

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Prof. Dr. E. Mayatepek

**Adhäsion sequentieller Bakterienisolate von Mukoviszidosepatienten mit  
chronischer *Pseudomonas aeruginosa*-Infektion unter Berücksichtigung der  
Lungenfunktion**

Dissertation

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

vorgelegt von

**Dirk Hammes**

2007

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 Schroten

Koreferent: Prof. Dr. med. Walter Däubener

Gewidmet meinen Eltern  
Rosemarie und Gerd Hammes  
und meiner Frau Julia

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
Inhaltsverzeichnis	
Abkürzungsverzeichnis	
<b>1. Einleitung</b>	
1.1 Ätiologie und Pathogenese der Zystischen Fibrose	1
1.2 Allgemeine Organmanifestationen der Zystischen Fibrose	2
1.3 Die Lungenmanifestation bei Zystischer Fibrose	3
1.4 Diagnostik der Zystischen Fibrose	4
1.5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
1.6 Definition von Virulenz und Virulenzfaktoren	6
1.7 Virulenzfaktoren von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
1.8 Der Virulenzfaktor Adhäsion bei <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
1.9 Besonderheiten von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bei Zystischer Fibrose	9
1.10 Infektion der CF-Lunge mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
1.11 Therapie der bronchopulmonalen Infektion durch <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bei Zystischer Fibrose	13
1.12 Symptomatische Therapie und Prophylaxe der bronchopulmonalen Manifestation	14
1.13 Zielsetzung und Fragestellung	15
<b>2. Material und Methoden</b>	
2.1 Probenkollektiv und Untersuchungszeitraum	17
2.2 Laborgeräte	17
2.3 Medien, Puffer und Lösungen	18
2.4 Aufbereitung der Bakterienisolate	18
2.5 Lungenzellreihe A549	19
2.6 Zellkultivierung von A549	20
2.7 Prinzip der Fluoreszenz und FITC	21
2.8 Adhäsionsassay	21

2.9	Auswertung der Versuchsergebnisse	22
2.10	Statistik	23
2.11	Genotypisierung der <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Stämme	23
2.12	Klinische Verlaufparameter	24
2.12.1	Forcierte Vitalkapazität ( FVC )	24
2.12.2	Einsekundenkapazität ( FEV1 )	25
2.12.3	Anwendungsbereiche der Verlaufparameter	25
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	
3.1	Verteilung der Adhäsionswerte von allen Proben	26
3.2	Entwicklung der Adhäsion und der klinischen Funktionsparameter bei den einzelnen Patienten	27
3.2.1	Adhäsion und klinischer Verlauf des Patienten BK	27
3.2.2	Adhäsion und klinischer Verlauf des Patienten CK	30
3.2.3	Adhäsion und klinischer Verlauf des Patienten DP	32
3.2.4	Adhäsion und klinischer Verlauf des Patienten GS	34
3.2.5	Adhäsion und klinischer Verlauf des Patienten NN	36
3.2.6	Adhäsion und klinischer Verlauf des Patienten SB	38
3.2.7	Adhäsion und klinischer Verlauf des Patienten SS	40
3.2.8	Adhäsion und klinischer Verlauf des Patienten TH	43
3.3	Zusammenfassende Darstellung der Adhäsion bei den einzelnen CF-Patienten	45
3.4	Zusammenfassende Darstellung der FEV1 % bei den einzelnen CF-Patienten	46
3.5	Zusammenfassende Darstellung der FVC % bei den einzelnen CF-Patienten	47
3.6	Zeitliche Entwicklung der Adhäsion unter Zusammenfassung der Ergebnisse aller Patienten	48
3.6.1	Statistische Auswertung der Entwicklung der Adhäsion unter Zusammenfassung der Ergebnisse aller Patienten anhand einer Varianzanalyse	49
3.7	Entwicklung der klinischen Funktionsparameter unter Zusammenfassung der Daten aller Patienten	50

## Inhaltsverzeichnis

---

3.7.1	Zeitliche Entwicklung der FEV1 % aller Patienten	51
3.7.2	Zeitliche Entwicklung der FVC % aller Patienten	52
3.8	Vergleich der Adhäsion mit der FVC % und der FEV1 % bei Erstkolonisation	54
3.9	Vergleich der klinischen Verlaufparameter mit der Adhäsion bei den einzelnen CF-Patienten	54
3.10	Adhäsionsausprägung in Abhängigkeit von der Anzahl der isolierten <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Stämme	56
3.11	Abhängigkeit der Adhäsion vom Genotyp	57
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>58</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>66</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>67</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>79</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>80</b>
	<b>Abstract</b>	<b>81</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Ad.	Adhäsion
BSA	Rinder-Sreum-Albumin (bovine serum albumin)
°C	Grad Celcius
ca.	circa
cAMP	cyklische Adenosinmonophosphat
CF	Zystische Fibrose
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
cfu	colony forming unit
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et altera
FEV 1	Forciertes expiratorisches Volumen in 1 Sekunde
FITC	Fluoreszein-Iso-Thio-Cyanat
FVC	Forcierte Vitalkapazität
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GF	Gesichtsfeld
h	Stunde
HBSS	Hanks´balanced salt W/O Phenol red
kg	Kilogramm
min	Minute
ml	Milliliter
mmol/l	Millimol pro Liter
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphat buffered saline)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PAO	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain one

## Abkürzungsverzeichnis

---

Pat.	Patient
pO <sub>2</sub>	Sauerstoff-Partialdruck
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
r.p.m.	Rotations per minute (Umdrehung pro Minute)
sec	Sekunde
UV	Ultraviolett

## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Ätiologie und Pathogenese der Zystischen Fibrose

Das Krankheitsbild der Zystischen Fibrose wurde erstmals 1936 durch Fanconi beschrieben und ist mit einer Inzidenz von 1 auf 2000-2500 Lebendgeburten die häufigste angeborene Stoffwechselerkrankung von Menschen kaukasischer Herkunft.

Die Erkrankung wird autosomal rezessiv vererbt, wobei die Frequenz der heterozygoten Genträger bei 1:25 liegt.

Das für den Defekt verantwortliche Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 7 in der Position 7q31-32. Dieses sogenannte CFTR – Gen (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator – Gen) umfaßt circa 250 Kb und codiert für ein, aus 1480 Aminosäuren zusammengesetztes, in den exokrinen Drüsenzellen apikal sitzendes, transmembranöses Glykoprotein. Bei diesem Protein handelt es sich um einen cAMP-abhängigen Ionenkanal, der den Chloridionenfluß reguliert.

Bislang sind mehr als 1000 Mutationen im CFTR–Gen bekannt, welche das Krankheitsbild der Mukoviszidose bedingen können. Die häufigste Mutation in Westeuropa ist mit 70-75% der Fälle die delta F508 – Mutation (Tsui 1992, Riordan et al. 1989). Bei dieser Mutation liegt in Position 508 des CFTR-Gens eine Deletion von 3 Basenpaaren vor, wodurch die Kodierung für Phenylalanin fehlt. Durch die unterschiedlichen Mutationen kommt es in verschiedenem Ausmaß zu pathologischen Veränderungen. Diese können entweder in einer gestörten CFTR–Proteinsynthese, in einer verminderten Konzentration des CFTR-Proteins oder in Reifungs- oder Transportstörungen des CFTR–Proteins in der Zelle liegen, wodurch es zu einer fehlerhaften Regulation des Ionenkanals oder zu einer mangelnden Ionenleitfähigkeit kommt.

Die Konsequenz der Defekte ist ein verminderter oder fehlender Chloridionentransport durch den CFTR-Kanal, so dass es zu einer Anhäufung von Chloridionen innerhalb der Zelle kommt. Dies hat eine gesteigerte Reabsorption von Natrium und Wasser zur Folge was zu einer erhöhten Viskosität vor allem der bronchialen und intestinalen Sekrete führt.

## 1.2. Allgemeine Organmanifestationen der Zystischen Fibrose

Die Mukoviszidose ist eine Multiorganerkrankung, wobei die Ausprägung der Beteiligung der einzelnen Organsysteme sehr variabel ist.

Die typischen gastrointestinalen Symptome der Mukoviszidose sind durch die Beteiligung von Pankreas, Darm, Leber und Gallenwegen verursacht. Es kommt allgemein zur Präzipitation des hochviskösen Sekrets in den Acini und Ausführungsgängen der exokrinen Drüsen mit konsekutiver Obstruktion, Fibrosierung und Atrophie des Parenchyms der betroffenen Organe.

Im Pankreas resultiert daraus eine exokrine Insuffizienz mit Maldigestion, Malabsorption, Steatorrhoe, abdominellen Schmerzen und Gedeihstörungen. Bei fortschreitender Destruktion des Bauchspeicheldrüsengewebes, mit Untergang auch der endokrinen Zellen des Pankreas, kann sich im Verlauf eine diabetische Stoffwechsellage ausbilden. Eine charakteristische Erstmanifestation der Zystischen Fibrose ist der bei Neugeborenen auftretende Mekoniumileus. Im späteren Krankheitsverlauf kann es durch die Eindickung der intestinalen Sekrete zum distalen intestinalen Obstruktions-Syndrom (DIOS) kommen. Weitere Manifestationen am Darm können Invaginationen oder ein Analprolaps sein.

In der Leber entsteht durch die wasserarme, zähflüssige Galle eine Cholestase. Darausfolgende entzündliche Veränderungen im Parenchym mit periportalen Fibrosierungen enden in einer biliären Leberzirrhose mit den möglichen Komplikationen einer Splenomegalie oder Ösophagusvarizen.

Aus der exokrinen Pankreasinsuffizienz und der Cholestase resultieren ausgeprägte Fettresorptionsstörungen mit den typischen Mangelerscheinungen.

Gehäuft werden auch cholagene Konkremente bei CF-Patienten diagnostiziert. In den oberen Atemwegen kann es zu nasalen Polypen oder einer chronischen Sinusitis kommen.

Bei männlichen Erkrankten kann zudem durch die Obliteration des Ductus deferens eine Infertilität bedingt werden. Eine unphysiologische Zusammensetzung des Zervixschleims kann bei Frauen ebenfalls die Fruchtbarkeit beeinflussen.

### 1.3. Die Lungenmanifestation bei Zystischer Fibrose

Das Ausmaß der Lungenbeteiligung ist für die meisten CF-Patienten der für die Lebenserwartung limitierende Faktor. Auch die Morbidität und Hospitalisierungsdauer sind maßgeblich durch die bronchopulmonale Beteiligung bestimmt.

Untersuchungen zeigen, dass die Lunge bei einem Säugling mit Zystischer Fibrose bei Geburt histologisch normal ist (Sturgess et al. 1982). Wenige Wochen später zeigen sich aber bereits hypertrophierte submuköse Drüsen und hyperplastische Becherzellen in den Bronchiolen. Ob zu diesem Zeitpunkt bereits virale oder bakterielle Infektionen vorliegen, wird kontrovers diskutiert. Durch Hypersekretion und Anhäufung des charakteristischen zähen Sekrets kommt es zur Obliteration der zunächst peripheren Atemwege mit Ausbildung von Atelektasen und überblähten Bereichen. Dieser Prozess weitet sich mit der Zeit bis auf die großen, zentralen Atemwege aus.

In bereits sehr frühen Krankheitsstadien konnte eine Erhöhung von proinflammatorischen Leukinen (insbesondere Interleukin 8) und des Tumor-Nekrose-Faktors alpha, noch vor einem nachweisbaren bakteriellen Erstbefall, in der bronchoalveolären Lavage (BAL) nachgewiesen werden (Khan et al. 1995)). Bei den dadurch hervorgerufenen Entzündungsreaktionen sind massenhaft neutrophile Granulozyten mit ihren inflammatorischen Produkten wie Proteasen und Sauerstoffradikalen zu finden, die eine sekundäre Gewebsdestruktion bewirken. Eine bestehende Imbalance im Proteasen – Antiproteasen – Verhältnis verstärkt die entstehenden Epithelschäden (Birrer et al. 1994).

Zudem wird durch das hochvisköse Sekret die mukoziliäre Clearance und damit die Selbstreinigungsfunktion der Lunge von Sekreten stark beeinträchtigt (Wood et al.). Die Sekretstase, die entstandenen Epithelschäden und vorangehende virale Infekte bewirken eine hohe Prädisposition für bakterielle Kolonisationen mit nachfolgenden Infektionen (Ramsey et al. 1992, Smith et al. 1996). Die, für die Infektionen bedeutenden Keime sind insbesondere *Staphylokokkus aureus*, *Hämophilus influenzae*, *Burkholderia cepacia* und der Leitkeim der Mukoviszidose *Pseudomonas aeruginosa*. Bis in die Fünfzigerjahre dominierte *Staphylokokkus aureus* als Erreger in pulmonalen Isolaten CF-Erkrankter (Hoiby et al.), was einerseits durch die damalige frühe Mortalität von CF-Patienten bedingt war. Andererseits wurden erfolgreiche eradizierende

Antibiotikatherapien bei *Staphylokokkus aureus*-Infektionen entwickelt, welche ebenfalls für den Führungswechsel in der relativen Häufigkeit der Erregerverteilung in CF-Lungen zugunsten von *Pseudomonas aeruginosa* verantwortlich gemacht werden. Bislang wurde von einem sequenziellen Besiedelungsmodell ausgegangen. Neuere Studien konnten zeigen, dass auch bei erwachsenen Patienten bis zu 50% Kokolonisationen der beiden Bakterienarten bestehen (Burns et al. 1998). Auf *Pseudomonas aeruginosa* und den speziellen Befall der Lunge mit diesem Bakterium wird unten ausführlicher eingegangen. Diese später chronischen Infektionen und die zunehmenden, von neutrophilen Granulozyten dominierten, Entzündungsreaktionen führen zu immer weiter fortschreitenden Schäden an der Lunge und sind entscheidend für die Prognose der Erkrankung.

Diese pathologischen Veränderungen zeigen sich klinisch und radiologisch in Form von Bronchiolitis, obstruktiver Bronchitis, Bronchiektasien, interstitiellen und lobulären Pneumonien, Atelektasen und diffuser Alveolardestruktion (Sobonya et al. 1986). Es resultiert eine kombinierte obstruktive und restriktive Ventilationsstörung mit Verteilungsstörungen und Verkleinerung der Gasaustauschfläche. Das Endstadium ist häufig durch eine globale Ateminsuffizienz mit pulmonalem Hochdruck und Cor pulmonale geprägt.

### 1.4. Diagnostik der Zystischen Fibrose

Häufig wird die Erkrankung erst anhand typischer klinischer Symptome erkannt und verspätet diagnostiziert. Diese klinischen Symptome können sich, wie geschildert, als anhaltende Diarrhoen und Steatorrhoen, Gedeihstörungen, Kleinwuchs, chronisch produktivem Husten oder Zeichen einer obstruktiven Ventilationsstörung mit, im Verlauf sich ausbildenden, Trommelschlegelfingern und Uhrglasnägeln zeigen. Gerade die Kombination aus gastrointestinalen und respiratorischen Manifestationen muss den Verdacht auf das Krankheitsbild der Mukoviszidose lenken.

Ein regelmäßig durchgeführtes Neugeborenenenscreening wird in Deutschland nicht umgesetzt. Eine effektive Cystische-Fibrose-Früherkennung liegt in der Methode zur

Erkennung des IRT ( immunreaktives Trypsin ) im Vollblut mittels Enzymimmunoassay vor (Lyczak et al.2002).

Die Goldstandardmethode zur Bestätigung des Erkrankungsverdacht ist der Pilocarpin-Iontophorese-Schweiß-Test nach Gibson und Cooke, welcher die pathognomonischen Erhöhungen von Natrium- und Chloridionen im Schweiß bei Mukoviszidose nachweisen kann. Die dreifache Bestätigung der Erhöhung einer der beiden Elektrolytkonzentrationen gilt als beweisend.

Eine Erweiterung der Diagnostik bei unklaren Ergebnissen bietet die transepitheliale Potentialdifferenzmessung an der Nase (Alton et al 1990) und die Untersuchung von Rektumschleimhautbiopsien (van Barneveld et al. 2006, Mall et al. 2004).

Die weiterführende Diagnostik umfasst die molekulargenetischen Untersuchungen des Erbgutes zur Mutationsanalytik

### 1.5. *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* ist ein ubiquitärer Keim mit einer hohen Stoffwechsellanpassungsfähigkeit an die Umgebung, welcher sich in feuchtem Milieu schnell vermehrt. Es handelt sich um ein gramnegatives, aerobes, fakultativ-pathogenes Stäbchenbakterium von plumper Gestalt. Durch die polare Begeißelung mit einem oder mehreren Geißeln ist der 2-4 x 0,5-0,8 µm große Feuchtkeim gut beweglich. Bei Kultivierung imponieren die Kolonien flach, unregelmäßig begrenzt, metallisch glänzend mit leicht gezacktem Rand. Charakteristisch ist der aromatische, traubenartige Geruch. Die Bildung von Pigmenten wie Pyorubin, Pyocyanin und Fluorescin wodurch der Eiter bei *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen typisch gelblich-grün gefärbt sein kann, ist fakultativ. In der Regel treten Kolonisierung und Infektionen durch *Pseudomonas aeruginosa* bei Patienten mit Defekten der spezifischen oder unspezifischen Abwehr auf. Im Fall der CF-Patienten ist, wie oben beschrieben, der Befall durch die Sekretstase und die Epithelschäden begünstigt. Die zum Großteil nosokomial erworbenen Infektionen können postoperative Wundinfekte, Harnwegsinfekte, Endokarditiden, Pyelonephritiden, Pneumonien und Sepsen bedingen. Ebenfalls häufig befallen sind Verbrennungswunden.

*Pseudomonas aeruginosa* lässt sich bei Erkrankten aus verschiedenen Materialien (Sputum, bronchoalveolare Lavage etc.) isolieren und durch spezifische Stoffwechsellmuster identifizieren. Zum Zweck eingehender Studien ist die Gentyptisierung der verschiedenen Stämme zum Beispiel in Form der RFLP (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen) möglich.

Die natürlichen Vorkommen von *Pseudomonas aeruginosa* sind das Erdreich, feuchtes Holz und Oberflächengewässer. Zum Teil ist der Erreger auch im Darm von Mensch und Tier nachweisbar. Große Bedeutung hat *Pseudomonas aeruginosa* im Krankenhausbetrieb als Erreger nosokomialer Infektionen (Botzenhart et al. 1993). Infektionsquellen können hier Waschbecken, Toiletten, Inkubatoren, Absaugkatheter, Desinfektionsmittel, Beatmungs- und Narkosegeräte sein (Morrison et al. 1984). Der häufigste Infektionsweg geht vermutlich über kontaminierte Hände des Krankenhauspersonals (Döring et al. 1993), Familienangehöriger oder Mitpatienten. Deshalb kommt der Expositionsprophylaxe prädisponierter Patienten, insbesondere Mukoviszidose-Erkrankten, eine große Bedeutung zu.

### 1.6. Definition von Virulenz und Virulenzfaktoren

Als Virulenz bezeichnet man das Ausmaß der krankheitserzeugenden Eigenschaft eines Stammes einer pathogenen Spezies. Virulenzfaktoren ermöglichen das Durchbrechen der Abwehr und damit das Zustandekommen einer Infektion und/oder von Schäden an Wirtszellen. Sie können chromosomal, phageal oder plasmidkodiert sein.

Die Wirkungsweise der Virulenzfaktoren kann in der Adhärenz an Wirtszellen, der Invasion und Ausbreitung im Gewebe oder auch in der direkten Schädigung und Zytotoxizität durch Exotoxine und Exoenzyme liegen. Des Weiteren können Bakterien die spezifische und unspezifische Infektabwehr durch Bildung spezifischer Faktoren beeinflussen. Zusammen mit der Aktivierung von Entzündungszellen, des Komplementsystems und der Induktion von Zytokinen trägt auch der Wirtsorganismus zur Virulenz bei, so dass sie insgesamt aus der Wechselwirkung zwischen Erreger und Wirt resultiert.

### 1.7. Virulenzfaktoren von *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* verfügt über eine Vielzahl von Produkten und Merkmalen, die für die Virulenz dieser Bakterienart verantwortlich sind. Nachfolgend ist eine Auswahl wichtiger Virulenzfaktoren dargestellt:

Exotoxin A ist eine ADP-Ribosyltransferase, welche durch Translationshemmung die Proteinbiosynthese blockieren kann (Iglewski et al. 1979). Des Weiteren hat das Toxin direkte zytotoxische und immunmodulatorische Effekte.

Exoenzym S wirkt als Adhäsion an respiratorisches Epithel und ist zytotoxisch.

Zytotoxin ist durch Ausbildung von transmembranösen Poren gewebezerstörend.

Die Gruppe von Proteasen und Elastasen wirken proteolytisch auf Elastin, Kollagen und Laminin (Heck et al. 1986). Es kommt zur Gewebsinvasion, Destruktion respiratorischer Zilien (Hinglay et al. 1982) und Zerstörung von unspezifischen Abwehrmechanismen.

Phospholipasen bedingen durch den Abbau bestimmter Substanzen die Stimulation von Entzündungsmediatoren und den Abbau von Surfactant.

Die Produktion von Pigmenten wie Pyocyanin und Pyorubin wirkt bakterizid, senkt die Zilienschlagfrequenz (Kanthakumar et al. 1996) und stimuliert die Freisetzung von Elastase aus neutrophilen Granulozyten (Ras et al. 1992).

Lipopolysaccharide (Endotoxine), als Bestandteil der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien, gelten als Adhäsine und aktivieren das Komplementsystem.

Viele der Virulenzfaktoren stellen wichtige Antigene dar, wodurch das spezifische Immunsystem des Wirtsorganismus zu einer starken humoralen Immunantwort stimuliert wird.

### 1.8. Der Virulenzfaktor *Adhäsion* bei *Pseudomonas aeruginosa*

Als Adhäsion wird die Bindung der Bakterien an die Zielzellen bezeichnet. Es ist ein spezifischer Prozess der nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip funktioniert. Diese feste, dauerhafte Bindung an die Wirtszellen ist die wesentliche Voraussetzung für die chronische Kolonisation und spätere Infektion durch *Pseudomonas aeruginosa*.

Eine Reihe von Produkten und Bestandteilen von *Pseudomonas aeruginosa* dienen als Liganden bei der Adhäsion an die Atemwegsepithelien von Mukoviszidosepatienten. Hierzu zählen das Exoenzym S (Baker et al. 1991), die Pili (Russel et al. 1989), die Geißeln (Feldmann et al. 1998), die Lipopolysaccharide (Gupta et al. 1994), das Protein F (Azghani et al. 2002), der Type-4-pilus (Zoutmann et al. 1991), das Flagellin (Hybiske et al. 2004, Lillehoj 2002) und das Alginat (Marty et al. 1998).

Es konnte gezeigt werden, dass *Pseudomonas aeruginosa* eine hohe Adhäsion an den Bronchialschleim und die Epithelien des respiratorischen Systems bei CF-Patienten aufweist (Dealer et al. 1992, Devaraj et al. 1994, Scharfmann et al. 1996). *Pseudomonas aeruginosa* bindet auch verstärkt an die, bei Epithelschäden freiliegende, Basalmembran des Lungenepithels (Tsang et al. 2003, Plotkowski et al. 2002). Korrespondierende Rezeptoren an den Zielzellen für die Anbindung der Adhäsine sind die Glycosphingolipide Asialo-GM 1 und GM 2 (Baker et al. 1990), Glykoproteine (Ramphal et al. 1987), Glykolipide (Gupta et al. 1994), Sialosylreste (Scharfmann et al. 2000), Muc1 Mucin (Lillehoj et al. 2002) und das Laminin (Plotkowski 1996). Nach de Bentzman et al. (1996) und Imundo et al. (1995) führt eine vermehrte Expression von Asialogangliosid 1 (GM 1) auf der apikalen Membran von CF-Lungenepithelzellen zu einer höheren Adhäsionsneigung von *Pseudomonas aeruginosa*.

Weiterhin werden Fibronectin und Vitronectin in einer Studie von Leroy-Dudal et al. von 2004 als natürliche Liganden für die Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* benannt. Als wichtiger Rezeptor für *Pseudomonas aeruginosa* wurde auch das CFTR-Protein selbst angegeben (Pier et al. 1996). Bislang wurde jedoch kaum untersucht, wie sich die Ausprägung der Adhäsion bei chronischer Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* entwickelt.

Eine Einflussnahme im Sinne einer Reduzierung der Adhäsionsstärke von *Pseudomonas aeruginosa* an respiratorische Epithelien, konnte für das Antibiotikum Azithromycin an buccalen Zellen (Baumann et al. 2001) gezeigt werden. In einer weiteren Studie wurde für Azithromycin und Clarithromycin in Kombination mit Gatifloxazin eine signifikante Inhibition der Adhäsion gezeigt (Zhonghua et al. 2001). Für Chloramphenicol und Cefsulodin (Di Martino et al. 2001; Carfartan et al. 2004) und auch Dextran (Barghouti et al. 1996) konnte gegenüber Alveolarepithel die gleiche Wirkung festgestellt werden. Auch für Polysaccharide wie Glycogen und Mannan konnte eine

inhibitorische Wirkung auf die Adhäsion nachgewiesen werden (Wolska et al. 2005). Das Antibiotikum Piperacillin in Kombination mit Tazobactam zeigte in einer Versuchsreihe von Fonseca et al. 2004 eine signifikante Abnahme der Adhäsion und eine Abnahme der Biofilmbildung bei verschiedenen *Pseudomonas aeruginosa*-Stämmen. In Erforschung sind auch Vakzine mit konsekutiver Antikörperbildung gegen Adhäsine (Cachia et al. 2003). Ziel dieser Forschungen ist es, den primären Schritt der Besiedlung durch *Pseudomonas aeruginosa*, die Adhäsion an das respiratorische Epithel, insbesondere bei CF-Patienten zu blockieren oder zu reduzieren.

### 1.9. Besonderheiten von *Pseudomonas aeruginosa* bei Zystischer Fibrose

Bei der Erstbesiedlung der Lunge von CF-Patienten mit *Pseudomonas aeruginosa* lassen sich in der überwiegenden Anzahl der Fälle die nicht-mukoiden Stämme nachweisen. Im Verlauf der chronischen Infektion kommt es zu der charakteristischen Umwandlung in die schleimbildende, mukoide Form (Döring et al. 1997, Pederson et al. 1992). Ein auslösender Faktor der Transformation wird in der vermehrten Sauerstoffradikalenproduktion durch neutrophile Granulozyten vermutet (Mathee et al. 1999). Es kommt zu einer Überproduktion von Exopolysacchariden, dem so genannten Alginate, welches aus L-Glucuronsäure und D-Mannuronsäure aufgebaut ist (Russel et al. 1989). Die mukoiden Bakterien assoziieren zu größeren Verbänden, den Mikrokolonien (Lam et al. 1980). In Verbindung mit Mukus und Entzündungszellen bildet sich ein Biofilm aus, welcher an Muzine der Bronchien adhärert (Plotkowski et al. 1996). Das Volumen des Biofilms besteht nur zu 10-20% aus Bakterien. Zur Versorgung der Bakterien mit Sauerstoff und anderen Nährstoffen ist der Biofilm mit einem System von kleinen Kanälen durchzogen (Costerton et al. 1994). In dem Biofilm gebundene Bakterien wachsen im Gegensatz zu den planktonisch vorkommenden Erregern verlangsamt (Dunne 2002). Die Eigenschaft zur Alginatebildung von *Pseudomonas aeruginosa* geht bei Subkultivierung regelmäßig wieder verloren.

Die Alginatebildung gilt als der wesentliche Virulenzfaktor von *Pseudomonas aeruginosa* bei der Zystischen Fibrose, da bei mukoiden Stämmen alle übrigen potentiellen Virulenzfaktoren vermindert ausgeprägt sind (Govan 1996). Nach einer Studie von

Vranes et al. von 2004 nimmt auch der Virulenzfaktor Adhäsion bei Ausbildung der mukoiden Form ab. Trotzdem kommt es beim Befall durch die mukoide Variante im Erkrankungsverlauf zu einer stark fortschreitenden Zerstörung von Lungengewebe und einer zunehmenden Einschränkung der Lungenfunktion (Pederson et al. 1992).

Die Ausbildung des Alginats und konsekutiv des Biofilms hat weit reichende Folgen auf das bronchopulmonale System:

- Mechanische Verlegung der Lumina der Bronchien
- Alginat ist ein Adhäsion an Lungeneithelien (Marty et al. 1998)
- Herabsetzung der mukoziliaren Clearance
- Erhöhung der Antikörperproduktion
- Beeinträchtigung der Phagozytosefähigkeit (Cabral et al. 1987)
- Verminderung der Wirksamkeit von Antibiotika (Bayer et al. 1991; Aaron et al. 2002))
- Induktion der Produktion von Interleukin 1 und des Tumornekrosefaktors alpha
- Beeinträchtigung der Aktivierung des Komplementsystem
- Steigerung der sekretorischen Aktivität von mukösen und serösen Zellen

In Versuchen an Patienten mit diffuser Panbronchiolitis konnte eine verminderte Produktion von Alginat durch die Anwendung von Makroliden gezeigt werden (Molinari et al. 1993, Tateda et al.1996, Ichimiya et al.1996). Auch die Ausbildung weiterer Virulenzfaktoren wie die Produktion von Exoprodukten (z.B. Elastase), von Geißeln und die Struktur der Lipopolysaccharide konnten in diesem Zusammenhang positiv beeinflusst werden.

Eine weitere Möglichkeit eine Reduktion der Alginatproduktion und auch der Adhärenzstärke an Alveolarepithel zu bewirken, besteht in der Anwendung von Bismuttholderivaten (Wu et al. 2002).

## 1.10. Infektion der CF-Lunge mit *Pseudomonas aeruginosa*

Seit den Fünfziger-Jahren ist *Pseudomonas aeruginosa* der Leitkeim der Zystischen Fibrose. In der 2.-3. Dekade liegt der Lungenbefall bei CF-Patienten mit *Pseudomonas aeruginosa* bei einer Prävalenz von 80% (Govan et al. 1996). Der Keim weist eine hohe Persistenz nach stattgefunder Infektion auf. Oft bleibt die Lunge eines CF-Patienten ein Leben lang von einem *Pseudomonasstamm* besiedelt (Tümmler et al. 1997). Es können auch mehrere Klone nebeneinander existieren oder transiente Besiedelungen auftreten. Ein vollkommener Wechsel des Erregerstammes ist sehr selten. Die Lungeninfektion mit *Pseudomonas aeruginosa* mit den entzündlichen Gewebsveränderungen ist maßgeblich für die Prognose der Zystischen Fibrose verantwortlich.

Was die hohe Prädisposition der CF-Lunge gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* bedingt ist noch weitgehend ungeklärt. Die Epithelschäden durch vorausgehende Infektionen mit Viren (z.B. Respiratory Syncytial Virus oder Influenza A-Virus) und Bakterien (*Staphylokokkus aureus*, *Hämophilus influenzae* und *Streptokokkus pneumoniae*) erleichtern die Kolonisierung und Infektion durch *Pseudomonas aeruginosa*. Die hohe Adhäsionsbereitschaft an das entzündlich veränderte Lungenepithel und den Schleim wurde bereits erwähnt. Nach Maselli et al. (2003) sind das weibliche Geschlecht, der homozygote Genotyp für die Delta-F508-Mutation und vorausgehende Infektionen mit *Staphylokokkus aureus* Risikofaktoren für die Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa*. Des weiteren ist die, durch Elektrolytimbalance und die Produktion von hoch viskösem Schleim, herabgesetzte mukoziliäre Clearance und die verminderte bakterizide Wirkung von Epithelien, durch die Inaktivierung von Abwehrmechanismen in der CF- Lunge (Smith et al. 1996 und Goldmann et al. 1997), für die besondere Anfälligkeit mitverantwortlich. Die erhöhte Affinität für die Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* durch die gesteigerte Ausbildung von Asiolo-GM 1 auf CF-Lungenepithelien wurde erwähnt. Durch die Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* wird die Produktion des proinflammatorisch wirkenden Interleukin 8 erhöht (Di Mango et al. 1995). Gleichzeitig ist in der CF-Lunge die Produktion des Gegenspielers Interleukin 10 vermindert (Bonfield et al. 1995). Die Selektion von *Pseudomonas aeruginosa* durch Antibiotika-Therapien vor allem gegen *Staphylokokkus aureus*, wird kontrovers

diskutiert.

*Pseudomonas aeruginosa* verfügt über eine Vielzahl von Virulenzfaktoren (s. 1.10. und 1.11.) welche das intakte Abwehrsystem von CF-Patienten (Harper et al. 1980, Scrensen et al. 1990) schwächen und unterlaufen.

Da eine Reihe dieser Virulenzfaktoren wichtige Antigene darstellen, kommt es zu einer ausgeprägten und anhaltenden Antikörperproduktion, durch die der Erreger in der Regel trotzdem nicht eliminiert werden kann. Es folgt eine frustrane, immunkomplexvermittelte Entzündungsreaktion mit Aktivierung des Komplementsystems. Eine Schlüsselrolle nehmen die massenhaft vorhandenen neutrophilen Granulozyten ein. Die, durch den Zerfall von Granulozyten in großen Mengen freiwerdende, Neutrophilenelelastase führt zu starken proteolytischen Gewebedestruktionen, induziert die Produktion von Interleukin 8, und ist eine hochpotente sekretogene Substanz (Döring et al. 1995 und Schuster et al. 1992). Zusammen mit weiteren Proteasen beeinträchtigt sie die lokale Immunabwehr und hat auch direkte toxische Wirkungen auf das respiratorische Epithel. Weitere Produkte der Granulozyten sind Sauerstoffradikale und lysosomale Enzyme. Die progrediente Zerstörung von Lungengewebe führt im Verlauf zum fortschreitenden fibrotischen Umbau der Lunge. Das geschädigte Lungengewebe ist wiederum prädisponiert für erneute Adhäsion, Kolonisation und Infektion durch *Pseudomonas aeruginosa*.

Da die Infektion der CF-Lunge mit *Pseudomonas aeruginosa* und damit die Lungenschäden mit der Überlebensrate korrelieren (Ramsey 1996), muß die Kolonisierung und folgende Infektion so früh wie möglich erkannt und therapiert werden. Ein Ziel der vorliegenden Studie ist es, den Zusammenhang zwischen der Entwicklung des Funktionszustands der Lunge in Abhängigkeit von der Adhäsionsstärke im Verlauf der chronischen Pseudomonasinfektion zu untersuchen.

Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* außerhalb der Lunge kommen bei CF-Patienten nicht vermehrt vor. Ziel der Forschung ist es, Maßnahmen zu entwickeln, die die Prädisposition der CF-Lunge für die Pseudomonasinfektion senken und die Primärbesiedlung erschweren oder verhindern.

### 1.11. Therapie der bronchopulmonalen Infektion durch *Pseudomonas aeruginosa* bei Zystischer Fibrose

Für die antibiotische Therapie von bronchopulmonalen Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* steht eine Reihe von Substanzen zur Verfügung, auf welche der Erreger mit unterschiedlicher Sensitivität reagiert. Es kommen zur Anwendung Penicillinderivate wie Piperacillin und Azlocillin, Cephalosporine der 3. Generation (z.B. Ceftazidim), Monobaktame, Carbapeneme (Imipenem und Meropenem), Colistin und Aminoglykoside wie vor allem Tobramycin. Diese Substanzen werden teils inhalativ, teils oral oder intravenös verabreicht.

Insgesamt bestehen im Gegensatz zu den Wildstämmen bei Krankenhausstämmen häufig Resistenzen gegen verschiedene Wirkstoffgruppen. Diese erworbenen Resistenzen erschweren die gezielte chemotherapeutische Behandlung sehr. Deshalb wird die Therapie grundsätzlich mit einer Zweierkombination von Antibiotika mit unterschiedlichen Resistenzmechanismen vorgenommen.

Eine Eradikation von *Pseudomonas aeruginosa* ist nur in Ausnahmefällen möglich (Palm 2000), so dass in der Regel nur eine Erregerzahlreduktion Ziel der Therapie sein kann. Es werden Therapieschemata zur Dauertherapie in Form einer alle 3 Monate durchzuführenden, parenteralen, prophylaktischen antibiotischen Therapie über 14 – 21 Tage oder eine gezielte symptomatische Infektexazerbationstherapie angewendet.

In Erprobung sind verschiedene Vakzinstrategien um die Wahrscheinlichkeit eines Erstbefalls durch *Pseudomonas aeruginosa* zu verringern. Die Beeinflussung des grundlegenden Gendefektes durch gentechnische Methoden brachte bislang keinen durchbrechenden Erfolg.

## 1.12. Symptomatische Therapie und Prophylaxe der bronchopulmonalen Manifestation

Begleitend zu der gezielten antibiotischen Therapie der Lungeninfektionen schließt die Behandlung eine Reihe von prophylaktischen und symptomatischen Therapieansätzen mit ein:

- Physiotherapeutische Maßnahmen und körperliche Aktivität zur Thoraxmobilisation und Sekretelimination, Erhöhung der mukoziliären Clearance und Lungenelastizitätserhaltung
- Bronchospasmolytika wie Beta-2-Mimetika und Anticholinergika bei hyperreaktivem Bronchialsystem und Obstruktionen
- Anwendung von Mukolytika wie N-Acetylcystein
- Verabreichung von Glucokortikosteroiden
- Rekombinante DNAse zur Aufspaltung extrazellulärer kumulierter DNA zwecks Reduktion der Schleimviskosität
- Amilorid zur Beeinflussung des Elektrolytflusses um die Natrium- und Wasserabsorption zu reduzieren

Auch die optimierte Therapie der gastrointestinalen Manifestationen hat entscheidenden Einfluss auf die pulmonale Situation. Durch Erhalt eines ausreichenden Längensollgewichtes und ausreichender Zufuhr von Energieträgern, wird die respiratorische Leistung positiv beeinflusst (Konstan et al. 2003, Steinkamp et al. 2002).

### 1.13. Zielsetzung und Fragestellung

Die chronische Infektion der Lunge mit *Pseudomonas aeruginosa* bei der Zystischen Fibrose ist ein wesentlicher Faktor bezüglich der Morbidität und Mortalität der erkrankten Patienten. Die Adhäsion als feste und dauerhafte Bindung an die Alveolarzellen ist die wesentliche Voraussetzung für die Kolonisation und spätere Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa*.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Entwicklung des Virulenzfaktors Adhäsion bei chronisch mit *Pseudomonas aeruginosa* infizierten CF-Patienten im Verlauf der Erkrankung zu untersuchen. Die Untersuchungen wurden an 8 CF-Patienten vom Zeitpunkt der Erstkolonisation mit *Pseudomonas aeruginosa* über einen Zeitraum von bis zu 15 Jahren durchgeführt. Neben der Adhäsionsstärke wurde der klinische Status anhand der Lungenfunktionsparameter FVC und FEV1 im Verlauf erfasst. Zusätzlich wurden in vorausgegangenen Studien die Genotypen für einen Großteil der Proben bestimmt. Dies ermöglichte die Untersuchung, ob ein Zusammenhang zwischen der Adhäsionsstärke und den bakteriellen Genotypen besteht.

Folgende Fragestellungen wurden erstellt:

- Ist die Ausprägung der Adhäsion bei Erstkolonisation mit *Pseudomonas aeruginosa* bei CF-Patienten ähnlich oder zeigen sich interindividuelle Unterschiede?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen der Adhäsion bei Erstbesiedelung und dem pulmonalen Funktionszustand?
- Zeigt sich im Verlauf der chronischen Infektion der Lunge bei CF-Patienten eine Änderung der Ausprägung des Virulenzfaktors Adhäsion?
- Liegt bei den einzelnen Patienten ein Zusammenhang zwischen der gemittelten Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* und dem durchschnittlichen pulmonalen Funktionszustand vor?
- Besteht eine Korrelation zwischen der Entwicklung der Ausprägung des Virulenzfaktors Adhäsion und des pulmonalen Funktionszustandes bei CF-Patienten über den Untersuchungszeitraum?
- Lassen sich Rückschlüsse von der Adhäsionsstärke auf den pulmonalen funktionellen Zustand eines CF-Patienten ziehen oder umgekehrt?

## Einleitung

---

- Zeigt sich eine durchschnittlich höhere Adhäsion bei Nachweis von mehreren *Pseudomonas aeruginosa*- Stämmen?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Genotyp eines Bakterienisolates und der Fähigkeit zur Adhäsion?

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Probenkollektiv und Untersuchungszeitraum

Die in dieser Versuchsreihe verwendeten Bakterienisolate wurden von der Forschungsgruppe „Molekulare Pathologie der Mukoviszidose“ der Medizinischen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um insgesamt 100 sequentiell isolierte Bakterienasservate aus Sputumproben von acht Mukoviszidose-Patienten. Die Bakterienisolate wurden jeweils vom Beginn der Erstkolonisation über einen Zeitraum von bis zu 15 Jahren gesammelt und in dieser Arbeit bezüglich ihrer Adhäsionsstärke untersucht. Teilweise wurden aus einer Sputumprobe eines Patienten mehrere phänotypisch unterschiedliche *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme isoliert und untersucht. Bei der Auswertung und Darstellung der gemessenen Adhäsionsstärken wurden in diesen Fällen die Adhäsionsstärken der phänotypisch unterschiedlichen Stämme pro Entnahmezeitpunkt gemittelt.

### 2.2. Laborgeräte

- Fluoreszenz-Mikroskop von Zeiss®
- Fluoreszenzlampe, Kappa®
- Auflichtmikroskop, Zeiss® ID 03
- Auswertungssoftware Image Pro Plus®, The Proven Solution, Version 3.0, Media Cybernetics
- UV-VIS Spektrophotometer, Shimadzu® UV mini 1240
- Brutschrank, Heraeus® HERAcell
- Schüttelbrutschrank, Biometra® APT Line
- Schüttelwasserbad, Köttermann® 244
- Zentrifuge, Hettich® Rotanta/TRC
- Milligrammwaage, Sartorius® analytic
- Tiefkühlschrank, Heraeus® HERAfreeze
- Sterilwerkbank, Heraeus® Modell HERAsafe

### 2.3. Medien, Puffer und Lösungen

Zellmedium (Dulbecco`s Modified Eagle Medium) mit Zusatz von 10% FCS (hia), 2mM L-Glutamin und einem Anteil von 50 U/ml Penicillin/Streptomycin

LB-Flüssigmedium

HBSS (Hank`s balanced salt W/O Phenol red)

Hepes 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic-acid, tris-buffer

Na-Borat (20mM Borsäure und 150 mM NaCl, pH 9,0)

PBS (Phosphat buffered saline)

BSA (Bovine serum albumine)

Formalin 0,5%

Schafblutagarplatten

### 2.4. Aufbereitung der Bakterienisolate

Die Bakterienisolate wurden in Eppendorf-Röhrchen in einem Tiefkühlschrank bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Zur Anwendung einer Bakterienprobe in einer Versuchsreihe wurden die benötigten Asservate in einen Kühlbehälter überführt und mit einer zuvor ausgeglühten Öse eine kleine Menge entnommen (ca. eine  $\frac{1}{4}$  Öse). Anschließend erfolgte der 3-Ösenausstrich auf Schafsblutagarplatten. Diese wurden als Übernachtskultur im Brutschrank bei  $37^{\circ}$  inkubiert. Am nachfolgenden Tag wurde eine Reinkultur mit der Öse abgezogen und in 5ml LB-Flüssigmedium überimpft. Nach erneuter Übernachtskultur im Schüttelinkubator bei  $37^{\circ}$  waren die Proben für den Versuch einsetzbar.

## 2.5. Lungenzelllinie A549

Die Zelllinie A549 ist eine humane Lungencarcinomzelllinie, welche von einem 1972 explantierten Lungentumor eines kaukasischen Mannes abstammt. Im Detail handelt es sich um eine Alveolarzellcarcinomlinie entsprechend den Pneumozyten Typ II. Die gut differenzierten Epithelzellen wachsen als Monolayer konfluent und adhärent. In einer Verdünnung von 1:5 - 1:10 nach Passage wachsen die Zellen als Monolayer innerhalb von 4-7 Tagen erneut konfluent. Die Verdopplungszeit liegt bei 30 Stunden. Optimale Wachstumsbedingungen sind 37°C bei 5% Kohlendioxid und Verwendung von 90% Delbecco`s Modified Eagle Medium mit 10% FBS.

A549 wurde in zahlreichen Versuchsreihen in Verbindung mit *Pseudomonas aeruginosa* verwendet (Gagniere et al. 2004; Leroy-Dudal et al. 2004; Azghani et al. 2002; Carterson et al. 2005; Chi et al. 1991; Di Martino et al. 2000; Barghouti et al. 1996; Di Martino et al. 2002; Hahn 1997).

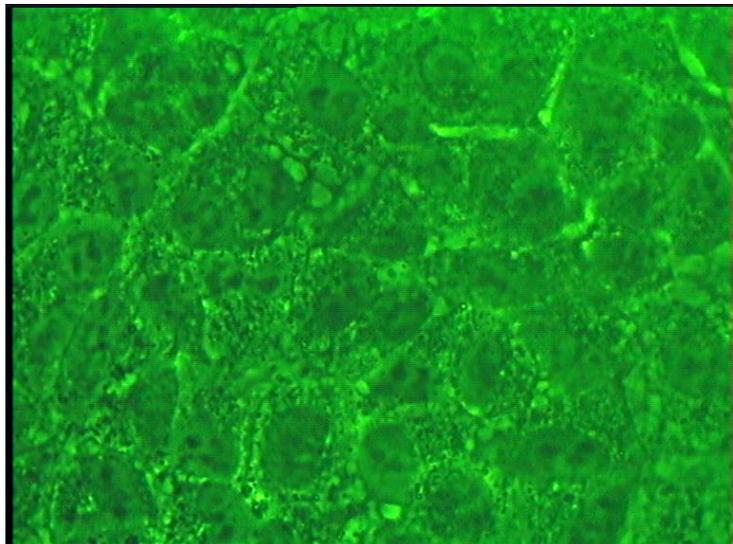


Abbildung 1: Confluent A 549-Zellrasen

## 2.6. Zellkultivierung von A549

Die Zellen wurden in Falconflaschen mit einer je nach Flaschengröße entsprechenden Menge Medium bei 37°C und 5% Kohlendioxid im Brutschrank inkubiert. Alle 2-3 Tage wurde das Medium vorsichtig mittels Pipette abgesaugt, ohne die adhärennten Zellen zu beschädigen, und durch neues auf 37°C vorgewärmtes Zellmedium ersetzt.

Bei Konfluenz der Zellen oder spätestens nach einer Woche wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde das Medium vorsichtig mit der Pipette abgesaugt und der Zellrasen anschließend einmalig mit erwärmter PBS-Pufferlösung von Mediumresten befreit. Nach Abpipettieren der Mediumreste erfolgte die Zugabe von ebenfalls erwärmter Trypsin/EDTA-Lösung in einer nach Flaschengröße festgelegten Menge ( 4, 8 oder 15ml ) auf den Zellrasen. Anschließend erfolgte die Inkubation im Brutschrank für ca. 5 Minuten bis sich die Zellen vom Flaschenboden ablösten. Es war darauf zu achten, dass die Inkubation nicht länger als 10 Minuten betrug, da es sonst zu Zellschäden kam. Die entstandene Zellsuspension wurde abgesaugt und mit der doppelten Menge Medium resuspendiert und anschließend bei 1180Upm bei 25°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das entstandene Zellsediment mit etwas Medium resuspendiert. Im Anschluss wurde mittels Neubauerzählkammer die gewünschte Verdünnung von  $10^5$  A549-Zellen/ml eingestellt. Mit dieser Zellsuspension wurden 12-well-Platten mit je 1ml / Cup befüllt und im Weiteren für 2 Tage unter Kontrolle und einmaligem Mediumwechsel bis zur Ausbildung eines konfluenten Zellrasens im Brutschrank inkubiert. Die nach Befüllung der Platten überbleibende Zellsuspension wurde in Falconflaschen ausgesät und mit entsprechenden Mengen Zellmedium erneut inkubiert. Die Zellen wurden maximal 25mal passagiert. Bei höheren Passagen kam es zu einer „falsch niedrigen Adhärenz“ der Bakterien an den Lungenzellen. Zudem zeigte sich ein zunehmend verlangsamtes Wachstum der Zellen mit gehäuft auftretenden toten Zellen, so dass sich keine konfluenten Zellrasen mehr ausbildeten. Zwecks Kontrolle der Reproduzierbarkeit wurde bei jedem Versuchsansatz der Kontrollkeim PAO (*Pseudomonas aeruginosa* strain one) mitgeführt um Abweichungen im Adhäsionsprotokoll zu erkennen.

## 2.7. Prinzip der Fluoreszenz und FITC

Wird nach der Absorption von Strahlung von Stoffen die aufgenommene Energie nicht in Form von Wärme, sondern als sichtbares Licht abgegeben, so spricht man von Fluoreszenz. Dieses ausgestrahlte, nicht absorbierte Licht, auch Sekundärstrahlung genannt, zeigt stets eine größere Wellenlänge als die Anregungsstrahlung. Da Bakterien nicht die Eigenschaft besitzen, sich zur Fluoreszenz anregen zu lassen, können diese zur Detektion mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert werden. Durch den Fluoreszenzfarbstoff FITC ( **F**luoreszein-**I**so-**T**hio-**C**yanat ) kommt es zu einer antikörper-unabhängigen direkten Proteinmarkierung. Nach Markierung der Bakterien mit FITC wird bei der Auswertung im Fluoreszenzmikroskop die Probe mit Licht bestrahlt, das genau der Wellenlänge entspricht, die den Farbstoff am besten zur Fluoreszenz anregt. Im Falle von FITC wendet man blaues Licht mit einer Wellenlänge von 450nm bis 490nm an. Die Einschränkung des Lichtes auf ein bestimmtes Wellenlängenspektrum wird über einen Erregerfilter erreicht. Die von FITC ausgehende Sekundärstrahlung ist gelbgrünlich (Wick et al. 1976).

Da der Farbstoff mit der Zeit und unter Bestrahlung mit Tageslicht und UV-Licht verblasst (Picciolo und Kaplan 1985), muß zügig gearbeitet werden und die Auswertung in einem abgedunkelten Raum vorgenommen werden. Bei starker Bestrahlung ist es möglich, dass FITC 50% der Strahlungsintensität innerhalb von 2 bis 3 Minuten verliert (Sedlacek et al. 1981).

## 2.8. Adhäsionsassay

Nach Entnahme der Übernachtskulturen aus dem Schüttelbrutschrank wurden diese bei 3000g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Anschließend erfolgte das Dekantieren des Überstandes und die Resuspension des Pellet mit 8ml gekühltem Na-Borat-Puffer und die erneute Zentrifugation unter oben genannten Bedingungen. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Nach erneutem Verwerfen des Überstandes wurde mit 1ml Na-Borat resuspendiert unter Zugabe von 200µl FITC, welches zuvor abgedunkelt aufgetaut worden war. Anschließende Inkubation der Suspension im abgedunkelten

Schüttelwasserbad bei 23°C für 30 Minuten.

Nach erfolgter Inkubation wurde die Suspension vorsichtig auf 5ml 6%-Albuminlösung BSA/PBS geschichtet und für 15 Minuten bei 3000g bei 4°C zentrifugiert zwecks Abbindung des überschüssigen, ungebundenen FITC. Der Überstand wurde dekantiert, mit HBSS + Hepes resuspendiert und erneut bei 3000g bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Anschließend erfolgte die Einstellung der Bakteriendichte am Photometer auf  $10^9$  cfu/ml bei einer Extinktion von 600nm. Aus zuvor durchgeführten Verdünnungsreihen war dieser Wert ermittelt worden. Nach Verdünnung auf 1:10 mit eisgekühltem HBSS + Hepes, mit einer Endkonzentration von  $10^8$  cfu/ml, wurden die cups der 12-well-Platten mit konfluentem A 549-Zellrasen mit je 1ml gefüllt. Die einzelnen Cups der Platten waren zuvor unter dem Lichtmikroskop auf Konfluenz des Lungenzellrasen kontrolliert wurden und anschließend vorsichtig mit auf 37°C erwärmten HBSS + Hepes dreimal gespült worden (Entfernung von Mediumresten).

Die mit Bakteriensuspension gefüllten Platten wurden für 60 Minuten bei 70rpm im Schüttelbrutschrank inkubiert. Abschließend wurden die nicht adhärenen Bakterien durch viermaliges Spülen der Cups mit kaltem HBSS + Hepes abgewaschen und die Fixierung mit 500µl 0,5% Formalin je Cup vorgenommen. Bis zur Auswertung wurden die Platten im abgedunkelten Kühlschranks gelagert.

### 2.9. Auswertung der Versuchsergebnisse

Ziel des Versuchsansatzes war es die Anzahl der fluoreszenzmarkierten und an Lungenzellen adhärenen Bakterien der verschiedenen *Pseudomonas aeruginosa*-Asservate zu bestimmen. Es erfolgte eine Zählung von Bakterien pro Gesichtsfeld auf dem Zellkulturrasen.

Die Auswertung erfolgte mittels Auflichtfluoreszenzlichtmikroskopie mit Hilfe des halbautomatischen Zählprogramms Image Pro Plus® unter visueller Kontrolle. Die Bakterienproben wurden jeweils als Dreifachansatz angesetzt und pro Cup je 30 Gesichtsfelder mit einer Größe von  $0,0186 \text{ mm}^2$  (0,12mm x 0,155mm) ausgewertet. Aus den für jede Bakterienprobe ermittelten 90 Werten wurde der Mittelwert gebildet. Der Referenzkeim PAO (DSM 1707) wurde bei jedem Versuchsdurchgang mitgeführt.

## 2.10. Statistik

Zur statistischen Auswertung und graphischen Darstellung der erhobenen Daten wurde mit den Programmen Sigma-Plot SPSS Science 2000, Microsoft Excel sowie dem Varianzanalysemodell ANOVA (Berechnung mit SAS/Mixed) gearbeitet. In dieser Studie wurden bereits asservierte Bakterienproben und retrospektiv gesammelte klinische Daten aufgearbeitet und untersucht.

Die verwendeten Sputumproben waren bei den Patienten in keiner festen zeitlichen Abfolge entnommen worden. Bei jedem der 8 Patienten waren die Zeitpunkte der Probengewinnung verschieden und auch die Zeitintervalle zwischen den Proben variierten individuell stark.

Die Erfassung des funktionellen pulmonalen Zustandes der Patienten erfolgte ebenfalls individuell und nicht in regelmäßigen Abständen. Zudem wurden die klinischen Untersuchungen nicht immer mit den Sputumentnahmen kombiniert durchgeführt. Aufgrund dieser Einschränkungen im Datenmaterial erfolgte eine vorwiegend deskriptive Auswertung der Versuchsergebnisse.

## 2.11. Genotypisierung der *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme

Bei den Bakterienisolaten wurde in vorausgegangenen Studien für die erste Hälfte des Untersuchungszeitraumes mit Hilfe der RFLP (Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen) eine Genotypisierung vorgenommen. Bei dieser Methode wird mit Hilfe von selten schneidenden Restriktionsenzymen (z.B. *Spe I*) die Bakterien-DNA in verschieden lange Fragmente verdaut. Mittels der Gelelektrophorese im Wechselfeld werden die resultierenden Fragmente aufgetrennt und bilden ein für den jeweiligen Stamm charakteristisches Bandenmuster aus. Die identifizierten unterschiedlichen Genotypen wurden mit Groß- und Kleinbuchstaben bezeichnet. Die Methode hat eine hohe diskriminatorische Qualität.

## 2.12. Klinische Verlaufsparemeter

Zusätzlich zu der Entnahme der Sputumproben wurde der Verlauf des klinischen Status anhand verschiedener Parameter erfasst. Diese Daten wurden retrospektiv aus dem Archiv der Kinderklinik der Medizinischen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt. Die Erfassung des klinischen Status bei den einzelnen Patienten wurde teilweise unabhängig von der Entnahme der Sputumproben durchgeführt, so daß die Zeitpunkte der Sputumentnahmen und der klinischen Untersuchungen teilweise nicht korrelieren. Zudem ist bei 7 der 8 Patienten der Untersuchungszeitraum für die Sputumentnahme länger als der für die klinischen Lungenfunktionsparameter. Wesentlicher klinischer Parameter war die Lungenfunktion, mit Erfassung des absoluten und relativen FEV<sub>1</sub> und der absoluten und in Relation zum Sollwert gesetzten FVC. Da die absoluten Messwerte von Geschlecht, Körpergewicht, Alter und Konstitution abhängig sind und breit streuen, werden die FEV<sub>1</sub> und die FVC in dieser Studie in % des für Patienten errechneten Normalwertes angegeben.

### 2.12.1. Forcierte Vitalkapazität ( FVC )

Als **Forcierte Vitalkapazität** FVC bezeichnet man das Volumen, welches nach maximaler Inspiration durch forcierte Expiration ausgeatmet werden kann. Eine Verminderung der FVC lässt auf eine restriktive Ventilationsstörung schließen, bedingt durch Fibrose, Emphysem oder Parenchymverlust. Der Wert steht in Abhängigkeit zu der Lungen- und Brustwandcompliance. Fortgeschrittene obstruktive Lungenschäden können auch zu einer Verkleinerung der FVC führen. Als normal werden Werte >80% des alters- und geschlechtsbezogenen Sollwertes angesehen. In dieser Studie wurde die FVC prozentual auf den Sollwert bezogen erfasst.

Nach der European Respiratory Society werden die Schweregrade der funktionellen Einschränkung wie folgt gestaffelt:

- leichtgradig: FVC 70-90%
- mittelgradig: FVC < 50-70%
- schwergradig: FVC < 50%

### 2.12.2. Einsekundenkapazität ( FEV1 )

Das **Forcierte Expiratorische Volumen**, auch Einsekundenkapazität oder Tiffeneau-Test genannt, definiert das Gasvolumen, das innerhalb einer Sekunde nach maximaler Inspiration durch forcierte Expiration ausgeatmet werden kann. Die gebräuchliche Angabe des FEV1 in Prozent der Vitalkapazität wird auch in dieser Studie verwendet. Der Sollwert der Einsekundenkapazität beträgt mindestens 80% der FVC. Eine Verminderung des FEV1 kommt insbesondere bei obstruktiven Ventilationsstörungen vor. Die European Respiratory Society unterscheidet 3 Schweregrade der Einschränkung der FEV1:

- leichtgradig: FEV1 > 70%
- mittelgradig: FEV1 50-69%
- schwergradig: FEV1 < 50%

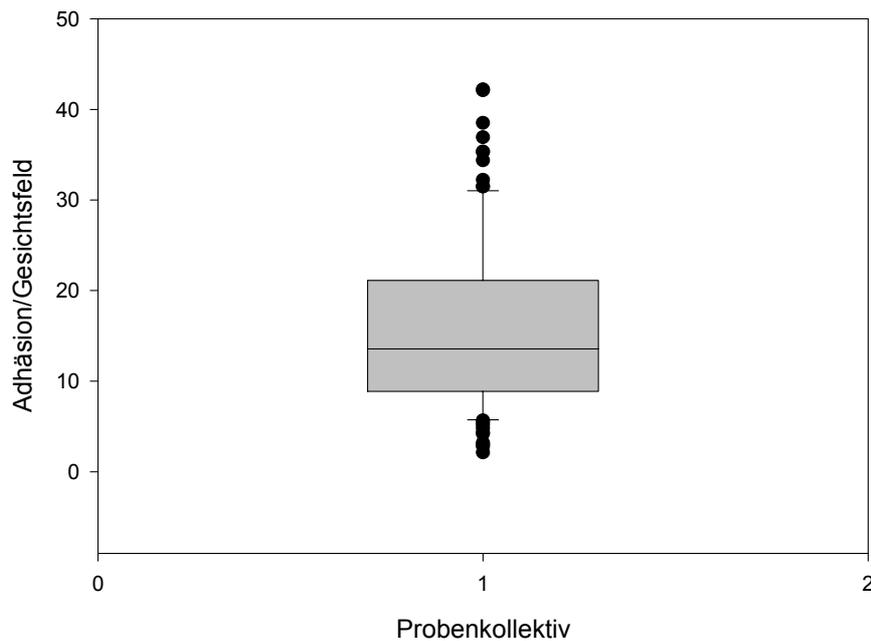
### 2.12.3. Anwendungsbereiche der Verlaufparameter

Zur Bewertung der pulmonalen Funktion bei Cystischer Fibrose haben sich die Parameter des FEV1 und die FVC zur Verlaufsbeurteilung in vielen Studien etabliert (Kerem et al. 1990, Pederson et al. 1992, Rabsch 1998, Mekus 2002, Müller 2002). Als Verlaufparameter sind sie einfach und schnell durchführbar und sind für die Verlaufbeurteilung und die Prognose sehr sensitiv (Stanbrook et al. 2004, Sharma et al. 2001, Izbicki et al. 2000, Corey et al. 1998). Da bei diesen Parametern eine große intraindividuelle Schwankungsbreite vorliegt, wird erst eine Änderung des Ausgangswert >20% für das FEV1 und die FVC als signifikant angesehen (Lemen et al. 1990).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Verteilung der Adhäsionswerte von allen Proben

Verteilung aller Adhäsionswerte



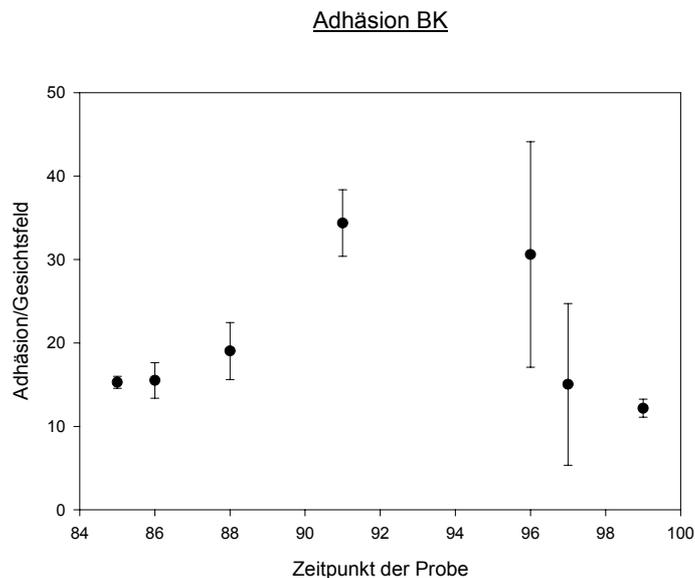
**Graphik 1: Darstellung aller Adhäsionsdaten mit Median und Quartilen**

Wie aus der Graphik ersichtlich zeigt sich eine große Spannbreite bei der Ausprägung der Adhäsion mit Werten von 2,8 Ad./GF bis zu 42,2 Ad./GF. Das Median für alle Adhäsionswerte liegt bei 13,6 Ad./GF. Werte zwischen 8,9 und 21 Ad./GF (Bereich zwischen 1. und 3. Quartil) entsprechen einer mittelstarken Adhäsion. Eine Adhäsion unterhalb von 8,9 Ad./GF ist als niedrig einzustufen. Werte oberhalb der 3. Quartile mit 21 Ad./GF entsprechen somit einer starken Adhäsionsausprägung. Adhäsionen oberhalb der 90. Perzentile (31,49 Ad./GF) sind als sehr stark zu benennen.

### 3.2. Entwicklung der Adhäsion und der klinischen Funktionsparameter bei den einzelnen Patienten

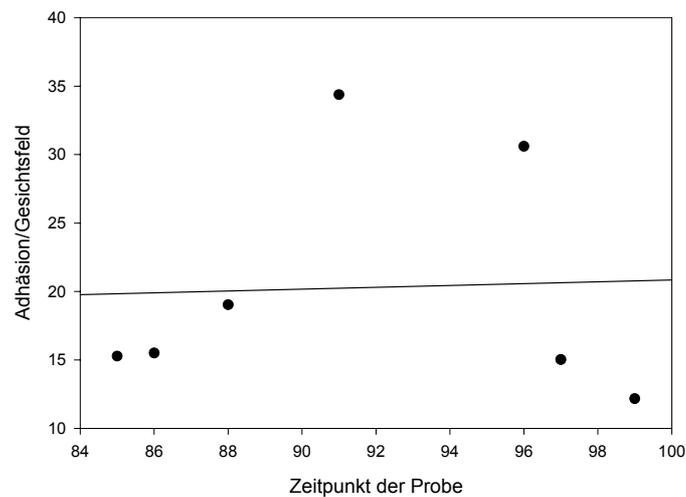
#### 3.2.1 Adhäsion und klinischer Verlauf des Patienten BK

CF-Patient BK ist weiblich und 1966 geboren. Bei dieser Patientin wurden 7 Sputumproben in einem Untersuchungszeitraum von über 15 Jahren (1985-1999) asserviert. Aus diesen Proben wurden *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme isoliert und auf ihre Fähigkeit zur Adhäsion untersucht. Der klinische Beobachtungszeitraum erstreckte sich über 12 Jahre (1985-1996). In den Jahren 86, 88, 96, 97 und 99 wurden je 2 phänotypisch unterschiedliche *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme aus den Sputumproben isoliert. Wie unter 2.1 beschrieben wurde bei Vorkommen von mehreren Stämmen pro Untersuchungszeitpunkt aus den Einzelwerten ein Mittelwert gebildet.



**Graphik 2: Mittelwerte mit Standardabweichung der Adhäsion des Pat. BK**

Adhäsion BK mit Regressionsgerade

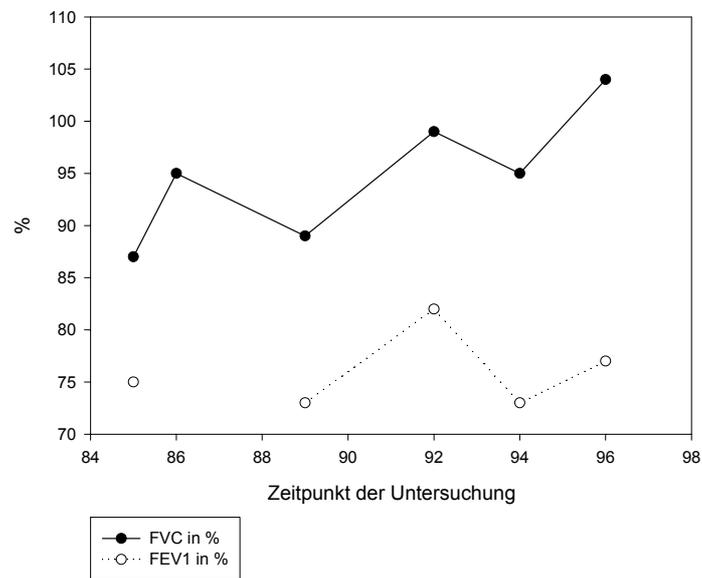


**Graphik 3: Mittelwerte der Adhäsion des Pat. BK mit Regressionsgeraden**

Die Ausprägung der gemessenen Adhäsionsstärke in dieser Versuchsreihe zeigt einen wellenförmigen Verlauf mit einem Maximum 1991 bei einem Wert von 34,4 adhärenen Bakterien pro Gesichtsfeld (Ad./GF). Zu Beginn (15,3 Ad./GF) und Ende (12,2 Ad./GF) des Beobachtungszeitraumes lagen annähernd ähnliche Werte vor. Bei Anlage einer Regressionsgeraden ergibt sich eine leichte positive Steigung der Geraden. Eine eindeutige Entwicklung der Ausprägung der Adhäsion zeigt sich bei diesem Patienten nicht.

Die klinischen Verlaufparameter zeigen sich beständig mit tendenzieller Verbesserung der FVC % von 87% 1985 auf 104% 1996. Eine Abhängigkeit zu der Adhäsionsausprägung lässt sich nicht erkennen.

Lungenfunktion BK

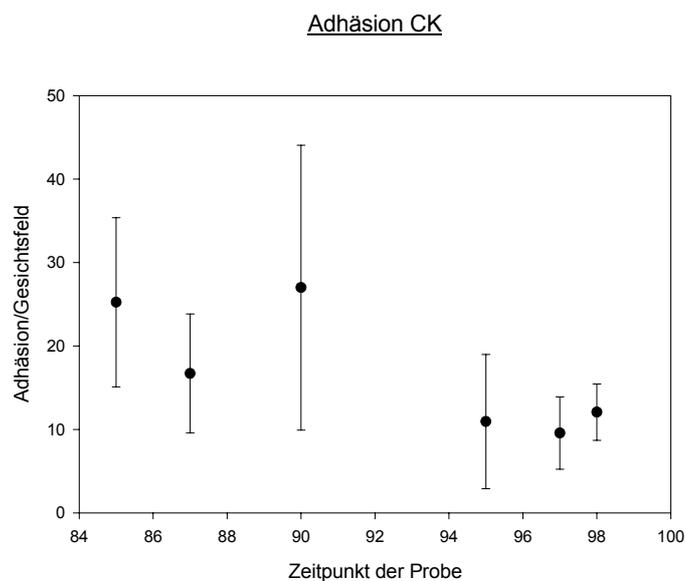


**Graphik 4: Entwicklung der klinischen Funktionsparameter des Pat. BK**

### 3.2.2 Adhäsion und klinischer Verlauf des Patienten CK

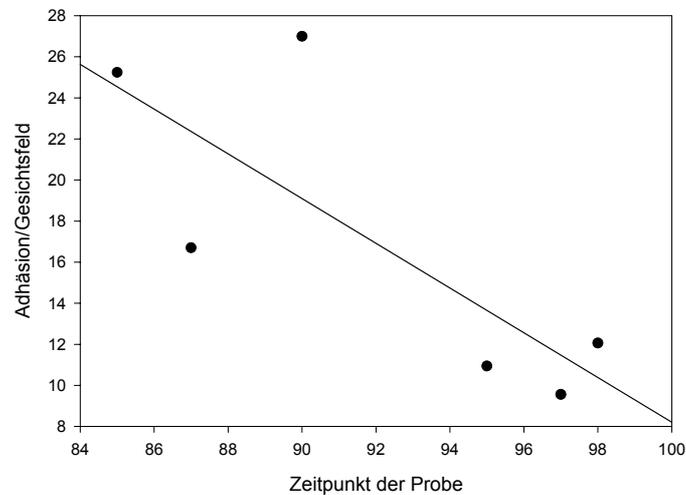
Der Patient CK ist männlich und 1968 geboren. 6 Sputumproben dieses Patienten wurden in einem Zeitraum von 14 Jahre untersucht (1985-1998). In den Jahren 85, 90 und 98 wurden je 2 Stämme aus der jeweiligen Sputumprobe isoliert. 1985, 87 und 95 waren es je 3 Stämme und 1997 4 Stämme. Der klinische Zustand wurde über 12 Jahre (1985-1996) erfasst.

Die gemessene Adhäsionsstärke nimmt bei diesem Patienten im untersuchten Zeitraum von 25,2 Ad./GF zu Beginn des Untersuchungszeitraumes auf 12,1 Ad./GF 1998 ab. In der Regressionsanalyse zeigt sich eine deutlich negative Steigung.



**Graphik 5: Mittelwerte mit Standardabweichung der Adhäsion des Pat. CK**

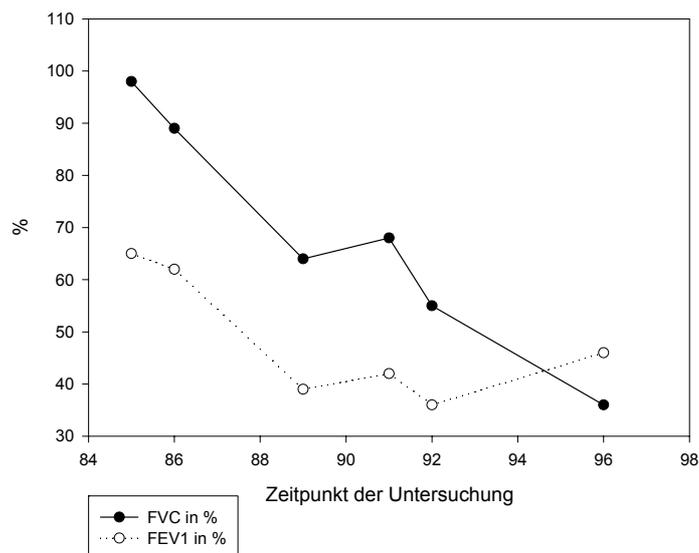
Adhäsion CK mit Regressionsgerade



**Graphik 6: Mittelwerte der Adhäsion des Pat. CK mit Regressionsgeraden**

Die klinische Situation erfährt über den Beobachtungszeitraum eine dramatische Verschlechterung. Insbesondere die FVC % sinkt vom Eingangswert mit 98% auf 36% ab. Die FEV1 % nimmt von 65% 1985 auf 46% 1996 ab. Bei diesem Patienten zeigt sich parallel zu einer Abnahme der Adhäsion eine deutliche Verschlechterung der pulmonalen Situation.

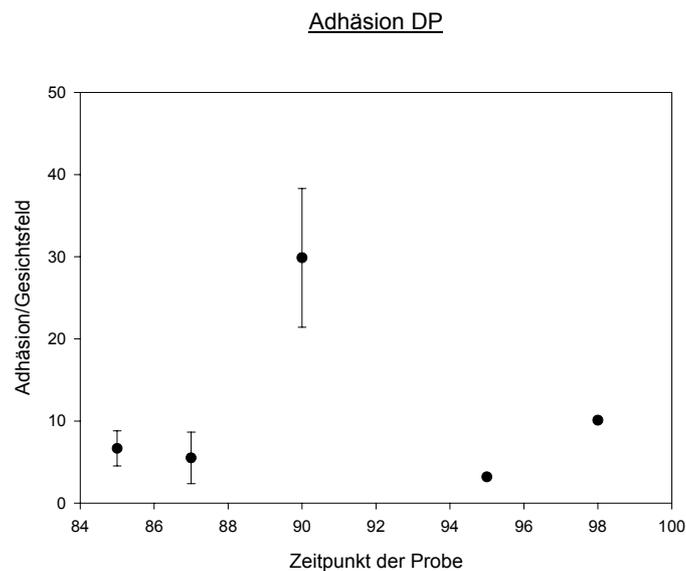
Lungenfunktion CK



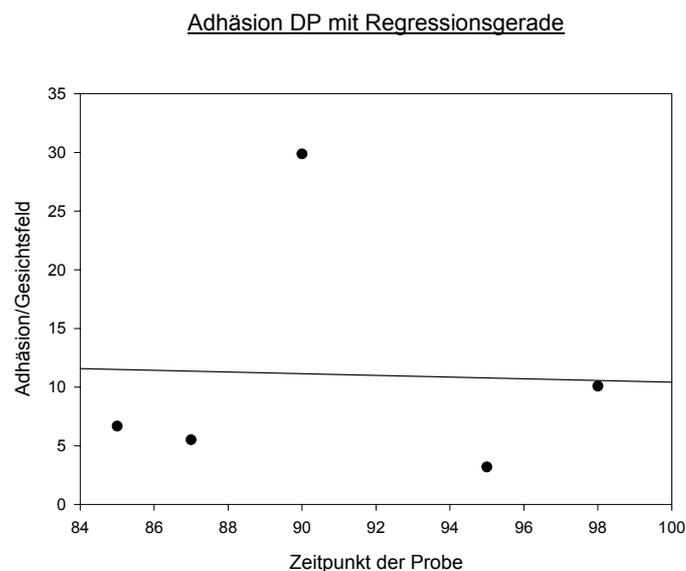
**Graphik 7: Entwicklung der klinischen Funktionsparameter des Pat. CK**

### 3.2.3 Adhäsion und klinischer Verlauf des Patienten DP

Patient DP ist männlich und 1975 geboren. Von 1985 bis 1998 wurde zu 5 Zeitpunkten *Pseudomonas aeruginosa* aus dem Sputum des Patienten isoliert. In den Jahren 85 und 87 konnten je 2 verschiedene Stämme kultiviert werden. Der klinische Status wurde über 13 Jahre von 1985 bis 1997 erfasst.



**Graphik 8: Mittelwerte mit Standardabweichung der Adhäsion des Pat. DP**



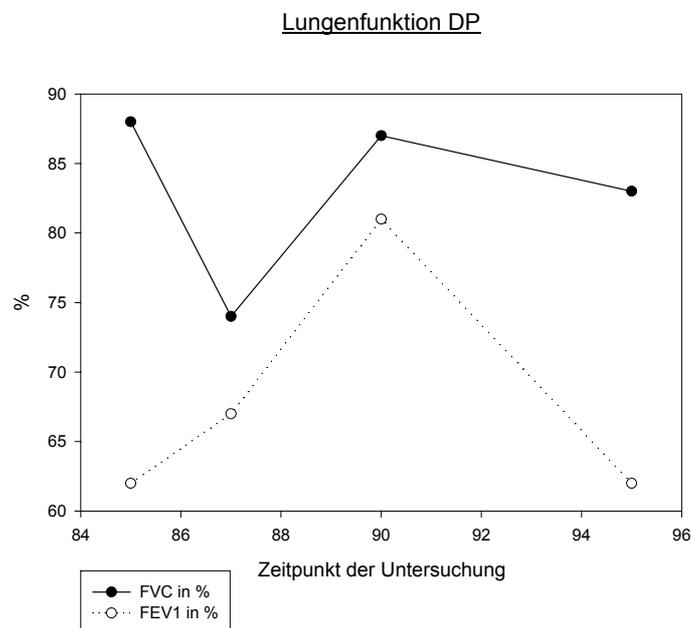
**Graphik 9: Mittelwerte der Adhäsion des Pat. DP mit Regressionsgeraden**

## Ergebnisse

---

Die Adhäsionsstärke zeigt eine eher beständige geringe Ausprägung mit einem Ausreißer im Jahr 1990. Hier wurde eine sehr hohe Adhäsion mit einem Wert von 29,9 adhärenen Bakterien/Gesichtsfeld ermittelt. Die parallel dazu dargestellte Regressionsgerade zeigt dagegen keine Steigung.

Beim Vergleich mit den klinischen Daten findet sich eine deutliche Verbesserung der FEV1 % im Jahre 1990, welche mit dem erhöhten Wert der Adhäsion zusammenfällt. Die Anfangs- und Endwerte der FEV1 % (62 und 62), sowie der FVC % (88 und 83) sind ähnlich denen der Adhäsionsausprägung nur leicht bis gar nicht verändert.

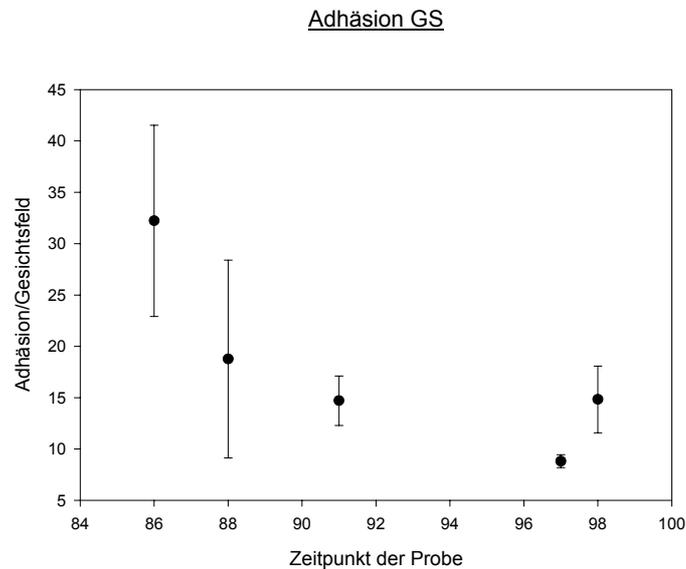


**Graphik 10: Entwicklung der klinischen Funktionsparameter des Pat. DP**

### 3.2.4 Adhäsion und klinischer Verlauf des Patienten GS

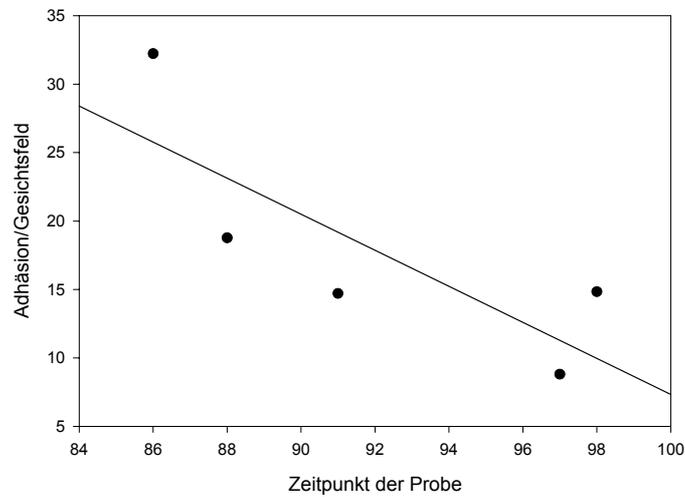
Patient GS ist weiblich und 1973 geboren. In einem Zeitraum von 15 Jahren (1986-1998) wurden 5 Sputumproben untersucht. 1991 und 1998 konnten je 2 Stämme und 1988 3 Stämme aus den Sputumproben isoliert werden. Klinischen Daten wurden von 1986-1996 in 7 Untersuchungen erfasst.

Die Adhäsion nimmt bei dieser Patientin im Untersuchungszeitraum von 32,2 Ad./GF 1986 auf einen Wert von 8,8 Ad./GF im Jahr 1997 sehr stark ab. Der letzte ermittelte Wert der Adhäsion liegt 1998 bei 14,8 Ad./GF. Die angelegte Regressionsgerade weist eine negative Steigung auf.



**Graphik 11: Mittelwerte mit Standardabweichung der Adhäsion des Pat. GS**

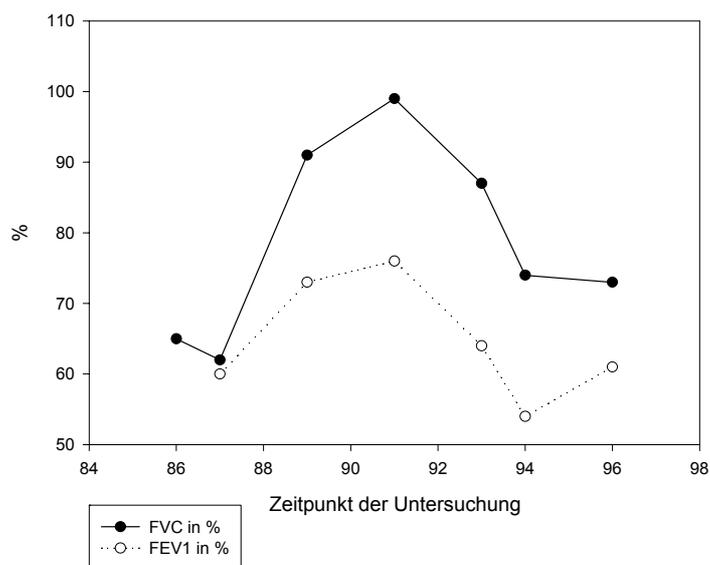
Adhäsion GS mit Regressionsgerade



**Graphik 12: Mittelwerte der Adhäsion des Pat. GS mit Regressionsgeraden**

Die FVC % erfährt nach einem Ausgangswert von 65% eine deutliche Verbesserung auf 99% 1991 mit nachfolgendem Abfall auf 73%. Der zeitliche Verlauf der FEV1 % zeigt ebenfalls eine Verbesserung des Wertes von 60% auf 76% im Jahr 1991 mit anschließendem Abfall auf 61%. Die beschriebene eher kontinuierliche Abnahme der Adhäsionsstärke zeigt keine Korrelation zum klinischen Verlauf.

Lungenfunktion GS

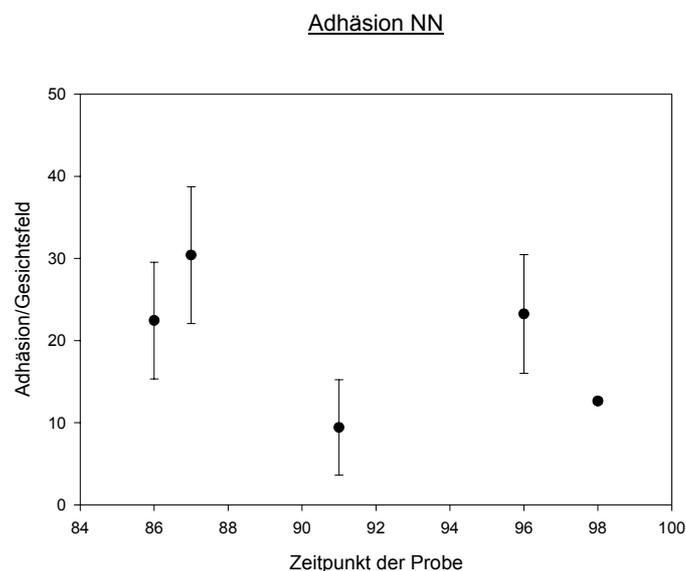


**Graphik 13: Entwicklung der klinischen Funktionsparameter des Pat. GS**

### 3.2.5 Adhäsion und klinischer Verlauf des Patienten NN

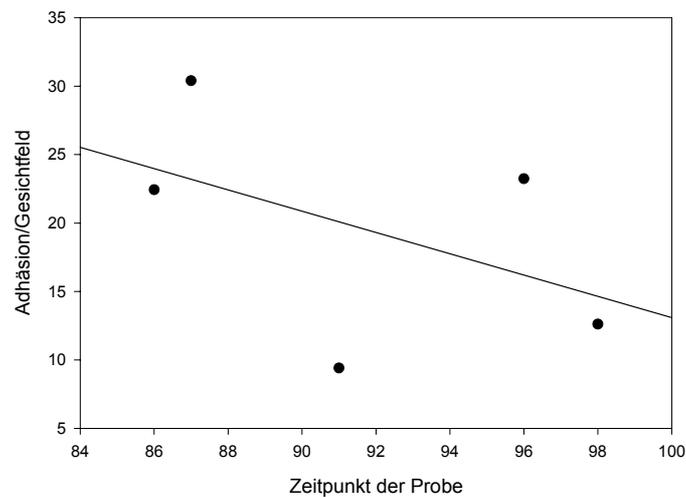
Patient NN ist weiblich und 1975 geboren. Sputumproben wurden in der Zeit von 1986 bis 1998 bei 5 Untersuchungen aufgearbeitet. 1986, 91 und 96 wurden je 2 Stämme und 1987 4 phänotypisch differente Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* aus den Sputumproben isoliert. Klinischen Daten wurden von 1985 bis 1996 erfasst.

Der Verlauf der Adhäsion zeigt eine Abnahmetendenz bei wechselhafter Ausprägung der Adhäsionsstärke, welche sich in der Regressionsanalyse wiederfindet. Die Adhäsion fällt vom Eingangswert 22,4 Ad./GF auf 12,6 Ad./GF ab.



**Graphik 14: Mittelwerte mit Standardabweichung der Adhäsion des Pat. NN**

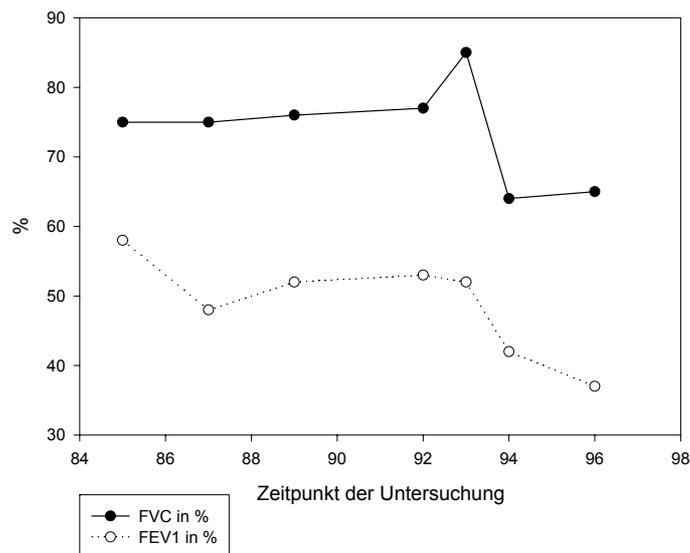
Adhäsion NN mit Regressionsgerade



**Graphik 2: Mittelwerte der Adhäsion des Pat. NN mit Regressionsgeraden**

Die klinische Situation des Patienten NN ist bis 1993 stabil mit nachfolgender Verschlechterung sowohl der FVC % als auch insbesondere der FEV1 %. Die FVC % nimmt insgesamt von 75% zu Beginn des Beobachtungszeitraumes auf 65% ab. Die FEV1 % weist einen Abfall von 58% 1985 auf 37% 1996 auf. Mit dieser negativen Entwicklung der klinischen Situation geht der Abwärtstrend der Adhäsionsstärke einher.

Lungenfunktion NN

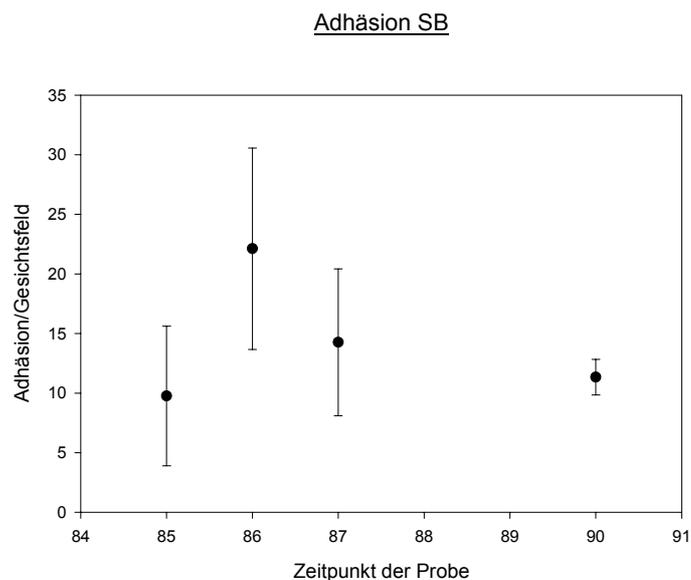


**Graphik 16: Entwicklung der klinischen Funktionsparameter des Pat. NN**

### 3.2.6 Adhäsion und klinischer Verlauf des Patienten SB

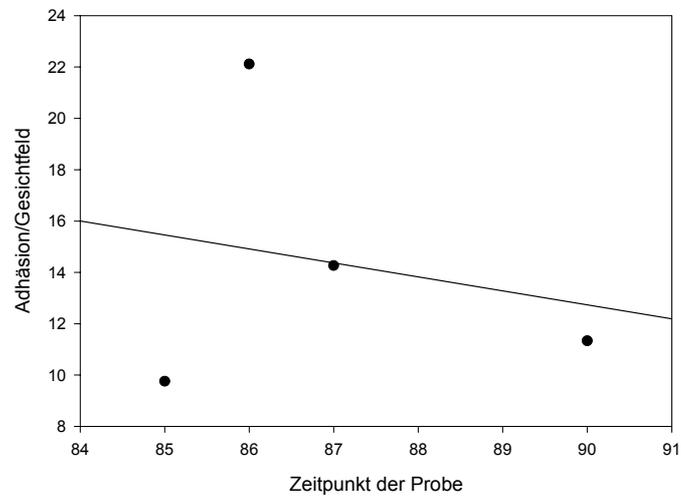
Patient SB ist weiblich. Die Patientin ist 1977 geboren und 1990 verstorben. Im Untersuchungszeitraum von 1985- 1990 wurden bei dieser Patientin 4 Sputumproben untersucht. 1986 und 1987 wurden je 4 Stämme und 1990 2 Stämme aus den Sputumproben isoliert. Die klinische Beobachtung erstreckte sich von 1986 bis 1990 über 5 Jahre.

Die dargestellten Ergebnisse der Adhäsion zeigen bei dieser Patientin ebenfalls eine Abnahmetendenz. Die erfassten Werte der klinischen Parameter zeigen eine weitere Verschlechterung der bereits vorbestehenden schlechten Ausgangswerte zu Beginn des Untersuchungszeitraumes. Die FVC % fällt von 44% 1986 auf 23% 1990 ab. Die FEV1 % nimmt von 24% noch auf 18% ab.



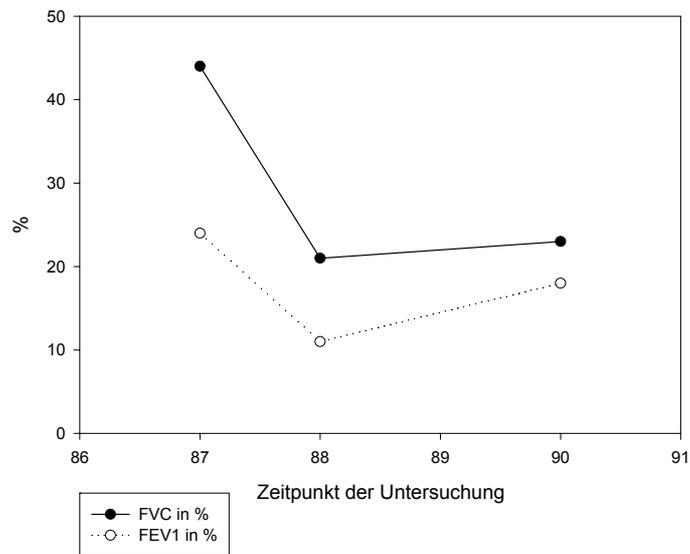
**Graphik 17: Mittelwerte mit Standardabweichung der Adhäsion des Pat. SB**

Adhäsion SB mit Regressionsgerade



**Graphik 18: Mittelwerte der Adhäsion des Pat. SB mit Regressionsgeraden**

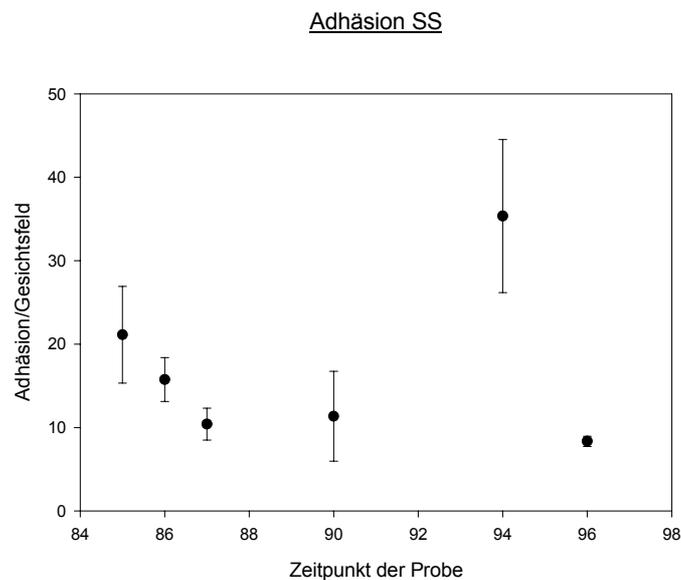
Lungenfunktion SB



**Graphik 19: Entwicklung der klinischen Funktionsparameter des Pat. SB**

### 3.2.7 Adhäsion und klinischer Verlauf des Patienten SS

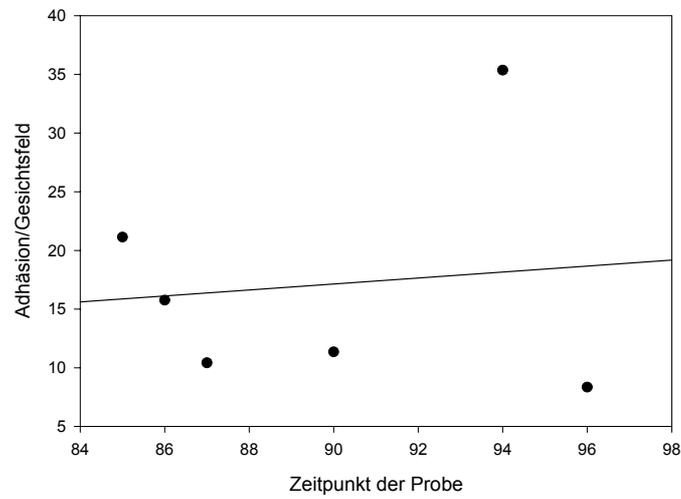
Patient SS ist männlich und 1968 geboren. Über einen Zeitraum von 12 Jahren (1985-1996) wurden bei Patient SS 6 Sputumproben untersucht. In den Jahren 85 und 87 wurden je 4 Stämme und 1990 2 Stämme aus den Sputumproben isoliert. Die klinischen Untersuchungen wurden über 11 Jahre (1985-1995) durchgeführt.



**Graphik 20: Mittelwerte mit Standardabweichung der Adhäsion des Pat. SS**

Die Adhäsionsstärke zeigt in diesem Fall eine Abnahme von 20,5 Ad./GF auf 8,8 Ad./GF mit einem Ausreißer mit einem Wert von 35,4 Ad./GF 1994. Aufgrund des hohen Adhäsionswertes 1994 zeigt die Regressionsgerade eine leichte positive Steigung. Unter Auslassung des Wertes von 1994 würde die Regressionsanalyse eine deutlich negative Steigung ergeben.

Adhäsion SS mit Regressionsgerade



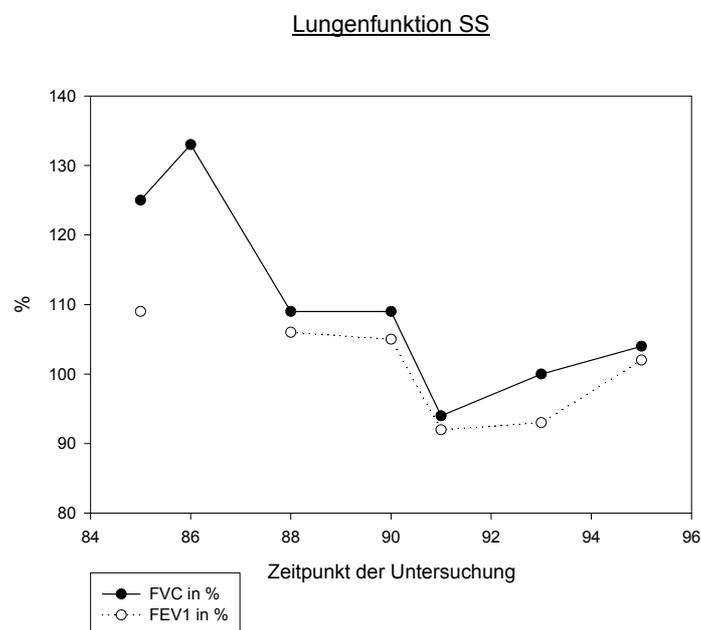
**Graphik 3: Mittelwerte der Adhäsion des Pat. SS mit Regressionsgeraden**

## Ergebnisse

---

Die Werte der klinischen Verlaufparameter FVC % und FEV1 % werden zunächst deutlich schlechter mit Erholung und Stabilisierung der Werte gegen Ende des Beobachtungszeitraumes. Die FEV1 % fällt zunächst von 109% auf 92% 1990 und steigt bis 1995 wieder auf 102% an. Parallel dazu nimmt die FVC % von 125 % auf 94% 1991 ab mit Wiederanstieg des Wertes auf 104% 1995. Der hohe Adhäsionswert 1994 fällt in die Phase der sich verbessernden Lungenfunktionsparameter.

Bei Betrachtung des Gesamtuntersuchungszeitraumes verschlechtern sich bei diesem Patienten mit abnehmender Adhäsionsstärke die klinischen Parameter.



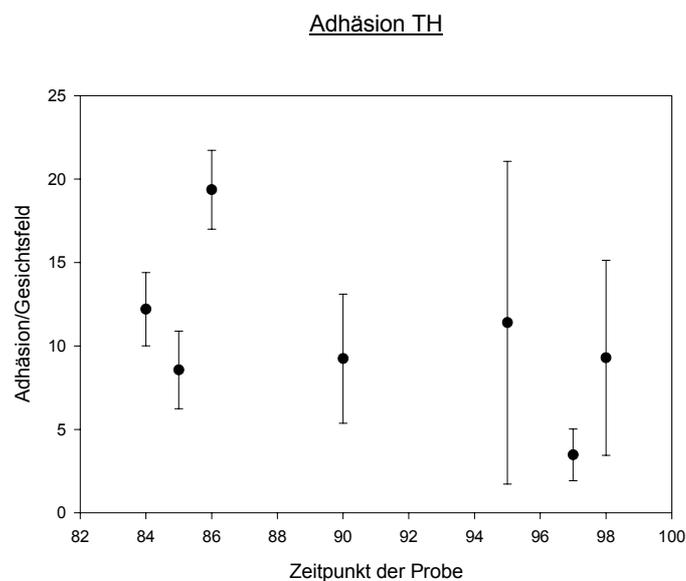
**Graphik 22: Entwicklung der klinischen Funktionsparameter des Pat. SS**

### 3.2.8 Adhäsion und klinischer Verlauf des Patienten TH

Patient TH ist männlich. Zwischen 1984 und 1998 wurden von diesem Patienten 7 Sputumproben auf *Pseudomonas aeruginosa* untersucht. In den Jahren 84, 86, 90, 95, 97 und 98 wurden je 2 verschiedene Stämme und 1985 4 verschiedene Stämme aus den Proben isoliert. Patient TH ist 1979 geboren.

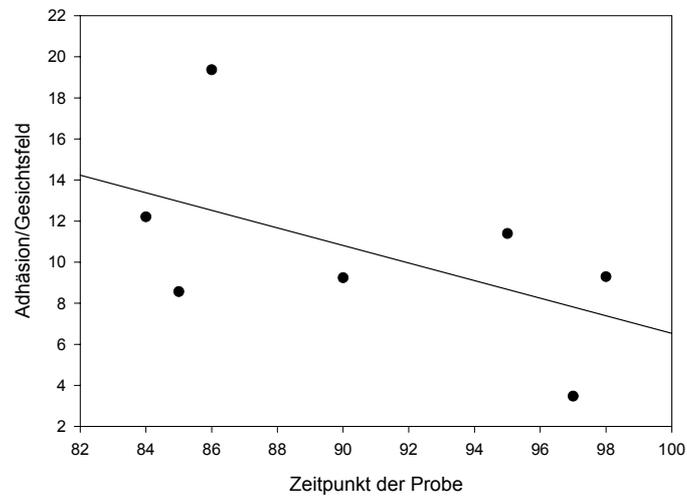
Bei diesem Patienten lässt sich trotz starker Schwankungen der Adhäsionsstärke eine Abnahme der Adhäsion erkennen. Diese Beobachtung bestätigt sich bei Anlage der Regressionsgeraden.

Aufgrund der nur unvollständig erfassten klinischen Daten lässt sich über die funktionelle, pulmonale Situation keine Aussage machen.



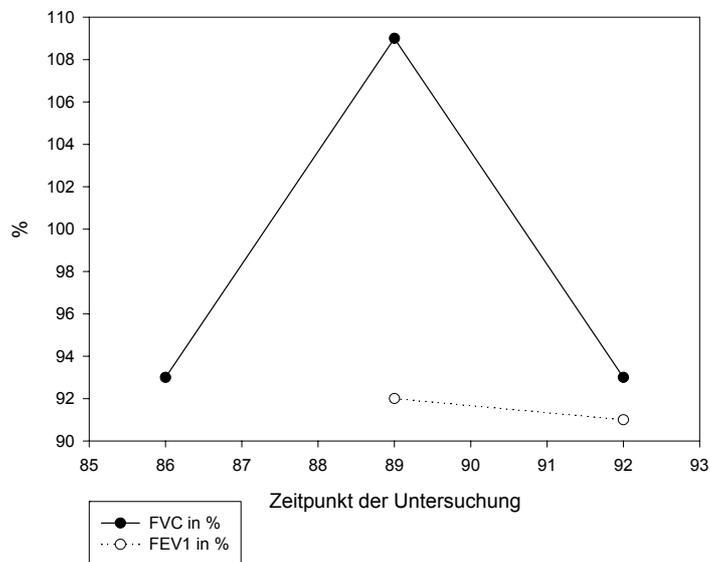
**Graphik 23: Mittelwerte mit Standardabweichung der Adhäsion des Pat. TH**

Adhäsion TH mit Regressionsgerade



**Graphik 24: Mittelwerte der Adhäsion des Pat. TH mit Regressionsgeraden**

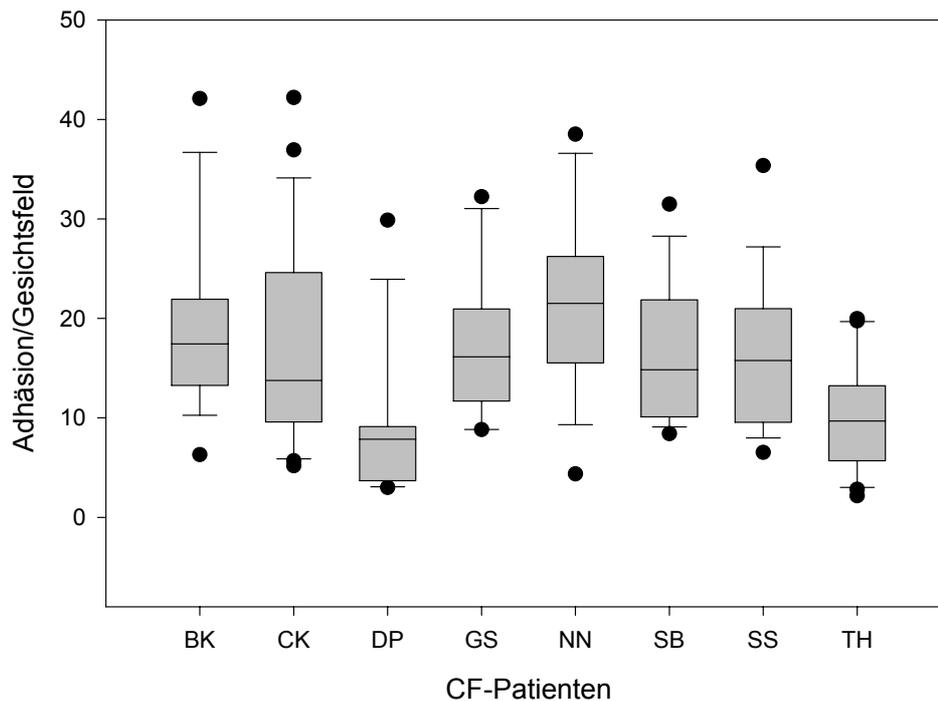
Lungenfunktion TH



**Graphik 25: Entwicklung der klinischen Funktionsparameter des Pat. TH**

### 3.3. Zusammenfassende Darstellung der Adhäsion bei den einzelnen CF-Patienten

#### Ausprägung der Adhäsion bei den einzelnen CF-Patienten

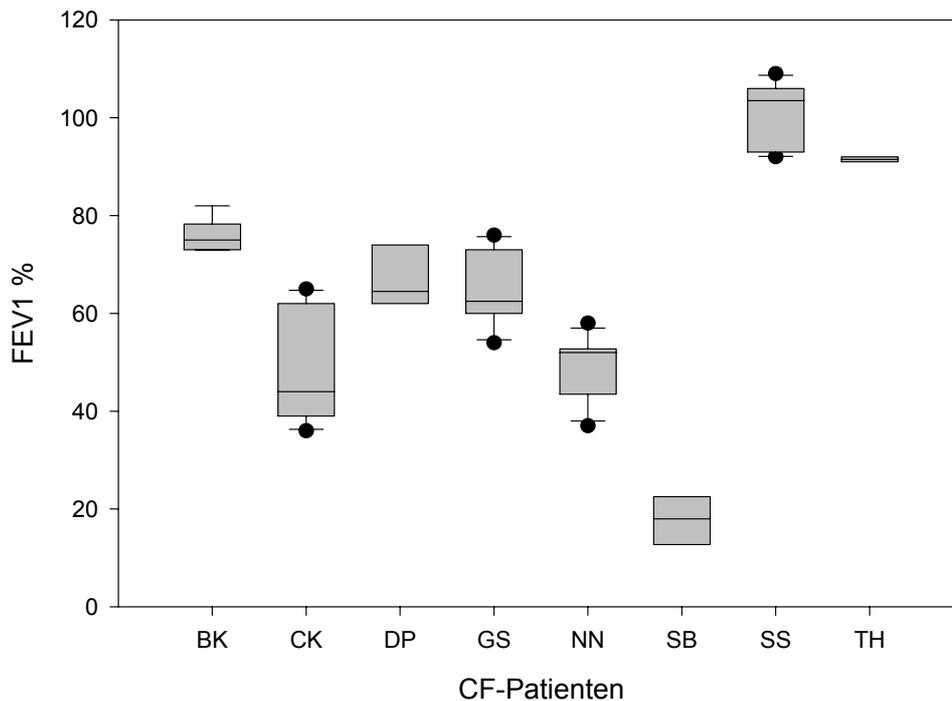


**Graphik 4: Ausprägung des Virulenzfaktors Adhäsion bei den einzelnen Patienten**

Bei dieser Graphik wurden alle ermittelten Adhäsionswerte pro Patient zusammengefasst und als Boxplot mit Median dargestellt. Es zeigt sich eine große Spannweite bei der Ausprägung der Adhäsion mit Werten von 2,8 Ad./GF bei Patient TH bis zu 42,2 Ad./GF bei Patient CK. Das Median aller Adhäsionswerte lag bei 13,6 Ad./GF. Die Patienten DP mit einem Median von 7,19 und TH mit 8,94 weisen durchschnittlich die niedrigsten Adhäsionswerte auf. Bei Patient NN liegt der Median mit 20,6 am höchsten. Den zweithöchsten Median hat Patient BK mit 16,75.

### 3.4. Zusammenfassende Darstellung der FEV1 % bei den einzelnen CF-Patienten

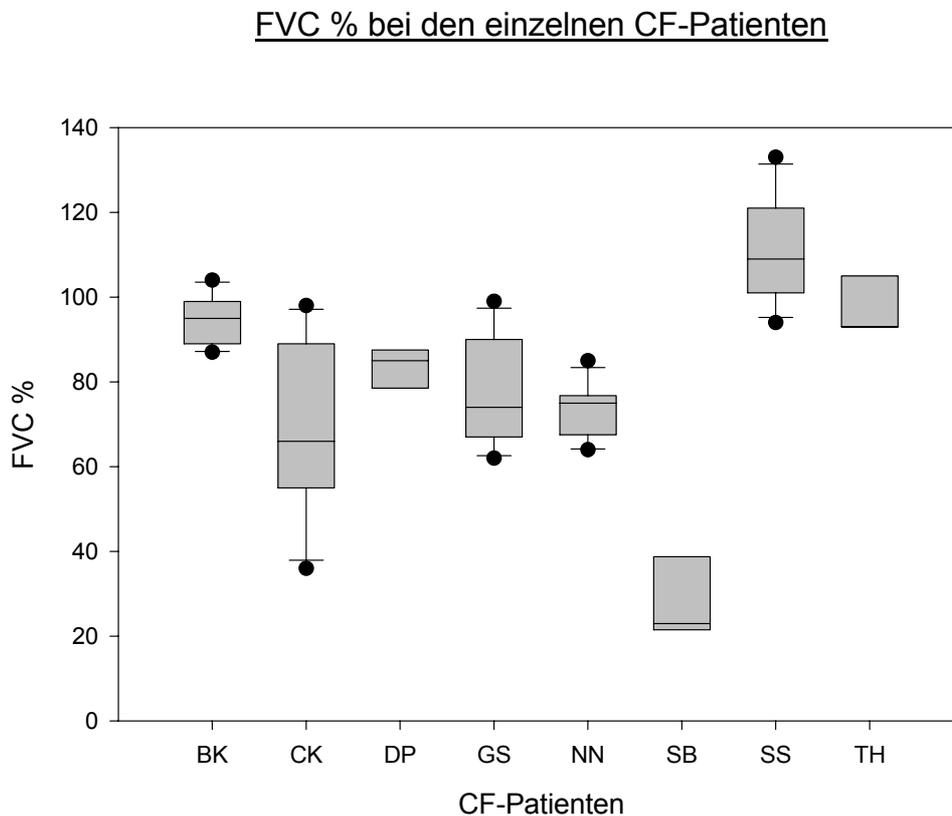
FEV1 % bei den einzelnen CF-Patienten



**Graphik 5: Gesamtdarstellung der ermittelten Werte der FEV1 % der untersuchten CF-Patienten**

In dieser Graphik wurden für jeden CF-Patienten die Ergebnisse der FEV1 % zusammengefasst. Patient SS hat mit einem Median von 103,5 für die FEV1 % den durchschnittlich höchsten Wert. Den zweithöchsten Median erreicht Patient TH mit 91,5%. Patient BK hat einen Median von 75%. Die niedrigsten Werte hat Patient SB mit einem Median von 18% für die FEV1 %.

### 3.5. Zusammenfassende Darstellung der FVC % bei den einzelnen CF-Patienten



**Graphik 6: Gesamtdarstellung der ermittelten Werte der FVC % der untersuchten CF-Patienten**

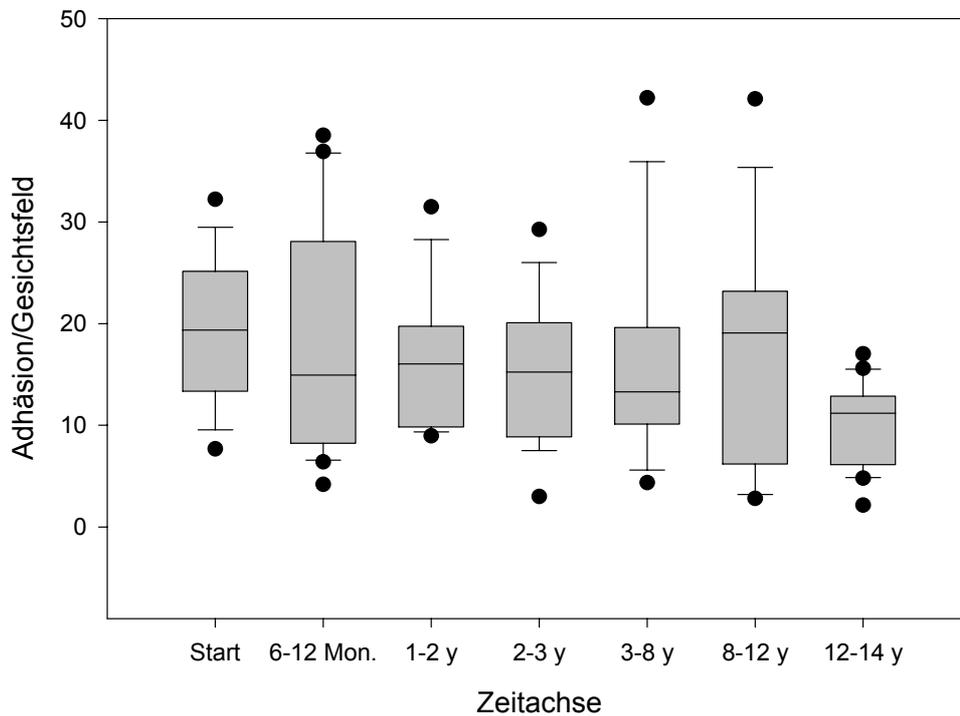
Die Darstellung der zusammengefassten Werte der FVC % für die einzelnen CF-Patienten zeigt eine sehr ähnliche Verteilung wie die FEV1 % (s. 3.4.). Wie bei der FEV1 % hat Patient SS auch bei der FVC % die durchschnittlich höchsten Werte mit einem Median von 109%. Patient BK und TH liegen mit Medianen von 95% und 93% ebenfalls hoch. Mit deutlichem Abstand hat Patient SB auch bei der FVC % die schlechtesten Ergebnisse mit einem Median von 23%.

### 3.6. Zeitliche Entwicklung der Adhäsion unter Zusammenfassung der Ergebnisse aller Patienten

In dieser Darstellung wurden die Adhäsionswerte aller Patienten im Verlauf in 7 Zeitabschnitten zusammengefasst. Diese zeitliche Unterteilung wurde gewählt, um in jedem Zeitabschnitt vergleichbar große Datenmengen zu erhalten. Zudem sollten möglichst viele der untersuchten Patienten pro Zeitabschnitt repräsentiert sein. Der Zeitpunkt Start erfasst die Ergebnisse der Erstuntersuchungen der Patienten.

Über den dargestellten Zeitraum lässt sich eine Abnahme der Adhäsionsstärke erkennen. Der Median für die Adhäsionen pro Gesichtsfeld nimmt vom Zeitpunkt Start mit 19,4 auf 10,4 im letzten Zeitabschnitt ab (statistische Auswertung siehe 3.6.1).

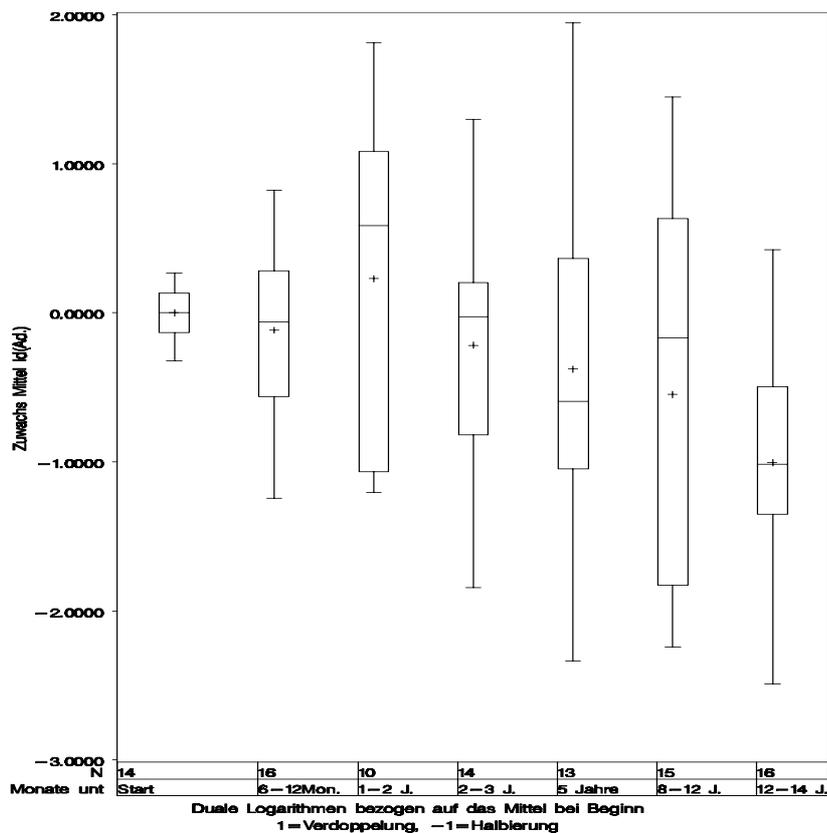
Veränderung der Adhäsion aller CF-Patienten im Verlauf



Graphik 7

### 3.6.1 Statistische Auswertung der Entwicklung der Adhäsion unter Zusammenfassung der Ergebnisse aller Patienten anhand einer Varianzanalyse

Die Entnahme der Sputumproben bei den Probanden wurde in teils sehr unregelmäßigen und unterschiedlichen Zeitabständen vorgenommen. Aufgrund dieser Tatsache liegt nicht von jedem Patienten zu jedem Zeitpunkt ein Adhäsionswert vor. Bei dem gewählten Varianzanalysemodell handelt sich um eine ANOVA (**AN**alysis **O**f **VA**riance between groups) für unbalancierte Messwiederholungen (durchgeführt von Hr. Dr. Willers, Mathematisches Institut der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf). Bei dieser Analyse wird eine Annahme über die fehlenden Werte der einzelnen Patienten in den gewählten Zeitfenstern gestellt, da zur Durchführung einer Varianzanalyse von jedem Patienten zu jedem Zeitpunkt ein Wert vorliegen sollte. Die Darstellung im dualen Logarithmus wurde gewählt zur Stabilisierung der Streuung. Eine Veränderung um eine Einheit bedeutet somit eine Verdopplung oder Halbierung der Werte. Allgemein werden relative Veränderungen der Werte zum Startwert analysiert. Bei der Auswertung der Daten wurden diese wie unter 3.5. in 7 Zeitabschnitte eingeteilt. Über den gesamten Untersuchungszeitraum zeigte sich eine *signifikante Abnahme der Adhäsionsausprägung* ( $p$ -Wert = 0,02) vom Startwert bis zum Endwert auf nahezu die Hälfte (die Differenz vom Startwert zum Endwert beträgt -0,96).



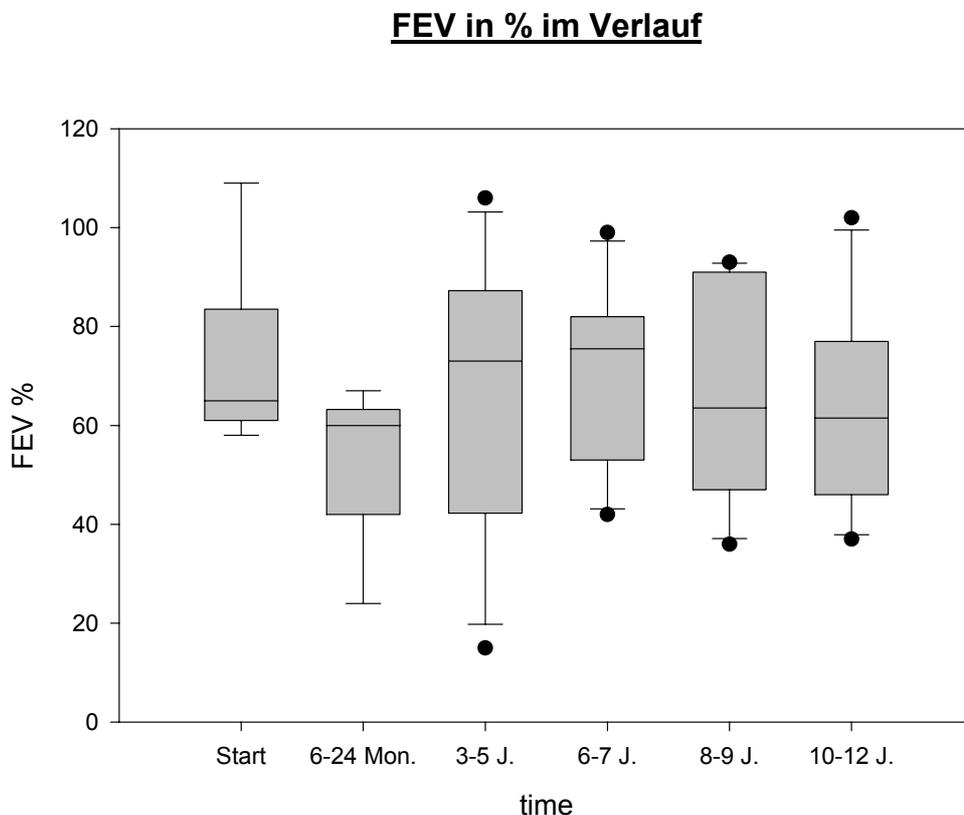
Graphik 8: Relative Veränderung der Adhäsion aller CF-Patienten im Verlauf in einer ANOVA-Varianzanalyse für unbalancierte Messwiederholungen

### 3.7. Zeitliche Entwicklung der klinischen Funktionsparameter unter Zusammenfassung der Daten aller Patienten

Bei der Darstellung und Auswertung der zusammengefassten klinischen Daten aller Patienten wurden diese in 6 Zeitabschnitte eingeteilt, aufgrund der zu den Sputumproben unterschiedlichen Datenmenge und der unterschiedlichen zeitlichen Erfassung der klinischen Werte.

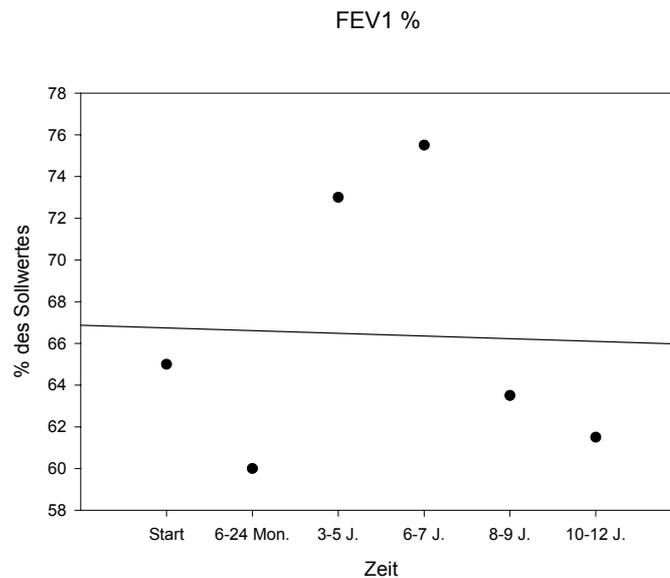
### 3.7.1 Zeitliche Entwicklung der FEV1 % bei allen Patienten

Der graphisch dargestellte Verlauf der zusammengefassten Daten der FEV1 % aller Patienten zeigt sich beständig mit einem Ausgangsmedian von 65% und einem Endmedian von 61,5%. Im Zeitabschnitt 6-7 Jahre wird ein Wert von 75,5% erreicht. Eine deutlich ersichtliche Entwicklung in Form einer Verbesserung oder Verschlechterung der Werte wie bei der Adhäsionsauswertung zeigt sich trotz des sehr langen Untersuchungszeitraumes nicht.



**Graphik 9: Veränderung der FEV1 % aller untersuchten CF-Patienten im Verlauf**

Die Darstellung mit Anlage einer Regressionsgeraden an die Mediane der FEV1 % aller Patienten zeigt eine nur geringe negative Steigung. Eine zu erwartende deutliche und kontinuierliche Verschlechterung der FEV1 % bei den CF-Patienten stellt sich nicht dar.



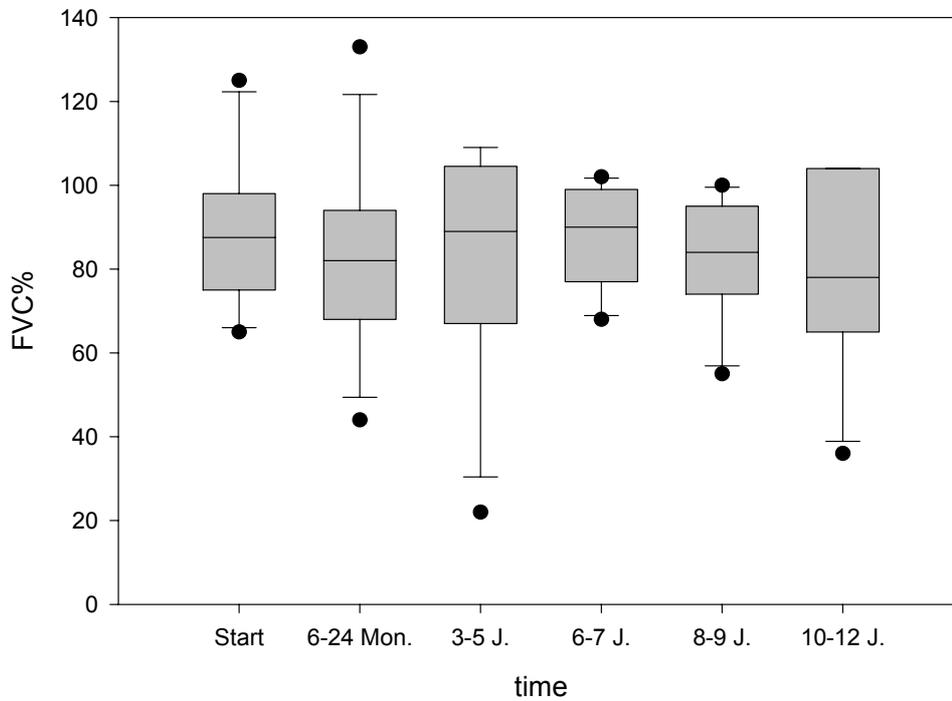
**Graphik 10: Mediane der FEV1 % aller Pat. im Verlauf mit Regressionsgeraden**

### 3.7.2 Zeitliche Entwicklung der FVC % bei allen Patienten

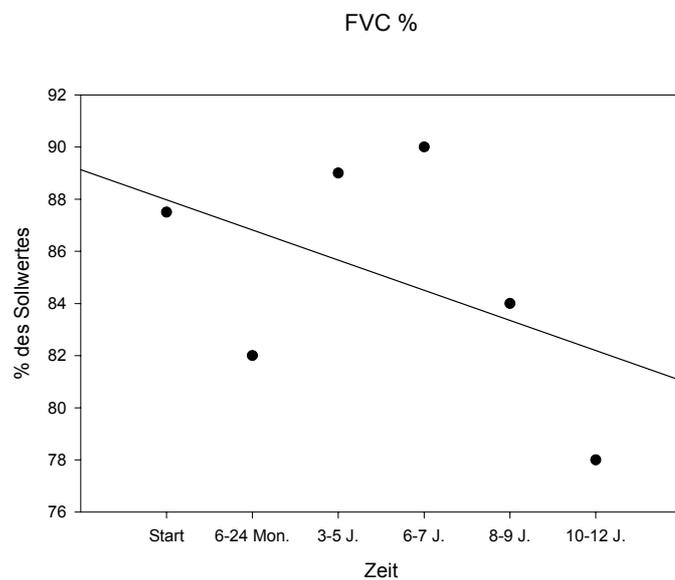
Die zusammengefasste Darstellung der Untersuchungsergebnisse der FVC in % des Sollwertes zeigt eine Abnahmetendenz, wobei eine deutliche Verschlechterung der FVC % von über 20% im Verlauf (Lemen et al. 1990) nicht vorliegt.

Der Median nimmt von 87,5 auf 78% im Verlauf ab. Die an die Mediane der FVC % aller Patienten angelegte Regressionsgerade zeigt somit eine negative Steigung. Zwischenzeitlich werden Medianwerte von 89% (Zeitabschnitt 3-5 J.) und 90% (Zeitabschnitt 6-7 J.) erreicht.

**FVC% im Verlauf**



**Graphik 11: Veränderung der FVC % aller untersuchten CF-Patienten im Verlauf**



**Graphik 12: Mediane der FVC % aller Pat. im Verlauf mit Regressionsgeraden**

### 3.8. Vergleich der Adhäsion mit der FVC % und der FEV1 % bei Erstkolonisation

Die zu der Ersterfassung der Adhäsion ermittelten Werte der pulmonalen Funktionsparameter FVC % und FEV1 % zeigten ebenfalls eine deutliche Streuung. Die Erstmessung der FVC % ergab Werte von 65% bei Patient GS bis 125% bei Patient SS. Der Median der ermittelten Werte für die FVC % lag bei 87,5%. Die FEV1 % war am niedrigsten bei Patient NN mit 58% und am höchsten bei Patient SS mit 109%. Der Median aller Patienten bei Erstbestimmung lag für die FEV1 % bei 65%. Patient SB wurde aufgrund fehlender klinischer Werte bei Studienbeginn nicht mitberücksichtigt. Patient SS hat somit für beide Funktionsparameter die besten Werte. Bei der Adhäsion zeigt Patient SS mit 21,12 Ad./GF jedoch keine auffallende Ausprägung. Patient NN mit deutlich schlechteren Werte mit einer FVC % von 75% und einer FEV1 % von 58% zeigt eine annähernd gleiche Adhäsion (22,43 Ad./GF) wie Patient SS (21,12 Ad./GF). Bei Patient GS mit der höchsten Adhäsion von 32,22 Ad./GF liegt die FVC % mit 65 und die FEV1 % mit 60% eher niedrig. Patient DP mit der niedrigsten Adhäsion von 6,67 Ad./GF hat für die FEV1 % mit 62% einen ähnlichen Wert wie Patient GS. Die FVC % liegt bei DP zu Beginn der Erfassung bei 88% und somit im Gesamtdurchschnitt.

Zusammenfassend läßt sich in dieser Studie *kein Zusammenhang* zwischen der Stärke der Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* bei Erstbesiedelung und den dazu erfassten pulmonalen Funktionsparametern feststellen.

### 3.9. Vergleich der klinischen Verlaufparameter mit der Adhäsion bei den einzelnen CF-Patienten

Bei diesem Vergleich wurde von den einzelnen Patienten die durchschnittliche Adhäsionsausprägung den Medianen der FVC % und der FEV1 % gegenübergestellt.

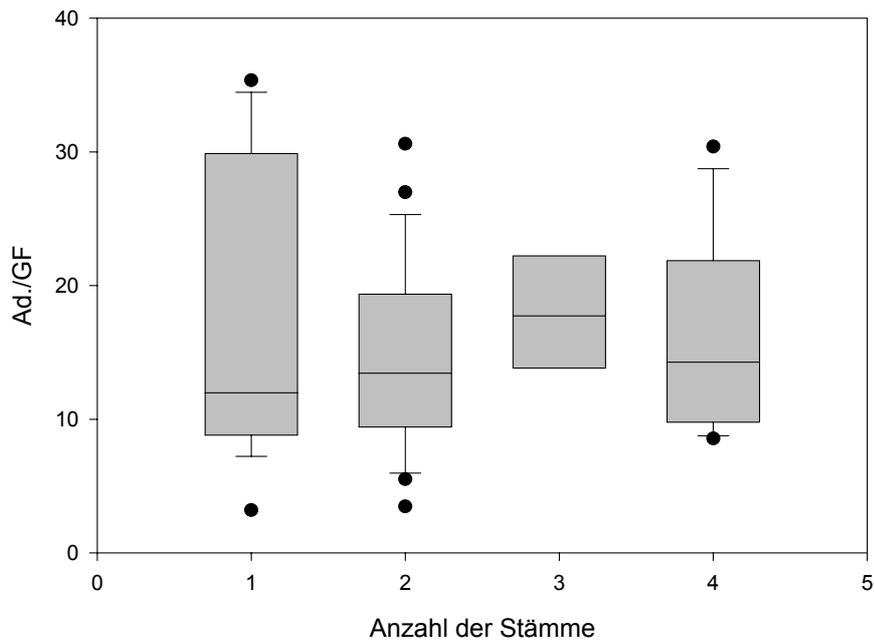
Patient NN mit dem höchsten Median von 20,6 Ad./GF bei der Adhäsion lag bei den Werten für die Lungenfunktionsparameter mit einem Median von 75% für die FVC % und 52% für die FEV1 % im mittleren Bereich der insgesamt erfassten Werte. Patient

DP mit der durchschnittlich niedrigsten Adhäsion mit einem Median von 7,19 Ad./GF zeigte bei den ermittelten pulmonalen Verlaufsparemtern eine FVC % mit einem Median von 85% und für die FEV1 % ein Median von 64,5%. Somit ließen sich bei stark unterschiedlichen Adhäsionswerten zwischen den Patienten keine entsprechenden Differenzen in den Lungenfunktionswerten nachweisen.

Bei Patient SS mit den besten gemessenen klinischen Werten mit einem Median für die FVC % von 109 und einem Median von 103,5 für die FEV1 % lag die Adhäsion mit 15,75 im oberen Durchschnitt. Patient SB hatte mit Medianwerten von 23% für die FVC % und 18% für die FEV1 % die mit Abstand schlechtesten klinischen Werte. Die Adhäsionsausprägung lag mit einem Median von 15,74 Ad./GF im Vergleich zu Patient SS gleich hoch.

### 3.10. Adhäsionsausprägung in Abhängigkeit von der Anzahl der isolierten *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme

#### Adhäsionsausprägung in Anhängigkeit der Anzahl der isolierten P.a.-Stämme



**Graphik 13: Zusammenfassung der Adhäsionsdaten aller Pat. in Abhängigkeit von der Anzahl der isolierten *P. aeruginosa*-Stämme in den Proben**

In den einzelnen Sputumproben der untersuchten Patienten wurden bis zu 4 phänotypisch verschiedene *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme isoliert. In 14 Proben wurde 1 Stamm, in 22 Proben 2 Stämme, in 4 Proben 3 Stämme und 7 Proben 4 Stämme nachgewiesen. In der zusammenfassenden Darstellung liegt der Median für die Adhäsion bei Befall mit 1 Stamm bei 11,98. Der Median für 2 Stämme beträgt 13,45 und der für 3 Stämme 17,74. Bei Befall mit 4 Stämmen liegt der Median mit 14,27 wieder niedriger. Ein Anstieg der Ausprägung der Adhäsion in Abhängigkeit von der Anzahl der isolierten *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme lässt sich nicht dokumentieren.

### 3.11. Abhängigkeit der Adhäsion vom Genotyp

Die ermittelten Adhäsionsdaten wurden im Weiteren mit den Ergebnissen der Genotypisierung der *Pseudomonas aeruginosa*-Isolate verglichen.

Patient NN war chronisch mit dem *Pseudomonas aeruginosa*-Genotypen (Klon **C**) infiziert. Dieser Klon wurde in allen untersuchten Proben isoliert. Die Adhäsion variiert bei diesen Isolaten zwischen 14,47 Ad./GF und 38,51 Ad./GF (Mittelwert 25,84 Ad./GF).

Es findet sich somit keine für diesen Genotyp charakteristische Adhäsionsstärke

Der gleiche Genotyp wurde bei Patient GS bestimmt. Die Adhäsionsstärke reicht bei diesem Patienten von 8,87 Ad./GF bis zu 32,22 Ad./GF mit einem Mittelwert von 19,66 Ad./GF. Auch hier läßt sich somit keine Korrelation zwischen dem Genotypen und der Adhäsionsausprägung feststellen.

Bei Patient SS ließ sich ein Genotypwechsel feststellen. In den Bakterienisolaten von 1985 und 86 wurde der Genotyp **K** bestimmt mit einem Adhäsionsmittel von 20,41 Ad./GF. Zu den nächsten Probenentnahmen 1987 und 1990 hatte sich ein Wechsel zum Genotyp **C** vollzogen mit einem Mittelwert für die Adhäsion von 10,73 Ad./GF (höchster Wert 16,19 Ad./GF; niedrigster Wert 6,51 Ad./GF). Das Adhäsionsmittel liegt nach dem Genotypwechsel von **K** nach **C** um nahezu die Hälfte niedriger. Patient SS weist somit im Verlauf ebenfalls den Genotyp **C** auf. Im Vergleich mit den Patienten NN und GS zeigt sich zusammenfassend für den Genotyp **C**, dass die Adhäsion bei gleich bleibendem Genotyp sowohl innerhalb eines Patientenverlaufes als auch interindividuell stark variabel ist und nicht spezifisch für einen Genotypen ist.

Der Genotyp bei Patient CK (Klon **a**) war in den untersuchten Proben gleichbleibend. Die Adhäsion lag bei diesen Proben zwischen 10,15 Ad./GF und 36,93 Ad./GF, das Adhäsionsmittel bei 22,04 Ad./GF. Auch hier zeigte sich erneut eine deutliche Streuung der Adhäsionswerte bei gleichbleibendem Genotyp.

Bei Patient DP mit beständigem Genotyp **H** lag die Adhäsion zwischen 4,19 Ad./GF und 8,14 Ad./GF mit einem Mittelwert von 7,01 Ad./GF.

In den gewonnenen Proben von Patient SB wurden *P. aeruginosa*-Stämme mit dem Genotyp **D** und **E** nachgewiesen. Bei Patient BK lag vorwiegend der Genotyp **F** vor. Auch bei diesen Genotypen zeigte sich kein beständiger Zusammenhang zu der Adhäsionsstärke.

## 4. Diskussion

Das Krankheitsbild der Zystischen Fibrose ist die häufigste angeborene Stoffwechselerkrankung von Menschen kaukasischer Herkunft. Sie ist eine Multiorganerkrankung, wobei das Ausmaß der Lungenbeteiligung der wesentliche Faktor bezüglich der Morbidität und Mortalität ist. Die Veränderungen in der Lunge eines CF-Patienten bedingen eine hohe Prädisposition für bakterielle Infekte insbesondere gegenüber dem Leitkeim *Pseudomonas aeruginosa*. Diese hohe Prädisposition für die Besiedelung und nachfolgende Infektion der CF-Lunge mit *P. aeruginosa* ist weitgehend ungeklärt. Voraussetzung für die Kolonisation und spätere chronische Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* ist die feste und dauerhafte Adhäsion der Bakterien an die Wirtszellen. Die Entwicklung der Ausprägung des Virulenzfaktors Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* bei Besiedelung und Infektion der CF-Lunge ist im Verlauf bislang wenig erforscht. Bisherige Veröffentlichungen beziehen sich auf Vergleiche der Adhäsion von mukoiden und nicht-mukoiden *Pseudomonas aeruginosa*-Stämmen. Nach Erstbesiedelung mit zumeist nicht-mukoiden Stämmen kommt es im Verlauf der chronischen Infektion zu der charakteristischen Umwandlung in die schleimbildende, mukoide Form (Döring et al. 1997; Pederson et al. 1992). Für die mukoiden Stämme wurde im Vergleich zu nicht-mukoiden Stämmen eine deutlich verringerte Adhäsionsfähigkeit festgestellt (Govan et al. 1996; Vranes et al. 2004).

Zur Klärung der Entwicklung der Adhäsionsausprägung wurden in der vorliegenden Studie 100 sequentielle Bakterienisolate von 8 CF-Patienten seit Beginn der Kolonisation über einen Zeitraum von bis zu 15 Jahren auf ihre Fähigkeit zur Adhäsion untersucht. Das verwendete Adhäsionsassay wurde bereits vielfach in der Erforschung der Adhäsion von Bakterien benutzt und stellt somit eine etablierte Methode dar (Chi et al. 1991, Baker et al. 1991, Schroten et al. 1992, Di Martino et al. 2002). Um die Adhäsion der Bakterien mit Hilfe der Auflichtfluoreszenzlichtmikroskopie auswerten zu können, wurde in diesem Adhäsionsassay der Proteinfarbstoff FITC verwendet. Da dieser Fluoreszenzfarbstoff mit der Zeit und unter Bestrahlung mit Tageslicht oder UV-Licht verblasst (Picciolo und Kaplan 1985), erfolgte die Auswertung direkt im Anschluss an jede Versuchsdurchführung in einem abgedunkelten Raum. Sedlacek et al.

beschrieben 1981 eine mögliche Abnahme der Strahlungsintensität von FITC innerhalb von 2-3 Minuten bei starker Bestrahlung. Bei der Auszählung der adhärierenden Bakterien pro Gesichtsfeld wurde neben der automatischen Auszählung jeweils eine visuelle Auszählung durchgeführt.

Die in dieser Versuchsanordnung verwendete Zelllinie A549 ist in der Erforschung der Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* an Lungenepithelzellen bei Zystischer Fibrose sehr etabliert (Gagniere et al. 2004; Leroy-Dudal et al. 2004; Azghani et al. 2002; Carterson et al. 2005; Chi et al. 1991; Di Martino et al. 2000; Barghouti et al. 1996; Di Martino et al. 2002; Hahn 1997). Es war darauf zu achten, dass die A549-Zellen nicht öfter als maximal 25mal passagiert wurden. Bei höheren Passagen zeigte sich in Kontrollversuchen eine falsch niedrige Adhärenz von *Pseudomonas aeruginosa* an die Lungenzellen. Zudem zeigte sich bei höheren Passagen (> 25 Passagen) ein zunehmend verlangsamtes Wachstum der Zellen mit gehäuft auftretenden abgestorbenen Zellen, so dass der für die Versuchsanordnung notwendige konfluente Zellrasen nicht mehr ausgebildet wurde.

Bei der notwendigen Ablösung der Zellen aus den Inkubationsflaschen mit Trypsin/EDTA-Lösung war darauf zu achten, dass die Inkubation mit Trypsin nicht länger als 10 Minuten durchgeführt wurde. Bei längerer Inkubation kam es zu Zellschäden, was ebenfalls einen nicht konfluenten Zellrasen bedingte. Die mit A549-Zellen befüllten Cups der 12-well-Platten wurden vor Versuchseinsatz einzeln unter dem Lichtmikroskop auf Konfluenz des Zellrasens kontrolliert.

Vergleichend zu der Adhäsionsentwicklung wurde die funktionelle pulmonale Situation der 8 untersuchten Patienten anhand der FVC % und der FEV1 % im Verlauf ausgewertet.

Die bereits genannten Arbeiten von Govan und Vranes ließen auf eine Abnahme der Adhäsionsstärke von *Pseudomonas aeruginosa* im Verlauf der chronischen Infektion der Lunge bei Zystischer Fibrose schließen. Diese Hypothese stützt sich auf die beschriebene Adhäsionsabnahme von *Pseudomonas aeruginosa* bei der charakteristischen Umwandlung von der nicht-mukoiden in die mukoide Form während einer chronischen Infektion (Döring et al. 1997, Pederson et al. 1999). In Bezug auf die Lungenfunktionsparameter wurde von einer kontinuierlichen Verschlechterung im

Krankheitsverlauf ausgegangen (Kerem et al. 1990, Rabsch 1998). Zur Klärung dieser Arbeitshypothesen wurde sowohl die individuelle, als auch die Entwicklung der Gesamtgruppe untersucht.

Die Ergebnisse der Studie zeigten eine große Streuung bei der Ausprägung der Adhäsion mit Werten von 2,8 Ad./GF bis zu 42,2 Ad./GF.

Schon bei der Ersterfassung der Adhäsionswerte bei den 8 untersuchten CF-Patienten zeigte sich eine sehr variable Ausprägung des Virulenzfaktors. Die gemessenen Mittelwerte der Adhäsion bei Erstbesiedelung reichten von 6,67 Ad./GF bis zu einem Wert von 32,22 Ad./GF. Aus dieser Verteilung ergab sich die Folgerung, dass die Adhäsionsausprägung von *Pseudomonas aeruginosa* bei Erstkolonisation der Lunge eines CF-Patienten starke interindividuelle Unterschiede aufweist. Obwohl die Adhäsion an die Wirtszelle der wesentliche Schritt in der Besiedelung und nachfolgenden Infektion ist und die Patienten mehrheitlich mit den Erstisolaten dauerhaft besiedelt blieben, ließ sich eine einheitliche zunächst starke Ausprägung der Adhäsion nicht nachweisen. Unabhängig von der Adhäsionsstärke bei der Erstbesiedlung kam es bei allen 8 untersuchten Patienten zu einer chronischen Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa*. Ein Schwellenwert der Adhäsion für eine erfolgreiche Kolonisation und folgende Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* ließ sich nicht erkennen.

Bei der Auswertung der Entwicklung der Adhäsionsausprägung bei den einzelnen Patienten zeigte sich diese sowohl im Verlauf der einzelnen Patienten als auch im interindividuellen Verlauf sehr variabel. Bei 6 Patienten kam es im Beobachtungszeitraum zu einer Abnahme der Adhäsion. Besonders deutlich zeigte sich diese Entwicklung bei Patient CK (Abnahme der Adhäsion von 25,2 Ad./GF auf 12,1 Ad./GF) und Patient GS (Abnahme der Adhäsion von 32,2 Ad./GF auf 14,8 Ad./GF). Bei Patient SS zeigte sich unter Auslassung des hohen Wertes 1994 ebenfalls eine deutliche Abnahme der Adhäsion von 20,5 Ad./GF auf 8,8 Ad./GF. Im Weiteren ergaben sich sichtbare Abnahmen der Adhäsionsausprägung für die Patienten NN, TH und SB. Bei den Patienten BK und DP konnten keine wesentlichen Entwicklungen des Virulenzfaktors Adhärenz nachgewiesen werden.

In der Zusammenfassung der Adhäsionsdaten aller Patienten ließ sich eine signifikante Abnahme der Adhäsion über den Untersuchungszeitraum auf nahezu die Hälfte des

Startwertes nachweisen. Die Ergebnisse der zusammenfassenden Auswertung der Adhäsion aller Patienten und die Mehrheit der Adhäsionsverläufe der einzelnen Patienten lassen auf eine Abnahme des Virulenzfaktors Adhäsion bei chronischer Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* bei CF- Patienten schließen und stützen somit die Beobachtungen von Vranes et al. und Govan et al. Zudem kam es bei den Patienten mit anfänglich hoher Adhäsion (Pat. CK, GS und NN) im Verlauf zu einer verhältnismäßig stärkeren Downregulation der Adhäsion als bei den übrigen Patienten.

Im Weiteren wurden die Adhäsionswerte mit den parallel erfassten klinischen Parametern FVC und FEV 1 in Bezug gesetzt.

Die zu der Ersterfassung der Adhäsion ermittelten Werte der pulmonalen Funktionsparameter FVC % und FEV1 % zeigten ebenfalls eine deutliche Streuung. Die Erstmessung der FVC % ergab Werte von 65% bis 125%. Die Werte der FEV1 % lagen zwischen 58% und 109%. Im Vergleich der Adhäsionsstärke der einzelnen Patienten mit ihren pulmonalen Funktionsparametern bei Erstbesiedlung ließ sich in dieser Studie keine Abhängigkeit feststellen.

Der Vergleich der durchschnittlichen Adhäsionsausprägung mit den Medianen der FVC % und der FEV1 % der einzelnen Patienten ergab, dass ein Rückschluss von der Adhäsionsstärke eines *Pseudomonas aeruginosa*-Isolates auf den klinischen Zustand eines CF-Patienten nicht möglich ist. Ebenso ließ sich aus den Ergebnissen keine Schlußfolgerung von den klinischen Verlaufparametern FVC % und FEV1 % auf die Adhäsionsausprägung stellen. Eine Korrelation zwischen der durchschnittlich ermittelten Adhäsion und den erfassten pulmonalen Funktionsparametern zeigte sich somit nicht.

In der parallelen Betrachtung der Adhäsionsentwicklung und der Entwicklung der Lungenfunktion bei den einzelnen Patienten zeigte sich ebenfalls keine einheitliche Beziehung zwischen den Faktoren. Bei Patient CK zeigte sich parallel zu der deutlichen Abnahme der Adhäsion eine ausgeprägte Abnahme der FVC % und der FEV1 %. Auch die Patienten NN, SB und SS wiesen eine Assoziation zwischen der Abnahme der Adhäsion und der negativen Entwicklung der erfassten Lungenfunktionsparameter auf. Bei den anderen 4 untersuchten CF-Patienten ließ sich diese Korrelation nicht nachweisen. Der kontinuierliche starke Abfall der Adhäsion bei Patient GS spiegelte sich

nicht in der FVC % und der FEV1 % wider. Bei Patient BK kam es im Verlauf sogar zu einer Verbesserung der Lungenfunktion bei wellenförmiger Adhäsionsentwicklung.

Auffallend ist bei Patient DP, dass mit dem sehr hohen Wert für die Adhäsion von 29,9 Ad./GF die besten Werte der Lungenfunktion zusammenfielen (FVC % 87 und FEV1 % 81). Diese Beobachtung blieb aber ein Einzelfall.

Die positive als auch die negative Assoziation zwischen der Adhäsionsentwicklung und der klinischen Entwicklung zeigte keine Abhängigkeit vom durchschnittlichen klinischen Zustand oder der allgemeinen Adhäsionsausprägung. Zusammenfassend ließ sich in den Einzelverläufen kein Zusammenhang zwischen der Abnahme der Adhäsion und einer Verschlechterung der Lungenfunktion bei chronischer Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* erkennen. Im Verlauf der Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* kam es bei der Mehrzahl der untersuchten Patienten unabhängig vom klinischen Verlauf zu einer Abnahme der Adhäsionsstärke.

Diese Beobachtung bestätigte sich auch in der zusammenfassenden Gegenüberstellung der klinischen Untersuchungsparameter und der Adhäsionsstärke aller Patienten.

Die FVC % aller Patienten zeigte keine wesentliche Verschlechterung im Beobachtungszeitraum. Der Verlauf der Gesamt-FEV1 % wies ebenfalls keine wesentliche Abnahme in den 12 Jahren auf. Parallel dazu fand eine signifikante Abnahme der Adhäsion auf die Hälfte des Ausgangswertes im Verlauf der chronischen Infektion statt, trotz der lange Zeit stabil gebliebenen Lungenfunktionsparameter.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass es zu einer deutlichen Abnahme der Ausprägung des Virulenzfaktors Adhäsion im Verlauf einer chronischen Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* kommt. Diese Downregulation des Virulenzfaktors fällt bei Patienten mit hohen Adhäsionswerten im Verlauf stärker aus. Allgemein ist die Ausprägung der Adhäsion bei Erstkolonisation als auch im weiteren Krankheitsverlauf interindividuell stark unterschiedlich. Zudem scheint die Entwicklung einer chronischen Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* bei CF-Patienten unabhängig von der Adhäsionsstärke bei Erstkolonisation zu sein.

Im Vergleich mit den klinischen Daten zeigt sich die Entwicklung der Adhäsionsausprägung im Verlauf der chronischen Infektion mit *P. aeruginosa* unabhängig vom klinischen Zustand eines CF-Patienten.

Die Analyse der Genotypen ergab, dass der Virulenzfaktor Adhäsion bei gleich bleibendem bakteriellem Genotyp innerhalb eines Patientenverlaufes sowie im interindividuellen Vergleich ebenfalls stark variabel ist. Die Fähigkeit zur Adhäsion ist daher nach diesen Versuchsdaten keine für einen bestimmten *Pseudomonas aeruginosa*-Stamm spezifische Eigenschaft.

Im Weiteren lässt sich auch keine deutliche Abhängigkeit der durchschnittlichen Adhäsion von der Anzahl phänotypisch unterschiedlicher *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme in einer Probe erkennen.

In dieser Studie wurden bereits asservierte Bakterienproben und retrospektiv gesammelte klinische Daten aufgearbeitet und untersucht.

Die verwendeten Sputumproben waren bei den Patienten in keiner festen zeitlichen Abfolge entnommen worden. Bei jedem der 8 Patienten waren die Zeitpunkte der Probengewinnung verschieden und auch die Zeitintervalle zwischen den Proben variierten individuell stark.

Die Erfassung des funktionellen pulmonalen Zustandes der Patienten erfolgte ebenfalls individuell und nicht in regelmäßigen Abständen. Zudem wurden die klinischen Untersuchungen nicht immer mit den Sputumentnahmen kombiniert durchgeführt. Aufgrund dieser Einschränkungen im Datenmaterial erfolgte eine vorwiegend deskriptive Auswertung der Versuchsergebnisse. Die in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse sollten in größer angelegten prospektiven Studien weiter erforscht werden. Auch sollte zukünftig die Möglichkeit von dreidimensionalen A 549-Aggregaten zur Erforschung der Pathogenität von *Pseudomonas aeruginosa* berücksichtigt werden (Carterson et al. 2005). Von diesen Modellen erhofft man sich eine repräsentative, den physiologischen Verhältnissen angepasste Aussagekraft bei Interaktionen zwischen *Pseudomonas aeruginosa* und Lungenepithelzellen.

Die Adhäsion an die respiratorischen Epithelzellen bei CF-Patienten bleibt der erste und wesentliche Schritt in der Kolonisation und nachfolgenden Infektion der tiefen Atemwege mit *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas aeruginosa* ist ein Keim mit hoher Anpassungsfähigkeit an seine Umgebung. Nach den Ergebnissen dieser Studie ist nach erfolgreicher Kolonisation im weiteren Krankheitsverlauf von einer Downregulation der

Fähigkeit zur Adhäsion auszugehen. Demnach ist die Adhäsionsfähigkeit bei Erstkolonisation stärker ausgeprägt als im weiteren Krankheitsverlauf. Ein wesentlicher Einfluß des Virulenzfaktors Adhäsion auf den weiteren Krankheitsverlauf konnte bei fehlender Assoziation mit der Lungenfunktion (FVC % und FEV1 %) im Verlauf nicht gezeigt werden. Somit könnte es von Vorteil sein Therapien zur Senkung der Adhäsion eher im Zeitintervall der Erstbesiedelung und Kolonisation anzuwenden.

In der Literatur wird eine Vielzahl von Therapieverfahren mit Substanzen beschrieben, welche eine Senkung der Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* bewirken können. Auf der einen Seite wurde eine Reihe von Antibiotika auf ihre Wirksamkeit zur Adhäsionssenkung getestet. Für die Chemotherapeutika Azithromycin (Carfartan et al. 2004), Piperacillin in Kombination mit Tazobactam (Fonseca et al. 2004), Erythromycin (Tsang et al. 2003), Cefsulodin (Di Martino et al. 2001) und auch Gatifloxacin in Kombination mit einem Makrolid konnte eine teils signifikante Verminderung oder Inhibition der Adhäsion an respiratorisches Epithel gezeigt werden. Auf der anderen Seite zeigten auch nicht-antibiotische Substanzen Potential zur Inhibition und Reduktion der Adhärenz. Stoffe wie Neuraminidase (Wolska et al. 2005) oder Bismuththiole (Wu et al. 2002) reduzierten die Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa*. Barghouti et al. wiesen 1996 den inhibitorischen Effekt von Polysacchariden (Dextran, Glycogen, Mannan) auf die Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* an buccalen Epithelzellen und Lungenzellen nach (A 549).

Wolska et al. bestätigten 2005 in einer Versuchsreihe diesen Effekt.

Der Großteil der genannten Substanzen hat aber nur dann einen wesentlichen inhibitorischen Effekt auf die Adhäsion, wenn sie vor Anbindung der Bakterien an die Wirtszelle gegeben werden. Zudem konnte für die meisten Antibiotika eine deutlich schlechtere Wirksamkeit nach Ausbildung des Biofilms nachgewiesen werden (Aaron et al. 2002; Stewart et al. 2002). Einschränkend muß bemerkt werden, daß die inhibitorischen Effekte auf die Adhäsion der genannten Substanzen bislang nur in vitro erforscht sind.

Eine weitere hoffnungsvolle Therapieform besteht in der Immunisation gegen *P. aeruginosa* mittels Vakzinen. Hsieh et al. konnte 2005 durch Immunisierung mit einer nicht toxischen Form des Exotoxin A von *Pseudomonas aeruginosa* bei Mäusen eine deutliche Verminderung der Adhäsion an oropharyngeales Epithel nachweisen.

## Diskussion

---

Durch die Erforschung von Substanzen, welche die Adhäsion inhibieren oder sogar lösen, erhofft man sich die Erstkolonisation zu verhindern oder wenigstens hinauszögern zu können. Hierdurch könnte es zu einer deutlichen Verbesserung der Lebenserwartung der CF-Patienten kommen.

## 5. Zusammenfassung

Die Hauptursache der Morbidität und Mortalität bei der Zystischen Fibrose ist die chronische Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa*. Der erste Schritt der Infektion ist die bakterielle Adhäsion an Oberflächenrezeptoren des respiratorischen Epithels. Die Infektion führt zu einer massiven lokalen Entzündungsreaktion mit sekundärer Gewebedestruktion und konsekutiv zu einer limitierten Prognose der Erkrankung. Die Bedeutung des Virulenzfaktors Adhärenz im Verlauf der chronischen *Pseudomonas aeruginosa* Infektion ist weitgehend ungeklärt.

In dieser Versuchsreihe wurden 100 sequentielle Bakterienisolate von acht CF-Patienten von Beginn der Kolonisation über einen Zeitraum von bis zu 15 Jahren bezüglich ihrer Fähigkeit zur Adhäsion untersucht. In einem Bakterienbindungsassay wurden fluoreszenzmarkierte (FITC) *Pseudomonas aeruginosa*-Isolate mit der humanen Lungenkarzinomzelllinie A549 inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels Auflichtfluoreszenzmikroskopie mit Hilfe eines halbautomatischen Zählprogramms unter visueller Kontrolle. Zusätzlich wurde anhand einer retrospektiven Studie der klinische Verlauf der CF-Patienten anhand der FVC % und der FEV1 % in dem Untersuchungszeitraum verfolgt.

Die sequentiell isolierten Bakterien zeigten in der zusammenfassenden Auswertung aller Werte über den Untersuchungszeitraum eine signifikante Abnahme der Adhäsionsfähigkeit ( $p$ -Wert = 0,02) bei interindividuell stark schwankender Ausprägung der Adhäsion. Bei den untersuchten Patienten konnte keine Assoziation zwischen der abnehmenden Adhärenz an Lungenepithelzellen und der Lungenfunktion im Verlauf gefunden werden.

Zudem läßt sich keine Abhängigkeit der Adhäsionsstärke von dem bakteriellen Genotypen feststellen.

Schlussfolgerung: Die interindividuelle stark unterschiedliche Ausprägung des Virulenzfaktors Adhärenz nimmt im Verlauf der chronischen Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* ab. Eine Abhängigkeit zwischen der Höhe der Adhäsion und des pulmonalen Funktionszustandes zeigt sich nicht. Der Virulenzfaktor wird vielmehr unabhängig vom klinischen Zustand des Patienten im Verlauf der chronischen Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* herunterreguliert.

## 6. Literaturverzeichnis

Aaron S.D., Ferris W., Ramotar K., Vandemheen K., Chan F., Saginur R.: Single and combination antibiotic susceptibilities of planctonic, adherent and biofilm-grown *Pseudomonas aeruginosa* isolates cultured from sputa of adults with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 40(11): 4172-9, (2002)

Albelda S.M., Smith C.W., Ward P.A.: Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J* Vol. 8, 504-512 ( 1994)

Alton E.W., Currie D., Logan-Sinclair R., Warner J.O., Hodson M.E., Geddes D.M.: Nasal potential difference; a critical diagnostic test for cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.*; 3: 922-926 (1990)

Azghani A.O., Idell S., Bains M., Hancock R.E.: *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture. *Microb. Pathog.*, 33(3), 109-114 (2002)

Baker N.R., Minor V., Shahrabadi M.S., Simpson D.A., Woods D.E.: *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is an adhesion. *Infect. Immun.*, Vol. 59, No. 9 2859-2863 (1991)

Barghouti S., Guerdoud L.M., Speert D.P.: Inhibition by dextran of *Pseudomonas aeruginosa* adherence to epithelial cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, Vol. 154, No. 6, 1788-1793 (1996)

Baumann U., Fischer J.J., Gudowius P., Lingner M., Tümmler B.: Buccal Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* in Patients with Cystic Fibrosis under Long-Term therapy with Azithromycin. *Infection* 29, No. 1 (2001)

Bayer A.S., Speert D.P., Park S. et al.: Functional role of mucoid exopolysaccharide (alginate) in antibiotic- induced and polymorphonuclear leucocyte-mediated killing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immunol* Vol. 59(1), 302-308 (1991)

Birrer P., McElvaney N.G., Rudeberg A., Sommer C.W., Liechti Gallati S., Kraemer R., Hubbaerd R., Crystal R.G.: Protease-antiprotease imbalance in the lungs of children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* Vol. 150, 207-213 (1994)

Boat T.E., Cheng P.W.; Epithelial cell dysfunction in cystic fibrosis: implications for airways disease. *Acta Paediatr Scand Suppl* Vol 363, 25-29 (1989)

Bonfield T.L., Konstan M., Burfeind P. et al.: Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the antiinflammatory cytokine IL-10 which is downregulated in cystic fibrosis. *Am J Respir Mol Biol* Vol. 13, 257-261 (1995)

Botzenhart K., Rüden H.: Hospital infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiot. Chemother.* Vol. 39, 1-15 (1987)

Botzenhart K., Döring G.: Epidemiology and ecology of *Pseudomonas aeruginosa*. In: Campa M., Bendinelli M, Friedmann H.: *Pseudomonas as an opportunistic pathogen*. Pleunum. Publishing Cooperation, New York, 1-18 (1993)

Boucher R.C.: Human airway ion transport (part one). *Am Repir Crit Care Med* Vol. 150, 271-281 (1994)

Braekeleer M.D., Allard C., Leblanc J.-P., Aubin G., Simard F.: Genetic Determinants of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cystic fibrosis patients in Canada. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis.* 17, 269-271 (1998)

Bronsveld I., Bijman J., Mekus F., Ballmann M., Veeze H.J., Tümmler B.: Clinical presentation of exclusive cystic fibrosis lung disease. *Thorax* 54, 278-281 (1999)

Burns J.L., Emerson J., Stapp J.R., Yim D.L., Krzewinski J., Loudon L., Ramsey B.W., Clausen C.R.: Microbiology of sputum from patients with cystic fibrosis centers in the United States. *Clin. Infect. Dis.* 27, 158-163 (1998)

Cachia P.J., Hodges R.S.: Synthetic peptide vaccine and antibody therapeutic development: Prevention and treatment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biopolymers.* 71(2): 141-68, (2003)

Carfartan G., Gerardin P., Turck D., Husson M.O.: Effect of subinhibitory concentrations of azithromycin on adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to bronchial mucins collected from cystic fibrosis patients. *J. Antimicrob. Chemother* 53(4):686-8, (2004)

Carterson A.J., Honer zu Bentrup K., Ott C.M., Clarke M.S., Pierson D.L., Vanderburg C.R., Buchanan K.L., Nickerson C.A., Schurr M.J.: A549 lung epithelial cells grown as three-dimensional aggregates: alternative tissue culture model for *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infect. Immun.* 73(2): 1129-40, (2005)

Chai D., Wang R., Pei F.: Effects of macrolides on biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 81(15): 934-6, (2001)

Chi E., Mehl T., Nunn D., Lory S.: Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with A549 pneumocyte cells. *Infection and Immunity*, Vol. 59, No. 3, 822-828 (1991)

Chronos Z.C., Wert S.E., Livingston J.L., Hassett D J., Whitsett J.A.: Role of cystic fibrosis transmembrane conductance in pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa* in vivo. *J. Immunol.* 165, 3941-3950 (2000)

Corey M., McLaughlin F.J., Williams M., Levinson H.: A comparison of survival, growth and pulmonary function in patients with cystic fibrosis in Boston and Toronto. *J. Clin. Epidemiol.*; 41: 583-591 (1988)

Costerton J.W., Lewndowski Z., DeBeer D., Caldwell D., Korber D., James G.: Biofilms, the customized Microniche. *J. Bacteriol.*; 176: 2137-2142 (1994)

- Cripps A.W., Dunkley M.L., Clancy R. L., Kyd J.: Vaccine Strategies against *Pseudomonas aeruginosa* Infection in the lung. Behring Inst. Mitt., No. 98, 262-268 (1997)
- Cunha B. A.: *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapy. Seminars in Resp. Infections, Vol. 17, No. 3, 231-239 (2002)
- Davies J. C.: New therapeutic approaches for cystic fibrosis lung disease. J. R. Soc. Med., 95 Suppl. 41, 58-67 (2002)
- Dealer S.F., Holton A.: *Pseudomonas aeruginosa* is retained in the bronchi of cystic fibrosis by an increased transepithelial potential. Medical Hypotheses; 37: 186-190 (1992)
- De Bentzmann S., Roger P., Puchelle E.: *Pseudomonas aeruginosa* adherence to remodelling respiratory epithelium. Eur Respir J 9, 2145-2150 (1996)
- Di Mango E, Zar H.J., Bryan R. et al.: Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. J Clin Invest Vol. 96, 2204-2210 (1995)
- Di Martino P., Rebiere-Huet J., Hulen C.: Effects of Antibiotics on adherence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens* to A549 pneumocyte cells. Chemotherapy 46, 129-134 (2000)
- Di Martino P.: Effects of antibiotics on adherence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens* to human fibronectin. Chemotherapy 47, 344-349 (2001)
- Di Martino P., Gagniere H., Berry H., Bret L.: 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., 4(6), 613-620 (2002)
- Dinwiddie R.: Pathogenesis of lung disease in cystic fibrosis. Respiration 67, 3-8 (2000)
- Döring G., Ulrich M., Müller W., Bitzer J., Schmidt-König L., Müntz L., Grupp H., Wolz C., Stern M., Botzenhart K.: Generation of *Pseudomonas aeruginosa* aerosols during handwashing from contaminated sink drains, transmission to hands of hospital personnel and its prevention by use of new heating device. Zentralbl. Hyg. Vol 191, 494-505 (1991)
- Döring G., Frank F., Boudier C., Herbert S., Fleischer B., Bellon G.: Microbiology of airway disease with cystic fibrosis of *Pseudomonas aeruginosa*. Clin. Microbiol. Rev.; 4 (1): 35-51 (1991)
- Döring G., Hörz M., Ortelt J., Grupp H., Wolz C.: Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in an intensive care unit. Epidemiol. Infect Vol. 110, 427-436 (1993)

Döring G., Krogh-Johansen H., Weidinger S, Hoiby N.: Allotypes of alpha1-antitrypsin in cystic fibrosis patients homozygous and heterozygous for delta 508. *Pediatr. Pulmonol* 18, 3-7 (1994)

Döring G., Knight R., Bellon G.: Immunology of cystic fibrosis. In: Hodson M.E., Geddes D.(eds) *Cystic fibrosis*. Arnold, London, 109-140 (1994)

Döring G, Frank F., Boudier C., Herbert S., Fleischer B., Bellon G.: Cleavage of lymphocyte surface antigens CD2, CD4 and CD8 by polymorphonuclear leukocyte elastase and cathepsin G in patients with cystic fibrosis. *J Immunol*. Vol. 154, 4842-4850 (1995)

Döring G.: Cystic fibrosis respiratory infections: interactions between bacteria and host defence. *Monaldi Arch. Chest Dis.*, 52, 363-366 (1997)

Döring G., Conway S.P., Heijerman H. G.M., Hodson M.E., Hoiby N., Smyth A., Touw D.J.: Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur. Respir. J.* 16, 749-767 (2000)

DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (2002): A549 Cell culture data

Dunne W.M. Jr.: Bacterial adhesion: Seen any good biofilm lately? *Clin. Microbiol. Rev.*, Vol. 15, No. 2, 155-166 (2002)

Farell P.M., Guanghong S., Splaingard M., Colby C.E., Laxova A., Kosorok M.R., Rock M.J., Mischler E.H.: Acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis. *Pediatrics* Vol. 100 (1997)

Feldmann M., Bryan R., Rajan S., Scheffler D., Brunnert S., Tang H., Prince A.: Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infections. *Infect Immun*. Vol. 66, 43-51 (1998)

Fluge G., Ojeniyi B., Hoiby N., Digranes A., Ciofu O., Hunstad E., Hannaes O.C., Storrosten O.-T.: Typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains in Norwegian cystic fibrosis patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 7, 238-243 (2001)

Fonseca A.P., Extremina C., Fonseca A.F., Sousa J.C.: Effects of subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam on *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* 53(Pt9): 903-10, (2004)

Gabral D.A., Loh B.A., Speert D.P.: Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* resists nonopsonic phagocytosis by human neutrophils and macrophages. *Pediatr Res* 22, 429-431 (1987)

Gagniere H., Di Martino P.: Alpha5beta 1 integrins and fibronectin are involved in adherence of the *Pseudomonas aeruginosa* ER 97314 clinical strain to A549 cells. *Folia Microbiol. (Praha)* 49(6): 757-62, (2004)

Gilligan P.H.: Microbiology of airways disease in patients with cystic fibrosis. Clin. Microbiol. Rev., Vol. 4, No. 1, 35-51 (1991)

Goldman M.J., Anderson G.M., Stolzenberg E.D., Kari U.P., Zasloff M., Wilson J.M.: Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. Cell Vol. 88, 553-560 (1997)

Govan J.R.W., Deretic V.: Microbiological pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. Microbiol. Review Vol. 60, No. 3, 539-574 (1996)

Gupta S.K., Berk R.S., Masinick S., Hazlett L.D.: Pili and lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* bind to the glycolipid asialo GM1. Infect Immun. Vol. 62, 4572-4579 (1994)

Hahn H.P.: The type-4-pilus ist he major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*-a review. Gene, Vol. 192, 99-108 (1997)

Harper T.B., Gaumer H.R., Waring W. et al.: Cell mediated immunity and suppressor T cell function in children with cystic fibrosis. Lung Vol. 157(4), 219-228 (1980)

Heck L.W., Morihara K., Abrahamson D.R.: Degradation of soluble laminin and depletion of tissue-associated basement membrane laminin by *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease. Infect Immun. Vol. 54, 149-153 (1986)

Heck L.W., Morihara K., McRae W.B., Miller E.J.: Specific cleavage of human type III and IV collagens by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. Infect Immun Vol. 51, 115-118 (1986)

Hinglay S.T., Hastie A.T., Kueppers F., Higgins L.M.: Disruption of respiratory cilia by proteases including those of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun. Vol. 54, 379-385 (1982)

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

Hoiby N.: Microbiology of lung infections in cystic fibrosis patients. Acta Paedriatr. Scand. Suppl., 301, 33-54 (1982)

Hoiby N, Koch C.: Cystic fibrosis. 1. *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis and ist management. Thorax Vol. 45, 881-884 (1990)

Hsieh J.C., Tham D.M., Feng W., Huang F., Embaie S., Liu K., Dean D., Hertle R., Fitzgerald D.J., Mrsny R.J.: Intranasal immunization strategy to impede pilin-mediated binding of *Pseudomonas aeruginosa* to airway epithelial cells. Infect Immun. 73 (11): 7705-17. (2005)

- Hybiske K., Ichikawa J.K., Huang V., Lory S.J., Machen T.E.: Cystic fibrosis airway epithelial cell polarity and bacterial flagellin determine host response to *Pseudomonas aeruginosa*. *Cell Microbiol.*; 6 (1), 49-63 (2004)
- Iglewski B.H., Sadoff J.C.: Toxin inhibitors of protein synthesis: Production, purification and assay of *Pseudomonas aeruginosa* toxin A. *Methods Enzymol.* Vol. 60, 780-793 (1979)
- Imundo L., Barasch J., Prince A., Al-Awqati Q.: Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *Medical Sciences* Vol. 92, 3019-3023 (1995)
- Izbicki G., Trachsel D., Rutishauser M., Perruchoud A.P., Zamm M.: Early detection of exacerbation of lung infections in patients with cystic fibrosis by means of daily spirometry. *Schweiz Med. Wochenschr.*; 130: 1361-1365 (2000)
- Jiang C., Finkbeiner W., Widdicombe J., McCray P., Miller S.: Altered fluid transport across airway epithelium in cystic fibrosis. *Science* 262, 424-427 (1993)
- Jiang X., Hill W.G., Pilewski J.M., Weisz O.A.: Glycosylation differences between a cystic fibrosis and rescued airways cell line are not CFTR dependent. *Am J Physiol* Vol. 273, L913-L920 (1997)
- Kanthakumar K., Taylor G.W., Gundell D.R., Dowling R.B., Johnson M., Cole P.J., Wilson R.: The effect of bacterial toxins on levels of intracellular adenosine nucleotides and human ciliary beat frequency. *Pulm. Pharmacol.* Vol. 9, 223-230 (1996)
- Katz J.N., Horowitz R.I., Dolan T.F., Shapiro E.D.: Clinical features as predictor of functional status in children with cystic fibrosis. *J Paediatr* Vol. 108, 332-335 (1986)
- Kerem E., Corey M., Gold R., Levison H.: Pulmonary function and clinical course in patients with cystic fibrosis after pulmonary colonization with *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Pediatr.*, 116, 714-719 (1990)
- Khan T.Z., Wagener J.S., Bost T., Martinez J., Accurso F. J., Riches D. W.: Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 154, 1075-1082 (1995)
- Knutsen A.P., Slavin R.G., Roodman S.T. et al.: Decreased T-helper cell function in patients with cystic fibrosis. *Int Arch Allergy Appl Immunol* Vol. 85(2), 208-212 (1988)
- Konstan M.W., Butler S.M., Wohl M.E., Stoddard M., Matousek R., Wagener J.S., Johnson C.A., Morgan W.J.; Investigators and Coordinators of the Epidemiologic Study of Cystic Fibrosis: Growth and nutritional indexes in early life predict pulmonary function in cystic fibrosis. *J. Pediatr.*, 142(6):624-30 (2003)

- Lam J., Chen R., Lam K., Costerton J.W.: Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected klungs in cystic fibrosis. *Infect Immun.* Vol 28, 546-556 (1980)
- Leroy-Dudal J., Gagniere H., Cossard E., Carreiras F., Di Martino P.: Role of alphavbeta5 integrins and vitronectin in *Pseudomonas aeruginosa* PAK interaction with A549 respiratory cells. *Microbes. Infect.* 6(10), 875-81 (2004)
- Lillehoj E.P., Hyun S.W., Kim B.T., Zhang X.G., Lee D.I., Rowland S., Kim K.C.: Muc1 mucins on the cell surface are adhesion sites for *Pseudomonas aeruginosa*. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 280(1): L181-7, (2001)
- Lillehoj E.P., Kim B.T., Kim K.C.: Identification of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin as an adhesin for Muc1 mucin. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 282 (4): L751-6 (2002)
- Lyczak J.B., Cannon C.L., Pier G.B.: Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Reviews*, Vol. 15, No. 2, 194-222 (2002)
- Maasion P.P., Inoue H., Richman-Eisenstat J. et al.: Novel *Pseudomonas aeruginosa* product stimulates interleukin-8 production in airway epithelial cells in vitro. *J Clin Invest* Vol. 93(1), T26-T32 (1994)
- Mall M., Hirtz S., Gonska T., Kunzelmann K: Assesment of CFTR function in rectal biopsies for the diagnosis if cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibro.* 3 Suppl. 2: 165-169 (2004)
- Marcus H., Austria A.L., Baker N.R.: Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to tracheal epithelium. *Infect Immun.* Vol. 57, 1050-1053 (1989)
- Marty N., Pasquier C., Dournes J.L., Chavagnat F., Guinand M., Chabanon G., Pipy B., Montrozier H.: Effects of characterised *Pseudomonas aeruginosa* exopolysaccharides on adherence to human tracheal cells. *J. Med. Microbiol.*; 47: 129-134 (1998)
- Mathee K., Ciofu O., Sternberg C., Lindum P.W., Campbell J.I., Jensen P., Johnsoen A.H., Givskov M., Ohman D.E., Molin S., Hoiby N., Kharazmi A.: Mucoid Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. *Microbiology*; 145 (Pt 6): 1349-1357 (1999)
- May T.B., Shinabarger D., Maharat R. et al.: Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* : a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Rev* Vol. 4(2), 191-206 (1991)
- Mekus F., Ballmann M., Bronsveld I., Bijman J., Veeze H., Tümmler B.: Categories of deltaF 508 homozygous cystic fibrosis twin and siblings pairs with distinct phenotypic characteristics. *Twin Res.*; 3 (4): 277-293 (2000)

Mitchell E., Houles C., Sudakevitz D., Wimmerova M., Gautier C., Perez S., Wu A.M., Gilboa-Garber N., Imberty A.: Structural basis for oligosaccharide-mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of cystic fibrosis patients. *Nat. Struct. Biol.* 9(12): 918-21, (2002)

Mizgerd J.P., Kobzik L., Warner A.E., Brain J.D.: Effects of sodium concentration on human neutrophil bactericidal functions. *Am. J. Physiol.* 388-393 (1995)

Mizukane R., Hirakata Y., Kaku M. et al.: Comparative in vitro exoenzyme-suppressing activities of azithromycin and other macrolide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemotherapy* Vol. 38, 528-533 (1994)

Molinari G., Guzman C.A., Pesce A. et al.: Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors by subinhibitory concentrations of azithromycin and other macrolide antibiotics. *J. Antimicrob. Chemotherapy* Vol. 31, 681-688 (1993)

Moore K.W., O'Garra A., de Waai-Malefyt R et al.: Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* Vol. 11, 163-190 (1993)

Morrison A.J. Jr., Wenzel R.P.: Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Infect. Dis.* Vol. 6 (Suppl.), 627-642 (1984)

Pederson S.S., Hoiby N., Espersen F., Koch C.: Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Thorax*; 47: 6-13 (1992)

Picciolo G.L., Kaplan D.S.: Reduction of fading of fluorescent reaction product for microphotometric quantitation. *Adv. Appl. Microbiol*; 30: 197-235 (1985)

Pier G.B., Grout M., Zaidi T.S., Olsen J.C., Johnson L.G., Yankaskas J.R., Goldberg J.B.: Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science* Vol. 271, 64-67 (1996)

Pier G.B.: Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 97, 8822-8828 (2000)

Plotkowski M.C., Tournier J.M., Puchelle E.: *Pseudomonas aeruginosa* strains possess specific adhesins for laminin. *Infect. Immun.* Vol. 64, 600-605 (1996)

Plotkowski M.C., Costa A.O., Morandi V., Barbossa H.S., Nader H.B., de Bentzmann S., Puchelle E.: Role of heparan sulphate proteoglycans as potential receptors for non-piliated *Pseudomonas aeruginosa* adherence to non-polarised airway epithelial cells. *J. Med. Microbiol.* Vol. 50; No. 2, 183-190 (2002)

Poelstra K.A., van der Mei H.C., Gottenbos B., Grainger D.W., van Horn J.R., Busscher H.J.: Pooled human immunoglobulines reduce adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* in a parallel plate flow chamber. *Biomed. Mater. Res.*, Vol. 51, No. 2, 224-232 (2000)

Puchelle E., de Bentzmann S., Plotkowski C.: Receptors in the *Pseudomonas aeruginosa* adherence to injured and repairing airway epithelium. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*; 154 (4 Pt 2): 155-162 (1996)

Rabsch P.: Die pulmonale Besiedelung von *Pseudomonas aeruginosa* bei Patienten mit Mukoviszidose-Betrachtung des Besiedelungsablaufes sowie Veränderungen klinischer Parameter und des Therapieregimes. Diss.; 2: 22 (1998)

Ramphal R., Guay C., Pier G.B.: *Pseudomonas aeruginosa* adhesins for tracheobronchial mucin. *Infect Immun.* Vol. 55, 600-603 (1987)

Ramsey B.W.: Management of pulmonary disease in patients with cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 335, 179-188 (1996)

Ras G.J., Theron A.J., Anderson R., Taylor G.W., Wilson R., Cole P.J., van der Merwe C.A.: Enhanced release of elastase and oxidative inactivation of alpha-1-protease inhibitor by stimulated human neutrophils exposed to *Pseudomonas aeruginosa* pigment 1-hydroxyphenazine. *J. Infect. Dis.* Vol. 166, 568-573 (1992)

Rebiere-Huet J., Guerillon J., Pimenta A.L., Di Martino P., Orange N., Hulen C.: POins of *Pseudomonas aeruginosa fluorescens* MFO as fibronectin-binding proteins. *FEMS Microbio. Letters* 215, 121-126 (2002)

Rebiere-Huet J., Di Martino P., Hulen C.: Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to fibronectin by PA-IL and monosaccharides: involvement of lectin-like process. *Can. J. Microbiol.* 50(5): 303-12, (2004)

Reynolds H.Y., Kazmierowski J.A., Newball H.H.: Specific of opsonic antibodies to enhance phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* by human alveolar macrophages. *J. Clin. Invest.* Vol. 56, 376-385 (1975)

Riordan J.R., Rommens J.M., Kerem B.S., Alon N., Rozmahel R., Grzelczak Z., Zielenski J., Lok S., Plavsic N., Chou J.L., Drumm M.L., Iannuzzi M.L., Collins F.S., Tsui L.C.: Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DANN. *Science* 245: 1066-1073 (1989)

Russell N.J., Gacesa P.: Physicochemical properties of alginate from mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antibiot. Chemotherapy* Vol. 42, 62-66 (1989)

Saiman L., Ishimoto K., Lory S., Prince A.: The effect of piliation and exoproduct expression on the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelial monolayers. *J. Infect. Dis.* Vol. 161, 541-548 (1990)

Saiman L., Cacalano G., Gruenert D. et al.: Comparison of adherence of *Pseudomonas aeruginosa* of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelial cells from cystic fibrosis patients and healthy subjects. *Infect Immunol* Vol. 60(7), 2808-2814 (1992)

Saiman L., Prince A.: *Pseudomonas aeruginosa* pili bind to asialoGM1 which is increased on the surface of cystic fibrosis epithelial cells. *J Clin Invest* Vol. 92(4), 1875-1880 (1993)

Santos J.I., Hill H.R.: Neutrophil function in cystic fibrosis. In: Shapira E., Wilson G.B.(eds) *Immunological aspects of cystic fibrosis*. CRC Press, Boca Raton, 29-37 (1984)

Scharfmann A., Kroczyński H., Carnoy C., Van Brussel E., Lamblin G., Ramphal R., Roussel P.: Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory mucins and expression of mucin-binding proteins are increased by limiting iron during growth. *Infect Immun* Vol. 64, 5417-5420 (1996)

Scharfmann A, Delmotte P., Beau J., Lamblin G., Roussel P., Mazurier J.: Sialyl-Le(x) and sulfo-sialyl-Le(x) determinants are receptors for *Pseudomonas aeruginosa*: *Glycoconjugate Journal*, Vol. 17, 735-740 (2000)

Scheid P., Kempster L., Griesenbach U., Davies J.C., Dewar A.: Inflammation in cystic fibrosis airways: relationship to increased bacterial adherence. *Eur. Respir. J.* 17(1), 27-35 (2001)

Schroten H., Wolske A., Plogmann R., Hanisch F.G., Hacker J., Uhlenbruck G., Wahn V.: Binding of cloned-S-fimbriated *E. coli* to human buccal epithelial cells-different inhibition of binding by neonatal saliva and adult saliva. *Zbl. Bakt.* 274, 514-518 (1991)

Schroten H., Steinig M., Plogmann R., Hanisch F.G., Hacker J., Herzig P. Wahn V.: S-Fimbriae mediated adhesion of *E. coli* to human buccal epithelial cells is age independent. *Infection* 20; 5, 273-275 (1992)

Schuster A., Ueki I., Nadel J.A.: Neutrophil elastase stimulates tracheal submucosal gland secretion that is inhibited by ICI200, 355. *Am J Physiol* Vol. 262, L86-L91 (1992)

Sedlacek H.H., Grigat H., Seiler F.R.: The fluorescence immunoassay using plane surface solid phases (FIAPS). *Meth. Enzymol.*; 74: 87-105 (1981)

Sharma R., Florea V.G., Bolger A.P., Doehner W., Florea N.D., Coats A.J., Hodson M.E., Anker S.D., Henein M.Y.: Wasting as an independent predictor of mortality in patients with cystic fibrosis. *Thorax*; 56: 746-750 (2001)

Smith J., Travis S., Greenberg E., Welsh M.: Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* Vol. 85, 229-236 (1996)

Sobonya R.E., Taussig L.M.: Quantitative aspects of lung pathology in cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* Vol. 134, 290-295 (1986)

Sommerhoff C.P., Nadel J.A., Basbaum C.B., Caughey G.H.: Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from cultured bovine airway gland serous cells. *J Clin Invest* Vol. 85, 682-689 (1990)

- Sorensen R.U., Waller R.L., Klimger J.D.: Cystic fibrosis. Infection and immunity to pseudomonas. Clin Rev Allergy Vol.9, 47-74 (1990)
- Stanbrook M.B., Corey M., Tullis D.E.: The repeatability of forced expiratory volume measurements in adults with cystic fibrosis. Chest; 125(1): 150-155 (2004)
- Steinkamp G., Wiedemann B.: Relationship between nutritional status and lung function in cystic fibrosis: cross sectional and longitudinal analyses from the German CF quality assurance (CFQA). Thorax; 57(7): 596-601 (2002)
- Stewart P.S.: Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. Int. J. Med. Microbiol. 292(2): 107-13, (2002)
- Sturgess J., Imrie J.: Quantitative evaluation of the development of tracheal submucosal glands in infants with cystic fibrosis and control infants. Am J Pathol Vol. 106, 303-311 (1982)
- Tateda K., Ishii Y., Matsumoto T et al.: Direct evidence for antipseudomonal activity of macrolides: exposure-dependent bactericidal activity and inhibition of protein synthesis by erythromycin, clarithromycin and azithromycin. Antimicrob. Agents Chemother. Vol 40, 2271-2275 (1996)
- Tattersson L.E., Poschet J.F., Firoved A., Skidmore J., Deretic V.: CFTR and pseudomonas infections in cystic fibrosis. Front. Biosci. 6, 890-897 (2001)
- Theilacker C., Coleman F.T., Mueschenborn S., Llosa N., Grout M., Pier G.B.: Construction and characterization of a Pseudomonas aeruginosa mucoid exopolysaccharide-alginate conjugate vaccine. Infect. Immun. 71(7): 3875-84, (2003)
- Tsang K.W., Shum D.K., Chan S., Ng P., Mak J., Leung R., Shum I.H., Ooi G.C., Tipoe G.L., Lam W.K.: Pseudomonas aeruginosa adherence to human membrane collagen in vitro. Eur. Respir. J., 21(6): 932-8, (2003)
- Tsang K.W., Ng P., Ho P.L., Chan S., Tipoe G., Leung R. Sun J., Ho J.C., M.S., Lam W.K.: Effects of erythromycin on Pseudomonas aeruginosa adherence to collagen and morphology in vitro. Eur. Respir. J. 21(3): 401-6, (2003)
- Tsui LC.:The spectrum of Cystic fibrosis mutations. Trends Genet. 8: 392-398 (1992)
- Tümmler B, Bosshammer S., Breitenstein S., Gudowius P.: Vaccination Against Pseudomonas aeruginosa. Behring Inst. Mitt., No.98, 249-255 (1997)
- van Barneveld A., Stanke F., Ballmann M., Naim H.Y.: Ex vivo biochemical analysis of CFTR in human rectal biopsies. Biochem. Biophys. Acta. 1762 (4): 393-397 (2006)
- Vasil M.L.: Pseudomonas aeruginosa: biology, mechanisms of virulence epidemiology. J. Pediatr., 108, 800-805 (1986)

Von Gotz F., Haussler S., Jordan D., Saravanamuthu S.S., Wehmhoner D., Strussmann A., Lauber J., Attree I., Buer J., Tümmler B., Steinmetz I.: Expression analysis of a highly adherent and cytotoxic small colony variant of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a lung of a patient with cystic fibrosis. *J. Bacteriol.* 186(12): 3837-47, (2004)

Vranes J., Tjesic-Drinkovic D., Zulj I., Kruzic V., Turkovic B., Maric S.: Adherence ability of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis to two different epithelial cell lines. *Coll. Antropol.* 28(2): 675-80, (2004)

Wick G., Baudner S., Herzog F.: *Imunfluoreszenz*. Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg (1976)

Wolska K., Obrepalska M., Jakubczak A.: Inhibition of adhesion to buccal epithelial cells of *Pseudomonas aeruginosa* by dextran. *Med. Dosw Mikrobiol.* 57(3): 311-8, (2005)

Wolska K., Rudas P., Jakubczak A.: Reduction in the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to human buccal epithelial cells with neuraminidase inhibition. *Pol. J. Microbiol.* 54(1): 73-6, (2005)

Wood R.E., Wanner A., Hirsch J., Farrell P.M.: Tracheal mucociliary transport in patients with cystic fibrosis and its stimulation by terbutaline. *Am Rev Respir Dis* Vol. 111, 733-738 (1975)

Wood R.E., Boat T.F., Dorshuk C.F.: Cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* Vol. 113, 833-878 (1976)

Wu C.L., Domenico P., Hassett D.J., Beveridge T.J., Hauser A.R., Kazzaz J.A.: Subinhibitory bismuth-thiols reduce virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 26(6), 731-738 (2002)

## **Danksagung**

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Horst Schrotten für die Überlassung des Themas, seine Unterstützung bei der Dissertation und die aufgebrachte Geduld.

Herrn Dr. Peter Gudowius danke ich für seine durchweg engagierte Unterstützung und Hilfe während der gesamten Erarbeitung der vorliegenden Dissertation.

Weiterhin danke ich Herrn Universitätsprofessor Dr. Mayatepek, Direktor der Klinik für allgemeine Pädiatrie des Zentrums für Kinderheilkunde der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, für die Arbeitsmöglichkeit in seiner Klinik.

Frau Mölleken und den Mitarbeitern des Infektiologischen Labor der Klinik für allgemeine Pädiatrie des Zentrums für Kinderheilkunde danke ich für die stets freundliche Unterstützung und die Mithilfe an den Experimenten.

Herrn Dr. Willers vom Mathematischen Institut der Universität Düsseldorf und Herrn Prof. Dr. Diepenbrock vom Fachbereich Mathematik und Naturwissenschaften der Bergischen Universität Wuppertal danke für ihren tatkräftigen Beistand bei der Durchführung der statistischen Auswertung.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Julia für ihre anhaltende Motivation und Begleitung durch alle Phasen der Entstehung dieser Arbeit. Ebenso danke ich meinem Sohn Tristan für seine erfrischenden Inspirationen.

Meinen Eltern danke ich herzlich für die Ermöglichung des Studiums und die stete Unterstützung meiner Ausbildung.

## Lebenslauf

Name: Hammes  
Vorname: Dirk  
Geburtsdatum: 04.09.1973  
Geburtsort: Wuppertal

### Schulbildung:

1980-1984 Grundschule Rottsieper Höhe Wuppertal  
1984-1993 Carl-Fuhlrott Gymnasium Wuppertal

### Zivildienst:

1993-1994 Sozialer mobiler Hilfsdienst der evangelischen Gemeinde  
Wuppertal-Cronenberg

### Beruflicher Werdegang:

1995-1997 Ausbildung zum Hotelkaufmann

### Studium:

1997-2003 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine Universität  
Düsseldorf  
05/2003 Ärztliche Abschlussprüfung

### Ärztlicher Werdegang:

Seit 08/2003 AiP/Assistenzarzt an den Kliniken St. Antonius Wuppertal in der  
Weiterbildung zum Unfallchirurgen und Orthopäden  
  
10/2004 Erteilung der Approbation

**Adhäsion sequentieller Bakterienisolate von Mukoviszidosepatienten mit chronischer *Pseudomonas aeruginosa*-Infektion unter Berücksichtigung der Lungenfunktion**

vorgelegt von Dirk Hammes

Die Hauptursache der Morbidität und Mortalität bei der Zystischen Fibrose ist die chronische Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa*. Der erste Schritt der Infektion ist die bakterielle Adhäsion an Oberflächenrezeptoren des respiratorischen Epithels. Die Infektion führt zu einer massiven lokalen Entzündungsreaktion mit sekundärer Gewebedestruktion und konsekutiv zu einer limitierten Prognose der Erkrankung. Die Bedeutung des Virulenzfaktors Adhärenz im Verlauf der chronischen *Pseudomonas aeruginosa* Infektion ist weitgehend ungeklärt.

In dieser Versuchsreihe wurden 100 sequentielle Bakterienisolate von acht CF-Patienten von Beginn der Kolonisation über einen Zeitraum von bis zu 15 Jahren bezüglich ihrer Fähigkeit zur Adhäsion untersucht. In einem Bakterienbindungsassay wurden fluoreszenzmarkierte (FITC) *Pseudomonas aeruginosa*-Isolate mit der humanen Lungenkarzinomzelllinie A549 inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels Auflichtfluoreszenzmikroskopie mit Hilfe eines halbautomatischen Zählprogramms unter visueller Kontrolle. Zusätzlich wurde anhand einer retrospektiven Studie der klinische Verlauf der CF-Patienten anhand der FVC % und der FEV1 % in dem Untersuchungszeitraum verfolgt.

Die sequentiell isolierten Bakterien zeigten in der zusammenfassenden Auswertung aller Werte über den Untersuchungszeitraum eine signifikante Abnahme der Adhäsionsfähigkeit ( $p$ -Wert = 0,02) bei interindividuell stark schwankender Ausprägung der Adhäsion. Bei den untersuchten Patienten konnte keine Assoziation zwischen der abnehmenden Adhärenz an Lungenepithelzellen und der Lungenfunktion im Verlauf gefunden werden.

Zudem läßt sich keine Abhängigkeit der Adhäsionsstärke von dem bakteriellen Genotypen feststellen.

Schlussfolgerung: Die interindividuelle stark unterschiedliche Ausprägung des Virulenzfaktors Adhärenz nimmt im Verlauf der chronischen Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* ab. Eine Abhängigkeit zwischen der Höhe der Adhäsion und des pulmonalen Funktionszustandes zeigt sich nicht. Der Virulenzfaktor wird vielmehr unabhängig vom klinischen Zustand des Patienten im Verlauf der chronischen Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* herunterreguliert.

Prof. Dr. med. H. Schrotten



