

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie  
des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin  
des Universitätsklinikums Düsseldorf

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. E. Mayatepek

**Die Bedeutung des Virulenzfaktors Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa*  
bei der Zystischen Fibrose  
– Untersuchungen an europäischen Zwillingen und Geschwistern –**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von  
Darius Salehin  
2006

Die Bedeutung des Virulenzfaktors Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* bei der Zystischen Fibrose – Untersuchungen an europäischen Zwillingen und Geschwistern –

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg  
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Horst Schrotten

Koreferent: Prof. Dr. med. Walter Däubener

## Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>IV</b>
<b>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>VII</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Die Zystische Fibrose</b> .....	<b>1</b>
1.1.1. Diagnostik der Zystischen Fibrose .....	2
1.1.2. Allgemeine Pathophysiologie der Zystischen Fibrose .....	3
1.1.3. Spezielle Pathophysiologie der Lunge bei der Zystischen Fibrose .....	5
1.1.4. „Mikrobiologie“ der Zystischen Fibrose .....	6
1.1.5. Viren .....	7
1.1.6. Pilze .....	7
1.1.7. Bakterien .....	8
1.1.7.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	9
1.1.7.2. <i>Haemophilus influenzae</i> .....	10
1.1.7.3. <i>Burkholderia cepacia</i> .....	10
1.1.8. Die gastrointestinale Manifestation bei der Zystischen Fibrose .....	11
1.1.9. Weitere Manifestationsorte der Zystischen Fibrose .....	11
<b>1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> .....	<b>12</b>
1.2.1. Geschichtliches .....	12
1.2.2. Allgemeines - Definition .....	12
1.2.3. Morphologie .....	13
1.2.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bei der Zystischen Fibrose .....	14
1.2.5. Adhäsion von <i>P. aeruginosa</i> und Bedeutung in der Pathophysiologie der Lungenschädigung ..	15
1.2.6. Virulenzfaktoren von <i>P. aeruginosa</i> .....	16
1.2.6.1. Lipopolysaccharide .....	17
1.2.6.2. Flagellin .....	18
1.2.6.3. Neutrophilenelastase .....	18
1.2.6.4. Exotoxin A .....	18
1.2.6.5. Mukoexopolysaccharid (Alginat) .....	19
1.2.7. Mukoide Wachstumsform .....	19
<b>1.3. Zwillingsstudien bei der Zystischen Fibrose</b> .....	<b>21</b>
<b>1.4. Fragestellung</b> .....	<b>21</b>

<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>23</b>
2.1. Chemikalien.....	23
2.2. Verwendete Geräte.....	23
2.3. A549-Zellkultur .....	24
2.4. Passagieren von A549 und deren Aussaat .....	24
2.5. Untersuchtetes Probenmaterial und Patientenkollektiv.....	25
2.5.1. Vorkommen verschiedener <i>P. aeruginosa</i> Stämme .....	27
2.6. Asservierung und Kultivierung der Bakterien .....	28
2.7. Bakterienbindungsassay.....	29
2.8. Auswertung .....	30
2.9. Klinische Verlaufparameter .....	31
2.9.1. Forcierte Vitalkapazität FVC.....	31
2.9.2. Forcierte expiratorische Volumen der ersten Sekunde FEV1 .....	31
2.9.3. Längensollgewicht .....	32
2.10. Statistische Auswertung .....	33
<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1. Berechnung der Adhäsion von <i>P. aeruginosa</i>.....</b>	<b>34</b>
3.1.1. Adhäsionsstärke der untersuchten <i>P. aeruginosa</i> Isolate.....	34
3.1.2. Betrachtung der für die Adhäsion erzielten Extremwerte .....	36
3.1.3. Paarvergleich der Gesamtgruppe.....	36
3.1.3.1. Paarvergleich der monozygoten Zwillinge .....	37
3.1.3.2. Paarvergleich der heterozygoten Zwillinge und Geschwister .....	40
3.1.4. Verteilung der <i>Pseudomonas</i> -Genotypen und Vergleich mit ihrer Adhäsion.....	41
<b>3.2. Vergleich der klinischen Daten .....</b>	<b>43</b>
3.2.1. Allgemeine Beschreibung der erhobenen Lungenfunktionsparameter.....	43
3.2.2. Paarvergleich der klinischen Parameter.....	44
3.2.2.1. Paarvergleich Forcierte Vitalkapazität FVC .....	45
3.2.2.2. Paarvergleich Einsekundenkapazität FEV1 .....	45
<b>3.3. Zusammenhang zwischen klein. Zustand und der Adhäsionsstärke von <i>P. aeruginosa</i>.....</b>	<b>45</b>
3.3.1. Zusammenhang zwischen FVC und der Adhäsion von <i>P. aeruginosa</i> .....	46
3.3.2. Zusammenhang zwischen FEV1 und der Adhäsion von <i>P. aeruginosa</i> .....	47
3.3.3. Zusammenhang zwischen den konkordanten klein. Verläufen und der Adhäsion von <i>P. a</i> .....	48

3.3.4. Zusammenhang zwischen den diskordanten klin. Verläufen und der Adhäsion von <i>P.a.</i> .....	49
3.3.5. Zusammenhang zwischen der Anzahl der <i>P. aeruginosa</i> Stämme und der Lungenfunktion .....	49
3.3.6. Zusammenhang zwischen Längensollgewicht und Adhäsion von <i>P. aeruginosa</i> .....	51
3.3.7. Zusammenhang zwischen der Anzahl der <i>P. a.</i> Stämme und dem Längensollgewicht .....	52
<b>3.4. Zusammenhang zwischen Längensollgewicht und Lungenfunktionsparametern.....</b>	<b>53</b>
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>55</b>
4.1. Diskussion der Methodik.....	55
4.2. Auswahl der klinischen Beobachtungsparameter.....	56
4.3. Diskussion der Ergebnisse .....	57
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>65</b>
<b>6. DANKSAGUNG .....</b>	<b>92</b>
<b>7. LEBENSLAUF .....</b>	<b>93</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A549	Pneumozyten Typ II Zelllinie
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
ABPA	Allergische bronchopulmonale Aspergillose (engl. Allergic bronchopulmonary aspergillosis)
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BMI	Body Mass Index
BSA	Rinder-Serum-Albumin (bovine serum albumin)
BT	Bismuth-thiol
°C	Grad Celsius
Ca	Carcinom
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
CF	Zystische Fibrose (engl. Cystic fibrosis)
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
cfu	Colony forming units (Koloniebildende Einheiten)
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CON-	konkordant negativ
CON+	konkordant positiv
DIS	diskordant
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
E. coli	Escherischia coli
eds.	editors (Herausgeber)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et altera (lateinisch: und andere)
ExA	Exotoxin A
FEV1	Forciertes expiratorisches Volumen in 1 Sekunde
FITC	Fluoreszein-Iso-Thio-Cyanat
FP	Fluoreszenzmikroskop
FVC	Forcierte Vitalkapazität
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
h	Stunde

H <sup>+</sup>	Wasserstoffionen
HBSS	Hanks´ balanced salt W/O Phenol red
<i>H. influenza</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
HHU	Heinrich-Heine-Universität
HSP	heparan sulphate proteoglycane
IATS	International Antigenic Typing System
IgA	Immunglobulin A
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
kg	Kilogramm
l	Liter
LB	Luria Broth
L-	links-konfiguriert
LPS	Lipopolysaccharid
LSG	Längensollgewicht
µg	Mikrogramm
M	mol/Liter
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimol
mmol/l	millimol/Liter
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PAO1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain one
PEG	Perkutane endoskopische Gastrotomie
pO <sub>2</sub>	Sauerstoff-Partialdruck
<i>P. a.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. cepacia</i>	<i>Pseudomonas cepacia</i>

<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
rpm	Rotations per minute (Umdrehung pro Minute)
RSV	respiratorisches Syncytial Virus
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
sec	Sekunde
slgA	sekretorisches (aktives) Immunglobulin A
UKD	Universitätsklinikum Düsseldorf
Upm	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
vs.	versus
wfh%	weight predicted for height (Einheit für Längensollgewicht)



## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1:	Schem. Darstellung des für die Zystische Fibrose analysierten Genproduktes CFTR .....	3
Abb. 2:	Altersabhängigkeit der Prävalenz CF-relevanter bakterieller Erreger .....	8
Abb. 3:	Bakterielle Erreger der tieferen Atemwege von CF-Patienten kurz vor dem Tod .....	9
Abb. 4:	Drei-Ösenausstrich von <i>P. aeruginosa</i> auf einer Agarplatte .....	14
Abb. 5:	konfluente A549 unter Auflichtmikroskopie .....	25
Abb. 6:	Zwilling- und Geschwisterverteilung .....	26
Abb. 7:	RFLP von <i>P. aeruginosa</i> -Isolaten eines CF-Patienten .....	27
Abb. 8:	Anzahl unterschiedlicher <i>P. aeruginosa</i> Stämme der Gesamtgruppe.....	28
Abb. 9:	schwach adhärierende <i>Pseudomonas aeruginosa</i> an A549 .....	30
Abb. 10:	stark adhärierende <i>Pseudomonas aeruginosa</i> an A549 .....	30
Abb. 11:	Graphische Darstellung der Verteilung der Adhäsionsstärke von <i>P. aeruginosa</i> .....	35
Abb. 12:	Adhäsion von <i>P. aeruginosa</i> in der Gesamtgruppe.....	35
Abb. 13:	Graphische Darstellung der Adhäsion von <i>P. aeruginosa</i> im Geschwistervergleich .....	37
Abb. 14:	Adhäsionen von <i>P. aeruginosa</i> innerhalb der monozygoten Zwillingspaare.....	38
Abb. 15:	Zusammenhang Adhäsion von <i>P. aeruginosa</i> und Lungenfunktion.....	39
Abb. 16:	Adhäsionen von <i>P. aeruginosa</i> innerhalb der dizygoten Zwillingspaare und Geschwister.	41
Abb. 17:	Verteilung der FVC in % der Gesamtgruppe .....	44
Abb. 18:	Verteilung der FEV1 in % der Gesamtgruppe .....	44
Abb. 19:	Streuung von FVC nach Adhäsionsstärke .....	46
Abb. 20:	Streuung von FEV1 nach Adhäsionsstärke.....	47
Abb. 21:	Streuung von FVC nach Anzahl unterschiedlicher <i>P. aeruginosa</i> Stämme.....	50
Abb. 22:	Streuung von FEV1 nach Anzahl unterschiedlicher <i>P. aeruginosa</i> Stämme .....	50
Abb. 23:	Adhäsion von <i>P. aeruginosa</i> nach Längensollgewicht .....	52
Abb. 24:	Anzahl unterschiedlicher <i>P. aeruginosa</i> Stämme nach Längensollgewicht .....	53
Abb. 25:	Streuung von FVC und FEV1 nach Längensollgewicht .....	54
Abb. 26:	Verteilung der Proben auf die Quartile.....	59
Tabelle 1:	Unterschiede zwischen den <i>P. aeruginosa</i> Isolaten der einzelnen Geschwisterpaare .	42
Tabelle 2:	Lungenfunktionsparameter der Gesamtgruppe .....	43
Tabelle 3:	Längensollgewicht der Gesamtgruppe.....	51
Tabelle 4:	Verteilung der Quartile für die Adhäsion von <i>P. aeruginosa</i> .....	58

## 1. EINLEITUNG

### 1.1. Die Zystische Fibrose

Die Zystische Fibrose (CF), im deutschen Sprachraum auch Mukoviszidose genannt, ist die häufigste angeborene autosomal rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung der weißen Bevölkerung [Levis 1995, Andersen 1946]. Sie wurde 1936 erstmals von Fanconi beschrieben [Fanconi 1936].

Die Zystische Fibrose zeigt in Abhängigkeit der ethnischen Herkunft eine variable Erkrankungshäufigkeit. So sind in der kaukasischen Bevölkerung etwa 1/2500 Lebendgeburten betroffen, im Vergleich dazu nur 1/17000 in der afro-amerikanischen Bevölkerung [Welsh et al. 1995].

Bis heute gilt die Zystische Fibrose als unheilbare Erkrankung mit tödlichem Verlauf. In den letzten zwei Jahrzehnten ist die Lebenserwartung der CF-Patienten stark angestiegen. Nach Angaben des europäischen CF-Registers lag die mittlere Lebenserwartung 1999 bereits bei 31,4 Jahren [Ramsey 1996, Koch und Hoiby 1993], während sie 1974 noch bei 14 Jahren und 1949 unter einem Jahr lag [Gilligan 1991].

Die kontinuierlichen epidemiologischen Veränderungen der Zystischen Fibrose sind hauptsächlich auf folgende Aspekte zurückzuführen:

- ? verbessertes Verständnis der Pathophysiologie
- ? verbesserte Pankreasenzymsubstitution und somit verbesserte Verwertung von hochkalorischer Nahrung
- ? Fortschritte in der antibiotischen Therapie.

Das zu behandelnde Patientenkollektiv hat sich demnach verändert: Handelte es sich früher bei der Zystischen Fibrose fast ausschließlich um eine pädiatrische Erkrankung, erreichen heute bereits ein Drittel der Patienten das Erwachsenenalter [FitzSimmons 1993].

Die Ausprägung der Zystischen Fibrose in den einzelnen Organsystemen ist sehr unterschiedlich. Sowohl die Anzahl der betroffenen Organe als auch der Schweregrad der Symptomatik kann von Patient zu Patient stark variieren.

### 1.1.1. Diagnostik der Zystischen Fibrose

Der Verdacht auf das Vorliegen einer Zystischen Fibrose kann auf klinische Symptome oder Risiken in der Anamnese gegründet sein. Mekoniumileus, chronische Lungenentzündungen und gastrointestinale Beschwerden, die zu Malabsorption und zu mangelndem Ernährungszustand führen, sind die wichtigsten Symptome, die an eine Zystische Fibrose denken lassen.

Charakteristisch ist eine erhöhte Konzentration der Elektrolyte Natrium und Chlorid im Schweiß der Patienten. Bereits in volkstümlichen Berichten aus dem 18./19. Jahrhundert wurden „Kinder, die salzig schmeckten und früh verstarben“ beobachtet.

Seit 1959 wird diese Symptomatik diagnostisch durch den „Pilocarpin-Iontophorese-Schweiß-Test“ nach Gibson und Cooke genutzt [Gibson und Cooke 1959]. Bis heute stellt dieser Test den Goldstandard in der Diagnostik der Zystischen Fibrose dar [Stern 1997]. Pathognomonisch für die Zystische Fibrose sind Chloridwerte im Schweiß von mehr als 60 mmol/l (Nomwert: 20-40 mmol/l). In Grenzfällen hat sich neben der genetischen Diagnostik die nasale Potentialdifferenzmessung (PD-Messung) in spezialisierten CF-Zentren etabliert [Knowles et al. 1995, Alton et al. 1990].

Der früher als Suchtest eingesetzte Albumintest (BM-Test), bei dem die Albuminkonzentration im Mekonium bestimmt wurde, ist durch den IRT-Test, einer radioimmunologischen Bestimmung des Trypsin im Blut von Neugeborenen, ersetzt worden [Lyczak et al. 2002]. Dieser Test ist nicht im routinemäßig durchgeführten Neugeborenencreening enthalten.

Durch eine Pränataldiagnostik im Sinne einer Chorionzottenbiopsie in der 10.-12. Schwangerschaftswoche oder einer Amniozentese in der 16. Schwangerschaftswoche lassen sich mit Hilfe einer DNA-Typisierung die am häufigsten betroffenen Genloci untersuchen. Die pränatale Diagnostik ist immer dann zu erwägen, wenn in einer Familie bereits ein krankes Kind vorhanden ist. Eine besondere, aber voraussichtlich in Zukunft häufiger vorkommende, Indikation besteht bei Kinderwunsch einer an Zystischer Fibrose erkrankten Frau.

### 1.1.2. Allgemeine Pathophysiologie der Zystischen Fibrose

Die Zystische Fibrose wird durch Mutation im „Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ (CFTR) Gen ausgelöst [Kerem et al. 1989]. Das auf dem langen Arm des Chromosoms 7 (7q31.2) gelegene CFTR Gen setzt sich aus einer Kette von 1480 Aminosäuren zusammen und besteht aus fünf Domänen: zwei membranüberspannenden Segmenten, zwei zytosolischen Segmenten (NBF1, NBF2) und einer regulatorischen R Domäne (Abb. 1) [Riordan et al. 1989, Tsui et al. 1985].

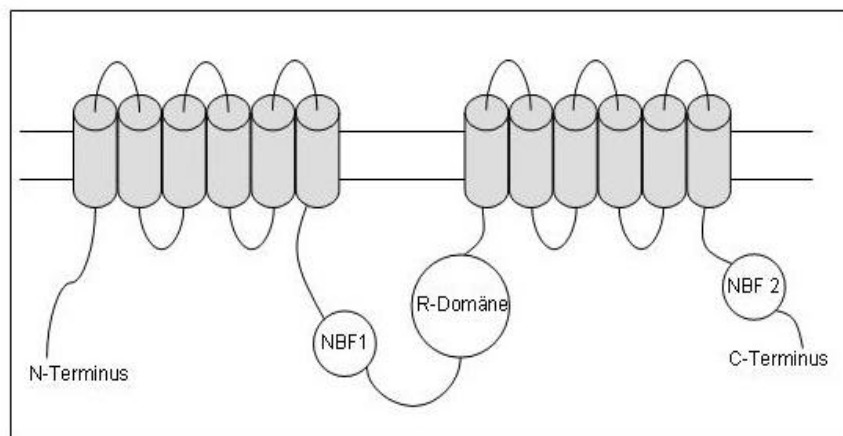


Abb. 1: Schematische Darstellung des für die Zystische Fibrose analysierten Genproduktes CFTR [aus Ringe und Petsko 1990]

CFTR ist ein signalgesteuerter Chloridkanal, der in die Regulation des epithelialen Ionentransports eingreift [Lyczak et al. 2002, Chroneos et al. 2000, Welsh et al. 1995, Bear et al. 1992, Anderson et al. 1991, Cheng et al. 1991, Rommens et al. 1989].

Die Funktionsstörung des CFTR bewirkt eine verminderte Wasser- und Natriumsekretion in das Drüsenlumen [Tsui 1991]. Die Folge ist eine Zunahme der Viskosität exokriner Sekrete, welche die Funktion der Organsysteme, vor allem an der Epitheloberfläche des Respirations- und Gastrointestinaltraktes, beeinträchtigt. Zudem führt diese Funktionsstörung zu einer veränderten Elektrolytkonzentration im Schweiß.

Bis heute sind mehr als 1200 verschiedene Mutationen bekannt, die zu dem oben genannten genetischen Defekt auf dem Chromosom 7 führen. Die delta F508 ist die häufigste Mutation im CFTR-Gen, die bei fast 70% der CF-Patienten in Westeuropa und den USA vorliegt. Eine Deletion von drei Basenpaaren in Exon 10, die zu einem Verlust von Phenylalanin in der Position 508 des CFTR Proteins führt, ist dafür verantwortlich [Tsui 1992, Kerem et al. 1989, Riordan et al. 1989]. Etwa die Hälfte aller CF-Patienten in Nordamerika und Europa sind homozygot für die delta F508 Mutation.

Die CF-Mutationen lassen sich in sechs Klassen einordnen:

Klasse I: CFTR-Proteinsynthese fehlt oder ist gestört

Klasse II: Reifung und Transport des CFTR-Proteins in der Zelle sind gestört

Klasse III: Regulation des CFTR Ionenkanals ist defekt

Klasse IV: Störungen in der Ionenleitfähigkeit des CFTR Kanals

Klasse V: Störungen der Wechselwirkungen mit anderen Proteinen

Klasse VI: CFTR Konzentration in der Zelle ist vermindert.

Patienten mit zwei Mutationen aus den Klassen I, II oder III zeigen das klassische Krankheitsbild der Zystischen Fibrose mit gastrointestinalem und pulmonalem Befall. Patienten mit mindestens einer CFTR Mutation der Klassen IV, V oder VI sind zumindest bis zum Schulkindalter pankreassuffizient. Einige Mutationen der Klasse IV,

V oder VI sind mit einem benignen oder aberranten Verlauf der Zystischen Fibrose assoziiert.

### 1.1.3. Spezielle Pathophysiologie der Lunge bei der Zystischen Fibrose

Bei einem CF-Neugeborenen weist die Lunge zunächst keine morphologischen Schäden auf [Khan et al. 1995]. Der genetisch determinierte CF-Basisdefekt ist für die Produktion eines hochviskösen Sekrets verantwortlich, woraus eine Neigung zur Inflammation und Infektion resultiert. Im Verlauf der Erkrankung führt dies auch schon vor klinischen Symptomen [Abman et al. 1992] zu einer Destruktion des Lungengewebes und zu Veränderungen im Bronchialsystem [Dinwiddie 2000].

Im Vordergrund der durch den Krankheitsprozess entstandenen Ventilationsstörung steht die bronchiale Obstruktion. Diese beginnt in der Peripherie und überträgt sich auf die großen Bronchien mit Fortschreiten des Krankheitsprozesses [Oppenheimer und Esterley 1975]. Die morphologischen Veränderungen bestehen wie bei einer chronisch obstruktiven Bronchitis aus einer Verlegung des Bronchiallumens durch zähen Schleim, einer entzündlichen Infiltration der Submukosa und narbiger Verziehung der peripheren Atemwege.

Zusätzlich kann die bronchiale Obstruktion durch die Hyperreagibilität des Bronchialsystems verstärkt werden, so dass eine Konstriktion der hypertrophierten glatten Muskulatur, als Folge einer allergischen Reaktion auf ein Allergen (wie z.B. auf *Aspergillus fumigatus* bei einer ABPA), auftreten kann. Eine kontinuierlich fortschreitende bronchiale Obstruktion auf dem Boden rezidivierender bzw. chronischer Infektionen, trägt zu einer Parenchymdestruktion mit Lungenemphysembildung bei.

Chronische bronchopulmonale Entzündungen mit einer gestörten mukoziliären Clearance führen bei CF-Patienten häufig zur Entstehung diffuser Bronchiektasen.

Bei einem kleinen Teil der CF-Patienten kommt es neben der Obstruktion zu einer restriktiven Ventilationsstörung, die eher als sekundäre Folge verschiedener krankheitsbedingter Komplikationen (auch extrapulmonal) und nicht als primäre Veränderung zu erklären ist.

Die Kombination von Sekretstase, Minderbelüftung und den daraus resultierenden pathologischen Veränderungen der Epithelien, fördert virale und vor allem bakterielle Infektionen [Rosenfeld und Ramsey 1992]. Daraus resultieren weitere Epithelschäden [Lyczak et al. 2002], die ihrerseits zum Auftreten neuer Kolonisationen und damit zu einer Chronifizierung führen.

CFTR selbst scheint ein wichtiger Rezeptor bei der bakteriellen Invasion via Endozytose zu sein [Derichs et al. 2004, Pier 2000, Pier et al. 1996] und somit proinflammatorische Wirkung zu besitzen [Davies 2002].

Anhand der untersuchten Entzündungsparameter (Anreicherung neutrophiler Granulozyten, Immunglobulinen, Interleukin-8 und Arachidonsäure) [Freedman et al. 2004, Armstrong et al. 1995] konnte festgestellt werden, dass die beschriebenen Entzündungsreaktionen bereits innerhalb der ersten vier Lebensmonate stattfinden [Khan et al. 1995]. Zusätzlich wird das Lungengewebe durch bakterielle Virulenzfaktoren und durch frustrane Abwehr des Immunsystems aus zerfallenden Leukozyten, welche massenhaft Elastase freisetzen, geschädigt [Elborn und Schale 1990].

#### **1.1.4. „Mikrobiologie“ der Zystischen Fibrose**

Die besondere Konsistenz und Zusammensetzung des Bronchialsekretes bei der Zystischen Fibrose, sowie die Störung der mukoziliären Clearance, sind prädisponierende Faktoren für bakterielle Infektionen [Smith et al. 1996, Govan 1992]. Kennzeichnend ist ein viskös-schleimiges, oft grünes, purulentes Sputum [Pamsey 1996].

Typisch für die Zystische Fibrose ist das Überwiegen bakterieller Infektionen in der Lunge. Eine dänische Studie konnte in 63% bakterielle und in nur 6% virale Infektionen bei einer akuten Exazerbation nachweisen [Pedersen et al. 1981].

Außerhalb des Respirationstraktes haben CF-Patienten keine erhöhte Infektneigung [Hoiby 1977].

### 1.1.5. Viren

Die sich hauptsächlich auf den Respirationstrakt auswirkenden Viren, wie Influenza A und B, Parainfluenza 1 und 3, Rhinoviren, Adenoviren und besonders das respiratorische-Syncytial-Virus (RSV), spielen als Verursacher akuter Exazerbationen eine untergeordnete Rolle [Prober 1991, Pedersen et al. 1981]. Insbesondere im Kleinkindesalter gelten sie als Wegbereiter für bakterielle Superinfektionen. Durch virale Vorschädigung des Respirationstraktes kann dieser leichter von Bakterien besiedelt werden [Conway et al. 1992, Johansen et al. 1992, Abman et al. 1991]. Dies zeigt sich vor allem bei der häufigen Entwicklung einer chronischen *Pseudomonas aeruginosa* Infektion der CF-Patienten nach einer RSV Besiedelung [Johansen und Hoiby 1992, Pedersen et al. 1981].

### 1.1.6. Pilze

*Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* und gelegentlich *Exophiala dermatidis* sind die häufigsten Pilzarten, die im Atemtrakt von CF-Patienten gefunden werden [Blaschke-Hellmessen et al. 1991, Haase et al. 1991]. Bei älteren Kindern und jungen Erwachsenen stellt die „allergische, bronchopulmonale Aspergillose (ABPA)“ eine besondere Komplikation bei Infektionen mit *Aspergillus fumigatus* dar [Mussaffi et al. 2000, Paul et al. 1996, Schürmann und Reinhardt 1996].



### 1.1.7. Bakterien

Für das Fortschreiten der pathologischen Lungenveränderungen sind hauptsächlich Bakterien verantwortlich [Gilligan 1991, Govan 1990]. Sie zeigen bei der Zystischen Fibrose eine charakteristische Altersabhängigkeit:

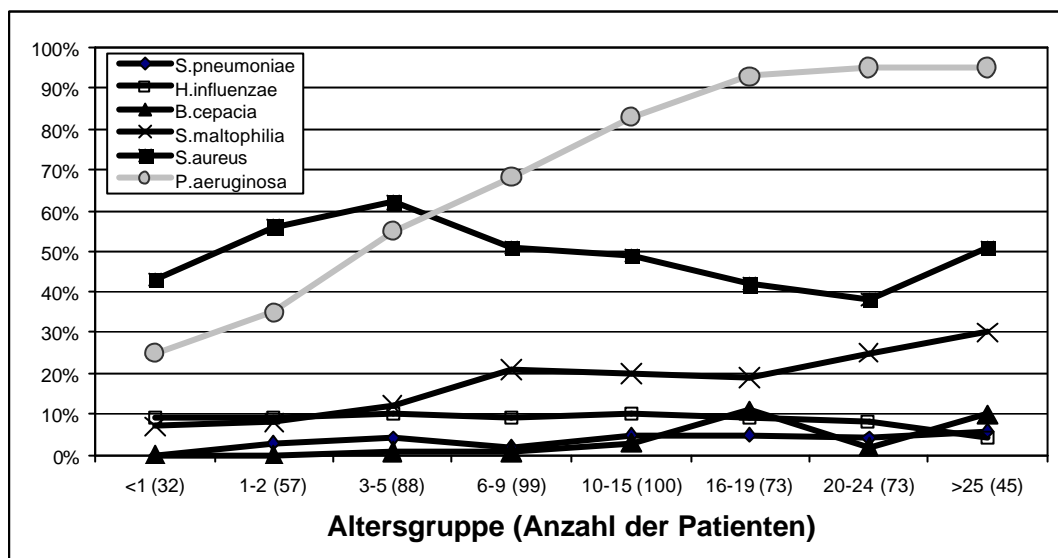


Abb. 2: Altersabhängigkeit der Prävalenz CF-relevanter bakterieller Erreger [aus Bauernfeind und Przyklenk 1997]

In den ersten Lebensjahren werden pulmonale Infektionen mit *Haemophilus influenzae Typ B*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Burkholderia cepacia* beobachtet (Abb. 2). Nach dem fünften Lebensjahr dominieren die Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* [Pedersen 1992]. Keime, die ebenfalls häufig zu finden sind: *Stenotrophomonas maltophilia*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* sowie *Proteus spezie* [Pedersen et al. 1986, Hoiby 1982 und 1974].

Studien aus dem Jahre 1946 zeigen noch eine niedrige Prävalenz für Infektionen durch *Pseudomonas aeruginosa* [diSant'Agnes und Anderson 1946]. Seitdem ist ein stetiger Anstieg von Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* und *Staph. aureus* zu verzeichnen (Abb. 3) [Govan 1990, Pier 1985].

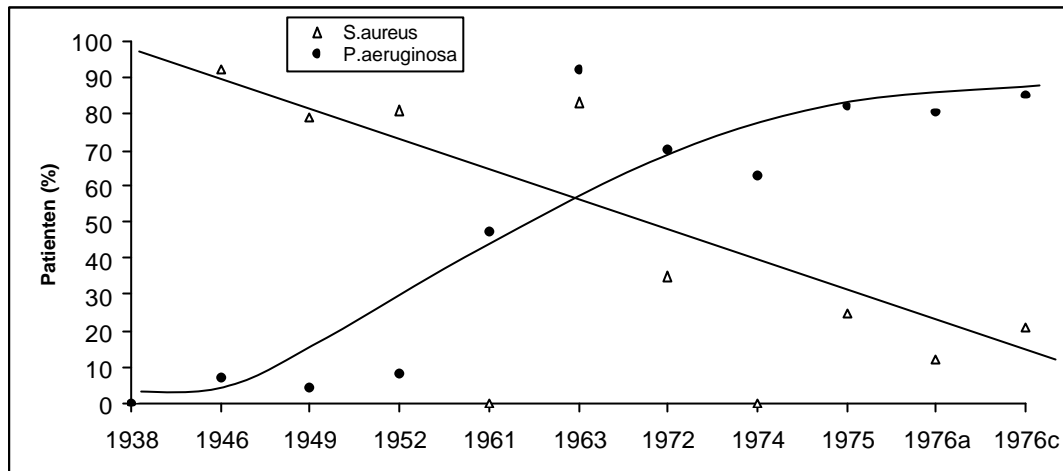


Abb. 3: Bakterielle Erreger der tieferen Atemwege von CF-Patienten kurz vor dem Tod oder nach Autopsie [Hoiby 1982]

#### 1.1.7.1. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* ist ein grampositives Kugelbakterium, welches typischerweise bei Infektionen der Haut und Hautanhangsgebilde zur klassischen Abszessbildung führt. Ausgehend von großen Furunkeln kann es zur Osteomyelitis oder zur Infektion innerer Organe mit septischen Krankheitsbildern kommen. *S. aureus* ist einer der Hauptverursacher von nosokomialen Infektionen und bei 50% der CF-Patienten besiedelt er in den ersten Lebensjahren den Bronchialtrakt (Abb. 2) [Gilligan 1991]. Vor dem Einsatz suffizienter Antibiotikatherapien verstarben mehr als 90% der CF-Patienten in sehr jungen Jahren an respiratorischen *S. aureus* Infektionen [Gilligan 1991, Andersen 1938]. Aufgrund der stetigen Weiterentwicklung der antibiotischen Therapeutika spielen die *S. aureus* Infektionen heutzutage keine entscheidende Rolle in der Mortalität, sondern vielmehr in der fortschreitenden pulmonalen Verschlechterung von CF-Patienten [Govan und Nelson 1992, Döhring et al. 1990]. Ähnlich wie bei viralen Infektionen können sie zu einer Schädigung des Lungengewebes führen, welche die Besiedelung u.a. mit *Pseudomonas aeruginosa* begünstigt [Hoiby 1982]. Diese Kombination von *S. aureus* und *Pseudomonas*

*aeruginosa* konnte regelmäßig bei Patienten mit schlechtem klinischen Allgemeinzustand nachgewiesen werden [Hudson et al. 1993].

#### **1.1.7.2. *Haemophilus influenzae***

*Haemophilus influenzae* gehört zur physiologischen Flora des oberen Respirationstraktes. Bekapselte Stämme vom Typ B sind vor allem bei Kindern als Verursacher invasiver Infektionen, wie Meningitiden bekannt. Bei CF-Patienten lassen sich überwiegend nichtbekapselte Stämme nachweisen. *Haemophilus influenzae* gilt als möglicher Verursacher akuter Exazerbationen chronischer Lungenerkrankungen bei CF-Patienten [Pedersen 1992].

#### **1.1.7.3. *Burkholderia cepacia***

*Burkholderia cepacia* (früher: *Pseudomonas cepacia* [Govan und Deretic 1996]) findet sich selten als Erreger nosokomialer Infektionen. Im Verlauf der letzten 20 Jahre zeigte der Keim vor allem bei älteren CF-Patienten eine endemische Zunahme [Hoiby 1982]. Im Vergleich zu *Pseudomonas aeruginosa* ist seine Prävalenz insgesamt niedriger [FitzSimmons 1993]. Die CF-Patienten mit einer *Burkholderia cepacia* Infektion zeigen neben asymptomatischen Verläufen (chronische Träger), Verläufe mit langsam fortschreitender Verschlechterung und zum Teil letalem Ausgang (*B. cepacia*-Syndrom) [Nelson et al. 1991]. Die Kombination von *Burkholderia cepacia* und *Pseudomonas aeruginosa* ist zur Interaktion fähig und bildet Biofilme in den Lungen von CF-Patienten [Eberl et al. 2004].

### **1.1.8. Die gastrointestinale Manifestation bei der Zystischen Fibrose**

Die Zystische Fibrose geht typischerweise mit gastrointestinalen Symptomen wie Funktionsstörungen von Leber, Pankreas und Darm einher. Durch die abnorm zähen Sekrete kommt es im Pankreas zu einer Verlegung der Ausführungsgänge und folgend zu ihrer zystischen Erweiterung. Die pankreasspezifischen Verdauungsenzyme gelangen nicht in das Duodenallumen, was Maldigestion, Malabsorption, Steatorrhoe und Gedeihstörungen zur Folge hat. Ebenso kann es wegen des nachfolgenden Unterganges von endokrinem Pankreasgewebe zur Entwicklung eines Diabetes mellitus kommen. Durch Rückstau der ebenfalls eingedickten Galle entsteht eine biliäre Zirrhose mit deren Folgeerscheinungen. Ein Mekoniumileus tritt bei 5-10% der CF-Patienten in den ersten Lebenstagen als typische Erstmanifestation auf [Sheppard 1995]. Bei einem Teil der Patienten führt der hochvisköse Darmschleim zum intestinalen Obstruktionssyndrom, zur Darminvagination oder zum sekundären Rektumprolaps.

### **1.1.9. Weitere Manifestationsorte der Zystischen Fibrose**

Auch in den Geschlechtsorganen wird ein hochvisköses Sekret gebildet. Bei männlichen CF-Patienten führt dies zu einer Obliteration des Ductus deferens.

Eine Azoospermie und konsekutive Infertilität sind die Folge. Bei Frauen kann die Veränderung des Zervixschleims die Fertilität ebenfalls herabsetzen.

Die abnorme Schweißproduktion mit hohen Natriumchloridmengen kann bei Anstrengung und größerer Hitze zu einer schweren hypotonen Dehydratation mit resultierender metabolischer Alkalose und prärenalem Nierenversagen führen.

## 1.2. *Pseudomonas aeruginosa*

### 1.2.1. Geschichtliches

Bereits 1786 versuchte Otto Friedrich Müller aus Kopenhagen eine Bakteriensystematik mit wissenschaftlicher Nomenklatur zu schaffen. Dabei unterschied er zwischen beweglichen Mikroben, die er als „Zittertierchen“ oder Vibriones bezeichnete und unbeweglichen „Urkörperchen“ oder Monaden.

Ende des 19. Jahrhunderts erkannte man, dass es bewegliche Stäbchenbakterien gab, die nicht in das Schema der Vibrionen einzuordnen waren. Es handelte sich vielmehr um „falsche, weil bewegliche, Urkörperchen“, also Pseudo-Monaden.

*Pseudomonas aeruginosa* ist der Verursacher des blaugrünen Wundeiters. Die grünspanartige Verfärbung der Wundverbände (aeruginosus = grünspanartig) war namensgebend. 1882 gelang Gessard die erste Reinkultur.

### 1.2.2. Allgemeines - Definition

*Pseudomonas aeruginosa* ist ein gramnegatives, nicht sporenbildendes Stäbchenbakterium, welches meist leicht gebogen ist und ubiquitär in Wasser sowie im Boden vorkommt. Es ist durch eine oder mehrere polar angeordnete Geißeln beweglich [Vasil 1986].

Pseudomonaden sind obligate Aerobier, die zur Abdeckung ihres Energiebedarfs Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor benötigen. Die Keime weisen eine hohe natürliche Antibiotikaresistenz auf und sind bezüglich ihrer Umwelt anspruchslos. *Pseudomonas aeruginosa* ist ein häufiger und gefürchteter Erreger nosokomialer Infektionen.

Des Weiteren findet man *Pseudomonas aeruginosa* bei Patienten mit folgenden Erkrankungen [Tredgett et al. 1990]:

- ? chronisch obstruktive Bronchitis anderer Ursache (z.B. Immotiles Zilien Syndrom),
- ? Infektionen der Respirationsorgane durch kontaminierte Inhalationsgeräte oder Klimaanlage,
- ? Otitis media durch Besuche in nicht gechlorten Schwimmbädern,
- ? Infektionen von postoperativen Wunden und Brandwunden,
- ? rezidivierende Harnwegsinfektionen.

Die *Pseudomonas aeruginosa* Infektion ist nicht spezifisch für die Zystische Fibrose, aber sie kommt bei dieser Erkrankung häufiger als bei anderen chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen vor. Sie wird bei der Zystischen Fibrose mit einer Prävalenz von 25% unterhalb des ersten Lebensjahres und im Erwachsenenalter über 80% angegeben [Govan et al 1996, Koch et al. 1993, Pedersen 1992]. Die Inzidenz beträgt in Deutschland sowie in Europa 8% [Döring 1998].

### **1.2.3. Morphologie**

Die Kolonien von *Pseudomonas aeruginosa* sind typischerweise flach, unregelmäßig begrenzt, im Randbereich gezähnt, metallisch glänzend und durch Pigmente (z.B. Pyocyanin) gefärbt (Abb. 4). Sie weisen einen eindringlichen süßlich-aromatischen Geruch auf. *Pseudomonas aeruginosa* bildet auf bluthaltigen Nährböden in der Regel eine Beta-Hämolyse aus [Johnson und Boese-Marrazzo 1980].

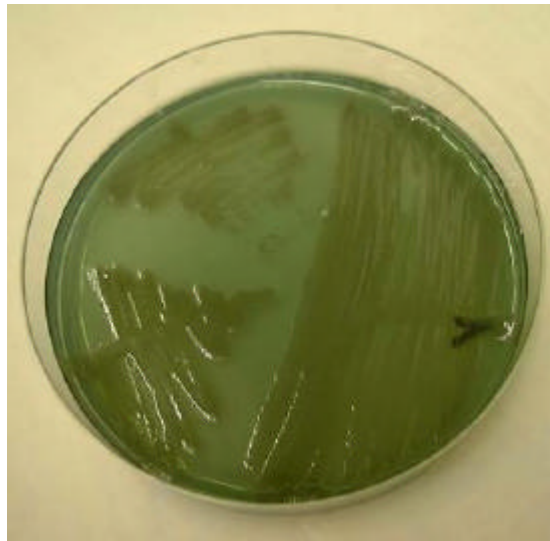


Abb. 4: Drei-Ösenausstrich von *P. aeruginosa* auf einer Agarplatte

#### 1.2.4. *Pseudomonas aeruginosa* bei der Zystischen Fibrose

Ausgangspunkt intensiver Forschung sind die Beobachtungen, dass *Pseudomonas aeruginosa* bei der Zystischen Fibrose ab einem bestimmten Alter der vorherrschende Keim ist (Abb. 2). Eine Vorschädigung des Epithels durch virale und andere bakterielle Infektionen führt zu einer erhöhten Prävalenz von *Pseudomonas aeruginosa* [Pedersen 1992, Prober 1991]. Nach Besiedelung der tiefen Atemwege ist er selbst durch intensivste Antibiotikatherapie nicht mehr zu eliminieren. Dies führt zu der für die Zystische Fibrose typischen Chronifizierung der Infektion mit diesem Erreger [Davies 2003, Le Bourgeois 2003, Di Martino 2001, Di Martino et al. 2000, Hoiby 1982].

Des Weiteren wurde festgestellt, dass bei Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* andere bakterielle Keime fehlen. Dies liegt an der Fähigkeit von *Pseudomonas aeruginosa*, Substanzen wie Pyocyanin zu synthetisieren, die das Wachstum anderer Bakterien inhibieren [Machan et al. 1991].

Die Erstinfektion mit *Pseudomonas aeruginosa* erfolgt häufig durch Klinikaufenthalte in CF-Zentren und Rehabilitationseinrichtungen oder durch Kontakte mit erkrankten Geschwistern [Jensen et al. 1997, Renders et al. 1997, Tümmler et al. 1997, Govan et al. 1992, Zimakoff et al. 1983].

CF-Patienten bleiben im Regelfall über viele Jahre von demselben *Pseudomonas aeruginosa*-Stamm besiedelt [Römling et al. 1994, Tredgett et al. 1992, Horrevorts et al. 1990, Ojenyi et al. 1990].

### **1.2.5. Adhäsion von *P. aeruginosa* und dessen Bedeutung in der Pathophysiologie der Lungenschädigung**

Bei *in vitro* Versuchen ließ sich eine erhöhte Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* sowohl an den Rezeptoren im Bronchialschleim [Dealer et al. 1992] als auch an „nackten Epithelzellen“ des respiratorischen Epithels von CF-Patienten nachweisen [Imundo et al. 1995, Zar et al. 1995, Cervin et al. 1994]. Dies ist in Publikationen für Typ II Alveolarepithelzellen A549, verschiedene Bronchialepithelzelllinien sowie für nicht respiratorisches Epithel beschrieben [Davies et al. 2001, Fleiszig et al. 2001, Jendrossek et al. 2001, Ratner et al. 2001, Garrity-Ryan et al. 2000].

In Inokulationsversuchen siedelte sich *Pseudomonas aeruginosa* besonders auf krankhaft verändertem respiratorischem Epithel an und war hochaffin gegenüber Mukus [Hoiby 1998, Tsang et al. 1994, Koch et al. 1993, Nelson et al. 1990].

Dieser Mukus befindet sich diskontinuierlich auf dem respiratorischen Epithel, hauptsächlich in der Trachea und in den Bronchien. Unter anderem befinden sich dort auf der Oberfläche Defensine, die gegenüber Bakterien, Viren und Pilzen toxisch sind, indem sie in deren Zellmembran inserieren und diese dadurch permeabel machen. Diese antimikrobielle Wirksamkeit der Defensine scheint von der Salzkonzentration des Umgebungsmilieus abhängig zu sein, denn bei höheren NaCl-Konzentrationen im Sekret der CF-Patienten wird diese Aktivität entscheidend inhibiert [Smith et al. 1996]. Eine Restfunktion der Chloridsekretion schützt nicht vor einer *Pseudomonas aeruginosa* – Infektion, so dass neben den CFTR-assoziierten Fakto-



ren andere Faktoren den Zeitpunkt der Infektion mitbestimmen müssen [Derichs et al. 2004].

Die pulmonale Manifestation der Zystischen Fibrose ist zum Teil auf die Aktivierung neutrophiler Granulozyten und Alveolarmakrophagen zurückzuführen. Die Persistenz von Erregern (*P. aeruginosa*) oder häufige Reinfektionen (*S. aureus*) führen zu einem ständigen Einstrom phagozytischer Zellen in die Lunge. Folge sind frustrane Phagozytoseversuche [Döring et al. 1995]. Weiter werden neutrophile Granulozyten chemotaktisch stimuliert, sowie das Komplementsystem und weitere immunologische Abwehrsysteme aktiviert [Kharazmi et al. 1986]. Durch Überwiegen proinflammatorischer Substanzen kommt es zu nachfolgenden Gewebsschädigungen; eine besondere Stellung hat dabei die Neutrophilenelastase [Pedersen et al. 1992].

Der Übergang zur chronischen *Pseudomonas aeruginosa*-Infektion ist variabel [FitzSimmons 1993] und führt bei CF-Patienten zu einer starken spezifischen Antikörperproduktion gegen die im Weiteren erläuterten Antigene [Fomsgaard 1998, Hoiby 1998, Kronborg 1995].

### **1.2.6. Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa***

Bei Betrachtung der immunologischen Ebene wird deutlich, dass das menschliche Immunsystem eine Reihe von *Pseudomonas* Antigenen erkennt und entsprechende Antikörper bilden kann (z.B. Lipopolysaccharide, Exotoxin A und Alginate).

Diese Virulenzfaktoren ermöglichen das Durchbrechen der Abwehr und damit das Zustandekommen einer Infektion mit resultierenden Schäden an den Wirtszellen. Virulenz ist zumeist multifaktoriell und das Ergebnis der Wechselwirkung von erreger- und wirtseitigen Faktoren. Eine wesentliche pathogenetische Funktion von *Pseudomonas aeruginosa* bei der Zystischen Fibrose ist seine Fähigkeit zu fester und dauerhafter Bindung.

Die bakterielle Adhäsion an den Oberflächenrezeptoren des respiratorischen Epithels stellt den ersten Schritt der Infektion dar. Als Adhäsine an die Epithelzellen der Trachea, des Oropharynx oder an den Schleim der Atemwege gelten Pili [Marcus et al. 1989, Russell et al. 1989], Flagellen [Feldman 1998], Geißeln [Feldman et al.

1998], Exoenzym S [Baker et al. 1991, Albus 1989] sowie Lipopolysaccharide [Gupta et al. 1994]. Auf dieses Molekül wird wegen seiner Bedeutung für die Adhäsion im Folgenden näher eingegangen [Hoiby 1995].

Lediglich das Polysaccharid Dextran und wenige Antibiotika, wie z.B. Azithromycin, haben einen Effekt auf die Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* [Baumann et al. 2001, Barghouthi et al. 1996].

### 1.2.6.1. Lipopolysaccharide

Lipopolysaccharide, auch Endotoxine genannt, sind Moleküle, die fest an die äußere Oberfläche gramnegativer Bakterien gebunden sind und einen integralen Bestandteil der äußeren Membran bilden. Außen bestehen sie aus einer Polysaccharidkette, einem Kernligosaccharidkomplex und einem zentralen Lipid-A-Teil. Die Vielfalt der so genannten O-Typen von Lipopolysacchariden entsteht durch Variation der Anzahl und der Zusammensetzung der Polysaccharidketten [Fomsgaard 1990]. Im Rahmen der Chronifizierung der Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* ist eine Reduktion an Polysaccharidketten (rough type) und eine durch die geringere Variabilität der Core- und Lipid-A-Struktur bedingte Polyagglutinabilität die Folge [Pedersen 1992, Ojeniyi 1991, 1990 und 1985].

Lipopolysaccharide gelten daneben als wesentliche Mediatoren der Komplementaktivierung [Jensen et al. 1993]. Die sehr hohen Antikörpertiter, die im Serum chronisch infizierter CF-Patienten nachgewiesen werden konnten, sind im Sinne eines Eliminationsmechanismus des Körpers zu deuten, welcher aus der Lunge ins Serum übergetretene LPS-Moleküle neutralisiert und auf diese Weise endotoxische Symptome verhindert [Kronborg et al. 1995].

### 1.2.6.2. Flagellin

*Pseudomonas aeruginosa* ist u.a. durch das Vorhandensein von Flagellin [Hybiske et al. 2004] in der Lage, an die basalen Schichten des respiratorischen Epithels zu adhären. Dies findet vor allem in nicht intakten Bereichen, dem sogenannten „nackten respiratorischen Epithel“, statt [Tsang et al. 2003].

### 1.2.6.3. Neutrophilenelastase

Die Neutrophilenelastase stimuliert die Interleukin 8 Produktion der respiratorischen Epithelzellen und führt somit zu einer vermehrten Schleimproduktion. Insgesamt behindern die Proteasen die lokale unspezifische Immunantwort bei initialer *Pseudomonas aeruginosa* Infektion [Hoiby und Koch 1990] und induzieren eine stark ausgeprägte Bildung spezifischer Antikörper gegen bakterielle Toxine und Enzyme.

### 1.2.6.4. Exotoxin A

Die am stärksten toxische Substanz, die von *Pseudomonas aeruginosa* produziert wird, ist das Exotoxin A. Im Vergleich zu Endotoxin hat es eine 10.000-fach erhöhte Toxizität [Liu et al. 1973]. Durch rezeptorvermittelte Endozytose sind in erster Linie das Alveolarepithel und das pulmonale Endothel betroffen [Bourke et al. 1998 und 1994, FitzGerald 1980]. Granström et al. untersuchten den Antikörperverlauf gegenüber Exotoxin und stellten eine Erhöhung der Antikörper gegen Exotoxin A bei der chronischen *Pseudomonas aeruginosa* Infektion fest [Granström et al. 1984].

### 1.2.6.5. Mukoexopolysaccharid (Alginat)

Alginat ist ein heterogenes mukoides Exopolysaccharid aus Mannuronsäure und Galuronsäure [Russell und Cacesa 1989], welches zuerst bei Meeresalgen nachgewiesen wurde. Linker und Jones beschreiben erstmals eine ähnliche Substanz bei mukoiden Formen von *Pseudomonas aeruginosa* [Linker und Jones 1966], die in größerer Menge bei der chronischen *Pseudomonas* Infektion von CF-Patienten synthetisiert wird [Meluleni et al. 1995].

Der Schleim gilt als bedeutsamer Faktor für die Pathogenese der Zystischen Fibrose, da die meisten übrigen potentiellen Virulenzfaktoren von mukoiden Stämmen nicht exprimiert werden [Govan et al. 1996]. Alginat ist die Grundsubstanz des Biofilms [Hoiby 1998, Pedersen 1992, Giwercman et al. 1991] Es wirkt als Barriere gegen die Immunmechanismen des Körpers sowie gegenüber angreifenden Antibiotika [Koch et al. 1993] und spielt somit eine immunmodulatorische Rolle [Hoiby 1998, Govan et al. 1996, Pedersen 1992]. Aufgrund von Bindungsversuchen verschiedener Exopolysaccharide an respiratorische Zellen vermutet man, dass Alginat als Ligand für die Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* agiert [Marty et al. 1998]. Hinzu kommt die mechanische Auswirkung auf das sich zunehmend verengende Lumen des Endobronchialraums.

Weitere Bakterien, welche ebenfalls Alginat produzieren, sind nicht humanpathogen [Pedersen et al. 1989].

### 1.2.7. Mukoide Wachstumsform

Aktuelle molekularbiologische Studien konnten zeigen, dass Veränderungen im Lebensraum der Keime, beispielsweise ein vermindertes Nahrungsangebot oder steigende Osmolarität, Spontanmutationen zur Folge haben können. Diese erhöhte Rate an Spontanmutationen führt wiederum zu einer Veränderung der Produktion von Alginat. Es kommt zu einem typischen Phänotypwechsel der Keime, die dann in einer mukoiden Form auftreten und Mikrokolonien bilden [Doring 1997, Govan und

Deretic 1996, Deretic et al. 1994 und 1990, Pedersen 1992, May et al. 1991, Hoiby 1974]. Dabei sollen laut Mathee et al. während der Entzündungsreaktion durch Leukozyten freigesetzte Sauerstoffradikale eine Überproduktion von Alginat indizieren [Mathee et al. 1999].

Bei etwa 10% der Patienten lassen sich bereits zu Beginn der Besiedelung mukoide Keime finden und bei etwa 50% treten diese bereits in der initialen Phase der Besiedelung auf [Hoiby 1974]. Somit beherbergen CF-Patienten häufig mukoide und nicht-mukoide Stämme gleichzeitig nebeneinander.

Die Bakterienkolonien produzieren Polysaccharide, die den Biofilm in Form einer Matrix umgeben. Der größte Teil der Matrix wird von kleinsten Wasserkanälchen durchzogen. Durch diese werden die Mikrokolonien mit wassergelöstem Sauerstoff versorgt [Costerton et al. 1994]. Antikörper haben die Fähigkeit, diesen Biofilm zu penetrieren [Meno und Amako 1990].

Die im Biofilm wachsenden Bakterien bewirken eine andauernde Aktivierung verschiedener Entzündungsparameter und sind im Falle von *Pseudomonas aeruginosa* bei der Zystischen Fibrose oftmals Ursache von chronischen, gewebserstörenden Entzündungsprozessen [Kharazmi et al. 1999].

Obwohl der mukoide Phänotyp von *Pseudomonas aeruginosa* eigentlich ein defizienter Organismus mit geringerer Produktionsrate von Exotoxinen ist, wird er als der pathogenere Phänotyp angesehen [Kharazmi et al. 1999, Hoiby 1998, Pedersen et al. 1992 und 1990, Brown et al. 1990].

### 1.3. Zwillingsstudien bei der Zystischen Fibrose

Im Rahmen der CF-Forschung sind Untersuchungen an Zwillingen und Geschwisterpaaren, die an Zystischer Fibrose erkrankt sind, weit verbreitet. An diesem speziellen Patientenkollektiv kann der Einfluss auf unterschiedliche genetische Faktoren reduziert werden [Bronsveld et al. 2000 und 2001]. Ein weiterer Ansatz trifft den Aspekt des gemeinsamen Aufwachsens der Kinder. Die Zwillings- und Geschwisterpaare wachsen in derselben Umgebung auf. So teilen sie meist ihren sozioökonomischen Status, die generellen Lebensbedingungen und darüber hinaus auch vergleichbare therapeutische Behandlungsstrategien.

Bei heterozygoten CF-Zwillingen und CF-Geschwistern findet man ein Patientenkollektiv, in dem unterschiedliche genetische Läsionen differenziert analysiert werden können [Bronsveld et al 2001, Dolan and Boomsma 1998, Phillips 1993].

Bei monozygoten Zwillingen mit dem gleichen genetischen Hintergrund sind externe Faktoren, wie die Besiedlung mit Mikroorganismen und deren Bedeutung für den Krankheitsverlauf besonders gut vergleichbar.

### 1.4. Fragestellung

In der Gruppe der CF-Zwillinge und Geschwister ist eine Infektion mit demselben *Pseudomonas aeruginosa* Stamm wahrscheinlich. Der Verlauf der Lungenerkrankung ist dennoch meist unterschiedlich. Somit ergeben sich die Fragen, ob dieselben *Pseudomonas aeruginosa* Stämme eine unterschiedlich ausgeprägte Fähigkeit zur Adhäsion zeigen und ob dieser Virulenzfaktor ein wichtiges Einflusskriterium für den Verlauf der Lungenerkrankung ist. Da es ebenfalls unterschiedliche klinische Verläufe unter den CF-Zwillingen und Geschwistern gibt, erscheint es denkbar, dass die Stärke der Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* den klinischen Zustand des CF-Patienten beeinflusst.

Dazu sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Zeigen genotypisch gleiche *Pseudomonas*-Isolate von CF-Zwillingen und Geschwistern identisches Adhäsionsverhalten im Rahmen einer Infektion?  
Ist der Virulenzfaktor Adhäsion eine für einen bakteriellen Genotypen spezifische Eigenschaft?
2. Korreliert die „Stärke der Adhäsion“ mit dem klinischen Zustand des CF-Patienten? Gehen „niedrige Adhäsionen“ mit einer guten Lungenfunktion einher?
3. Gibt es unterschiedliche klinische Verläufe einer Zystischen Fibrose bei monozygoten Zwillingen versus Geschwistern?
4. Zeigt sich bei der in beiden Zwillingspaaren mild verlaufenden Zystischen Fibrose auch ein ähnliches Adhäsionsverhalten von *Pseudomonas aeruginosa*? Zeigen sich bei Zwillingspaaren mit unterschiedlichen klinischen Verläufen auch unterschiedliche „Adhäsionsstärken“ von *Pseudomonas aeruginosa*?

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Chemikalien

Zellmedium (Dulbecco´s Modified Eagle Medium) mit Zusätzen von 10% FCS (hitzeinaktiviert), 2mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin/Streptomycin und 1mM Na-pyruvat

HBSS (Hanks´ balanced salt W/O Phenol red)

BSA (bovine serum albumine)

PBS (phosphat buffe red saline)

Natriumborat (20mM Borsäure und 150mM NaCl, pH 9,0)

Hepes

Flüssigmedium LB

Formalin 0,5%

Alle Substanzen wurden in höchstmöglichem Reinheitsgrad von kommerziellen Herstellern bezogen.

### 2.2. Verwendete Geräte

Milligrammwaage (Sartorius® analytic)

Schüttelbrutschrank (Biometra® APT Line)

Schüttelwasserbad (Köttermann® 244)

UV-VIS Spektrophotometer (Shimadzu® UV mini 1240)

Zentrifuge (Hettich Rotanta®/TRC)

Brutschrank (Heraeus® HERAcell)

Sterilwerkbank (Heraeus® HERAsafe)

Tiefkühlschrank (Heraeus® HERAfreeze)

Auflicht-Mikroskop (Zeiss® ID 03)



Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss®)

Fluoreszenz-Lampe (Kappa® Cystische Fibrose 15/4 MCC MCU II)

Software (Image Pro Plus®, The Proven Solution, Version 3.0, Media Cybernetics)

### **2.3. A549-Zellkultur**

A549 ist eine humane Lungenkarzinom-Zelllinie. Hierbei handelt es sich um gut differenzierte Pneumozyten Typ II, die aus einem Alveolarepithelkarzinom eines Mannes aus dem Jahre 1972 stammen. Ihr Wachstum ist adhärent im Monolayer und sie sind nach Passage in einer 1:5 bis 1:10-fachen Verdünnung nach 4-7 Tagen erneut konfluent.

Die Inkubation erfolgt bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in „Dulbecco´s Modified Eagle Medium“ mit Zusätzen von 10% FCS, 2mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin/Streptomycin und 1mM Natriumpyruvat. Unter diesen Bedingungen beträgt die Verdopplungszeit etwa 30 Stunden [DSMZ 2002].

Bisherige Verwendung fand A549 bei Forschungen über Interaktionen zwischen *Pseudomonas aeruginosa* [Chi et al. 1991] und anderen Keimen. Zudem wurde A549 bei Untersuchungen von Adhäsinen wie beispielsweise Typ 4-Pilus [Hahn 1997] und Protein F [Azghani et al. 2002] verwendet.

### **2.4. Passagieren von A549 und deren Aussaat**

Die Zellen wurden meist in 75ml Falconflaschen inkubiert. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage vorsichtig mittels Pipette abgesaugt und durch ein auf 37°C aufgewärmtes Medium ersetzt. Bei Konfluenz wurden die A549 Zellen spätestens in wöchentlichen Abständen passagiert.

Das Medium wurde dann mit einer Pipette abgesaugt und der Monolayer einmalig mittels PBS (pH 7,2) von Mediumresten befreit. Eine, je nach Größe der Falconflasche, definierte Menge an Trypsin/EDTA (4/8/15ml) wurde zugegeben und fünf Minuten im Brutschrank inkubiert. Diese Zeitvorgabe wurde genau eingehalten, um

die A549 Zellen nicht zu schädigen. Die entstandene Suspension, der vom Boden abgelösten Zellen, wurde in doppelter Menge Medium/PBS resuspendiert und bei 1180Upm bei 25°C zehn Minuten zentrifugiert. Nach erneuter Resuspension in Medium erfolgte die Verdünnung der Zellzahl auf  $10^5$  A549/ml. Die definierte Zellzahl wurde auf 12-well-Monolayer mit je  $10^5$  A549/Cup ausgesät und innerhalb von zwei Tagen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> zur Konfluenz inkubiert (Abb. 5).

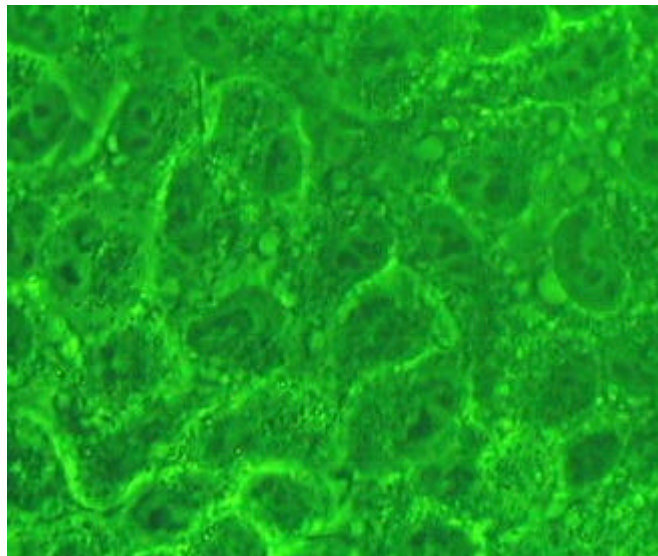


Abb. 5: konfluente A549 unter Auflichtmikroskopie

Alle Arbeiten mit den A549 Pneumozyten wurden unter sterilen Bedingungen unter der Herasafe® Sterilwerkbank durchgeführt.

## 2.5. Untersuchtetes Probenmaterial und Patientenkollektiv

Die *Pseudomonas aeruginosa* Sputumproben von CF-Zwillingen und Geschwistern stammen von der Klinischen Forschergruppe „Molekulare Pathologie der Mukoviszidose“ der Medizinischen Hochschule Hannover und wurden für diese wissenschaftliche Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Sputumproben wurden den CF-Zwillingen und Geschwistern zeitgleich in mehreren europäischen CF-Zentren

entnommen und charakterisiert. Der Transport der Proben erfolgte in gefrorenem Zustand von Hannover an das Kinderimmunlabor des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Düsseldorf. Sie wurden dann bei -80°C asserviert.

Für diese Arbeit standen Sputumproben und klinische Daten von 27 Geschwisterpaaren zur Verfügung. Darunter waren acht homozygote Zwillingspaare (29,6%), fünf dizygoten Zwillingspaare (18,5%) und 14 Geschwisterpaare (51,9%) (Abb. 6). Bei einer Geschwistergruppe handelt es sich um drei Geschwister, die an Zystischer Fibrose erkrankt sind. Insgesamt handelt es sich damit um 55 CF-Patienten (einmalig drei Geschwister).

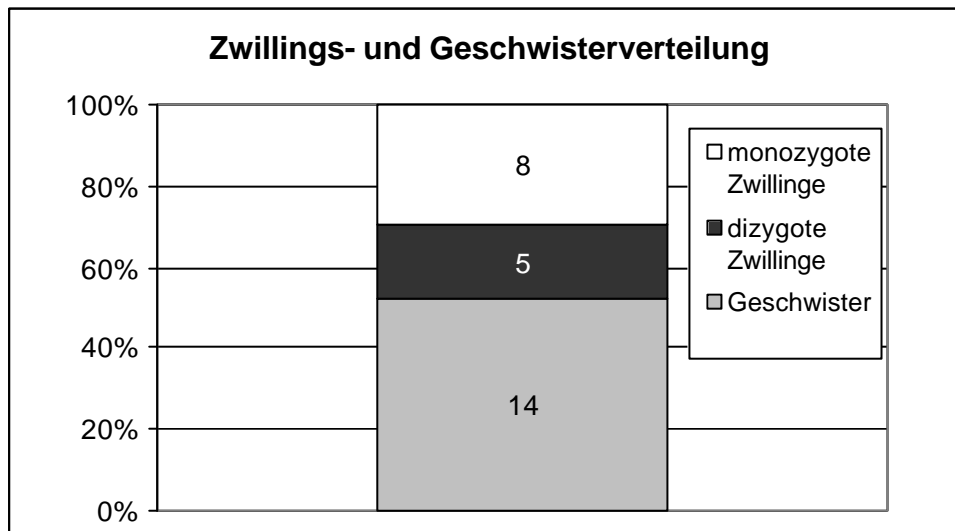


Abb. 6: Zwillings- und Geschwisterverteilung

Aus den vorliegenden Proben wurden 100 verschiedene phänotypische Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* isoliert. Alle Bakterienisolate wurden bereits mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) genotypisiert (Bsp. Abb. 7).

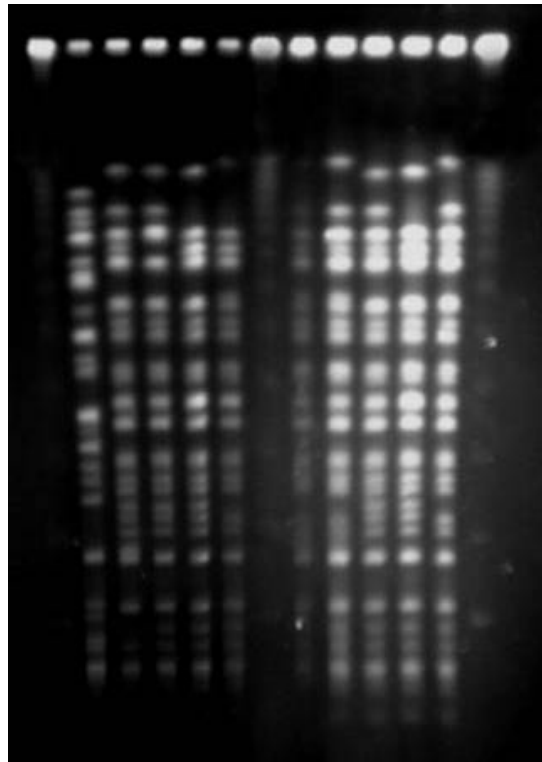


Abb. 7: RFLP klonaler Varianten von *P. aeruginosa* eines CF-Patienten

### 2.5.1. Vorkommen verschiedener *P. aeruginosa* Stämme

Anhand der Morphologie wurden verschiedene *Pseudomonas aeruginosa* Stämme aus einer Sputumprobe isoliert. Eine Mehrzahl der CF-Patienten weist mehrere phänotypisch unterschiedliche *Pseudomonas aeruginosa* Stämme auf.

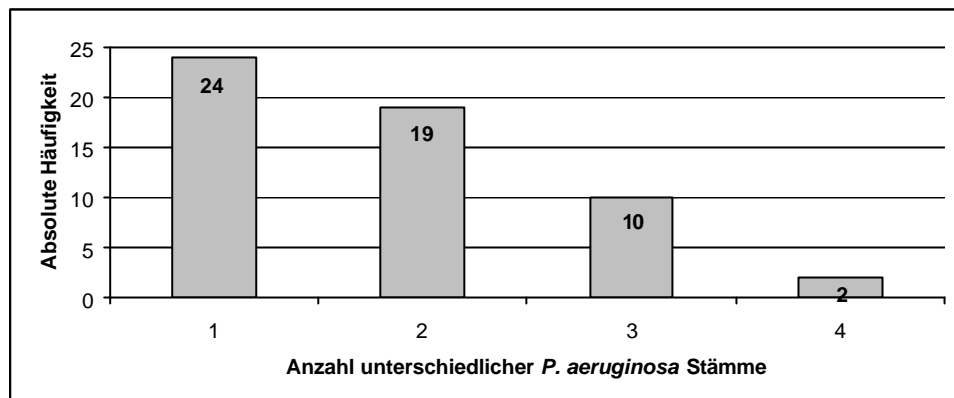


Abb. 8: Anzahl unterschiedlicher *P. aeruginosa* Stämme der Gesamtgruppe

Aus Abbildung 8 geht hervor, dass 24 der 55 CF-Patienten nur von einem *Pseudomonas aeruginosa* Stamm besiedelt werden, 19 Patienten zwei verschiedene Stämme, zehn Patienten drei verschiedene und zwei Patienten vier verschiedene *Pseudomonas aeruginosa* Stämme in ihrer Lunge aufweisen. Damit haben 43,6% der Patienten nur einen und 56,4% der Patienten mehrere Stämme.

## 2.6. Asservierung und Kultivierung der Bakterien

Aus den bei -80°C gelagerten Asservaten wurde eine ¼ Öse auf eine Schafblutagarplatte als 3-Ösenausstrich angelegt. Bei 37°C wurden die Platten über Nacht inkubiert. Anschließend wurde eine Einzelkolonie in LB-Flüssigmedium überimpft und erneut bei 37°C in einem Schüttelinkubator unter aeroben Bedingungen inkubiert.

## 2.7. Bakterienbindungsassay

Die über Nacht inkubierte Bakterienflüssigkultur wurde bei 3000g und 4°C zehn Minuten zentrifugiert. Nach Dekantieren und Resuspendieren mit 8ml auf Eis gekühltem Natriumborat-Puffer erfolgte mehrfach eine Zentrifugation unter oben genannten Bedingungen (3000g, 4°C, 10min).

Nun erfolgte das Resuspendieren in 1ml Natriumborat-Puffer und anschließend die Markierung der Bakterien mit Fluoreszein-Iso-Thio-Cyanat (FITC). Dabei handelt es sich um eine antikörperunabhängige direkte Proteinmarkierung [Wick et al. 1976]. Zu 1ml Bakteriensuspension wurden 200µl FITC-Suspension hinzugegeben und das Gemisch für 30min unter leichtem Schütteln in einem abgedunkelten Wasserbad bei 23°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Suspension vorsichtig über 5ml 6%iger Albuminlösung BSA / PBS geschichtet und zentrifugiert (3000g, 4°C, 15min). Der Überstand wurde verworfen und das nun gelb gefärbte Pellet in 8ml auf Eis gekühlter Lösung, bestehend aus einer 1:50 Lösung Hepes und HBSS, resuspendiert und bei 3000g und 4°C zehn Minuten mehrmals zentrifugiert.

Daraufhin erfolgte die Einstellung der Bakteriendichte mittels Photometer. Aus vorangegangenen Experimenten konnte mittels Verdünnungsreihen gezeigt werden, dass *Pseudomonas aeruginosa* bei 600nm und einer Extinktion von 0,65 eine Bakteriendichte von  $10^9$  cfu/ml aufweist. Nach einer 1:10 Verdünnung mit der auf Eis gekühlten Hepes-HBSS Lösung wurden die zuvor durch mehrmaliges Waschen von Medium befreiten 12-well-Monolayer mit A549 mit der nun definierten Menge von  $10^8$  cfu FITC-markierten *Pseudomonas aeruginosa* beimpft.

Anschließend wurden diese unter Schwenken bei 37°C über eine Stunde bei 70rpm inkubiert. Nicht adhärente Bakterien wurden durch mehrfaches Waschen entfernt und der Assay mit 500µl 0,5% Formalinlösung je well fixiert.

## 2.8. Auswertung

Die Auswertung erfolgte mittels Auflichtfluoreszenzlichtmikroskopie unter visueller Kontrolle mit Hilfe eines halbautomatischen Zählprogramms (Image Pro Plus ®) (Abb. 9 und 10).

Das jeweilige Gesichtsfeld besitzt eine Größe von 0,0186 mm<sup>2</sup> (0,12mm x 0,155mm). Im Dreifachansatz wurden jeweils 30 Gesichtsfelder untersucht und der Referenzstamm PAO1 (DSM 1707) bei jedem Versuchsdurchgang mitgeführt.

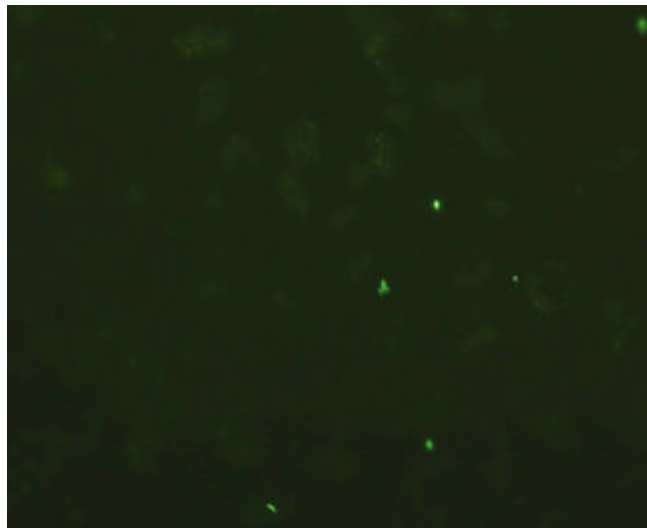


Abb. 9: schwach adhärierende *Pseudomonas aeruginosa* an A549

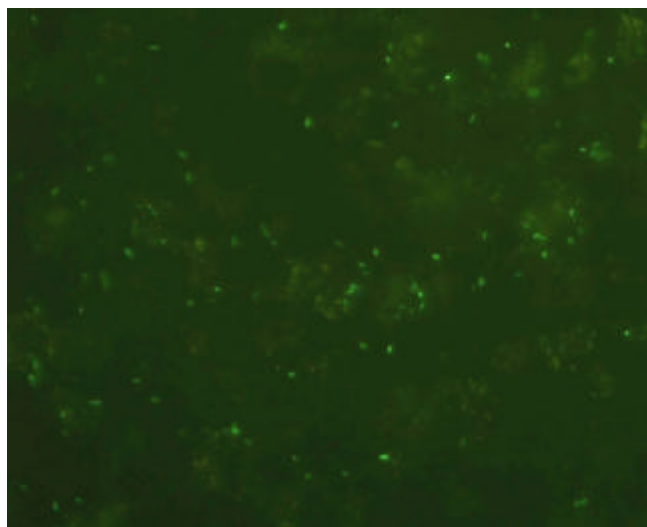


Abb. 10: stark adhärierende *Pseudomonas aeruginosa* an A549

## **2.9. Klinische Verlaufsparemeter**

Lungenfunktionsuntersuchungen können die Einschränkung bei Atemwegsobstruktionen erfassen. Als Lungenfunktionsparameter dienen in der Verlaufsbeobachtung der Zystischen Fibrose die Forcierte Vitalkapazität FVC sowie die Einsekundenkapazität FEV1. Sie dienen zur Objektivierung von Verlauf und Prognose der Zystischen Fibrose [Sharma et al. 2001, Corey et al. 1998].

Die Ermittlung der Patientendaten sowie der Lungenfunktionsuntersuchung erfolgte durch mehrere europäische CF-Zentren parallel zur Entnahme der Sputumproben. Anschließend erfolgte das Zusammentragen der Daten durch die Forschergruppe „Molekulare Pathologie der Mukokoviszidose“ der Medizinischen Hochschule in Hannover.

### **2.9.1. Forcierte Vitalkapazität FVC**

Die Forcierte Vitalkapazität FVC ist definiert als das Gasvolumen, welches nach maximaler Inspiration durch maximal forcierte Expiration ausgeatmet werden kann. Bei obstruktiven Ventilationsstörungen kommt es zu einer Abnahme der FVC.

Als Normalbereich werden Werte über 80% des Sollwerts betrachtet [Neuberger et al. 1995, Zapletal und Samanek 1977].

### **2.9.2. Forcierte expiratorische Volumen der ersten Sekunde FEV1**

Das forcierte expiratorische Volumen der ersten Sekunde FEV1, auch Einsekundenkapazität, Atemstoßtest oder Tiffeneau-Wert genannt, definiert das Gasvolumen, das nach maximaler Inspiration in der ersten Sekunde unter größter Anstrengung ausgeatmet werden kann. Bei der im Laufe der Zystischen Fibrose zu erwartenden bronchialen Obstruktion kann auch bei maximaler Anstrengung in der ersten Sekunde nur ein verminderter Anteil der Vitalkapazität ausgeatmet werden.



Der Sollwert der forcierten Ausatmung in der ersten Sekunde beträgt bei Gesunden über 80% des Ausatmungsvolumens [Neuberger et al. 1995, Zapletal und Samanek 1977].

### 2.9.3. Längensollgewicht

Bei Patienten mit Zystischer Fibrose sind, neben dem pulmonalen Status, schlechtes Gedeihen und daraus resultierendes Untergewicht ein wesentlicher, prognostischer Parameter bezogen auf die Lebenserwartung und den Verlauf der Erkrankung. Zur Beurteilung dienen bei Kindern und Jugendlichen das Längensollgewicht LSG und für Erwachsene der Body Maß Index (BMI).

Das Längensollgewicht [= % des Idealgewichts für die Länge] wird mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Längensollgewicht} = [\text{aktuelles Gewicht} / \text{Idealgewicht}^* \text{ zur Länge}] \times 100$$

(\*Idealgewicht = Gewicht der 50. Perzentile bezogen auf die Länge)

<b>LSG (wfh) in %</b>	<b>BMI</b>	
90 bis 110	19 bis 25	Normal
85 bis 89	18 bis 19	Untergewicht mild
80 bis 84	17 bis 18	Untergewicht mäßig
75 bis 79	16 bis 17	Untergewicht schwer
unter 75	unter 16	Untergewicht sehr schwer/Kachexie

Patienten mit einem Längenwachstum unterhalb der dritten Perzentile bedürfen einer getrennten Betrachtung, da für sie die LSG-Berechnungen nicht immer angemessen sind.

## 2.10. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* an A549 Pneumozyten wurden mit dem zweizeitigen Anova-Test auf Signifikanz geprüft.

Die Prüfung auf Korrelation zwischen den einzelnen Geschwisterpaaren erfolgte mittels T-Test.

Das Signifikanzniveau wird bei  $p < 0,05$  angesetzt.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Berechnung der Adhäsion von *P. aeruginosa*

##### 3.1.1. Adhäsionsstärke der untersuchten *P. aeruginosa* Isolate

Die Adhäsion von Bakterien ist definiert als das Anheften von Bakterien an den Schleimhautoberflächen. Dieser Vorgang stellt den ersten Schritt einer Infektion dar. In der vorliegenden Arbeit wurde diese „Adhäsionsstärke“ ermittelt. Die folgende Abbildung zeigt die Verteilung der einzelnen Adhäsionswerte (Abb. 11 und 12). Es handelt sich dabei um absolute Zahlen pro 0,0186 mm<sup>2</sup> (ausgemessenes Gesichtsfeld des Auflichtmikroskops: 0,12 x 0,155mm<sup>2</sup>). Die einzelnen Adhäsionen der phänotypisch verschiedenen *Pseudomonas aeruginosa* Stämme wurden zur besseren Vergleichbarkeit addiert. Damit entstand für jeden Patienten ein einzelner Wert der Adhäsionsstärke von *Pseudomonas aeruginosa*. Die Standard-Statistikmaße der addierten Adhäsionen zeigten eine Spannweite der Werte vom Minimum 2,9 cfu/gf bis zum Maximum von 91,5 cfu/gf. Der Mittelwert lag bei 21,3 cfu/gf ( $\pm 17,7$ ).

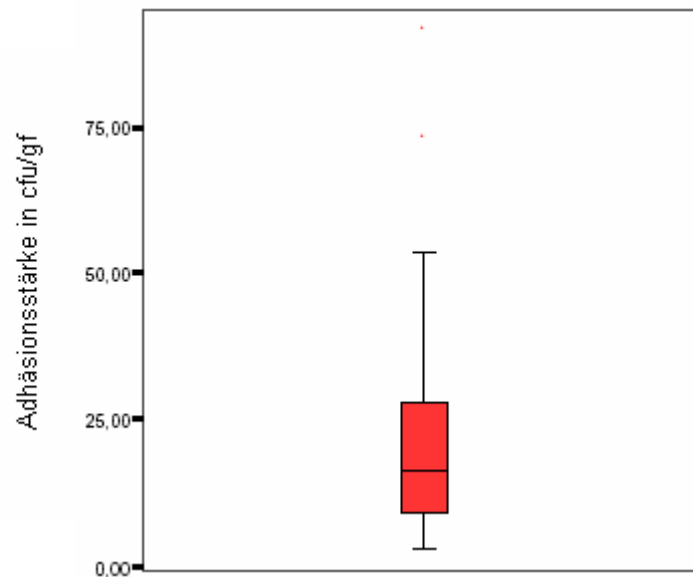


Abb. 11: Graphische Darstellung der Verteilung der Adhäsionsstärke von *P. aeruginosa*

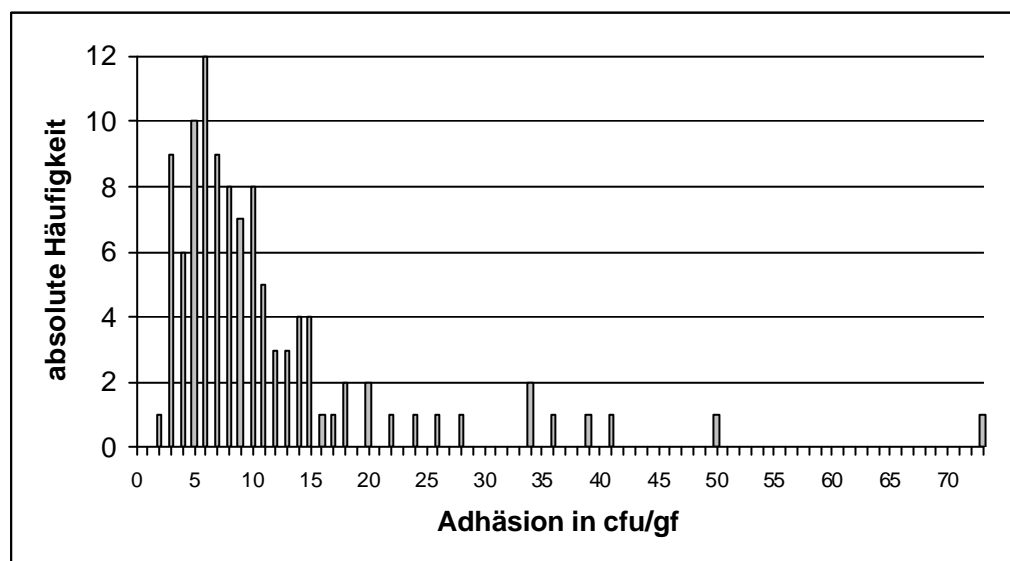


Abb. 12: Adhäsion von *P. aeruginosa* in der Gesamtgruppe

Insgesamt fand sich bei den CF-Patienten eine starke Streuung in der Adhäsionsstärke der einzelnen *Pseudomonas aeruginosa* Stämme. Überwiegend zeigte sich

eine Adhäsionsstärke zwischen Werten von drei und 18 cfu/gf. In diesem Bereich lagen 88 der 100 verschiedenen *Pseudomonas aeruginosa* Stämme.

### 3.1.2. Betrachtung der für die Adhäsion erzielten Extremwerte

Die Betrachtung des CF-Patienten mit der niedrigsten Adhäsionsstärke von 2,9 cfu/gf (Abb. 12) zeigte bei den klinischen Untersuchungsergebnissen der Lunge eine funktionelle Vitalkapazität von 86,5% und eine Einsekundenkapazität von 77,8%. Das Längensollgewicht dieses CF-Patienten lag mit 89,8% ebenfalls im oberen Normbereich. Im Vergleich dazu betrug die Vitalkapazität bei dem CF-Patienten mit der größten Adhäsionsstärke 68,4% und die Einsekundenkapazität 51,9%. Der Ernährungszustand lag mit 94,5% im Normbereich.

Resultierend ergaben sich in der Lungenfunktion zwischen diesen beiden CF-Patienten Unterschiede entsprechend der Adhäsionsstärke. Der Ernährungszustand lag für beide nahe dem Normbereich. Der CF-Patient mit der gering gemessenen Adhäsionsstärke von *Pseudomonas aeruginosa* erzielte in der Lungenfunktionsprüfung deutlich bessere Werte im Vergleich zu dem CF-Patient mit hoher Adhäsionsstärke von *Pseudomonas aeruginosa*.

### 3.1.3. Paarvergleich der Gesamtgruppe

Um die Ergebnisse zwischen den CF-Geschwistern in Form eines Paarvergleiches untersuchen zu können, wurden die Geschwister in zwei Gruppen geteilt. Somit ergaben sich zwei Gruppen mit jeweils 27 Geschwistern, die nun im Paarvergleich auf die gemessene Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* verglichen wurden. Für die erste Gruppe ergab sich ein Mittelwert von 16,7 cfu/gf mit einer Standardabweichung von 16,7. Im Vergleich dazu lag der Mittelwert in der zweiten Gruppe mit 25,7 cfu/gf und einer Standardabweichung von 18 darüber. Unter Anwendung des T-Tests zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Ausprägung der einzelnen Adhäsionen (zweiseitige Signifikanz  $p=0,029$ ).

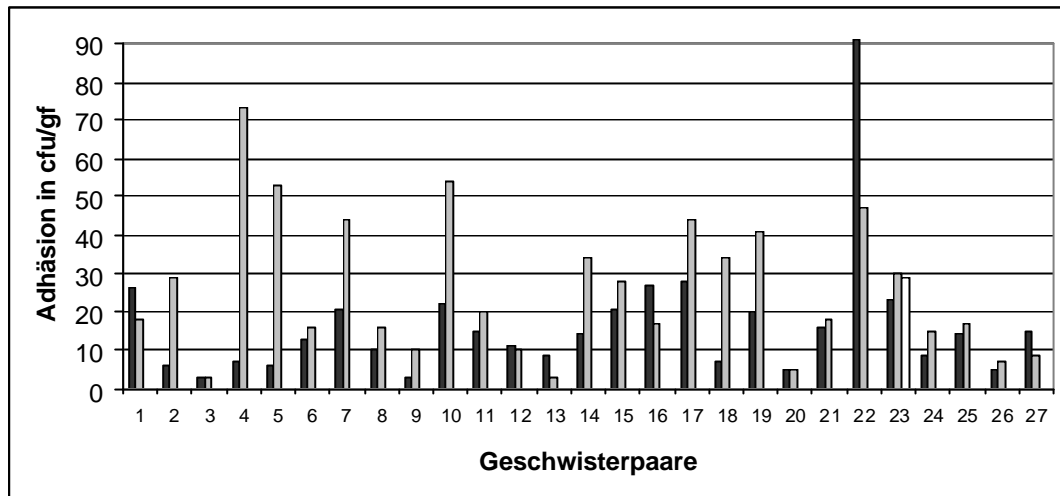


Abb. 13: Graphische Darstellung der Adhäsion von *P. aeruginosa* im Geschwistervergleich

Eine differenzierte Betrachtung von Geschwisterpaar drei und Geschwisterpaar 20, die beide nahezu keine Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* aufwiesen, zeigte dennoch einen schweren Verlauf der Erkrankung (Abb. 13). Im Fall von Geschwisterpaar drei mit einer niedrigen Adhäsionsstärke von beiden Geschwistern befanden sich die klinischen Messparameter in der unteren Norm (Abb. 13). Für Geschwisterpaar 20 fielen die klinischen Parameter für die Lungenfunktionen in beiden Fällen bei ebenfalls niedriger Adhäsionsstärke pathologisch aus (Abb. 13). Bei intensiver Untersuchung von Geschwisterpaar vier, konnte kein Zusammenhang zwischen der stark divergenten Adhäsion und den klinischen Untersuchungsparametern gezeigt werden (Abb. 13).

### 3.1.3.1. Paarvergleich der monozygoten Zwillinge

Für die Gruppe der monozygoten Zwillinge, bestehend aus acht Zwillingspaaren, konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* festgestellt werden. Bereits bei Betrachtung der einzelnen Mittelwerte für diese Gruppe zeigte sich nur ein geringer Unterschied. Der Mittelwert der ersten

Gruppe lag bei 24,4 cfu/gf ( $\pm 27,6$ ). Die zweite Gruppe wies mit 27,9 cfu/gf einen höheren Mittelwert und eine geringere Streuung auf ( $\pm 14,5$ ).

Folgende Graphik zeigt die Adhäsionsstärke von *Pseudomonas aeruginosa* der einzelnen monozygoten Zwillinge im Vergleich zum Geschwisterzwillings (Abb. 14).

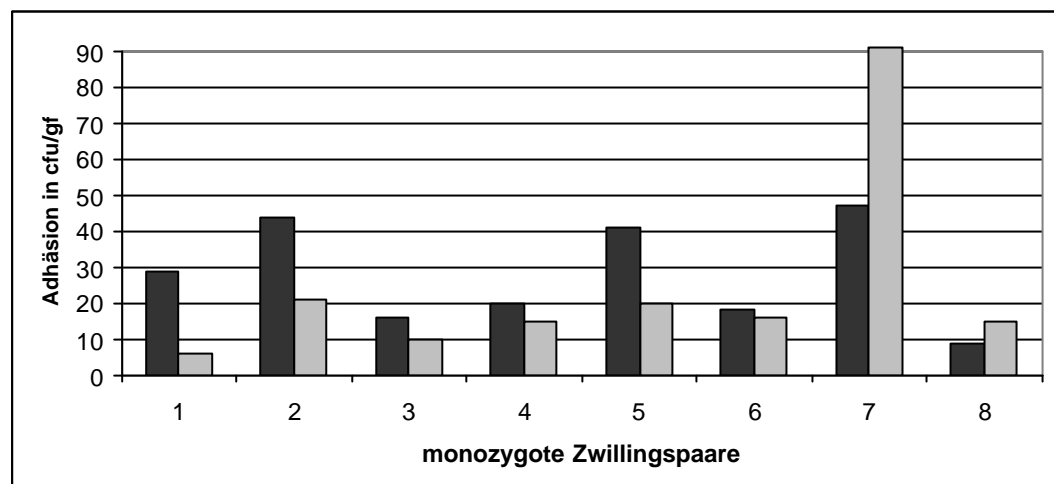


Abb. 14: Adhäsionen von *P. aeruginosa* innerhalb der monozygoten Zwillingspaare

Zwillingsspaar eins zeigte einen sehr großen Unterschied in der Adhäsion der *Pseudomonas aeruginosa* Stämme von 28,9 cfu/gf im Vergleich zu 5,8 cfu/gf (Abb. 14). Dieses Ergebnis spiegelte sich in der Ausprägung der Adhäsionsstärke innerhalb des Zwillingsspaares und in der Lungenfunktionsprüfung wider. Die Einsekundenkapazität lag bei 65,5% vs. 49% bei dem anderen Zwilling.

Zwillingsspaar zwei, mit einem ebenfalls großen Unterschied in der Ausprägung der Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* im Sputum, zeigte für den linken schwarz markierten Zwilling zwei (Abb. 14) mit einer Adhäsion von 43,7 cfu/gf eine deutlich schlechtere Lungenfunktion mit einer funktionellen Vitalkapazität FVC von 21,1% und einer Einsekundenkapazität FEV1 von 12,5% (Abb. 15). Im Vergleich dazu waren beim Geschwisterzwillings mit einer geringeren Adhäsion von 21,4 cfu/gf normwertige Lungenparameter zu beobachten.

Dieses Zwillingsspaar zeigte somit einen Zusammenhang zwischen einer hohen Adhäsionsstärke von *Pseudomonas aeruginosa* und einer schlechten Lungenfunktion.

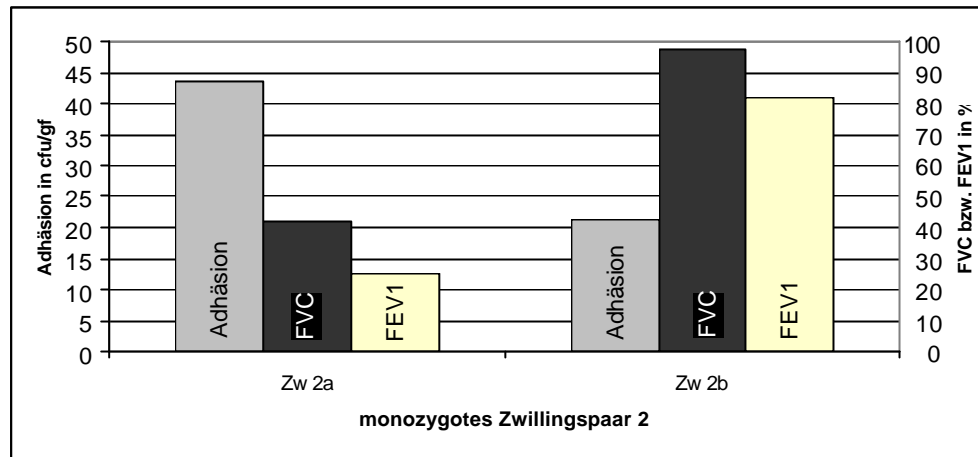


Abb. 15: Zusammenhang Adhäsion von *P. aeruginosa* und Lungenfunktion beispielhaft für ein monozygoten Zwillingenpaar

Die Zwillingenpaare drei, vier, sechs und acht (Abb. 14) zeigten einen geringen Unterschied in der Adhäsion im Vergleich zum jeweiligen Geschwisterzwillings. In den gemessenen Lungenparametern ergaben sich dennoch Unterschiede. So hatte Zwillingenpaar drei bei niedrigerer Adhäsion schlechtere Werte für die Einsekundenkapazität FEV1.

Bei Zwillingenpaar vier (Abb. 14) wurden für den CF-Patienten mit der höheren Adhäsionsstärke von *Pseudomonas aeruginosa* schlechtere Werte für die funktionelle Vitalkapazität FVC (71,3%) und die Einsekundenkapazität FEV1 (64%) beobachtet, verglichen mit dem Geschwisterzwillings mit normwertigen Lungenparametern.

Bei Betrachtung von Zwillingenpaar sechs (Abb. 14) sind analog zur Adhäsion keine bedeutsamen Unterschiede in den Untersuchungsergebnissen der Lungenfunktionen festgestellt worden.

Eine niedrige, für beide Zwillingen auf einem vergleichbaren Niveau befindliche Adhäsion, wies Zwillingenpaar acht (Abb. 14) auf, wohingegen die Lungenfunktion für beide unterhalb der Norm lag. Der Zwillings mit einer Adhäsion von 8,7 cfu/gf erreichte eine Lungenvitalkapazität FVC von 70,6% und eine Einsekundenkapazität FEV1 von 69,7%. Der Zwillings mit einer gering höheren Adhäsion von 14,7 cfu/gf wies mit einer



Vitalkapazität FVC von 50,9% und einer Einsekundenkapazität FEV1 von 51,1% eine deutlich eingeschränkte Lungenfunktion auf.

Bei den Zwillingspaaren fünf und sieben (Abb. 14) korrelierte eine erhöhte Adhäsion ebenfalls mit einer schlechten Lungenfunktion.

In einem zweiten Berechnungsansatz wurden die *Pseudomonas aeruginosa* Isolate mit der höchsten Adhäsion für die statistische Auswertung verwendet. Hierbei lagen die Mittelwerte für Gruppe eins bei 11,5 cfu/gf ( $\pm 9,5$ ), Gruppe zwei lag mit einer Adhäsion von 17,4 cfu/gf ( $\pm 15,2$ ) darüber. Statistisch gesehen lag dabei kein signifikanter Unterschied vor (2-seitige Signifikanz  $p=0,056$ ).

Bei differenzierter Untersuchung der Gruppe monozygoter Zwillinge fiel ein minimaler Unterschied der Mittelwerte in den Adhäsionsstärken ohne Signifikanz auf. So lag die Adhäsion für Gruppe eins bei 15,5 cfu/gf ( $\pm 14,7$ ), bei der anderen Gruppe nahezu identisch bei 15,8 cfu/gf.

### 3.1.3.2. Paarvergleich der heterozygoten Zwillinge und Geschwister

Die Gruppe der dizygoten Zwillinge und Geschwister umfasste insgesamt 39 CF-Patienten, fünf davon dizygoten Zwillingspaare. Ausgeschlossen für die Berechnungen wurden drei an Zystischer Fibrose erkrankte Geschwister, da im Paarvergleich nur jeweils zwei Patienten miteinander verglichen werden konnten. Zur gänzlichen Darstellung wurden diese jedoch in Abb. 16 graphisch mitefassen.

Ebenso wie bei den monozygoten Zwillingen wurde der Unterschied zwischen beiden Geschwisterteilen bezüglich der Stärke der Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* untersucht. Mit Hilfe des T-Tests konnte auch für diese Gruppe ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Adhäsionsstärke festgestellt werden (zweiseitige Signifikanz  $p=0,021$ ).

Für die Gruppe eins ergab sich ein Mittelwert der Adhäsion von 13,5 cfu/gf ( $\pm 8,5$ ). Mit 24,8 cfu/gf wies die andere Patientengruppe eine deutlich höhere durchschnittliche Adhäsion bei größerer Schwankungsbreite auf ( $\pm 19,6$ ).

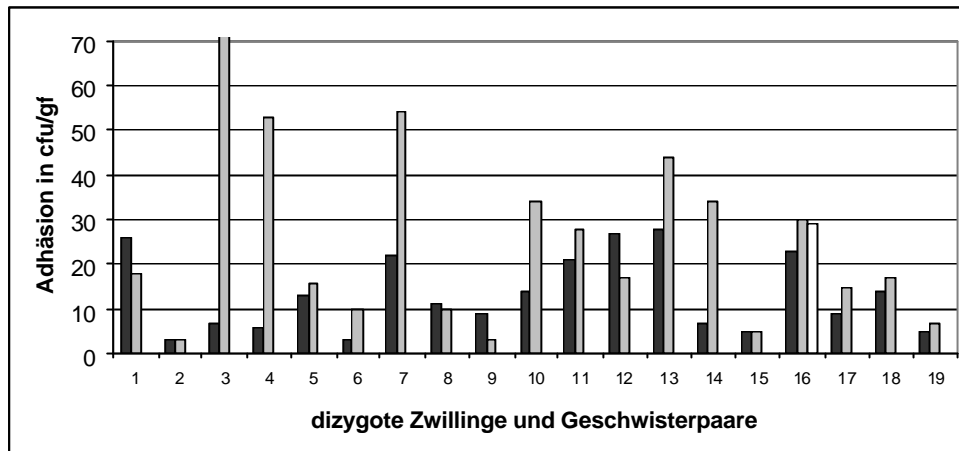


Abb. 16: Adhäsionen von *P. aeruginosa* innerhalb der dizygoten Zwillingspaare und Geschwister

### 3.1.4. Verteilung der *Pseudomonas*-Genotypen und Vergleich mit ihrer Adhäsion

Die einzelnen Zwillings- bzw. Geschwisterpaare wurden in vier verschiedene Gruppen eingeteilt (Tabelle 1):

In der ersten Gruppe wurden die Zwillingspaare mit identischen Klonen, in der zweiten Gruppe Zwillingspaare mit klonalen Varianten (80-99% Übereinstimmung) und in der dritten Gruppe verwandte Klone mit einer Übereinstimmung von etwa 70% zugeordnet. Die vierte Gruppe beinhaltete die Zwillingspaare mit verschiedenen Klonen.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	monozygote Zwillinge	dizygote Zwillinge	Geschwisterpaare
identische Klone (100%)	2	3	5
klonale Varianten (80-99%)	4	1	8
verwandte Klone (70%)	0	0	1
verschiedene Klone	2	1	0

Tabelle 1: Genetische Unterschiede zwischen den *P. aeruginosa* Isolaten der einzelnen Geschwisterpaare

Bakterienisolate, die im Rahmen der klinischen Untersuchung von CF-Zwillingen und Geschwistern gesammelt wurden, wiesen nach Darstellung ihres Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) in der Regel einen einheitlichen Genotyp auf. Es wurden genetische Gruppen von *Pseudomonas aeruginosa* unterschieden. Der Gruppe genetisch identischer Klone mit einer Übereinstimmung von 100% konnten zwei monozygote Zwillingspaare, drei dizygote Zwillingspaare und fünf Geschwisterpaare zugeordnet werden. Die Einteilung der klonalen Varianten, mit einer Übereinstimmung von 80-99%, traf für vier monozygote Zwillingspaare, ein dizygotes Zwillingspaar und acht Geschwisterpaare zu (Tabelle 1). Hierbei fiel auf, dass der überwiegende Anteil der Zwillings- und Geschwisterpaare in diese beiden *Pseudomonas aeruginosa* Gruppen einzuordnen war.

Somit war die genetische Übereinstimmung von *Pseudomonas aeruginosa* innerhalb eines Zwillings- oder Geschwisterpaares unabhängig von deren Verwandtschaftsgrad.

Es stellte sich die Frage, ob die genetisch identischen *Pseudomonas aeruginosa* Stämme von Geschwistern auch die gleiche Adhäsionsstärke aufwiesen. Untersucht wurden hierzu *Pseudomonas aeruginosa* Stämme im Sputum des jeweiligen CF-Zwillingen.

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Adhäsionsstärken der untersuchten Keime in vier Quartile unterteilt (Definition der Quartile siehe Kapitel 3.3). Die genetische Verwandtschaft in den Gruppen der identischen Klone, sowie der klonalen Varianten,

konnte ebenso durch eine gleiche Adhäsionsstärke widergespiegelt werden. Es wurden, mit Ausnahme von zwei Klonen, ähnliche, sich in einem Quartil befindliche Adhäsionen erzielt. Für die verschiedenen Klone ergab sich dagegen eine hohe Variabilität in ihrer Adhäsionsstärke an A549. Es fanden sich sowohl ähnliche Adhäsionen als auch stark divergente Adhäsionen in der Gesamtgruppe der verschiedenen Klone.

### 3.2. Vergleich der klinischen Daten

#### 3.2.1. Allgemeine Beschreibung der erhobenen Lungenfunktionsparameter

		<b>FVC</b>	<b>FEV1</b>
<b>Mittelwert</b>		<b>84,05</b>	<b>68,01</b>
<b>Standardfehler des Mittelwertes</b>		<b>3,19</b>	<b>3,39</b>
<b>Median</b>		<b>84,82</b>	<b>65,54</b>
<b>Standardabweichung</b>		<b>23,63</b>	<b>25,17</b>
<b>Minimum</b>		<b>32,36</b>	<b>15,76</b>
<b>Maximum</b>		<b>141,21</b>	<b>111,06</b>
<b>Perzentile</b>	<b>20</b>	<b>70,42</b>	<b>49,93</b>
	<b>50</b>	<b>84,82</b>	<b>65,54</b>
	<b>75</b>	<b>101,70</b>	<b>92,30</b>

Tabelle 2: Lungenfunktionsparameter der Gesamtgruppe

Tabelle 2 zeigt für die Gesamtpopulation (n = 55) die Verteilung der gemessenen Lungenfunktionsparameter. Der Mittelwert für FVC lag mit 84% im Normbereich, wohingegen für FEV1 dieser mit 68% unterhalb der Norm lag. Die Ergebnisse für beide Lungenfunktionsparameter lassen auf Patienten mit erheblich eingeschränkter

Lungenfunktion schließen (Minimum für FVC von 32,4% und FEV1 von 15,8%) (Tabelle 2).

Die folgende graphische Darstellung mittels Boxplots zeigt die Verteilung der Lungenfunktionsparameter (Abb. 17 und 18):

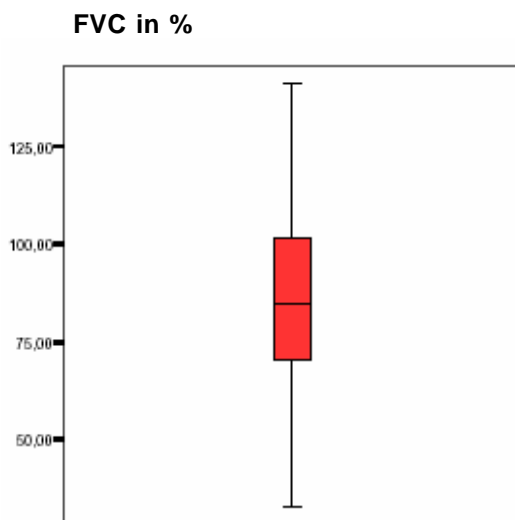


Abb. 17: Verteilung der FVC in % der Gesamtgruppe

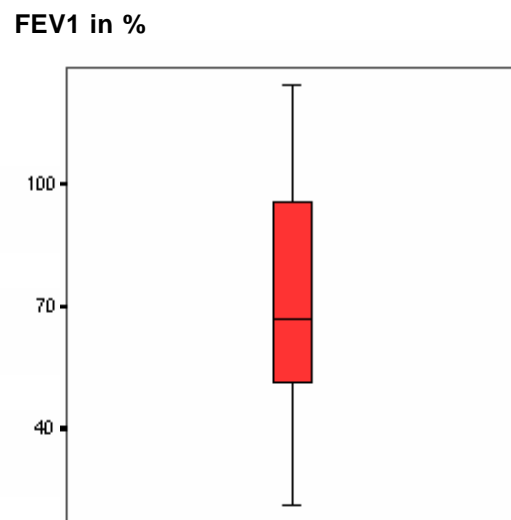


Abb. 18: Verteilung der FEV1 in % der Gesamtgruppe

### 3.2.2. Paarvergleich der klinischen Parameter

Für einen Paarvergleich wurden die Ergebnisse der Forcierten Vitalkapazität FVC und der Einsekundenkapazität FEV1 zur Beurteilung des pulmonalen Status, sowie das Längensollgewicht als Hinweis für den Ernährungszustand verwandt. Im Vordergrund stand hier die Frage, ob sich Unterschiede innerhalb des Zwillingen- oder Geschwisterpaares für die oben genannten Parameter ergeben.

### 3.2.2.1. Paarvergleich Forcierte Vitalkapazität FVC

Die einzelnen Gruppen zeigten im Mittel oberhalb der Norm liegende Messergebnisse für die Forcierte Vitalkapazität, für die eine Gruppe 82% und die andere Gruppe 85,2%. Weder für die Gesamtgruppe (zweiseitige Signifikanz  $p=0,417$ ), noch für die Patientengruppe aufgeschlüsselt nach monozygoten Zwillingen (zweiseitige Signifikanz  $p=0,484$ ) und Geschwistern (zweiseitige Signifikanz  $p=0,614$ ), konnte ein signifikanter Unterschied innerhalb der jeweiligen Paare nachgewiesen werden.

### 3.2.2.2. Paarvergleich Einsekundenkapazität FEV1

Der Vergleich des Forcierten expiratorischen Volumens in einer Sekunde FEV1 zeigte weder in der Gesamtgruppe (zweiseitige Signifikanz  $p=0,452$ ), noch in der Gruppe, differenziert nach Zwillingen (zweiseitige Signifikanz  $p=0,928$ ) oder Geschwistern (zweiseitige Signifikanz  $p=0,891$ ), signifikante Unterschiede. Auffallend waren die im Vergleich zur FVC unterhalb der Norm liegenden FEV1 Werte. Sie lagen für die erste Gruppe bei 63,9% und für Gruppe zwei bei 70,8%.

## 3.3. Statistischer Zusammenhang zwischen klinischem Zustand und der Adhäsionsstärke von *P. aeruginosa*

Die in Kapitel 3.2.1. aufgeführten klinischen Parameter wurden in Beziehung zu der Ausprägung der Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* gesetzt. Dafür wurden die Patienten in vier Quartile eingeteilt, die jeweils abhängig von der Adhäsionsstärke vom ersten Quartil (Minimum) bis zum vierten Quartil (Maximum) zugeordnet wurden. Die CF-Patienten mit 0-25% der Maximaladhäsion wurden dem ersten Quartil zugeordnet, 25-50% dem zweiten und 50-75% dem dritten Quartil. Im vierten Quartil befinden sich diejenigen CF-Patienten mit *Pseudomonas aeruginosa* Stämmen, die eine Adhäsionsstärke nahe an den Maximalwerten besitzen (75-100%).

### 3.3.1. Statistischer Zusammenhang zwischen der Forcierten Vitalkapazität FVC und der Adhäsion von *P. aeruginosa*

Bei Betrachtung der Mittelwerte für FVC konnte keine negative Korrelation zur gemessenen Adhäsion festgestellt werden. Vor Berechnung der Signifikanz wurde jeweils für alle weiteren Berechnungen die Homogenität der Varianzen getestet, um die Zulässigkeit des Vergleiches der Mittelwerte zu bestätigen. Die Ausprägung der Adhäsion von *Pseudomonas æruginosa* war signifikant unterschiedlich zwischen den Quartilen ( $p=0,049$ ). Die graphische Darstellung mittels Boxplots zeigte keine lineare Beziehung zwischen Adhäsion und der funktionellen Vitalkapazität im Sinne einer abfallenden Lungenfunktion bei steigender Adhäsionsstärke.

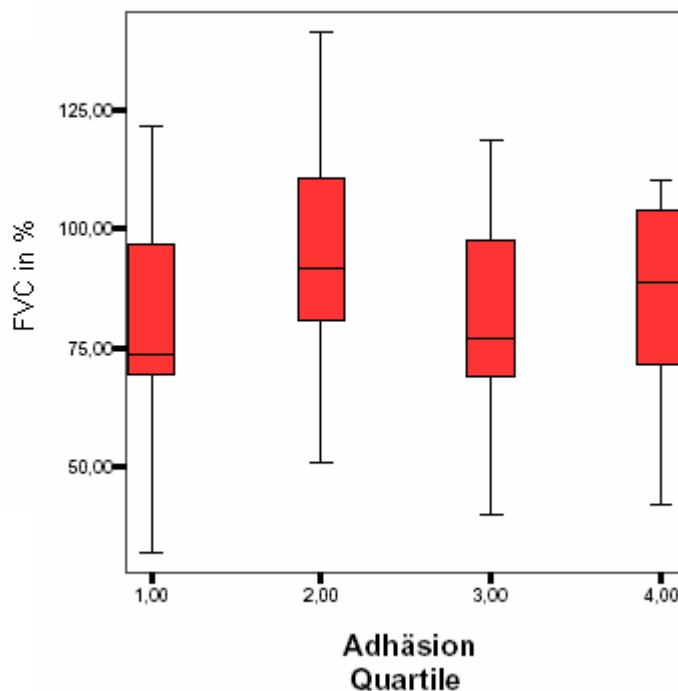


Abb. 19: Streuung von FVC nach Adhäsionsstärke

### 3.3.2. Statistischer Zusammenhang zwischen der Forcierten Einsekundenkapazität FEV1 und der Adhäsion von *P. aeruginosa*

Für die Einsekundenkapazität zeigte sich ebenfalls keine statistische Signifikanz in den Unterschieden zwischen den Quartilen ( $p=0,275$ ). Die Mittelwerte fielen nicht vom ersten bis zum vierten Quartil ab, so dass ebenso für den Lungenfunktionsparameter FEV1 kein Bezug zwischen Absinken der Lungenfunktion und steigenden Adhäsionswerten von *Pseudomonas aeruginosa* gezeigt werden konnte. Für sämtliche Quartile lagen die Werte meist im pathologischen Bereich (<80%) (Abb. 20).

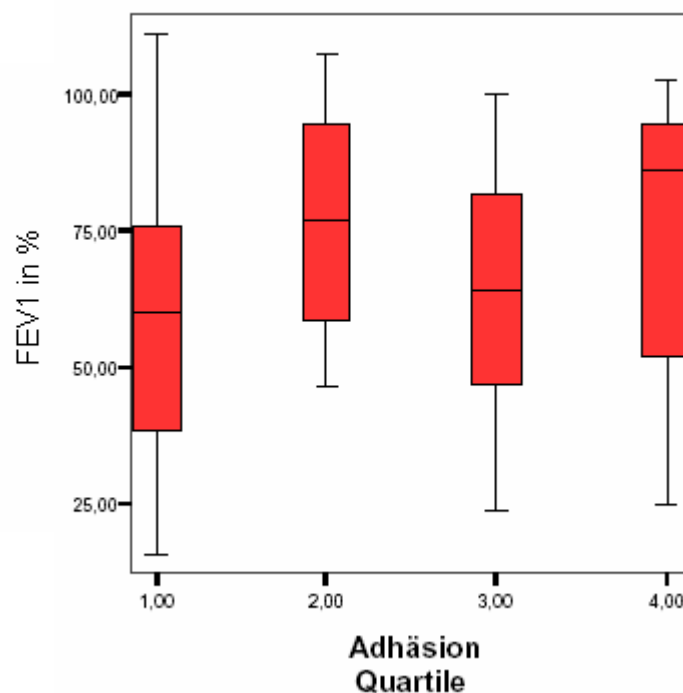


Abb. 20: Streuung von FEV1 nach Adhäsionsstärke



### **3.3.3. Zusammenhang zwischen den konkordanten klinischen Verläufen und der Adhäsion von *P. aeruginosa***

Die Zwillingspaare wurden ihrem klinischen Verlauf nach in einen konkordanten oder einen diskordanten Verlauf unterschieden. Die Gruppe der konkordanten klinischen Verläufe wurde weiter aufgeteilt in die konkordant positiven und die konkordant negativen Verläufe.

Die Gruppe der konkordant positiven Verläufe, d.h. eine für beide Patienten mild verlaufende Erkrankung, beinhaltete sieben Zwillingspaare. Diese wurden ihrerseits gemäß den klinischen Parametern, beginnend mit der mildesten Ausprägung der Erkrankung, gestaffelt. Bei intensiver Betrachtung der Extremwerte ließ sich bei dem Zwillingsspaar mit der am mildesten verlaufenden Erkrankung eine sehr gering ausgeprägte Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* verzeichnen. Im Gegensatz dazu zeigte ein Zwillingsspaar mit weniger mild verlaufender Erkrankung eine höhere Adhäsionsstärke.

In der Gruppe der konkordant negativen Zwillingspaare, die eine schwer verlaufende Erkrankung bei beiden Patienten beschreibt, wurde eine Streuung der Adhäsionsstärke beobachtet. Die Ergebnisse lagen verteilt über die gesamte Streubreite der gemessenen Adhäsionen und zeigten sowohl nah beieinander liegende als auch stark unterschiedliche Adhäsionsstärken. Die klinischen Verläufe hingegen stellten sich für beide CF-Patienten ähnlich schlecht dar. Bedeutend erschien, dass in dieser Gruppe der konkordant negativen klinischen Verläufe, im Gegensatz zur konkordant positiven Gruppe, überwiegend höhere Adhäsionsstärken zu verzeichnen waren.

### **3.3.4. Zusammenhang zwischen den diskordanten klinischen Verläufen und der Adhäsion von *P. aeruginosa***

Die Zwillingspaare mit in unterschiedlichen Schweregraden verlaufender Zystischer Fibrose wurden weiter unterteilt in eine Gruppe mit starker Diskordanz und in eine Gruppe mit mäßiger Diskordanz. Der Patientengruppe mit stark diskordanten klinischen Verläufen konnten fünf Zwillingspaare zugeordnet werden. Es zeigte sich eine hohe Varianz der gemessenen Werte für die Adhäsion mit auch sehr ähnlichen Messergebnissen innerhalb eines Geschwisterpaares.

Die Gruppe der mäßig diskordanten Verläufe bestand aus sieben Zwillings- und Geschwisterpaaren und zeigte vergleichbare Werte für die Adhäsion.

Zusammenfassend ließ sich in den Gruppen der diskordanten klinischen Verläufe anhand der Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* nicht auf den Schweregrad der Erkrankung schließen.

### **3.3.5. Zusammenhang zwischen der Anzahl phänotypisch unterschiedlicher *P. aeruginosa* Stämme und den Lungenfunktionsparametern**

Es wurden vier Gruppen beginnend mit einer bis hin zu vier verschiedenen Kolonien unterschieden.

Bei Betrachtung der zugeordneten Mittelwerte beginnend mit FVC fiel auf, dass beide Patienten mit jeweils vier verschiedenen *Pseudomonas aeruginosa* Stämmen eine eingeschränkte Forcierte Vitalkapazität FVC aufwiesen. Die drei anderen Gruppen lagen mit ihren Mittelwerten oberhalb des Normwertes von 80% (Abb. 21).

Eine hohe Streuung der Gruppe „Patienten mit drei verschiedenen Keimen“ ist erkennbar. Hierbei erzielten viele Patienten sehr niedrige Werte für FVC. Bei einem CF-Patient dieser Gruppe wurde jedoch auch die stärkste FVC gemessen.

Im weiteren Verlauf wurde dies für die Einsekundenkapazität untersucht. Es fand sich kein Zusammenhang zwischen der Anzahl phänotypisch verschiedener *Pseudomonas aeruginosa* Stämme im Sputum der Patienten und der Einsekunden-

kapazität. Diese Erkenntnisse wurden für die Analyse der Mittelwerte, der Spannweite und der Streuungsmaße bei allen Untersuchungsgruppen erzielt (Abb. 22). Daraus resultierend lässt sich das Ergebnis festhalten, dass die Anzahl vorhandener phänotypisch verschiedener *Pseudomonas aeruginosa* Stämme ohne einen eindeutig messbaren Einfluss auf die Lungenfunktionsparameter war.

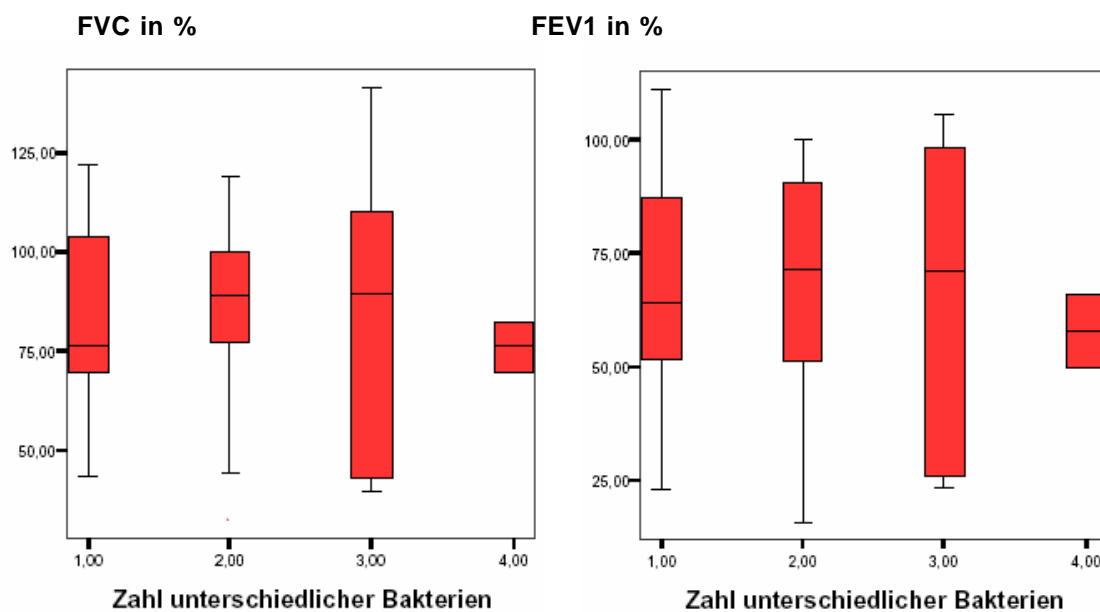


Abb. 21: Streuung von FVC nach Anzahl unterschiedlicher *P. aeruginosa* Stämme

Abb. 22: Streuung von FEV1 nach Anzahl unterschiedlicher *P. aeruginosa* Stämme

### 3.3.6. Statistischer Zusammenhang zwischen Längensollgewicht und Adhäsion von *P. aeruginosa*

Das Längensollgewicht als Parameter für den Ernährungszustand von CF-Patienten wurde mit den erhobenen Adhäsionen verglichen.

In der folgenden Tabelle sind die statistischen Parameter für das Längensollgewicht aufgezeigt:

		<b>LSG</b>
<b>Mittelwert</b>		<b>100,70</b>
<b>Standardfehler des Mittelwertes</b>		<b>1,68</b>
<b>Median</b>		<b>99,58</b>
<b>Standardabweichung</b>		<b>12,48</b>
<b>Minimum</b>		<b>74,69</b>
<b>Maximum</b>		<b>136,31</b>
<b>Perzentile</b>	<b>20</b>	<b>90,94</b>
	<b>50</b>	<b>99,58</b>
	<b>75</b>	<b>109,40</b>

Tabelle 3: Längensollgewicht LSG der Gesamtgruppe

Anhand des Mittelwertes sowie des Medians ist erkennbar, dass die vorhandenen Patientenkollektive im Durchschnitt ein normwertiges Längensollgewicht (90-110%) aufweisen. Das Minimum des erzielten Längensollgewichtes von 74,69% wird nicht zu einem kachektischen Ernährungszustand gezählt.

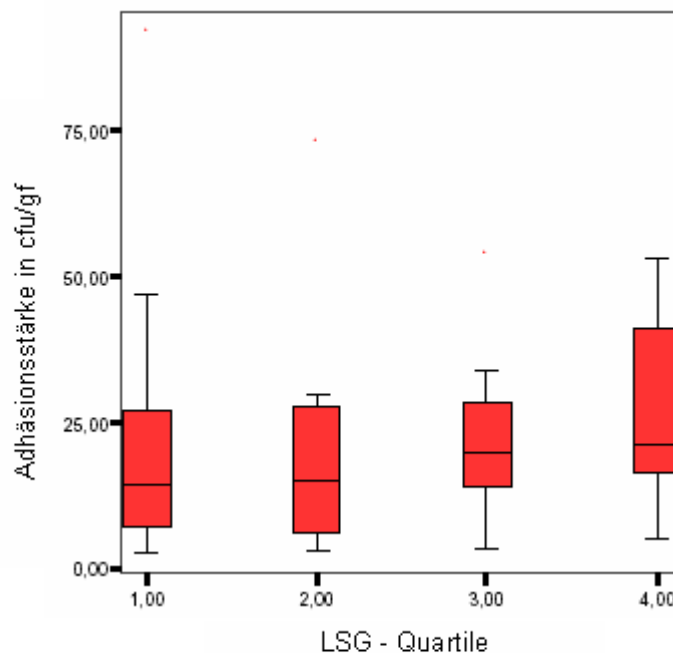


Abb. 23: Adhäsion von *P. aeruginosa* nach Längensollgewicht

Es konnte keine Korrelation zwischen dem Längensollgewicht und dem Ausmaß der Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* an A549 gezeigt werden ( $p=0,683$ ) (Abb. 23). Bei Differenzierung des Patientenkollektivs in Zwillinge und in Geschwisterpaare bestätigte sich dieses Ergebnis.

### 3.3.7. Statistischer Zusammenhang zwischen der Anzahl phänotypisch unterschiedlicher *P. a.* Stämme und dem Längensollgewicht

Nach den in Abschnitt 3.3.5. gezeigten Untersuchungen zum statistischen Zusammenhang zwischen den klinischen Daten der Lunge und der Anzahl verschiedener *Pseudomonas aeruginosa* Stämme folgte diese Untersuchung in gleicher Weise für das Längensollgewicht.

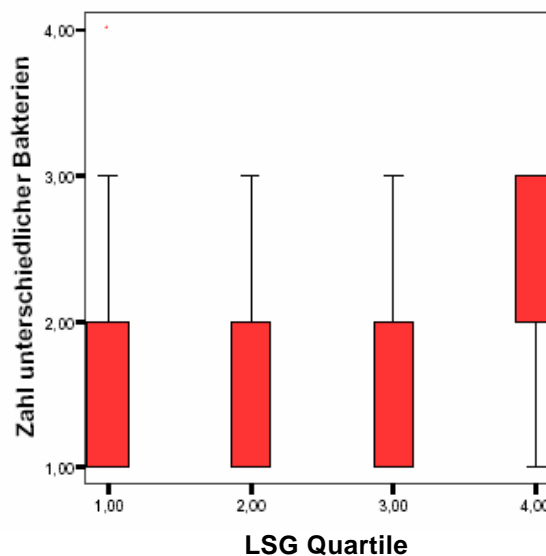


Abb. 24: Anzahl unterschiedlicher *P. aeruginosa* Stämme nach Längensollgewicht

Die graphische Darstellung zeigt, dass CF-Patienten aus dem vierten Quartil eine höhere Zahl unterschiedlicher *Pseudomonas aeruginosa* Stämme besitzen als die übrigen Quartile (Abb. 24). Dieser Zusammenhang ist jedoch statistisch nicht signifikant ( $p=0,137$ ). Eine Differenzierung in Zwillinge und Geschwister bestätigte das Ergebnis des Gesamtkollektivs dahingehend, dass die Anzahl unterschiedlicher Bakterien keine Rückschlüsse auf das Längensollgewicht als Indikator des Ernährungszustandes erlaubt.

### 3.4. Statistischer Zusammenhang zwischen Längensollgewicht und Lungenfunktionsparametern

Der Zusammenhang zwischen einem gutem Ernährungszustand (hohem Längensollgewicht) und einer guten Lungenfunktion ließ sich mit den uns zur Verfügung stehenden Daten weder für die Forcierte Vitalkapazität noch für die Einsekundenkapazität bestätigen.

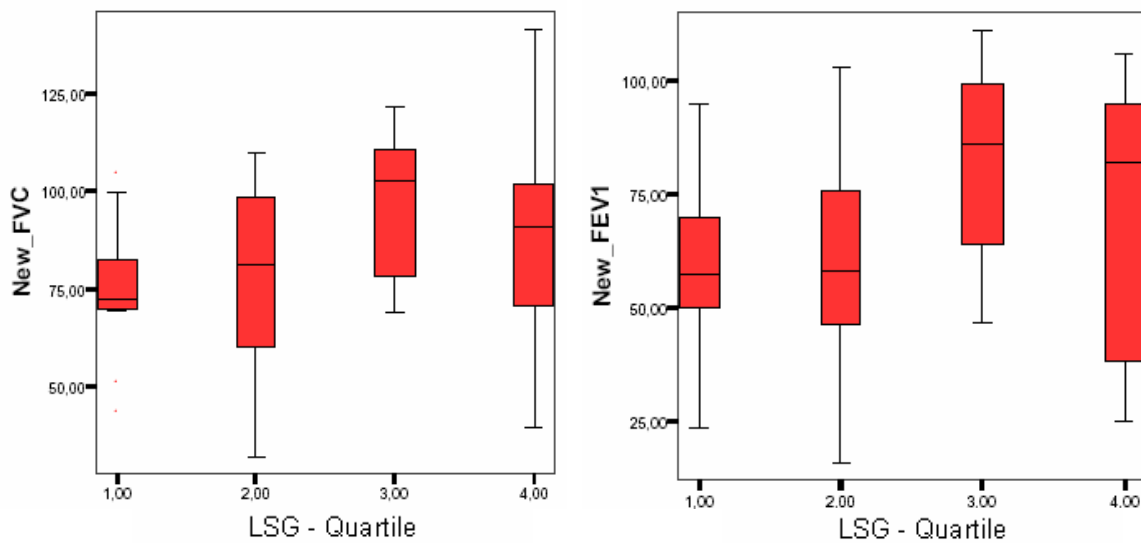


Abb. 25: Streuung von FVC und FEV1 nach Längensollgewicht

Die Verteilung verdeutlicht eine zunehmende Streuung der FVC und FEV1 in der Gruppe des vierten Quartils (Abb. 25).

Es konnte kein Zusammenhang zwischen einer pulmonalen Verschlechterung und einer daraus folgenden Verschlechterung des Ernährungszustands nachgewiesen werden.

## 4. DISKUSSION

Patienten, die an einer Zystischen Fibrose erkrankt sind, leiden an einem Gendefekt eines Chloridkanals, der zur Produktion eines hochviskösen Sekrets in verschiedenen Organen führt. In der Lunge führt dieser zähe Schleim zu einer bronchialen Obstruktion mit Neigung zur Inflammation. Es kommt zunächst zu einer Kolonisation mit *Haemophilus influenza* oder *S. aureus* und schließlich zu einer chronischen Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* [Elborn et al. 1993, Brett et al. 1988]. Diese ist in hohem Maße für den Verlauf und die Prognose der Zystischen Fibrose verantwortlich.

Der Einfluss isolierter *Pseudomonas aeruginosa* Stämme von CF-Patienten bezüglich ihrer Fähigkeit zur Adhäsion ist bei der Zystischen Fibrose kaum untersucht. Die bakterielle Adhäsion an den Oberflächenrezeptoren des respiratorischen Epithels stellt den ersten Schritt der Infektion dar. Es ist nicht bekannt, ob und wie sich dieser Virulenzfaktor innerhalb eines CF-Zwillingspaares oder CF-Geschwisterpaares unterscheidet und ob mögliche Unterschiede mit dem klinischen Verlauf korrelieren. Anhand der erhobenen klinischen Untersuchungsergebnisse der CF-Patienten werden Zusammenhänge im Erkrankungsgrad der Zystischen Fibrose und der Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* untersucht.

### 4.1. Diskussion der Methodik

Der in dieser Studie verwendete Adhäsionsassay ist eine etablierte Nachweismethode zur Überprüfung der Adhäsion von Bakterien [Di Martino et al. 2002, Schroten et al. 1992 und 1993, Baker et al. 1991, Chi et al. 1991].

Das Prinzip der Markierung von Bakterien mittels FITC wurde bereits in mehreren Studien über Virulenzfaktoren von Bakterien angewandt [Schroten et al. 1991 und 1992]. Neben seiner hohen Sensitivität und Spezifität [Samuel et al. 1988] hat der Farbstoff den Nachteil des schnellen Verblässens; dies geschieht in Abhängigkeit



von der Zeit sowie Tages- oder UV-Licht-Bestrahlung [Sedlacek et al. 1981, Picciolo und Kaplan 1985]. Aus diesem Grunde wurde der Versuchsansatz nach Markierung mit FITC mit einer Formalinlösung fixiert und unter abgedunkelten Versuchsbedingungen ausgewertet.

Zur Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde in jedem Versuchsansatz der Referenzstamm PAO1 mitgeführt; alle *Pseudomonas aeruginosa* Isolate wurden im Dreifachansatz untersucht. Der Adhäsionsassay zeigte eine gute Reproduzierbarkeit. Diese wurde anhand des jeweils mitgeführten Referenzstammes PAO1 sichergestellt.

Während der Versuche wurde beobachtet, dass die verwendete Zelllinie A549 nur bis zu einer Passage von P25 verwendet werden durfte. Höhere Passagen ergaben nicht reproduzierbare, falsch niedrige Ergebnisse und wurden für den Versuchsansatz nicht verwendet.

#### **4.2. Auswahl der klinischen Beobachtungsparameter**

Die Lungenfunktionsparameter FVC und FEV1 finden im klinischen Alltag Verwendung. Sie dienen als Verlaufparameter für den pulmonalen Zustand und zur Beurteilung von Therapieerfolgen bei der Zystischen Fibrose [Müller 2002, Rabsch 1998, Demko et al. 1995, Henry 1992, Kerem et al. 1990].

Diese Parameter sind sensitiv für den Verlauf der Zystischen Fibrose. Die intra-individuellen Schwankungen bei den klinischen Parametern sind zu berücksichtigen, so dass die erforderliche Änderung vom Ausgangswert für einen signifikanten Unterschied der Funktionellen Vitalkapazität und der Einsekundenkapazität etwa 20% beträgt [Nickerson et al. 1980].

### 4.3. Diskussion der Ergebnisse

Untersuchungen an Zwillingen und Geschwistern, die an Zystischer Fibrose erkrankt sind, zeigen bei gleicher CFTR-Mutation einen variablen klinischen Verlauf [Derichs et al. 2004]. Mit Ausnahme der Pankreasinsuffizienz [Kristidis et al. 1992] besteht keine enge Korrelation zwischen dem klinischen Verlauf und den zugrunde liegenden CFTR-Mutationen [Mickle et al. 2000, Kerem et al. 1996 und 1990]. Dies gilt auch für die delta F508 homozygoten Patienten, obwohl sie Träger der gleichen Mutation sind. Unter Zwillingen und Geschwistern mit gleicher CFTR-Mutation kann ebenfalls eine starke Diskordanz bezüglich der Klinik des pulmonalen Phänotyps bestehen [Salvatore et al. 2002, Bronsveld et al. 2001].

Maßgeblich für die Prognose und die Lebensqualität ist die pulmonale Infektion und hier vorrangig die Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa*.

Bei gleicher pulmonaler Besiedlung zeigen sich verschiedene Krankheitsverläufe bei CF-Zwillingen und Geschwistern [Picard et al. 2004]. Die unterschiedlichen klinischen Untersuchungsergebnisse für CF-Zwillinge sowie Geschwister bei gleichem Entwicklungsablauf und Umgebung, lassen die Überlegung aufkommen, ob diese Unterschiede in der *Pseudomonas aeruginosa* Infektion begründet sind.

Die in der vorliegenden Studie untersuchten 27 Geschwisterpaare, darunter acht monozygote und fünf dizygote Zwillingspaare, waren von genotypisch gleichen *Pseudomonas aeruginosa* Stämmen kolonisiert. 56% aller Patienten sind von mehreren *Pseudomonas aeruginosa* Stämmen besiedelt.

Zur Klärung, ob sich Unterschiede in der Adhäsion als wichtigen Virulenzfaktor von *Pseudomonas aeruginosa* zeigen, wurde die Adhäsion bei diesen CF-Zwillings- und Geschwisterpaaren gemessen und zwischen den Paaren verglichen.

Die vorliegende Arbeit zeigt eine weite Streuung des Virulenzfaktors Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* in der untersuchten Gesamtgruppe. Es wurden Ergebnisse von drei cfu/gf bis 73 cfu/gf gemessen, entsprechend einer sehr starken Adhäsion und einer nahezu fehlenden Adhäsion (Tabelle 4).

Zur Klassifizierung der Adhäsionsstärken von *Pseudomonas aeruginosa* wurden diese in vier verschiedene Quartile eingeteilt. Das erste Quartil beinhaltet die Gruppe der Adhäsionen bis 18 cfu/gf. Dies entspricht 25% des am höchsten erzielten Adhäsionswertes. Im zweiten Quartil wurden die Werte zwischen 18 und 36 cfu/gf eingeordnet (25-50%), dem Quartil III wurden die Werte 36 bis 54 cfu/gf zugeordnet (50-75% der höchsten Adhäsion), sowie dem Quartil IV die Adhäsionen über 54 cfu/gf (Tabelle 4).

Quartil	Prozent	Adhäsion cfu/gf
I	0 - 25%	0 – 18
II	25 - 50%	18 – 36
III	50 - 75%	36 – 54
IV	75 - 100%	54 – 73

Tabelle 4: Verteilung der Quartile für die Adhäsion von *P. aeruginosa*

So können verschiedene Adhäsionsstärken deutlicher unterschieden und entweder einer schwach ausgeprägten Adhäsion (Quartil I) oder in Quartile steigender Adhäsionsstärke (Quartil II-IV) eingeordnet werden.

In dieser Arbeit lag der überwiegende Teil der gemessenen Adhäsionen von *Pseudomonas aeruginosa* im ersten Quartil (84 von 100 untersuchten Proben) und zeigte damit eine schwache Adhäsion. Zwölf Proben wurden Quartil II zugeordnet, drei Quartil III und eine Probe, mit 72,8 cfu/gf, Quartil IV.

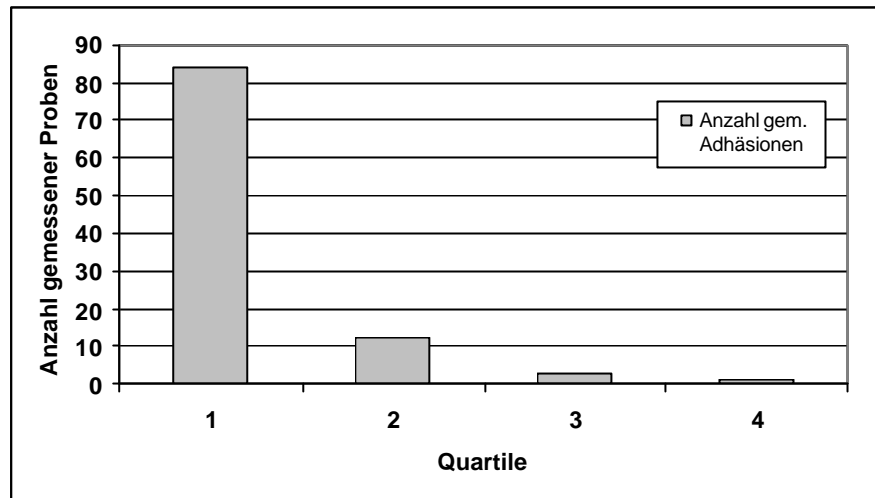


Abb. 26: Verteilung der Proben auf die Quartile

Die Gruppen der verschiedenen Adhäsionsstärken wurden nun unterteilt nach monozygoten Zwillingen- und dizygoten Zwillingen sowie Geschwisterpaaren. Aufgrund ihrer „genetischen Vergleichbarkeit“ wurde die Gruppe der dizygoten Zwillinge mit der Gruppe der CF-Geschwister zusammengefasst.

Durch die niedrige Gesamtzahl von acht monozygoten Zwillingenpaaren konnte keine Signifikanzrechnung durchgeführt werden. Jedoch fällt auf, dass die Gruppe der monozygoten Zwillingenpaare Adhäsionsstärken im gleichen Quartil aufzeigten, wohingegen die Gruppe der dizygoten Zwillingen- und Geschwisterpaare Adhäsionen in unterschiedlichen Quartilen zeigten. Für diese Gruppe war ein signifikanter Unterschied in der Ausprägung der Adhäsionsstärken beobachtbar (zweiseitige Signifikanz  $p=0,021$ ).

Zusammengefasst zeigte sich somit, im Vergleich zum signifikanten Unterschied der Adhäsionen für *Pseudomonas aeruginosa* in der Gruppe der dizygoten Zwillingen- und Geschwisterpaare, eine starke Übereinstimmung in der Ausprägung der Adhäsionen in der Gruppe der monozygoten Zwillingen. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Beobachtungen von Johansen et al., die ebenfalls eine ähnliche Ausprägung bei der chronischen *Pseudomonas aeruginosa* Infektion innerhalb monozygoter

Zwillingspaare nachweisen konnten [Johansen et al. 1991]. Die Ergebnisse zeigten die Auswirkung desselben CFTR Genotyps und lassen vermuten, dass sich die ersten Schritte der *Pseudomonas aeruginosa* Infektion in den Lungeneithelien der monozygoten Zwillingspaare gleichen.

Im weiteren Verlauf wurden die klinischen Funktionsparameter untersucht, die parallel zur Sputumprobe erhoben wurden. Es wurden die zwei Lungenfunktionsparameter FVC und FEV1 sowie das Längensollgewicht als Parameter der körperlichen Entwicklung bei Kindern ermittelt. Diese Untersuchungsparameter wurden verwendet, um den klinischen Zustand von CF-Zwillingen und Geschwistern vergleichen zu können. Da diese Parameter unabhängig von Geschlecht und Alter der Patienten sind [Goss et al. 2005, Katz et al. 2004, Bronsveld et al. 2001], wurde ebenso in dieser Studie auf eine entsprechende weitere Unterscheidung verzichtet.

Bei Betrachtung der Ergebnisse für die Lungenfunktionsparameter fiel auf, dass sich der Mittelwert aller CF-Patienten für FVC noch im Normbereich befindet, jener für FEV1 jedoch im Mittel unter der Norm liegt. Daher wurde für FVC lediglich eine geringere Unterscheidungsmöglichkeit erwartet.

Die körperliche Entwicklung bei CF-Zwillingen und Geschwistern, gemessen mittels Längensollgewicht, ist ähnlich und zeigt keinen signifikanten Unterschied [Picard et al. 2004]. Die CF-Patienten dieser Studie zeigten durchschnittlich ein im Normbereich liegendes Längensollgewicht. Der körperliche Entwicklungszustand der untersuchten CF-Patienten ist somit als gut zu bewerten.

Die CF-Zwillings- und Geschwisterpaare zeigten hinsichtlich der Einsekundenkapazität FEV1 und des Längensollgewichtes einen ähnlicheren Verlauf im Vergleich zu nicht verwandten CF-Patienten [Mekus et al. 2000]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die Beobachtung, dass weder in der Gruppe der monozygoten CF-Zwillingspaare noch in der Gruppe der CF-Geschwister ein signifikanter Unterschied in der Ausprägung ihrer Lungenfunktionen nachgewiesen werden konnte.

Diese Resultate können, neben dem gleichen genetischen Hintergrund, auf die große Bedeutung des gleichen Entwicklungsablaufes von CF-Zwillingen und Geschwistern zurückzuführen sein.

Es galt weiter zu diskutieren, ob die Stärke der Adhäsion mit dem klinischen Zustand eines CF-Patienten korreliert. Hierzu wurden die jeweiligen in dieser Studie gemessenen Werte für die Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* mit zeitnah zu der Sputumentnahme gewonnenen klinischen Funktionsparametern verglichen.

Eine signifikante Korrelation zwischen der Ausprägung der Adhäsion und den Lungenfunktionsparametern FVC und FEV1 konnte nicht festgestellt werden. In Einzelfällen war eine negative Korrelation zwischen Adhäsionsstärke und Lungenfunktionsparametern nachzuweisen.

Zur besseren Vergleichbarkeit und Eingruppierung der Zwillings- und Geschwisterpaare nach ihrem klinischen Verlauf der Zystischen Fibrose wurden basierend auf dem Phänotyp des Individuums und der klinischen Parameter drei Kategorien von Patientenpaaren unterschieden [Mekus et al. 2000]:

- ? eine in beiden Patienten mild verlaufende Zystische Fibrose
- ? eine in beiden Patienten schwer verlaufende Zystische Fibrose
- ? eine unterschiedlich verlaufende Zystische Fibrose, d.h. eine bei einem Patienten mild verlaufende und beim anderen Patienten schwer verlaufende Zystische Fibrose

Insgesamt sieben CF-Zwillingen- und Geschwisterpaare wurden der Gruppe der mild verlaufenden Erkrankungen zugeordnet, darunter zwei monozygote Zwillingspaare und fünf Geschwisterpaare. Im weiteren Verlauf wurde nach den klinischen Messergebnissen ein Ranking, beginnend mit dem Geschwisterpaar mit der mildesten Ausprägung der Erkrankung, erstellt. Anschließend wurde dieses Ranking mit den gemessenen Adhäsionen für *Pseudomonas aeruginosa* verglichen.

Hierbei fiel die beinahe durchgehend schwach ausgeprägte Adhäsionsstärke (Quartil I) in der gesamten Gruppe der mild verlaufenden Zystischen Fibrose, bezogen auf die Einsekundenkapazität, die forcierte Vitalkapazität sowie das Längensollgewicht, auf. Bei Betrachtung der einzelnen CF-Zwillingen- und Geschwisterpaare konnte ebenfalls diese annähernd ähnliche Adhäsionsstärke nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigten die CF-Zwillinge und Geschwister, die beide eine mild verlaufende Erkrankung hinsichtlich Lungenfunktion und Ernährungszustand aufwiesen, auch eine in beiden Fällen milde bzw. schwache Adhäsion.

Diese Untersuchungsergebnisse sprechen damit für eine Korrelation einer gering ausgeprägten Adhäsionsstärke von *Pseudomonas aeruginosa* mit einer mild verlaufenden Lungenerkrankung sowie einer guten Gewichtsentwicklung.

Der Gruppe der konkordant negativen klinischen Verläufe wurden sechs Zwilling- und Geschwisterpaare, darunter zwei monozygote Zwillingspaare, zugeordnet.

Es zeigt sich, dass sich die Adhäsionen von *Pseudomonas aeruginosa* zwischen den CF-Geschwistern gleichen und damit den in beiden Geschwisterteilen gleichen klinischen Verlauf widerspiegeln. Außerdem wurden für diese Gruppe im Vergleich zur Gruppe der mild verlaufenden Zystischen Fibrose insgesamt höhere Werte für die Adhäsion (bis IV. Quartil) von *Pseudomonas aeruginosa* gemessen.

Diese Ergebnisse korrelieren dementsprechend mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung, bei dem höhere Adhäsionsstärken von *Pseudomonas aeruginosa* mit einem schwereren Verlauf der Erkrankung einhergehen. Möglicherweise spielt die stärker ausgeprägte Fähigkeit zur Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* eine Rolle im schweren klinischen Verlauf der Zystischen Fibrose.

Bei zwölf Geschwisterpaaren, davon drei monozygote und zwei dizygoten Zwillingspaare, handelte es sich um eine unterschiedlich (diskordant) verlaufende Zystische Fibrose.

Insgesamt zeigte sich eine starke Streuung der Messergebnisse für diese Geschwisterpaare. Es wurden sowohl gleiche, in einem Quartil befindliche Adhäsionen, als auch stark unterschiedliche Adhäsionen von Geschwisterpaaren beobachtet.

Weiterhin auffallend ist in dieser Gruppe der diskordant verlaufenden Zystischen Fibrose, dass für fünf Zwillingspaare jeweils gleiche Adhäsionen (gleiches Quartil) von *Pseudomonas aeruginosa* gemessen wurden. Hier zeigte sich trotz unterschiedlichen klinischen Verlaufs eine Ähnlichkeit der Adhäsionsstärken. Es konnte ebenfalls keine Korrelation zwischen einer hohen Adhäsionsstärke von *Pseudomonas aeruginosa* und einer schweren klinischen Situation beobachtet werden.

Fünf Geschwisterpaare wurden aufgrund der stark unterschiedlichen klinischen Untersuchungsergebnisse der Gruppe, der am stärksten klinisch divergent verlaufenden Zystischen Fibrose, zugeordnet. Von diesen fünf Geschwisterpaaren ist eines ein monozygoten sowie eines ein dizygoten Zwillingspaar. Ihre Lungenfunktionsparameter und der Entwicklungsstatus unterscheiden sich deutlich, die Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* jedoch liegt in drei von fünf Zwillings- und Geschwisterpaaren im gleichen Quartil.

Für die Gruppe der diskordant verlaufenden Zystischen Fibrose kann somit insgesamt keine Korrelation zwischen Schweregrad der Erkrankung und gemessener Adhäsionsstärke nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann in der vorliegenden Arbeit für einzelne Zwillingspaare eine Ähnlichkeit (gleiches Quartil) in der Intensität der Adhäsionen von *Pseudomonas aeruginosa* festgestellt werden. Der Virulenzfaktor Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* ist dennoch keine für einen bakteriellen Genotyp spezifische Eigenschaft, sondern wahrscheinlich abhängig von externen Faktoren.

Aus Studien an Mäusen kann beispielsweise eine unterschiedlich ausgeprägte *Pseudomonas aeruginosa* Infektion an genetisch identischen Mäusen gezeigt werden, die auf eine unterschiedliche Fähigkeit zur Produktion von Alginate zurückgeführt wird [Hoffmann et al. 2005].

Die klinische Ausprägung der Zystischen Fibrose innerhalb der Zwillings- und Geschwisterpaare ist in der Gesamtgruppe sehr variabel. Auch für die Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* kann einzig in der Gruppe der mild verlaufenden Zystischen Fibrose eine Korrelation beobachtet werden. Außerdem wird neben Umwelteinflüssen der Verlauf der pulmonalen Erkrankung möglicherweise auch durch weitere genetische Faktoren, die so genannten modifizierenden Gene, beeinflusst.

Studien weisen auf eine wesentliche Rolle dieser genetischen Faktoren für die intestinale Manifestation der Zystischen Fibrose hin [Cutting 2005]. An der Ausbildung des pulmonalen Phänotyps der Zystischen Fibrose ergeben sich Hinweise auf die Beteiligung mehrerer chromosomaler Regionen [Kent et al. 1997].



Auch Haston et al. zeigen, dass unterschiedliche Regionen an der Ausbildung verschiedener pulmonaler Phänotypen beteiligt sind [Haston et al. 2002]. So können Unterschiede im anatomischen Aufbau (Dicke und Anzahl der Alveolen) der Lunge zwischen CF-Zwillingen möglicherweise eine Bedeutung in der unterschiedlichen Ausprägung einer *Pseudomonas aeruginosa* Infektion darstellen.

## 5. Literaturverzeichnis

**Abman SH., Ogle JW., Harbeck RJ., Butler-Simon N., Hammond KB., Accurso FJ. (1991)**

Early bacteriologic, immunologic, and clinical courses of young infants with cystic fibrosis identified by neonatal screening.

*J Pediatr* (1991); 119(2): 211-7

**Albus A., Saalman M., Tesch H., Pedersen SS., Döring G. (1989)**

Increased levels of IgG subclasses specific for *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme and polysaccharide antigens in chronically infected patients with cystic fibrosis.

*APMIS* (1989); 79: 1146-1148

**Alton EW., Currie D., Logan-Sinclair R., Warner JO., Hodson ME., Geddes DM. (1990)**

Nasal potential difference: a clinical diagnostic test for cystic fibrosis.

*Eur Respir J* (1990); 3: 922-926

**Andersen DH. (1938)**

Cystic Fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease.

*Am J Dis Child* (1938); 56: 344-399

**Andersen DH. (1946)**

Celiac syndrome: Genetics of the cystic fibrosis of the pancreas with a consideration of ethiology.

*Am J Dis Child* (1946); 72: 62-80

**Anderson MP., Berger HA., Rich DP., Gregory RJ., Smith AE., Welsh MJ. (1991)**

Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel.

*Cell* (1991); 67: 775-784

**Armstrong DS., Grimwood K., Carzino R., Carlin JB., Olinsky A., Phelan PD. (1995)**

Lower inspiratory tract infection and inflammation in infants with newly diagnosed cystic fibrosis.

*BMJ* (1995); 310: 1571-1572

**Azghani AO., Idell S., Bains M., Hancock RE. (2002)**

*Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesion in bacterial binding to lung epithelial cells in culture.

*Microb Pathog* (2002); 33 (3): 109-14

**Baker NR., Minor V., Deal C., Shahrabadi MS., Simpson DA., Woods D. (1991)**

*Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is an adhesion.

*Infect Immun* (1991); 59: 2859-2863

**Barghouthi S., Guerdoud LM., Speert DP. (1996)**

Inhibition by dextran of *Pseudomonas aeruginosa* adherence to epithelial cells.

*Am J Respir Crit Care Med* (1996); 154: 1788-1793

**Bauernfeind A., Przyklenk B. (1997)**

Microbiological background for anti-*Pseudomonas aeruginosa* vaccination in cystic fibrosis.

*Behring Institut Mitt* (1997); 98: 256-261

**Baumann U., Fischer JJ., Gudowius P., Lingner M., Herrmann S., Tümmler B., von der Hardt H. (2001)**

Buccal adherence of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis under long-term therapy with azithromycin.

*Infection* (2001); 29(1): 7-11

**Bear CE., Li C., Kartner N., Bridges RJ., Jensen TJ., Ramjeesingh M., Riordan JR. (1992)**

Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR).

*Cell* (1992); 68: 809-818

**Blaschke-Hellmessen R., Spitzer H., Paul KD., Hoffmann C. (1991)**

Mycological surveillance of children with cystic fibrosis.

*Mycoses* (1991);34 (1): 43-7

**Boßhammer J., Fiedler B., Gudowius P., von der Hardt H., Römling U., Tümmler B. (1995)**

Comparative hygienic surveillance of contamination of pseudomonads in a cystic fibrosis ward in a four year period.

*J Hosp Inf* (1995); 31: 261-274

**Bourke W., Kamp D., Dunn M., Chang SW. (1998)**

Bacterial toxin-induced pulmonary epithelial cytotoxicity and protective effect of dibutyryl-cAMP.

*Ir J Med Sci* (1998); 167: 19-21

**Bourke W., O'Connor CM., FitzGerald MX., McDonnell TJ. (1994)**

*Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A induces pulmonary endothelial cytotoxicity: protection by di-butyryl-cAMP.

*Eur Respir J* (1994); 7: 1754-1758

**Brett MM., Ghonheim ATM., Littlewood JM. (1988)**

Prediction and Diagnosis of early *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Cystic Fibrosis: a Follow-Up Study.

*J Clin Microbiol* (1988); 26: 1565-1570

**Bronsveld I., Mekus F., Bijman J., Ballmann M., de Jonge HR., Laabs U., Halley DJ., Ellemunter H., Mastella G., Thomas S., Veeze HJ., Tümmler B. (2001)**

Chloride conductance and genetic background modulate the cystic fibrosis phenotype of Delta F508 homozygous twins and siblings.

*J Clin Invest* (2001); 108 (11): 1705-15

**Bronsveld I., Mekus F., Bijman J., Ballmann M., Greipel J., Hundrieser J., Halley DJ., Laabs U., Busche R., de Jonge HR., Tümmler B., Veeze HJ. (2000)**

Residual chloride secretion in intestinal tissue of deltaF508 homozygous twins and siblings with cystic fibrosis. The European CF Twin and Sibling Study Consortium.

*Gastroenterology* (2000); 119 (1): 32-40

**Brown MR., Collier PJ., Gilbert P. (1990)**

Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: modification of the cell envelope and batch and continuous culture studies.

*Antimicrob Agents Chemother* (1990); 34: 1623-1628

**Bruderer U., Cryz SJ. jr., Schaad UB., Deusinger M., Que JU., Lang AB. (1992)**

Affinity Constants of Naturally Acquired and Vaccine-Induced Anti-*Pseudomonas aeruginosa* Antibodies in Healthy Adults and Cystic Fibrosis Patients.

*J Infect Dis* (1992): 344-349

**Cervin MA., Simpson DA., Smith AL., Lory S. (1994)**

Differences in eucaryotic cell binding of *Pseudomonas*.

*Microbial Pathogenesis* (1994); 17: 291-299

**Cheng SH., Rich DP., Marshall J., Gregory RJ., Welsh MJ., Smith AE. (1991)**

Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel.

*Cell* (1991); 66: 1027-1036

**Chi E., Mehl T., Nunn D., Lory S. (1991)**

Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with A549 pneumocyte cells.

*Infect Immun* (1991); 59 (3): 822-828

**Chronos ZC., Wert SE., Livingston JL., Hasset DJ., Whitsett JA. (2000)**

Role of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa* in vivo.

*J Immunol* (2000); 165(7): 3941-50

**Conway SP., Simmonds EJ., Littlewood JM. (1992)**

Acute severe deterioration in cystic fibrosis associated with influenza A virus infection.

*Thorax* (1992); 47: 112-114

**Corey M., McLaughlin FJ., Williams M., Levinson H. (1988)**

A comparison of survival, growth and pulmonary function in patients with cystic fibrosis in Boston and Toronto

*J Clin Epidemiol* (1988); 41: 583-591

**Costerton JW., Lewndowski Z., DeBeer D., Caldwell D., Korber D., James G. (1994)**

Biofilms, the customized Microniche.

*J Bacteriol.* (1994); 176 (8): 2137-2142

**Costerton JW., Stewart PS., Greenberg EP. (1999)**

Bacterial biofilms: A common cause of persistent infection.

*Science* (1994); 284: 1318-1322

**Cutting GR (2005)**

Modifier Genetics: Cystic fibrosis.

*Annu Rev Genomics Hum Genet.* (2005); 6: 237-60

**Davies J., Dewar A., Bush A., Pitt T., Gruenert D., Geddes DM., Alton AW. (1999)**

Reduction in the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to native cystic fibrosis epithelium with antiasialoGM1 antibody and neuraminidase inhibition.

*Eur Respir J* (1999); 13: 565-570

**Davies JC. (2002)**

New therapeutic approaches for cystic fibrosis lung disease.

*J R Soc Med* (2002); 95: 58-67

**Dealler SF., Holton A. (1992)**

*Pseudomonas aeruginosa* is retained in the bronchi of cystic fibrosis by an increased transepithelial potential.

*Medical Hypotheses* (1992); 37: 186-190

**Demko CA., Byard CJ., Davis PB. (1995)**

Gender differences in cystic fibrosis: *Pseudomonas aeruginosa* Infection.

*J Clin Epidemiol* (1995); 48: 1041-1049

**Deretic V., Govan JRW., Konyecsni WM., Martin DW. (1990)**

Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: Mutations in the muc-loci affect transcription of the algR and algD genes in response to environmental stimuli.

*Molec Microbiol* (1990); 4: 189-196

**Deretic V., Schurr MJ., Boucher JC., Martin DW. (1994)**

Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucoidity in cystic fibrosis: Environmental stress and regulation of bacterial virulence by alternative sigma factors.

*J Bacteriol* (1994); 176: 2773-2780

**Derichs N., Mekus F., Bronsveld I., Bijman J., Veeze HJ., von der Hardt H., Tümmler B., Ballmann M. (2004)**

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) mediated residual chloride secretion does not protect against early chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in F508del homozygous cystic fibrosis patients.

*Pediatr Res* (2004); 55 (1): 69-75

**Di Martino P. (2001)**

Effects of antibiotics on adherence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens* to human fibronectin.

*Chemotherapy* (2001); 47: 344-9

**Di Martino P., Gagniere H., Berry H., Bret L. (2001)**

Antibiotic resistance and virulence properties of *Pseudomonas aeruginosa* strains from mechanically ventilated patients with pneumonia in intensive care units: comparison with imipenem-resistant extra-respiratory tract isolates from uninfected patients.

*Microbes Infect* (2002); 4(6): 613-20

**Di Martino P., Rebiere-Huet J., Hulen C. (2000)**

Effects of antibiotics on adherence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens* to A549 pneumocyte cells.

*Chemotherapy* (2000); 46: 129-34

**Dinwiddie R. (2000)**

Pathogenesis of lung disease in cystic fibrosis.

*Respiration* (2000); 67: 3-8

**DiSant'Agnesse P., Anderson D. (1946)**

Celiac syndrome. IV. Chemotherapy in infection of the respiratory tract associated with cystic fibrosis of the pancreas.

*Am J Dis Child* (1946); 72: 17-61

**Döhring RV., Bauernfeind A., Lenz W., Przyklenk B. (1990)**

Staphylococcus aureus in patients with cystic fibrosis – an epidemiological analysis using a combination of traditional and molecular methods.

*Infection* (1990); 18: 57-60

**Döring G. (1997)**

Cystic fibrosis respiratory infections: interactions between bacteria and host defence.

*Monaldi Arch Chest Dis* (1997); 52: 363-6

**Döring G. (1998)**

Impfung gegen *Pseudomonas aeruginosa*.

Hygiene Institut der Universität Tübingen.

HOS multimedia Online Service GmbH & Co KG 1998

**Döring G., Bellon G., Knight R. (1995)**

Immunology of cystic fibrosis. In: Hodson, Geddes (eds): Cystic fibrosis.

*Chapman and Hall*, London (1995): 99-129

**Döring G., Frank F., Boudier C., Herbert S., Fleischer B., Bellon G. (1990)**

Microbiology of airway disease with cystic fibrosis of *Pseudomonas aeruginosa*.

*Clin Microbiol Rev* (1991); 4 (1): 35-51

**Dolan CV., Boomsma DI. (1998)**

Optimal selection of sib pairs from random samples for linkage analysis of a QTL using the EDAC test.

*Behav Genet* (1998); 28: 197-206

**Dork T., Mekus F., Schmidt K., Boßhammer J., Fislage R., Heuer T., Dziadek V., Neumann T., Kalin N., Wulbrand U., Wulf B., von der Hardt H., Maaß G., Tümmler B. (1994)**

Detection of more than 50 different CFTR mutations in a large group of German cystic fibrosis patients.

*Hum Genet* (1994); 94 (5): 533-42

**DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (2002)**

A549 Cell culture data

**Eberl L., Tümmler B. (2004)**

*Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia caryophylli* in cystic fibrosis: genome evolution, interactions and adaptation.

*Int J Med Microbiol.* (2004); 294: 123-31



**Elborn JS., Cordon SM., Shale DJ. (1993)**

Host inflammatory responses to first isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from sputum in Cystic Fibrosis.

*Pediatr Pulmonol* (1993); 15: 287-291

**Elborn JS., Schale DJ. (1990)**

Lung injury in cystic fibrosis.

*Thorax* (1990); 45: 970

**Fanconi G., Uehlinger E., Knauer C. (1936)**

Das Zöliakiesyndrom bei angeborener systemischer Pankreasfibromatose und Bronchiektasen.

*Wiener Med Wochenschr* (1936); 86: 753

**Feldman M., Bryan R., Rajan S., Scheffler L., Brunnert S., Tang H., Prince A. (1998)**

Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection.

*Infect Immun* (1998); 66: 43-51

**FitzGerald D., Morris RE., Saelinger CB. (1980)**

Receptor-mediated internalization of *Pseudomonas* toxin by mouse fibroblasts.

*Cell* (1980); 21: 867-873

**FitzSimmons S.C. (1993)**

The changing epidemiology of Cystic Fibrosis.

*J Pediatr* (1993); 122: 1-9

**Fleiszig SMJ., Arora SK., Van R., Ramphal R. (2001)**

FlhA, a component of the Flagellum assembly apparatus of *Pseudomonas aeruginosa*, plays a role in internalization by corneal epithel cells.

*Infect Immun* (2001); 69: 4931-4937

**Fomsgaard A. (1990)**

Antibodies to lipopolysaccharides: Some diagnostic and protective aspects.

*APMIS* (1990); 18: 5-38

**Freedman SA., Blanco PG., Zaman MM., Shea JS., Ollero M., Hopper IK., Weed DA., Gelrud A., Regan MM., Laposata M., Alvarez JG., O'Sullivan BP. (2004)**

Association of cystic fibrosis with abnormalities in fatty acid metabolism.

*N Engl J Med* (2004); 350: 560-569

**Gan KH., Veeze HJ., van der Ouweland AMW., Halley DJJ., Scheffer H., van der Hout A., Overbeek SE., de Jongste JC., Bakker W., Heijermann HGM. (1995)**

A cystic fibrosis mutation associated with mild lung disease.

*N Engl J Med* (1995); 333: 95-99

**Garrity-Ryan L., Kazmierczak B., Kowai R., Comolli J., Hauser A., Engel JN. (2000)**

The Arginin finger domain of ExoT contributes to actin cytoskeleton disruption and inhibition of internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by epithelial cells and macrophages.

*Infect Immun* (2000); 68: 7100-7113

**Gibson LE., Cooke RE. (1959)**

A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis.

*Pediatrics* (1959); 23: 545-549

**Gilligan PH. (1991)**

Microbiology of airway disease with cystic fibrosis.

*Clin Microbiol Rev* (1991); 4 (1): 35-51

**Giwerzman B., Jensen ET., Hoiby N., Kharazmi A., Costerton JW. (1991)**

Induction of Beta-Lactamase Production in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms.

*Antimicrob Agents Chemother* (1991); 35: 1008-1010

**Goldstein W., Döring G. (1986)**

Lysosomal enzymes from polymorphonuclear leucocytes and proteinase inhibitors in patients with cystic fibrosis.

*Am Rev Respir Dis.* (1986); 134: 49-56

**Goss CH., Rubenfeld GD., Ramsey BW., Aitken ML. (2005)**

Clinical trial participants compared to non-participants in cystic fibrosis.

*Am J Respir Crit Care Med.* (2005); 28

**Govan JRW. (1990)**

The microbiology and therapy of cystic fibrosis lung infections.

*Rev Med Microbiol* (1990); 1:19-28

**Govan JRW. (1990)**

Characteristics of mukoid *Pseudomonas aeruginosa* *in vitro* et *in vivo*. In: Gacesa P., Russel N.J. (eds): *Pseudomonas* infection and alginats: Biochemistry, genetics and pathology.:

*Chapman and Hall*, London (1990): 50-75

**Govan JRW., Deretic V. (1996)**

Micribial pathogenesis in Cystic fibrosis: Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*.

*Microbiol Rev* (1996); 60: 539-574

**Govan JRW., Nelson JW. (1992)**

Microbiology of lung infection in cystic fibrosis.

*British Medical Bulletin* (1992); 45: 913-929

**Granström M., Ericsson A., Strandvik B., Wretling B., Pavlovskis OR., Berka R., Vasil ML. (1984)**

Relation between antibody response to *Pseudomonas aeruginosa* exoproteins and colonization/infection in patients with cystic fibrosis.

*Acta Paediatr Scand* (1984); 73: 772-777

**Gudowius P., Boßhammer J., Römling U., Tümmler B., von der Hardt H. (1995)**

Trail of chemical disinfecting system for washbasins at the Medizinische Hochschule Hannover.

*Hyg Med* (1995); 20: 482-491

**Gudowius P., Hammes D., Salehin D., Tümmler B., Schrotten H. (2003)**

Adhäsion sequenzieller Bakterienisolate von Mukoviszidosepatienten mit chronischer *Pseudomonas aeruginosa* Infektion.

7. Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin, Berlin

*Infection* (2003); 31 (Suppl.1): 159

**Gupta SK., Berk RS., Masinick S., Hazlett LD. (1994)**

Pili and lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* bind to the glycolipid asialo GM1.

*Infect Immun* (1994); 62: 4572-4579

**Haase G., Skopnik H., Groten T., Kusenbach G., Posselt HG. (1991)**

Long-term fungal culture of sputum from patients with cystic fibrosis

*Mycoses* (1991); 34 (1): 49-52

**Hahn HP. (1997)**

The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*—a review.

*Gene* (1997); 192 (1): 99-108

**Haston CK., McKerlie C., Newbigging S., Corey M., Rozmahel R., Tsui LC. (2002)**

Detection of modifier loci influencing the lung phenotype of cystic fibrosis knockout mice.

*Mamm Genome* (2002); 13: 605-613

**Hata J.S., Fick RB. jr. (1991)**

Airway adherence of *Pseudomonas aeruginosa*: mucoexopolysaccharide binding to human and bovine airway proteins.

*J Lab Clin Med* (1991);17: 410-422

**Hatano K., Goldberg JB., Pier GB. (1993)**

*Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide: Evidence that the O Side Chains and Common Antigens are on the same molecule.

*J Bacteriol* (1993); 175: 5117-5128

**Hatano K., Goldberg JB., Pier GB. (1995)**

Biologic activities of antibodies to the neutral-polysaccharide component of the *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide are blocked by O side chains and mucoid exopolysaccharide (Alginate).

*Infect Immun* (1995); 63: 21-26

**Henry LH., Mellis CM., Petrovic L. (1992)**

Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* is a marker of poor survival in cystic fibrosis.

*Pediatr Pulmonol* (1992); 12: 158-161

**Hoffmann N., Rasmussen TB., Jensen PO., Stub C., Hentzer M., Molin S., Ciofu O., Givskov M., Johansen HK., Hoiby N. (2005)**

Novel mouse model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection mimicking cystic fibrosis.

*Infect Immun* (2005); 73: 2504-14

**Hoiby N. (1974)**

*Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: Relationship between mukoid strains of *Pseudomonas aeruginosa* and the humeral immun response.  
*Acta Path Microbiol Scan Sect. B* (1974); 82: 551-558

**Hoiby N. (1974)**

Epidemiological investigations of the respiratory tract bacteriology in patients with cystic fibrosis.  
*Acta Paediatr Scan* (1974); 82: 547-550

**Hoiby N. (1977)**

*Pseudomonas aeruginosa* Infection in Cystic Fibrosis: Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. A survey.  
*Acta Path Microbiol Scan Sect. B* (1974); 82: 551-558

**Hoiby N. (1982)**

Microbiology of lung infections in cystic fibrosis patients.  
*Acta Paediatr Scand Suppl* (1982); 301: 33-54

**Hoiby N. (1995)**

Microbiology of cystic fibrosis. In: Hodson, Geddes (eds): Cystic Fibrosis.  
*Chapman and Hall*, London (1995): 75-91

**Hoiby N. (1998)**

*Pseudomonas* in Cystic Fibrosis: past, presence, future.  
22. European CF Conference, Berlin 1998.

**Hoiby N., Koch C. (1990)**

Cystic fibrosis. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis and its management.  
*Thorax* (1990); 45: 881-884

**Horrevorts AM., Borst J., Puyk RJT., Ridder de R., Dzoljic-Danilovic G., Degener JE., Kerrebijn KE., Michel MF. (1990)**

Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis.  
*J Med Microbiol* (1990); 31: 119-124

**Hudson VL., Wielenski CL., Regelmann WE. (1993)**

Prognostic implications of initial oropharyngeal bacterial flora in patients with cystic fibrosis diagnosed before the age of two years.

*J Pediatr* (1993); 122: 854-860

**Hybiske K., Ichikawa JK., Huang V., Lory SJ., Machen TE. (2004)**

Cystic fibrosis airway epithelial cell polarity and bacterial flagellin determine host response to *Pseudomonas aeruginosa*.

*Cell Microbiol* (2004); 6 (1): 49-63

**Imundo L., Barasch J., Prince A., Al-Aquati Q. (1994)**

Cystic fibrosis cells have a receptor for pathogenetic bacteria on their apical surface.

*Proc Natl Acad Sci* (1995); 92: 3019-3023

**Jendrossek V., Grassme H., Mueller I., Lang F., Gulbins E. (2001)**

*Pseudomonas aeruginosa*-induced apoptosis involves mitochondria and stress-activated protein kinases.

*Infect Immun* (2001); 69: 2675-2683

**Jensen ET., Giwerzman B., Ojeniyi B., Bangsberg GM., Hansen A., Koch C. (1997)**

Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis and the possible role of contamination by dental equipment.

*J Hosp Infect* (1997); 36: 117-122

**Jensen ET., Kharazmi A., Garred P., Kronberg G., Fomsgaard A., Mollnes TE. Hoiby N. (1993)**

Complement activation by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms.

*Microb Pathog* (1993); 15: 377-388

**Johansen HK., Hoiby N. (1992)**

Seasonal onset of initial colonisation and chronic infection with *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis.

*Thorax* (1992); 47: 109-111

**Johansen HK., Nir M., Hoiby N., Koch C., Schwartz M. (1991)**

Severity of cystic fibrosis in patients homozygous and heterozygous for deltaF508 mutation.

*Lancet* (1991); 337: 631-634

**Johnson MK., Boese-Marrazzo D. (1980)**

Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*.  
*Infect Immun* (1980); 29: 1028-1033

**Katz SL., Strug LJ., Coates AL., Corey M. (2004)**

Disease severity in siblings with cystic fibrosis.  
*Pediatr Pulmonol* (2004); 37: 407-412

**Kent G., Iles R., Bear CE., Huan LJ., Griesenbach U., McKerlie C., Frndova H., Ackerley C., Gosselin D., Radzioch D., O´Brodivich H., Tsui LC., Buchwald M., Tanswell AK. (1997)**

Lung disease in mice with cystic fibrosis.  
*Clin Invest* (1997); 100: 3060-3069

**Kerem BS., Kerem E. (1996)**

The molecular basis of disease variability in cystic fibrosis.  
*Eur J Hum Genet* (1996); 4: 65-73

**Kerem BS., Rommens JM., Buchanan JA., Markiewicz D., Cox TK., Chakravarti A., Buchwald M., Tsui L-C. (1989)**

Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis.  
*Science* (1989); 245: 1073-1080

**Kerem E., Corey M., Gold R., Levison H. (1990)**

Pulmonary function and clinical course in patients with cystic fibrosis after pulmonary colonisation with *Pseudomonas aeruginosa*.  
*J Pediatr* (1990); 116: 714-719

**Kerem E., Corey M., Kerem BS., Rommens J., Markiewicz D., Levison H., Tsui LC., Durie P. (1990)**

The relationship between genotype and phenotype in cystic fibrosis – analysis of the most common mutation (dF508).  
*N Engl J Med* (1990); 323: 1517-1522

**Khan TZ., Wagener JS., Bost T., Martinez J., Accurso FJ., Riches DW. (1995)**

Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis.  
*Am J Respir Crit Care Med.* (1995);151(4): 1075-82

**Kharazmi A., Giwercman B., Hoiby N. (1999)**

Robbins device in biofilm research.

*Biofilms* (Methods in Enzymology) (1999); 310: 207-215

**Kharazmi A., Schiøtz PO., Hoiby N. (1986)**

Demonstration of neutrophil chemotactic activity in the sputum of cystic fibrosis patients with *Pseudomonas aeruginosa* infection.

*Eur J Clin Invest* (1986); 16: 143-148

**King DN., Heeley AF., Walsh MP., Kuzemko JA. (1979)**

Sensitive trypsin assay for dried blood specimens as a screening procedure for early detection of cystic fibrosis.

*Lancet* (1979); 2: 1217-1219

**Kishioka C., Okamoto K., Hassett DJ., de Mello D., Rubin BK. (1999)**

*Pseudomonas aeruginosa* alginate is a potent secretagogue in the isolated ferret trachea.

*Pediatr Pulmonol* (1999); 27: 174-179

**Koch C., Hoiby N. (1993)**

Pathogenesis of Cystic Fibrosis.

*Lancet* (1993); 341: 1065-1069

**Knowles MR., Durie PR. (2002)**

What is cystic fibrosis?

*N Engl J Med* (2002); 347 (6): 439-442

**Knowles MR., Paradiso AM., Boucher RC. (1995)**

In vivo nasal potential difference: techniques and protocols for assessing efficacy of gene transfer in cystic fibrosis.

*Hum gene Ther* (1995); 6: 445-455

**Kristidis P., Bozon D., Corey M., Markiewicz D., Rommens J., Tsui LC., Durie P. (1992)**

Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis.

*Am J Hum Genet* (1992); 50: 1178-1184



**Kronborg G. (1998)**

Lipopolysaccharide (LPS), LPS-immune complexes and cytokines as inducers of pulmonary inflammation in patients with Cystic Fibrosis and chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection.  
*APMIS* (1995); 50: 1-30

**Kronborg G., Shand G.H., Fomsgaard A., Hoiby N. (1992)**

Lipopolysaccharide is present in immune complexes isolated from sputum in patients with cystic fibrosis and chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection.  
*APMIS* (1992); 100: 175-180

**Le Bourgeois M. (2003)**

Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* and Other gram-negative bacteria in cystic fibrosis.  
*Arch Pediatr* (2003); 10 (2): 352s-357s

**Levis PA. (1998)**

The epidemiology of cystic fibrosis. In: Hodson, Geddes (eds): Cystic fibrosis.  
*Chapman and Hall*, London (1995): 1-13

**Linker A., Jones RS. (1966)**

A new polysaccharide resembling alginic and isolated from pseudomonads.  
*J Biol Chem* (1966); 241: 3845-3851

**Liu PV., Wang S. (1990)**

Three major somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*.  
*J Clin Microbiol* (1990); 28: 922-925

**Liu PV., Yoshii S., Hsieh H. (1973)**

Exotoxins of *P. aeruginosa*. II. Concentration, purification, and characterization of exotoxin A.  
*J Infect Dis* (1973): 514-519

**Lyczak JB., Cannon CL., Pier GB. (2002)**

Lung infections associated with cystic fibrosis.  
*Clin Microbiol Rev* (2002); 15 (2): 194-222

**Machan ZA., Pitt TL., White W., Watson D., Taylor GW., Cole PJ., Wilson R. (1991)**

Interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*: Description of an antistaphylococcal substance.

*J Med Microbiol* (1991); 34: 213-217

**Marcus H., Austria AL., Baker NR. (1989)**

Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to tracheal epithelium.

*Infect Immun* (1989); 57: 1050-1053

**Marty N., Pasquier C., Dournes J.L., Chavagnat F., Guinand M., Chabanon G., Pipy B., Montrozier H. (1998)**

Effects of characterised *Pseudomonas aeruginosa* exopolysaccharides on adherence to human tracheal cells.

*J Med Microbiol* (1998); 47: 129-134

**Mathee K., Ciofu O., Sternberg C., Lindum PW., Campbell JI., Jensen P., Johnsen AH., Givskov M., Ohman DE., Molin S., Hoiby N., Kharazmi A. (1999)**

Mucoid Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung.

*Microbiology* (1999); 145 (Pt 6): 1349-1357

**May TB., Shinabarger D., Maharay R., Kato J., Chu L., DeVault J.D., Raychoudhury S., Zielinski A., Berry A., Rotmel RK., Misra TK., Cacrabarty AM. (1991)**

Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: A key factor in chronic pulmonary infections in cystic fibrosis patients.

*Clin Microbiol Rev* (1991); 4: 191-206

**Mekus F., Ballmann M., Bronsveld I., Bijman J., Veeze H., Tümmler B. (2000)**

Categories of deltaF508 homozygous cystic fibrosis twin and siblings pairs with distinct phenotypic characteristics.

*Twin Res* (2000); 3 (4): 277-93

**Mekus F., Ballmann M., Bronsveld I., Dork T., Bijman J., Tümmler B., Veeze HJ. (1998)**

Cystic-fibrosis-like disease unrelated to the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.

*Hum Genet* (1998); 102 (5): 582-586

**Mekus F., Laabs U., Veeze H., Tümmler B. (2002)**

Genes in the vicinity of CFTR modulate the cystic fibrosis phenotype in highly concordant or discordant F508del homozygous sib pairs.

*Hum Genet* (2002); 112 (1): 1-11

**Meluleni GJ., Grout M., Evans DJ., Pier GB. (1995)**

Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm *in vitro* are killed by opsonic antibodies to the mucoid exopolysaccharid capsule but not by antibodies produced during chronic lung infection in cystic fibrosis patients.

*J Immunol* (1995); 155: 2029-2038

**Meno Y., Amako K. (1990)**

Morphological evidence of penetration of anti-O antibody through the capsule of *Klebsiella pneumoniae*.

*Infect Immun* (1990); 58: 1421-1428

**Mickle JE., Cutting GR. (2000)**

Genotyp-phenotyp relationships in cystic fibrosis.

*Med Clin North Am* (2000); 84: 597-607

**Mussaffi H., Greif J., Kornreich L., Ashkenazi S., Levy Y., Schonfeld T., Blau H. (2000)**

Severe allergic bronchopulmonary aspergillosis in an infant with cystic fibrosis and her asthmatic father.

*Pediatr Pulmonol* (2000); 29(2):155-9

**Müller I. (2002)**

Häufigkeit und klinische Relevanz von *Staphylokokkus aureus* bei Mukoviszidose.

*Diss* (2002); 2: 12-13

**Nelson JW., Doherty CJ, Brown PH. (1991)**

*Pseudomonas cepacia* in patients with cystic fibrosis.

*Lancet* (1991); 388: 1525

**Nelson JW., Tredgett MW., Sheehan JK., Thornton DJ., Notman D., Govan JR. (1990)**

Mucinophilic and chemotactic properties of *Pseudomonas aeruginosa* in relation to pulmonary colonization in cystic fibrosis.

*Infect Immun* (1990); 58: 1489-1495

**Neuberger M., Kundi M., Wiesenberger W., Frank W. (1995)**

Lungenfunktionsreferenzwerte für Schüler von 6 bis 16 Jahren.

*Pneumologie* (1994); 48: 175-181; Erratum. *Pneumologie*. (1995); 49: 96

**Nickerson BG, Lemen RJ, Gerdes CB, Wegmann MJ, Robertson G. (1980)**

Within-subject variability and per cent change for significance of spirometry in normal subjects and in patients with cystic fibrosis.

*Am Rev Respir Dis.* (1980);122(6): 859-66

**Oppenheimer EH., Esterley JR. (1975)**

Pathology of Cystic Fibrosis: Review of the literature and comparison with 146 autopsy studies.

*Perspect Pediatr Pathol* (1975); 2: 241

**Ojeniyi B., Baek L., Hoiby N. (1985)**

Polyagglutinability due to Loss of O-antigenic determinants in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients.

*APMIS Sect. B* (1985); 93: 7-13

**Ojeniyi B., Döring G., Lam JS., Rosdahl VT., Hoiby N. (1990)**

Typing of polyagglutinable *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients.

*APMIS* (1990); 98: 423-431

**Ojeniyi B., Hoiby N., Rosdahl VT. (1991)**

*Pseudomonas aeruginosa* in isolates from cystic fibrosis patients.

*APMIS* (1991); 99: 187-195

**Ojeniyi B., Wolz C., Döring G., Lam JS., Rosdahl VT., Hoiby N. (1990)**

Typing of polyagglutinable *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients.

*APMIS* (1990); 98: 423-431

**Paul KD., Leupold W., Blaschke-Hellmessen R., Ulbrich K., Peter-Kern M., Neumeister V. (1996)**

Allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) in patients with cystic fibrosis (CF): clinical significance, diagnosis and therapy.

*Mycoses* (1996);39 (1): 55-8

**Pedersen NT., Hoiby N., Modhorst CH., Lind K., Flensburg EW., Bruun B. (1981)**

Respiratory Infections in Cystic Fibrosis patients caused by virus, Clamydia and Mykoplasma: possible synergism with *Pseudomonas aeruginosa*.

*Acta Paediatr Scan* (1981); 70: 623-628

**Pedersen SS. (1992)**

Lung infection with alginate producing, mucoid *pseudomonas aeruginosa*.

*APMIS* 100 (1992); 28: 1-79

**Pedersen SS., Espersen F., Hoiby N., Jensen T. (1990)**

Immunglobulin A and Immunglobulin G antibody response to alginates from *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis.

*J Clin Microbiol* (1990); 28: 747-755

**Pedersen SS., Espersen F., Hoiby N., Shand GH. (1989)**

Purification, Characterization and Immunological Cross-Reactivity of Alginates Produced by Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* from Patients with cystic fibrosis.

*J Clin Microbiol* (1989); 27: 691-699

**Pedersen SS., Hoiby N., Espersen F., Koch C. (1992)**

Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis.

*Thorax* (1992); 47: 6-13

**Pedersen SS., Jensen T., Pressler T., Hoiby N. (1986)**

Does centralized treatment of cystic fibrosis increase the risk of *Pseudomonas aeruginosa* infection.

*Acta Paediatr Scan* (1986); 75: 840-845

**Phillips DI. (1993)**

Twin studies in medical research: can they tell us whether diseases are genetically determined?

*Lancet* (1993); 341: 1008-1009

**Picard E., Aviram M., Yahav Y., Rivlin J., Blau H., Bentur L., Avital A., Villa Y., Schwartz S., Kerem B., Kerem E. (2004)**

Familial concordance of phenotype and microbial variation among siblings with CF.

*Pediatr Pulmonol.* (2004); 38: 292-297

**Picciolo GL., Kaplan DS (1985)**

Reduction of fading of fluorescent reaction product for microphotometric quantitation.

*Adv Appl Microbiol* (1985); 30: 197-235

**Pier GB. (1985)**

Pulmonary disease associated with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: current status of the host-bacterium interaction.

*J Infect Dis* (1985); 151: 575-580

**Pier GB. (2000)**

Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections.

*Proc Natl Acad Sci* (2000); 97 (16): 8822-8828

**Pier GB., Grout M., Zaiidi TS., Goldberg JB. (1996)**

How mutant CFTR may contribute to *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis.

*Am J Respir Crit Care Med* (1996); 154: 175-181

**Pier GB., Koles NL., Meluleni G., Hatano K., Pollack M. (1994)**

Specificity and function of murine monoclonal antibodies and immunization-induced human polyclonal antibodies to Lipopolysaccharide subtypes of *Pseudomonas aeruginosa* serogroup O6.

*Infect Immun* (1994); 62: 1137-1143

**Pier GB., Saunders JM., Ames P., Edwards MS., Auerback H., Goldfarb J., Spert DP., Hurwitch S. (1987)**

Opsonophagocytic killing antibody to *Pseudomonas aeruginosa*, mucoid exopolysaccharide in older noncolonized patients with cystic fibrosis.

*N Engl J Med* (1987); 317: 793-798

**Pier GB., Thomas DM. (1982)**

Lipopolysaccharide and high-molecular-weight polysaccharide serotypes of *Pseudomonas aeruginosa*.

*J Infect Dis* (1982); 145: 217-223

**Plotkowski MC., Costa AO., Morandi V., Barbosa HS., Nader HB., de Bentzmann S., Puchelle E. (2001)**

Role of heparan sulphate proteoglycans as potential receptors for non-piliated *Pseudomonas aeruginosa* adherence to non-polarised airway epithelial cells.

*J Med Microbiol* (2001); 50 (2): 183-90

**Plotkowski MC., Tournier JM., Puchelle E. (1996)**

*Pseudomonas aeruginosa* strains possess specific adhesions for laminin.

*Infect Immun* (1996); 64: 600-605

**Pressler T. (1996)**

IgG subclasses and chronic bacterial infection. Subclass antibodies and the clinical course of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in Cystic fibrosis.

*APMIS 104* (1996); 66: 3-41

**Prober ChG. (1991)**

The impact of respiratory viral infections in patients with cystic fibrosis.

*Clin Rev Allergy* (1991); 9: 87-102

**Rabsch P. (1998)**

Die pulmonale Besiedelung von *Pseudomonas aeruginosa* bei Patienten mit Mukoviszidose – Betrachtung des Besiedelungsablaufes sowie Veränderungen klinischer Parameter und des Therapieregimes

*Diss* (1998); 2: 22

**Ramsey BW. (1996)**

Management of Pulmonary Disease in Patients with Cystic Fibrosis.

*N Engl J Med* (1996); 335: 179-188 (Erratum 335: 1167)

**Ratner AJ., Bryan R., Weber A., Nguyen S., Barnes D., Pitt A., Gelber S., Cheung A., Prince A. (2001)**

Cystic fibrosis pathogens activate Ca<sup>2+</sup>-dependent mitogen-activated protein kinase signaling pathways in airway epithelial cells.

*J Biol Chem* (2001); 276: 19267-75

**Renders NH., Sijmons MA., van Belkum A., Overbeek SE., Mouton JW., Verbrugh HA. (1997)**

Exchange of *Pseudomonas aeruginosa* strains among cystic fibrosis siblings.

*Res Microbiol* (1997); 148: 447-454

**Ringe D, Petsko DA. (1990)**

Viral proteases. Molecular metamorphosis.

*Nature* (1991); 354(6348): 22-3

**Riordan JR., Rommens JM., Kerem BS., Alon N., Rozmahel R., Grzelczak Z., Zielenski J., Lok S., Plavsic N., Chou JL., Drumm ML., Iannuzzi ML., Collins FS., Tsui L-C. (1989)**

Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA.

*Science* (1989); 245: 1066-1073

**Römling U., Fiedler B., Boßhammer J., Grothues D., Greipel J., Hardt von der H., Tümmler B. (1994)**

Epidemiologie of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis.

*J Infect Dis* (1994); 170: 1616-1621

**Rommens JM., Iannuzzi MC., Kerem BS., Drumm ML., Melmer G., Dean M., Rozmahel R., Cole JL., Kennedy D., Hidaka N., Zsiga M., Buchwald M., Riordan JR., Tsui LC., Collins FS. (1989)**

Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping.

*Science* (1989); 245: 1059-1065

**Rosenfeld M., Ramsey B. (1992)**

Evolution of airway microbiology in infant with cystic fibrosis: Role of Non Pseudomonal and Pseudomonal pathogens.

*Sem Resp Infect* (1992); 7: 158-167

**Russell NJ., Gacesa P. (1989)**

Physicochemical properties of alginate from mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients.

*Antibiot Chemother* (1989); 42: 62-66



**Sabra W., Lunsdorf H., Zeng AP. (2003)**

Alterations in the formation of lipopolysaccharide and membrane vesicles on the surface of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 under oxygen stress conditions.  
*Microbiology* (2003); 149 (Pt 10): 2789-95

**Samuel D., Patt RJ., Abuknesha RA. (1988)**

A sensitive method of detecting proteins on dot and western blots using a monoclonal antibody to FITC.  
*J Immunol Meth* (1988); 107: 217-224

**Schaad UB., Lang AB., Wedgwood J., Buehlmann U., Fürer E. (1990)**

Serotype specific IgG antibodies to lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: Correlation to disease, subclass distribution, and experimental protective capacity.  
*Pediatr Res* (1990); 27: 508-513

**Scharma R., Florea VG., Bolger AP., Doehner W., Florea ND., Coats AJ., Hodson ME, Anker SD., Henein MY. (2001)**

Wasting as an independent predictor of mortality in patients with cystic fibrosis.  
*Thorax* (2001); 56: 746-750

**Schroten H., Hanisch F.G., Plogmann R., Hacker J., Uhlenbruck G., Nobis-Bosch R., Wahn V. (1992)**

Inhibition of Adhesion of S-Fimbriated *Escherichia coli* to Buccal Epithelial Cells by Human Milk Fat Globule Membrane Components: a Novel Aspect of the Protective Function of Mucins in the Nonimmunoglobulin Fraction  
*Infection and Immunity* (1992); 7: 2893-2899

**Schroten H., Steinig M., Plogmann R., Hanisch F.G., Hacker J., Herzig P., Wahn V. (1992)**

S-Fimbriae Mediated Adhesion of *E. coli* to Human Buccal Epithelial Cells is Age Independent  
*Infection* 20 (1992); 5: 273-275

**Schroten H., Wolske A., Plogmann R., Hanisch F.G., Hacker J., Uhlenbruck G., Wahn V. (1992)**

Binding of Cloned S-Fimbriated *E. coli* to Human Buccal Epithelial Cells – Different Inhibition of Binding by Neonatal Saliva and Adult Saliva.  
*Zbl. Bakt.* (1991); 274: 514-518

**Schürmann A., Reinhardt D. (1996)**

Pulmonal Complications in Cystic Fibrosis.

*Sozialpädiatrie und Kinderärztliche Praxis* (1996); 18: 138-143

**Sedlacek HH., Grigat H., Seiler FR. (1981)**

The fluorescence immunoassay using plane surface solid phases (FIAPS).

*Meth Enzymol* (1981); 74: 87-105

**Shale DJ. (1992)**

Viral infections: A role in the lung disease of cystic fibrosis?

*Thorax* (1992); 47: 69

**Sheppard MN. (1995)**

The pathology of cystic fibrosis. In: Hodson, Geddes, eds: Cystic Fibrosis.

*Chapman and Hall*, London (1995): 131-149

**Smith JJ., Travis SM., Greenberg EP., Welsh MJ. (1996)**

Cystic Fibrosis Airway Epithelia Fail to Kill Bacteria because of abnormal airway surface fluid.

*Cell* (1996); 85: 229-236

**Soldan W., Ulbrich K., Paul KD., Leupold W. (1996)**

*Pseudomonas aeruginosa* Antikörper bei Patienten mit Mukoviszidose.

Jahrestagung der Gesellschaft für pädiatrische Pneumologie, Magdeburg April 1996

**Stern RC. (1997)**

The diagnosis of cystic fibrosis.

*N Engl J Med* (1997); 336: 487-491

**Tredgett MW., Doherty C., Govan JRW. (1990)**

Incidence of common pyocin types of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis and chronic airway diseases.

*J Med Microbiol* (1990); 32: 169-172

**Tsang KW., Rutman A., Tanaka E., Lund V., Dewar A., Cole P.J., Wilson R. (1994)**

Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with human respiratory mucosa *in vitro*.

*Eur Respir J* (1994); 7: 1746-1753

**Tsang KW., Shum DK., Chan S., Ng P., Mak J., Leung R., Shum IH, Oo GC., Tipoe GL., Lam WK. (2003)**

*Pseudomonas aeruginosa* adherence to human basement membrane collagen *in vitro*.  
*Eur Respir J* (2003); 21 (6): 932-8

**Tsui LC. (1991)**

Probing the basic defect in cystic fibrosis.  
Current opinion in genetic development (1991); 1: 4-10

**Tsui LC. (1992)**

The spectrum of cystic fibrosis mutations.  
*Trends Genet* (1992); 8: 392-398

**Tsui LC., Buchwald M., Barker D., Braman JC., Knowlton RG., Schumm JW., Eiberg H., Mohr J., Kennedy D., Plavsic N., Zsiga M., Markewicz D., Aktos G., Brown VA., Helms C., Gravius T., Parker C., Rediker K., Donis-Keller H. (1985)**

Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker.  
*Science* (1985); 230: 1054-1057

**Tümmler B. (2000)**

Genom Working Group Deutschland, August 2000

**Tümmler B., Boßhammer J., Brockhausen I., Gudowius P., Herrmann C., Herrmann S., Heuer T., Kubesch P., Mekus F., Romling U., Schmidt KD., Spangenberg C., Walter S. (1997)**

Infections with *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis.  
*Behring Inst Mitt* (1997); 98: 249-255

**Vasil ML. (1986)**

*Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms of virulence epidemiology.  
*J Pediatr* (1986); 108: 800-5

**Welsh MJ., Tsui LC., Boat TF., Beaudet AL. (1995)**

Cystic fibrosis. In: Scriver CR., Beaudet AL., Sly WS., Valle D. (eds) The metabolic and molecular bases of inherited disease.  
*McGraw Hill*, New York (1995): 3799-3876

**Wick G., Baudner S., Herzog F. (1976)**

Immunfluoreszenz.

Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg (1976)

**Wine JJ. (1991)**

The mutant protein responds.

*Nature* (1991); 354: 503-509

**Wu CL., Domenico P., Hasset DJ., Beveridge TJ., Hauser AR., Kazzaz JA. (2002)**

Subinhibitory bismuth-thiols reduce virulence of *Pseudomonas aeruginosa*.

*Am J Respir Cell Mol Biol* (2002); 26: 731-8

**Zapletal A., Samanek M. (1977)**

Die Bedeutung heutiger Methoden der Lungenfunktionsdiagnostik zur Feststellung einer Obstruktion der Atemwege bei Kindern und Jugendlichen.

*Z Erkrank Atm-Org.* (1977); 149: 343-371

**Zar H., Saiman L., Quittell L., Prince A. (1995)**

Binding of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelial from patients with various mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator.

*J Pediatr* (1995); 126: 230-233

**Zimakoff J., Hoiby N., Rosendal K., Guilbert JP. (1983)**

Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infection and the role of contamination of the environment in a cystic fibrosis clinic.

*J Hosp Infect* (1983); 4: 31-40

## 6. Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Schroten für die Überlassung des Themas und die Unterstützung dieser Dissertation.

Herrn Dr. med. Gudowius danke ich für die Unterstützung im gesamten Verlauf meiner Arbeit. Er war stets offen für Fragen und vermittelte mir das wissenschaftliche Denken und Arbeiten. Die zahlreichen kritischen Diskussionen und die wertvollen Beratungen haben wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit geführt.

Ebenso danke ich Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Mayatepek, dem Direktor der Klinik für allgemeine Pädiatrie des Zentrums für Kinderheilkunde des Universitätsklinikums Düsseldorf, für die Arbeitsmöglichkeit in seiner Klinik.

Den Mitarbeitern des Infektiologischen Labors der Klinik für allgemeine Pädiatrie des Zentrums für Kinderheilkunde, insbesondere Frau Mölleken und Frau Seibt, danke ich für die Hilfe und Mitarbeit an den Experimenten und die stets freundliche, geduldige Unterstützung.

Dem Institut Hommerich Forschung, insbesondere Herrn Ebers, danke ich für die Unterstützung im Bereich der statistischen Auswertung und Bob Andrews für Recherche und Archiv.

Besonderer Dank ist außerdem an meine Eltern gerichtet, die mir das Studium großzügig ermöglicht haben und mir immer alle Freiheiten gelassen haben.

Meinen Geschwistern und Freunden danke ich für ihre mentale Unterstützung und Motivation in jeder Phase meiner Arbeit.

## 7. Lebenslauf

### PERSÖNLICHE ANGABEN

---

Name: Darius Salehin  
Geburtsdatum: 14. März 1975  
Geburtsort: Mönchengladbach  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### AUSBILDUNG

---

- ? bis 1994  
**STIFTISCHES HUMANISTISCHES GYMNASIUM, MÖNCHEGLADBACH**
- ? April 1996 bis Mai 2003  
**HEINRICH-HEINE-UNIVERSITÄT DÜSSELDORF**  
Studium der Humanmedizin
- ? April 2002 bis März 2003  
**KLINIKUM KREFELD, KANTONSPITAL LIESTAL (SCHWEIZ)**  
Praktisches Jahr
- ? Seit August 2003  
**FRAUENKLINIK IM KLINIKUM KREFELD**  
Arzt in der Weiterbildung

### ZIVILDIENTST

---

- ? September 1994 bis November 1995  
**KRANKENHAUS NEUWERK, MÖNCHEGLADBACH**  
Pflegediensthelfer in der Abteilung für Viszeral- und Unfallchirurgie

### BESONDERE TÄTIGKEITEN

---

- ? September bis Oktober 1999  
**DEUTSCHES HERZZENTRUM BERLIN**  
Abteilung für Innere Medizin – Kardiologie
- ? August bis September 2000  
**MIDCENTRAL HEALTH-PALMERSTON NORTH HOSPITAL, NEUSEELAND**  
Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie
- ? März bis April 2001  
**STANFORD UNIVERSITY MEDICAL CENTER**  
Abteilung für Pathologie und Labormedizin

**Die Bedeutung des Virulenzfaktors Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa*  
bei der Zystischen Fibrose**

**- Untersuchungen an europäischen Zwillingen und Geschwistern -**

vorgelegt von Darius Salehin

Die Zystische Fibrose zeigt eine unterschiedliche klinische Ausprägung. Durch Untersuchungen an monozygoten und dizygoten Zwillingen sowie Geschwistern, die an Zystischer Fibrose erkrankt sind, kann der Einfluss auf unterschiedliche genetische Faktoren reduziert werden und durch den ebenfalls nahezu gleichen Entwicklungsablauf stellt diese Gruppe ein ideales Kollektiv zu vergleichenden Untersuchungen dar. Maßgeblich für die Prognose und die Lebensqualität ist die pulmonale Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa*. Bakterienisolate von CF-Zwillingen und Geschwistern wurden in einem *in vitro* Zellkultursystem auf Ihre Ähnlichkeit in der Ausprägung der Adhäsion, als ersten Schritt der Infektion, untersucht und mit dem gleichzeitig erhobenen klinischen Untersuchungsergebnis verglichen, um Zusammenhänge des Erkrankungsgrades der Zystischen Fibrose und der *Pseudomonas aeruginosa* Adhäsion aufzuzeigen.

Die Bakterienisolate zeigten in der Gesamtgruppe erhebliche Schwankungen in Ihrer Fähigkeit zur Adhäsion an respiratorischem Epithel. Innerhalb der Gruppe der homozygoten Zwillinge fanden sich sehr ähnliche Adhäsionen, wohingegen die Gruppe der CF-Geschwister einen signifikanten Unterschied zeigten.

In der Patientengruppe der mild verlaufenden Zystischen Fibrose fand sich eine Korrelation mit einer gering ausgeprägten Adhäsionsstärke von *Pseudomonas aeruginosa* sowie einer guten Gewichtsentwicklung. Bei einem Großteil der konkordant negativ verlaufenden Zwillingspaare geht ein hohes Maß an Adhäsion dieses Keimes mit einer Verschlechterung der Lungenfunktion einher. In dieser Gruppe ergab sich allerdings eine stärkere Streuung in den erzielten Adhäsionswerten. In der Gruppe der klinisch diskordant verlaufenden Zwillingspaare konnte aufgrund einer hohen Varianz nicht auf deren klinischen Verlauf geschlossen werden.

Der untersuchte Virulenzfaktor Adhäsion zeigt eine signifikante Korrelation zwischen identischer Genetik und gleicher Adhäsionsstärke. In der Gruppe der CF-Geschwister zeigte sich eine unterschiedliche Ausprägung. Die Fähigkeit zur Adhäsion ist daher nach unseren Daten nicht stammspezifisch, sondern durch verschiedene äußere Faktoren beeinflusst. Dabei fand sich keine generelle Korrelation zwischen der Höhe der Adhäsion und dem erhobenen klinischen Status der CF-Patienten zum Entnahmezeitpunkt der Bakterienisolate.

Prof. Dr. med. H. Schrotten