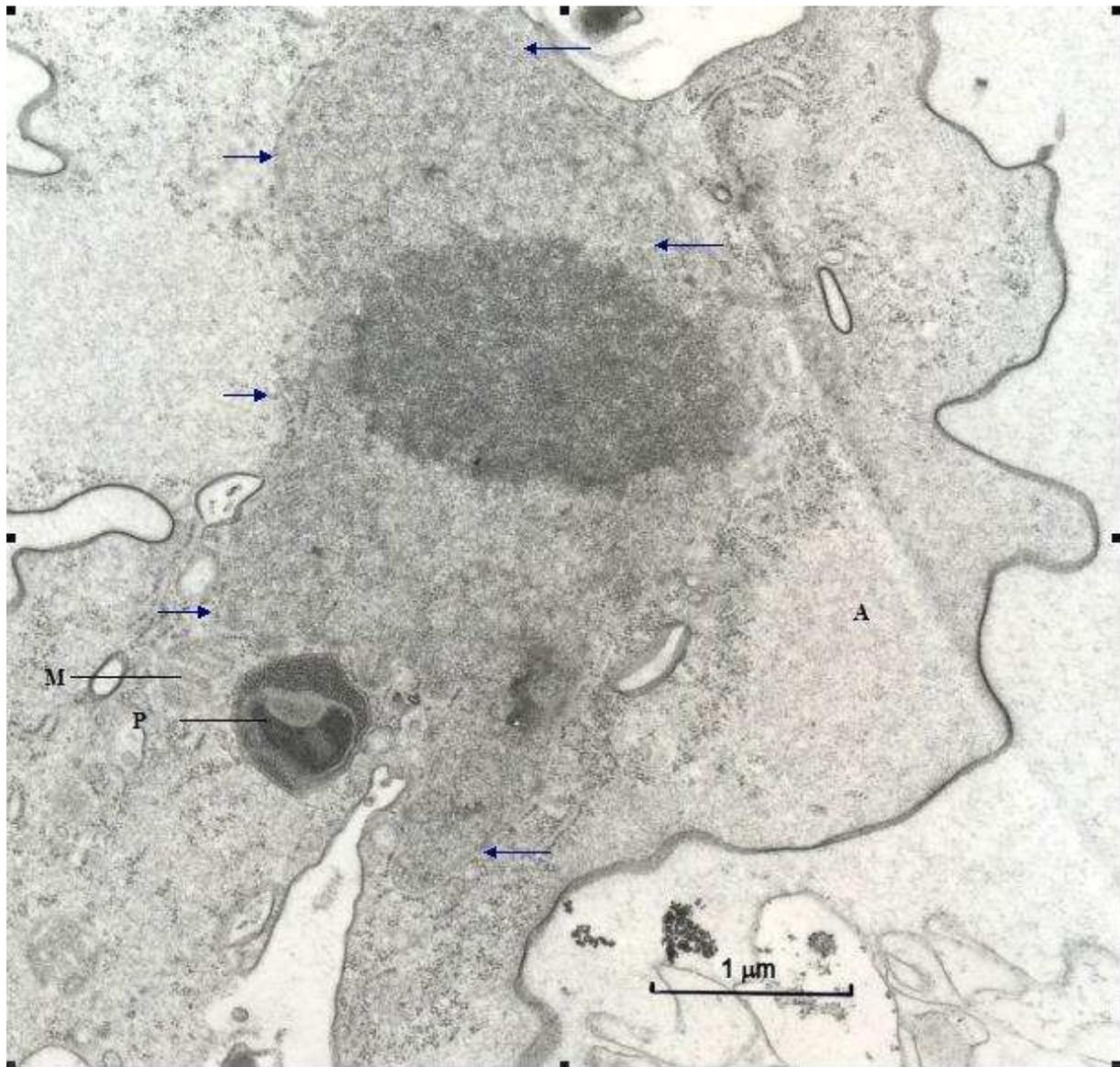


Abb.47: Parasit (P) bzw. MLO beim Eintritt in den Kern durch die Kernmembran (Pfeile); deutliche morphologische Änderungen sind erkennbar; A: Wirtsamöbe; M: Mitochondrium der Wirtsamöbe; Bar: 1μm

Unter morphologischen Veränderungen drang der MLO durch die Kernmembran in den Kern der Wirtsamöbe ein (**Abb.47** und **48**). Hier fand das intranukleäre Wachstum sowie die weitere Differenzierung statt (siehe auch **Abb.49**).

Die strenge Sporenmorphologie war einem polymorphen, (intranukleären) Meronten-ähnlichen Stadium gewichen, dessen Durchmesser im Durchschnitt $0,7\mu\text{m}$ ($s = 0,04$) betrug.

Die bisher gut sichtbaren Organellen wie Polarfilament, Polaroplast etc. waren nicht mehr zu erkennen; der Einsatz des Polarfilamentes konnte jedoch auch beim Eintritt in den Kern nicht beobachtet werden. Die Differenzierung setzte sich fort.

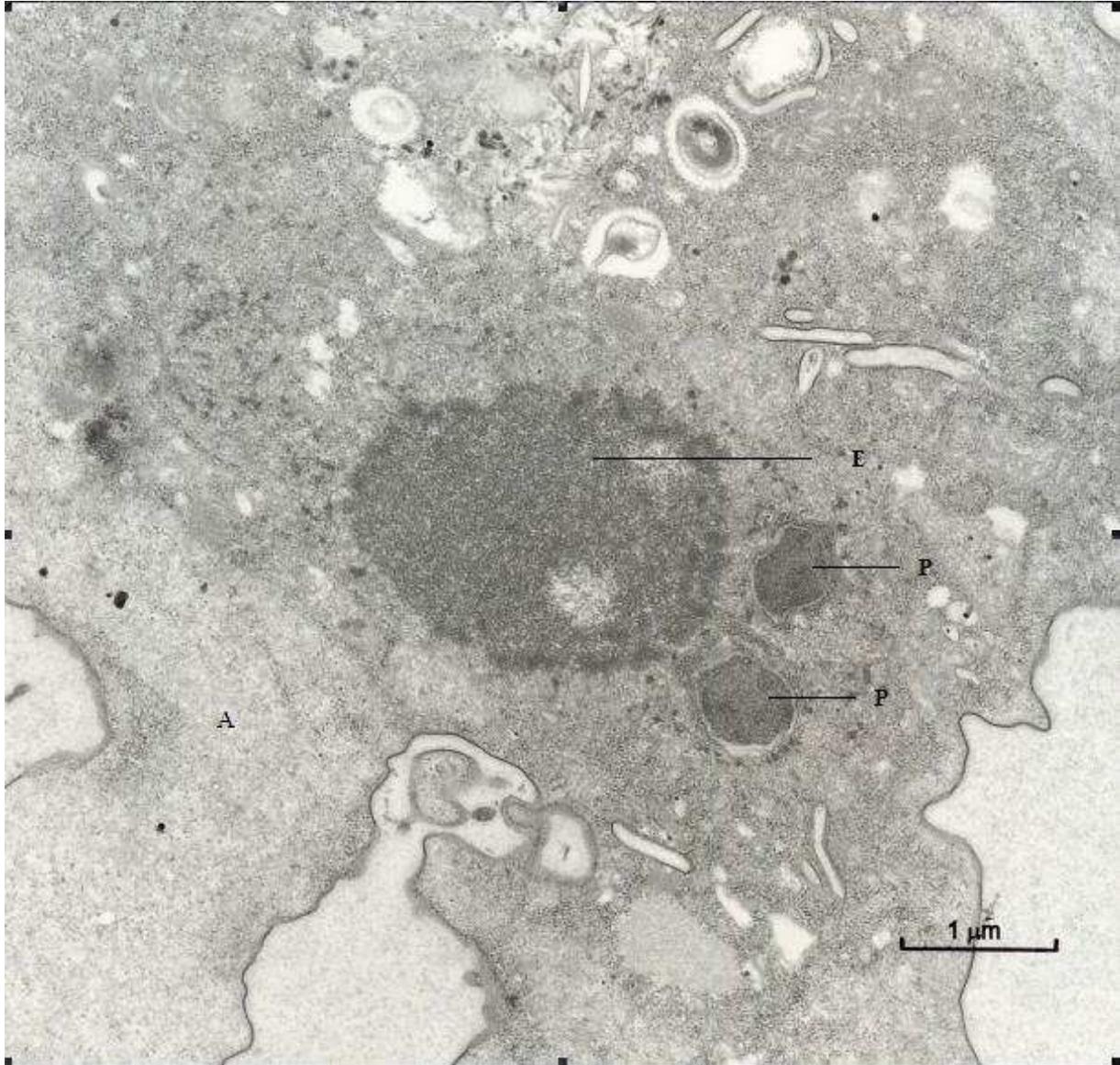


Abb.48: Zwei Parasiten (P) bzw. MLO nach dem Passieren der Kernmembran im Karyoplasma der Wirtsamöbe (A); E: Endosom; Bar: 1μm

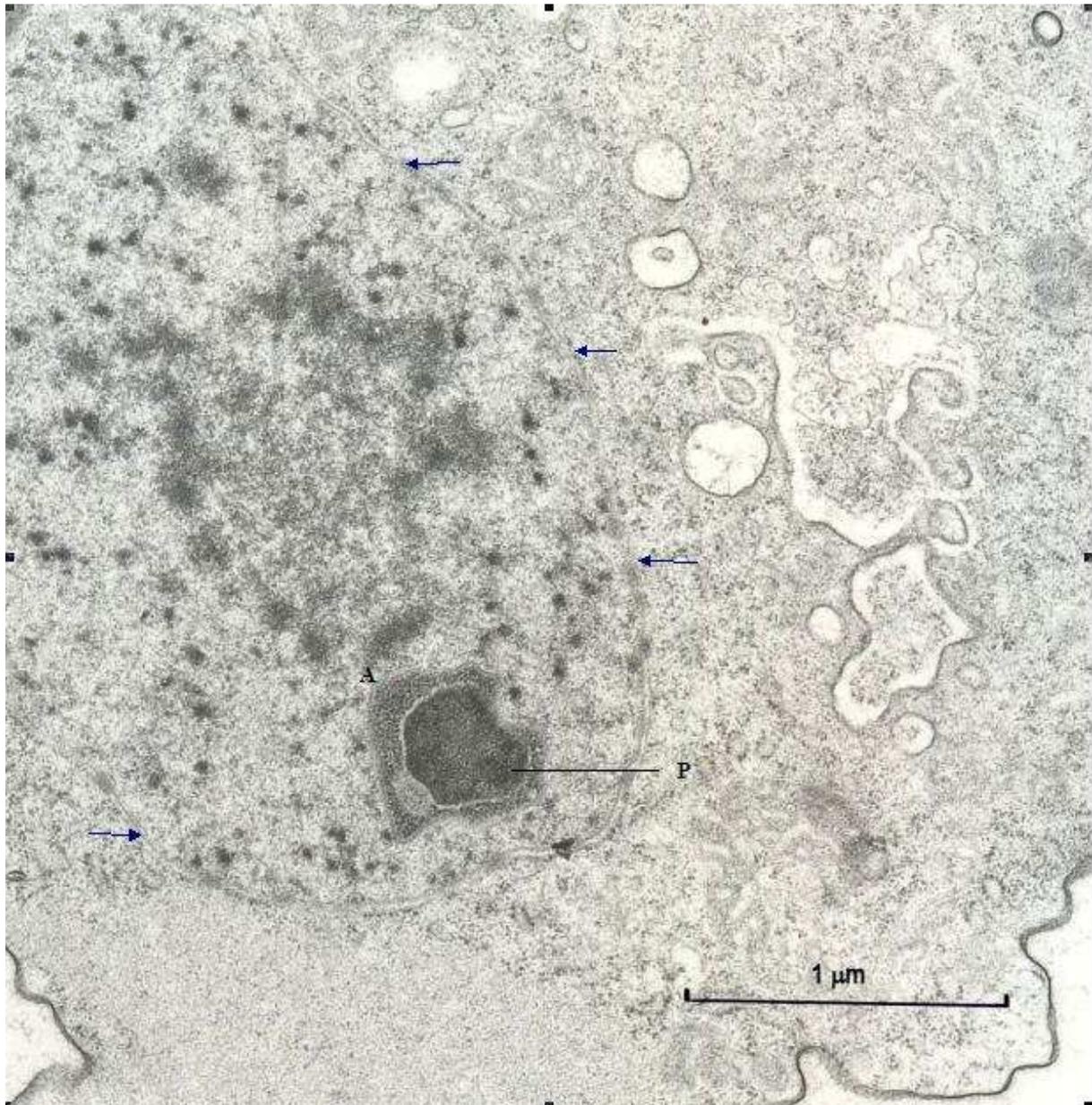


Abb.49: Parasit (P) kurz nach dem Eintritt durch die Kernmembran (Pfeile) in die Wirtsamöbe (A); Bar: 1μm

Es gelang, einen frühen Meronten im Kern der Amöbe, kurz nach dem Passieren der Kernmembran bildlich festzuhalten (**Abb.49**). Das Endosom schien sich nach dieser Aufnahme aufzulösen, verlor in jedem Fall aber an Elektronendichte. Im Endosom konnten jedoch niemals MLO- Stadien nachgewiesen werden.

Ein weiterer MLO nach seinem Eindringen in den Kern der Wirtsamöbe ist in **Abb.50** und **51** gut aufgelöst.

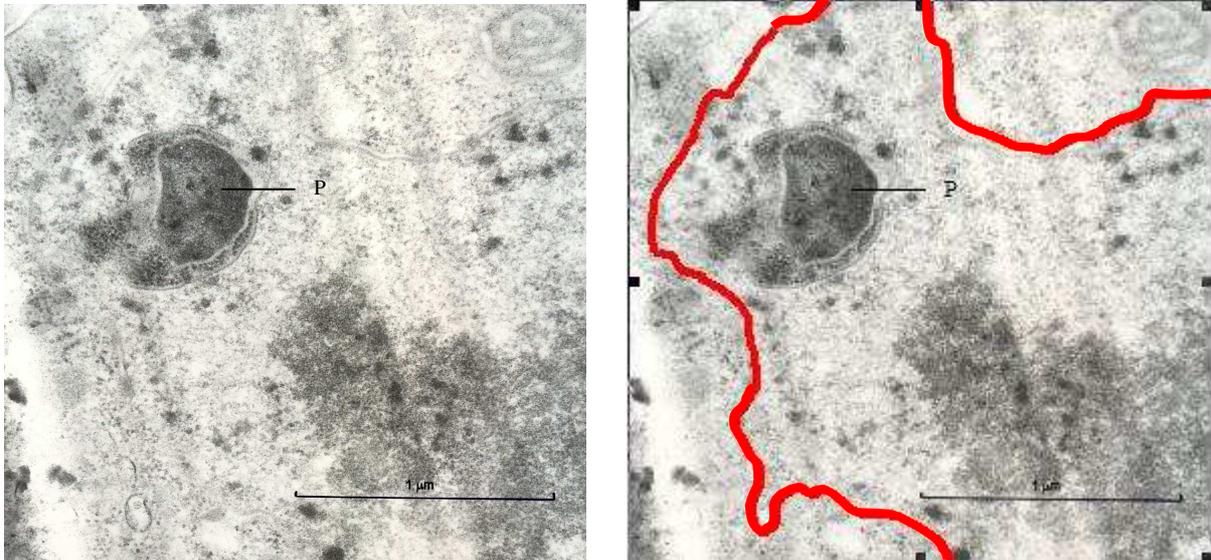


Abb.50 und **Abb.51**: Parasit (P) bzw MLO kurz nach dem Passieren der Kernmembran; zur Verdeutlichung ist die doppelte Kernmembran in der rechten Aufnahme durch eine (dicke) Linie farbig gekennzeichnet; Bar: 1µm

In einer Übersichtsaufnahme einer kompletten, bereits infizierten Vanelle (**Abb.52**) ist ein einkerniger Meront kurz nach dem Passieren der Kernmembran zu erkennen.

Die Kernmembran war intakt.

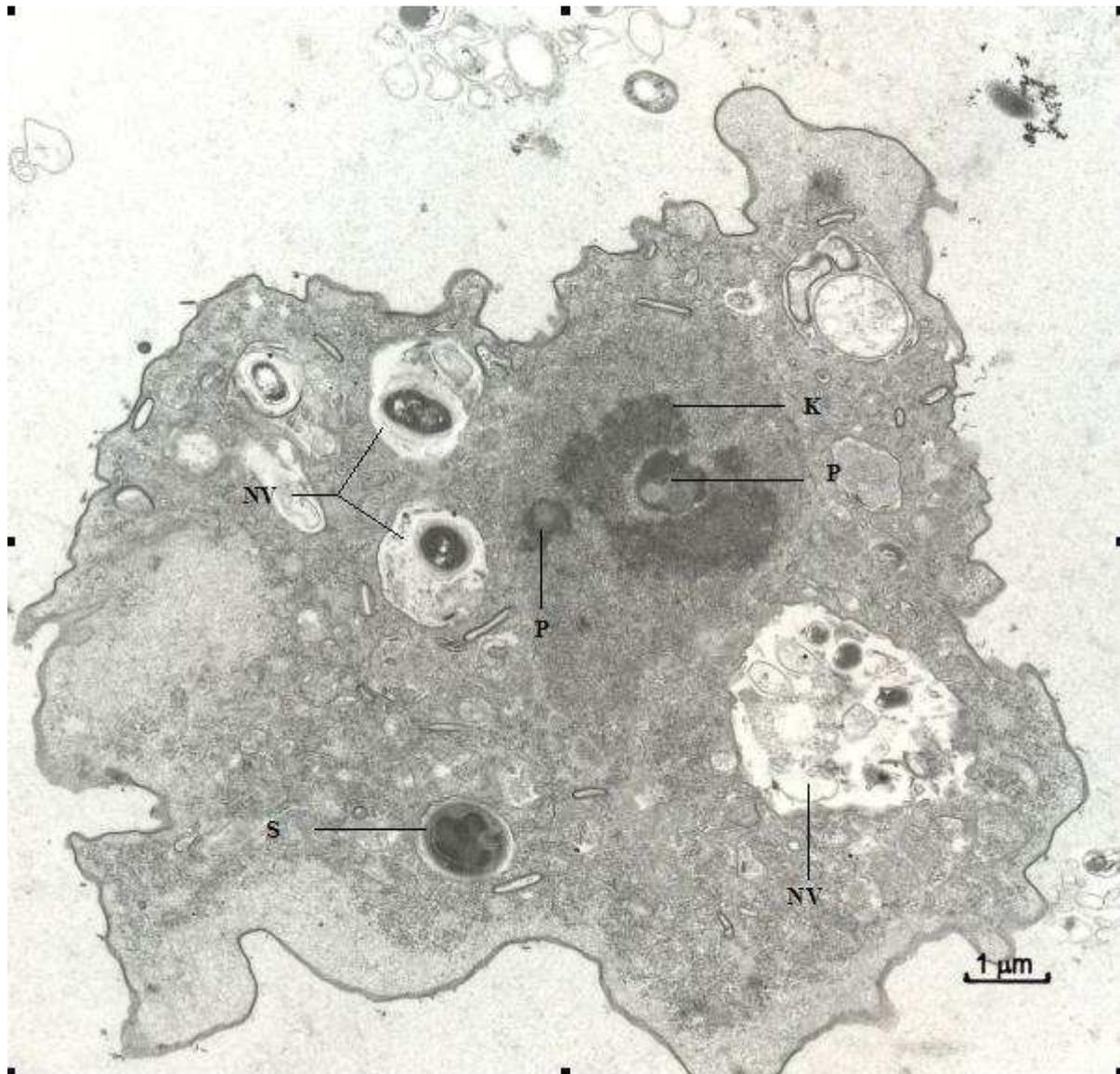


Abb.52: *Vannella* sp. mit 2 Parasiten (P) bzw. MLO bereits im Kern (K) sowie Sporen (S) in Nahrungsvakuolen; NV: Nahrungsvakuole; Kernmembran gut erkennbar; Bar: 1μm

Deutlich wird in dieser **Abb.52** auch, dass nicht nur ein einzelner MLO den Kern erreichen konnte, sondern dass gleich mehrere - in manchen Schnitten bis zu fünf erkennbar - ihre Entwicklung im Kern fortsetzen konnten, wobei sie ihre ursprüngliche Hülle einbüßten. Selbst als Meronten im Kern bereits zu erkennen waren, wurden immer noch weitere Sporen via Phagozytose durch die Wirtsamöben aufgenommen.

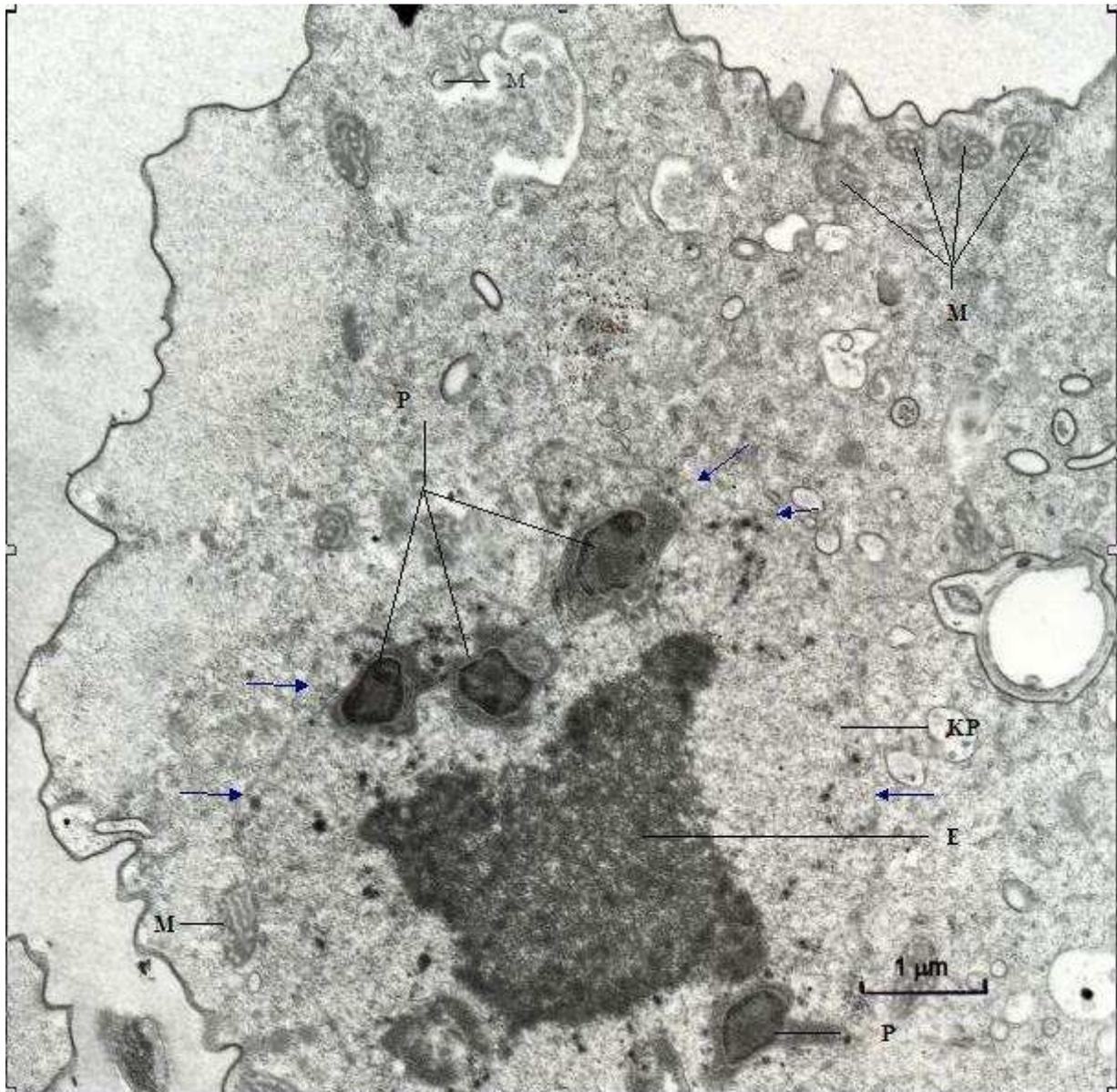


Abb.53: 4 Parasiten (P) bzw. MLO im Kern der Vanelle, einige kurz nach dem Passieren der Kernmembran (Pfeile), noch mit Kontakt zu dieser; M: Mitochondrien; Kern mit Karyoplasma (KP) und Endosom (E); Bar: 1μm

Gleich vier MLO sind in **Abb.53** im Amöbenkern zu erkennen, wobei bei dem unteren noch eine Verbindung zur Kernmembran ausgebildet war. Der MLO hatte gerade erst die Kernmembran passiert. Auch hier fehlten Hinweise auf den Einsatz des Polarfilaments.

In der proliferativen Phase wuchs der intranukleäre Organismus heran, die Kernteilung fand statt. Es bildeten sich anschließend durch Segmentation zahlreiche sporogoniale Plasmodien oder Sporoblasten, die sukzessive das gesamte Karyoplasma ausfüllten.

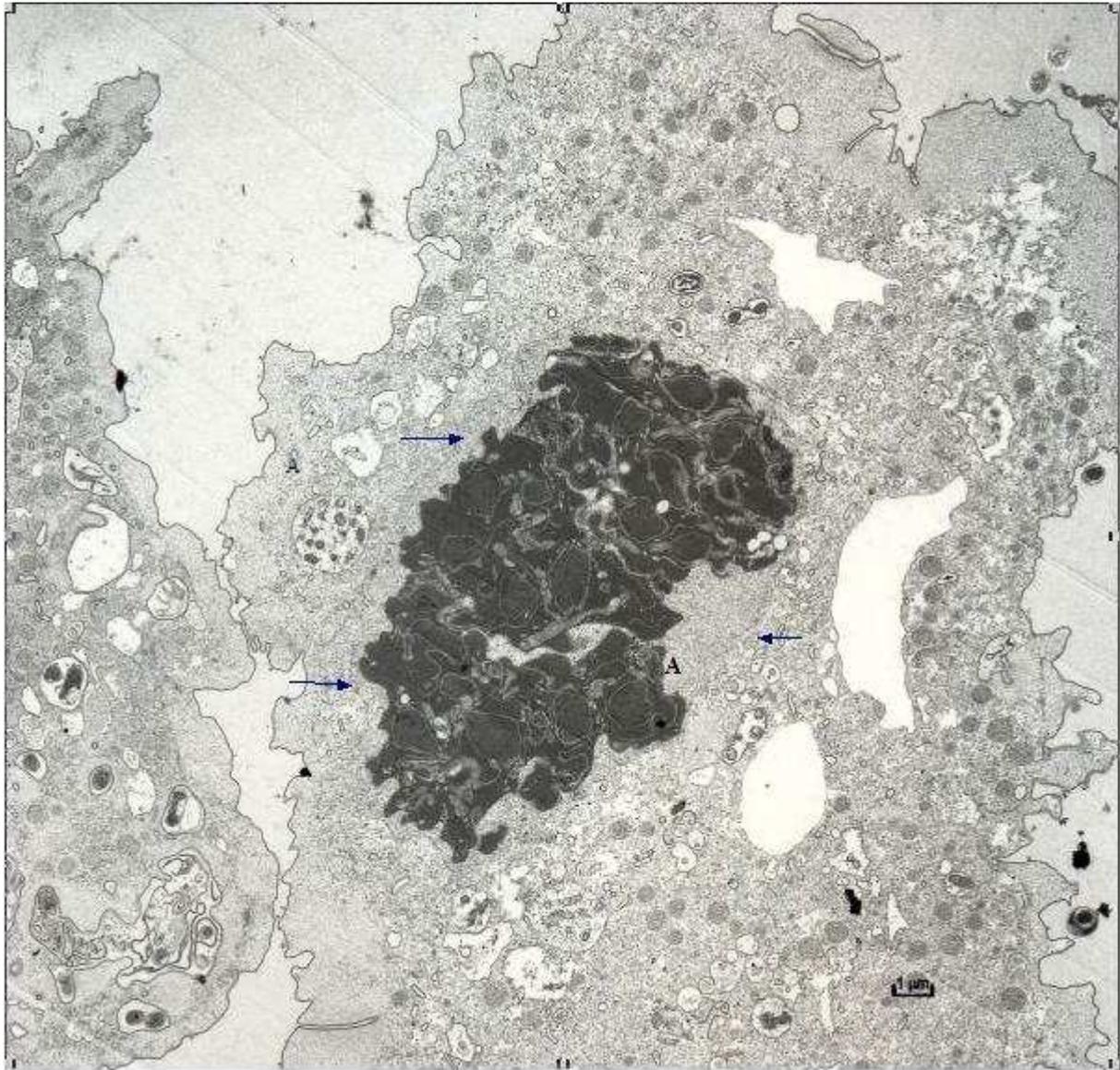


Abb.54: Proliferation der MLO im Kern der Wirtsamöbe (A); Pfeile: Kernmembran; Bar: 1μm

Durch die zahlreichen Teilungsvorgänge entstanden immer mehr Sporoblasten. Die Kernmembran wurde stark dilatiert, bis die Sporoblasten fast die gesamte Amöbe einnahmen und die Kernmembran sich der Zellmembran näherte. In dieser Phase wurde die Kernmembran gedehnt, so dass der Kern einen Durchmesser von bis zu 10μm (Maximum) aufwies. Ein Endosom war bei derartigen Stadien nicht mehr erkennbar (**Abb.54**).

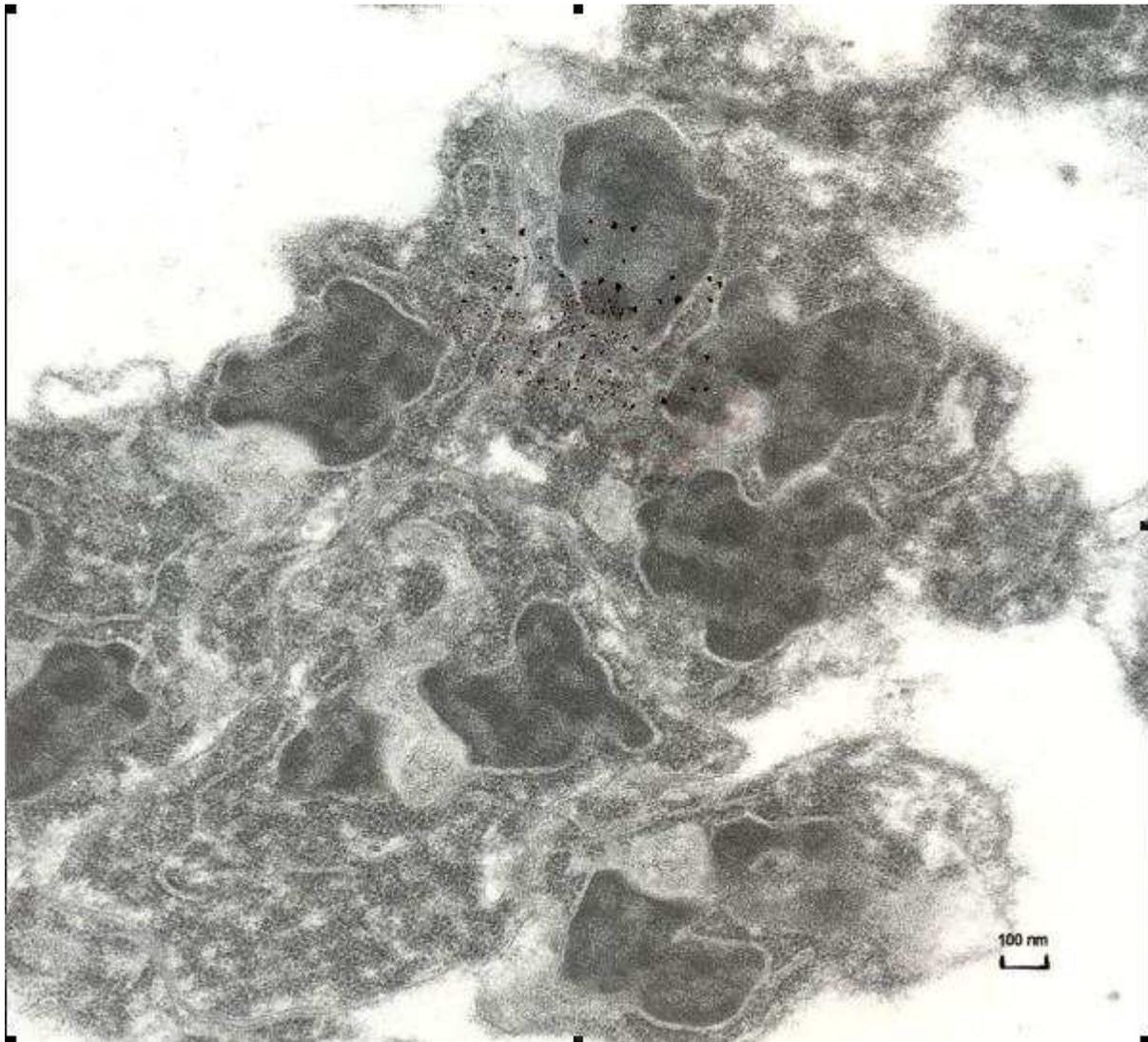


Abb.55: Sporenbildung durch Ausdifferenzierung der Endozytobiontenstadien; Organellen in Genese; die Punktierung im oberen Teil der Aufnahme stellt ein Artefakt dar; Bar: 100nm

Die Sporogonie begann mit den in **Abb.55** erkennbaren frühen Differenzierungsphasen. Das sporogonale Plasmodium, der Sporoblast, war noch kompakt, während sich im Zuge der Segmentierung in einzelne Sporoblasten die Organellen (wie Vakuole, Kern, Polarfilament etc.) zu entwickeln begannen.

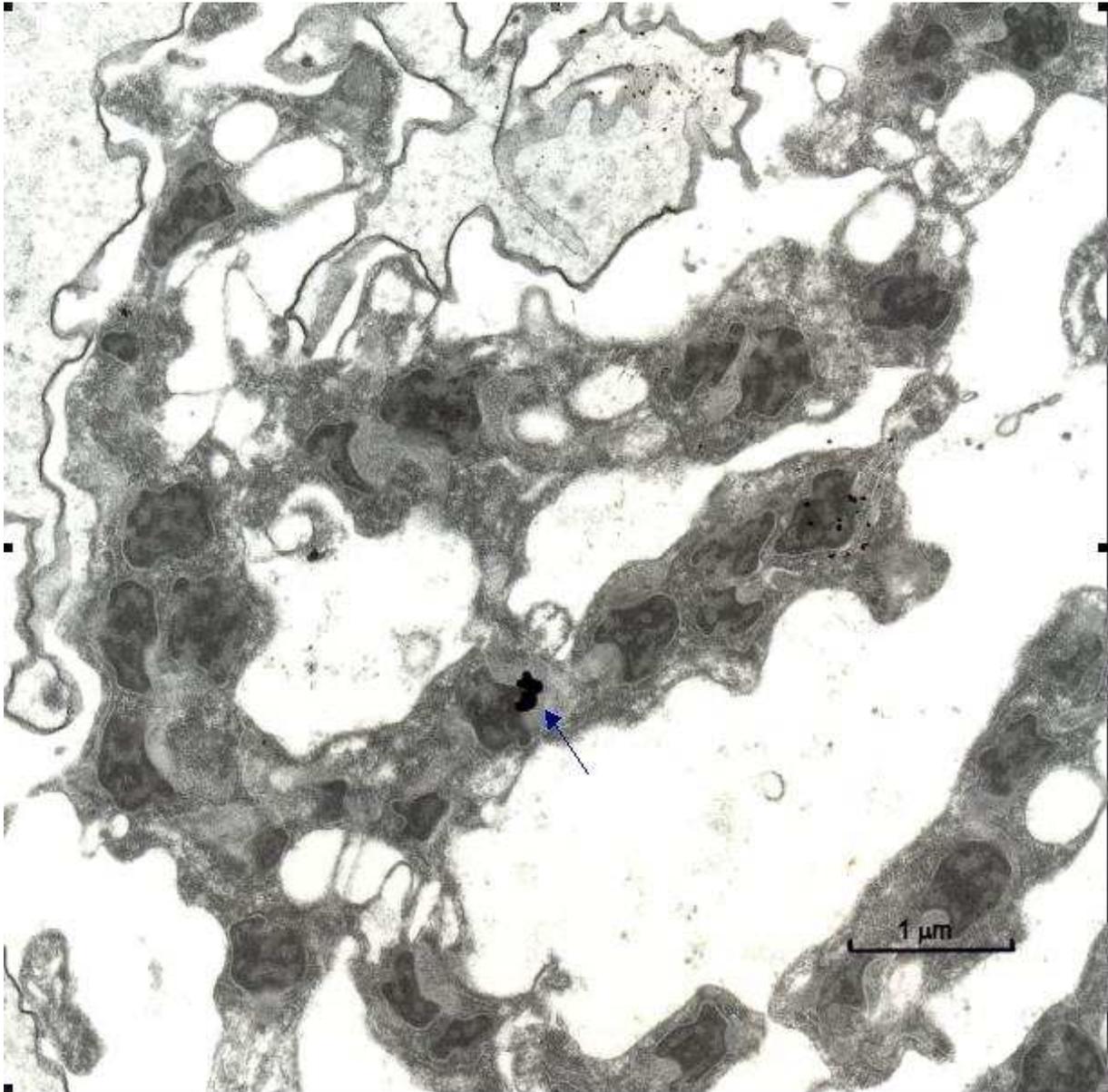


Abb.56: Eine weitere Ausdifferenzierung der MLO unter sukzessiver Ausbildung der typischen Organellen; Pfeil: Artefakt; Bar: 1 μm

Die Ausdifferenzierung in Sporen ging weiter. Verschiedene Schläuche wurden sichtbar (**Abb.56**). Die ehemalige Kernmembran des Wirtes war noch zu erkennen. Die Kerne der MLO wurden, ebenso wie die anderen für Mikrosporidien typischen Organellen (vgl. **Abb.6**) ausdifferenziert und damit sichtbar.

Im weiteren Verlauf differenzierten sich die Sporoblasten in freie Sporen. Die Sporengruppen von verschiedenen Sporoblasten waren durch Membranen voneinander getrennt (**Abb.57**).

Zu diesem Zeitpunkt, da bereits fast 2/3 der Vannelle durch die Entwicklungsstadien des Endozytobionten gefüllt war, befand sich die Wirtsamöbe immer noch im lebenden Zustand, jedoch nunmehr - wie in den lichtmikroskopischen Untersuchungen bereits bestätigt werden konnte - vermindert aktiv und stark hypertroph.

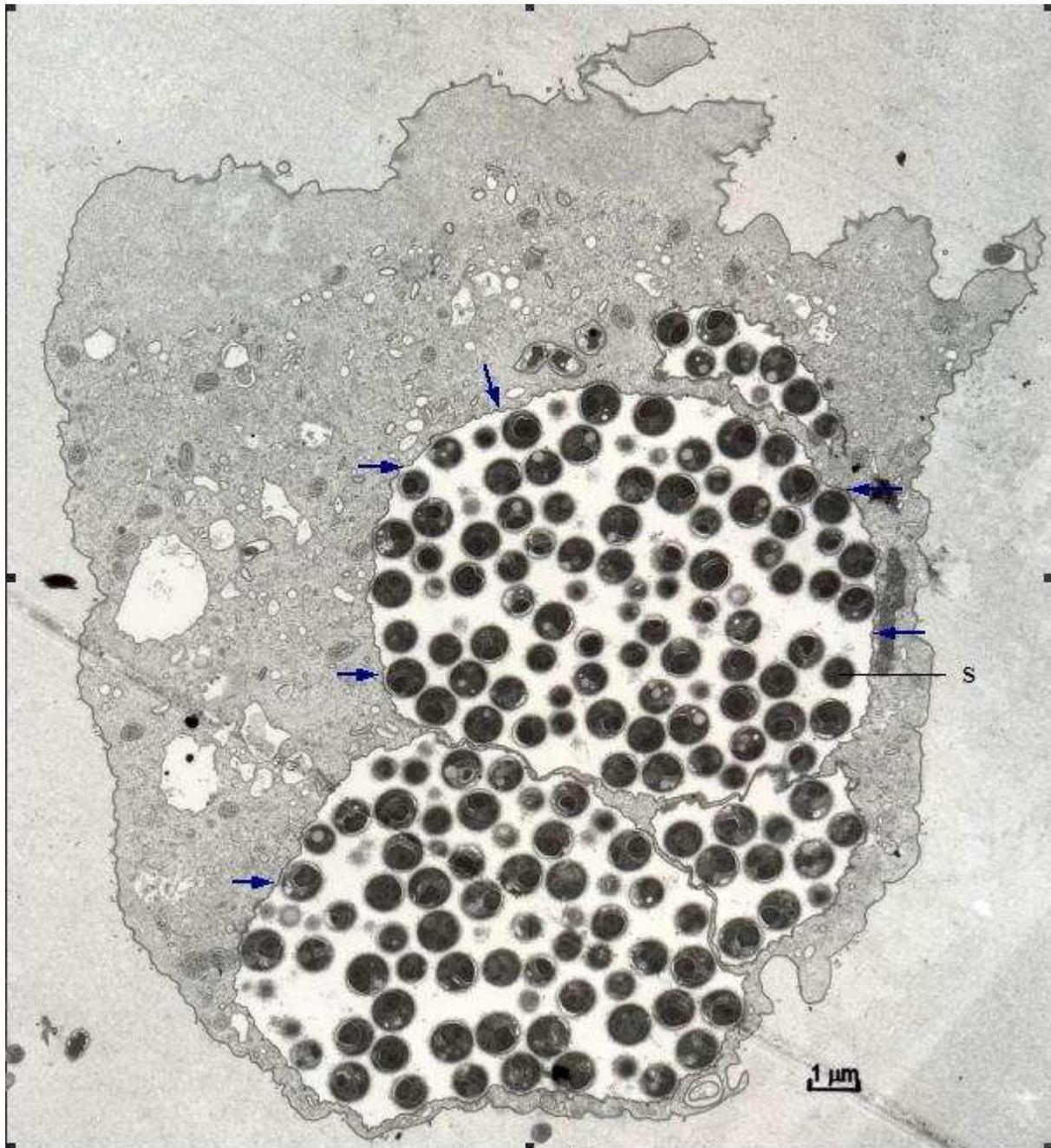


Abb.57: *Vannella* sp. mit Sporengruppen aus reifen Sporen (S), die aus wenigstens 2 MLO stammen. Sporen mit allen charakteristischen Organellen; Pfeile: Kernmembran; Bar: 1μm

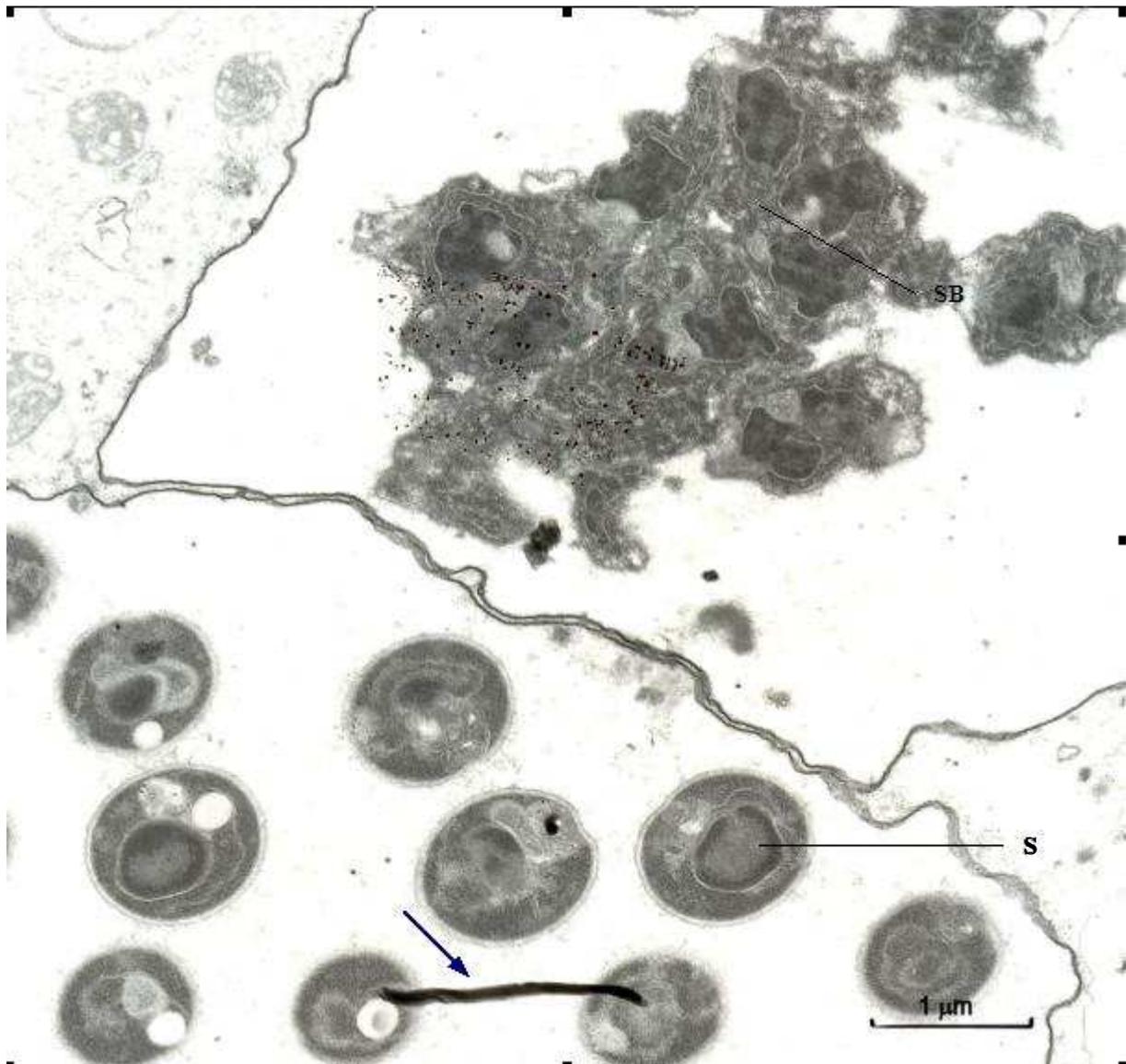


Abb.58: *Vannella* sp. mit einem Sporoblasten (SB) im Kern oben. Während beim unteren Endozytobionten die Sporen (S) bereits vollständig ausdifferenziert sind, befindet sich der obere Sporoblast noch in der Sporendifferenzierungsphase; der Pfeil deutet auf ein Artefakt hin; Bar: 1 μm

In **Abb.58** ist die Entwicklung von zwei unterschiedlichen Entwicklungsstadien der MLO im Kern innerhalb zweier sogenannter Sporenhaltigen Vesikel (SPVs) erkennbar, wobei bei dem unteren MLO die Sporenbildung abgeschlossen war, beim oberen jedoch erst die Sporoblasten gebildet wurden, die sich noch weiter differenzieren mussten. Erkennbar war ein zeitlicher Unterschied des Eindringens zweier Endozytobionten in das Karyoplasma der Wirtszelle, während **Abb.59** dagegen zwei deutlich voneinander getrennte Sporoblasten mit ausdifferenzierten Sporen des nahezu gleichen Entwicklungsstandes zeigte.

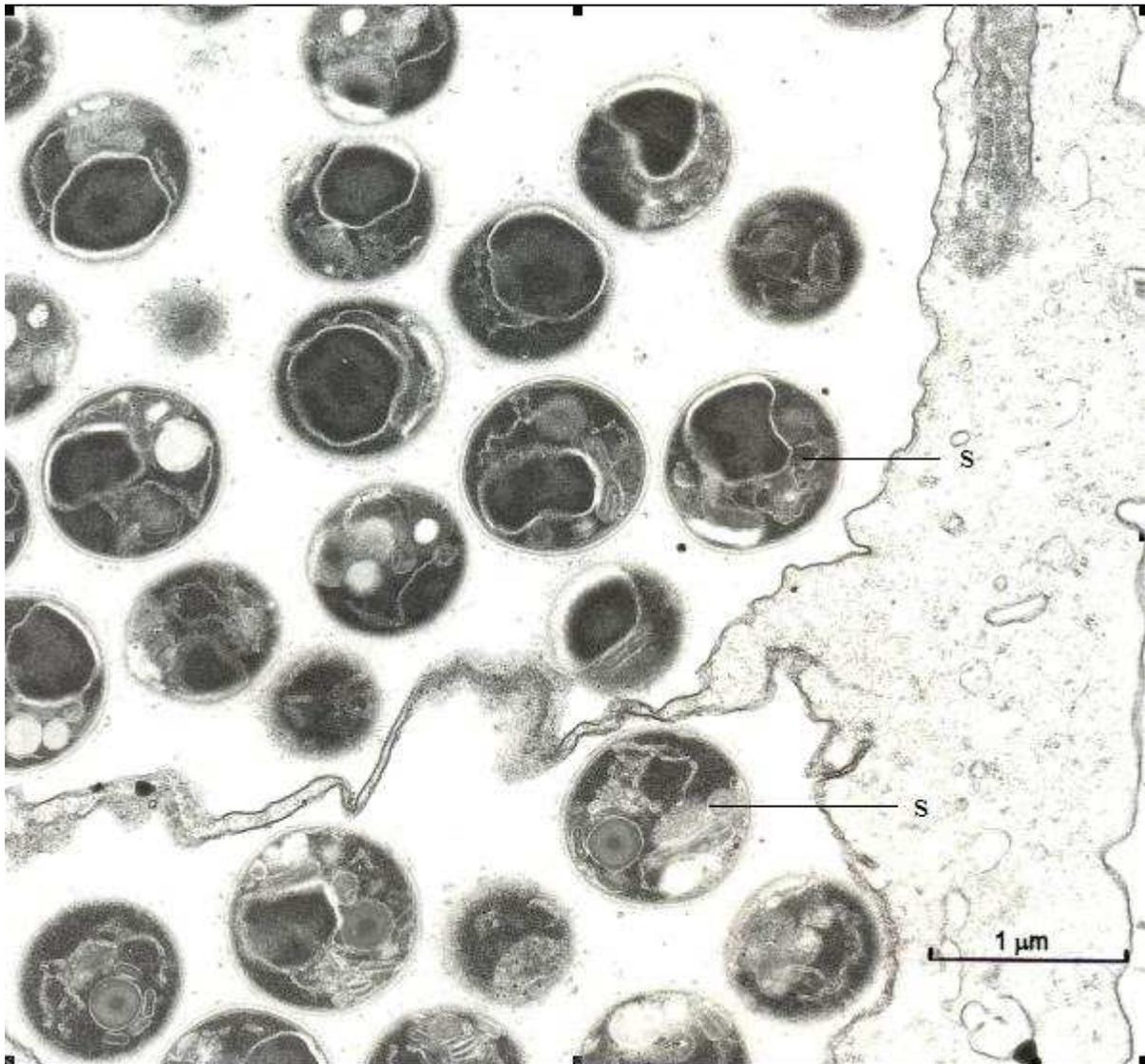


Abb.59: Zwei deutlich voneinander getrennte Sporengruppen als Abkömmlinge zweier MLO. Der Entwicklungsstand ist ungefähr gleich; dies deutet darauf hin, dass die MLO zeitnah zueinander in den Kern eingedrungen sind; S: Sporen; Bar: 1μm

Die Expansion der Kernmembran war so ungewöhnlich stark, dass diese fast die Zellmembran der hypertrophen, aber noch stoffwechselaktiven Amöbe erreichte. Im weiteren Verlauf dieser Dilatation kam es zur Ruptur der Wirtsamöben, wobei zunächst die Amöbenmembran zerriss. Nach Ruptur bzw. erfolgtem Absterben der Wirtsamöbe lagen die Sporen in Gruppen frei (**Abb.59**). Die früheren Umrisse der Amöbe waren aber noch erkennbar.

Die Infektionsphase hatte somit wieder begonnen, d.h. bisher noch nicht infizierte Amöben konnten durch Phagozytose freier Sporen infiziert werden.

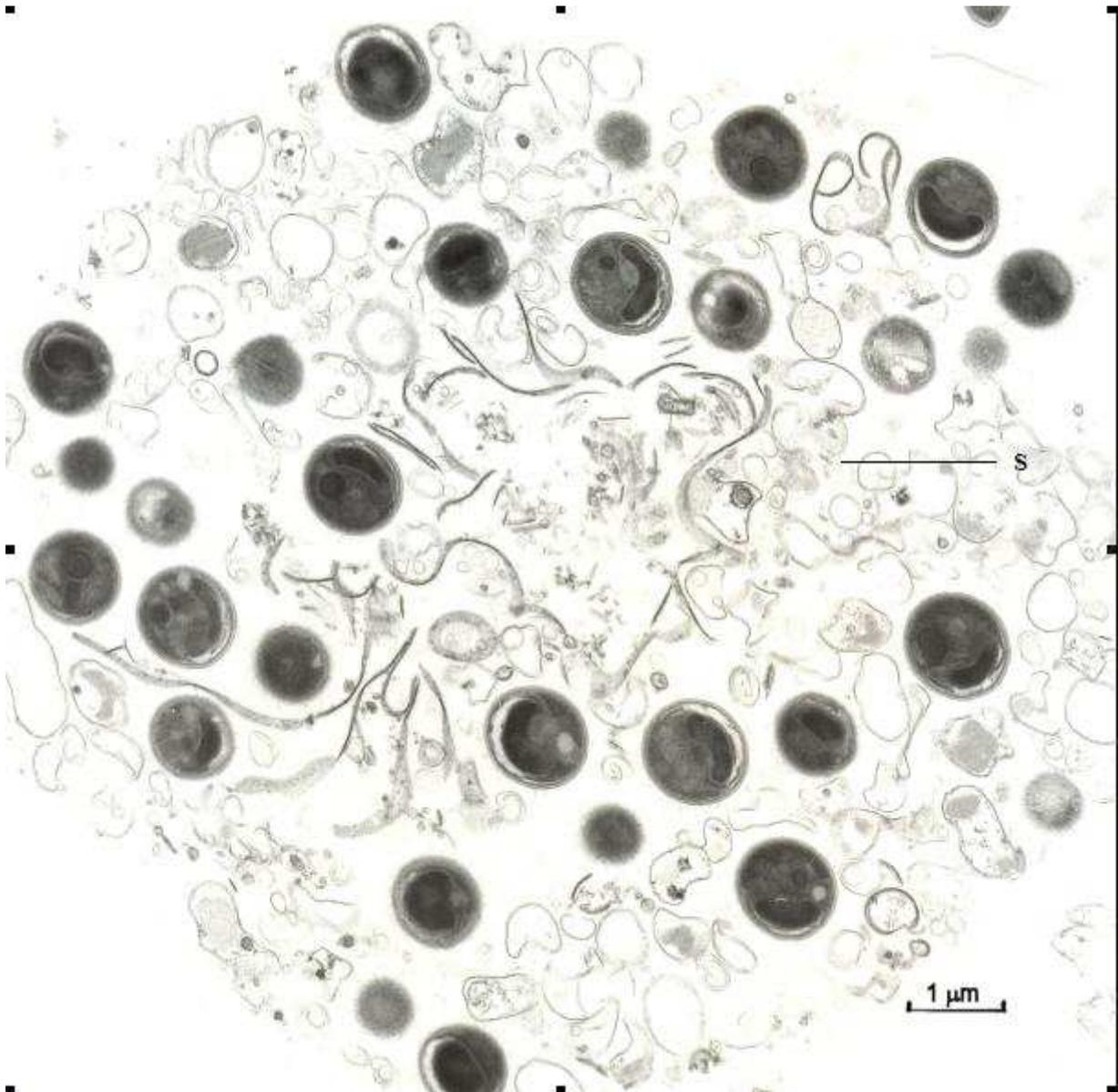


Abb.60: Sporen (S) lagen nach Ruptur der Wirtsamöbe frei; die ursprünglichen Umrisse der Vannelle sind noch anhand solcher Plaques zu erkennen; Bar: 1μm

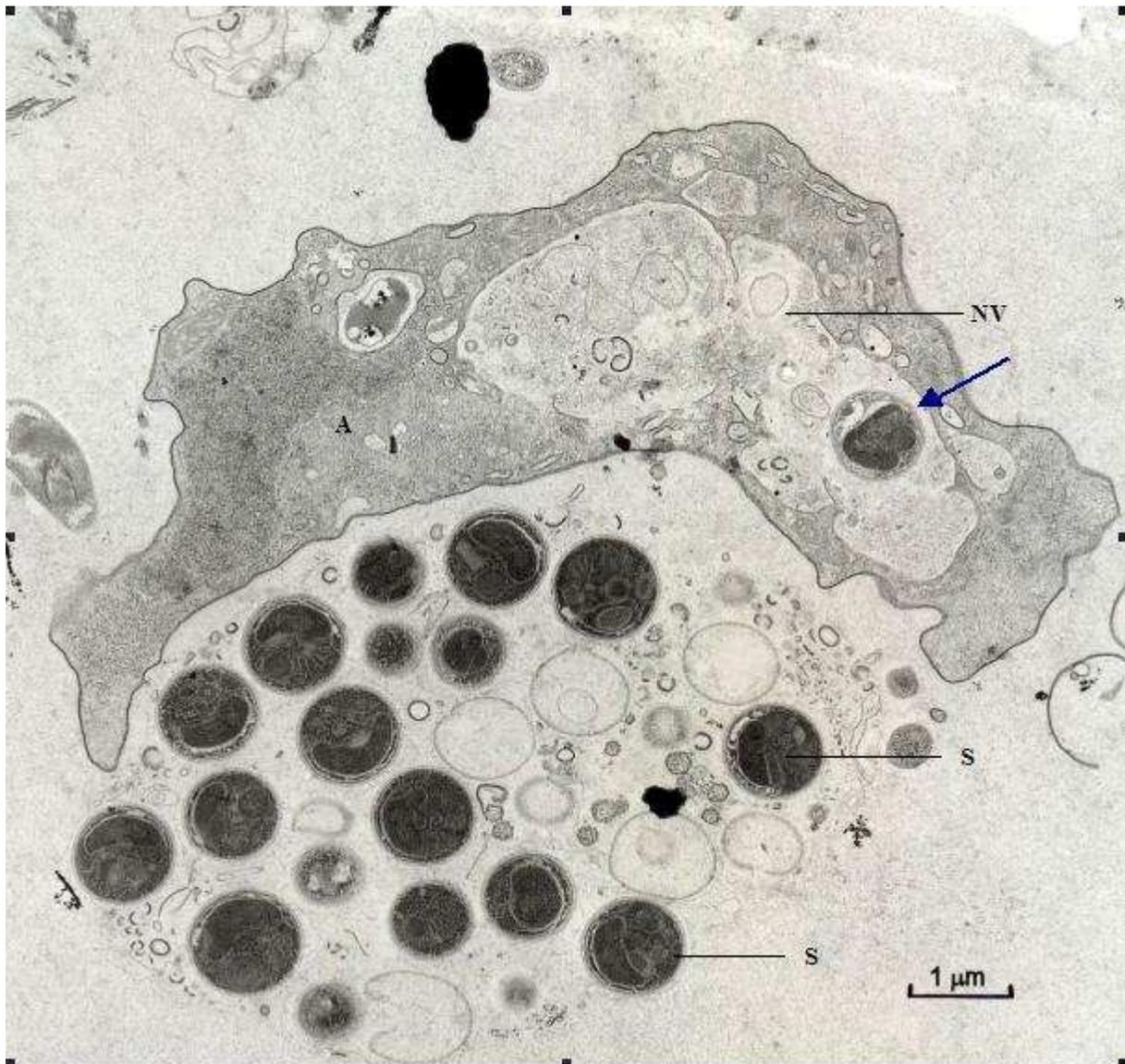


Abb.61: Wirtsamöbe (A) bei der Phagozytose eines ganzen Plaques von MLO-Sporen (S); eine Spore wurde bereits ingestiert (Pfeil) und befindet sich in einer Nahrungsvakuole (NV) zusammen mit anderen Nahrungsbestandteilen; Bar: 1μm

In **Abb.61** ist zu sehen, wie ein Vannellen-Trophozoit dabei war, den gesamten Sporenhaltigen Zellhaufen (Plaque) einer ruptierten Wirtsamöbe aufzunehmen. In diesem Sporenhaufen fanden sich auch offensichtlich leere Sporenhüllen. Die Vannelle hatte bereits vorher eine Spore via Phagozytose aufgenommen. Diese lag in einer Nahrungsvakuole im Zytoplasma der Wirtsamöbe.

3.4 Zeitdauer der Infektionsfähigkeit der Sporen

Um die Dauer der Infektiosität der Sporen einschätzen zu können, wurden in bestimmten Zeitabständen Reinfektionsversuche durchgeführt, um die freigewordenen Sporen mit Reinkulturen von VanAun0 auf ihre Infektiosität zu testen.

Die Untersuchungen ergaben, dass die Sporen bei 20°C, auf den Kulturplatten belassen, bis zu 26 Monate (!) für den Vannellenstamm VanAun0 infektiös blieben. Die Versuchsreihe wurde nach 26 Monaten abgebrochen, da die Agarplatten trotz des Parafilm - Austrocknungsschutzes nur noch eine dünne Agarschicht aufwiesen. Die Ergebnisse des Versuches sowie die Intervalle der Prüfungen zur Zeitdauer der Infektionsfähigkeit der Sporen sind in **Tab. 3** zusammengefasst.

Tab. 3: Ergebnisse der Versuche zur Zeitdauer der Infektionsfähigkeit

Zeitdauer p.i.	Infektiosität vorhanden
1 Woche	+
2 Wochen	+
3 Wochen	+
4 Wochen	+
2 Monate	+
3 Monate	+
6 Monate	+
10 Monate	+
12 Monate	+
16 Monate	+
20 Monate	+
24 Monate	+
26 Monate	+

3.5 Amöben als Wirtszellen von Mikrosporidien-ähnlichen Organismen: Evaluierung des Wirtsspektrums

Das Phänomen, dass sich Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Eukaryonten) in Protozoen vermehren können, wurde bereits häufig beschrieben (siehe Kapitel 1.1.2). Speziell die FLA sind nicht zuletzt wegen ihres Vorkommens im Trinkwasser Gegenstand intensiver Forschung geworden. Der reproduzierbare Nachweis von „infizierten“ Amöben aus der Umwelt ist den klassischen Verfahren der kulturellen Anzucht bei verschiedenen Temperaturen und mittels verschiedener Kulturmedien sowie den licht- und elektronenmikroskopischen Techniken vorbehalten.

Interessant war es nunmehr, herauszufinden, ob sich die intranukleär entwickelnden MLO auch in anderen FLA vermehren können. Hierbei wurden insbesondere andere Vannellenarten, potenziell pathogene Amöben, wie Naeglerien und Acanthamoeben, aber auch sonstige FLA aus der Stammsammlung des Koblenzer Labors herangezogen, von denen einige bereits als Wirte für andere Endozytobionten bekannt waren. Die Überimpfungen im Rahmen der Kokultivierungsversuche verschiedener FLA mit KAun1 wurden in gleicher Art und Weise wie bei den übrigen Überimpfungen standardisiert durchgeführt.

3.5.1 Ergebnisse der Vorversuche

Acanthamoeben:

Alle vorliegend eingesetzten Acanthamoebenisolatate gehörten morphologisch zur Gruppe II (Page 1988). Da bekannt ist, dass die Pathogenität von Amöben mit ihrer Toleranz von Temperaturen bei 37°C oder höher korreliert, wurden bei den im Wirtsspektrumsversuch verwendeten Acanthamoebenisolaten Temperaturtoleranztests (DE Jonckheere 1980) bei 37°C, 40°C und 44°C für 48 Stunden durchgeführt. Acanthamoeben der Gruppe II der Stämme aqua iso 2, Petz und ChiSan konnten bei 37°C gut gehalten werden, bei 40°C konnten jedoch keine Trophozoiten mehr nachgewiesen werden. *A. rhyodes*, Stamm 302-1, wuchs weder bei 37°C noch bei 40°C.

Naeglerien:

Bei Kontakt mit einem flüssigen Medium (z.B. Amöbensaline) bilden Naeglerien 2 Flagellen aus und gelten daher als „Amöboflagellaten“. In diesem Wirtsspektrumversuch sind die Naeglerien durch Angehörige der *N. gruberi* - Gruppe vertreten. Hierbei handelte es sich im Unterschied zu *N. fowleri* und *N. australiensis* um apathogene FLA. Die pathogene *Naegleria fowleri* wächst bei 30°C, 37°C, 42°C und 45°C, *Naegleria gruberi* dagegen bei 20°C, 30°C, einige Stämme höchstens noch bei 37°C. Der Naeglerien-Stamm aqua iso1 wurde zur Bestätigung der Gattungszugehörigkeit dem Amöben-Flagellaten-Transformationstest (Page 1967) bei 29°C und 37°C unterzogen. Es entwickelten sich nach Zugabe von Amöbensaline zweigeißelige Flagellaten, die die Identität der Gattung *Naegleria* bestätigten. Da analog zu den Verhältnissen bei den Acanthamoeben bekannt ist, dass auch die Pathogenität von Naeglerien mit ihrer Toleranz von Temperaturen bei 37°C oder mehr korreliert, wurden bei den eingesetzten Isolaten Temperaturtoleranztests (Griffin 1972) bei 37°C, 40°C und 44°C für 48 Stunden durchgeführt.

In unserem Fall wurde auch die Temperaturtoleranz bei 42°C mitgetestet.

Das Überleben bzw. die Vermehrung der Naeglerien bei 44°C wäre ein Hinweis auf das Vorliegen eines temperaturtoleranten Stammes, wozu auch die pathogene *N. fowleri* gehört. Bereits bei einer Temperatur von 42°C zeigten sich nach 48 Stunden keine Trophozoiten mehr. Es handelt sich also um einen nicht thermophilen Stamm des *N. gruberi* - Komplexes. Solche nicht thermophilen Stämme von Naeglerien wurden früher bereits in Kühl- und Spülwasser von Dentaleinheiten nachgewiesen (Michel und Just 1984).

3.5.2 Ergebnisse der Wirtsspektrumsversuche mit FLA

Die Wirtsspektrumsversuche mit den in **Tab.4** zusammengefassten FLA wurden lichtmikroskopisch analog den Beobachtungen und Intervallen bei VanAun0 ausgewertet. Als positiv (+) wurden nur diejenigen FLA eingestuft, in denen eine Proliferation von KAun1 nachgewiesen werden konnte.

Tab.4: Tabellarisch zusammengefasste Ergebnisse der Wirtsspektrumsversuche von KAun1 mit verschiedenen FLA (+: Proliferation fand statt; -: Proliferation fand nicht statt)

Spezies	Stamm	Proliferation KAun1
<i>Acanthamoeba</i> sp.	ChiSan	-
<i>Acanthamoeba rhyodes</i>	302-1	-
<i>Acanthamoeba</i> sp.	Petz	-
<i>Acanthamoeba</i> sp.	aqua iso2	-
<i>Vannella</i> sp.	d'oro	-
<i>Vannella</i> sp.	medagarda	+
<i>Vannella miroides</i>	Dent G1	+
<i>Vannella platypodia</i>	vp ash	-
<i>Vannella platypodia</i>	cis plat	-
<i>Saccamoeba stagnicola</i>	aqss	-
<i>Saccamoeba limax</i>	SL 1	-
<i>Platyamoeba placida</i>	xyz	-
<i>Harmannella vermiformis</i>	A1 HspiGento	-
<i>Naegleria gruberi</i>	aqua iso1	-
<i>Thecamoeba quadrilineata</i>	dcH 1	-
<i>Willaertia magna</i>	A1Pw1	-
<i>Tetramitus pararuselli</i>	Rhodos	-

3.5.2.1 FLA, bei denen keine Proliferation von KAun1 möglich war

Beispielhaft sollten für diejenigen FLA, die nicht für KAun1 suszeptibel sind (bei denen also keine Proliferation möglich war), die Ergebnisse von *Naegleria gruberi* Stamm aqua iso1 detaillierter dargestellt werden. Bei den anderen in **Tab.4** aufgeführten FLA, in denen keine Proliferation von KAun1 erfolgte, zeigten sich analoge Ergebnisse, deren bildliche Darstellung zwar sehr gut fotodokumentiert und kommentiert vorliegt, in der vorliegenden Arbeit m.E. jedoch verzichtbar war. Als nicht suszeptibel für KAun1 galt eine Kultur, wenn bis 1 Woche p.i. keine Entwicklung der Endozytobionten sichtbar wurde.

Naegleria gruberi (Komplex) Stamm aqua iso1

Die Naeglerien vom Stamm aqua iso1 stammten aus einem Gartenteich in Waldesch bei Koblenz. Im Durchschnitt waren die Trophozoiten 19,2 μ m lang ($s = 0,88$) und 9,8 μ m breit ($s = 0,52$). Der Kerndurchmesser betrug im Durchschnitt 9,1 μ m ($s = 0,16$), der Zystendurchmesser 14,9 μ m ($s = 0,16$).

Abb.62 und **63** zeigen Trophozoiten und Zysten von *Naegleria gruberi*, Stamm aqua iso1.

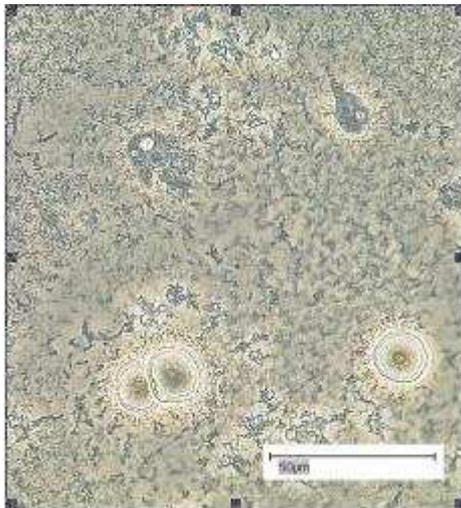


Abb.62: Trophozoiten und Zysten von *Naegleria gruberi* (Komplex); Stamm aqua iso1; Übersichtsaufnahme; Phasenkontrast; Bar: 50 μ m

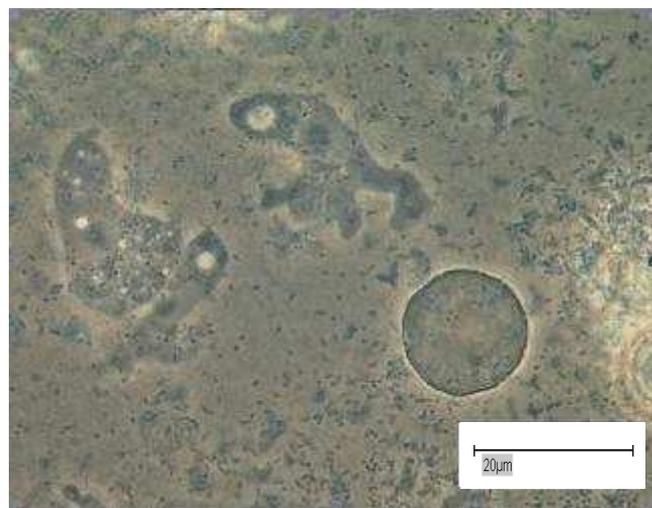


Abb.63: *Naegleria gruberi* (Komplex), Stamm aqua iso1: Trophozoiten mit kompaktem Endosom des Kerns; Lebende Zysten mit um den Kern angeordneten perinukleären Granula; Phasenkontrast; Bar: 20 μ m

Ergebnisse des Kokultivierungsversuchs mit *Naegleria gruberi* (Komplex), Stamm aqua iso1

Nach Zugabe eines ausgestochenen Agarblöckchens mit zahlreichen Sporen von KAun1 aus Kulturplatten, bei denen bereits vor 2 Wochen VanAun0-Reinkulturen mit KAun1 beimpft wurden, konnte beobachtet werden, dass die Naeglerien des Stamms aqua iso1 die Sporen via Phagozytose aufnahmen. **Abb.64** und **65** lassen erkennen, dass eine Entwicklung bzw. Proliferation im Kern oder im Zytoplasma der Naeglerien jedoch nicht stattfand.

Die Naeglerien wurden nicht geschädigt. Sie dienten also nicht als Wirte des Stammes KAun1. Eine weitere Propagierung des Stammes KAun1 zusammen mit *Naegleria gruberi*, Stamm aqua iso1 war ausgehend von diesen Kulturplatten nicht möglich. In den Zysten ließen sich die Sporen ebenfalls nachweisen (**Abb.65**).



Abb.64: *Naegleria gruberi* (Komplex), Stamm aqua iso1 - Trophozoit mit Sporen (S) im Zytoplasma sowie zahlreichen Sporen außerhalb; V: Vakuole; Hellfeld-Durchlicht; Bar: 20µm

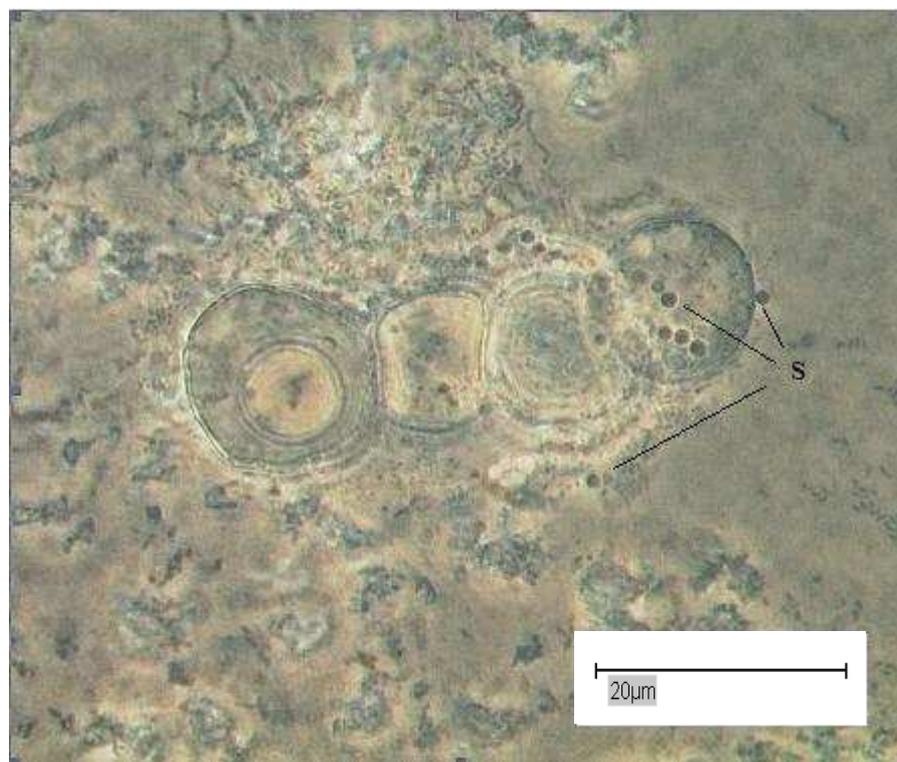


Abb.65: *Naegleria gruberi* (Komplex), Stamm aqua iso1 - Zysten mit Sporen (S) innen sowie Sporen auf der Kulturplatte; Hellfeld-Durchlicht; Bar: 20µm

3.5.2.2 FLA, bei denen die Proliferation von KAun1 erfolgte

Insbesondere die Gattung *Vannella* schien für den Wirtsspektrumsversuch interessant, da der die MLO beherbergende Stamm VanAun0 bereits als Wirt belegt ist. Bei zwei Stämmen der Gattung *Vannella* war die Kokultivierung mit der entsprechenden Proliferation im Kern möglich. Daher werden diese Ergebnisse in der Folge detailliert betrachtet.

Vannella sp., Stamm meda garda

Isoliert wurde dieser Stamm 2003 aus dem Gardasee/Italien. Die Trophozoiten sind im Durchschnitt 19,2µm lang ($s = 0,55$) und 14,6µm breit ($s = 0,93$). Eine Zystenbildung fand bei diesem Stamm nicht statt. **Abb.66** zeigt die Lokomotionsform im Übergang zur Schwimmform nach Zugabe von Amöbensaline. In **Abb.67** und **68** sind die Schwimm- bzw. Schwebeformen von *Vannella* sp., Stamm meda garda zu erkennen.

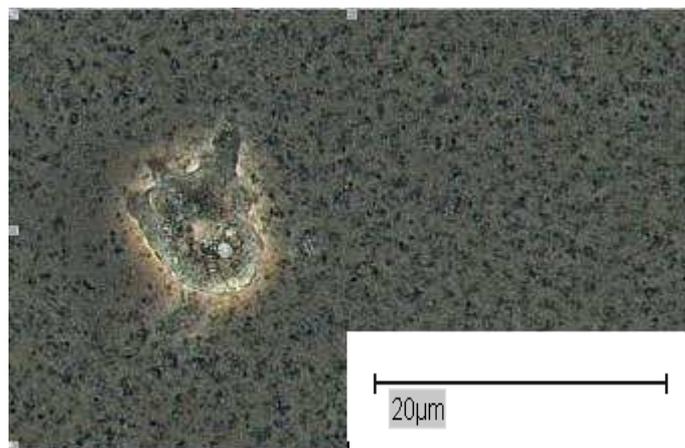


Abb.66: *Vannella* sp., Stamm meda garda; Lokomotionsform; beginnende Schwimmform; Phasenkontrast; Bar: 20µm



Abb.67: Schwimmform von *Vannella* spec, Stamm meda garda; Hellfeld-Durchlicht; Bar: 20µm

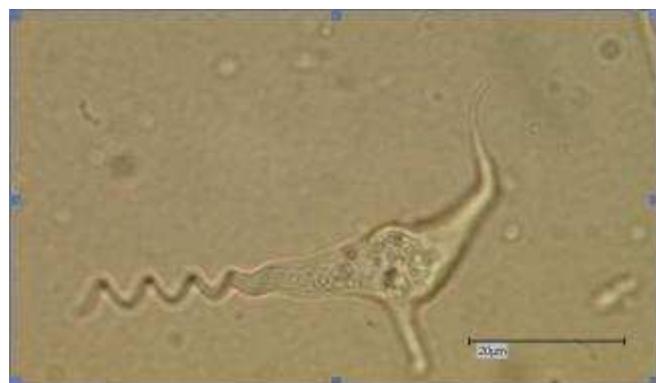


Abb.68: Schwimmform von *Vannella* spec, Stamm meda garda; Hellfeld-Durchlicht; Bar: 20µm

Ergebnisse des Kokultivierungsversuchs mit *Vannella* sp., Stamm meda garda

Lichtmikroskopische Ergebnisse:

Nach Zugabe eines ausgestochenen Agarblöckchens mit zahlreichen Sporen des Stammes KAun1 von Ausgangsplatten der Kokultivierung mit VanAun0, 2 Wochen p.i., konnte beobachtet werden, dass die Vannellen des Stammes meda garda die Sporen via Phagozytose aufnahmen. Stadien mit Sporen im Zytoplasma waren zu erkennen (siehe **Abb.69** und **70**). Die Entwicklung bzw. Proliferation fand anschließend im Kern, analog zu den Beobachtungen beim Vannellenstamm VanAun0 statt (**Abb.71 - 73**).

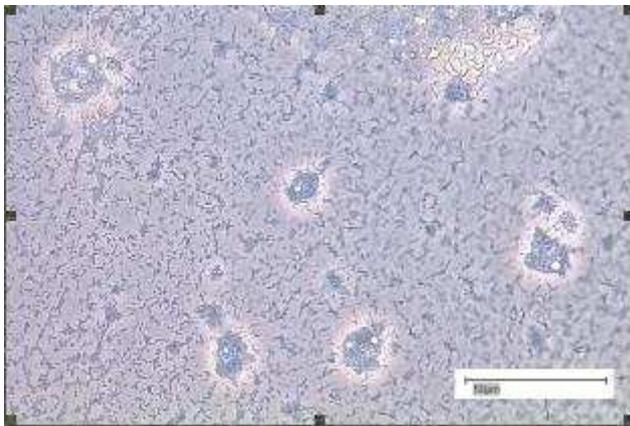


Abb.69: Vannellentrophozoiten vom Stamm meda garda mit unterschiedlichen Entwicklungsstadien der MLO; Phasenkontrast; Bar: 50µm

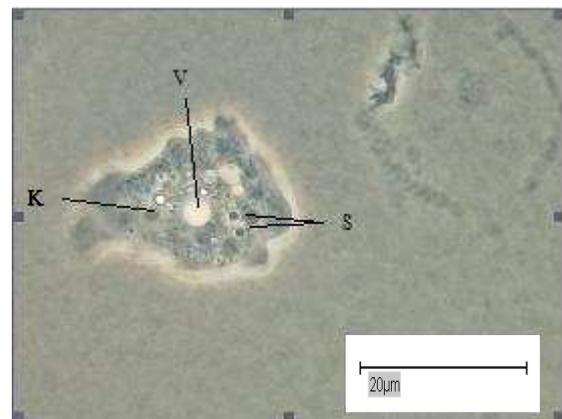


Abb.70: Vannellentrophozoit vom Stamm meda garda mit Sporen (S) in Nahrungsvakuolen; Phasenkontrast; V: Vakuole; K: Kern; Hellfeld-Durchlicht; Bar: 20µm

Die Vannellen wurden nach bereits lichtmikroskopisch deutlich sichtbarer Dilatation geschädigt. Sie dienten also als weitere Wirte des Stammes KAun1. Eine Propagierung des Stammes KAun1 war, ausgehend von diesen Kulturen mit *Vannella* sp., Stamm meda garda, möglich. Die Kulturhaltung erfolgte analog zu der Verfahrensweise bei VanAun0 durch die Überimpfung der Sporen bzw. durch das Ausschneiden eines Blöckchens und anschließende Überimpfung auf eine Reinkultur des Stammes meda garda.

Die Zeitabläufe/Wachstumsraten entsprachen, ebenso wie die gesamte Entwicklung des MLO denen bei *Vannella* sp. Stamm VanAun0.

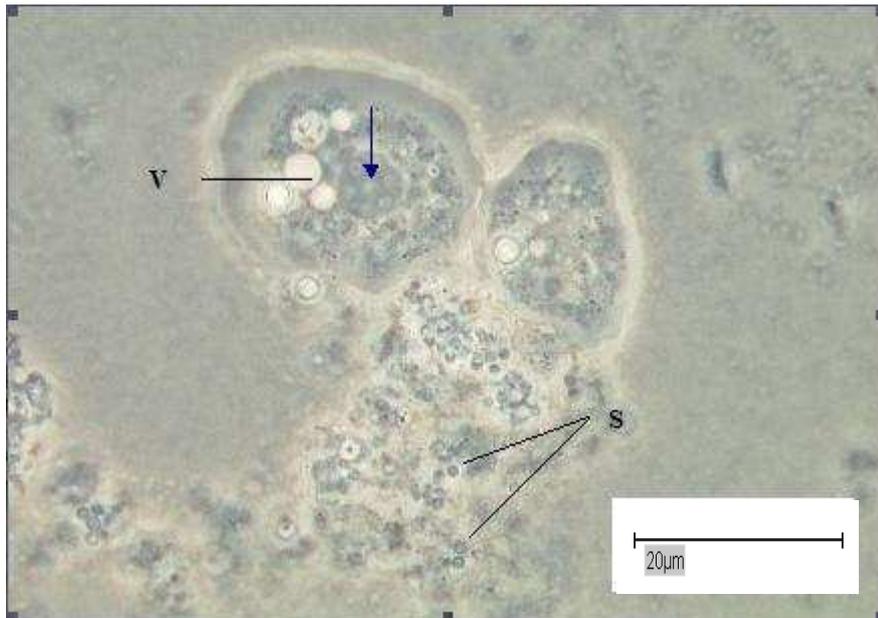


Abb.71: Trophozoiten vom Stamm meda garda; die linke Amöbe enthält Entwicklungsstadien (Pfeil) im Kern; die Sporen (S) liegen auch aussen; V: Vakuole; Hellfeld-Durchlicht; Bar: 20μm

Wie auch beim Stamm VanAun0 konnte die erfolgreiche Kokultivierung lichtmikroskopisch deutlich erkannt werden. **Abb.72** und **73** belegen, dass auch *Vannella* sp., Stamm meda garda, ebenso wie der Stamm VanAun0, als Wirt für die MLO dienen konnte.

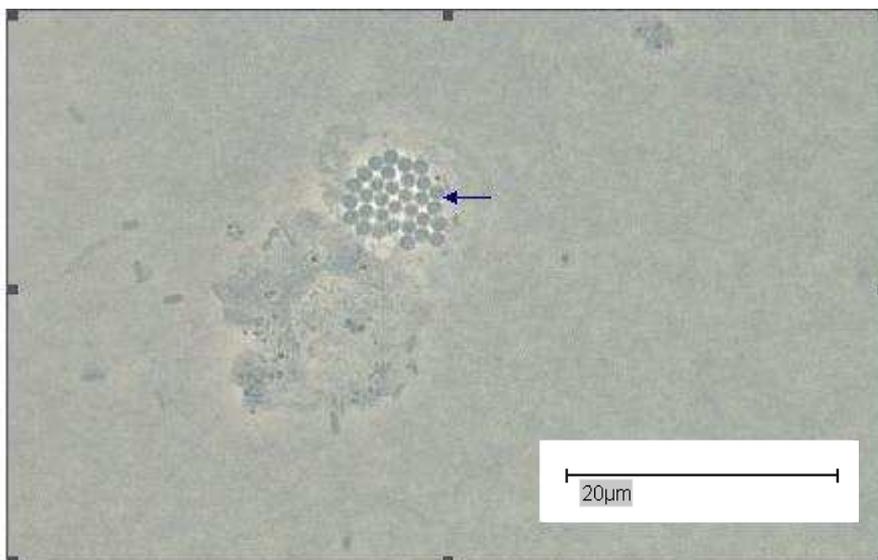


Abb.72: Trophozoiten vom Stamm meda garda; die obere Amöbe ist moribund oder bereits abgestorben; die Sporendifferenzierung ist bereits abgeschlossen (Pfeil); Hellfeld – Durchlicht; Bar: 20μm

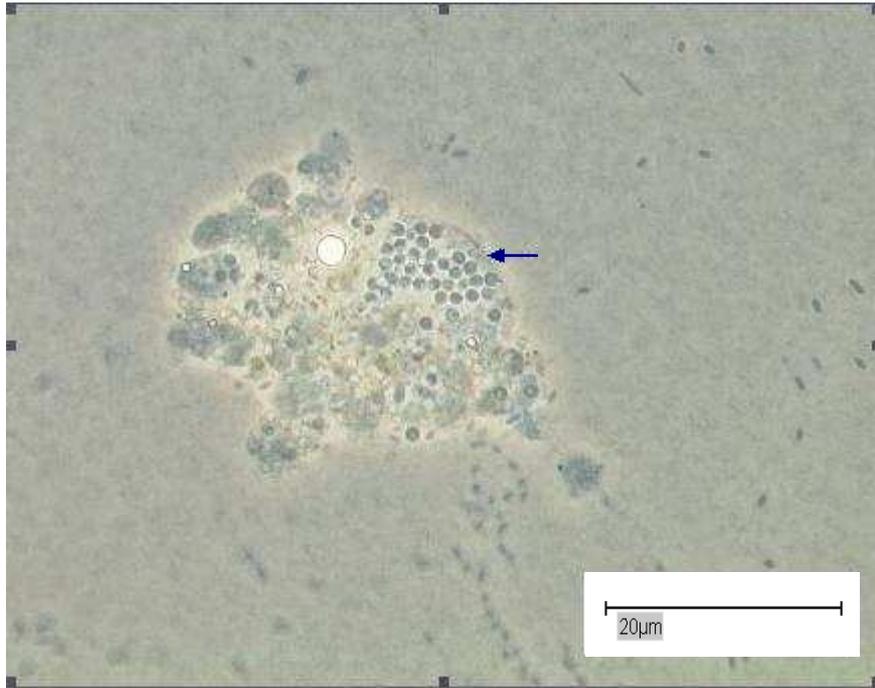


Abb.73: Rupturierte Amöbe vom Stamm meda garda; die Amöbe ist bereits abgestorben; Sporenhaufen (Pfeil); Hellfeld – Durchlicht; Bar: 20µm

Transmissionselektronenmikroskopischen Ergebnisse (TEM)

Wegen der Empfänglichkeit für KAun1 wurde dieser eindeutig infizierte Stamm auch elektronenmikroskopisch untersucht, wobei auf eventuell vorhandene Unterschiede zu VanAun0 geachtet werden sollte.

Die Aufnahme der Sporen durch die Vannellen des Stammes meda garda erfolgte ebenfalls durch Phagozytose. Via Food-Cup-Bildung wurden die Sporen ingestiert. Die Entwicklung fand im Kern der Vannellen statt. Auch die weiteren Proliferations- und Ausdifferenzierungsschritte incl. Dilatation entsprechen denen beim Wirts-Endozytobiont-Modell VanAun0 + KAun1. Nach abgeschlossener Sporenentwicklung kam es auch hier zur Ruptur der Trophozoiten und damit zur Freisetzung der infektiösen Sporen. Eine Aufnahme weiterer Sporen durch Phagozytose fand auch dann noch statt, als bereits Entwicklungsstadien im Kern zu erkennen waren. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass sich auch mehrere MLO im Kern entwickeln konnten.

Diese Ergebnisse sollen im Folgenden detailliert dargestellt werden:

Die Aufnahme der Sporen erfolgte durch Food-Cup-Bildung (**Abb.74** und **75**). In **Abb.74** sind zudem mehrere Sporen zu sehen, die von den Wirtsamöben bereits aufgenommen wurden.

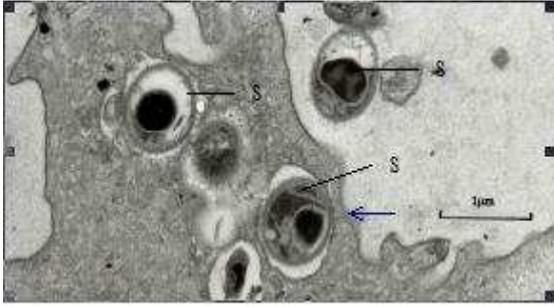


Abb.74: Erfolgte Phagozytose von Sporen (S) durch Vannellen des Stammes *meda garda*; die Zellmembran hat sich bereits wieder geschlossen (Pfeil); Sporen sind ebenfalls im Zytoplasma zu sehen; der Zellmembran aufgelagerte Glycostyli sind erkennbar; Bar: 1µm

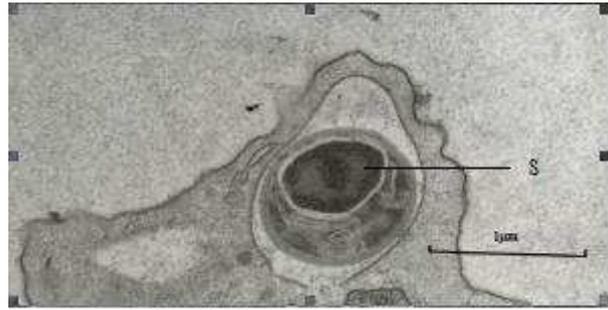


Abb.75: Erfolgte Phagozytose einer Spore (S) durch einen Trophozoiten des Stammes *meda garda*; die Zellmembran hat sich nach Food Cup-Bildung bereits wieder geschlossen; der Zellmembran aufgelagerte Glycostyli sind erkennbar; Bar: 1µm

Auch junge Parasitenstadien, die soeben die Kernmembran passiert haben, konnten belegt werden (**Abb.76**). Vorliegend konnte ein Eindringen in das Endosom nicht beobachtet werden.

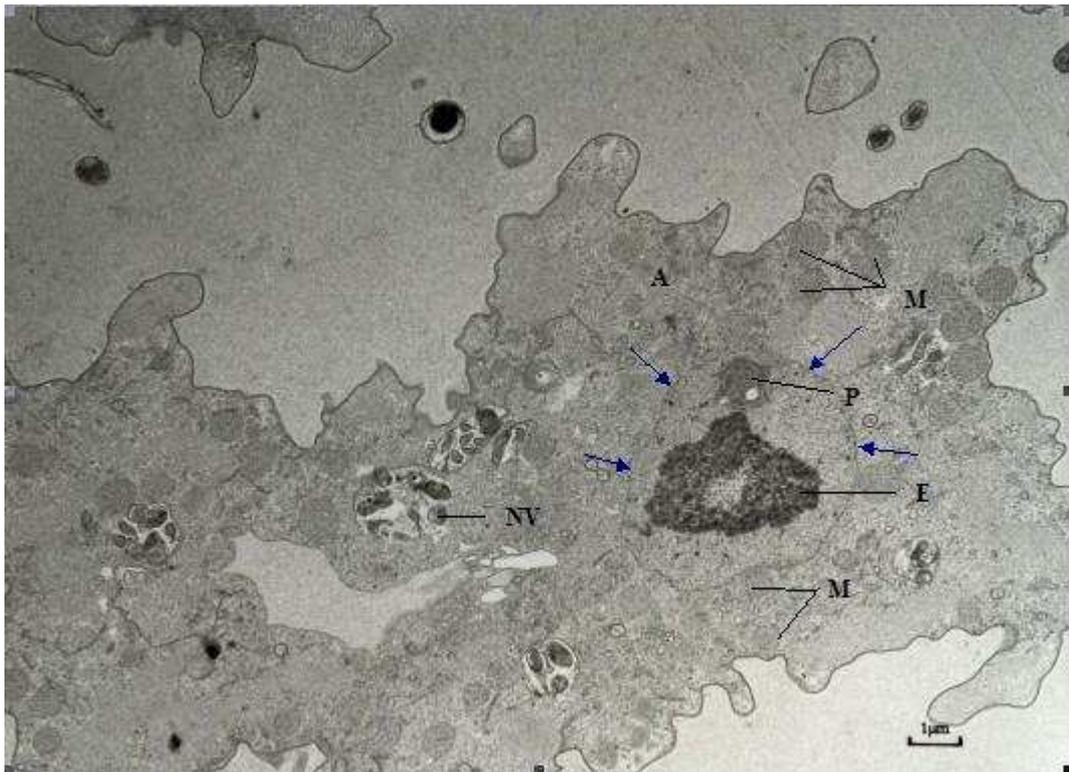


Abb.76: Ein Parasit (P) bzw. MLO ist bereits im Kern der Wirtsamöbe (A) des Stammes *meda garda*; hat somit die Kernmembran (Pfeile) passiert; E: Endosom; NV: Nahrungsvakuole; M: Mitochondrien; Bar: 1µm

Die Weiterentwicklung und Proliferation der MLO incl. Dilatation der Kernmembran der Wirtsamöben erfolgte analog der bereits bei *VanAun0* beschriebenen Vorgänge (**Abb.77** und **78**). Leere Sporenhüllen (Ghosts) konnten in Nahrungsvakuolen beobachtet werden (**Abb.79**).

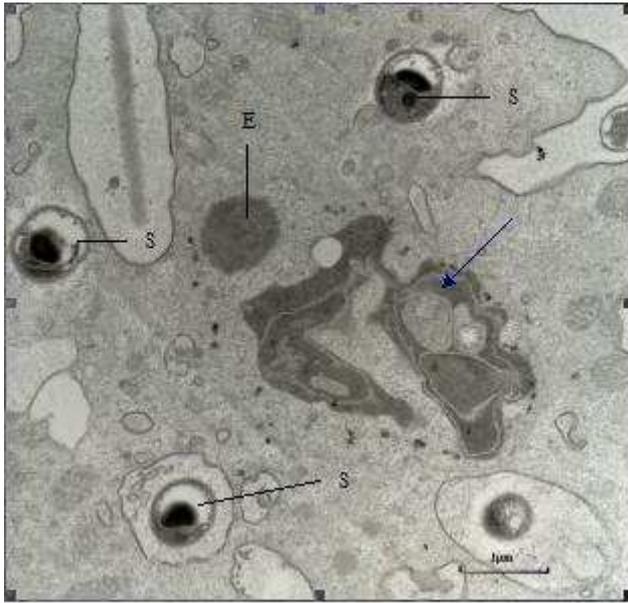


Abb.77: Weiterentwickeltes Stadium des MLO (Pfeil) im Kern der Wirtsamöbe *Vannella* sp. meda garda mit beginnender Proliferation; Sporen (S) in Nahrungsvakuolen im Zytoplasma; E: Endosom; Bar: 1µm

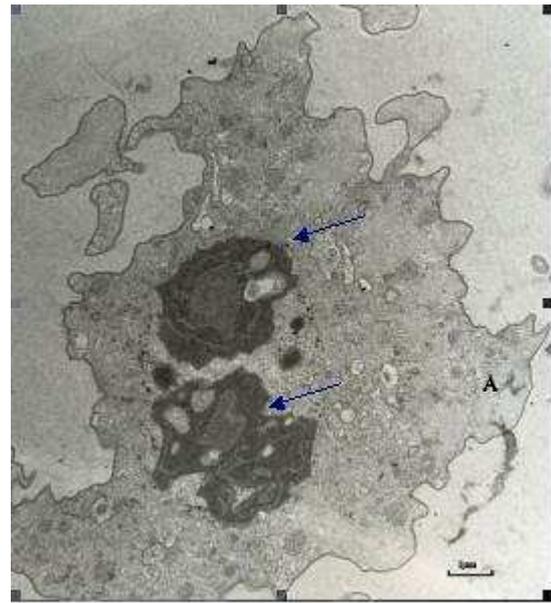


Abb.78: Weiterentwickeltes Stadium der MLO (Pfeile) im Kern der Wirtsamöbe (A) *Vannella* sp. meda garda mit beginnender Proliferation; Kernmembran stark dilatiert; Bar: 1µm

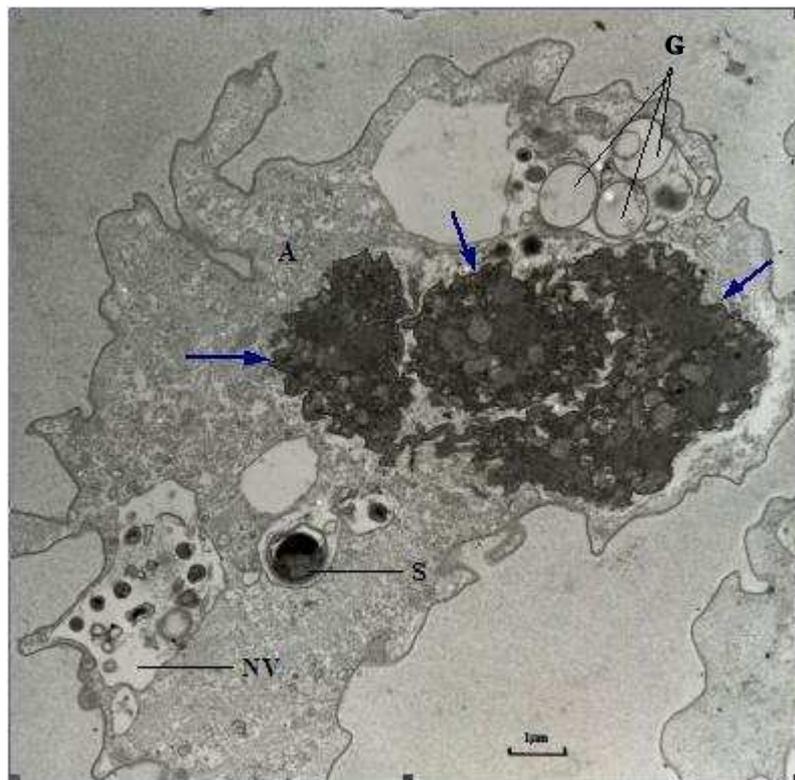


Abb.79: Drei weiterentwickelte MLO (Pfeile) im Kern der Wirtsamöbe (A); Proliferations- und Differenzierungsphase; einzelne Spore (S) in Nahrungsvakuole im Zytoplasma; die Kernmembran ist stark dilatiert; NV: Nahrungsvakuole; G: leere Sporenhüllen-Ghosts; Bar: 1µm

Bis zu 5 MLO wurden gleichzeitig im Kern von *Vannella* sp. (Stamm meda garda) gefunden. In der Folge zeigten sich weitere Entwicklungsstadien des Parasiten mit der Ausdifferenzierung zu Sporen (Abb.80 bis 83).

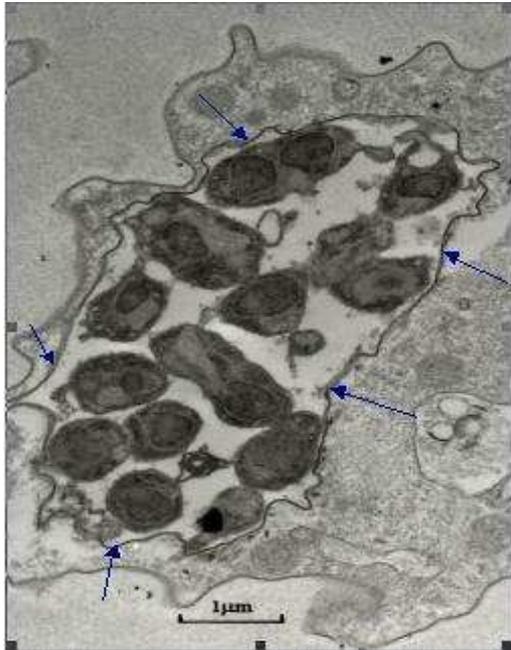


Abb.80: Weiter differenzierte Sporonten im Kern; die Abschnürungen sind bereits erfolgt; sehr starke Dilatation der Kernmembran (Pfeile); Bar: 1µm

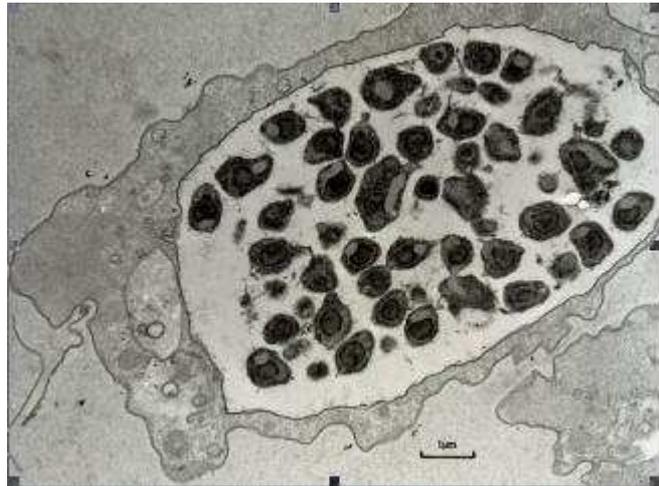


Abb.81: Abschnürung der Sporonten ist fast vollständig erfolgt; die Sporendifferenzierung ist weit fortgeschritten; der mit Parasitenstadien ausgefüllte Kern nimmt fast das gesamte Innere der Amöbe ein; Bar: 1µm

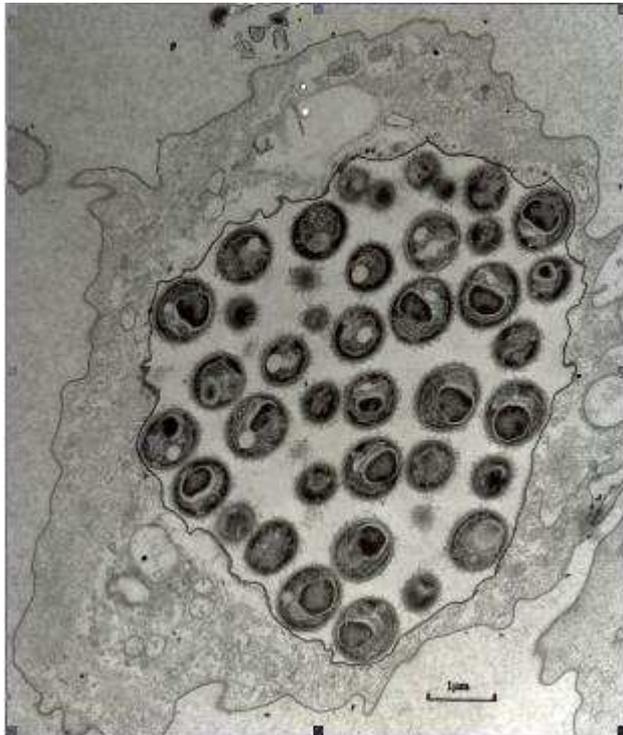


Abb.82: Die Sporenentwicklung ist abgeschlossen; alle Sporonten sind zu Sporen ausdifferenziert; die Amöbe ist moribund, steht kurz vor dem Absterben bzw. der Ruptur; Bar: 1µm

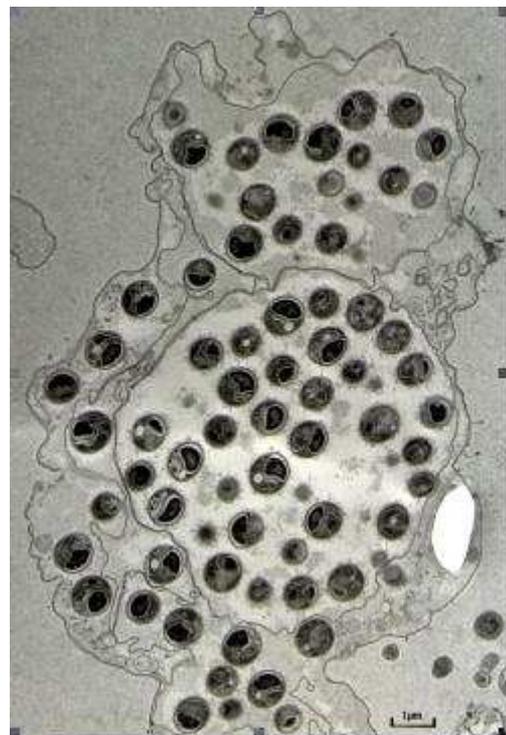


Abb.83: Auch bei *Vannella* sp. meda garda konnte ein Mehrfachbefall festgestellt werden; mindestens 3 Parasiten haben sich im Kern weiterentwickelt und befinden sich im etwa gleichen Entwicklungsstadium; Bar: 1µm

Der zweite Stamm, bei dem eine Proliferation von KAun1 im Kern nachgewiesen werden konnte, war *Vannella miroides*, Stamm Dent G1. Folgend soll auch dieser Stamm sowie die Kokultivierung detailliert beschrieben werden.

Vannella miroides, Stamm Dent G1

Die Vannellen dieses Stammes wurden 1995 von einer Bundeswehr-Dentaleinheit in Lahnstein isoliert. Die Trophozoiten sind im Durchschnitt $38,2\mu\text{m}$ lang ($s = 1,09$) und $27,7\mu\text{m}$ ($s = 1,01$) breit, der Kern besitzt einen Durchmesser von ca. $8,3\mu\text{m}$ ($s = 0,11$). **Abb.84** zeigt eine Lokomotionsform von *Vannella miroides* Dent G1 auf der Kulturplatte, **Abb.85** und **86** lassen die Schwimmform nach Zugabe von Amöbensaline erkennen. Nach dem Abschwemmen mit Amöbensaline zeigt sich eine Kriechform nach kurzer Schwimmphase.

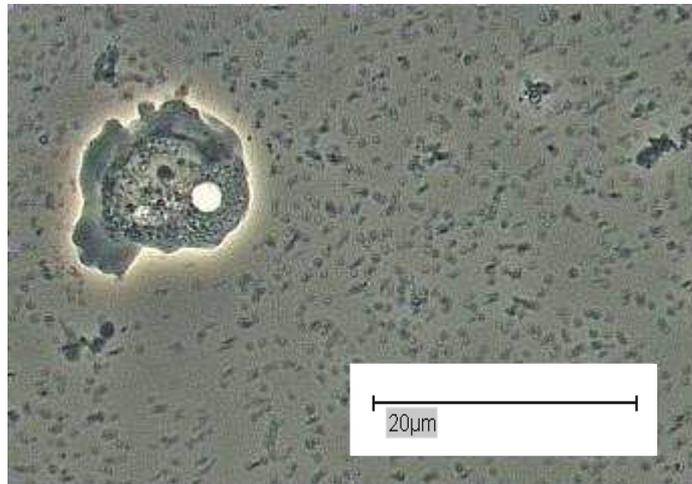


Abb.84: Lokomotionsform; Trophozoit des Stammes DentG1 auf Kulturplatte; hyalines Zytoplasma deutet die Lokomotionsrichtung an; Phasenkontrast; Bar: $20\mu\text{m}$

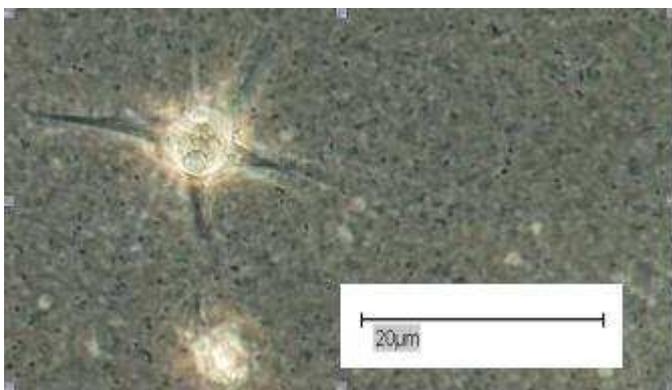


Abb.85: Schwimmform des Stammes DentG1 nach Abspülen mit Amöbensaline; Phasenkontrast; Bar: $20\mu\text{m}$

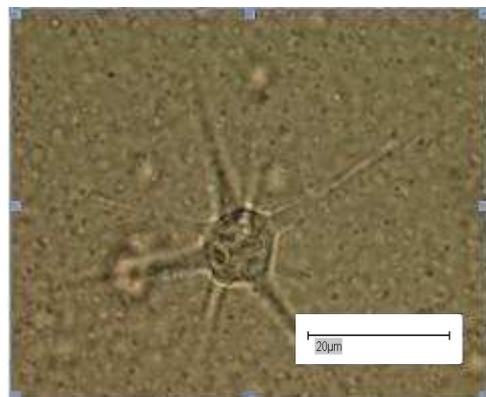


Abb.86: Schwimmform des Stammes DentG1 nach Abspülen mit Amöbensaline; Hellfeld-Durchlicht; Bar: $20\mu\text{m}$

Ergebnisse des Kokultivierungsversuchs mit *Vannella miroides*, Stamm DentG1

Lichtmikroskopische Ergebnisse

Nach Zugabe des ausgestochenen Agarblöckchens mit zahlreichen Sporen des Stammes KAun1 von Ausgangsplatten der Kokultivierung mit VanAun0, 2 Wochen p.i., konnte beobachtet werden, dass die Vannellen des Stammes DentG1 die Sporen via Phagozytose aufnahmen (siehe **Abb.87** und **88**). Stadien mit Sporen im Zytoplasma waren dann zu erkennen. Die anschließende Entwicklung bzw. Proliferation fand im Kern, analog zu den Beobachtungen bei VanAun0 + KAun1 statt.

Die Vannellen wurden ebenfalls nach bereits lichtmikroskopisch deutlich sichtbarer Dilatation geschädigt (siehe **Abb.89** und **90**). Sie dienten also auch als weitere Wirte des Stammes KAun1.

Eine weitere Propagierung des Stammes KAun1 war, ausgehend von diesen Kulturen, mit *Vannella miroides*, Stamm DentG1, möglich.

Die Kulturhaltung erfolgte analog zu der Verfahrensweise bei VanAun0 via Überimpfung der Sporen durch das Ausschneiden eines Blöckchens auf eine Reinkultur des Stammes DentG1.

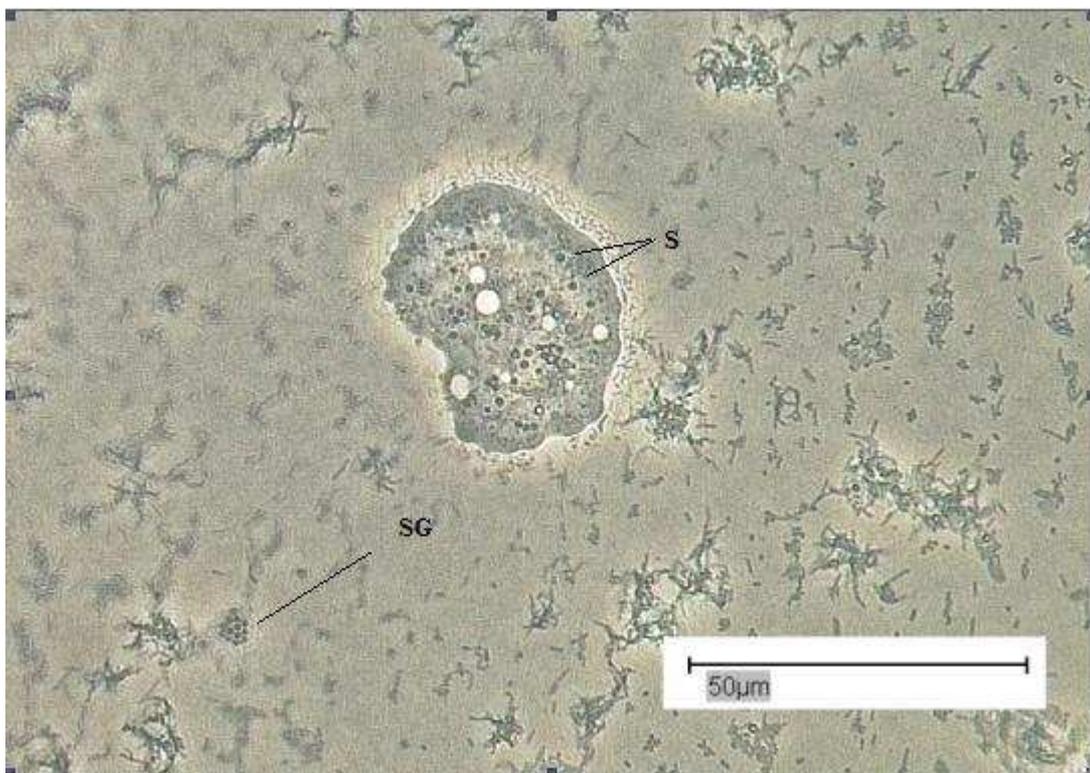


Abb.87: Trophozoit des Stammes DentG1 mit ingestierten Sporen (S); Sporengruppe (SG) außerhalb des Trophozoiten; Hellfeld – Durchlicht; Bar: 50µm

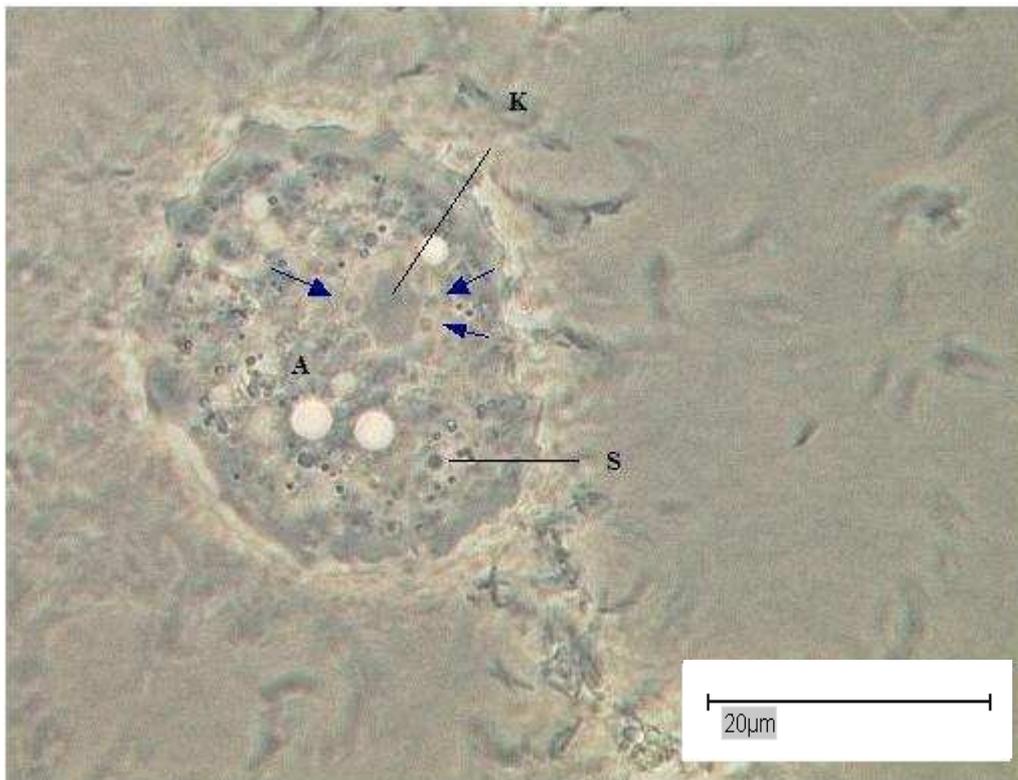


Abb.88: Trophozoit des Stammes DentG1 (A) mit ingestierten Sporen (S); mehrere Sporen (Pfeile) liegen bereits im Kern (K); Hellfeld – Durchlicht; Bar: 20μm



Abb.89: Trophozoiten des Stammes DentG1 mit bereits weiter entwickelten Parasiten KAun1 (Pfeil); Hellfeld – Durchlicht; Bar: 50μm

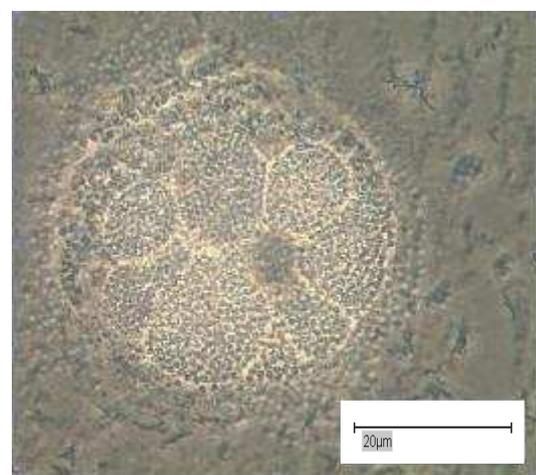


Abb.90: Trophozoit des Stammes DentG1 mit bereits weiter entwickelten Parasiten KAun1; Sporogenese bereits abgeschlossen; Hellfeld – Durchlicht; Bar: 20μm

Abb.89 bis 91 zeigen Entwicklungsstadien der MLO in *Vannella miroides*, Stamm DentG1. Nach erfolgter Ausdifferenzierung der Sporen kam es auch hier zur Ruptur der befallenen Trophozoiten und zur Freisetzung der infektiösen Stadien (Sporen).

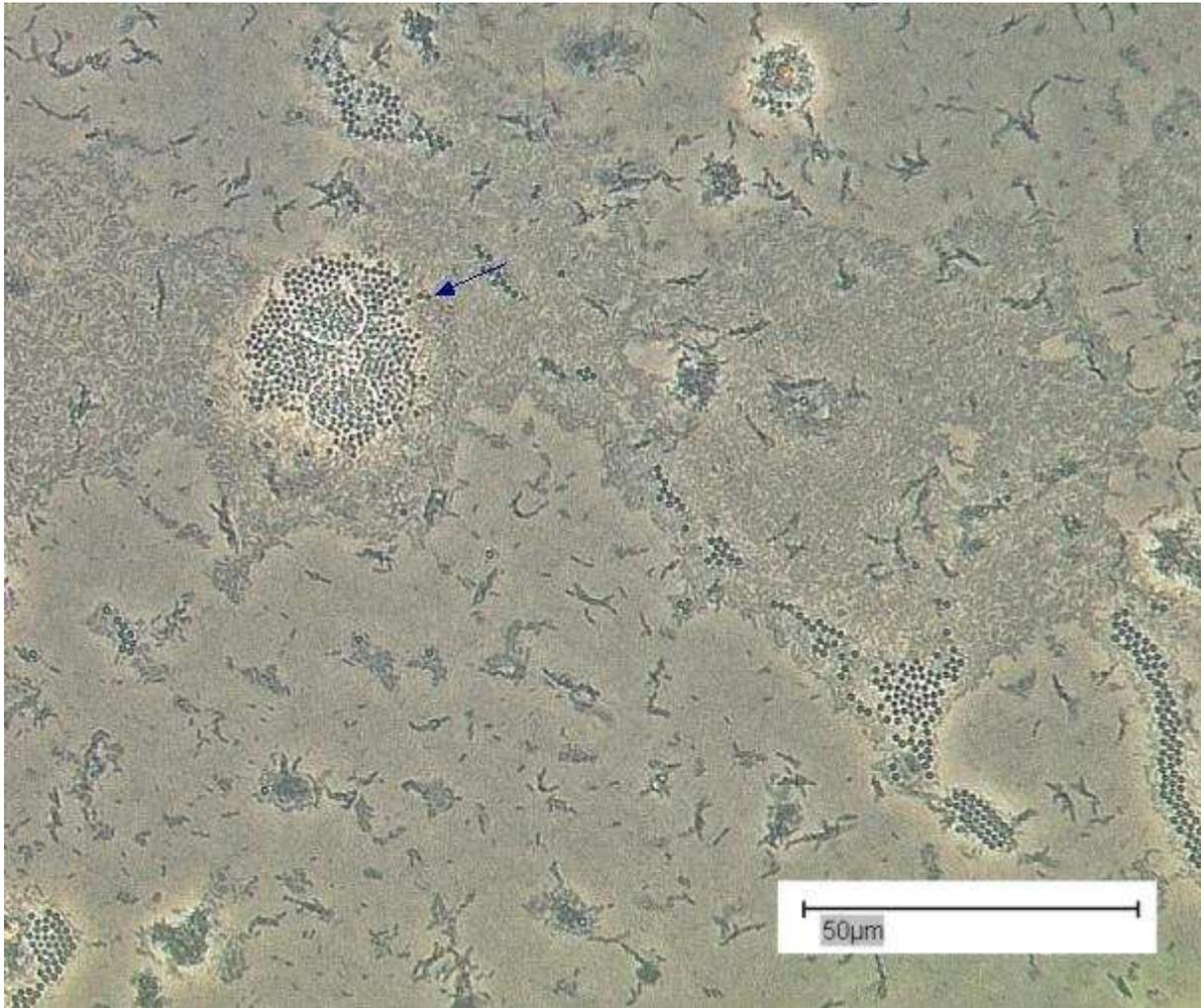


Abb.91: Übersichtsaufnahme: Rupturierte Wirtsamöbe des Stammes DentG1 (Pfeil); die Sporen sind weitgehend freigesetzt; die Umrisse der früheren Amöbe sind noch zu erkennen; zahlreiche freiliegende Sporen liegen auf der Kulturplatte; Hellfeld – Durchlicht; Bar: 50μm

Transmissionselektronenmikroskopische Ergebnisse (TEM)

Wegen der Empfänglichkeit für KAun1 wurde auch dieser infizierte Stamm transmissionselektronenmikroskopisch untersucht, wobei auch hier auf eventuell vorhandene Unterschiede zu den bislang bestätigten suszeptiblen Stämmen geachtet werden sollte. Die Aufnahme der Sporen durch die Wirtsamöben des Stammes DentG1 erfolgte ebenfalls durch Phagozytose via Food-Cup-Bildung (**Abb.92, 95**). Die **Abb.93** und **94** zeigen die Sporen nach der Ingestion im Zytoplasma.

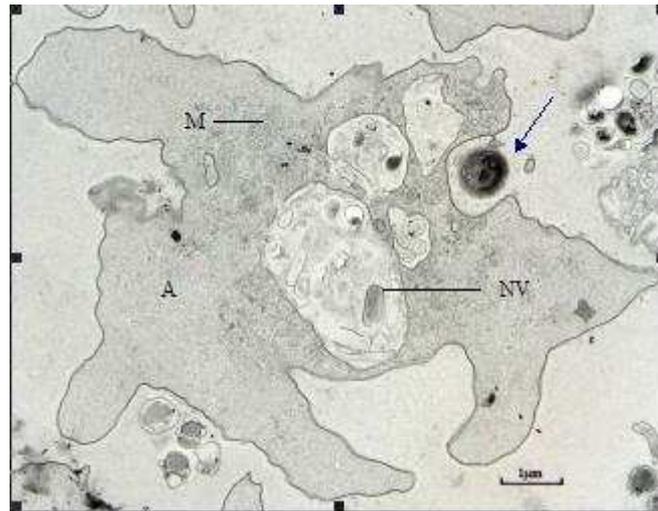


Abb.92: Aufnahme einer Spore durch Food-Cup-Bildung (Pfeil) von *Vannella miroides*, Stamm DentG1 (A); M: Mitochondrien; NV: Nahrungsvakuole; Bar: 1µm

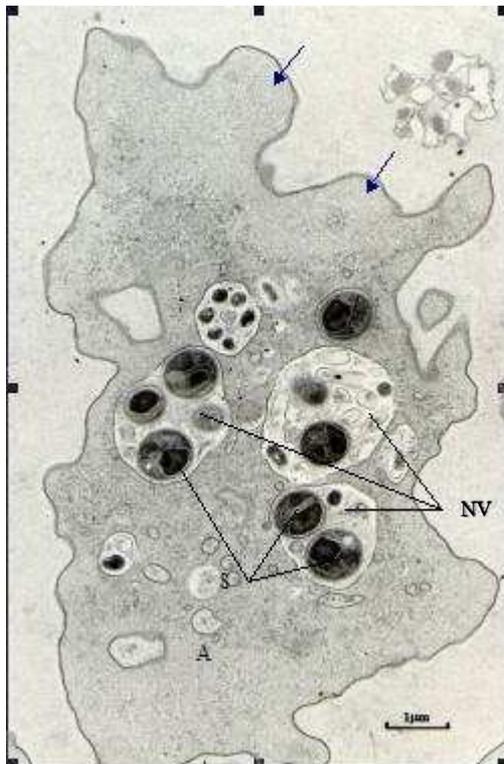


Abb.93: Zahlreiche bereits aufgenommene Sporen (S); teilweise zusammen mit anderen Bestandteilen in Nahrungsvakuolen (NV) der Wirtsamöbe (A); Pfeile: Hyaloplasma; Bar: 1µm

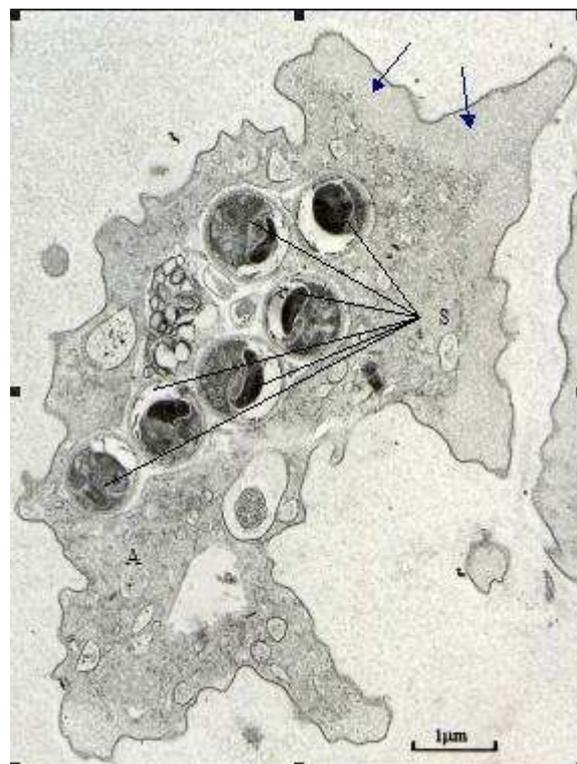


Abb.94: 6 Sporen (S) bereits durch *Vannella miroides*, DentG1 (A) ins Zytoplasma aufgenommen; Pfeile: Hyaloplasma; Bar: 1µm

Der in den **Abb.93** und **94** gut erkennbare helle Saum stellte das Hyaloplasma dar. Es konnten bereits in den Kern eingedrungene Parasitenstadien gefunden werden (**Abb.99**).

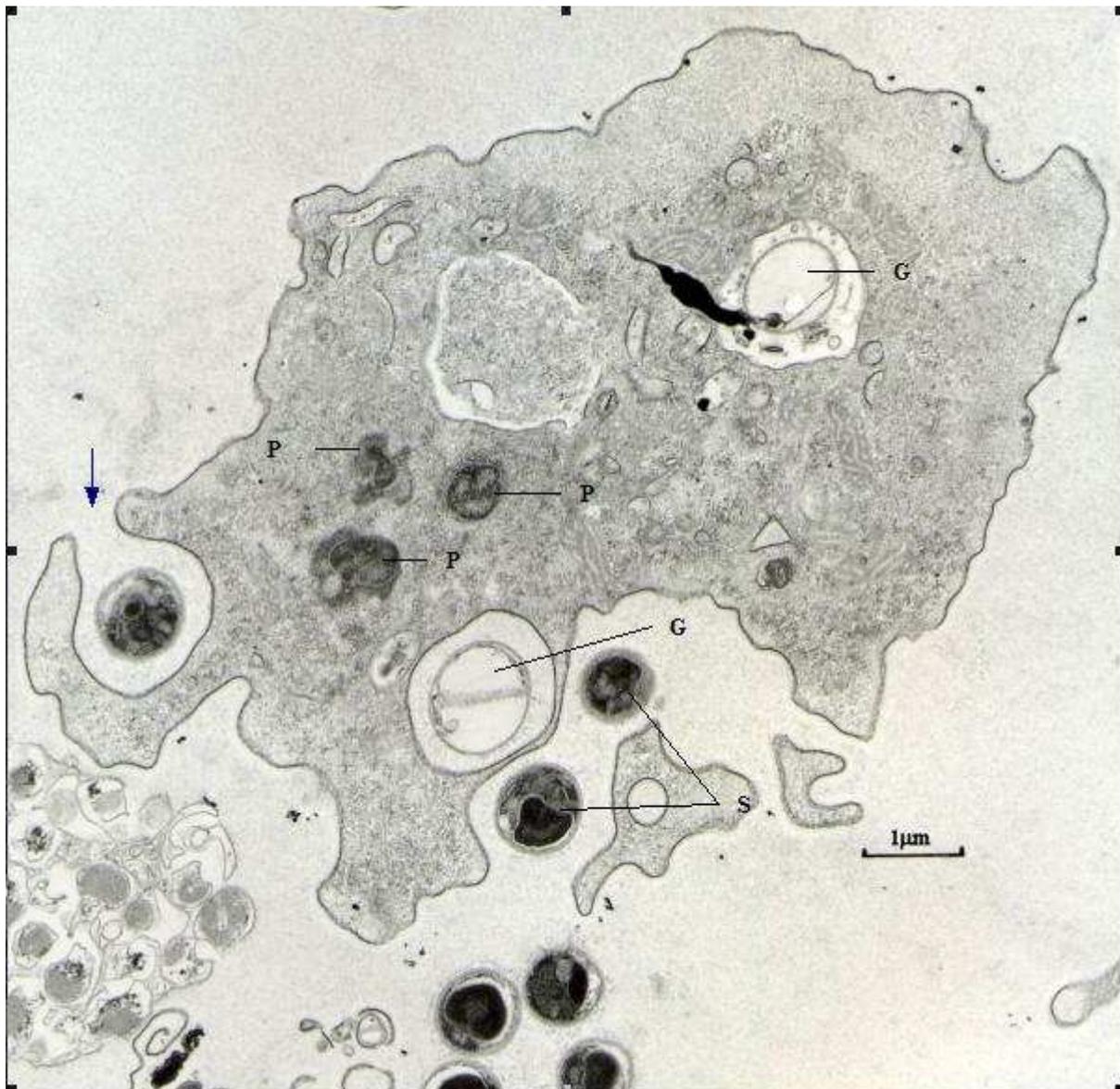


Abb.95: Aufnahme von Sporen durch Food-Cup-Bildung links (Pfeil) sowie unten rechts (S:Sporen), während sich bereits Parasiten (P) bzw. MLO im Kern entwickelt haben. Von anderen aufgenommenen Sporen ist nur noch die Sporenhülle erkennbar (G: Ghosts); Bar: 1μm

Im Rahmen der Food-Cup-Bildung wurden filamentöse Strukturen beobachtet (**Abb.95**, links). Sporenhüllen ohne erkennbares Sporoplasma waren zudem erkennbar (Ghosts).

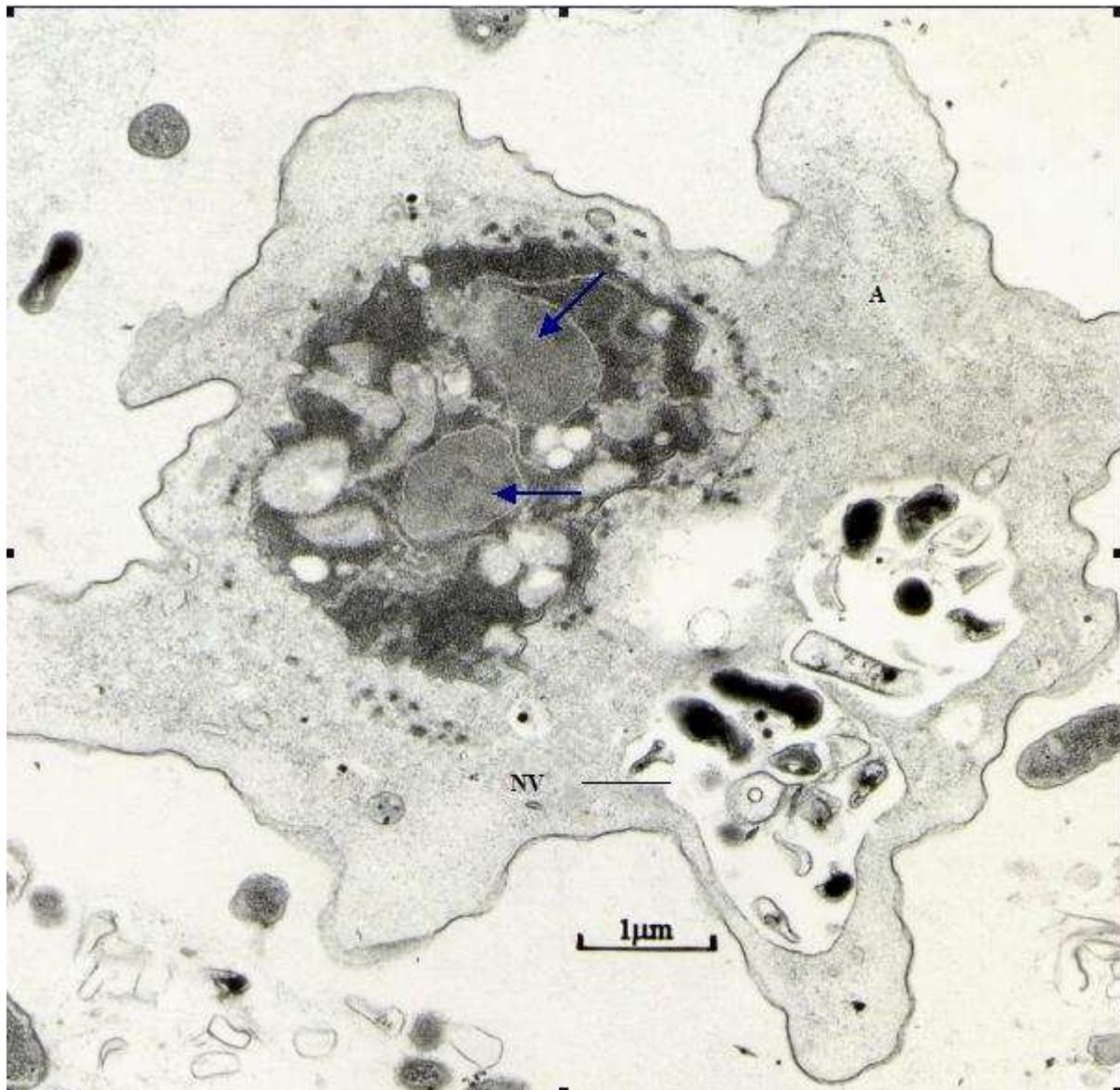


Abb.96: Entwicklungsstadien der MLO (Pfeile) im Kern von *Vannella miroides* DentG1; A: Wirtsamöbe; NV: Nahrungsvakuole; Bar: 1μm

Die Weiterentwicklung erfolgte wie bei den beiden bislang bestätigten Wirten VanAun0 und *Vannella* sp., Stamm meda garda im Kern (**Abb.96**). Nach einer Ausdifferenzierung des Parasiten folgten die Proliferationsphase (**Abb.97**) und die Sporenbildung (**Abb.98**).

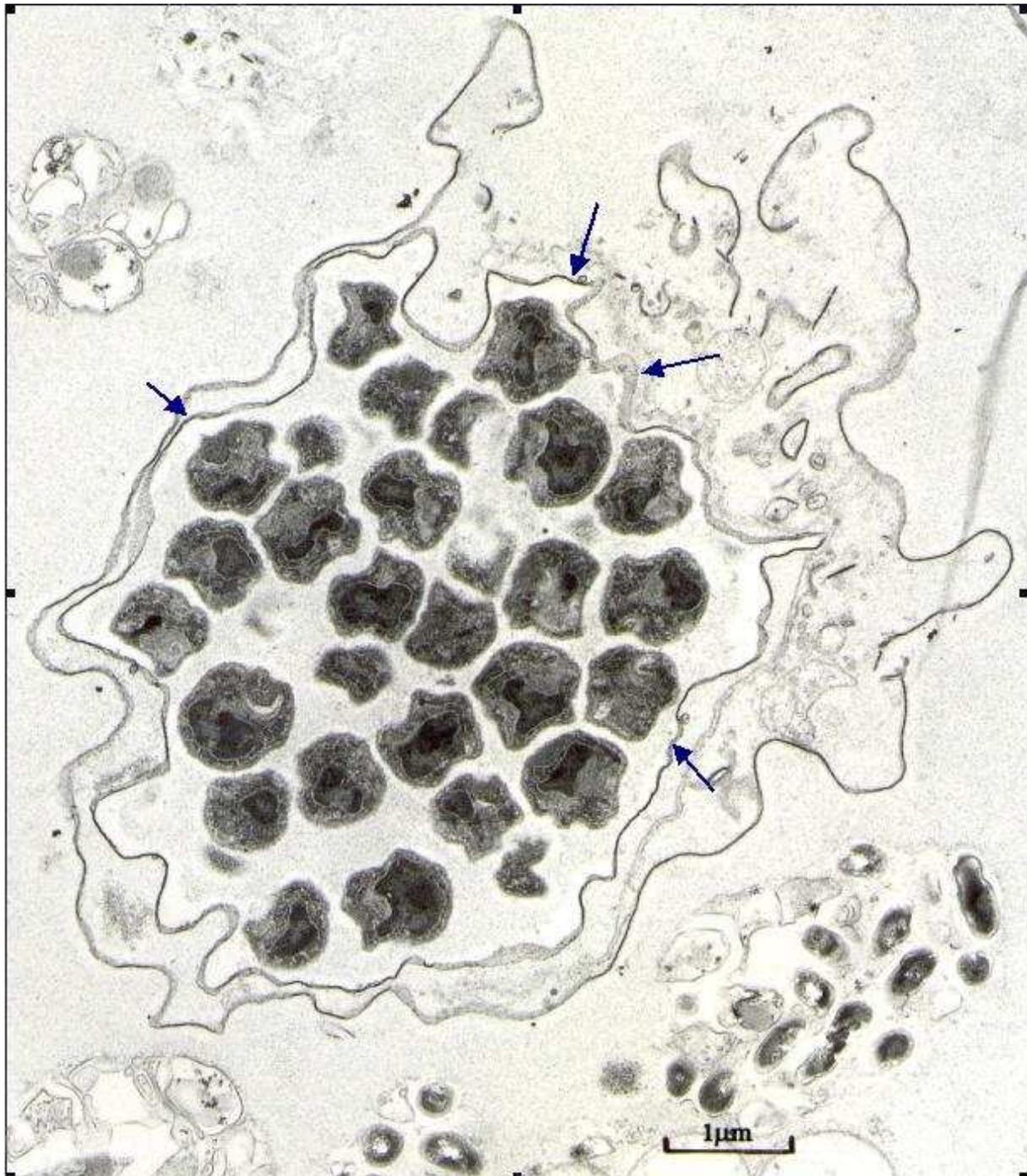


Abb.97: Fortgeschrittene Entwicklungsstadien der MLO. Die dilatierte Kernmembran (Pfeile) ist noch zu erkennen; Bar: 1 μm

Die Zeitabläufe/Wachstumsraten entsprachen denen bei *Vannella* sp. Stamm VanAun0. Dies konnte aufgrund der lichtmikroskopischen Untersuchungen, aber auch im Rahmen der gewählten Zeitintervalle für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigt werden.

Nach der Ausdifferenzierung und der erfolgten Sporenbildung erfolgte auch in diesem Fall die Freisetzung der Sporen durch die Ruptur der bereits moribunden Amöbe (Abb.98; Pfeil).

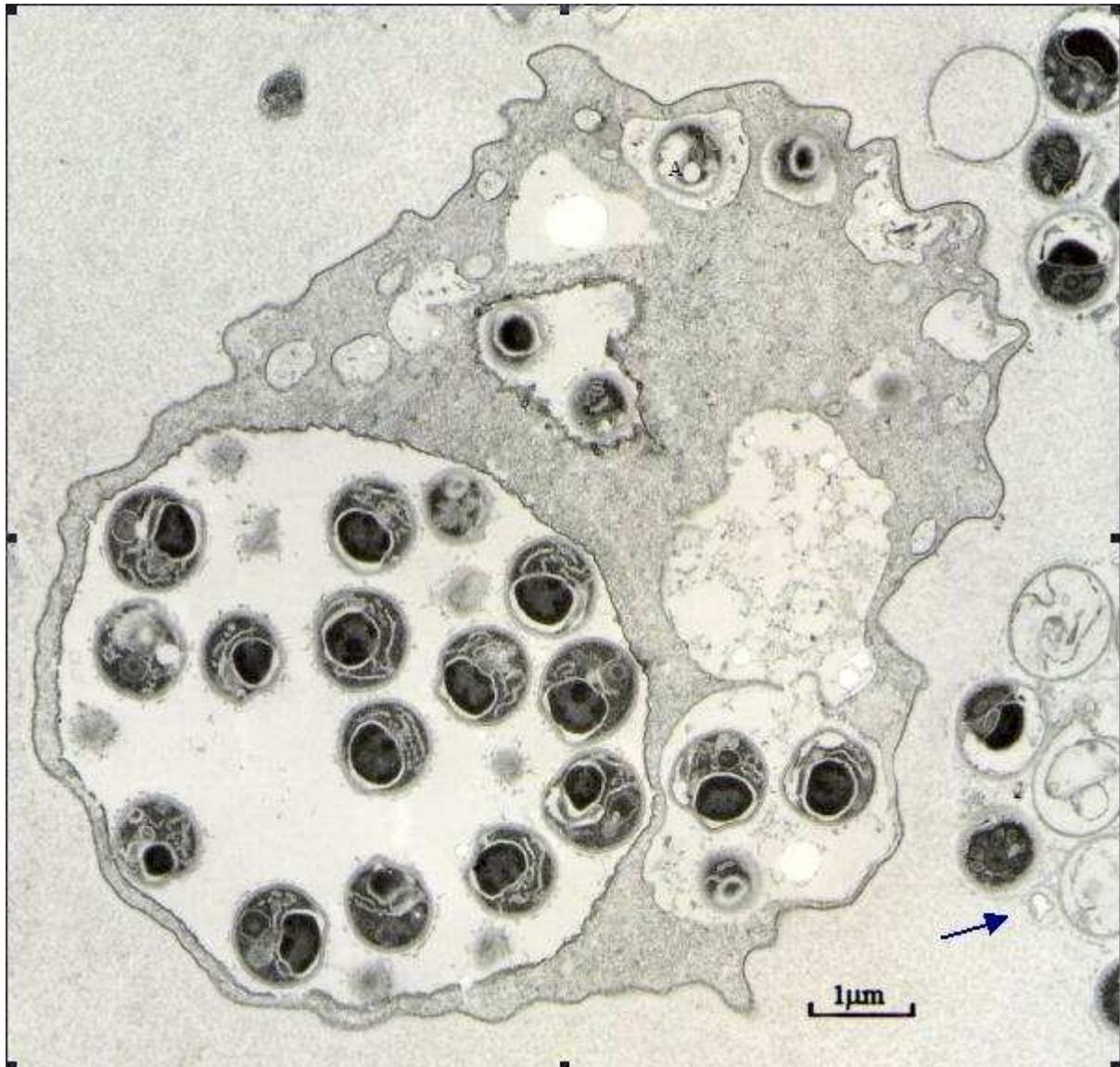


Abb.98: Ausdifferenzierte Sporen kurz vor dem Absterben der Amöbe (A); rechts Reste einer Wirtsamöbe nach Ruptur (Pfeil); Bar: 1μm

3.5.2.3 FLA mit Besonderheiten während der Kokultivierung mit KAun1

Bei zwei weiteren Vannellenstämmen, *Vannella platypodia* vp ash und *Vannella platypodia* cis plat, zeigten sich Phänomene, die - obgleich keine Proliferation von KAun1 nachgewiesen werden konnte – hier näher dokumentiert werden sollen.

Vannella platypodia (Glacer 1912; Page 1976)

V. platypodia ist die kleinste Vannellenspezies aus dem Süßwasser. Sie besitzt eine elektronenmikroskopisch nachweisbare Glycocalyx sowie Glycostyli, zwischen denen einfache Fäden zu erkennen sind. *V. platypodia* ist neben *V. mira* die häufigste in Swimming-Pools nachgewiesene Art (Cerva und Huldt 1974; Derr-Harf et al 1978; Desmet-Paix 1974; Rivera et al. 1983). Diese Arten wurden von Michel und Schneider (1980) in einem Physiotherapie-Schwimmbecken gefunden. Michel und Just (1984) fanden *V. platypodia* als eine von drei Vannellen-Arten in Kühl- und Spülwasser von Dental-Einheiten. Auch aus Wasserflaschen und selbst bei Luftuntersuchungen konnte *V. platypodia* nachgewiesen werden (Rivera et al. 1987). Sie bildet keine Zysten und geht bei Abschwemmung mit Amöbensaline nach der Ausbildung einer Schwimmform in eine Kriechform über.

Ergebnisse des Kokultivierungsversuchs mit *Vannella platypodia* vp ash

Die meisten lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigten die potenziellen Wirtsamöben (Übersichtsaufnahme **Abb.99**) bei der Sporenaufnahme via Phagozytose (**Abb.100**), die Zahl der Aufnahmen, auf denen eindeutig die Wirtsamöben mit den Sporen im Zytoplasma zu erkennen waren, war jedoch deutlich geringer.

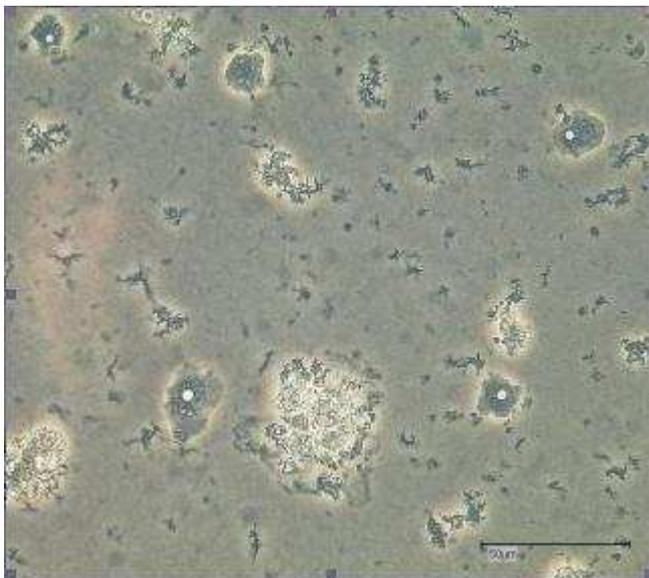


Abb.99: *Vannella platypodia* vp ash – Trophozoiten; Sporen sind in den Vannellen nicht zu erkennen; Übersichtsaufnahme; Phasenkontrast; Bar: 50µm

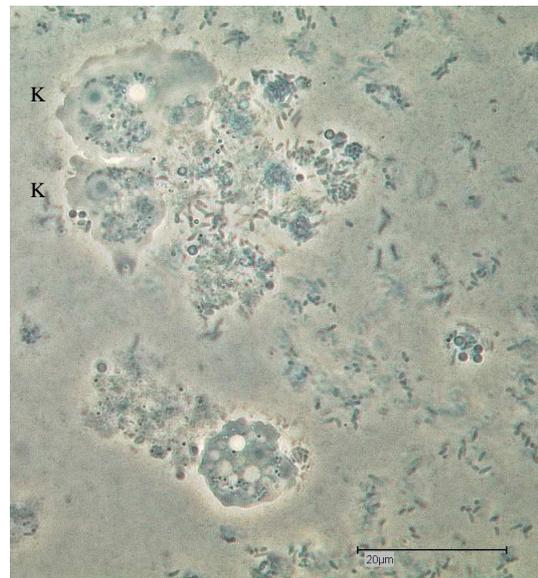


Abb.100: *Vannella platypodia* vp ash – Trophozoiten; Sporen sind im Inneren nicht zu finden; die Sporenaufnahme (Pfeil) ist jedoch erkennbar; K: Kern; V: Vakuole; Phasenkontrast; Bar: 20µm

Lichtmikroskopische Ergebnisse (Zeitreihenaufnahmen)

Aufgrund dieser ersten Ergebnisse und zur näheren Untersuchung dieses Phänomens erfolgten bei dem Kokultivierungsversuch von *Vannella platypodia* vp ash und KAun1 weitere Untersuchungen in Form von lichtmikroskopischen Zeitreihenaufnahmen zum Nachweis der Sporenaufnahme sowie der weiteren Entwicklung.

Die **Abb.101** bis **110** zeigen den Weg der Sporen, von der Phagozytose bis zur Exocytose.

Der Modus der Sporenaufnahme war der gleiche wie beim Modell VanAun0+KAun1.

Zusammenfassend lässt sich als Ergebnis der Kokultivierung festhalten, dass die Sporen phagozytiert wurden und sich anschließend im Zytoplasma der Vannellen befanden. Ein Eindringen in den Kern fand jedoch nicht statt. Stattdessen erfolgte die Exozytose der Sporen.

Alle Aufnahmen dieser Zeitreihe wurden innerhalb von 1,5 Minuten angefertigt, beginnend mit **Abb.101**, kurz nach Aufnahme der Spore durch die Wirtsamöben mittels Phagozytose.

Eine Entwicklung bzw. Proliferation im Kern oder im Zytoplasma konnte also nicht nachgewiesen werden. Die Vannellen wurden nicht geschädigt.

Sie dienten also nicht als weitere Wirte für Organismen des Stammes KAun1.

Eine weitere Propagierung incl. Proliferation des Stammes KAun1 war ausgehend von dieser Kulturplatte mit *Vannella platypodia* (Stamm vp ash) nicht möglich.

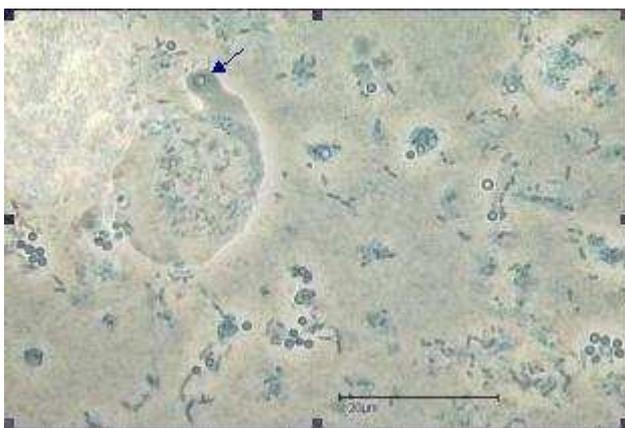


Abb.101: Wirtsamöbe *Vannella platypodia* vp ash kurz nach der Sporenaufnahme (Pfeil). Die Zellmembran hat sich nach erfolgter Food Cup – Bildung soeben erst wieder geschlossen; Phasenkontrast; Bar: 20µm

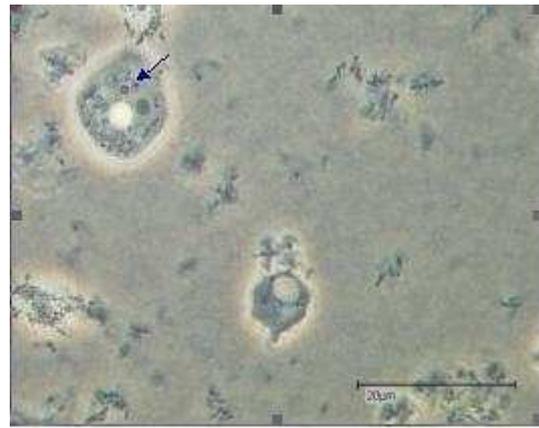


Abb.102: Wirtsamöbe *Vannella platypodia* vp ash beim Transfer der Sporen (Pfeil) im Zytoplasma; Phasenkontrast; Bar: 20µm

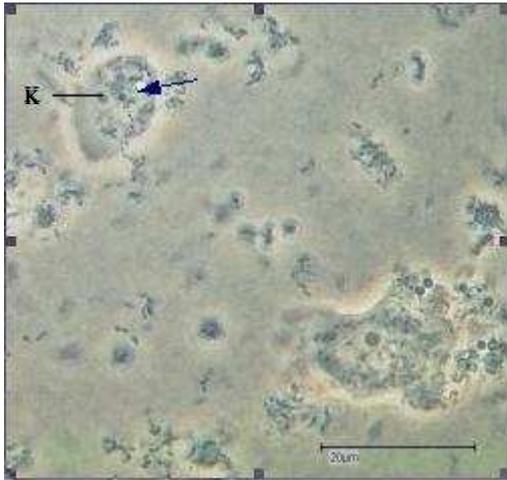


Abb.103: Weiterer Sporenttransport (Pfeil) durch die aktive Wirtsamöbe; K: Kern; Phasenkontrast; Bar: 20µm

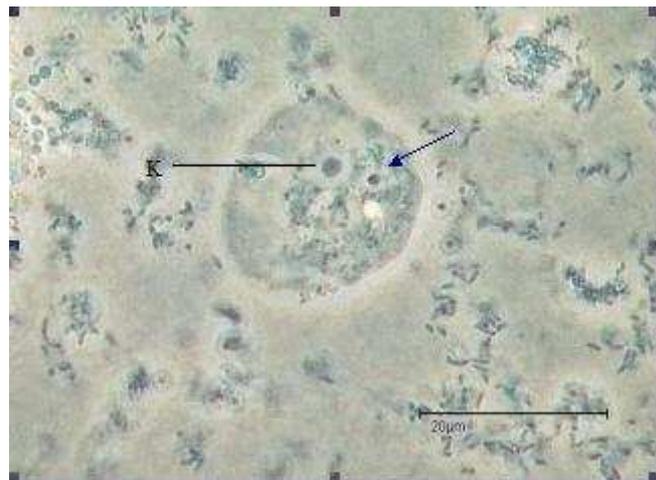


Abb.104: Weiterer Sporenttransport (Pfeil) durch die sehr aktive Wirtsamöbe; K: Kern; Phasenkontrast; Bar: 20µm

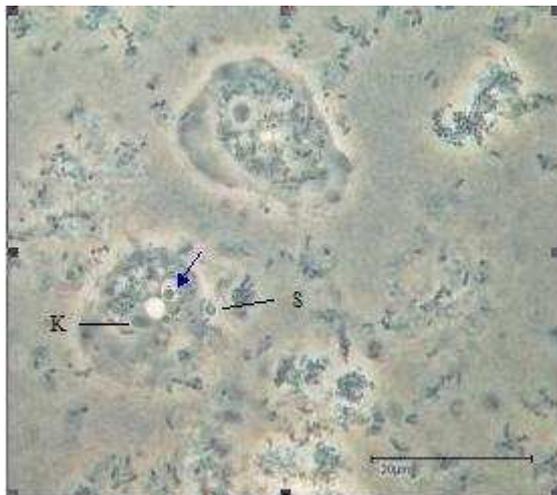


Abb.105: Weiterer Sporenttransport (Pfeil) durch die aktive Wirtsamöbe; die Aufnahme einer zweiten Spore (S) beginnt via Phagozytose; K: Kern; Phasenkontrast; Bar: 20µm

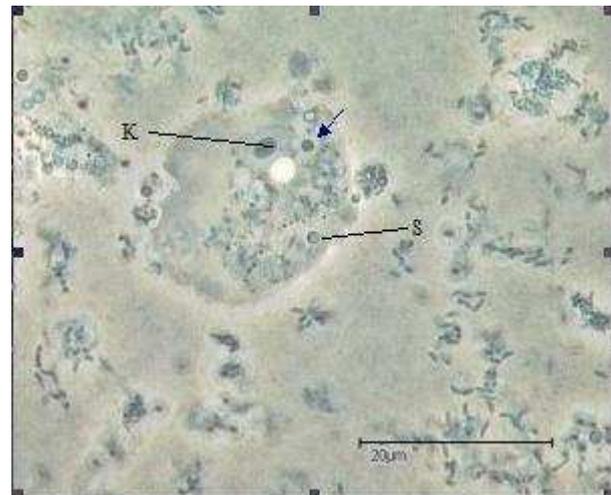


Abb.106: Weiterer Sporenttransport (Pfeil) der Wirtsamöbe; Aufnahme einer zweiten Spore (S) ist abgeschlossen; K: Kern; Phasenkontrast; Bar: 20µm

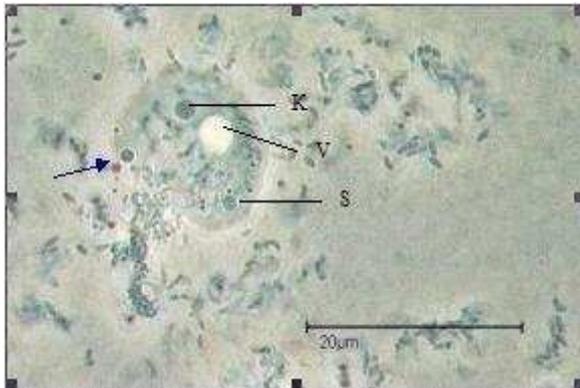


Abb.107: Eine Spore wird durch die Wirtsamöbe wieder ausgeschieden (Pfeil); eine weitere Spore (S) im Zytoplasma; K: Kern; Phasenkontrast; Bar: 20µm

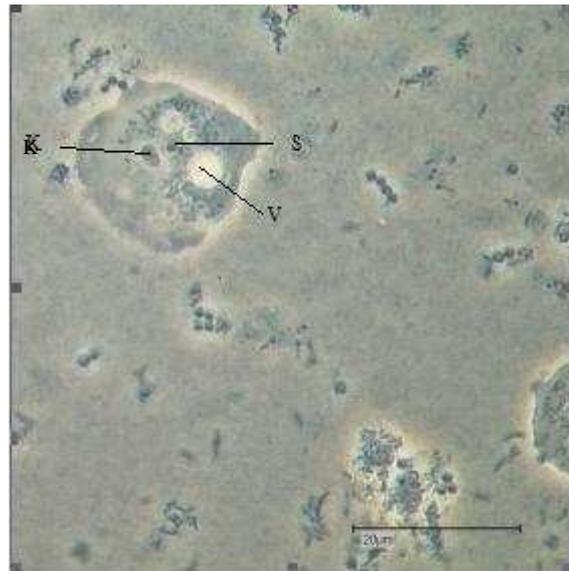


Abb.108: Die Wirtsamöbe jetzt nur noch mit einer Spore (S) im Zytoplasma; K: Kern; Phasenkontrast; Bar: 20µm

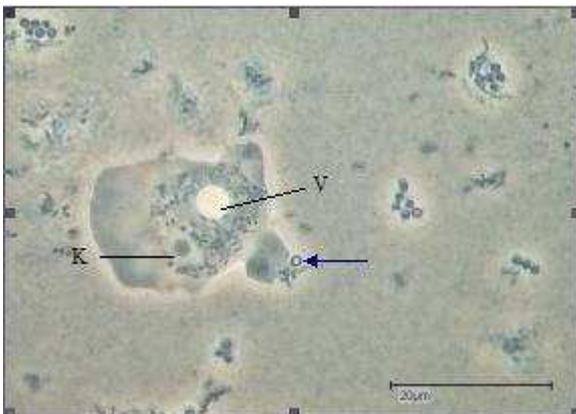


Abb.109: Die Wirtsamöbe scheidet zweite noch verbliebene Spore via Exozytose aus (Pfeil); V: Vakuole; K: Kern; Phasenkontrast; Bar: 20µm

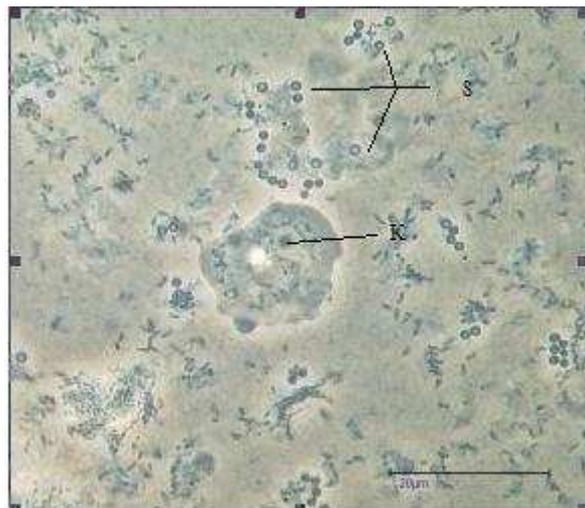


Abb.110: Die Wirtsamöbe hat alle Sporen via Exozytose ausgeschieden; zahlreiche Sporen (S) sind auf der Kulturplatte zu erkennen; K: Kern; Phasenkontrast; Bar: 20µm

Ergebnisse des Kokultivierungsversuchs mit *Vannella platypodia*, Stamm cis plat

Auch hier wurden aufgrund erster Ergebnisse bei dem Kokultivierungsversuch von *Vannella platypodia* cis plat und KAun1 weitere Untersuchungen in Form von Zeitreihenaufnahmen angefertigt. Der Grund war ebenfalls, dass die meisten bis dato gemachten Aufnahmen zwar offensichtlich die potenziellen Wirtsamöben bei der Sporenaufnahme durch Phagozytose zeigten. Dennoch gelang es nicht, Aufnahmen der Wirtsamöben mit Sporen im Zytoplasma zu erhalten. Dieses Phänomen galt es lichtmikroskopisch aufzuklären.

Alle Aufnahmen dieser Zeitreihe wurden innerhalb von 1,5 Minuten angefertigt, beginnend mit **Abb.111**, kurz nach Kontakt der Wirtsamöben mit der Spore.

Abb.111 bis **114** lassen erkennen, dass eine Sporenaufnahme entgegen den ersten Vermutungen doch nicht stattfand. Vielmehr kam es zwar zu einem Kontakt der Vannellen mit den Sporen; diese wurden aber regelrecht umflossen. Eine Entwicklung bzw. Proliferation im Kern oder im Zytoplasma konnte nicht nachgewiesen werden. Die Vannellen wurden nicht geschädigt. Sie dienten also nicht als weitere Wirte des Stammes KAun1. Eine weitere Propagierung des Stammes KAun1 incl. Proliferation war ausgehend von dieser Kulturplatte mit *Vannella platypodia* (Stamm cis plat) nicht möglich.

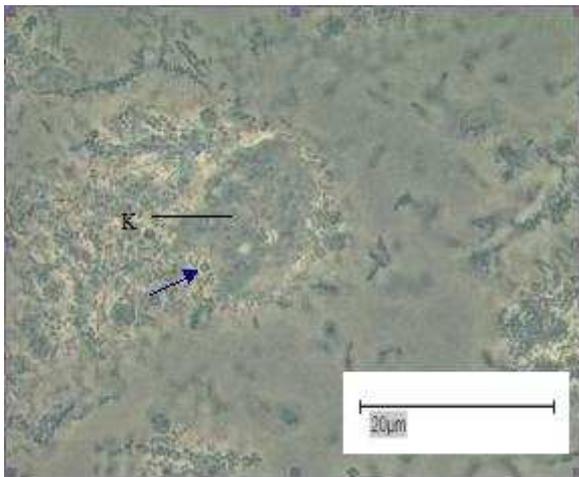


Abb.111: *Vannella platypodia* cis plat – Trophozoit; Lokomotionsform bei der Adhäsion einer Spore (Pfeil); K: Kern; Phasenkontrast; Bar: 20µm



Abb.112: *Vannella platypodia* cis plat – Trophozoit; Lokomotionsform bei der Adhäsion einer Spore (Pfeil); Ausbildung einer Food Cup; Phasenkontrast; Bar: 20µm

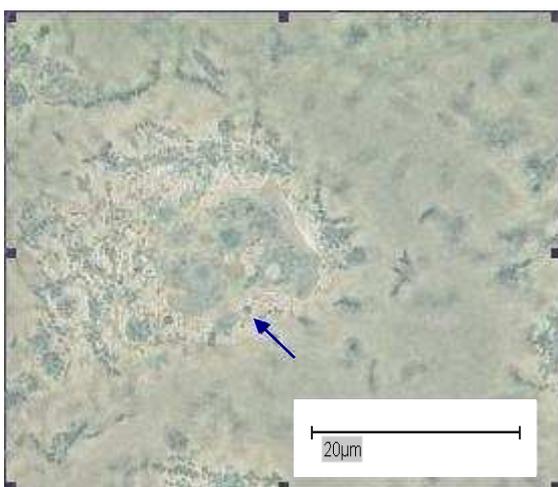


Abb.113: *Vannella platypodia* cis plat – Trophozoit; Spore wurde nicht aufgenommen (Pfeil); Lokomotionsform kriecht an der Spore vorbei; Phasenkontrast; Bar: 20µm

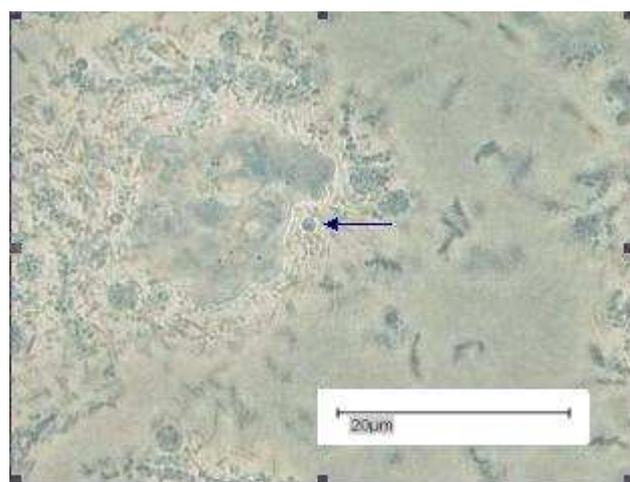


Abb.114: *Vannella platypodia* cis plat – Trophozoit; Spore wurde nicht aufgenommen (Pfeil); Amöbe kriecht an der Spore vorbei; Phasenkontrast; Bar: 20µm

3.5.3 Ergebnisse der Wirtsspektrumsversuche mit Zellkulturen

Zur Ergänzung der Wirtsspektrumsversuche wurden noch Kokultivierungsversuche mit Zellkulturen gemacht. Denn es wurden bereits zahlreiche Zelllinien im Rahmen von Untersuchungen an Mikrosporidien genutzt, z.B. Vero, MRC5 und MDCK-Zellen. Mikrosporidien aus Isolaten, die durch Hornhautabstriche bei AIDS-Patienten gewonnen worden waren, konnten bereits in MDCK – Zellen kultiviert werden (siehe Kapitel 1.1.5).

MDCK-Zellen

Die MDCK-Zellen bilden nach dem Anheften ein polar differenziertes Epithel auf dem Boden einer Kulturflasche als planer Monolayer aus (siehe **Abb.115** und **116**).



Abb.115: MDCK-Zellen als planer Monolayer in Kulturflasche; 50% bewachsen; Phasenkontrast; Bar: 100µm

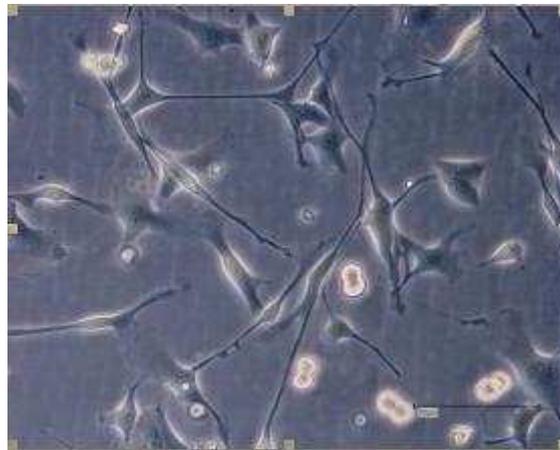


Abb.116: MDCK-Zellen als planer Monolayer in Kulturflasche; 90% bewachsen; Phasenkontrast; Bar: 50µm

Ergebnisse des Kokultivierungsversuchs mit MDCK-Zellen

Nach Zugabe der Suspension mit zahlreichen Sporen des Stammes KAun1 von Ausgangsplatten der Kokultivierung mit VanAun0, 2 Wochen p.i., zu den MDCK-Zellen konnte beobachtet werden, dass sich die Sporen im Zellkulturmedium befanden (**Abb.117** und **118**). Eine Aufnahme oder gar ein Eindringen der Sporen in die als Monolayer gewachsenen MDCK-Zellen fanden jedoch nicht statt. Die Zellen wurden nicht geschädigt. Sie dienen somit nicht als Wirte des Stammes KAun1.



Abb.117: Monolayer von MDCK-Zellen mit zahlreichen Sporen, diese liegen ausschließlich im Kulturmedium (als Punkte erkennbar); Phasenkontrast; Bar: 50μm



Abb.118: Monolayer von MDCK-Zellen mit zahlreichen Sporen, sie liegen ausschließlich im Kulturmedium (als Punkte erkennbar); Phasenkontrast; Bar: 50μm

MRC-5 - Zellen

Humane diploide Lungenfibroblasten (Medical Research Council-MRC-5) sind adhären wachsende, primäre, humane, embryonale Fibroblasten (siehe **Abb.119** und **120**).

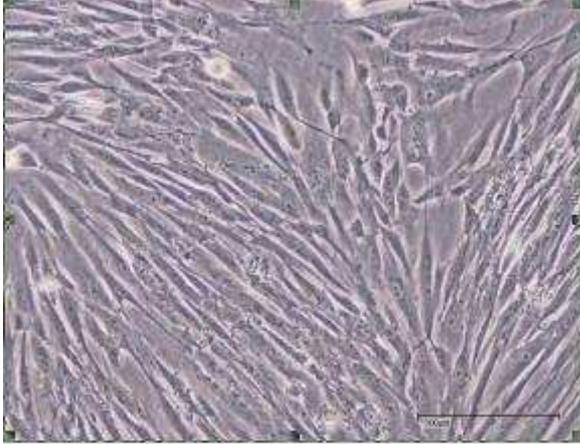


Abb.119: MRC-5-Zellen; Fibroblasten als Monolayer; 90% bewachsen; Phasenkontrast; Bar: 100µm

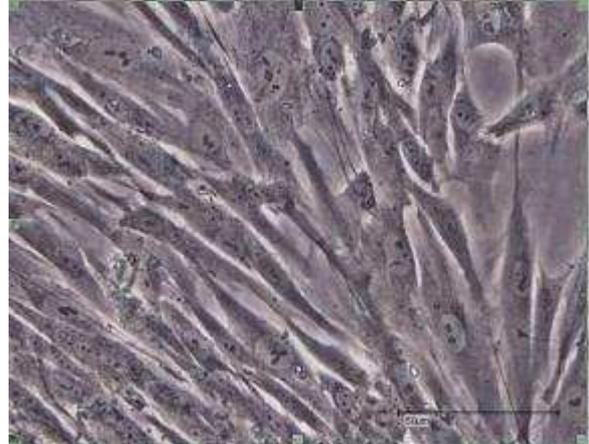


Abb.120: MRC-5-Zellen; Fibroblasten als Monolayer; 90% bewachsen; Phasenkontrast; Bar: 100µm

Ergebnisse des Kokultivierungsversuchs mit MRC-5 Zellen

Nach Zugabe der Suspension mit zahlreichen Sporen des Stammes KAun1 von Ausgangsplatten der Kokultivierung mit VanAun0, 2 Wochen p.i. zu den MRC-5 Zellen konnte beobachtet werden, dass sich die Sporen im Zellkulturmedium befanden (**Abb.121** und **122**).

Eine Aufnahme oder ein Eindringen der Sporen in die als Monolayer gewachsenen MRC-5 Zellen fanden jedoch nicht statt. Die Zellen wurden nicht geschädigt und dienten also nicht als Wirte des Stammes KAun1.

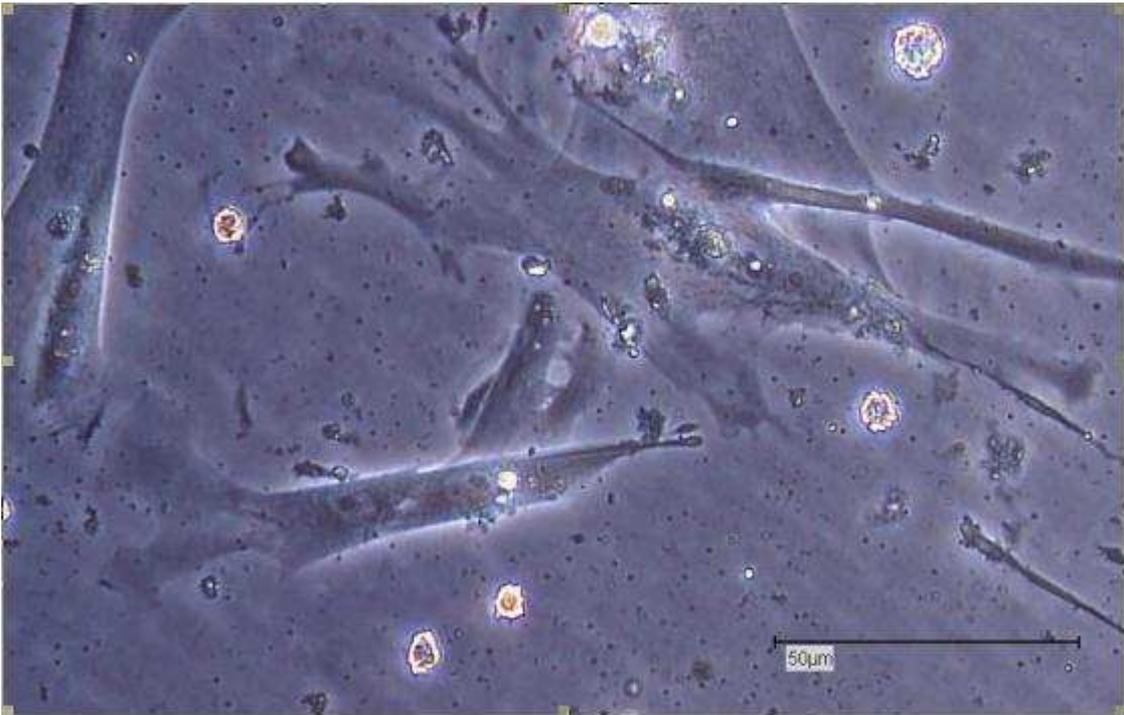


Abb.121: Monolayer von MRC-5 Zellen mit zahlreichen Sporen von KAun1; sie liegen ausschließlich im Kulturmedium (als Punkte erkennbar); Phasenkontrast; Bar: 50μm

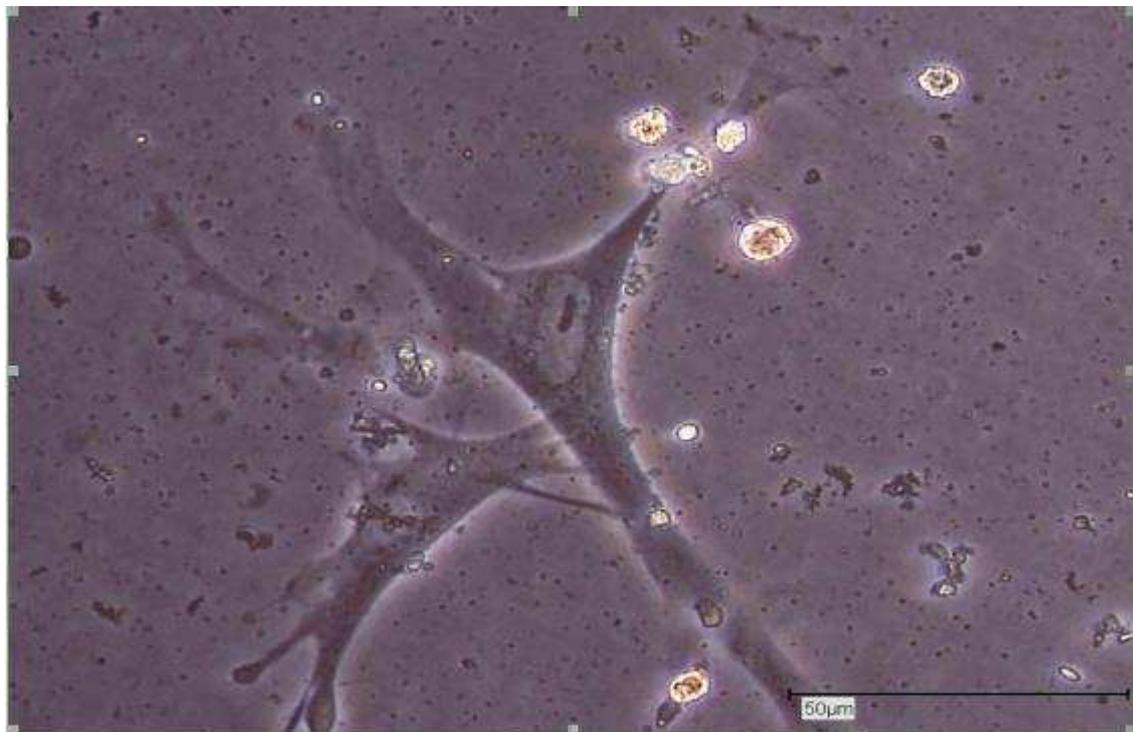


Abb.122: Monolayer von MRC-5 Zellen mit zahlreichen Sporen von KAun1; sie liegen ausschließlich im Kulturmedium (als Punkte erkennbar); Phasenkontrast; Bar: 50μm

4. Diskussion

4.1 Untersuchung des Infektionsweges des Mikrosporidien-ähnlichen Organismus „KAun1“ in die Wirtsamöben (*Vannella* sp. Stamm „Aun0“)

Der Aufnahmeweg und der Transfer der Sporen in den Amöbenkern, in dem sich die Entwicklung fortsetzt, wurden im ersten Teil der vorliegenden Arbeit dargestellt.

Gemäß der Fallbeschreibung konnten initial im Rahmen der lichtmikroskopischen Untersuchung einer eingesandten Probe kulturell Vannellen bestimmt werden, in deren Kern sich kokkoide Organismen vermehrten. Die in unserer Untersuchung eingesetzten Vannellen des Stammes VanAun0 besitzen keine Glycostyli, die eigentlich für die Gattung *Vannella* charakteristisch sind. Weil jedoch alle übrigen Kriterien, wie Bewegungen, Auftreten von Lokomotions- und Schwimmformen etc. absolut charakteristisch für die Gattung *Vannella* waren (Page 1988), erfolgte die taxonomische Zuordnung als *Vannella* sp.

Bei diesen Formen liegt eine Art Glycocalyx in Gestalt eines einfachen „fuzzy coat“ der Zellmembran auf. Eventuell reagiert die Amöbe mit diesem „Surface coat“, der über Liganden bzw. Rezeptoren verfügt. Die mehrfach beobachteten fibrillären Strukturen der Vannellen weisen auf eine Adhäsion bzw. Anlagerung der Sporen an der Amöbenmembran hin. Sowohl licht- als auch transmissionselektronenmikroskopisch konnte eindeutig belegt werden, dass die Nahrungsaufnahme sowie die Sporenaufnahme ausschließlich via Phagozytose erfolgte. Ein aktives Eindringen, wie es z.B. von *Plasmodium*-Sporozoitien, *Theileria*- bzw. *Babesia*-Merozoiten in Erythrozyten beschrieben ist, fand nicht statt (vgl. Mehlhorn 2001).

Eine Phagozytose beginnt üblicherweise mit der Rezeptor- vermittelten Adhäsion der aufzunehmenden Partikel. Mit der Bindung des Liganden wird das Zytoskelett der phagozytierenden Zelle aktiviert. Durch das Umfließen der Partikel mittels Pseudopodien beginnt die Bildung des Phagosoms. Die Aufnahme in die Zelle (Endozytose) erfolgt mittels Invagination bzw. Food-Cup-Bildung (Christiansen und Marshall 1965). Der Weitertransport erfolgt mit Hilfe von Aktinnetzen. Die Membranen verschmelzen über dem aufgenommenen Partikel und die innere Zellmembran löst sich ab. Es entsteht eine Nahrungsvakuole. Die anschließende Bildung eines Phagolysosoms geht einher mit der Verschmelzung mit den von Golgi-Apparat gebildeten Lysosomen. Dadurch kommt es zu einer Absenkung des pH-Wertes im Phagolysosom und die lysosomalen Enzyme werden wirksam (Hof und Dörries 2005).

Normalerweise sind also lysosomale Enzyme in der Lage, bestimmte Makromoleküle durch Hydrolyse abzubauen. Entweder kommt es hierbei zum vollständigen intrazellulären Abbau, der Ablagerung von Substanzen bzw. der Bildung von Telolysosomen (residual bodies).

Unverdaute Substanzen werden von der Zelle jedoch meist im Rahmen der Exozytose wieder ausgestoßen (Mehlhorn und Ruthmann 1992).

Einige Erreger überleben jedoch nach erfolgter Phagozytose innerhalb der Zelle mit der Hilfe verschiedener Mechanismen (z.B. Wachsbildung, Schleimkapselbildung). Die Verhinderung der Phagosom-Lysosom-Fusion ist von *Toxoplasma gondii* bekannt (Hahn et al. 2006). Im Falle von *Toxoplasma gondii* erfolgt das Eindringen (Invasion) nach erfolgter Adhäsion mit Hilfe des Einsatzes von Rhoptrien, deren Inhalt das Eindringen aktiv unterstützt. Es wird eine parasitophore Vakuole gebildet. Um diese Vakuole lagern sich die Mitochondrien der Wirtszelle an. Da keine Plasmamembran-Marker vorliegen, erfolgt keine Verschmelzung mit den Lysosomen. Das Ausschütten von Parasitenproteinen in die Vakuole bewirkt die Ausbildung einer parasitophoren Membran und die eines die Vakuole stabilisierenden Netzwerkes (Beckers et al. 1994).

Bei *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, Rickettsien aber auch Trypanosomen ist beschrieben, dass sie dadurch überleben, dass sie nach Zerstörung der phagosomalen Membran aus dem Phagosom in das Zytoplasma der Zelle entkommen (Méresse et al. 1999). Weiterhin gibt es die Möglichkeit, dass sich Mikroorganismen an die prinzipiell lebensfeindliche Umwelt des Phagolysosoms anpassen und dieses für ihre Vermehrung nutzen (*Coxiella burnetti* und Leishmanien; siehe Mehlhorn und Ruthmann 1992). Eine weitere Gruppe von Mikroorganismen ist in der Lage, das Schicksal des Phagosoms zu verändern. Es kommt nicht zur Phagosomenreifung und der Mikroorganismus verbleibt in einem sogenannten „ungewöhnlichen Phagosom“ (z.B. *Mycobacterium tuberculosis* und *Legionella pneumophila*). Letztere Mikroorganismen und deren Wechselwirkungen mit Wirtszellen sind Gegenstand der aktuellen Forschung (siehe Fajardo-Moser 2006).

Zahlreiche intrazelluläre Organismen (Bakterien, Viren und Eukaryonten) sind bereits als Endozytobionten von FLA beschrieben, wobei einige dieser intrazellulären Organismen auch ein pathogenes Potential besitzen (Michel et al. 1994 sowie Horn et al. 2000). Dieses Phänomen führte in der Folgezeit zu der anschaulichen Bezeichnung „Trojanisches Pferd der Mikroorganismen“ für ebensolche FLA (siehe Einleitung sowie Michel 1997).

In einer im Jahr 2005 von Alsam et al. durchgeführten Studie konnte nachgewiesen werden, dass Phagozytose bei Acanthamoeben ein Aktin-abhängiger Prozess ist. Durch Tyrosinkinase ausgelöste Aktinpolymerisation spielt bei der Aufnahme von Bakterien eine wichtige Rolle.

Die anfängliche Wechselwirkung zwischen intrazellulären Erregern und Wirtszellen wird über die Bindung eines bakteriellen Liganden, wie z.B. Pili, an einen Oberflächenrezeptor der Wirtszelle vermittelt. Beobachtungen haben jedoch ergeben, dass auch eine mikrofilamentunabhängige Endozytose stattfindet und, dass die Aufnahme der Bakterien und nicht die Bindung der entscheidende Schritt im Invasionsprozess ist (Fields et al. 1993). Im hier untersuchten Fall konnte ein aktiver Vorgang im Sinne des Gebrauchs eines Schleuderapparates zum Eindringen in die Zelle oder den Kern auch elektronenmikroskopisch nicht beobachtet werden. In einigen licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind Sporen in der Nähe eines Vannellen-Trophozoiten zu erkennen, die anschließend phagozytiert werden, was an beginnender Food Cup –Bildung erkennbar ist. Im Rahmen dieser Endozytose wurden die aufzunehmenden Partikel zunächst an der Zellmembran angelagert, anschließend von der Membran umschlossen und als geschlossene Bläschen nach innen gestülpt. Der Aufnahmeweg von Mikrosporidien durch Phagozytose ist lediglich insoweit beschrieben, dass bereits Makrophagen mit Mikrosporidien (hier *Encephalitozoon* sp.) infiziert werden konnten (Didier et al. 1998). Auch Coccidien können sich durch Phagozytose von Makrophagen unter Bildung einer parasitophoren Vakuole aufnehmen lassen (Mehlhorn und Ruthmann 1992). Spezielle Organellen von Coccidien wie etwa Rhoptrien oder Conidien konnten während der Beobachtung des gesamten Entwicklungsganges nicht nachgewiesen werden. Leere Sporenhüllen mit Teilen des ausgeschleuderten Polfadens, welche direkt auf eine Nutzung des Polarfilaments hindeuten, wurden ebenfalls nicht nachgewiesen. Lediglich leere Sporenhüllen („Ghosts“) mit intakter Sporenhülle wurden in Nahrungsvakuolen gefunden. Diese Ghosts stellten jedoch möglicherweise Reste von lysierten Sporen dar. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist z.B. die Zeitdauer des Verweilens der Sporen in den Nahrungsvakuolen; schaffen es die MLO binnen eines bestimmten Zeitraums nicht, in den Kern zu gelangen, können sie offensichtlich innerhalb der Phagosomen der Wirtsamöbe lysiert werden. Um so mehr plausibel erscheint eine solche Annahme, da alle übrigen variierbaren Bedingungen (wie Temperatur, Futterbakterien etc.), die einen Einfluss haben könnten, bei allen Versuchen absolut identisch waren. Für alle weiteren Untersuchungen war entscheidend, dass in den Vannellen des Stammes VanAun0 insbesondere mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie intrazelluläre MLO, z.B. als Sporen-Stadien nachgewiesen wurden. In den Sporen waren ein prominenter Kern, ebenso wie ein irregulär gewickeltes Polarfilament, Vakuolen und ein distinkter Polaroblast, alles charakteristische Merkmale für Mikrosporidien, erkennbar (Mehlhorn 2001).

Eine Separation in Endo- und Exospore konnte mit Hilfe der Elektronenmikroskopie ebenfalls bestätigt werden.

Die Amöbe selbst war auch nach der Aufnahme dieser Sporen und der weiteren Entwicklung der MLO noch sehr aktiv, während die Zellmembran bereits stark dilatiert war. Beim Eindringen der MLO in den Amöbenkern konnte ebenfalls kein Einsatz des Polarfilaments beobachtet werden. Ob die MLO aktiv in den Kern gelangten oder ob sie passiv, z.B. durch Mikrofilamente, aus dem Zytoplasma in Richtung Amöbenkern bewegt wurden, kann jedoch nicht abschließend beurteilt werden.

Eine Beeinträchtigung des Verhaltens der Wirtsamöbe, etwa bei der Nahrungsaufnahme oder in der Frequenz der pulsierenden Vakuole, im Vergleich zu nicht infizierten Vannellen des gleichen Stammes konnte zu Beginn der Infektion nicht beobachtet werden.

Die Hypertrophierung des Kerns ging einher mit einem starken Größenwachstum der Wirtsamöbe, da sich der parasitierte Kern nicht mehr teilen konnte und damit vermutlich die Zellteilung verhinderte.

Der Entwicklungsgang von Mikrosporidien beginnt normalerweise mit dem aktiven Eindringen (Infektionsphase) in die Wirtszelle durch das Ausschleudern des Polarfilaments, was eine Zellinvasion nach Penetrierung der Wirtszellenmembran erst möglich macht (Weiss 2001).

Anschließend erfolgt die Inokulation des Sporoplasma in das Zytoplasma der Wirtszelle. Nach dieser Infektionsphase mit Zellinvasion folgt der Entwicklungsgang der Proliferationsphase. Die dritte Phase, die Sporogonie-Phase besteht aus der finalen Differenzierung.

Im Gegensatz zum Meronten besitzen die Sporenstadien einen hohen Grad struktureller Organisation (Mathis 2000). Zwei Adaptationen für ihre spezielle Übertragungsfunktion sind bei den Sporen erkennbar: ein komplexer Schleuderapparat und eine äußere Hülle, die das extrazelluläre Überleben erst ermöglicht.

Diesen Mechanismus des Eindringens in die Wirtsamöben hatten wir auch bei dem untersuchten Wirt-Parasit-Modell erwartet.

Im vorliegenden Fall setzte sich die Entwicklung der MLO im Zellkern mit der Ausbildung des Sporoblasten fort, der wiederum durch starkes Größenwachstum die Kernmembran dilatierete und schließlich fast das gesamte Zellinnere der Amöbentrophozoiten erfüllte. Welchen Zweck die in einigen elektronenmikroskopischen Aufnahmen erkennbaren schlauchartigen Fortsätze mit Kontakt zur Kernmembran haben, kann nicht abschließend beantwortet werden.

Ob es sich um MLO handelt, die soeben die Kernmembran passiert haben und daher noch partiell einen Kontakt zur Kernmembran haben, oder ob es sich um (temporäre)

Versorgungsschläuche handeln könnte, ist ebenfalls nicht abschließend zu beantworten.

Selbst als bereits Meronten im Kern zu erkennen waren, wurden immer noch durch Phagozytose weitere Sporen durch die Amöben aufgenommen. Es konnten Wirtsamöben gefunden werden, die mehrere MLO in den diversen Entwicklungsstadien enthielten.

Eine Hemmung der Sporenaufnahme fand demzufolge nicht statt.

Dies deutet auch auf einen zeitlichen Unterschied des Eindringens mehrerer MLO in das Karyoplasma der Wirtszelle hin. Ein Befall des Endosoms konnte hingegen nicht beobachtet werden.

Nahezu alle Endozytobiontenstadien konnten während aller im Versuch genutzten Zeitintervallen angetroffen werden.

Die Aufnahmen zu späteren Zeitpunkten zeigten jedoch häufiger mehrere MLO-Stadien pro Amöbe sowie weiter differenzierte Stadien.

Nach der Differenzierung in Sporen sowie dem Absterben der Wirtszelle gelangten die infektiösen Sporen in die Umwelt und konnten erneut bisher nicht befallene Vannellen-Trophozoiten infizieren.

Die Übertragung hat also im vorliegenden Fall einen horizontalen Charakter (**Abb.123**), eine vertikale Übertragung, wie sie für einige Mikrosporidienarten, z.B. bei transovarieller Übertragung, beschrieben ist (Dunn und Smith 2001), findet nicht statt.



Abb.123: Verdeutlichung der Sporenübertragung (Wirt A und B: nachgewiesene Wirtsamöben)

Beim Versuch, den dargestellten Entwicklungsgang mit den verschiedenen bereits beschriebenen Entwicklungsgängen zu vergleichen, kommt man zu dem Schluß, dass er am ehesten der Entwicklung von Mikrosporidien der Gattung *Enterocytozoon* ähnelt.

Deutliche Unterschiede bestehen im Vergleich zu den als Modellorganismen für Entwicklungsgänge genutzten Arten der Gattungen *Encephalitozoon*, *Pleistophora* und *Nosema* (Mehlhorn 2001).

Bei wenigen Mikrosporidien ist bisher die Entwicklung im Kern der Wirtszelle nachgewiesen, was wiederum für die Interpretation der im folgenden dargestellten und diskutierten Resultate von Bedeutung ist, z.B. bei *Enterocytozoon salmonis* (Chilmonczyk et al. 1991) oder einer ähnlichen Spezies, die 1995 von Nilsen et al. beschrieben wurde. *Microsporidium rhabdophilia* sowie in der Folge *Nucleospora salmonis* (früher *Enterocytozoon salmonis*) und *Nucleospora secunda* n.sp. konnten als intranukleäre Mikrosporidien bestätigt werden (Lom und Dykova 2002).

Für die Proliferationsphase der Mikrosporidien ist beschrieben, dass sie sich in einem Vesikel, das den sich entwickelnden Parasiten vom Wirtszytosol teilt, befinden. Die Zellteilung erfolgt in diesem Vesikel, ebenso wie die Sporenbildung. Im vorliegenden Fall fanden Proliferation, Differenzierung und Sporenbildung bereits in einem abgeschlossenen Kompartiment innerhalb der Kernmembran statt. Die Karyolymphe, die das Innere des Zellkerns ausfüllt, enthält im wesentlichen Nucleotide, Enzyme und Stoffwechselprodukte. Der Zellkern als Steuerelement des Zellstoffwechsels der Amöbe sowie als Träger der DNA ist vom Zytoplasma durch eine zweifache Membran abgegrenzt, die wiederum von zahlreichen Poren durchsetzt ist. Diese Zellmembran nahm bis zur abgeschlossenen Sporenreife unter massiver Dilatation diese Vesikelfunktion wahr.

Das Protein- und RNA-haltige Kernkörperchen (Nucleolus, Endosom) im Kerninnenraum wurde nicht infiziert. Daher bietet sich der Schluss an, dass bei den vorliegenden MLO eine Sporogonie ohne die Ausbildung einer durch den Parasiten induzierten äußeren Hülle stattfindet. Diese Entwicklung wird als apansporoblastisch bezeichnet.

4.2 Nachweis der kokkoiden Parasitenstadien mittels Färbungen

Weil die molekularbiologischen Sequenzierungsversuche bislang selbst mit spezifischen Mikrosporidiensonden keine befriedigenden Ergebnisse brachten, sollten die Endozytobionten mittels Färbungen näher charakterisiert werden. Färbungen liefern in der Regel gute Ergebnisse im Rahmen der Diagnostik bei der Determinierung bzw. Zuordnung von Mikroorganismen. Monochromatische Färbungen erlauben in der Regel nur morphologische Aussagen. Bei Mehrfachfärbungen (polychromatischen Färbungen) können aufgrund unterschiedlicher Eigenschaften verschiedener Mikroorganismen weitere differentialdiagnostisch relevante Aussagen zum Färbeverhalten getroffen werden (Hof und Dörries 2005).

Insbesondere Calcofluor-, Gram-, Giemsa- und modifizierte Trichromfärbung werden in der Literatur immer wieder als zur Mikrosporidiendiagnostik geeignete Färbeverfahren beschrieben (Collier et al. 1998). Daher fanden sie bei den Untersuchungen Berücksichtigung. Da von Mikrosporidien bekannt ist, dass ihre Sporenwand aus zwei Schichten besteht und ihre innere Schicht Chitin enthält (Torres 2001), war zu erwarten, dass das Fluorochrom Calcofluor Weiß an das Chitin bindet und blau-weiß fluoresziert. Die Calcofluorfärbung konnte diese Eigenschaft in den vorliegenden Untersuchungen, sowohl bei der Färbung von solitären Sporen als auch von intrazellulären Sporen in Amöben belegen.

Diese erwartungsgemäß ausgefallenen Ergebnisse dienten also als Bestätigung der Annahme, dass es sich bei den parasitären Strukturen um MLO handeln könnte.

Die kontrastreiche Calcofluor-Färbemethode wurde als sehr nützlich zur Differenzierung der MLO eingestuft. Es lagen weder Färbeartefakte noch Interpretationsschwierigkeiten vor.

Die Farbreaktion im Rahmen der Gramfärbung ist ebenfalls eng mit dem Aufbau der Zellwand korreliert. Mikrosporidien-Sporen werden in der Literatur als grampositiv beschrieben (Canning 1990). Die hier erzielten Färbeergebnisse zeigten auch nach mehreren Wiederholungen, dass die vorliegenden Sporen eindeutig gramnegativ sind. Bakterien aus älteren Kulturen oder aus Untersuchungsproben von mit Antibiotika behandelten Patienten neigen zur „Gram-Labilität“, das heißt eine Differenzierung ist nicht möglich. Ob und inwieweit eventuell das Alter und der Vitalitätszustand der Kulturen, Adaptionsvorgänge oder sonstige Änderungen während der Zeit der Kulturhaltung hierbei eine Rolle spielen oder zumindest einen Einfluss auf die Ergebnisse der Gram-Färbung haben, kann nicht sicher belegt werden. Der Vitalitätszustand jedenfalls war, an der Infektionsfähigkeit gemessen, sehr gut.

Die Gram-Färbemethode wurde insgesamt als eher ungünstig und kontrastarm eingestuft, Bakterien wurden in ähnlicher Farbe mitgefärbt, das mikroskopische „Ansprechen“ von Strukturen war eher schwierig.

Die Giemsa-Färbung findet sich in den meisten Lehrbüchern neben der Calcofluor-Methode als eine weitere Methode zum Nachweis von intestinalen Mikrosporidien (Garcia 2001). Die Sporen konnten sowohl solitär als auch noch intrazellulär in der Wirtsamöbe gut nachgewiesen werden. Die Giemsa-Färbung lieferte im Vergleich zu allen anderen Färbemethoden die besten Ergebnisse beim Detektieren der Sporen sowie beim Erkennen von Innenstrukturen.

Die Diff-Quick-Färbung, die im Labor für Med. Parasitologie des Zentralen Institutes des Sanitätsdienstes der Bundeswehr Koblenz als Alternative bzw. Ergänzung zur traditionellen Giemsa-Färbung eingesetzt wird, erbrachte ähnliche Ergebnisse wie die Giemsa-Färbung, die Anfärbung der Sporen fiel jedoch blasser aus. Es ist festzustellen, dass die Giemsa-Färbung in diesem Fall die besseren und kontrastreichereren Ergebnisse lieferte. Kontrastarme Resultate zeigte die Kinyoun-Färbung, so dass auch diese Methode bei der vorliegenden Untersuchung keine befriedigenden Ergebnisse ergab.

Die ansonsten sehr differenzierende Trichromfärbung sowie die modifizierte Trichromfärbung finden sich, analog der Calcofluor- und die Giemsa-Färbung, in den meisten Lehrbüchern als eine weitere probate Methode zum Nachweis von Mikrosporidien im Rahmen der Diagnostik von eingesandtem Probenmaterial (Garcia 2001).

Beide Varianten der Trichromfärbung lieferten jedoch deutlich kontrastärmere Ergebnisse als die Calcofluor- bzw. Giemsa-Färbungen und sind daher für die Färbung der vorliegenden Organismen eher ungeeignet.

Als Fazit lässt sich feststellen, dass die Calcofluor-Färbung sowie die Giemsa-Färbung die besten sowie die erwarteten Ergebnisse in Bezug auf die Detektion der Sporen und die Darstellung der Innenstrukturen erbrachten. Trichromfärbung, modifizierte Trichromfärbung, Kinyounfärbung sowie die Diff-Quick-Färbung lieferten schlechtere Ergebnisse, die weder eine Innenstruktur erkennen ließen, noch zum besseren, differenzierteren Erkennen der Sporen beitrugen.

Die Gram-Färbung erbrachte – wie bereits oben dargestellt - ein Ergebnis, das sich nicht mit dem für Mikrosporidien beschriebenen Färbeverhalten deckt.

4.3 Taxonomische Zuordnung der Endozytobionten (Systematische Stellung)

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich in erster Linie mit lichtmikroskopischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen zur morphologischen Differenzierung des Endozytobionten KAun1 und dessen Eindringen in die Wirtsamöben. Bei diesen Untersuchungen stellte sich heraus, dass diese Endozytobionten aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften Mikrosporidien-ähnliche Organismen sind. Eine molekularbiologische Bestätigung, selbst mit Hilfe von spezifischen Mikrosporidiensonden, ist bislang nicht erfolgreich geführt worden. Auch die Ergebnisse im Rahmen der Färbeversuche bieten kein einheitliches Bild, das zu einer zweifelsfreien taxonomischen Zuordnung führen könnte. Insbesondere die Gram-Färbeergebnisse sprechen sogar gegen eine Zuordnung zu den Mikrosporidien.

Es gibt keine kokkoide Bakterienspezies, die vergleichbare, ultrastrukturell darstellbare Organellen aufweist wie die vorliegenden MLO. Es seien als Beleg nur der Kern und andere geformte Organellen erwähnt.

Die strukturelle Organisation dieser Organismen lässt eine Zuordnung zu den Eukaryonten eindeutig zu. Insbesondere die Morphologie der Organellen führte letztendlich zur Einordnung als Mikrosporidien-ähnlicher Organismus, obwohl jedoch eine molekularbiologische Bestätigung bislang nicht vorliegt. Dennoch sind es schließlich die elektronenmikroskopischen Ergebnisse, die es erlauben, mit dem Nachweis der Mikrosporidien-typischen Organellen, KAun1 als zumindest Mikrosporidien-ähnlichen Organismus einzustufen.

Auch die Nomenklatur des Entwicklungsganges von Mikrosporidien konnte vorliegend für KAun1 ausnahmslos übernommen werden. Möglicherweise handelt es sich aber um rudimentäre bzw. reduzierte Mikrosporidien.

Von Mikrosporidien ist bekannt, dass bereits die heranwachsenden Meronten ihre Wirtszelle und deren Kerne zu Riesenwachstum (Xenombildung) stimulieren können (Weiss 2001).

Die Ultrastruktur der charakteristischen Organellen der vorliegenden Sporen belegt die Unterschiede zu den bislang beschriebenen Mikrosporidien-Spezies. Vergleiche der Sporenmorphologie der KAun1-Sporen mit Sporen bekannter Mikrosporidienspezies zeigen, dass keine direkte Zugehörigkeit zu den bisher bekannten bzw. beschriebenen Mikrosporidien vorliegt. Insbesondere der irregulär aufgewickelte Polfaden ist ein deutliches Unterscheidungsmerkmal zu den bislang beschriebenen Mikrosporidiengruppen.

Möglicherweise handelt es sich aber um einen rudimentären Polfaden, der erst "sekundär" seine ursprüngliche Aufgabe verloren hat, da die Aufnahme der Sporen nun durch Phagozytose erfolgt und somit ein aktives Ausschleudern und Penetrieren nicht mehr notwendig ist. Durch ihre Größe und Gestalt, den Invasionsweg und die Entwicklung im Kern der Wirtszelle unterscheiden sie sich wesentlich von den bisher bekannten Mikrosporidien und sind daher mit keiner der bisher taxonomisch beschriebenen Mikrosporidien-Spezies vergleichbar (Mehlhorn 2001). Insbesondere zeigen nur sehr wenige Mikrosporidien einen intranukleären Entwicklungsgang (Chilmonczyk et al. 1991). Das im Vergleich zu den meisten bekannten Mikrosporidien nicht regulär arrangierte Polarfilament zeigt lediglich Ähnlichkeiten zu Mikrosporidien in Zellkulturen, die mit Albendazol behandelt worden waren (Lafranchi-Tristem et al. 2001).

Auch das unter den Mikrosporidien weit verbreitete Phänomen des Sporendimorphismus (Mehlhorn 2001) liegt bei KAun1 nicht vor.

In älteren Büchern finden sich bereits Hinweise auf sich im Kern entwickelnde Organismen. Bereits 1929 war im „Lehrbuch der Protozoenkunde“ von Doflein und Reichenow von den zu den Pilzen gestellten, sogenannten *Nucleophaga* zu lesen, die bei *Endolimax nana* und *Jodamoeba bütschlii* gefunden worden sind.

Im 1949 erschienenen „Précis de Parasitologie“ von Brumpt konnte man ebenfalls Beschreibungen von „*Nucleophaga*“ finden. Bei der Art *Nucleophaga hypertrophica* wurden sowohl Parasiten im Kern als auch eine Hypertrophie der Wirtsamöben bei intestinalen Amöben des Menschen beschrieben. Im gleichen Jahr erschien die 6. Auflage des „Lehrbuchs der Protozoenkunde“ von F. Doflein, fortgesetzt von E. Reichenow (1949). Hier wird über einen Parasitismus in *Paramecium bursaria* berichtet.

Die Endoparasiten werden hier als Pilze, die entweder im Zytoplasma (Gattung *Sphaerita*) oder im Kern der Protozoen (*Nucleophaga*) schmarotzen, bezeichnet. Entweder wachsen sie zu vielkernigen Plasmodien heran, die sich mit einer Membran umgeben und dann in zahlreiche Sporen zerfallen, oder sie treten nur als kleine kugelige Gebilde auf, die sich durch Zweiteilungen vermehren.

In beiden Fällen ist das Endstadium übereinstimmend; es bietet als ein regelmäßiger Haufen kugeligter Körperchen ein sehr charakteristisches Bild. Der Befall mit *Nucleophaga* führt zur Riesenkernbildung, der eine Vergrößerung des ganzen Zellkörpers entspricht. Unter den humanmedizinisch relevanten Protozoen sind es intestinale Amöben, die besonders heimgesucht werden.

Sphaerita lässt sich sehr häufig bei allen im Darm des Menschen vorkommenden Amöbenarten beobachten; *Nucleophaga* ist z.B. in *Endolimax nana* nachgewiesen worden. Im gleichen Werk (Reichenow 1949) wird darauf hingewiesen, dass Brumpt und Lavier in einem Falle ein gemeinsames Vorkommen von *Entamoeba dispar* mit *Sphaerita*-Befall sowie *Endolimax nana* mit *Nucleophaga*-Befall fanden. Der *Nucleophaga*-Befall des Zellkerns führt am Ende der Parasiten-Entwicklung zur Kernaflösung und damit zum Absterben des Zellkörpers. Vorher kommt es aber, wie Lavier bei *Entamoeba ranarum* beobachtete, zu einer bedeutenden Steigerung der Lebensvorgänge, was sich in einer sehr viel lebhafteren Beweglichkeit und einer stark erhöhten Nahrungsaufnahme äußert.

Ob es sich bei den als *Nucleophaga* oder *Sphaerita* beschriebenen Organismen um KAun1-ähnliche Mikroorganismen handeln könnte, kann nicht bewiesen werden, da die früher als *Nucleophaga* beschriebenen Mikroorganismen wegen des Fehlens elektronenmikroskopischer Aufnahmen nicht mit den vorliegenden Befunden verglichen werden können. Insbesondere fehlen Details zur Morphologie der intranukleär wachsenden Organismen.

4.4 Zeitdauer der Infektionsfähigkeit der Sporen

Durch den mehrschichtigen Sporenwandaufbau besitzen Mikrosporidien ein gewisses Maß an Schutz vor negativen Umwelteinflüssen. Shaddock und Polley (1978) haben eine Reihe von Versuchen durchgeführt, um die Infektiosität von z.B. *Encephalitozoon cuniculi*-Sporen unter den verschiedensten Bedingungen zu testen.

Sie konnten nachweisen, dass sie 9 Tage in Phosphatpuffersaline bei 37°C überlebten, mehr als 24 Tage bei 4°C oder 20°C sowie länger als 6 Monate bei – 70°C. Die Sporen überdauerten Erhitzung auf 54°C 60 Minuten lang und überstanden unbeschadet pH-Werte von 9 und 4. Selbst das 5malige Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Wiederauftauen schadete den Sporen nicht. *E. cuniculi* – Sporen wurden jedoch bei 10-minütiger Einwirkung einer 2% Lysollösung bzw. 10%iger Formalinlösung oder 70%igem Ethanol abgetötet. In vitro konnte auch der Verlust der Infektiosität bei 24-stündiger Einwirkung von CsCl (1,35 g/ml) oder 40%iger Sucrose nachgewiesen werden. Penicillin, Streptomycin oder Gentamycin waren in einigen Versuchen ebenso wirkungslos gegen *E. cuniculi* wie die Einwirkung von Ultraschall. Selbst Sporen, die 10 Jahre in destilliertem Wasser aufbewahrt wurden, waren noch infektiös. Ultraviolette Strahlung konnte, ähnlich wie γ -Strahlung, nur in hohen Dosen (3,8 J/cm²) die Sporenreifung unterbinden (Collier et al 1998).

Versuche mit Chloreinwirkung auf Mikrosporidien, wie z.B. auf *Encephalitozoon intestinalis*, zeigten, dass Chlor ein effektives Wasseraufbereitungsmittel zur Eliminierung von *E. intestinalis* ist (Wolk et al. 2004).

Im vorliegenden Fall konnte bei Reinfektionsversuchen nachgewiesen werden, dass die KAun1-Sporen bis zu 26 Monate infektiös blieben. Eine Schutzfunktion durch die Amöben scheint eher fraglich zu sein, da keine der suszeptiblen Wirtsamöben Zysten bildet und die Sporen aufgrund ihrer Tenazität bereits deutlich geschützt sind.

4.5 Amöben als Wirtszellen von KAun1 – Wirtsspektrum

Die umfangreiche Stammsammlung des Labors für Med. Parasitologie der Bundeswehr in Koblenz ermöglichte einen breiten Ansatz im Rahmen des Wirtsspektrumsversuchs durch die Möglichkeit, zahlreiche verschiedene FLA als potenzielle Wirtsamöben durch Kokultivierung mit KAun1 zu testen.

Bei *Vannella* sp., Stamm meda garda, gelang es, eine Infektion mit anschließender Proliferation im Kern der Wirtsamöben nachzuweisen.

Der Invasionsprozess sowie der Entwicklungsgang, beides analog den Vorgängen bei VanAun0 + KAun1, konnten licht- und elektronenmikroskopisch dokumentiert werden. *Vannella* sp., Stamm meda garda, besitzt im Gegensatz zu VanAun0 Glycostyli (vgl. Page 1988). Die Tatsache, dass die Aufnahme der Sporen bei VanAun0, die keine Glycostyli besitzt, ebenfalls stattfand, ließ jedoch, analog den Folgerungen bei *Vannella* sp., Stamm meda garda, den Schluss zu, dass Glycostyli zumindest keine obligatorische Voraussetzung für die Invasion der Sporen sind. Die ebenfalls für KAun1 susceptible *Vannella miroides*, Stamm DentG1, weist ebenfalls Glycostyli auf.

Offensichtlich stellt die An- oder Abwesenheit von Glycostyli also keinen Grund für die Aufnahme oder Nichtaufnahme bzw. Adhäsion der Sporen dar.

Ebenso wie bei VanAun0 + KAun1 konnten leere Sporenhüllen (Ghosts) in Nahrungsvakuolen von *Vannella* sp., Stamm meda garda, gefunden werden. Die potenzielle Genese dieser Ghosts wurden bereits oben diskutiert. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch bei der Kokultivierung von *Vannella* sp. DentG1 und KAun1 gefunden. Dies betrifft die bereits angesprochenen leeren Sporenhüllen in Nahrungsvakuolen ebenso wie den Invasionsweg und den Entwicklungsgang der MLO im Kern der Vannellen.

Im Rahmen des Kokultivierungsversuches mit *Vannella platypodia* Stamm vp ash wurden interessante Beobachtungen gemacht: Die KAun1-Sporen wurden via Phagozytose aufgenommen; es fand jedoch nur temporär eine Aufnahme statt, eine Verdauung der Sporen konnte nicht beobachtet werden, wohl aber eine rasche Ausschleusung. Es ist davon auszugehen, dass im Rahmen dieser Exozytose die zu exportierenden Partikel und Reste zunächst in Vesikel verpackt werden, die dann mit der Plasmamembran fusionieren und ihren Inhalt nach außen abgeben. Offensichtlich erkannten die Amöben dieses Stammes die MLO nicht als Nahrungspartikel und schleusten sie schnell wieder aus. Vergleichbare Beobachtungen wurden auch bereits bei der Kokultivierung von Acanthamoeben mit Cryptosporidien gemacht.

Hier konnte ebenfalls die Aufnahme der Cryptosporidien-Oozysten beobachtet werden; es fand aber auch eine anschließende Exocytose statt, ohne dass dadurch die Acanthamoeben oder aber die Oozysten geschädigt wurden (Gomez-Couso et al. 2006).

Ein weiterer *Vannella platypodia* Stamm, nämlich der Stamm cis plat, zeigte ebenfalls eine interessante Verhaltensweise. Selbst wenn die Amöben im Rahmen der Bewegung ihrer Trophozoiten mit den Sporen in Berührung kamen, umflossen sie diese regelrecht, nahmen sie also nicht auf.

Sie schienen also die Aufnahme trotz ausgebildeter Glycocalyx, deren Aufgabe üblicherweise die Adhäsion an Futterpartikel ist, zu verhindern bzw. zu vermeiden. Eventuell erkannten sie die Sporen nicht als potenzielle Nahrungspartikel.

Die weiterhin im Rahmen der Wirtsspektrumversuche eingesetzten Acanthamoeben, Saccamoeben, Platyamoeben, Hartmannellen, Naeglerien, Thekamoeben, Vahlkampfen und Willaertien waren nicht als Wirte zur Proliferation der MLO geeignet.

Außer dem Vannellenstamm VanAun0 sind es also lediglich zwei weitere Vannellenstämme, die als Wirte in Frage kommen. Dies deutet auf eine Gattungsspezifität hin. Offensichtlich finden andere Stämme bzw. v.a. andere FLA-Gattungen Mechanismen, die Proliferation der Sporen zu verhindern, die Sporen zu verdauen, die Sporen wieder auszuschleusen bzw. sie erst gar nicht aufzunehmen.

Zur Ergänzung der Wirtsspektrumsversuche sowie um der Frage nachzugehen, inwieweit die MLO einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der Patientin hatten und evtl. sogar nach dem Platzen der Vannellen im Auge in Epithelzellen gelangen können, wurden

Kokultivierungsversuche mit Zellkulturen durchgeführt. Eine Erregerisolierung mit Hilfe der Zellkulturdiagnostik basiert auf der Infektion und Vermehrung von infektiösen Erregern in geeigneten (permissiven) Zellkulturen *in vitro*. Die mit der Erregervermehrung verbundenen charakteristischen Veränderungen der Zellen (CPE, Syncytienbildung, Plaquebildung etc.) können lichtmikroskopisch im Invertmikroskop leicht beobachtet werden. Da Veränderungen der Zellen selten erregerspezifisch sind, muss in der Routinediagnostik normalerweise eine Identifizierung des infektiösen Agens durch Elektronenmikroskopie oder geeignete virusspezifische Verfahren (Antigennachweise in der Immunfluoreszenz bzw. spezifische Nukleinsäurenachweise mittels PCR) erfolgen.

Das Eindringen von Mikrosporidien in intestinale Epithelzellen (Caco-2 Zellen) via Phagozytose wurde von Foucoult und Drancourt (2000) nachgewiesen. Die Autoren beschrieben ein Aktin-basiertes Modell, um das Eindringen der Mikrosporidien in die Enterozyten zu erklären.

Zellkultur-Methoden wurden bereits zur Testung von antimikrobiellen Wirkstoffen auf einige Mikrosporidienspezies, wie z.B. *Encephalitozoon cuniculi*, *E. hellem* und *E. intestinalis* (*Septata intestinalis*), eingesetzt. Zahlreiche Zelllinien wurden im Rahmen dieser Untersuchungen mit Mikrosporidien bereits benutzt, z.B. Vero, MRC5 und MDCK-Zellen. Mikrosporidien aus Isolaten, die durch Hornhautabstriche bei AIDS-Patienten gewonnen wurden, konnten ebenfalls in MDCK – Zellen kultiviert werden (Collier et al. 1998).

Encephalitozoon cuniculi, eine Art, die sich in einer parasitophoren Vakuole von Säugetierzellen entwickelt, wurde beispielsweise auf MDCK-Zellen für weitere Untersuchungen, wie z.B. Gradientenseparation, kultiviert (Taupin et al. 2006). Kornea-infizierende Mikrosporidien sind bekannt (Theng et al. 2001). Es war jedoch bei der ATCC (American Type Culture Collection) während der Untersuchungszeit keine (Kontaminanten-freie) Korneazelllinie zu erhalten. Die Möglichkeit, die Kokultivierung in einem Korneakultur - Endozytobionten - Modell durchzuführen, musste daher entfallen.

Weder in MDCK-Zellen noch in MRC-5 Zellen konnte eine Aufnahme der Sporen beobachtet werden. Da in den licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen bereits eindeutig gezeigt werden konnte, dass die Aufnahme der infektiösen Sporen in die Vannellen nicht aktiv mittels Einsatz des Polarfilaments sondern durch Phagozytose der FLA erfolgt, war eine Aufnahme durch die hier eingesetzten Zellen nicht zu erwarten, da diese keine (ausgeprägte) Phagozytoseaktivität besitzen.

Humane Makrophagen wurden neben anderen Zelllinien bereits für die *in vitro* Kultivierung von humanpathogenen Mikrosporidien etabliert (Franzen 2003). Als Ergebnis im Rahmen der dort beschriebenen Versuche konnte festgehalten werden, dass sich Mikrosporidien neben der Infektion neuer Wirtszellen durch den Polfaden auch durch Phagozytose in das Innere der Zellen gelangen. Durch Doppelmarkierung mit lysosomalen Markern und anti-Mikrosporidien Antisera konnte gezeigt werden, dass die Vakuolen mit den phagozytierten Sporen weiter zu Endosomen und Lysosomen reifen. Es wurde daher gefolgert, dass zwar ein Teil der Mikrosporidien sporen über Phagozytose in das Innere der Zellen gelangt, es aber den Parasiten möglich zu sein scheint, dieses Kompartiment, das weiter zu Lysosomen reift, zu verlassen und so das Zytoplasma zu infizieren.

Dies impliziert aber wiederum die Notwendigkeit weiterer Versuche im Rahmen der Kokultivierung – z.B. mit Phagozytose-aktiven Macrophagenzelllinien.

4.6 Bedeutung von Biofilmen für FLA und deren Endozytobionten

Ein Biofilm besteht aus Bakterienzellen, die miteinander verbunden sind, aber insgesamt an einem Substrat (Oberfläche, Grenzschicht) anheften (Mikrobieller Bewuchs) und vollständig oder teilweise in eine von dem Organismus produzierte, polymere, organische Masse (EPS-extrazelluläre polymere Substanz; besteht aus Polysacchariden, Proteinen, Glykoproteinen, Alginaten und weiteren makromolekularen Verbindungen) eingebettet ist (Kreißig 2001).

Biofilme, die zunächst aus oligotrophen Arten gebildet werden, stellen in einem nährstoffarmen System lokale Bereiche hoher Anreicherung von Biomasse dar.

Die Entstehung eines Biofilms führt über die Schritte Adhäsion, Kolonisation und Wachstum. Man unterscheidet vier Phasen der Biofilmbildung: Induktionsphase (Basisfilm auf Substrat), Akkumulationsphase (Ansiedlung von EPS-produzierende Bakterien auf dem Basisfilm sowie Bildung des Oberflächenfilms), Existenz- bzw. Plateauphase (Gleichgewicht zwischen Aufwachsen und Abtrag), Abbau des Biofilms (Flemming und Wingender 2001).

Als einer der wichtigsten Vorteile des Lebens in Biofilmen gilt die in der Regel bessere Versorgung mit metabolisierbaren Substraten an einer Oberfläche durch die ständige Adsorption und die dadurch erfolgende Konzentrierung der Moleküle (Antenneneffekt).

Im Gegensatz zu suspendierten Bakterien, die normalerweise mit Antibiotika und Desinfektionsmitteln relativ leicht abgetötet werden können, lassen sich Bakterien in Biofilmen nur sehr schwer oder gar nicht abtöten. Dies liegt nicht nur an der Diffusions-beziehungsweise Reaktionsbarriere, die die EPS darstellen, sondern auch an dem unterschiedlichen physiologischen Zustand, in dem sich Bakterien in Biofilmen befinden (Szewzyk und Szewzyk 2003)

In der Matrix werden Nährstoffe aus dem Wasser akkumuliert. Die Bakterien sind in der Matrix geschützt und vermehren sich in ihr. Durch die oberflächennahe Matrix findet ein aktiver Stofftransport statt. Im tieferen Bereich werden Stoffe überwiegend durch molekulare Diffusion ausgetauscht.

Rowbotham (1980) beschrieb, dass FLA als Wirte von Legionellen fungieren können und somit zu deren Verbreitung in der Umwelt beitragen (siehe Einleitung: Freilebende Amöben als Wirte und Vehikel für Bakterien und andere Mikroorganismen).

Die Legionellenvermehrung wird durch die gleichzeitige Präsenz von Amöben gefördert (Boulanger und Edelstein 1995). Legionellen können an der Bildung von Biofilmen beteiligt sein, z.B. in Trinkwasserleitungen und Kühlturmwandungen. Aus solchen Biofilmen können sie immer wieder ins Wasser freigesetzt werden. Da Legionellen in Amöben (intrazelluläre Lokalisation) zudem gut geschützt sind, lassen sich Trinkwassersysteme nur schwer mit Chlor von Legionellen befreien (Schäfer 2003). Besorgniserregend ist, dass je nach angewandtem Analytikverfahren die oft in hoher Anzahl in Amöben vorhandenen Legionellen nicht erkannt werden und folglich hochkontaminierte Wassersysteme fälschlicherweise als legionellenfrei eingestuft werden (Flieger et al. 2004).

Das Leben im Biofilm bewirkt also eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber Bioziden durch den Schutz der EPS-Matrix im Biofilm.

Legionellose zählen unter den trinkwasserverursachten Infektionskrankheiten zu den am häufigsten vorkommenden und schwer verlaufenden Erkrankungen (Schäfer 2003).

FLA sind als Substratbesiedler an Substrate (Oberflächen und Sedimentablagerungen) sowie an das Vorkommen von geeigneten Nahrungsorganismen gebunden. Insbesondere Biofilme dienen als Habitate, wobei die FLA aufgrund ihrer Adhäsivität für Oberflächen bereits bei deren Entstehung beteiligt sein können.

Die FLA erhöhen die Produktivität von Biofilmen dadurch, dass sie sich an Oberflächen adhären und extrazelluläre Matrixsubstanzen sowie metabolische Substanzen wie Glucopolysaccharide und Proteine abgeben (Khan und Panjwani 2000).

Insbesondere solche Mikroorganismen, die zusätzlich zu ihrem Vorkommen in Biofilmen auch noch an die intrazellulären Bedingungen in den Amöben angepasst sind, finden geeignete Wachstumsbedingungen, ggfs. Schutz vor negativen Umwelteinflüssen und nutzen die Verbreitung in der Umwelt durch ihre Wirte.

Im Gegensatz zur Beschreibung der Proliferation von Legionellen in Amöben fand in den hier als Wirte verwendeten Vannellen jedoch keine Vermehrung der Endozytobionten innerhalb statischer, membranbegrenzter Vakuolen statt. Im Zytoplasma sind sie nur auf ihrem Weg von der Zellmembran zum Kern anzutreffen.

Die naheliegende Maßnahme zur Bekämpfung unerwünschter Mikroorganismen ist die Anwendung von Desinfektionsmitteln (Szewzyk und Szewzyk 2003; siehe auch Kapitel 1.1.3). Sind Biofilme vorhanden, führt dies jedoch häufig nicht zum Erfolg. Es ist bekannt, dass Biofilm-Bakterien eine um ein bis drei Größenordnungen höhere Biozid-Konzentrationen vertragen als in suspendierter Form, und dass für ihre Abtötung eine erheblich längere Einwirkzeit benötigt wird (Flemming 1994).

Die in den Amöben eingeschlossenen Endozytobionten werden in der Regel also gegenüber derartigen Desinfektionsmaßnahmen geschützt.

Untersuchungen über die Wirksamkeit von Bioziden beziehen sich in der Regel nur auf suspendierte Mikroorganismen. Aussagen über die Effektivität der Biozide gegenüber Biofilmen sind schwer zu treffen, da Biofilme nicht gleichmäßig und nur schwer reproduzierbar sind.

Auch bezüglich der Tenazität von medizinisch bedeutsamen FLA gab es in den letzten Jahren viele Veröffentlichungen. Bereits ab den 1980er Jahren gab es zahlreiche Untersuchungen zu der amöbiziden Wirkung von Kontaktlinsen – Reinigungsmitteln (Hiti et al. 2002, 2004).

Die Untersuchungsmethoden und Testansätze der verschiedenen Studien variierten jedoch erheblich (Buck et al. 2000), so dass ein einheitliches Testverfahren zur amöbiziden bzw. zystiziden Wirkung von Desinfektionsmitteln nicht besteht.

Die Internationale Organisation für Standardisierung (ISO) hat Standards für die Wirkung von Kontaktlinsenflüssigkeiten herausgegeben. Hierbei werden Acanthamoeben in der Testung jedoch nicht berücksichtigt, so dass keine acanthamoebizide Wirkung bestätigt werden kann. Warum die Testung auf Acanthamoeben fehlt, eine Wirksamkeitsprüfung gegenüber Bakterien jedoch vorgeschrieben ist, ist wiederum in der ISO damit begründet, dass es keine Standardmethode für eine Testung auf amöbizide bzw. trophozoitizide und zystizide Wirksamkeit gibt. Außerdem sei eine signifikante Reduktion der Bakterien als Futterorganismen der Acanthamoeben ein adäquates präventives Mittel zur Vermeidung von Acanthamoeben-Vermehrung. Wie viele Trophozoiten jedoch bereits zu einer Infektion führen können, wird nicht weiter ausgeführt (EN ISO 14729 2001).

Das Risiko durch FLA als Krankheitserreger sowie als Wirte für pathogene Mikroorganismen bleibt somit bestehen (Beattie et al. 2003). Untersuchungen zur Diagnostik und Therapie werden in zukünftigen Studien ebenso zu berücksichtigen sein, wie die Evaluierung der Wirkungsweise von Desinfektionssystemen, z.B. für Kontaktlinsen.

Pseudomonas aeruginosa wurde im vorliegenden Fall als medizinisch relevanter Keim in den Kontaktlinsenbehältern identifiziert. Zahlreiche Umweltbakterien, die an der Biofilmbildung beteiligt sind, werden jedoch im Rahmen der üblichen medizinisch mikrobiologischen Untersuchungen nicht nachgewiesen.

Auch mehrere FLA konnten im vorliegenden Fall in den Kontaktlinsenbehältern bzw. auf den Kontaktlinsen selbst nachgewiesen werden. Diese lebten dort in einem Biofilm von organischen Stoffen (z.B. Bakterien). Dies zeigt, dass die in den Kontaktlinsenbehältern vorhandenen Lösungen entweder keine amöbizide Wirkung entfalten oder aber nur unzureichend bzw. falsch angewendet worden sind. Es gelang den Vannellen, in einem Biofilm in den Behältern bzw. auf den Kontaktlinsen zu überleben, obwohl keine Zystenbildung stattfand, die normalerweise für die hohe Tenazität der FLA verantwortlich ist. Ob die intrazellulären MLO bereits von den Vannellen in die Behälter eingebracht wurden oder im Rahmen einer Phagozytose erst in den Behältern aufgenommen wurden, bleibt unklar.

Legt man aber die hier gemachten Beobachtungen im Rahmen der Kokultivierungsversuche zu Grunde, erscheint es eher wahrscheinlich, dass die Vannellen auf die im Biofilm vorhandenen MLO getroffen sind und sich erst dort mit den MLO infiziert haben.

Aufgrund der Beobachtungen zum zeitlichen Verlauf nach einer Kokultivierung von KAun1 mit VanAun0 wäre die Vannellenpopulation in einem solch engen Raum wie den Kontaktlinsenbehältern ansonsten zu schnell zusammengebrochen. Auf den genutzten Kulturplatten war spätestens nach 7 Tagen keine intakte Amöbe mehr zu erkennen.

4.7 Beteiligung der Endozytobionten an der Pathogenese

Weder die von den Kontaktlinsen isolierten Hartmannellen noch die Vannellen wurden im Rahmen der initialen Untersuchung als Auslöser einer Keratitis angesehen. Dass jedoch drei verschiedene FLA-Stämme an der linken Kontaktlinse nachgewiesen wurden, weist auf die schlechten hygienischen Bedingungen im Kontaktlinsenbehälter hin.

Eine Reihe von Fällen von Korneainfektionen durch Mikrosporidien sind publiziert (Ashton und Wirasinha 1973). Mikrosporidieninfektionen des Auges werden klinisch pathologisch als stromal oder epithelial eingestuft. Auch bei immunkompetenten Personen wurden eine Mikrosporidien-assoziierte Keratitis oder Korneageschwüre bereits beschrieben (Cali et al. 1991). Bei HIV-Patienten wurde die Keratokonjunktivitis meist klinisch beschrieben. Die Sporen ließen sich im Korneaepithel und im Konjunktivalepithel nachweisen (Weber et al. 2000). Im Gegensatz zu den tiefen Korneainfektionen in immunkompetenten Personen wurden bei den HIV-Patienten eher die oberflächlichen Epithelzellen der Kornea oder der Konjunktiva befallen.

In der Mehrzahl der Fälle wurden *Encephalitozoon hellem* und *E. cuniculi* mit humanpathogenen Eigenschaften in Verbindung gebracht. Diese Mikrosporidienarten entwickeln sich jedoch ausschließlich im Zytoplasma der Wirtszelle.

Ob und in welchem Ausmaß die Endozytobionten in unserem Falle die Epithelzellen der Kornea penetrieren bzw. an der Pathogenese der Keratitis beteiligt waren, lässt sich nicht abschließend beantworten. Die Tatsache, dass *Pseudomonas aeruginosa* in vom Auge entnommenen Abstrichen nachgewiesen wurde und die Therapie gegen diese Bakterien auch erfolgreich durchgeführt werden konnte, lässt es eher unwahrscheinlich erscheinen.

5. Ausblick

Den Versuchen zur Zeitdauer der Infektionsfähigkeit sollen noch Versuche zur Toleranz bzw. Resistenz gegenüber UV-Bestrahlung folgen. Ebenso erscheint es sinnvoll, Versuche zur Wirksamkeit von Desinfektionsmittel und – verfahren durchzuführen. Da aber weder für FLA noch für deren Endozytobionten standardisierte Testmethoden existieren, wurde bereits ein Versuchsdesign entworfen, das eine ebensolche Testung möglich macht. Es ist geplant, die einzusetzenden Mittel und Verfahren nach der Liste der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie auszuwählen. Auch die Wirksamkeit von Therapeutika (z.B. Albendazol) sollte getestet werden, allerdings erst, wenn nach weiteren Versuchen zur molekularbiologischen Sequenzierung die taxonomischen Zuordnung besser möglich ist. Als weiterer Versuchsansatz sollte die Temperaturtoleranz der KAun1-Sporen evaluiert werden. Denn die Fähigkeit, bei bestimmten (erhöhten) Temperaturen zu wachsen, ist je nach Infektionsort Voraussetzung für eine Infektion des Menschen. Weitere Untersuchungen zur Pathogenität in der Zellkultur bzw. im Tierversuch erscheinen auch deswegen lohnenswert, weil eine transovarielle (vertikale) Übertragung mit geringerer Pathogenität, horizontale Übertragung eher mit höherer Pathogenität assoziiert ist (Koella und Agnew 1997). Aufgrund der Parallelen zwischen FLA und humanen phagozytierenden Zellen sind ähnliche Phänomene auch bei einer Interaktion von KAun1 mit derartigen Zellen wie bei den FLA zu erwarten, insbesondere in Bezug auf Phagozytose, bakterizide Mechanismen und Oberflächenrezeptoren. Für diese Testung mit Phagozytose-aktiven Makrophagenzelllinien wurden die Voraussetzung bereits geschaffen. Zum Einsatz wird die Zelllinie MONO-MAC-6 (gewonnen vom Blut eines Patienten mit monoblastischer Leukämie; DSM ACC 124) kommen. Die Vannellen des Stammes VanAun0 werden auch in Zukunft im Rahmen von Wirtsspektrumsversuchen eingesetzt werden, um herauszufinden, ob sie auch als Wirte für andere Endozytobionten dienen können.

6. Zusammenfassung

Freilebende Nacktamöben sind ubiquitär in vielen aquatischen Habitaten und feuchten Böden zu finden. Sie sind wesentliche Bestandteile von Biozöosen in verschiedenen Substraten. Insbesondere Biofilme dienen ihnen als Habitate. Neben ihrer Rolle als Krankheitserreger dienen freilebende Amöben häufig als Wirte und Vehikel von intrazellulären Organismen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein parasitischer Endozytobiont in Wirtsamöben untersucht, der von Kontaktlinsen und aus dem Auge einer Keratitispatientin isoliert wurde. Es gelang, im Untersuchungsmaterial neben mehreren Vannellenstämmen in diesen auch Endozytobionten nachzuweisen. Es war Aufgabe der vorliegenden Untersuchung, diese von den Vannellen aus Kontaktlinsenbehältern isolierten Endozytobionten hinsichtlich ihres Verhaltens in den Wirtsamöben zu untersuchen.

Die Aufnahme in die Wirtsamöben und die Entwicklung der Endozytobionten konnte licht- und elektronenmikroskopisch dokumentiert werden.

Die Sporen des Endozytobionten KAun1 wurden ausschließlich nach Adhäsion der Sporen und einer Food-Cup-Bildung durch Phagozytose von den Wirtsamöben (*Vannella* sp., Stamm VanAun0) aufgenommen. Aktive Penetrationsvorgänge wurden nicht beobachtet. In Nahrungsvakuolen wurden die Sporen ins Zytoplasma der Vannellen transportiert.

Normalerweise sind lysosomale Enzyme in der Lage, Makromoleküle durch Hydrolyse abzubauen. Nur spärlich wurden jedoch leere Sporenhüllen („Ghosts“) in Nahrungsvakuolen angetroffen. In der Regel wurden die Sporen jedoch nicht verdaut. Nach Durchbrechen der Kernmembran fand die weitere Entwicklung ausschließlich im Kern der Wirtsamöben statt. Bereits mittels Lichtmikroskopie konnten verschiedene Stadien dargestellt werden, die in der Wirtsamöbe im Zytoplasma, in der Folge aber auch im Kern nachgewiesen wurden.

Insbesondere die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen belegten sowohl die Morphologie der Endozytobionten als auch die Entwicklung im Wirtsamöbenkern.

Während der Differenzierung und dem Wachstum der Parasiten nach erfolgter Merogonie und Sporogonie werden sowohl die Kern- als auch die Zellmembran massiv dilatiert. Der Zyklus beginnt von vorn mit der Ruptur der Wirtsamöbenmembran, wodurch die infektiösen Sporen nach außen gelangen und von weiteren Wirtsamöben phagozytiert werden können.

Insbesondere die im Rahmen der elektronenmikroskopischen Untersuchungen erkennbare Morphologie der Organellen führte zur Einordnung in die Gruppe Mikrosporidien-ähnlicher Organismen.

Vergleiche der Sporenmorphologie der KAun1-Sporen zeigten, dass keine direkte Zugehörigkeit zu den bekannten bzw. beschriebenen Mikrosporidien vorliegt. Färbemethoden wurden zum Nachweis sowie zur taxonomischen Zuordnung eingesetzt, nachdem Sequenzierungsversuche mit Hilfe von spezifischen Sonden bislang nicht zu aussagekräftigen Ergebnissen führten. Es gelang, die Chitin-haltige Sporenwand durch Calcofluor-Färbung nachzuweisen und damit einen weiteren Hinweis der systematischen Zugehörigkeit zu den Mikrosporidien zu erhalten. Die Gram-Färbung ergab jedoch Hinweise auf gramnegative Organismen, während Mikrosporidien in der Fachliteratur als grampositiv beschrieben sind.

Wirtsspektrumsversuche wurden mit FLA aus der umfangreichen Stammsammlung des Labors für Med. Parasitologie der Bundeswehr in Koblenz durchgeführt, um Aussagen zur Wirtsspezifität treffen zu können. Von den potenziell pathogenen FLA wurden sowohl Acanthamoeben als auch Naeglerien im Versuch zur Ermittlung des Wirtsspektrums mit berücksichtigt.

In diesen Versuchen ist es gelungen, zwei weitere Vannellenarten zu infizieren, wobei der Entwicklungsgang der Endozytobionten mit dem bei VanAun0 + KAun1 identisch war. Kokultivierungsversuche mit zwei in der Zellkultur üblichen Zelllinien blieben aber erfolglos. Dies deutet auf eine gewisse Wirtsspezifität hin.

Versuche zur Tenazität (Dauer der Infektiosität der Sporen) durch Reinfektionsversuche rundeten den Untersuchungsansatz ab. Die Sporen zeigten eine hohe Tenazität im Bezug auf die Dauer ihrer Infektiosität.

Eine Beteiligung der Mikrosporidien – ähnlichen Organismen an der Pathogenese der Keratitis erscheint eher unwahrscheinlich, da *Pseudomonas aeruginosa* in unmittelbar vom Auge der Patientin gewonnenen Abstrichen nachgewiesen wurde und die antibakterielle Therapie in der Folge auch erfolgreich durchgeführt werden konnte.

Die angewandten Methoden dienten auch dazu, Aufschluss über die systematische Stellung des Endozytobionten zu erhalten. Trotz der erfolglosen Anwendung molekularbiologischer Methoden sowie eines Gram-negativen Färbeergebnisses konnte die Zuordnung morphologisch als Mikrosporidien –ähnlicher Organismus aufgrund der eindeutigen elektronenmikroskopischen Ergebnisse erfolgen. Die im Rahmen der Färbeversuche erzielten sonstigen Resultate (Ausnahme: Gramfärbung) unterstützen dies weiterhin.

KAun mit seinem Wirt ist ein Endozytobiont-Wirt-Modell, das es ermöglicht, Interaktionen von FLA und Endozytobionten – auch weiterhin – zu untersuchen.

Summary

Free-living amoebae (FLA) occur ubiquitously in many aquatic habitats and humid soils. In addition to their role as pathogens, free-living amoebae are known to serve as natural hosts and vehicles of various intracellular organisms. They form an essential part of biocoenoses in various substrates. Biofilms are their preferred habitats. In the present thesis the development of a parasitic endocytobiont within host amoebae by cocultivating FLA of the genus *Vannella* (strain VanAun0) with endocytobionts (strain KAun1) recently isolated from the contact lens and the inflamed eye of a female patient with keratitis, was examined.

In addition to several *Vannella* strains, the presence of endocytobionts was demonstrated. The purpose of the present study was to analyze these endocytobionts isolated from the *Vannella*-stages concerning their behaviour in the host amoebae.

It was demonstrated by light and electron microscopy how infection and invasion of an eukaryotic organism occurs and grows in the nucleus of the FLA.

Microsporidia as obligate intracellular parasites usually infect their hosts by extrusion of the polar filament and by penetration of the host cell membrane. In contrast, it was shown that the spores of strain KAun1 are taken up by phagocytosis after adhesion of the spores to the cell membrane, followed by a food-cup formation (infective phase). Active penetration processes were not observed. The spores were transported into the cytoplasm of the vannellae via food vacuoles.

Usually lysosomal enzymes are capable of hydrolyzing macromolecules, but in the present case the spores were not digested. Phase contrast microscopy revealed early stages of the parasites moving through the cytoplasm into the nucleus of the host amoeba. The endocytobionts even proliferated in the amoeba-nucleus by penetrating the nuclear membrane. Transmission electron microscopy showed the polymorphic stages within the karyoplasm. The life cycle of microsporidian-like organisms ended up with a sporogonic phase in which a terminal differentiation took place and numerous spores were released by rupture of the host cell membrane. The spores were the only stages which were able to survive outside the host cell. However, empty spore shells (“ghosts”) were sparsely found in food vacuoles.

The examinations with the electron microscope, in particular, revealed both the endocytobionts’ morphology and their development inside the nucleus of the host amoeba. The fast-growing parasites expanded the nuclear membrane during the proliferative phase. During differentiation of the parasites after merogony and sporogony, the nuclear membrane and the cell membrane of the host amoeba were considerably dilated.

With the rupture of the amoeba's membrane the cycle started from the beginning, since the released infectious spores were phagocytized by other host amoebae.

In particular, the morphology of the organelles made visible with the electron microscope finally allowed to classify the endocytobionts as a microsporidan-like organism. Comparisons of the morphology of KAun1 spores with microsporidia showed that there is no direct relationship with other known and/or described microsporida.

Staining methods were used for identification as well as for taxonomic classification when sequencing attempts by means of specific probes did not yield relevant results. The chitin-containing spore wall could be visualized by calcofluor staining, thus revealing an additional indication for the relation to the microsporida. With Gram staining, however, a Gram-negative reaction was obtained, whereas microsporidia are described as Gram-positive in the literature. In a host spectrum analysis with numerous FLA strains from the Bundeswehr collection, e.g. *Naegleria*, *Acanthamoeba* or *Hartmannella*, only two further *Vannella* strains from different sources were identified as suitable hosts for the strain KAun1, with a development being identical with that in VanAun0. These results indicated a certain host specificity.

Cocultivation tests with two tissue-cell lines showed no proliferation.

Reinfection tests were carried out to determine the tenacity (duration of spore infectivity) and completed the test approach. The spores exhibited a high tenacity with respect to the duration of their infectivity (up to 26 months).

The fact that *Pseudomonas aeruginosa* could be identified in swabs taken directly from the patient's eye and the fact that the subsequent antibacterial therapy was successful implies that the participation of the microsporidan-like microorganisms in the pathogenesis of the keratitis appears rather improbable. All these methods used were also applied to obtain further information on the systematic position of the endocytobiont.

Despite the unsuccessful application of methods used in molecular biology and the Gram-negative staining result, the endocytobionts could be morphologically classified as a microsporidan-like organisms due to the clear electron microscopic results. The results obtained in the framework of the staining tests additionally support these findings.

Infection of *Vannella* sp. with the microsporidian-like organism strain KAun1 is a suitable model for studies of the host-parasite relations of eukaryotic organisms using their hosts as so-called Trojan horses.

7. Literaturverzeichnis

Abu Kwaik, Y.; Gar, L.Y.; Stone, B.J.; Venkataraman, C.; Harb, O.S.: Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis; Applied Environmental Microbiology 64; S. 3127-3133 ; 1998

Adam, H.; Czihak, G.: Arbeitsmethoden der makroskopischen und mikroskopischen Anatomie; Ein Laboratoriumshandbuch für Biologen, Mediziner und technische Hilfskräfte; Gustav Fischer Verlag Stuttgart; 1964

Alsam, S.; Sissons, J.; Dudley, R.; Khan, N.A.: Mechanisms associated with *Acanthamoeba castellanii* (T4) phagocytosis; Parasitology Research; 96; S. 402-409; 2005

Amann, R.; Springer, N.; Schönhuber, W.; Ludwig, W.; Schmid, E.; Müller, K.-D.; Michel, R.: Obligate Intracellular Bacterial Parasites of Acanthamoebae related to *Chlamydia* spp.; Applied and Environmental Microbiology; Jan. 1997; S. 115-121; 1997

Ashton, N.; Wirasinha, P.A.: Encephalitozoonosis of the cornea; British Journal of Ophthalmology 57; S. 669-674; 1973

Banforth, S.: The role of protozoa in litters and soil; Journal of Protozoology.; 32: 404; 1985

Barker, J.; Lambert, P.A.; Brown, M.R.W.: Influence of intra-amoebic and other growth conditions on the surface properties of *Legionella pneumophila*; Infection and Immunity; 61; S. 3503-3510; 1992

Beattie, T.K.; Seal, D.V.; Tomlinson, A.; McFadyen, A.K.; Grimason, A.M.: Determination of amoebicidal activities of multipurpose contact lens solutions by using a most probable number enumeration technique; Journal of Clinical Microbiology; Vol. 41; Nr. 7; S. 2992-3000; 2003

Beckers, C.J.; Dubremetz, J.F.; Mercereau-Puijalon, O.; Joiner, K.A.: The *Toxoplasma gondii* roptry protein ROP2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm; The Journal of Cell Biology; Vol. 127; S. 947-961; 1994

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.; Applied Environmental Microbiology 64; S. 279-286; 1998

Bigliardi, E.; Sacchi, L.: Cell biology and invasion of the microsporidia; Microbes and Infection; 3; S. 373-379; 2001

Birtles, R.J.; Rowbotham, T.J.; Michel, R.; Pitcher, D.G.; Lascola, B.; Alexiou-Daniel, S.; Raoult, D.: Candidatus *Odysella thessalonicensis* gen. nov., sp. nov., an obligate intracellular parasite of *Acanthamoeba* species; International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 50; S. 63-72; 2000

- Boulanger, C.A.; Edelstein, P.H.: Precision and accuracy of recovery of *Legionella pneumophila* from seeded tap water by filtration and centrifugation; Applied Environmental Microbiology; 61; S. 1805-1809; 1995
- Brumpt, E.: Précis de Parasitologie; 6. edition; Libraires de l'académie de médecine; Paris; 1949
- Bryan, R.T.; Cali, A.; Owen, R.L.; Spencer, H.C.: Microsporidia: opportunistic pathogens in patients with AIDS; Progress in Clinical Parasitology; Ed.: Sun, T.; Vol. 2; S. 1-26; 1990
- Buck, S.L.; Rosenthal, R.A.; Schlech, B.A.: Methods used to evaluate the effectiveness of contact lens care solutions and other compounds against *Acanthamoeba*: a review of the literature; Journal of Contact Lense Association of Ophthalmologists 26: 72-84; 2000
- Cali, A. et al.: Corneal Microsporidiosis: Charakterization and identification; Journal of Protozoology; Vol. 38; No. 6.; S. 215-217; 1991
- Canning, E.U.: Phylum Microspora; in Margulis L.; Corliss, J.O.; Melkonian, M.; Chapman, D.J. (Herausgeber): Handbook of Protoctista; S. 53-77; 1990
- Cerva, L.; Hultdt, G.: *Limax* amoebae in five swimming pools in Stockholm. Folia Parasitologica 21; S. 71-75; 1974
- Chilmonczyk, S.; Cox, WT, Hendrick, R.P.: *Enterocytozoon salmonis* n. sp.: an intranuclear microsporidium from salmonid fish; Journal of Protozoology 38; S. 264-269; 1991
- Christiansen, R.G.; Marshall, J.M.: A study of phagocytosis in the ameba *Chaos chaos*; The Journal of Cell Biology; Vol. 25; S. 443-457; 1965
- Cirillo, J.D.; Falkow, S.; Tompkins, L.S.: Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion; Infection and Immunity; 62; S. 3254-3261; 1994
- Collier, L.; Balows, A.; Sussman, M. (Volume editors: Cox, F.E.G.; Kreier, J.; Wakelin, D.): Topley and Wilson's Microbiology and microbial infections; 9.ed. Volume 5; Parasitology; 1998
- Collingro, A.; Walochnik, J.; Baranyi, C.; Michel, R.; Wagner, M.; Horn, M.; Aspöck, H.: Chlamydial endocytobionts of free-living amoebae differentially affect the growth rate of their hosts; European Journal of Protistology; 40; S. 57-60; 2004
- Culbertson, C. G.: The pathogenicity of soil amoebas. Annual Review of Microbiology 25 ; 231-254; 1971
- Curgy, J.J.; Vavra, J.; Vivares, C.: Presence of ribosomal RNAs with prokaryotic properties in microsporidia, eukaryotic organisms; Biologie Cellulaire; 38; S. 49-52; 1990
- Cursons, R.T.; Brown, T.J.; Keys, E.A.: Effect of disinfectans on pathogenic free-living amoebae in axenic conditions; Applied Einvironmental Microbiology; 40; S. 62-66; 1980

De Jonckheere, J.F.: Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp.; Applied Environmental Microbiology 39; S. 681-685; 1980

De Jonckheere J.F.; Brown, S.: Is the free-living amoeba *Hartmannella* causing keratitis ? Clin. Infect. 36; 1998; S. 349-350 sowie De Jonckheere, J. F.; Brown, S.: Non-*Acanthamoeba* amoebic keratitis; Cornea; 18; S. 499-501; 1999

De Jonckheere, J. F.; Brown, S.; Walochnik, J.; Aspöck, J.; Michel, R.: Morphological investigation of three *Tetramitus* spp. which are phylogenetically very closely related: *Tetramitus horticolus*; *Tetramitus russelli* n. comb. and *Tetramitus pararuselli* n. sp.: European Journal of Protistology; 41; S. 139-150; 2005

Desmet-Paix, I.: Recherche systematique d'amibes dans les eaux minerales. Annales de la Société Belgede Médecine Tropicale 54 ; S. 409-414; 1974

Derr-Harf, C.; Molet, B.; Schreiber J.; Krmere, M.: Epidemiologie des amibes libres dans les eaux de Strasbourg. Annales de parasitologie humaine et comparée 53 ; S. 467-477; 1978

Didier, E.S.; Snowden, K.F.; Shaddock, J.A.: Biology of microsporidian species infecting mammals; Advances in Parasitology; 40; S. 284-321; 1998

Doflein, F.; Reichenow, E.: Lehrbuch der Protozoenkunde; 5. Edition; Gustav Fischer Verlag; Jena; 1929

Doflein, F.; Reichenow, E.: Lehrbuch der Protozoenkunde; 6. Edition; 1. Teil; Allgemeine Naturgeschichte der Protozoen; Fischer Verlag; Jena; 1949

Drozanski, W.: Fatal bacterial infection in soil amoebae; Acta Microbiologica Pol. 5; S. 315-317; 1956

Drozanski, W. J.: *Sarcobium lyticum* gen. nov., sp. nov., an obligate intracellular bacterial parasite of small free-living amoebae; International Journal of Systematic Bacteriology; 41; S. 82-87; 1991

Dunn, A.M.; Terry, R.S.; Smith, J.E.: Transovarial Transmission in the Microsporidia; Advances in Parasitology; Ed.: Baker, J.R.; Muller, R.; Rollinson, D.; 48; S. 57-92; 2001

EN ISO 14729: Ophthalmic optics – contact lens care products – Microbiological requirements and test methods for products and regimens for hygienic management of contact lenses; 2001

Engelbrecht, H.; Jirovec, O.; Nemeseri, L.; Rosicky, B.: Parasitologische Arbeitsmethoden in Medizin und Veterinärmedizin; Akademie-Verlag Berlin; 1965

Everett, K.D.E.; Bush, R.M.; Anderssen, A.A.: Embedded description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five species, and standards for the identification of organisms; International Journal of Systematic Bacteriology; 49; S. 415-440; 1999

- Fajardo-Moser, M.: Untersuchung der *Legionella*-Infektion in der genetisch manipulierbaren Amöbe *Dictyostelium discoideum*; Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg; 2006
- Fast, N.M.; Keeling, P.J.: Alpha and beta subunits of pyruvate dehydrogenase E1 from the microsporidian *Nosema locustae*: mitochondrion-derived carbon metabolism in microsporidia; *Molecular and Biochemical Parasitology*; 117; S. 201-209; 2001
- Fields, B.S.; Fields, S.R.; Loy, J.N.; White, E.H.; Steffens, W.L.; Shotts, E.B.: Attachment and entry of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis*; *Journal of infectious diseases*; 167; S. 1146-1150; 1993
- Flemming, H.C.: Biofilme, Biofouling und mikrobielle Materialschädigung; Habilitationsschrift; Stuttgarter Siedlungswasserwirtschaftliche Berichte, Oldenburg Verlag; München; Band 129; 1994
- Flemming, H.C.; Wingender, J.: Biofilme – die bevorzugte Lebensform der Mikroorganismen; *Biologie in unserer Zeit*; 31; S. 2-13; 2001
- Flieger, A.; Banerji, S.; Broich, M.; Rydzewski, K.; Shadrach, W.S.: Pathogenese der Legionelleninfektion; Springer Verlag Berlin/Heidelberg; 2004
- Foucault, C.; Drancourt, M.: Actin mediates *Encephalitozoon intestinalis* entry into the human enterocyte-like cell line, Caco-2; *Microbial Pathogenesis*; 28; S. 51-58; 2000
- Franzen, C.: Mikrosporidien – In vitro Modelle zum Studium der Zell-Parasiten-Interaktionen; *Infection*; 31 Suppl. 1; S. 24; 2003
- Franzen, C.; Schwartz, D.A.; Visvesvara, G.S.; Muller, A.; Schwenk, A.; Salzberger, B.; Fatkenheuer, G.; Hartmann, P.; Mahrle, G.; Diehl, V.; Schrappe, M.: *Encephalitozoon cuniculi* infection of the gastrointestinal tract in a patient with AIDS; *Clinical Infectious Diseases* 21; S. 1480-1484 ; 1995
- Gardner, H.A.R.; Martinez, A.J.; Visvesvara, G.S.; Sotrel, A.: Granulomatous amebic encephalitis in an AIDS patient; *Neurology*; 41; S. 1993-1995; 1991
- Garcia, L.S.: *Diagnostic Medical Parasitology*; 4. Edition; 2001
- Gelman, B.B.; Popov, V.; Chaljub, G.; Nader, R.; Rauf, S.J.; Nauta, H.W.; Vivesvara, G.S.: Neurobiological and ultrastructural features of amebic encephalitis caused by *Sappinia diploidea*; *Journal of neuropathology and experimental neurology*; 62 (19); S. 990-998; 2003
- Görtz, H.D.; Michel, R.: Bacterial symbionts of protozoa in aqueous environments-potential pathogens? In: Greenblatt, C.; Spigelmann, M. (Edit.): *Emerging pathogens*; *Archaeology, ecology and evolution on infectious disease*; S. 25-37; 2003
- Gomez-Couso, H.; Paniagua-Crespo, E.; Ares-Mazas, E.: *Acanthamoeba* as a temporal vehicle of *Cryptosporidium*; manuscript under review; *Parasitology Research* 2006
- Gotuzzo, E. et al.: *Balamuthia mandrillaris*, a new international problem; 10. Symposium on parasitic and free living Amoebae; MEEGID-EMOP Symposia; Valencia; Spain; 2004

- Griffin, J.L.: Temperature tolerance of pathogenic and non pathogenic freeliving amoebae; Science 178; S. 869-879; 1972
- Groß, U.: Treatment of microsporidiosis including albendazole; Parasitology Research; 90; S. 14-18; 2003
- Hägele, S.; Köhler, R.; Merkert, H.; Schleicher, M.; Hacker, J.; Steinert, M.: *Dictyostelium dicoideum*: a new host model system for intracellular pathogens of the genus *Legionella*; Cellular microbiology; 2 (2); S. 165-171; 2000
- Hahn, H.; Falke, D.; Kaufmann, S.; Ullmann, U.: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie; Springer Verlag Heidelberg; 2005
- Hiti, K.; Walochnik, J.; Faschinger, C.; Haller-Schober, E-M.; Aspöck, H.: One- and two-step hydrogen peroxide contact lens disinfection solutions against *Acanthamoeba*: How effective are they?; 1-5; Eye; 2004
- Hiti, K.; Walochnik, J.; Haller-Schober, E.M.; Faschinger, C.; Aspöck, H.: Viability of *Acanthamoeba* after exposure to a multipurpose disinfecting contact lens solution and two hydrogen peroxide systems; British Journal of Ophthalmology; 86; S. 144-146; 2002
- Hof, H.; Dörries, R.: Medizinische Mikrobiologie; 3. Aufl.; Thieme Verlag, Stuttgart; 2005
- Hoffmann, R.; Michel, R.: Distribution of free-living amoebae (FLA) during preparation and supply of drinking water; International Journal of Hygiene and Environmental Health 203; S. 215-219; 2001
- Hoffmann, R.; Michel, R.; Schmid, E.N.; Müller, K.-D.: Natural infection with microsporidian organisms (KW 19) in *Vannella* sp. (Gymnamoebia) isolated from a domestic tap-water supply; Parasitology Research 84; S. 164-166; 1998
- Hok, T.T.: A simple and rapid cold-staining method for acid-fast bacteria; The American Review of Respiratory Diseases; S. 753; 1952
- Horn, M.; Wagner, M.; Müller, K.-D.; Schmid, E.N.; Fritsche, T.R.; Schleifer, K.-H.; Michel, R.: *Neochlamydia hartmannellae* gen. nov., sp. nov. (Parachlamydiaceae), an endoparasite of the amoeba *Hartmannella vermiformis*; Microbiology 146; S. 1231-1239; 2000
- Intalapaporn, P. et al.: *Balamuthia mandrillaris* meningoencephalitis: The first case in Southeast Asia; American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 70(6); S. 666-669; 2004
- Jadin, J.B.; Francois, J.; Bisoux, M.; Languillon, J.; Moris, R.: Développement intranucléaire de *Mycobacterium leprae* dans les cellules histiocytaires chez l`animal; Bulletin d` Académie Nationale de Médecine 152; S. 7-8; 1968
- Karnovsky, M.J.: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality in electron microscopy; Journal of Cell Biology; 27; 137A; 1965
- Kersten, A.; Althaus, C.: Mikrosporidien-Keratitis bei Patienten im Stadium AIDS; 96. Jahrestagung der DOG; Berlin; 1998

- Khan, N.; Panjwani, N.: Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections; VIII European Multicolloquium of Parasitology; Poznan, Poland; 2000
- Kiderlen, A.F.; Laube, U.: *Balamuthia mandrillaris*, an opportunistic agent of granulomatous amebic encephalitis, infects the brain via the olfactory nerve pathway; Parasitology Research; 94; S. 49-52; 2004
- Kilvington, S.; Price, J.: Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure; Journal of applied Bacteriology; 68; S. 519-525; 1990
- Koella, J.C.; Agnew, P.: Blood feeding success of the mosquito *Aedes aegypti* depends on the transmission route of its parasite *Edhazardia aedis*; Oikos; 78; S. 311-316; 1997
- Kreißig, D.: Der Biofilm – Bildung, Eigenschaften und Wirkungen, Teil 1 Bioforum (Sonderdruck); 24; 2001
- Kudo, R.R.: Protozoology; Ed. 5; Thomas (Publisher); Springfield; 1966
- La Scola, B.; Raoult, D.: *Afipia felis* in hospital water supply in association with free-living amoebae; Lancet 353; 1330; 1999
- La Scola, B. et al.: A giant virus in amoebae; Science 299; 5615; 03/2003
- Lafranchi-Tristem, N.; Curry, A.; Cheney, S.A.; Canning, E.U.: Growth of *Trachipleistophora hominis* (Microsporidia; Pleistophoridae) in C₂,C₁₂ mouse myoblast cells and response to treatment with albendazole; Folia Parasitologica; 48; S. 192-200; 2001
- Leippe, M.; Herbst, R.: Ancient weapons for attack and defense: the pore-forming polypeptides of pathogenic enteric and free-living amoeboid protozoa; The Journal of Eukaryotic Microbiology; 51(5); S. 516-521; 2004
- Lom, J.; Dykova, I.: Ultrastructure of *Nucleospora secunda* n.sp. (Microsporidia), parasite of enterocytes of *Nothobranchius rubripinnis*; European Journal of Protistology 38; S. 19-27; 2002
- Ly, T.M.C.; Müller H.E.: Interactions of *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri* and *Listeria innocua* with protozoans; The Journal of general and applied Microbiology 36; S. 143-150; 1990
- Ma, P.; Visvesvara, G.S.; Martinez, A.J.; Theodore, F.H.; Daggett, A.J.; Sawyer, T.K.: *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections: review; Review Infectious Diseases; 12; S. 490-513; 1990
- Marciano-Cabral, F.; Cabral, G.: *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans; Clinical Microbiology Reviews; 273-307; 04/2003
- Martinez, A.J.; Visvesvara, G.S.: Laboratory diagnosis of pathogenic free-living amoebas: *Naegleria*, *Acanthamoeba*, and *Leptomyxid*; Clinics in Laboratory Medicine 11: S. 861-877; 1991

- Martinez, A.J.; Visvesvara, G.S.: *Balamuthia mandrillaris* infection; Journal of Medical Microbiology; 50; S. 205-207; 2001
- Mathis, A.: Microsporidia: emerging advances in understanding the basic biology of these unique organisms; International Journal of Parasitology 30; S. 795-804; 2000
- Matsubayashi, H.; Koike, T.; Mikata, T.; Hagiwara, S.: A case of *Encephalitozoon* like body infection in man; Archives of Pathology; 67; S. 181-187; 1959
- Mehlhorn, H.; Ruthmann, A.: Allgemeine Protozoologie; Fischer Verlag, Jena; 1992
- Mehlhorn, H.: Encyclopedic Reference of Parasitology; 2.Ed.; Biology, Structure, Function; Springer Verlag, Heidelberg; S. 362-363; 2001
- Mergeryan, H.: The prevalence of *Acanthamoeba* in the human environment; Review Infectious Diseases 13; 410-412; 1991
- Méresse, S.; Steele-Mortimer, O.; Moreno, E.; Desjardins, M.; Finlay, B.; Gorvel, J.-P.: Controlling the maturation of pathogen-containing vacuoles: a matter of life and death; Nature Cell Biology; 1; S. 183-188; 1999
- Michel, R.; Schneider, H.: Studies of limax amoebae in a physiotherapeutical indoor; Betriebshygiene und Praeventivmedizin; 170; S. 479-491; 1980
- Michel, R.; Just, H.M.: Acanthamoeben, Naeglerien und andere freilebende Amöben in Kühl- und Spülwasser von Zahnbehandlungseinheiten; Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene; 179; 1; S. 56-72; 1984
- Michel, R.: Wirkung von Silberpräparaten auf Amöben; Bundesakademie für Wehrverwaltung und Wehrtechnik; Wehrtechnisches Symposium Wasser und Abwasser in der Bundeswehr; Koblenz; 1985
- Michel, R.; Hauröder-Philippczyk, B.; Müller, K.-D.; Weishaar, I.: *Acanthamoeba* from human nasal mucosa infected with an obligate intracellular parasite; European Journal of Protistology 30; S. 104-110; 1994
- Michel, R.; Burghardt, H.; Bergmann, H.: Natürliche intrazelluläre Infektion bei Acanthamoeben mit *Pseudomonas aeruginosa* nach ihrer Isolierung aus einer mikrobiologisch beanstandeten Trinkwasser-Hausinstallation eines Krankenhauses; Zentralblatt für Hygiene 196; S. 532-544; 1995
- Michel, R.; Müller, K.-D.; Schmid, E.N.: *Ehrlichia*-like organismus (KSL1) observed as obligate intracellular parasites of *Saccamoeba* species; Endocytobiosis and Cell Research; 11; S. 69-80; 1995
- Michel, R.; Hauröder, B.: Isolation of an *Acanthamoeba*-strain with intracellular *Burkholderia pickettii* infection; Zentralblatt für Bakteriologie 285; S. 541-557; 1997
- Michel, R.: Freilebende Amöben als Wirte und Vehikel von Mikroorganismen; Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie 19; S. 11-20; 1997

- Michel, R.; Hauröder, B.; Müller, K.-D.; Zöller, L.: An environmental *Naegleria*-strain, unable to form cysts – turned out to harbour two different species of endocytobionts; *Endocytobiosis and Cell Research* 13; S. 115-118; 1999
- Michel, R.; Schmid, E.N.; Böker, T.; Hager, D.G.; Müller, K.-D.; Hoffmann, R.; Seitz, H.M.: *Vannella* sp. harboring Microsporidia-like organisms isolated from the contact lens and inflamed eye of a female keratitis patient; *Parasitology Research*. 86; S. 514-520; 2000
- Michel, R.; Steinert, M.; Zöller, L.; Hauröder, B.; Henning, K.: Cocultivation of protozoa and the *Chlamydia*-like bacterium *Waddlia chondrophila* isolated from an aborted bovine foetus in Germany; *Acta Protozoologica*. 43; S. 37-42; 2004
- Michel, R. Wylezich, C.: Beitrag zur Biologie und Morphologie von *Cochlonema euryblastum*, einem endoparasitischen Pilz von *Thecamoeba quadrilineata*; *Mikrokosmos*; 94; Heft 2; 2005
- Michel, R.; Müller, K.D.; Zöller, L.; Walochnik, J.; Hartmann, M.; Schmid, E.N.: Free living amoebae serve as host for the *Chlamydia*-like bacterium *Simkania nevegensis*; *Acta Protozoologica*; 44; S. 113-121; 2005
- Modie, E.G.; Le Jambre, L.F.; Katz, M.E.: *Thelohania montirivulorum* sp.nov. (Microspora: Thelohaniidae), a parasite of the Australian freshwater crayfish, *Cherax destructor* (Decapoda: Parastacidae): fine ultrastructure, molecular characteristics and phylogenetic relationships; *Parasitology Research*; 91; S. 215-228; 2003
- Naegler, K.: Fakultativ parasitische Micrococcen in Amöben; *Archiv für Protistenkunde* 19; S. 246-253; 1910
- Nilsen, F.; Ness, A.; Nylund, A.: Observations on an intranuclear microsporidian in lymphoblasts from farmed Atlantic halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.); *Journal of Eukaryotic Microbiology* 42; S. 131-135; 1995
- O'Brien, S.J.; Bhopal, R.S.: Legionnaires` disease: the infective dose paradox; *Lancet*; 342; S. 5-6; 1993
- Otto-Karg, I.; Steinert, M.; Frosch, M.; Pitten, F.A.: Amöben – möglicher „Hitzeschutz“ für Legionellen; *Hygiene und Medizin*; 31. Jg. Suppl. 1; 2006
- Page, F.C.: Taxonomic criteria for *Limax* amoebae, with descriptions of 3 new species of *Hartmannella* and 3 of *Vahlkamphia*; *Journal of Protozoology*; 14; S. 499-521; 1967
- Page, F.C.: A further study of taxonomic criteria for *Limax* amoebae, with descriptions of new species and key to genera; *Archiv für Protistenkunde*; 116; S. 149-184; 1974
- Page, F.C.: A New Key to freshwater and soil Gymnamoebae with instructions for culture; *Culture Collection of Algae and Protozoa*; 1988
- Page, F.C.; Siemensma, F.J.: Nackte Rhizopoda und Heliozoa; *Protozoenfauna Band 2*; Fischer Verlag; Stuttgart, New York; 1991

- Penland, R.L.; Wilhelmus, K.R.: Microbiologic analysis of bottled water: is it safe for use with contact lenses? *Ophthalmology* 106; S. 1500-1503; 1999
- Rinder, H.; München; Franzen, C.; Köln; Desplazes, P.; Schweiz; Mündliche Mitteilung
- Rivera, F.; Medina, F. et al.: Pathogenic and free-living protozoa cultured from nasopharyngeal and oral regions of dental patients; *Environmental Research*; 33: S. 428-440; 1984
- Rivera, F.; Ramirez, P.; Vilaclara, G.; Medina, F.: A survey of pathogenic and free living amoebae inhabiting swimming pool water in Mexico city; *Environmental Research* 32; S. 205-211; 1983
- Rivera, F.; Roy-Ocotla, G.; Rosas, I.; Ramirez, E.; Bonilla, P; Lares, F.: Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs; *Environmental Research*; 42; 1; S. 149-154; 1987
- Rogers, J.; Keevil, C.W.: Immunogold and fluorescein immunolabelling of *Legionella pneumophila* within an aquatic biofilm visualized by using episcopic differential interference contrast microscopy; *Applied Environmental Microbiology* 58; S. 2326-2330; 1992
- Rowbotham, T.J.: Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae; *Journal of Clinical Pathology* 33; S. 1179-1183; 1980
- Rüchel, R.: Fluoreszenzfärbung mit optischen Aufhellern zum Direktnachweis von Pilzen in klinischen Untersuchungsmaterialien; *Mikrobiologie*; 5. Jg.; S. 78; 1995
- Saliba, K.J.; Kirk, K.: Nutrient acquisition by intracellular apicomplexan parasites: staying for dinner; *International Journal for Parasitology* 31; S. 1321-1330; 2000
- Schadduk, J.A.; Polley, M.B.: Some factors influencing the in vitro infectivity and replication of *Encephalitozoon cuniculi*; *Journal of Protozoology*; 25; S. 491-496; 1978
- Schäfer, B.: Legionellen in Warmwasserversorgungsanlagen; Bedeutung, Bestimmung und Bekämpfung; S. 227-236; Beitrag aus "Die Trinkwasserverordnung"; Erich Schmidt Verlag; Berlin; 2003
- Schmid, E.N.; Michel, R.; Müller, K.-D.; Pichler, O.: *Cytophaga* sp., a facultative intracellular bacterium in acanthamoebae isolated from a keratitis patient; 45. Tagung der DGHM; Karlsruhe; 1993
- Schottelius, J.; Schmetz, C.; Kock, N.; Schüler, T.; Sobottka, I.; Fleischer, B.: Presentation by scanning electron microscopy of the life cycle of microsporidia of the genus *Encephalitozoon*; *Microbes and Infection*; 2; S. 1401-1406; 2000
- Schuster, F.L.; Glaser, C.; Honarmand, S.; Mguire, J.H.; Visvesvara, G.S.: *Balamuthia* amebic encephalitis risk, hispanic americans; *Emerging Infectious Diseases*; 2004
- Seal, D.V.; Kirkness, C.M.; Bennet, H.G.B.; Peterson, M. and Keratitis Study Group: *Acanthamoeba* keratitis in Scotland: risk factors for contact lens wearers. *Contact Lens Anterior Eye* 22; 58-68; 1999

- Smith-Sommerville, H.E.; Huryn, V.B.; Walker, C.; Winters, A.L.: Survival of *Legionella pneumophila* in the cold water ciliate *Tetrahymena vorax*; Applied Environmental Microbiology; 57; S. 2742-2749; 1991
- Sprague, V.; Becnel, J.J.; Hazard, E.I.: Taxonomy of phylum Microspora; Critical reviews in Microbiology; 18; S. 285-395; 1992
- Steinert, M.; Birkness, K.; White, E.; Fields, B.; Quinn, F.: *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls; Applied Environmental Microbiology; 64; S. 2256-2261; 1998
- Szewzyk, U.; Szewzyk, R.: Biofilme - die etwas andere Lebensweise; BIOSpektrum; 3; 9.Jg.; 2003
- Taupin, V.; Metenier, G.; Vivares, C.P.; Pensier, G.: An improved procedure for Percoll gradient separation of sporogonial stages of *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia); Parasitology Research; 99; S. 708-714; 2006
- Theng, J. et al.: Microsporidial keratoconjunctivitis in a healthy contact lens wearer without Human Immunodeficiency Virus infection; Ophthalmology; Vol. 108; Number 5; 2001
- Torres-Fernandez, O.: Ultrastructural findings on Microsporidia spore wall as seen by ruthenium tetroxide fixation; Journal of invertebrate pathology; 77; S. 138-140; 2001
- Tsvetkova, N. et al.: The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria; Parasitology Research; 92; S. 405-413; 2004
- Vivares, C.P.: Introduction: The „microsporidial world“, a paragon for analyzing intracellular parasitism; Microbes and infection; 3; S. 371-372; 2001
- Wagner, Y.; Noack, B.; Hoffmann, Th.; Jacobs, E.; Lück, P.C.: Periodontopathogenic bacteria multiply in the environmental amoeba *Acanthamoeba castellanii*; International Journal of Hygiene and Environmental Health; S. 535-539; 2006
- Weber, R.; Deplazes, P.; Schwartz, D.: Diagnosis and clinical aspects of human microsporidiosis; Cryptosporidiosis and Microsporidiosis; Ed.: Petry, F.; Contributions to Microbiology; Ed.: Schmidt, A.; S. 166-192; 2000
- Walochnik, J.; Köhler, M.; Szenasi, Z.; Aspöck, H.: Diversity of free-living amoebae (FLA) in thermal waters in Hungary; Tagungsband; Programm&Abstracts; 25. Wissenschaftliche Tagung der Deutschen Gesellschaft für Protozoologie; Liebenwalde; 02/2006
- Weiss, L.M.; Vossbrinck, C.R.: Microsporidiosis: Molecular and diagnostic aspects; Advances in Parasitology; 40; S. 352-399; 1998
- Weiss, L.M.: Microsporidia: emerging pathogenic protists; Acta Tropica; 78; S. 89-102; 2001
- Wichro, E.; Hoelzl, D.; Krause, R.; Bertha, G.; Reinthaler, F.; Wenisch, C.: Microsporidiosis in travel-associated chronic diarrhea in immune-competent patients; American Journal of Medicine and Hygiene; 73 (2); S. 285-287; 2005

Witschel, H.; Schumacher, R.; Seitz, H.M.: Amöben –Keratitis. Ein klinisch-histopathologischer Fallbericht; Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde 185; S. 46-49; 1984

Wolk, DM.; Johnson, CH.; Rice, EW.; Marshall, MM.; Grahn, KF.; Plummer, CB.; Sterling, CR.: A spore counting method and cell culture model for chlorine disinfection studies of *Encephalitozoon* syn. *Septata intestinalis*; Applied and Environmental Microbiology; 66; 4; S 1266-1273; 2004

Wylezich, C.; Smirnov, A.V.; Michel, R.: Molecular biological and morphological studies on the reisolated binucleate amoeba *Sappinia diploidea* (Thekamoebidae); Tagungsband; Programm&Abstracts; 25. Wissenschaftliche Tagung der Deutschen Gesellschaft für Protozoologie; Liebenwalde; 02/2006

8. Angaben zu vorpublizierten Ergebnissen

Vorträge:

P. Scheid: Free-living amoebae as cerebral pathogens and vehicles of pathogenic organisms; Department of Medical Microbiology; Cardiff University School of Medicine; Wales College of Medicine 01/2006

P. Scheid: A Microsporidia strain using an alternative pathway to infect free-living amoebae; 14th Japanese-German Cooperative Symposium on Protozoan Diseases; Düsseldorf; 09/2004

Poster:

P. Scheid, R. Michel; L. Zöller: Free living amoebae as pathogens and vehicles of pathogen organisms; 22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie e.V.; Wien; 02/2006

P. Scheid; R. Michel; L. Zöller: Freilebende Amöben als Krankheitserreger und als Vehikel pathogener Organismen; Medizinische B-Schutztagung; München; 10/2005

P. Scheid; L. Zöller:
Freilebende Amöben als Krankheitserreger und als Vehikel pathogener Organismen
35. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Wehrmedizin und Wehrpharmazie; Trier; 10/2004

Veröffentlichungen/Abstracts:

P. Scheid; R. Michel; L. Zöller: Free living amoebae as pathogens and vehicles of pathogen organisms; *Infection*; Vol. 33; S. 226; 06/2005

P. Scheid: A Microsporidia strain using an alternativ pathway to infect free-living amoebae; Tagungsband: 14th Japanese-German Cooperative Symposium on Protozoan Diseases; Düsseldorf; 09/2004

P. Scheid; L. Zöller:
Freilebende Amöben als Krankheitserreger und als Vehikel pathogener Organismen
35. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Wehrmedizin und Wehrpharmazie;
Tagungsband; Kurzfassungen; Trier; 10/2004

P. Scheid: Mechanism of intrusion of a microsporidian-like organism into the nucleus of host amoebae (*Vannella* sp.) isolated from a keratitis patient; *Parasitology Research*; to be published; 2007

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Patrick Leander Scheid
Wohnort: 56323 Waldesch, Birkenweg 11
Geburtstag: 25.06.1967
Geburtsort: 66606 St. Wendel
Konfession: röm. katholisch
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

Schulbildung

Von 1973 – 1977 Grundschule Sotzweiler
Von 1977 bis 1986 Arnold-Janssen-Gymnasium in St. Wendel
Abschluß: Abitur 1986

Studium

WS 1989/90 – 1995/96 Diplom Studiengang Biologie an der Universität des Saarlandes;
Fächerschwerpunkte: Biogeographie, Botanik, Zoologie
Abschluß Dipl.-Biologe
Parallel bis 1993 Magisterstudiengang Englisch / Anglistik

Fremdsprachen:

Englisch: Anglistik-Studium bis Zwischenprüfung;
1 Jahr Auslandsaufenthalt in Wales, Medical Center;
Cambridge Advanced Certificate

Französisch: Französisch Leistungskurs

Latein: Großes Latinum

Berufserfahrung:

1986 bis 1989 Soldat auf Zeit; Sanitätsdienst der Bundeswehr
1989 Anerkennung der Berufsbezeichnung Krankenpflegehelfer
01.10.1995-30.06.1996: VSE Saarbrücken im Bereich Anlagenoptimierung,
Systemsteuerung und Windkraftanlagenanwendung;
Projektmanagement
01.07.1996-19.07.1996: Umweltanalytisches Praktikum S.A.F.E. Analyses, Frankreich
seit 05.08.1996: Zentrales Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr Koblenz;
zu Beginn in der Laborgruppe Med. Zoologie
ab 2000: Laborleiter Labor für Med. Parasitologie
ab 2006: Laborleiter Laborverbund Med. Parasitologie und Zellkultur

10. Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 03.07.2007