

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der  
Universität Tübingen

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

**Untersuchung zweier *Pseudomonas aeruginosa*-Blutisolate  
hinsichtlich infektionsrelevanter Gene und Phänotypen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Kübler, Pierre David Martin**

**2021**

Dekan:	Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter:	Professorin Dr. J.-S. Frick
2. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. C. Gille
Tag der Disputation:	26.08.2021

*Meiner Familie und Freunden*

# Inhalt

Abkürzungen .....	6
1 Einleitung .....	7
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	7
1.1.1 Epidemiologie und klinische Bedeutung .....	7
1.1.2 Genom und Regulationsmechanismen .....	10
1.1.3 Virulenzfaktoren .....	11
1.1.4 Antibiotikaresistenzen: Mechanismen und Auswirkungen .....	16
1.2 Sepsis .....	18
1.2.1 Epidemiologie und pathophysiologisches Verständnis .....	18
1.2.2 Biomarker für Diagnostik und Prognose der Sepsis .....	20
1.2.3 Der Erreger als Biomarker .....	21
1.3 Die VARPA-Studie .....	22
1.3.1 Methodik und für die vorliegende Arbeit relevante Ergebnisse .....	22
1.3.2 Das <i>hlyP</i> -Gen als prognostischer Biomarker: Was ist bereits bekannt? ...	24
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit .....	26
2 Material und Methoden .....	27
2.1 Geräte und Materialien .....	27
2.2 Chemikalien und Reagenzien .....	27
2.3 Medien und Pufferlösungen .....	28
2.4 Bakterienstämme .....	31
2.5 Anzucht der Bakterien .....	32
2.6 Wachstumsversuche .....	33
2.6.1 Wachstum in LB- und M9-Medium .....	33
2.6.2 Wachstum bei pH 5, 7 und 8 .....	33
2.6.3 Wachstum bei 27 °C, 37 °C und 40 °C .....	33
2.6.4 Wachstum in defibriniertem Schafblut .....	34
2.6.5 Biofilmbildung .....	34
2.7 Motilität .....	35
2.7.1 „Swimming“ .....	35
2.7.2 „Swarming“ .....	36
2.8 Hämolyseverhalten .....	36
2.9 Zellkultur und Zytotoxizitäts-Assay .....	37
2.10 Wachstum auf MacConkey-Agar .....	37

2.11 Lichtmikroskopie.....	37
2.12 Herstellung der Deletionsmutanten und deren Komplementierung .....	38
2.13 Statistische Auswertung .....	39
3 Ergebnisse.....	40
3.1 Wachstumsversuche .....	40
3.1.1 Wachstum in LB- und M9-Medium .....	40
3.1.2 Wachstum bei pH 5, 7 und 8 .....	45
3.1.3 Wachstum bei 27 °C, 37 °C und 40 °C .....	51
3.1.4 Wachstum in defibriniertem Schafblut.....	55
3.1.5 Biofilmbildung .....	56
3.2 Motilität .....	58
3.2.1 „Swimming“ .....	58
3.2.2 „Swarming“ .....	61
3.3 Hämolytische Aktivität.....	65
3.4 Zytotoxizitäts-Assay.....	67
3.5 Wachstum auf MacConkey-Agar .....	68
3.6 Lichtmikroskopische Betrachtung der <i>P. aeruginosa</i> -Isolate .....	69
4 Diskussion .....	73
4.1 Zusammenhang zwischen Wachstum und Virulenz.....	73
4.1.1 Vergleich von ID50 wt und ID173 wt.....	74
4.1.2 Vergleich von ID50 wt mit den Deletionsmutanten ID50 $\Delta$ 1866-1 und ID50 $\Delta$ 1799 .....	75
4.2 Zytotoxizitäts- und Biofilm-Assay weisen auf unterschiedlich starke Invasivität hin.....	76
4.3 Exkurs zu den experimentellen Ergebnissen des chronischen <i>P. aeruginosa</i> -Isolats PAO1.....	78
4.4 Ausblick.....	79
5 Zusammenfassung .....	81
6 Literaturverzeichnis.....	82
7. Erklärung zum Eigenanteil.....	94
Danksagung .....	95

## Abkürzungen

ACC-Cluster	akzessorisches Gencluster
°C	Grad Celsius
CF	zystische Fibrose
CFU	koloniebildende Einheiten
CRP	C-reaktives Protein
DIC	disseminierte intravasale Koagulation
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
g	Gramm
G	Gravitationskraft
h	Stunde(n)
HR	Hazard-Ratio
l	Liter
M	molare Masse (g/mol)
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MOI	Infektionsmultiplizität
nm	Nanometer
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität
rpm	Umdrehungen pro Minute
SD	Standardabweichung
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$

# 1 Einleitung

## 1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

### 1.1.1 Epidemiologie und klinische Bedeutung

*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ist ein ubiquitär vorkommendes, stäbchenförmiges, gramnegatives Bakterium (Hof et al. 2014). Kennzeichnend sind seine genetische und metabolische Vielseitigkeit sowie Anpassungsfähigkeit. Der Keim kann unterschiedlichste Lebensräume besiedeln und ist in der Lage Infektionen sowohl in Pflanzen als auch in Tieren und Menschen auszulösen (D'Argenio et al. 2001; Rahme et al. 1995). In der Umwelt findet sich *P. aeruginosa* vor allem in feuchter Umgebung wie z.B. in Böden und Flüssen (Pirnay et al. 2005; Green et al. 1974). Aber auch im Krankenhaus wurde das Bakterium bereits in Wasserhähnen (Reuter et al. 2002), Siphons (Ayliffe et al. 1974), Schwimmbädern (Gregory et al. 1987) und Blumenvasen (Taplin et al. 1973) nachgewiesen. Darüber hinaus ist eine Besiedelung von Intubationsschläuchen, Blasen- und Venenkathetern möglich (Donlan 2001). Insbesondere nosokomiale Infektionen mit *P. aeruginosa* sind daher keine Seltenheit. Das Bakterium gehört zu den fünf häufigsten Erregern nosokomialer Infektionen in Europa (ECDC 2013).

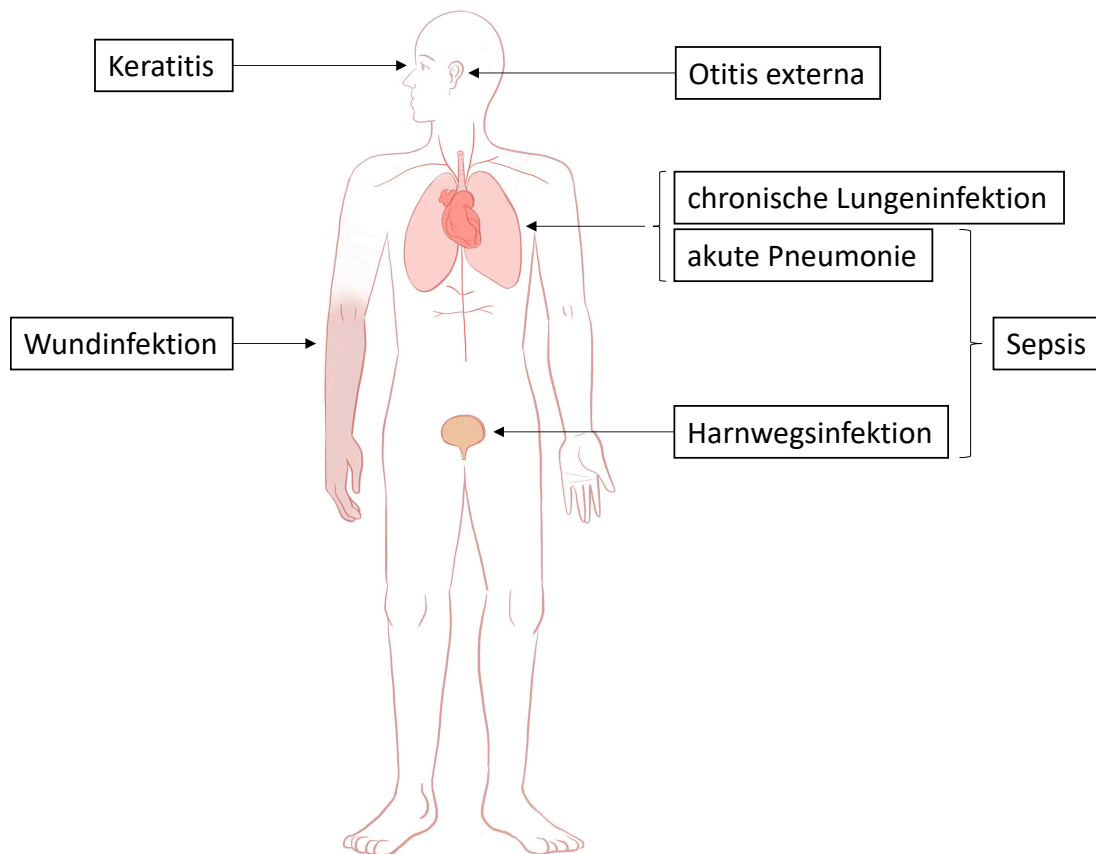
Bei Infektionen mit *P. aeruginosa* wird zum einen zwischen ambulant und nosokomial erworbenen sowie zwischen akuten und chronischen Infektionen unterschieden. Einen Kurzüberblick zu häufigen Infektionsfoki bietet *Abbildung 1*. Die Otitis externa, im Englischen „swimmer’s ear“, ist die Entzündung des äußeren Gehörkanals. Sie steht meist im Zusammenhang mit kontaminiertem Schwimmbadwasser, wobei *P. aeruginosa* typischerweise das auslösende Pathogen darstellt. Die Otitis externa steht für eine ambulante, akute, aber fast immer benigne verlaufende *P. aeruginosa*-Infektion (Ninkovic et al. 2008; Rene et al. 1990). Dahingegen können Infektionen des Auges schnell zur Erblindung führen, insbesondere Kontaktlinsenträger sind gefährdet. Wird die Linse zu lange getragen, kommt es zu Läsionen im Korneaepithel, die eine Adhäsion von *P. aeruginosa* erleichtern (Ramphal et al. 1981). Das Bakterium gehört zu den wichtigsten Erregern bakterieller Keratitiden (Nagachandrika et al. 2011).

Als opportunistischer Erreger, der in erster Linie immunkompromittierte Patienten betrifft, spielen nosokomiale Infektionen aber eine hervorgehobene Rolle (Hattemer et al. 2013; ECDC 2013). Normalerweise bietet das Epithel der Haut einen wirksamen Schutz vor Infektionen. Diese Schutzschicht ist insbesondere bei Verbrennungsoptionen jedoch nicht mehr vorhanden und *P. aeruginosa* kann die geschwächte Abwehrlage des Körpers ausnutzen (Church et al. 2006). Das Bakterium ist einer der häufigsten Infektionserreger in diesem Patientenkollektiv (Estahbanati et al. 2002). *P. aeruginosa* präsentiert sich daneben als Erreger nosokomialer Harnwegsinfekte. Wichtigster Risikofaktor, neben operativen Eingriffen, ist die Anlage eines Blasenkatheters. Zum einen kann *P. aeruginosa* darauf Biofilme bilden, zum anderen wird beim Einführen des Katheters das Schleimhautepithel verletzt. Dies begünstigt wiederum eine bakterielle Kolonisierung (Donlan 2001; Mittal et al. 2009). Nicht zuletzt können durch *P. aeruginosa* akute, nosokomiale Pneumonien ausgelöst werden. Besonders gefährdet sind künstlich beatmete Patienten. Die Bakterien können ebenso auf Beatmungsgeräten Biofilme ausbilden und leicht an der Schleimhaut adhären, die hier beim Einführen des Tubus unvermeidlich verletzt wird (Donlan 2001). Pneumonien in diesem Patientenkollektiv sind mit einer Mortalität von bis zu 30 % assoziiert (Williams et al. 2010). Akute Pneumonien, Harnwegs- und Wundinfektionen können darüber hinaus in eine Sepsis münden (ECDC 2015). Diese stellt eine gefürchtete Komplikation in den zumeist schwerkranken, oft auch immunsupprimierten Patienten dar (Bodey et al. 1985; Kang et al. 2003). In einer Studie des European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) erlitten 3 % der Intensivpatienten eine Sepsis; in 8,2 % der Fälle war *P. aeruginosa* das auslösende Pathogen (ECDC 2015). Das Risiko, an einer solchen *P. aeruginosa*-Sepsis zu versterben, ist sehr hoch und beträgt ca. 40 % (McCarthy et al. 2017; Kang et al. 2003; Willmann, Kuebart, Marschal, et al. 2013).

Neben den akuten Geschehen kann insbesondere die Lunge Ort einer chronischen Infektion durch *P. aeruginosa* werden. Dies betrifft vor allem Patienten mit zystischer Fibrose (CF). Das visköse Sekret, die eingeschränkte mukoziliäre Clearance und die verminderte Ventilation der Lungenabschnitte begünstigen die Besiedelung durch das Bakterium (Koch et al. 1993; Worlitzsch et al. 2002). Aber



auch Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) und Bronchiektasien stellen ein gefährdetes Kollektiv dar. Bei ihnen ist ebenfalls die mukoziliäre Clearance sowie die Ventilation der überblähten Lungenabschnitte vermindert (Martinez-Solano et al. 2008). Die chronische Lungeninfektion geht mit einer stetigen Verschlechterung der Organfunktion und einer erhöhten Mortalität einher (Nixon et al. 2001). Therapeutisch besonders problematisch ist die Fähigkeit des Erregers Biofilme zu bilden. Die Bakterien im Biofilm sind weniger empfindlich gegenüber Antibiotika, was eine vollständige Eradizierung erschwert oder gar unmöglich machen kann (Hoiby et al. 2011; Doring et al. 2000).



**Abbildung 1 Überblick zur klinischen Ausprägung von *P. aeruginosa*-Infektionen.**

Nachgewiesen werden *P. aeruginosa*-Infektionen routinemäßig mittels Kultur aus Blut, Lungensekret, Urin oder Wundabstrich (Marre 2000). Kolonien wachsen auf den üblichen Nährböden wie beispielsweise Schafblut oder Selektivnährmedien wie Cetrimid. Typischerweise verströmen sie einen lindenblütenartigen Geruch und bilden ein grünliches Pigment. Der Oxidasetest ist positiv (Murray 1999; Lowbury et al. 1955).

### **1.1.2 Genom und Regulationsmechanismen**

Die Anpassungsfähigkeit des Bakteriums spiegelt sich in dessen Erbinformation wider. Diese ist im Vergleich zu anderen Bakterienspezies ausgesprochen groß. Das Genom von PAO1 kodiert beispielsweise für etwa 5570 Proteine (Stover et al. 2000). Zum Vergleich: Bei einer Genomsequenzierung von *Escherichia coli* (*E. coli*) wurden 4288 proteinkodierende Gene gefunden (Blattner et al. 1997). Dabei gehört *E. coli* bereits ebenfalls zu den Bakterienspezies mit vergleichsweise großem Genom.

Generell werden die Begriffe Pangenom, Kerngenom und akzessorisches Genom voneinander abgegrenzt. Unter dem Begriff Pangenom von *P. aeruginosa* versteht man die Summe aller Gene, die in der Spezies gefunden wurden. Das Pangenom kann unterteilt werden in ein Kerngenom, welches allen Isolaten gemein ist und in ein akzessorisches Genom, welches nur von einigen Stämmen geteilt wird (Tettelin et al. 2005). Mosquera-Rendon et al. (2016) haben in ihrer Studie 181 *P. aeruginosa*-Genome analysiert. Das Pangenom hatte eine Größe von 16.820 Genen, das Kerngenom umfasste 2.503 Gene. Das durchschnittliche Genom eines Isolats wies 6.175 Gene auf. Im Rahmen der VARPA-Studie, in welche diese Arbeit eingebettet ist (nähere Erläuterung unter »1.3 Die VARPA-Studie«), wurden 166 Isolate analysiert. Deren Pangenom umfasste 23.917 Gene, 4.354 davon bildeten das Kerngenom. Ca. 10 % der Gene eines jeden Isolats kodierten für Regulatorproteine wie beispielsweise Helikasen (Willmann M., persönliche Mitteilung). Ein Anteil von 10 % ist im Vergleich zu anderen Bakterienspezies sehr hoch, leistet aber einen wichtigen Beitrag zur Anpassungsfähigkeit an unterschiedliche Umweltbedingungen (Stover et al. 2000; Wolfgang et al. 2003). Bemerkenswert ist außerdem, dass ein Großteil des

Pangenoms akzessorischer Art ist und nur ein kleiner Teil das Kerngenom bildet. Das bedeutet, dass zwischen einzelnen Isolaten wesentliche genetische und damit potenziell phänotypische Unterschiede bestehen können.

Die große Zahl an Regulatorproteinen ermöglicht die kontrollierte Regulation der Genexpression. So kann sich das Bakterium über das An- und Abschalten bestimmter Gene an die jeweiligen Gegebenheiten adaptieren. Diese Regulatoren kann man u.a. zwei verschiedenen Gruppen zuordnen: Den Zweikomponentensystemen und den Quorum-sensing-Mechanismen. Zweikomponentensysteme bestehen aus einer membrangebundenen Sensorkinase, die einen extrazellulären Stimulus detektieren kann, und einem Regulatorprotein, das von der aktivierten Sensorkinase phosphoryliert und damit ebenfalls aktiviert wird. Das aktivierte Regulatorprotein kann nun beispielsweise Einfluss auf die Genexpression nehmen oder auch enzymatische Wirkung entfalten (Stock et al. 2000).

Quorum-sensing-Mechanismen dienen dagegen nicht der Anpassung eines einzelnen Bakteriums, sondern ermöglichen die koordinierte Aktivität der gesamten Population. Quorum-sensing ist ein Instrument der Bakterien ihre Populationsgröße zu messen und entsprechend dieser ihr Verhalten als Gesamtpopulation zu verändern. Dazu produziert jedes Bakterium Autoinduktoren. Je höher die Bakteriendichte, desto höher ist die Konzentration dieser Signalmoleküle. Erreicht die Konzentration einen Schwellenwert, dann wirken sich die Autoinduktoren auf die Transkription von Genen aus. Bestimmte Gene werden also erst abgelesen, wenn die Erregerpopulation eine gewisse Größe erreicht hat. Insgesamt wurden bisher drei Systeme beschrieben, las, rhl und pqs, die auch untereinander verflochten sind (de Kievit et al. 2000; Winzer et al. 2001).

### **1.1.3 Virulenzfaktoren**

Bevor auf spezifische Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* näher eingegangen wird, sollen kurz einige Begrifflichkeiten in diesem Zusammenhang erläutert werden. Häufig miteinander synonym verwendet werden die Bezeichnungen Pathogenität und Virulenz. Genau genommen beschreibt die Pathogenität jedoch die generelle Fähigkeit eines Mikroorganismus im Wirt Schaden und Krankheit hervorzurufen.

Hingegen ist die Virulenz als relatives Maß der Pathogenität zu verstehen. Wie virulent ein Erreger nun ist, also in welchem Maße er einem Wirt Schaden zufügen kann, hängt von verschiedenen Faktoren ab: U. a. von der Erregeranzahl, dem Infektionsweg, dem Immunstatus des Wirts und an den Virulenzfaktoren des Erregers. Als solche werden Komponenten und Stoffwechselprodukte des Erregers bezeichnet, die ihm die Fähigkeit vermitteln in den Wirt einzudringen, sich in ihm zu vermehren, seinen Abwehrkräften standzuhalten und ihn zu schädigen; kurzgefasst, Krankheit auszulösen. Grob und oft nicht eindeutig lassen sich Virulenzfaktoren diesen Mechanismen entsprechend folgenden Kategorien zuordnen: Faktoren zur Adhäsion an die Wirtszelle, zur Invasion, zur Immunevasion sowie Endotoxine, Exotoxine und Siderophore. Letztere dienen der Eisenakquirierung (Peterson 1996; Smith 1977). Auf chromosomaler Ebene sind normalerweise mehrere Gene für die Ausprägung eines Virulenzfaktors verantwortlich. Diese Gene können u.a. zu einem Operon gehören oder eine Pathogenitätsinsel bilden, die im Ganzen auf andere Bakterien übertragbar sein kann. Gerade bei *P. aeruginosa* scheint der horizontale Transfer eine wichtige Rolle beim Erwerb von Genen und damit bei der Anpassungsfähigkeit des Erregers zu spielen (Carter et al. 2010; Mathee et al. 2008).

Die Anzahl an Virulenzfaktoren, über die *P. aeruginosa* verfügt, ist sehr groß und ermöglicht ihm verschiedene Infektionsmodi. Zu den bekannten Faktoren gehören u. a. Exoproteasen, Exopolysaccharide und Oberflächenstrukturen wie Pili und Flagellen. Letztere sind an verschiedenen Phänotypen beteiligt. Im Rahmen einer Infektion erfolgt die Adhäsion der Bakterie an eine Wirtszelle im Wesentlichen über ihr Flagellum und Typ-4-Pili (Hahn 1997). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Typ-4-Pili den Bakterien als Konjugationsapparate dienen können und so den Austausch genetischer Informationen ermöglichen (Carter et al. 2010).

Flagellen und Typ-4-Pili spielen aber auch für die verschiedenen Motilitätsformen von *P. aeruginosa* eine entscheidende Rolle. Hierzu gehören Swimming, Swarming und Twitching. In flüssigen Medien ist *P. aeruginosa* in der Lage zu schwimmen. Angetrieben wird das Bakterium über eine Flagelle, die rotiert und so eine Vorwärtsbewegung ermöglicht (Kearns 2010). Twitching und Swarming befähigen *P. aeruginosa* dazu, sich über Oberflächen zu bewegen. Beim Twitching werden Typ-4-Pili verlängert, die sich dann an der Oberfläche festsetzen und schließlich

retrahiert werden. So zieht sich das Bakterium an den Pili entlang nach vorne. Reguliert wird diese Form der Motilität u. a. durch Zweikomponentensysteme, die auf die Transkription der Pilusgene Einfluss nehmen. Es gibt zwar einige bekannte Regulationssysteme, allerdings sind die Signale, auf die sie reagieren, meist noch unbekannt. Physikalische Eigenschaften der Oberfläche (z.B. die Viskosität) sowie chemische Umgebungssignale (z. B. die Eisenkonzentration) spielen aber eine wichtige Rolle (Burrows 2012). Das Swarming, bei dem Flagellen und Pili ebenfalls involviert sind, wird mit akuten Infektionen assoziiert. Der Phänotyp ist komplex, da sich die Bakterien als Gemeinschaft und nicht individuell fortbewegen. Dementsprechend spielen hier Quorum-sensing-Systeme eine wichtige Rolle, denen viele weitere für den Phänotyp notwendige Stoffwechselwege unterworfen sind. Als Beispiel sei die Surfactant-Produktion erwähnt, um die Oberflächenspannung zu senken (Kearns 2010). Außerdem konnte beobachtet werden, dass während des Swarmings die Expression weiterer Virulenzfaktoren, darunter Exotoxine und Siderophore, hochreguliert wird (Overhage et al. 2008).

Viele *P. aeruginosa*-Stämme sind in der Lage Biofilme zu bilden. Dieser Virulenzfaktor spielt bei der chronischen Lungeninfektion, beispielsweise im CF-Patienten, eine wichtige Rolle (Costerton et al. 1999). Biofilme sind definiert als sessile bakterielle Gemeinschaft. Zuerst adhären die Bakterien mittels Pili und Flagellen, formen im nächsten Schritt Mikrokolonien und beginnen, eine Matrix um sich herum zu produzieren (Davey et al. 2000). Meist sind die Exopolysaccharide Alginate, Pel und Psl sowie Proteine und DNA Bestandteile dieser Matrix (Ryder et al. 2007). Erreger, die einmal in einem solchen Biofilm organisiert sind, erweisen sich als äußerst unempfindlich gegenüber Antibiotika und dem Immunsystem (Donlan et al. 2002). Der Wechsel vom planktonischen zum sessilen Wachstum ist ein streng regulierter Prozess, der mit vielen Anpassungsvorgängen einhergeht. Hier sind beispielsweise Zweikomponentensysteme wie die Sensorkinase GacS involviert. Diese erhöht u. a. die Expression von Genen der Exopolysaccharid-Synthese. Gleichzeitig aber wird das, in akuten Infektionen wichtige, Typ-3-Sekretionssystem herunterreguliert (Lapouge et al. 2008; Wei et al. 2013).

In akuten Infektionen spielt Biofilmbildung eine untergeordnete Rolle. Kennzeichnend ist hier die verstärkte Expression zytotoxischer Virulenzfaktoren

(Mikkelsen et al. 2011). Das bereits erwähnte Typ-3-Sekretionssystem spielt dabei eine wichtige Rolle. Dieses ist ein nadelförmiger Komplex aus mehreren Proteinen, mit dem *P. aeruginosa* in der Lage ist, Toxine direkt in die Wirtszelle zu injizieren. Seine Expression wird mit akuten und invasiven Infektionen in Verbindung gebracht (Hauser 2009). Vier toxische Effektorproteine wurden bisher beschrieben: ExoS, ExoU, ExoT und ExoY. ExoS besitzt die Fähigkeit Wirts-GTPasen zu aktivieren und wirkt zusätzlich als ADP-Ribosyltransferase. Über diese Domänen entfaltet ExoS seine zytotoxische und antiphagozytische Wirkung. Einer der Mechanismen beruht auf der Zerstörung des Aktingerüsts der Wirtszelle. Die Zelle rundet sich daraufhin ab und verliert den Kontakt zu den Nachbarzellen (Frithz-Lindsten et al. 1997; Goehring et al. 1999; Hauser 2009; Kaufman et al. 2000). Unter der Wirkung von ExoT löst sich die Zelle aus der Extrazellulärmatrix und geht daraufhin in Apoptose, auch hier spielt eine Interaktion des Toxins mit dem Zytoskelett der Wirtszelle eine Rolle. ExoT kann darüber hinaus das intrinsische mitochondriale Apoptoseprogramm aktivieren (Wood, Goldufsky, and Shafikhani 2015; Wood, Goldufsky, Bello, et al. 2015). ExoU weist PhospholipaseA2-Aktivität auf. Diese löst Phospholipidmembranen auf und verursacht damit den nekrotischen Untergang der Zelle. Die akute Pneumonie und ExoU sind stark miteinander assoziiert, das Toxin führt zu einer schnelleren Schädigung des Lungengewebes (Finck-Barbancon et al. 1997; Schulert et al. 2003; Sato et al. 2003). In CF-Isolaten ist ExoU dagegen nur selten nachzuweisen (Dacheux et al. 2000; Feltman et al. 2001). ExoY ist eine Adenylatcyclase und erhöht dementsprechend die cAMP-Konzentration in der Wirtszelle. Auch hier kommt es zu einer Störung des Aktingerüsts, außerdem wurde eine gesteigerte Durchlässigkeit des Endothels beobachtet (Sayner et al. 2004; Yahr et al. 1998).

Folgendes Modell zur Pathogenese des Typ-3-Sekretionssystems in der akuten Lungeninfektion wurde von Hauser (2009) vorgestellt: Das Typ-3-Sekretionssystem kann insbesondere gut an geschädigtes Epithel binden (Fleiszig et al. 1997; Tsang et al. 1994). ExoT vermag zudem die Wundheilung zu verlangsamen. ExoS und ExoU verzögern die erste Phase der Entzündungsreaktion, indem sie die proinflammatorische Aktivität der Gewebsmakrophagen unterbinden (Sutterwala et al. 2007). Auf der anderen Seite kann ExoU eine starke Entzündungsreaktion hervorrufen:

Durch die lipolytische Aktivität des Toxins wird Arachidonsäure freigesetzt, was zur Bildung von Prostaglandinen führt (Saliba et al. 2005). Im Zuge der aufflammenden Entzündung wird das Gewebe von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen infiltriert, die jedoch keine Eradizierung von *P. aeruginosa* erreichen. Stattdessen führt die Depletion an Entzündungszellen zu einer lokalisierten Immunsuppression (Ader et al. 2005; Diaz et al. 2008). Im Verlauf verschlechtert sich die Lungenfunktion: Es wird weniger Surfactant gebildet, die Alveolen füllen sich mit entzündlichem Exsudat (Ganter et al. 2009; Henderson et al. 2006), epitheliale und endotheliale Barrieren werden zerstört und Bakterien und Zytokine können ins Blut übertreten (Kurahashi et al. 1999).

*P. aeruginosa* besitzt viele weitere bekannte Virulenzfaktoren, darunter Proteasen, wie LasB und Protease IV. Diese können Elastin und Kollagen spalten, bieten aber auch Vorteile bei der Immunevasion, indem sie Zytokine, Komplementfaktoren und Immunglobuline spalten (Theander et al. 1988; Buret et al. 1993; Engel et al. 1998). Ein besonders augenfälliges Charakteristikum des Erregers ist die Bildung von Pigmenten, darunter Pyoverdin und Pyocyanin. Pyoverdin wird von *P. aeruginosa* u. a. als Siderophor benutzt. Siderophore akquirieren Eisen, das im Wirt normalerweise an Proteine wie Hämoglobin oder Transferrin gebunden vorliegt (Cornelissen et al. 1994; Meyer et al. 1996). Pyoverdin ist aber auch ein Signalmolekül, das die Expression von Exotoxin A fördert (Jimenez et al. 2012). Pyocyanin interferiert mit vielen Zellfunktionen, u. a. setzt es die Wirtszellen unter oxidativen Stress und stört die mitochondriale Atmungskette (Jimenez et al. 2012; Lau et al. 2004). In Versuchen an Koronararterien von Schweinen konnte zudem eine antagonistische Wirkung auf die Relaxation der Gefäßmuskulatur gezeigt werden (Hempnall et al. 2015).

Wie bereits in »1.1.2 Genom und Regulationsmechanismen« erwähnt, besteht eine große genetische Variabilität zwischen den verschiedenen Stämmen von *P. aeruginosa*. Demzufolge werden nicht alle Stämme die gleiche Ausstattung an Virulenzfaktoren vorweisen. Auf diese Weise können sich deutliche Unterschiede bezüglich der Virulenz ergeben.

#### 1.1.4 Antibiotikaresistenzen: Mechanismen und Auswirkungen

Charakteristisch für *P. aeruginosa* sind seine Antibiotikaresistenzen. Generell teilt man Resistenzen nach intrinsischen, erworbenen und adaptiven Mechanismen ein. Bei einer intrinsischen Resistenz ist die entsprechende genetische Information, beispielsweise für ein antibiotikaspaltendes Enzym, fester Bestandteil der Erbinformation des Erregers. Im Gegensatz dazu sind erworbene Resistenzen das Ergebnis einer Mutation oder eines genetischen Transfers. Zusätzliche genetische Informationen können über Konjugation, Transformation und Transduktion vom Bakterium aufgenommen werden. Die genetische Veränderung kann beispielsweise die Zielstruktur des Antibiotikums selbst oder einen Regulator betreffen (Breidenstein et al. 2011). Eine adaptive Resistenz geht hingegen mit einer Anpassungsreaktion auf die Umwelt einher. Diese Reaktion führt zu einer Antibiotikaresistenz, die verschwindet, sobald sich die Umweltbedingungen wieder ändern. Ein Beispiel hierfür wären Biofilme, die unter bestimmten Voraussetzungen produziert werden und die Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika verringern.

Wie bereits erwähnt, ist auch *P. aeruginosa* in der Lage, eine solche Exopolysaccharidmatrix zu produzieren und damit eine Penetrationsbarriere gegen das Therapeutikum aufzubauen (Breidenstein et al. 2011). Durch Mutationen in den Genen der Gyrase und Topoisomerase IV kann der Erreger Resistenzen gegenüber Flurchinolonen erwerben. Diese Mutationen bewirken eine derart veränderte Proteinstruktur, dass das Antibiotikum nicht mehr binden und folglich nicht mehr wirken kann (Lambert 2002; Nakano et al. 1997). Darüber hinaus spielen Effluxpumpen eine wesentliche Rolle. Über diese kann der Erreger Betalaktame, Tetracycline als auch Fluorchinolone wieder aus der Zelle herausschleusen (Li et al. 1995; Poole 2001). Drei solcher Pumpen wurden bisher in *P. aeruginosa* beschrieben (Kohler et al. 1997; Poole et al. 1996; Poole et al. 1993). Wird mindestens eine davon überexprimiert ist dies mit der Entstehung multiresistenter Bakterienstämme assoziiert (Poole 2001; Sadeghifard et al. 2012). AmpC ist ein Beispiel für eine Betalaktamase, die chromosomal fest in *P. aeruginosa* verankert ist. Sie ermöglicht die Spaltung von Penicillinen und Cephalosporinen (Lambert 2002). Neben AmpC kann *P. aeruginosa* aber noch weitere Betalaktamase-Gene erwerben, so etwa für



Metallobetalaktamsen, welche zusätzlich Carbapeneme spalten können (Walsh et al. 2005).

Aufgrund intrinsischer Mechanismen ist das Bakterium bereits gegenüber vielen Antibiotika unempfindlich. Zusätzlich wird jedoch ein Anstieg erworbener Resistenzen beobachtet: In einer europaweiten Studie von 2017 des ECDC waren 30,8 % der untersuchten *P. aeruginosa*-Isolate gegenüber mindestens einer der fünf pseudomonaswirksamen Antibiotikaklassen resistent. Zu diesen gehören Carbapeneme, Fluorchinolone, Aminoglykoside, Piperacillin + Tazobactam sowie Ceftazidim (ECDC 2018). Verantwortlich dafür wird u. a. der zunehmende Antibiotikaeinsatz gemacht, der durch Selektionsdruck die *de novo* Entstehung von Resistenzen fördert (Carmeli et al. 1999). Häufig davon betroffen sind CF-Patienten: Aufgrund der wiederholten Antibiotikatherapien können sich Resistenzen akkumulieren (Ogle et al. 1988). Ein anderer wichtiger Faktor ist die Verbreitung resistenter Keime von Patient zu Patient im Krankenhaus. Dieses Problem spielt vor allem auf Intensivstationen eine Rolle (Fridkin et al. 1999).

Diese Entwicklung hat Auswirkungen auf das Behandlungsergebnis der Patienten. Infektionen mit multiresistenten *P. aeruginosa*-Stämmen gehen mit erhöhter Morbidität und Mortalität einher (Aloush et al. 2006; Tam et al. 2010; Willmann, Kuebart, Marschal, et al. 2013). So muss u.a. wieder auf Therapeutika zurückgegriffen werden, die aufgrund ihres ungünstigen Nebenwirkungsprofils eigentlich nicht mehr verwendet werden. Dazu gehört beispielsweise das Polymyxin, welches nephro- und neurotoxische Nebenwirkungen haben kann (Falagas et al. 2006). Neue Strategien zur Bekämpfung von *P. aeruginosa* werden also dringend benötigt. Einige Ansätze zielen darauf ab, das Patientenkollektiv besser zu differenzieren. So scheinen neutropenische Patienten mit einer *P. aeruginosa*-Sepsis von der gleichzeitigen Therapie mit zwei Antibiotika zu profitieren. So wäre die höhere Toxizität des Therapieschemas zu rechtfertigen (Kim et al. 2014; Safdar et al. 2004). Darüber hinaus gibt es Bemühungen Vakzine gegen Virulenzfaktoren, wie z.B. gegen Elastasen oder Flagellen zu entwickeln. Hiervon könnten insbesondere Risikogruppen wie CF-Patienten profitieren (Matsumoto et al. 1998; Doring et al. 2007). Ein anderer Ansatz wird bei der Forschung an Quorum-sensing-Blockern

verfolgt, die die Kommunikation zwischen den Bakterien stören sollen (O'Loughlin et al. 2013).

## 1.2 Sepsis

### 1.2.1 Epidemiologie und pathophysiologisches Verständnis

Gelingt es dem Immunsystem nicht eine Infektion wirksam einzudämmen, kann sich konsekutiv eine Sepsis entwickeln. Die Sepsis ist definiert als fehlregulierte Reaktion des Wirtsorganismus auf einen Infektionserreger, die mit einer lebensbedrohlichen Organdysfunktion einhergeht (Singer et al. 2016). Die von Angus et al. (2001) vorgelegte epidemiologische Studie zur schweren Sepsis bezifferte die Inzidenz in den USA auf ca. 3 Fälle pro 1000 Einwohner. Die Mortalitätsrate betrug knapp 30 %. Paradoxerweise steigt mit der besser werdenden medizinischen Versorgung auch die Inzidenz der Sepsis an. Es gibt immer mehr kritisch kranke und immun-kompromittierte Patienten (Chemotherapie, Immunsuppression, HIV, Alter): Ein wachsendes Kollektiv, das besonders anfällig für schwere Infektionen ist. So steht auch auf Intensivstationen die Sepsis bei den Todesursachen an erster Stelle (Kumar et al. 2015). Nach Zahlen des ECDC von 2014 erleiden in Europa ca. 3 % der Intensivpatienten eine Sepsis. Zu den wichtigsten Erregern gehörten Koagulase-negative-Staphylokokken (22,3 %), Enterokokken (12,5 %), *Staphylococcus aureus* (10,1 %) und Klebsiellen (8,9 %). Aber auch *P. aeruginosa* gehörte mit 8,2 % zu den fünf häufigsten Sepsiserregern (ECDC 2015), wobei hier die Mortalitätsraten mit ca. 40 % besonders hoch sind (McCarthy et al. 2017; Kang et al. 2003; Willmann, Kuebart, Marschal, et al. 2013).

Das aktuell gängige pathophysiologische Verständnis der Sepsis fokussiert sich – der Definition entsprechend – auf die schädigende Wirkung des Immunsystems. Einige Vorgänge auf molekularer, zellulärer und Organ-, bzw. systemischer Ebene sollen im Folgenden auszugsweise vorgestellt werden. Am Beginn steht auf molekularer Ebene die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine. Diese Botenstoffe werden von der unspezifischen Immunabwehr auf Kontakt mit einem Erreger hin sezerniert: Bestimmte Komponenten des Erregers, sog. pathogen associated molecular patterns (PAMPs), z.B. Lipopolysaccharide, werden über Toll-like-Rezeptoren der

Abwehrzellen erkannt und aktivieren diese. Wichtige Vertreter unter den nun produzierten Zytokinen sind Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und die Interleukine 1 und 6 (Takeuchi et al. 2010). Die Zytokine setzen viele lokale und systemische Entzündungsprozesse in Gang. U. a. wird ein prokoagulatorischer Zustand über die Aktivierung neutrophiler Granulozyten, Monozyten, Thrombozyten und Endothelzellen geschaffen. In den entstehenden Immunthrombi sollen die Erreger festgehalten und den phagozytierenden Zellen vorgesetzt werden (Engelmann et al. 2013). Aktivierte Abwehrzellen produzieren daneben reaktive Sauerstoffspezies. Diese sollen die Erreger abtöten, treffen aber auch Proteine, DNA und Mitochondrien der Wirtszellen. Dies kann für eine Zelle den Untergang bedeuten. Es scheint jedoch auch die Möglichkeit zu bestehen, dass die Zelle in eine Art Ruhemodus eintritt. Sind die Mitochondrien geschädigt, herrscht ein Mangel an ATP. Um einer tödlich niedrigen ATP-Konzentration zu entgehen, fährt die Zelle ihren Stoffwechsel so weit wie möglich herunter. Ihrer spezialisierten Funktion kann die Zelle in diesem Zustand aber nur noch eingeschränkt nachkommen (Brealey et al. 2002). Weitere wichtige Veränderungen auf Zellebene spielen sich an Endothel und Epithel ab. Der Gefäßtonus sinkt und es kommt zur Vasodilatation. Außerdem kann im Verlauf die Barrierefunktion oft nicht mehr aufrechterhalten werden (Aird 2003). Die Auswirkungen, die diese Vorgänge auf Organ- und systemischer Ebene haben, deuten sich bereits an. Die ausgedehnte Bildung der Immunthrombi kann in eine disseminierte intravasale Koagulation (DIC) ausufern (Engelmann et al. 2013). Selbst wenn Zellen nicht direkt untergehen, sondern lediglich ihren Stoffwechsel zurückfahren, nimmt die Leistungsfähigkeit der entsprechenden Organe ab. Davon kann beispielsweise die Niere in Form eines akuten Nierenversagens betroffen sein (Alobaidi et al. 2015). Aber auch die Funktion der Herzmuskulatur ist eingeschränkt (Parker et al. 1984). In Kombination mit einer systemischen Vasodilatation sinken der Blutdruck und damit die Durchblutung aller Körperorgane. In der Lunge sammelt sich darüber hinaus austretende Flüssigkeit und behindert die Oxygenierung des Blutes (Matthay et al. 2012). Alle genannten Vorgänge wirken ineinander, aggravieren sich gegenseitig und führen letztlich zum Versagen der Organe und zum Tod.

### **1.2.2 Biomarker für Diagnostik und Prognose der Sepsis**

Im klinischen Kontext stellen sich stets zwei zentrale Fragen: Was hat der Patient? Und: Wie krank ist er? An dieser Beurteilung entscheidet sich u. a. welche Therapie gewählt wird, ob diese gegebenenfalls eskaliert werden muss oder ob anderweitige Maßnahmen ergriffen werden, wie z.B. die Isolierung eines Patienten. In diesem Prozess spielen Biomarker eine bedeutende Rolle.

Im Falle der Sepsis gestaltet sich die Diagnose oft als schwierig. Die klinische Symptomatik ist häufig unspezifisch und nicht von nichtinfektiösen Auslösern systemischer Entzündungsreaktionen zu unterscheiden. Die Sensitivität von Blutkulturen ist nicht besonders hoch und ein Ergebnis oft erst nach 24 Stunden zu erwarten (Lee et al. 2007). Gleichzeitig hängt jedoch von einer schnellen Diagnose und Therapiebeginn das Überleben des Patienten ab (Warren 1997). Die Diagnose wird meist aufgrund des klinischen Bildes in Zusammenschau mit den Laborergebnissen für die Leukozyten, das C-reaktive Protein (CRP) und Procalcitonin gestellt.

CRP und Procalcitonin sind die etablierten und routinemäßig eingesetzten Biomarker für Infektionen. Das CRP ist ein Akute-Phase-Protein, das von den Hepatozyten im Rahmen der Entzündungsreaktion synthetisiert wird. Prinzipiell handelt es sich um ein Opsonin, welches die spezifische Immunantwort stimuliert. Die Konzentration im Blut spiegelt zeitnah das Ausmaß an Gewebeschädigung wider und eignet sich besonders zur Verlaufskontrolle. Das CRP ist allerdings nicht sonderlich spezifisch, sondern steigt auch bei nicht erregerbedingten entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis an (Hof et al. 2014). Die Procalcitoninkonzentration im Blut reagiert dagegen spezifischer auf bakterielle Infektionen und soll insbesondere zwischen Sepsis und nicht infektiös bedingten Auslösern systemischer Entzündungsreaktionen differenzieren helfen. Während einer Infektion wird Procalcitonin nicht nur von den C-Zellen der Schilddrüse produziert, sondern insbesondere von Fett- und Leberzellen, sodass der Plasmaspiegel ansteigt (Linscheid et al. 2004). Dass jedoch auch Procalcitonin kein übermäßig zuverlässiger Biomarker zu sein scheint, legte eine Metaanalyse von Tang et al. (2007) nahe. Gleichwohl sind CRP und Procalcitonin bisher die einzigen etablierten

diagnostischen und prognostischen Biomarker, ungeachtet intensiver Suche nach Alternativen (Pierrakos et al. 2010).

Es wird auch in Zukunft keinen einzelnen Marker geben, der die Diagnose einer Sepsis erlaubt oder ausschließt. Die Diagnose und Prognose der Erkrankung wird weiterhin Ergebnis der Zusammenschau von Klinik und Labor bleiben. Doch neue Biomarker könnten zu einer Verfeinerung dieses Prozesses beitragen: Besonders gefährdete Patienten könnten genauer identifiziert werden. Besser differenzierte Patientenkollektive sind die Voraussetzung, um angepasste Therapieregime bzw. neue zielgerichtete Medikamente zu entwickeln. Ein Beispiel: Zu den zentralen Mechanismen der Entzündungsreaktion in der Sepsis gehört die Erkennung des Pathogens über Toll-like-Rezeptoren und die Freisetzung von TNF- $\alpha$ . So ist es nicht verwunderlich, dass u. a. Polymorphismen im Gen, das für den Toll-like-Rezeptor kodiert, wie auch des TNF- $\alpha$ -Gens gefunden wurden, die mit dem Behandlungsergebnis einer Sepsis korrelieren. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Polymorphismen die Empfindlichkeit des Rezeptors, bzw. die Zytokinkonzentration beeinflussen. Derartiges Wissen könnte in Zukunft zur Risikoeinschätzung eines Patienten mitherrangezogen werden und als Ansatzpunkt neuer Immuntherapien dienen (Thompson et al. 2014; Tang et al. 2000; Hotchkiss et al. 2003).

### **1.2.3 Der Erreger als Biomarker**

Bemerkenswerterweise bleibt der Infektionserreger selbst im gängigen pathophysiologischen Verständnis der Sepsis weitgehend unbeachtet. So konzentriert sich die Suche nach neuen Biomarkern hauptsächlich auf solche, die sich vom Wirtsorganismus her ableiten. Eine Charakterisierung der Sepsis basierend auf diesem Konzept muss aber unvollständig bleiben, denn es ignoriert die Heterogenität der Erreger (Lisboa et al. 2010). Selbst innerhalb einer Spezies wie der von *P. aeruginosa* ist die genetische Variabilität bereits enorm (»1.1.2 Genom und Regulationsmechanismen«). Offensichtlich ist eine Differenzierung des Erregers mit Resistenztestung wichtiger Bestandteil der Diagnostik, um eine wirksame Antibiotikatherapie wählen zu können. Aber Bakterien unterscheiden sich nicht nur bezüglich ihrer Resistenzmuster, sondern u.a. auch bezüglich ihrer Virulenzfaktoren

und somit in ihrer Pathogenese. Spezieszugehörigkeit und Virulenzfaktoren sind wichtige Einflussgrößen der Mortalität (Gao et al. 2008).

Neben dem Wirtsorganismus muss daher ebenfalls der Erreger in den Blick genommen werden: Es gilt relevante (Virulenz-)Faktoren zu identifizieren, um diese als diagnostische und prognostische Biomarker einsetzen zu können. Nicht zuletzt könnte dieses Wissen auch die Basis für die Entwicklung neuer Medikamente bilden, die zielgerichtet an der Pathogenese des Erregers ansetzen. Im Fall von *P. aeruginosa* sind zwar viele Virulenzfaktoren bekannt, deren Relevanz in der Sepsis aber noch ungeklärt. Einzig für das Typ-3-Sekretionssystem gibt es bereits *in vivo*-Erkenntnisse: So stehen die Expressionslevel der Proteine ExoS, ExoT und ExoU in Zusammenhang mit dem Behandlungsergebnis der Sepsis (El-Solh et al. 2012). Außerdem erhöht allein das Vorhandensein des *exoU*-Gens das Mortalitätsrisiko (Pena et al. 2015). Somit ließe sich dieses Gen bereits jetzt als neuer Biomarker in der *P. aeruginosa*-Sepsis in Betracht ziehen.

## **1.3 Die VARPA-Studie**

### **1.3.1 Methodik und für die vorliegende Arbeit relevante Ergebnisse**

Diese Arbeit ist Teil der VARPA-Studie (Virulence and Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*) unter der Leitung von Professor Dr. Matthias Willmann am Universitätsklinikum Tübingen. Wie zuvor erläutert, ist wenig über die klinisch relevanten Virulenzfaktoren der Sepsis bekannt. Dies gilt ganz allgemein und auch speziell für die *P. aeruginosa*-Sepsis. Ziel der Studie war es daher klinisch relevante, bakterielle Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* mit Einfluss auf die 30-Tage-Mortalität (primärer Endpunkt) zu identifizieren. Solche Faktoren hätten das Potenzial als neue prognostische Biomarker eingesetzt zu werden. Gegebenenfalls könnten diese auch als neue therapeutische Zielstrukturen dienen.

Dazu wurden 166 *P. aeruginosa*-Blutisolate von septischen Patienten gesammelt und mit diesen Genom- und Proteomanalysen durchgeführt. In der Zusammenschau der Genom- und Proteomdaten mit relevanten Patientenvariablen wurde dann nach Genen und Proteinexpressionswerten gesucht, die mit der 30-Tage-Mortalität der Patienten in Assoziation standen. Endpunkt der Studie war die Mortalität nach 30

Tagen. Für die statistische Analyse des Zusammenhangs zwischen Patientenvariablen und Genotyp des *P. aeruginosa*-Isolates und dem primären Endpunkt wurde eine mehrstufige Cox-Regression verwendet. Zu Beginn der Studie wurden die Gene des akzessorischen Genoms in einem Screeningmodell getestet. Dieses war bereits um Patientenfaktoren korrigiert. In diesem Modell zeigte sich für die Gene 1799 und 1866 ein erhöhtes Hazard-Ratio (HR). Gen 1866, das in der Studie den Namen *helP* (*helicase P*) erhielt, wurde mit einem HR von 3,21 assoziiert. Bei einem HR von 3,21 für *helP* ist das Risiko an der Sepsis zu versterben um das 3,21-Fache erhöht, wenn das Gen vorhanden ist, im Vergleich dazu, wenn es nicht vorhanden wäre. Für Gen 1799 ergab sich ein HR von 3,03 (Willmann M., persönliche Mitteilung).

Akzessorische Gene können gehäuft zusammen vorkommen, sodass es möglich ist, diese in sogenannten akzessorischen Genclustern (ACC-Cluster) zusammenzufassen. Die Studie konnte insgesamt vier ACC-Cluster identifizieren. Dabei war das ACC-Cluster 2 mit erhöhter Mortalität assoziiert (HR 1,95). Die nähere Analyse des ACC-Clusters 2 ergab, dass hier Gene, die für putative Histidinkinasen kodieren, überrepräsentiert sind (Willmann M., persönliche Mitteilung). Histidinkinasen spielen eine Rolle in Zweikomponentensystemen, die Wahrnehmung und Anpassung an Umweltbedingungen ermöglichen, indem sie auf die Transkription Einfluss nehmen können (Gooderham et al. 2009).

Diese Ergebnisse – erhöhtes HR für die Gene 1799, 1866 (*helP*) und das ACC-Cluster 2 – bildeten die Ausgangslage für die vorliegende Arbeit. In Kapitel »1.4 Zielsetzung dieser Arbeit« soll näher darauf eingegangen werden. In der VARPA-Studie wurden die Ergebnisse des Screeningmodells in einem darauf aufbauenden multivariaten Vorhersagemodel weiter getestet. Dabei konnte für das Gen 1799 keine signifikante Erhöhung des HR mehr gezeigt werden. *helP* jedoch war weiterhin mit einem erhöhten HR assoziiert (HR 2,01,  $p = 0,05$ ). Folglich wurden weitere Untersuchungen auf *helP* fokussiert (Willmann M., persönliche Mitteilung).

### 1.3.2 Das *helP*-Gen als prognostischer Biomarker: Was ist bereits bekannt?

*helP* kodiert für ein noch nicht charakterisiertes Protein. Die Aminosäuresequenz ist jedoch identisch zu einem Protein, PSPA7\_4493, das im *P. aeruginosa*-Stamm PA7 nachgewiesen wurde. Laut funktioneller UNIPROT-Prädiktion handelt es sich um eine putative DEAD/DEAH-Box-Helikase. Phylogenetisch konnte das Gen ebenfalls am ehesten den DEAD-Box-Helikasen zugeordnet werden (Willmann M., persönliche Mitteilung). Charakteristisch für diese Enzyme ist der hoch konservierte Helikasekern, der aus zwei Domänen besteht. Dieser beherbergt die Bindungsstellen für RNA oder DNA und ATP mit Helikase- und Hydrolaseaktivität. DEAD-Box-Helikasen nehmen in eukaryotischen, als auch in den meisten prokaryotischen Zellen eine wesentliche Rolle im RNA-Metabolismus ein (Cordin et al. 2006). Sie können nicht nur den Abbau der mRNA beeinflussen, sondern insbesondere die Translation. So wirken sie bei der Assemblierung der Ribosomen mit und fördern das Ablesen der mRNA, wahrscheinlich indem sie deren Sekundärstruktur verändern (Cordin et al. 2006; Intile et al. 2015; Py et al. 1996). Neben PSPA7\_4493 existiert ein weiteres Protein, RL063, das mit der Aminosäuresequenz von *helP* weitgehend übereinstimmt (98,3 %). RL063 wird von einem Gen auf der Pathogenitätsinsel I des *P. aeruginosa*-Stamms PA14 kodiert. Es besteht jedoch nicht nur eine Ähnlichkeit zwischen diesen beiden Genen auf Sequenzebene. Die genetische Umgebung von *helP* in den 22 *helP*-positiven Stämmen der VARPA-Studie ähnelt stark der Pathogenitätsinsel I von PA14. Insbesondere in den *helP* vorgeschalteten Bereichen ist diese gut konserviert. Hier befindet sich ein Gencluster, welches ein Typ-4-Pilus-System kodiert. Dieses wurde bereits als Konjugationsapparat beschrieben und ist in der Lage, die Pathogenitätsinsel I in andere *P. aeruginosa*-Stämme zu übertragen (Carter et al. 2010).

Von den 166 untersuchten Isolaten erwiesen sich 22 als *helP*-positiv. Eine phylogenetische Untersuchung ergab, dass das Gen weitgehend unabhängig von den genetischen Verwandtschaftsverhältnissen über die Isolate verteilt ist. In Stämmen, die das Hochrisiko-ACC-Cluster 2 tragen, kommt *helP* mit 27,27 % jedoch häufiger vor als in den anderen ACC-Clustern (9,77 %). Die genetische Nähe von *helP* zu einem Typ-4-Pilus-System sowie die von genetischen Verwandtschaftsverhältnissen unabhängige Verteilung über die 166 Isolate hinweg, lässt die Vermutung zu, dass



das Gen über horizontalen Gentransfer erworben wurde, bzw. gegebenenfalls weiterhin übertragbar ist.

In einem *Galleria mellonella*-Infektionsmodell war *helP* mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko assoziiert (HR 1,62). Wurde *helP* zudem in einen wenig virulenten *helP*-negativen Stamm eingebracht, erhöhte sich das Mortalitätsrisiko im Infektionsmodell mit dieser nun *helP*-positiven Mutante um das 12-Fache. Dies lässt wiederum darauf schließen, dass *helP* mehr darstellt als nur einen Surrogatparameter.

Gen 1799 kodiert für ein unbekanntes, hypothetisches Protein. Weitere Informationen zu diesem Gen sind nicht bekannt.

Bezüglich der Gene 1799 und *helP* und des ACC-Clusters 2 konnten unter den 166 untersuchten Isolaten zwei identifiziert werden, die sich als Gegenstücke gegenüberstehen: ID50 wt trägt sowohl das Gen 1799 und *helP* sowie das ACC-Cluster 2. ID173 wt trägt weder die beiden Gene, noch das ACC-Cluster 2. Berücksichtigt man außerdem das Behandlungsergebnis, kann ID50 wt als das virulentere Isolat angesehen werden (Willmann M., persönliche Mitteilung).

## 1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Insbesondere die durch *P. aeruginosa* ausgelöste Sepsis ist mit einer hohen Mortalität assoziiert. Die Wechselwirkungen in der akuten Infektion zwischen diesem Erreger und dem Wirtsorganismus sind aber bisher weitestgehend unbekannt. Welche Rolle die genetische Ausstattung von *P. aeruginosa* spielt, war Gegenstand einer vorangegangenen Studie, in der die Genome verschiedener *P. aeruginosa*-Blutisolate von Sepsispatienten sequenziert worden waren. Das Vorhandensein der Gene 1799 und 1866 (*helP*) konnte dabei jeweils mit erhöhter Mortalität assoziiert werden. Die Funktion der Gene ist allerdings unbekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, die statistischen Ergebnisse der genetischen Untersuchung mit phänotypischen Unterschieden in Verbindung zu bringen:

- Wie unterscheidet sich ein Isolat mit mortalitätsassoziierten Faktoren hinsichtlich potenziell infektiöser Virulenzfaktoren von einem Isolat ohne mortalitätsassoziierte Faktoren?
- Ergeben sich insbesondere Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Vermehrungsfähigkeit und Virulenz?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen den mortalitätsassoziierten Genen 1799 und *helP* und der Vermehrungsfähigkeit, bzw. einem anderen Virulenzfaktor?

Für diese Arbeit sollten daher erstmalig zwei klinische *P. aeruginosa*-Blutisolate, mit wahrscheinlich unterschiedlicher Virulenz, miteinander verglichen werden. Dazu ausgewählt wurde das Isolat ID50 wt, welches die mortalitätsassoziierten Gene 1799 und *helP* trägt und dessen Infektion einen letalen Ausgang nahm. Daneben das Isolat ID173 wt, welches keines der beiden Gene trägt und dessen Infektion bis zum Ende des Beobachtungszeitraums nicht tödlich verlief. Darüber hinaus sollte die Bedeutung der zwei Gene näher zu beleuchtet werden, indem das ID50-Wildtypisolat mit seiner Deletionsmutante des jeweiligen Gens verglichen wurde.

Zur Charakterisierung der Isolate und Mutanten wurden vergleichende *in vitro*-Analysen durchgeführt. Untersucht wurde das Wachstum in verschiedenen Nährmedien, unter unterschiedlichen Temperatur- und pH-Bedingungen, und in Schafblut. Im Anschluss daran wurden die Virulenzeigenschaften Biofilmbildung, Swimming, Swarming, Hämolyse und Zytotoxizität geprüft

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Materialien

96-Well-Platten aus Polystyrol, steril (Nunc, Wiesbaden)  
96-Zapfenplatten aus Polystyrol, steril (Nunc, Wiesbaden)  
6-Well-Platten aus Polystyrol, steril (Greiner Bio-One, Frickenhausen)  
Blutagarplatten Columbia agar with sheep blood (Oxoid, Basingstoke, UK)  
Fotokamera iPhone5s (Apple, Cupertino, USA)  
Gene Frame-Abdichtungen (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)  
Inkubatoren: MaxQ4450 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)  
HT AK82 (Infors, Bottmingen, Schweiz)  
HAT Minitron (Infors, Bottmingen, Schweiz)  
Kulturröhrchen 14 ml aus Polystyrol, steril (Corning Science, Reynosa, Tamaulipas, Mexiko)  
Mikroskop DMRE (Leica, Wetzlar)  
Mikroskop Eclipse TS100 (Nikon, Alzenau)  
pH-Meter pH526 (WTW, Weilheim)  
Photometer Biophotometer D30 (Eppendorf, Hamburg)  
GraphPad Prism 7.03 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)  
Sterilbank Herasafe KS18 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)  
Sterilfilter Acrodisc Syringe Filters 0,2 µm Porengröße (Pall Corporation, Ann Arbor, MI, USA)  
Sterilfilter Acrodisc Syringe Filters 0,45 µm Porengröße (Pall Corporation, Ann Arbor, MI, USA)  
Zentrifuge Centrifuge 5415R (Eppendorf, Hamburg)  
Zentrifuge Centrifuge 5804 (Eppendorf, Hamburg)

### 2.2 Chemikalien und Reagenzien

Ampuwa (Fresenius Kabi, Bad Homburg)  
Bacto Agar (Becton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix, Frankreich)  
CaCl<sub>2</sub> (AppliChem, Darmstadt)  
CHAPS (Sigma-Aldrich, Steinheim)

D-(+)-Glukose (Merck, Darmstadt)  
Dulbecco's Modified Eagle Medium (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)  
EDTA (AppliChem, Darmstadt)  
Fetal Bovine Serum (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)  
HCl 1M (VWR, Fontenay-sous-Bois, Frankreich)  
IPTG BioChemica (AppliChem, Darmstadt)  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt)  
Luria Bertani Broth Base (Becton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix, Frankreich)  
MacConkey Agar No.2 (Oxoid, Basingstoke, UK)  
MgSO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, Steinheim)  
NaCl (Merck, Darmstadt)  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, Steinheim)  
NaOH 1M (Merck, Darmstadt)  
Natriumcitrat-Dihydrat (Carl Roth, Karlsruhe)  
Natriumpyruvat 100mM (Biochrom, Berlin)  
NH<sub>4</sub>Cl (AppliChem, Darmstadt)  
Nutrient Broth No.2 (Oxoid, Basingstoke, UK)  
PBS Dulbecco (Biochrom, Berlin)  
Poly-L-Lysin (Sigma, St. Louis, USA)  
Tetracyclin (Sigma-Aldrich, Steinheim)

### **2.3 Medien und Pufferlösungen**

#### *Luria Bertani (LB) Nährmedium*

25 g LB Broth Base in 1 l destilliertem Wasser lösen und autoklavieren.

#### *Phosphate buffered saline (PBS) (5x)*

85,05 g NaCl

14,23 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O

1,35 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

werden in 500 ml Aqua dest. gelöst, gemischt und autoklaviert.

Diese Stammlösung wird 1:20 mit Aqua dest. verdünnt und autoklaviert, um die einfach konzentrierte Gebrauchslösung zu erhalten.

#### *M9 Salts (5x)*

30 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

15 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

2,5 g NaCl

5 g NH<sub>4</sub>Cl

zu 1 l Aqua dest. hinzugeben, pH auf 7,4 einstellen und autoklavieren.

#### *M9-Minimalnährmedium*

20 ml M9 Salts (5x)

80 ml Aqua dest.

autoklavieren. Anschließend davon 2,21 ml entfernen und

200 µl MgSO<sub>4</sub> (1M) steril filtriert

10 µl CaCl<sub>2</sub> (0,1M) steril filtriert

2 ml Natriumcitrat (1M) steril filtriert

hinzugeben.

#### *Swarming-Agar*

3,2 g Nutrient Broth No.2

2 g Bacto-Agar

werden in 390 ml Ampuva gelöst und autoklaviert.

10 g D-(+)-Glucose in 50 ml Aqua dest. lösen und steril filtrieren.

Ist das Medium auf ca. 55 °C abgekühlt, werden 10 ml der Glukoselösung hinzugegeben.

### *Swimming-Agar*

2 g Bacto-Agar in 1 l LB-Medium lösen und autoklavieren.

### *Defibriniertes steriles Schafblut*

von ACILA, Mörfelden-Walldorf, Artikelnummer: 2101012, Chargennummer: 26526, Abfülldatum: 10.11.2016

### *0,2 M Phosphatpuffer nach Sørensen*

13,6 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  werden in 1 l LB-Medium gelöst (Lösung 1).

17,8 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  werden in 1 l LB-Medium gelöst (Lösung 2).

25 ml von Lösung 1 und 475 ml von Lösung 2 ergeben ein gepuffertes Nährmedium mit pH 8.

163 ml von Lösung 1 werden mit 350 ml von Lösung 2 gemischt und ergibt ein Puffermedium mit pH 7.

Für pH 5 werden von Lösung 1 500 ml und von Lösung 2 5 ml verwendet.

Der pH-Wert wird überprüft und mit HCl bzw. NaOH nachjustiert.

### *MacConkey-Agar*

51,5 g des MacConkey-Agars werden in 1 l destilliertem Wasser gelöst und autoklaviert.

## 2.4 Bakterienstämme

Für die Versuche wurden die folgenden *P. aeruginosa*-Stämme verwendet:

**Tabelle 1** Verwendete *P. aeruginosa*-Stämme.

<b>Stamm:</b>	<b>Beschreibung:</b>	<b>Herkunft:</b>
ID50 wt	Patientenisolat; isoliert aus Blutkultur, Infektionsfokus: Wunde; Gen 1799, <i>helP</i> , ACC-Cluster 2 positiv; „high-risk“	Mikrobiologische Diagnostik, Tübingen
ID50 $\Delta$ 1866-1	unmarkierte „in-frame“ Deletionsmutante, Kolonie 1	AG Schwarz
ID50 $\Delta$ 1866-2	unmarkierte „in-frame“ Deletionsmutante, Kolonie 2	AG Schwarz
ID50 $\Delta$ 1799	unmarkierte „in-frame“ Deletionsmutante	AG Schwarz
ID50 $\Delta$ 1866-1 / pME6032::1866	komplementierte Deletionsmutante	AG Schwarz
ID50 $\Delta$ 1866-2 / pME6032::1866	komplementierte Deletionsmutante	AG Schwarz
ID50 $\Delta$ 1866-2 / pME6032	Vektorkontrolle	AG Schwarz
ID173 wt	Patientenisolat; isoliert aus Blutkultur, Infektionsfokus: urogenital; Gen1799, <i>helP</i> , ACC-Cluster 2 negativ; „low-risk“	Mikrobiologische Diagnostik, Tübingen
PAO1	Laborstamm, ursprünglich Wundisolat	(Holloway 1955)

*P. aeruginosa* ID50 wt und ID173 wt wurden aus dem Blut von Patienten des Universitätsklinikums Tübingen isoliert ID50 wt enthält in seinem Genom die Gene

1799 und *help* sowie das ACC-Cluster 2. Die Gene und das ACC-Cluster 2 wurden mit einem erhöhten HR assoziiert. ID173 wt hingegen trägt weder die beiden Gene noch das ACC-Cluster 2. Die Infektion mit ID50 wt nahm einen letalen Ausgang. Der Patient, der mit ID173 wt infiziert war, überlebte hingegen den Beobachtungszeitraum. Ausgehend davon könnte es sich bei ID50 wt um das virulentere Isolat von beiden handeln.

Der Laborstamm PAO1, der ursprünglich aus einer Wunde isoliert worden war, diente als Referenz und Positivkontrolle für die Motilitätsversuche Swimming und Swarming. Der Stamm ist sicher zu beiden Fortbewegungsformen in der Lage (Shrout et al. 2006).

Um die Funktion der Gene 1799 und *help* näher zu untersuchen, wurden unmarkierte „in-frame“ Deletionsmutanten aus Einzelkolonien von ID50 wt verwendet: ID50  $\Delta$ 1866-1, ID50  $\Delta$ 1866-2, ID50  $\Delta$ 1799. Für *help* waren zwei Deletionsmutanten hergestellt worden. Als Kontrollen für die Deletionsmutanten ID50  $\Delta$ 1866-1 und ID50  $\Delta$ 1866-2 wurden komplementierte Deletionsmutanten genutzt. In diesen, ID50  $\Delta$ 1866-1 / pME6032::1866, ID50  $\Delta$ 1866-2 / pME6032::1866, wurde das *help*-Gen vom Plasmid pME6032 exprimiert. Als Negativkontrolle diente eine weitere Mutante, die mit dem leeren Plasmid transformiert wurde: ID50  $\Delta$ 1866-2 / pME6032. Die verwendeten Deletionsmutanten und komplementierten Deletionsmutanten wurden von Mitarbeitern der AG Schwarz, Mikrobiologie Tübingen, hergestellt und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

## 2.5 Anzucht der Bakterien

Die Isolate lagen als Einfrierkultur vor und wurden für die Experimente in Kulturröhrchen mit 3 ml LB-Medium bei 37 °C und 200 rpm über Nacht im Inkubator angezüchtet. Am folgenden Tag wurde die optische Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) gemessen und mit den Übernackturen die Tagkulturen beimpft. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Kulturen auf eine Start- $OD_{600}$  von 0,05 eingestellt, dies entspricht einer Zelldichte von ca.  $5 \times 10^7$  koloniebildenden Einheiten pro Milliliter (CFU/ml).



## **2.6 Wachstumsversuche**

### **2.6.1 Wachstum in LB- und M9-Medium**

In 100-ml-Erlenmeyerkolben wurden je 15 ml LB- oder M9-Medium vorgelegt und die Ansätze mit der jeweiligen Übernachtskultur beimpft. Die Ansätze wurden bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Nach 3, 6 und 24 h wurden Proben entnommen und die OD<sub>600</sub> sowie die CFU bestimmt. Um die CFU zu bestimmen, wurden je 100 µl Proben entnommen und eine Verdünnungsreihe in PBS erstellt. Die verdünnten Proben wurden auf LB-Agarplatten ausplattiert und nach Inkubation der Platten die Anzahl der Kolonien ausgezählt.

Dieses Experiment wurde mit den Isolaten PAO1, ID50 wt, ID50 Δ1866-1, ID50 Δ1799, ID173 wt durchgeführt. Für jeden Stamm wurden drei Versuche in Duplikaten durchgeführt.

### **2.6.2 Wachstum bei pH 5, 7 und 8**

In 100-ml-Erlenmeyerkolben wurden je 15 ml LB-Medium mit Phosphatpuffer nach Sørensen mit pH 5, pH 7 oder pH 8 vorgelegt. Die Ansätze wurden mit den jeweiligen Übernachtskulturen beimpft und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Nach 3, 6 und 24 h wurde die OD<sub>600</sub> gemessen. Zur Kontrolle wurde nach 24 h zudem der pH-Wert in den Versuchsansätzen bestimmt.

Auch hier wurden drei Versuche in Duplikaten für die jeweiligen Stämme ID50 wt, ID50 Δ1866-1, ID50 Δ1799, ID173 wt und den jeweiligen pH-Wert durchgeführt.

### **2.6.3 Wachstum bei 27 °C, 37 °C und 40 °C**

In 100-ml-Erlenmeyerkolben wurden 15 ml LB-Medium vorgelegt. Die Ansätze wurden beimpft und im Inkubator bei 27 °C, 37 °C oder 40 °C und jeweils 200 rpm inkubiert. Nach 3, 6 und 24 h wurde die OD<sub>600</sub> gemessen.

Es wurden drei Versuche in Duplikaten für die Stämme ID50 wt, ID50 Δ1866-1, ID50 Δ1799, ID173 wt und die jeweilige Temperatur durchgeführt.

#### **2.6.4 Wachstum in defibriniertem Schafblut**

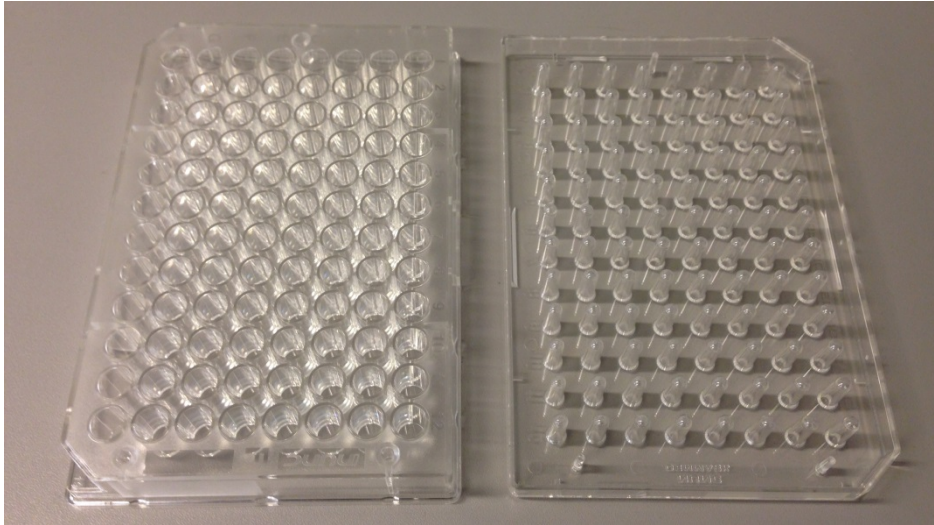
In ein Kulturröhrchen wurden 2 ml steriles und defibriniertes Schafblut vorgelegt. Die Versuchsansätze wurden beimpft und nach 3 und 6 h im Inkubator bei 37 °C und 200 rpm eine Probe entnommen und die CFU bestimmt.

Es wurden drei Versuche in Duplikaten mit den Stämmen PAO1, ID50 wt, ID50  $\Delta$ 1866-1, ID50  $\Delta$ 1799, ID173 wt durchgeführt.

#### **2.6.5 Biofilmbildung**

Der in diesem Experiment verwendete Zapfenplatten-Assay ist eine etablierte Methode, um Biofilmbildung zu untersuchen (Ceri et al. 1999). Je 200  $\mu$ l 0,1 %iges Poly-L-Lysin wurden in die benötigten Wells einer 96-Well-Platte (*Abb. 2*) gegeben. Eine Zapfenplatte (*Abb. 2*) wurde daraufgesetzt und 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Zapfen waren daraufhin mit Poly-L-Lysin beschichtet. Je 200  $\mu$ l Bakterien-suspension in LB-Medium (OD<sub>600</sub> 0,05) wurden in die Wells einer neuen 96-Well-Platte gegeben. Die mit Poly-L-Lysin beschichteten Zapfen wurden nun in die Wells mit der Suspension getaucht und bei 37 °C 24 h in einer Feuchtkammer (Metallbox mit feuchter Zellulose ausgelegt) inkubiert. Bakterien, die weiterhin planktonisch geblieben waren, sollten anschließend von den Zapfen abgewaschen werden. Hierzu wurde die Zapfenplatte auf eine Well-Platte gesetzt, die mit 200  $\mu$ l PBS-Medium je Well befüllt war und die Platten ca. 5 min bei 200 rpm geschüttelt. In eine weitere 96-Well-Platte wurden je 200  $\mu$ l einer Lösung aus 0,1 %igem EDTA und 0,1 % CHAPS in PBS gegeben. Die gewaschene Zapfenplatte wurde daraufgelegt und die beiden Platten bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Nach einer Stunde hatten sich die im Biofilm gewachsenen Bakterien von den Zapfen abgelöst. Die Zapfenplatte wurde abgenommen und die 200  $\mu$ l in den Wells in je ein Eppendorf-Cup überführt und gevortext. In diesen Proben wurde die CFU bestimmt.

Es wurden drei Versuche in Duplikaten mit den Stämmen ID50 wt, ID50  $\Delta$ 1866-1, ID50  $\Delta$ 1799, ID173 wt durchgeführt.



**Abbildung 2 Eine 96-Well- und eine 96-Zapfenplatte**

## **2.7 Motilität**

Die Motilitätsexperimente wurden nach Shrouf et al. (2006) durchgeführt. Statt Nutrient Broth CM0501 wurde Nutrient Broth No.2 von Oxoid verwendet.

### **2.7.1 „Swimming“**

Der 0,2 %ige Swimming-Agar wurde in der Mikrowelle erhitzt, bis er sich verflüssigt hatte. Der Agar wurde auf ca. 55 °C abgekühlt und je 25 ml in eine Petrischale pipettiert. Die Platten wurden eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Die Bakterien einer Übernachtskultur wurden in LB-Medium auf eine  $OD_{600}$  von 3,5 eingestellt. Mit einer Impfnadel wurde nun ca. 1  $\mu$ l konzentrierte Bakteriensuspension in die Mitte der Swimming-Agarplatten eingebracht.

Es wurden zwei unterschiedliche Experimente mit den Stämmen ID50 wt, ID50  $\Delta$ 1866-1, ID50  $\Delta$ 1799, ID173 wt und PAO1 durchgeführt. Im ersten Experiment wurden die Platten bei 37 °C für 6 h, beim zweiten bei 30 °C für 12 h bebrütet. Beide Experimente wurden dreimal in Duplikaten durchgeführt.

### **2.7.2 „Swarming“**

Nachdem der 0,5 %ige Swarming-Agar autoklaviert worden war, wurde der Agar auf 55 °C abgekühlt und die Glucoselösung zugegeben. Anschließend wurde der Swarming-Agar auf 50 °C abgekühlt. Davon wurden je 25 ml in Petrischalen pipettiert und die Platten eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Bakterien aus einer Übernachtskultur wurden auf eine OD<sub>600</sub> von 3,5 eingestellt. 5 µl dieser konzentrierten Bakteriensuspension wurden in die Mitte einer Swarming-Agarplatte aufgetropft und anschließend 15 min antrocknen gelassen. Die Platten wurden dann bei 37 °C für 24 h in den Brutschrank gestellt.

Abweichend zu Shrou et al. (2006) wurden die komplementierten Mutanten in einer Übernachtskultur mit Tetracyclin (125 µg/ml) herangezogen. Die Swarming-Agarplatten der komplementierten Mutanten enthielten kein Tetracyclin. Der Agar wurde jedoch für Mutanten, die das pME6032-Plasmid tragen, mit 0,1 mM IPTG versetzt, um die Expression zu erhöhen. Zum Vergleich wurden die pME6032-tragenden Mutanten zusätzlich auch auf den regulären Swarming-Agarplatten ohne IPTG aufgebracht.

Drei Experimente wurden durchgeführt: Das erste dreimal in Duplikaten mit ID50 wt, ID50 Δ1866-1, ID50 Δ1799, ID173 wt und PAO1. Das Zweite einmal in Duplikaten mit ID50 wt, ID50 Δ1866-1, ID50 Δ1866-1 / pME6032::1866 ohne IPTG, ID50 Δ1866-1 / pME6032::1866 mit IPTG und PAO1. Das Dritte wurde zweimal in Triplikaten mit ID50 wt, ID50 Δ1866-2, ID50 Δ1866-2 / pME6032::1866 ohne IPTG, ID50 Δ1866-2 / pME6032::1866 mit IPTG und PAO1 durchgeführt.

### **2.8 Hämolyseverhalten**

Mittels Dreiösenausstrich wurden die Bakterien direkt aus der Übernachtskultur auf Blutagarplatten aufgetragen. Die Platten wurden bei 37 °C bebrütet und nach 48 h dokumentiert.

## **2.9 Zellkultur und Zytotoxizitäts-Assay**

Für einen Zytotoxizitäts-Assay wurden humane Zellen mit den Bakterien infiziert. Es wurde die Zelllinie A549 in Passage 2 verwendet. Diese Zelllinie wurde ursprünglich aus einem humanen Alveolarzellkarzinom gewonnen. Die Zellen weisen aber weiterhin Eigenschaften differenzierter Lungenepithelzellen auf, sodass sie sich für den *in vitro*-Versuch eignen (Lieber et al. 1976).

Die A549-Zellen wurden in DMEM-Medium kultiviert, das mit 10 % fetalem Kälberserum und 1 mM Natriumpyruvat versetzt worden war. Je 500 µl davon wurden in die Wells einer 24-Well-Platte vorgelegt und anschließend je  $1 \times 10^5$  A549-Zellen aus der zweiten Passage zu jedem Well hinzugegeben. Die Zellen wurden über 48 h inkubiert, sodass sie eine 90 %ige Konfluenz erreichten. Aus LB-Übernachtskulturen wurden  $2 \times 10^6$  Bakterien zu jedem Well gegeben, dies entspricht 10 µl bei einer OD<sub>600</sub> von 0,2. Die Bakterien aus den Übernachtskulturen wurden zuvor abzentrifugiert und zwei Mal in PBS gewaschen. Die Well-Platte wurde anschließend bei 800 G für 5 min zentrifugiert, damit die Bakterien in Kontakt mit den Zellen kamen. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 3 h wurden die Wells unter dem Eclipse TS100 von Nikon mikroskopiert und dokumentiert.

## **2.10 Wachstum auf MacConkey-Agar**

Analog zum Hämolyseversuch (»2.8 Hämolyseverhalten«) wurden die Bakterien auf MacConkey-Agarplatten ausgestrichen. Nach 24 h im Brutschrank bei 37 °C wurden die Platten dokumentiert.

## **2.11 Lichtmikroskopie**

Eine Gene-Frame-Abdichtung (ein Silikonrahmen) wurde auf einen Objektträger geklebt und eine 1 %ige Agaroselösung in PBS hineingefüllt. Ein zweiter Objektträger wurde darübergelegt. Sobald der Agar getrocknet war, wurden der zweite Objektträger und der Silikonrahmen wieder entfernt. Der Agar wurde in kleine Rechtecke geschnitten.

Die Isolate PAO1, ID50 wt, ID50  $\Delta$ 1866-1, ID50  $\Delta$ 1799, ID173 wt wurden verwendet. Diese wurden aus der Einfrierkultur bei 37 °C und 200 rpm in LB-Medium bis in die log-Phase zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 angezüchtet. Dies entspricht einer Zelldichte von  $6 \times 10^8$  CFU/ml. Je 2  $\mu$ l der Bakteriensuspension eines Isolates wurden nun auf das Agarose-Pad getropft, trocknen gelassen und für die Aufnahme lichtmikroskopischer Bilder mit einem Deckglas abgedeckt. Hierfür wurde das DMRE-Mikroskop von Leica und ein 100x PH 3-Objektiv (NA: 1,4) verwendet.

## 2.12 Herstellung der Deletionsmutanten und deren Komplementierung

Die einfachen und komplementierten Deletionsmutanten wurden von Mitarbeitern der AG Schwarz hergestellt und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Herstellungsschritte sollen im Folgenden kurz dargelegt werden.

Um eine unmarkierte „in-frame“ Deletionsmutante für das *help*-Gen aus ID50 wt herzustellen, wurden zunächst die dem Gen vorgeschaltete und nachgeschaltete 600 Basenpaare große Region amplifiziert. Die Primer wurden so ausgewählt, dass die PCR-Produkte noch die ersten drei, bzw. die letzten drei Codons des Gens 1866 beinhalten sowie an diesen Enden eine zueinander komplementäre Region, um so die beiden Sequenzen fusionieren zu können (Splicing by Overlap PCR). Diese Sequenz wurde anschließend in den Suicide-Vektor pEXG2 eingebracht. Chemisch kompetente *E. coli* wurden mit pEXG2:: $\Delta$ 1866 transformiert. Im nächsten Schritt wurde der Vektor mittels Konjugation auf ID50 wt übertragen. Ein Gemisch aus *E. coli* und ID50 wt wurde auf Irgasan- und Gentamicin-haltigen LB-Platten ausgestrichen. *E. coli* wurde durch Irgasan, ID50 wt durch das Gentamicin abgetötet. Lediglich die Bakterien, die das Plasmid, welches zusätzlich eine Gentamicin-resistenz trägt, tatsächlich aufgenommen hatten, überlebten. Das Plasmid wurde per Crossover in das Genom des ID50 wt integriert. Durch Gegenselektion mit Saccharose wurden rekombinante Stämme, die das zunächst integrierte Plasmid wieder ausgeschleust hatten, selektiert. Dabei gibt es zwei Möglichkeiten für die Rekombination: Entweder entsteht wieder ein Wildtyp oder eine Deletionsmutante. Ob die Deletion stattgefunden hatte, wurde mittels PCR überprüft. Die unmarkierte

„in-frame“ Deletionsmutante für das Gen 1799 aus ID50 wt wurde ebenso hergestellt.

Die Komplementierung erfolgte mit dem low-copy-Vektor pME6032, unter Kontrolle eines  $P_{tac}$ -Promotors. Das Gen 1866 wurde amplifiziert und in den Vektor eingeschleust. Mittels Elektroporation wurde ID50  $\Delta$ 1866 mit pME6032::1866, bzw. mit dem leeren Plasmid pME6032 transformiert. Die komplementierten Deletionsmutanten wurden mit 125  $\mu$ g/ml Tetracyclin selektiert. Die Komplementierung des ID50  $\Delta$ 1866 / pME6032::1866 wurde mittels PCR überprüft.

### **2.13 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm „GraphPad Prism 7.03“ durchgeführt. Jedes Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander in Duplikaten durchgeführt. Aus den Messwerten wurden für jeden Stamm die Mittelwerte nach 3, 6 und 24 Stunden bestimmt und die Standardabweichung errechnet. In den Schaubildern des Ergebnisteils geben die Punkte den Mittelwert, die Fehlerbalken die Standardabweichung wieder. Die Unterschiede zwischen den Stämmen wurden auf Signifikanz getestet. Dazu wurde bei den Wachstumsexperimenten der Mann-Whitney-U-Test, beim Vergleich des Schwimmings der Welch-t-Test verwendet. Der Mann-Whitney-U-Test kann bei unabhängigen Stichproben verwendet werden, die abhängige Variable muss mindestens ordinalskaliert und das untersuchte Merkmal nicht normalverteilt sein. Der Welch-t-Test wird ebenfalls zum Vergleich zweier unabhängiger Stichproben verwendet. Die abhängige Variable muss jedoch mindestens intervallskaliert sein und Normalverteilung des Merkmals angenommen werden. Eine Varianzhomogenität zwischen den untersuchten Gruppen muss, im Gegensatz zum Student's t-Test, nicht gegeben sein. P-Werte  $< 0,05$  wurden als signifikant gewertet. Signifikante Unterschiede zwischen ID50 wt und ID173 wt wurden in den Schaubildern wie folgt gekennzeichnet: Für  $P < 0,05$  mit \*, für  $P < 0,01$  mit \*\* und für  $P < 0,001$  mit \*\*\*.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Wachstumsversuche

Eine höhere Erregerlast im Blut erhöht das Risiko für eine schwerer verlaufende Sepsis (Kumar 2014; Rello et al. 2009). Auch die Ergebnisse einer klinischen Studie von Willmann, Kuebart, Vogel, et al. (2013) unterstützen diese These. In der Studie wurde die Time-to-Positivity der Blutkulturen von Patienten mit septischer *P. aeruginosa*-Bakteriämie ausgewertet. Die Time-to-Positivity ist die Zeit vom Start der Inkubation der Blutkulturen bis zum automatischen Alarmsignal des diagnostischen Blutkulturinstruments. Es wird davon ausgegangen, dass die Time-to-Positivity in erster Linie von der Erregeranzahl im Blut abhängt: Hohe Erregerzahl spiegelt sich in kürzerer Time-to-Positivity wider. Eine kürzere Time-to-Positivity konnte in dieser Studie mit einem schlechteren Behandlungsergebnis des Patienten assoziiert werden. Da die Erregerzahl im Blut auch von der Wachstumsgeschwindigkeit abhängt, wurde das Wachstum der Isolate und Mutanten unter unterschiedlichen Bedingungen und zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Dabei sollte auch ein möglicher Einfluss der Gene 1799 und *help* auf das Wachstum bestimmt werden. Die Messzeiten nach 3, 6 und 24 Stunden wurden gewählt, sodass die frühe und späte exponentielle Wachstumsphase sowie die stationäre Phase abgebildet werden.

#### 3.1.1 Wachstum in LB- und M9-Medium

Zunächst wurde das Wachstum in LB-Medium verglichen. LB ist ein Vollmedium und ermöglicht den Bakterien ein schnelles Wachstum. Es sollte aber auch der Frage nachgegangen werden, ob die verschiedenen Isolate unterschiedlich gut mit einem verminderten Nährstoffangebot umgehen können. Dazu wurden die Bakterien in M9-Minimalmedium mit Natriumcitrat als Kohlenstoffquelle herangezogen. In je 15 ml LB-, bzw. M9-Medium wurden die Bakterien ausgehend von einer Start-OD<sub>600</sub> von 0,5 über 24 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert.

Nach jeweils 3, 6 und 24 h wurden in den Versuchen die OD<sub>600</sub> und die CFU/ml bestimmt. Dabei waren die Ergebnisse der beiden Messmethoden vergleichbar



(Abb. 3 und 4 sowie Abb. 5 und 6). Die Bakterien in den LB-Versuchsansätzen vermehrten sich um zwei Zehnerpotenzen, durchschnittlich auf rund  $7,5 \times 10^9$  CFU/ml nach 24 h. Der Unterschied im Wachstum von ID50 wt und ID173 wt wurde auf Signifikanz getestet. ID173 wt wuchs generell besser, die Unterschiede waren mit Ausnahme der CFU-Messung nach 24 h signifikant (Abb. 3 und 4). Insbesondere in der frühen und späten exponentiellen Phase betragen die CFU/ml-Werte von ID173 wt das rund 1,6-Fache der CFU/ml von ID50 wt. Der per OD<sub>600</sub> festgestellte Wachstumsunterschied nach 24 h war signifikant. Hier betrug die OD<sub>600</sub> für ID173 wt das 1,07-Fache von ID50 wt (Tab. 2).

Die Messwerte von ID50 wt und seiner Mutanten wurden ebenfalls auf Signifikanz getestet. Bei den OD<sub>600</sub>-Werten ergab sich zwischen ID50 wt und ID50 Δ1866 nach 6 h ein statistisch signifikant besseres Wachstum für die Mutante um das 1,07-Fache (P = 0,0099; Mann-Whitney-U-Test). Bei den CFU/ml-Werten ergab sich zwischen ID50 wt und ID50 Δ1799 nach 6 h ein statistisch signifikant besseres Wachstum des Wildtyps um das 1,36-Fache (P = 0,0010; Mann-Whitney-U-Test).

Die Bakterien im M9-Medium vermehrten sich um etwas mehr als eine Zehnerpotenz auf durchschnittlich  $1,7 \times 10^9$  CFU/ml nach 24 h (Abb. 6). Das Wachstum war erwartungsgemäß geringer und betrug nur etwa das 0,23-Fache dessen in LB-Medium (Abb. 5). Bei Betrachtung der OD<sub>600</sub>- und CFU/ml-Messungen ergaben sich zwischen ID50 wt und ID173 wt nach 6 und 24 h signifikante Unterschiede im Wachstum (Abb. 5 und 6). Im Schnitt vermehrte sich ID173 wt mehr als doppelt so gut innerhalb der ersten 6 h und auch nach 24 h betrug die CFU/ml von ID173 wt noch das 1,4-Fache der CFU/ml von ID50 wt (Tab. 3).

Die Wachstumsunterschiede zwischen ID50 wt und seinen Mutanten erreichten zu keinem Zeitpunkt ein signifikantes Niveau, weder bei Betrachtung der OD- noch der CFU/ml-Werte.

Die Ergebnisse weisen auf einen Vermehrungsvorteil von ID173 wt in LB- und M9-Medium hin. Insbesondere während der exponentiellen Phase scheint dieser ID50 wt im Wachstum überlegen. Ob die Gene 1799 und *help* Einfluss auf das Wachstum nehmen, scheint dagegen fragwürdig. Generell kann aufgrund der Ergebnisse davon

ausgegangen werden, dass die beiden Messmethoden, OD<sub>600</sub> und CFU/ml, vergleichbar sind.

**Tabelle 2 Mittelwerte der OD<sub>600</sub>- und CFU/ml-Messungen von ID50 wt und ID173 wt in LB-Medium.**

	ID50 (OD <sub>600</sub> )	ID173 (OD <sub>600</sub> )	ID50 (CFU/ml)	ID173 (CFU/ml)
3 h	1,313	1,758	3,31x10 <sup>8</sup>	5,467x10 <sup>8</sup>
6 h	2,027	2,560	2,279x10 <sup>9</sup>	3,733x10 <sup>9</sup>
24 h	3,922	4,20	8,375x10 <sup>9</sup>	7,283x10 <sup>9</sup>

**Tabelle 3 Mittelwerte der OD<sub>600</sub>- und CFU/ml-Messungen von ID50 wt und ID173 wt in M9-Medium.**

	ID50 (OD <sub>600</sub> )	ID173 (OD <sub>600</sub> )	ID50 (CFU/ml)	ID173 (CFU/ml)
3 h	0,146	0,182	1,005x10 <sup>8</sup>	1,617x10 <sup>8</sup>
6 h	0,509	1,018	6,008x10 <sup>8</sup>	1,413x10 <sup>9</sup>
24 h	0,711	0,827	1,643x10 <sup>9</sup>	2,313x10 <sup>9</sup>

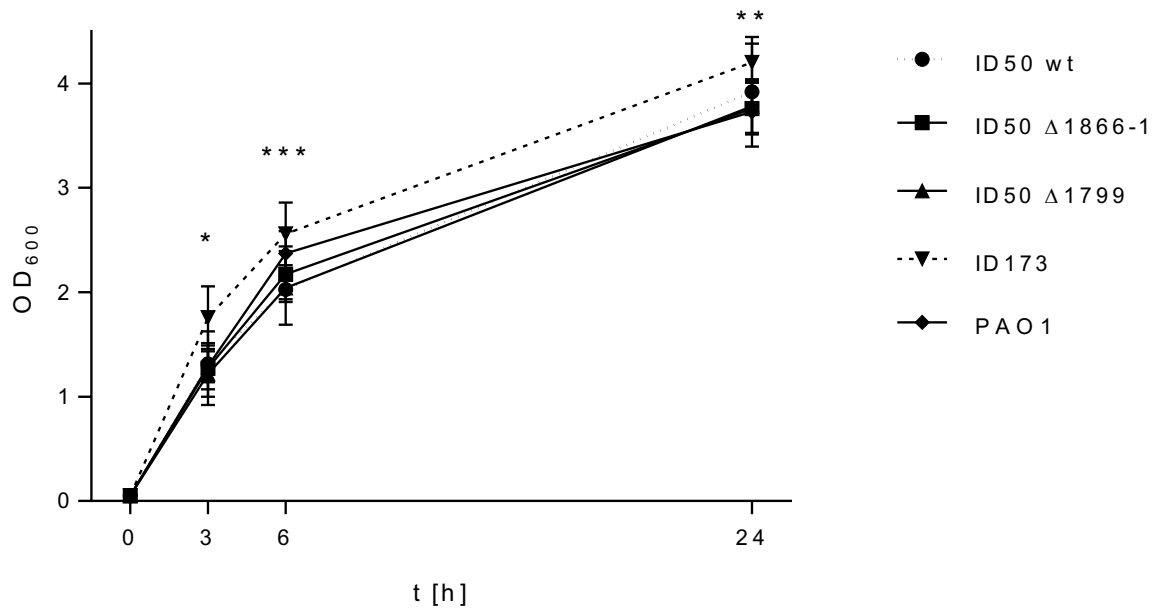


Abbildung 3 Wachstumskurven von ID50 wt, ID50 Δ1866-1, ID50 Δ1799, ID173 wt und PAO1 in LB-Medium, bei einer Start-OD<sub>600</sub> von 0,05. Mann-Whitney-U-Test mit ID50 wt und ID173 wt durchgeführt: \*, P = 0,0120; \*\*\*, P = 0,0001; \*\*, P = 0,0065.

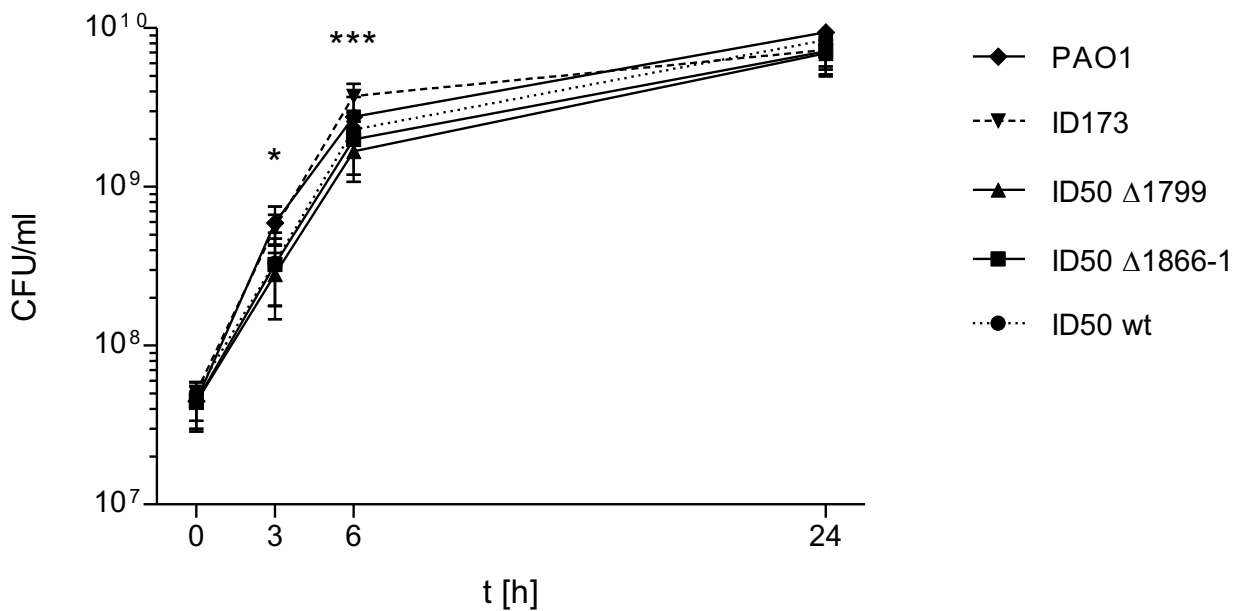


Abbildung 4 Wachstumskurven von ID50 wt, ID50 Δ1866-1, ID50 Δ1799, ID173 wt und PAO1 in LB-Medium, bei einer Startkonzentration von  $\sim 5 \times 10^7$  CFU/ml. Mann-Whitney-U-Test mit ID50 wt und ID173 wt durchgeführt: \*, P = 0,0332; \*\*\*, P = 0,0003.

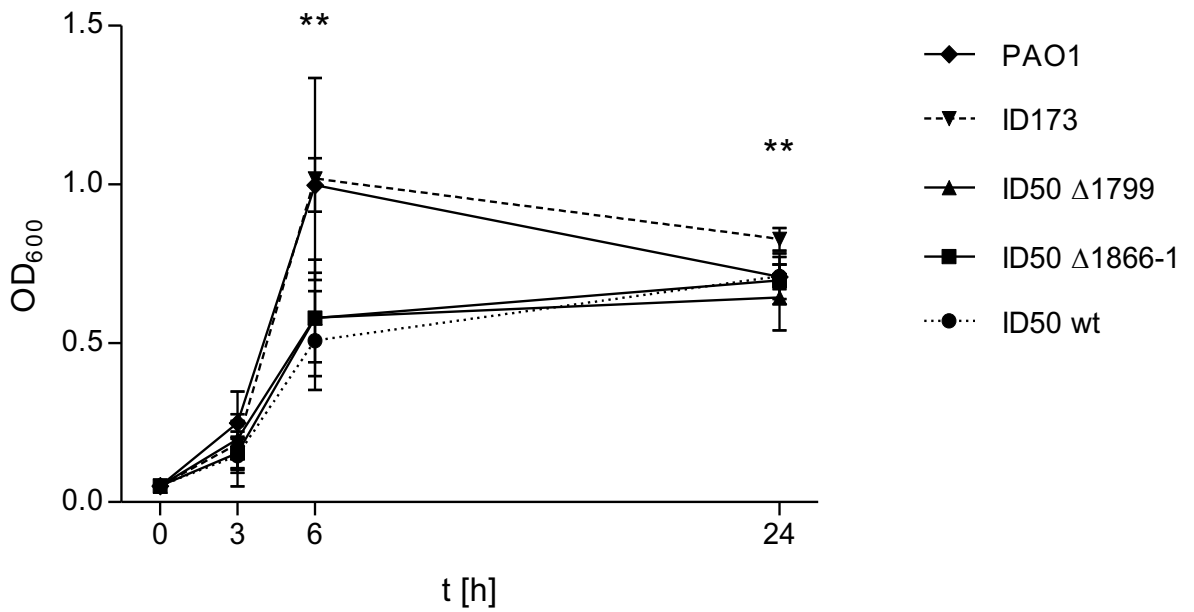


Abbildung 5 Wachstumskurven von ID50 wt, ID50 Δ1866-1, ID50 Δ1799, ID173 wt und PAO1 in M9-Medium, bei einer Start-OD<sub>600</sub> von 0,05. Mann-Whitney-U-Test mit ID50 wt und ID173 wt durchgeführt: \*\*, P<sub>6</sub> = 0,0019, P<sub>24</sub> = 0,0051.

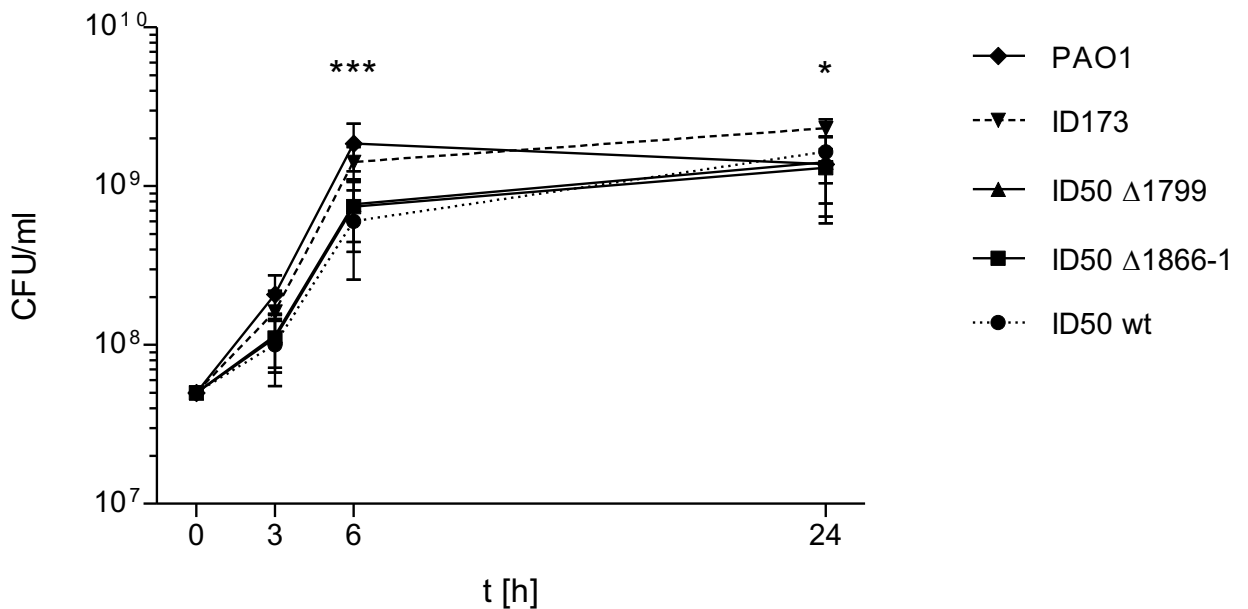


Abbildung 6 Wachstumskurven von ID50 wt, ID50 Δ1866-1, ID50 Δ1799, ID173 wt und PAO1 in M9-Medium, bei einer Startkonzentration von ~5 × 10<sup>7</sup> CFU/ml. Mann-Whitney-U-Test mit ID50 wt und ID173 wt durchgeführt: \*\*\*, P = 0,0004; \*, P = 0,0234.

### 3.1.2 Wachstum bei pH 5, 7 und 8

Je nach Umgebung sind Bakterien unterschiedlichen pH-Bedingungen ausgesetzt. Im Blut des Menschen herrscht ein pH-Wert von ca. 7,4. Im Magen-Darm-Trakt sind die Bedingungen wechselhaft. Der Speichel ist leicht sauer (pH 6,5), die Parietalzellen des Magens sorgen für einen pH-Wert unter 2. Der Chymus wird daraufhin von einem leicht alkalischen Pankreassekret (pH 8,2) wieder neutralisiert (Schmidt 2010). Somit können auch auf die Bakterien während einer Besiedelung oder Infektion des Körpers unterschiedliche pH-Werte einwirken.

In je 15 ml LB-Medium mit Phosphatpuffer nach Sørensen mit pH 5, 7 und 8 wurden die Bakterien ausgehend von einer Start-OD<sub>600</sub> von 0,5 über 24 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Nach 24 h wurde der pH-Wert in den Versuchsansätzen kontrolliert. Es wurde untersucht, inwieweit Wachstumsunterschiede zwischen den Isolaten bei verschiedenen pH-Werten bestehen. Außerdem sollte das Wachstum eines Isolats unter verschiedenen pH-Werten verglichen werden. Die ersten Experimente in LB- und M9-Medium (*Abb. 3 bis 6*) zeigten, dass sich die Ergebnisse der OD<sub>600</sub>- und der CFU-Wachstumskurven gegenseitig bestätigten. Aus diesem Grund wurde auf eine Messung der CFU verzichtet.

Im Vergleich zwischen ID50 wt und ID173 wt zeigte sich bei pH 5, pH 7 und pH 8 ein signifikant besseres Wachstum von ID173 wt. Für ID50 wt und die zwei Mutanten ergaben sich hingegen fast identische Wachstumskurven (*Abb. 7 bis 9*). Besonders interessant erscheinen die Unterschiede im sauren und alkalischen Milieu: Zwischen ID173 wt und ID50 wt fielen einmal bei pH 5 ein besonders großer Unterschied nach 6 h und ein weiterer bei pH 8 nach 24 h auf. Bei pH 5 benötigte ID50 wt eine deutlich längere Phase der Adaptation als bei höheren pH-Werten (*Abb. 11*). Gleichzeitig war diese auch deutlich länger als bei ID173 wt: Nach 6 h betrug die OD<sub>600</sub> von ID173 wt das 6-Fache dessen von ID50 wt (*Abb. 7*). Dieser Unterschied lag bei pH 7 lediglich beim 1,3-Fachen (*Abb. 8*). Betrachtet man die Wachstumskurven bei pH 8 fällt auf, dass ID173 wt seine stationäre Phase (24 h) auf höherem Niveau erreichte als ID50 wt (*Abb. 9*). Der Unterschied betrug das 1,25-Fache. Vergleicht man dahingegen den Unterschied zwischen ID173 wt und ID50 wt nach 24 h bei einem pH von 7, betrug dieser nur das 1,12-Fache (*Abb. 8*).

Vergleicht man die Wachstumskurven eines Isolats unter unterschiedlichen pH-Bedingungen (*Abb. 10 und 11*), gilt sowohl für ID173 wt als auch für ID50 wt, dass ein saurer pH in der exponentiellen Phase das Wachstum stärker behinderte als ein alkalischer pH. Nach 24 h jedoch war erkennbar, dass die stationäre Phase bei pH 8 auf niedrigerem Niveau erreicht wurde als bei pH 5. Die stationäre Phase von pH 5 erreichte dabei das Niveau von pH 7. Betrachtet man ID173 wt, lag nach 24 h die OD<sub>600</sub> bei pH 5 um 1,08-fach höher als bei pH 8. Dieser Unterschied betrug bei ID50 wt sogar das 1,22-Fache.

Die Messwertunterschiede zwischen ID50 wt und dessen Deletionsmutanten wurden ebenfalls auf Signifikanz getestet. Für ID50  $\Delta$ 1866 ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede bei pH 5 nach 3 h (1,19-fach stärker als ID50 wt; P = 0,0304; Mann-Whitney-U-Test) und 24 h (0,94-Fache von ID50 wt, P = 0,0152; Mann-Whitney-U-Test), bei pH 8 nach 6 h (1,11-fach stärker als ID50 wt; P = 0,0064; Mann-Whitney-U-Test). Für ID50  $\Delta$ 1799 ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede bei pH 8 nach 3 h (1,15-fach stärker als ID50 wt; P = 0,0295; Mann-Whitney-U-Test) und nach 6 h (1,09-fach stärker als ID50 wt; P = 0,0064; Mann-Whitney-U-Test).

Insgesamt betrachtet, wirkte sich ein von pH 7 abweichendes Milieu negativ auf das Wachstum von *P. aeruginosa* aus. ID50 wt scheint dabei jedoch empfindlicher zu reagieren als ID173 wt. Bei vereinzelt signifikanten, kleinen Unterschieden zum Wildtyp, erscheint keine Einflussnahme der Gene 1799 und *helP* auf Wachstum, bzw. pH-Anpassungsfähigkeit gegeben.

Abschließend wurde nach 24 h der pH-Wert der Versuchsansätze kontrolliert. Dabei konnte festgestellt werden, dass der pH trotz der hohen Pufferkonzentration nicht stabil geblieben war. So stiegen die Werte in den pH 5-Ansätzen von 5 auf 6. In den Ansätzen von pH 7 und pH 8 lagen die Werte nach 24 h bei 7,5, bzw. 8,3. Folglich sezernierten die Bakterien alkalische Metaboliten. Unterschiede bezüglich der Höhe des pH-Anstiegs zwischen den verschiedenen Isolaten ergaben sich nicht.

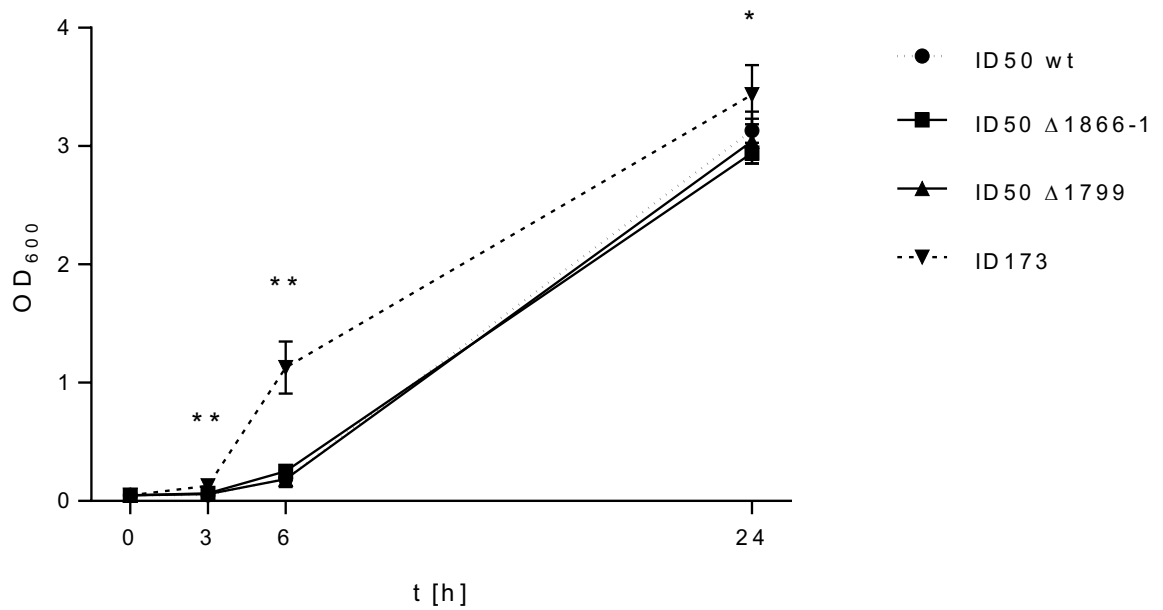


Abbildung 7 Wachstumskurven von ID50 wt, ID50  $\Delta$ 1866-1, ID50  $\Delta$ 1799 und ID173 wt in 0,2 M Phosphatpuffer nach Sørensen bei pH 5 und einer Start-OD<sub>600</sub> von 0,05. Mann-Whitney-U-Test mit ID50 wt und ID173 wt durchgeführt: \*\*, P = 0,0022; \*, P = 0,0260.

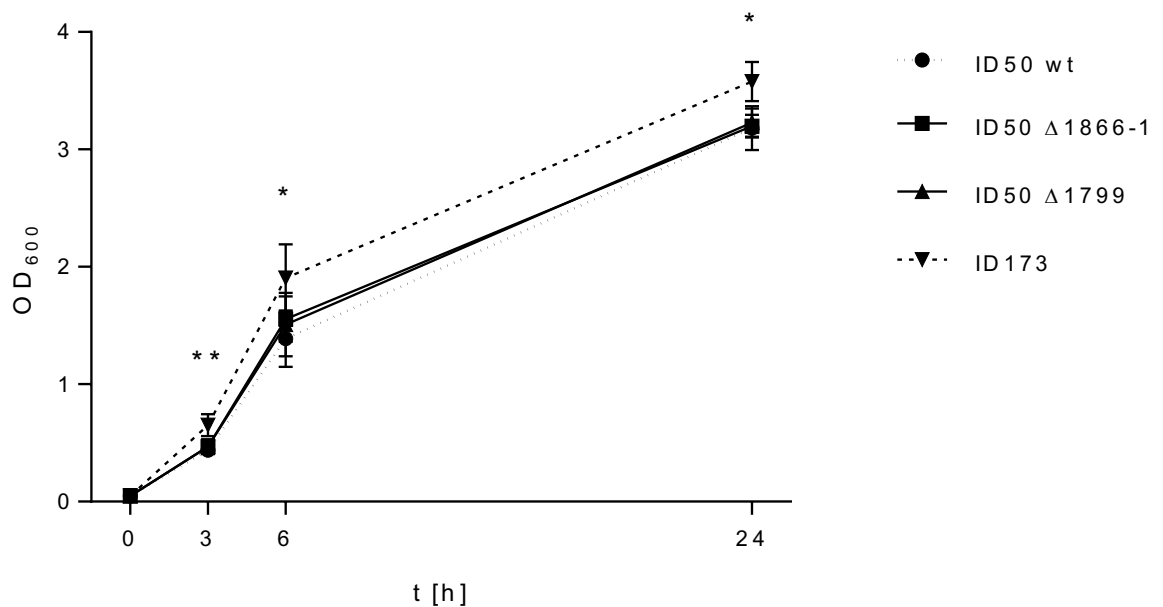
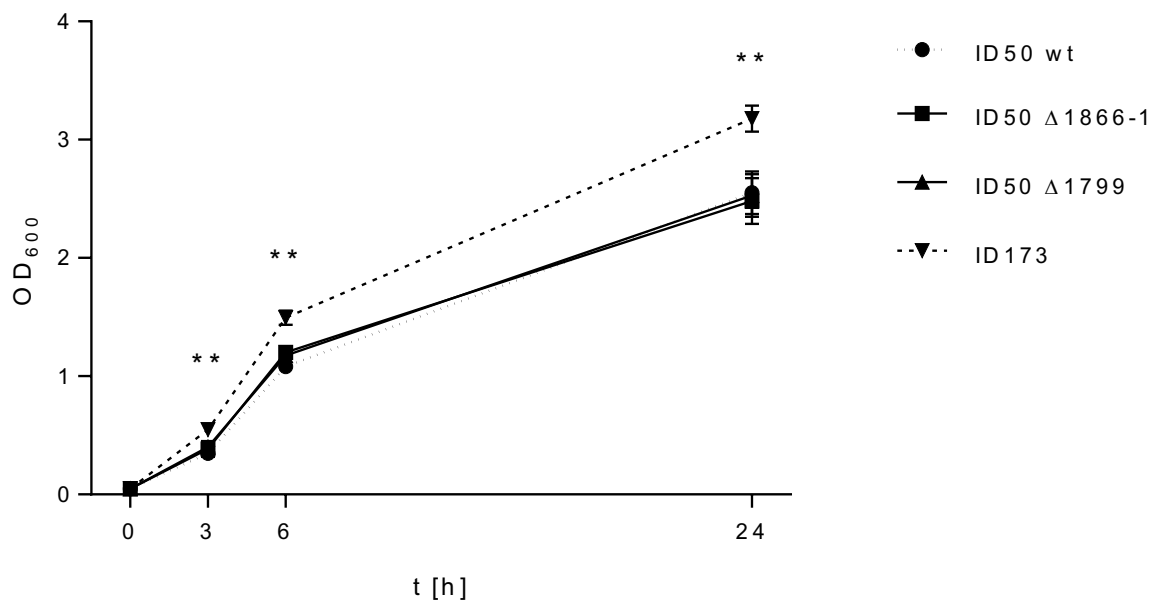


Abbildung 8 Wachstumskurven von ID50 wt, ID50  $\Delta$ 1866-1, ID50  $\Delta$ 1799 und ID173 wt in 0,2 M Phosphatpuffer nach Sørensen bei pH 7 und einer Start-OD<sub>600</sub> von 0,05. Mann-Whitney-U-Test mit ID50 wt und ID173 wt durchgeführt: \*\*, P = 0,0022; \*, P = 0,0152.



**Abbildung 9** Wachstumskurven von ID50 wt, ID50  $\Delta$ 1866-1, ID50  $\Delta$ 1799 und ID173 wt in 0,2 M Phosphatpuffer nach Sørensen bei pH 8 und einer Start-OD<sub>600</sub> von 0,05. Mann-Whitney-U-Test mit ID50 wt und ID173 wt durchgeführt: \*\*, P = 0,0022.



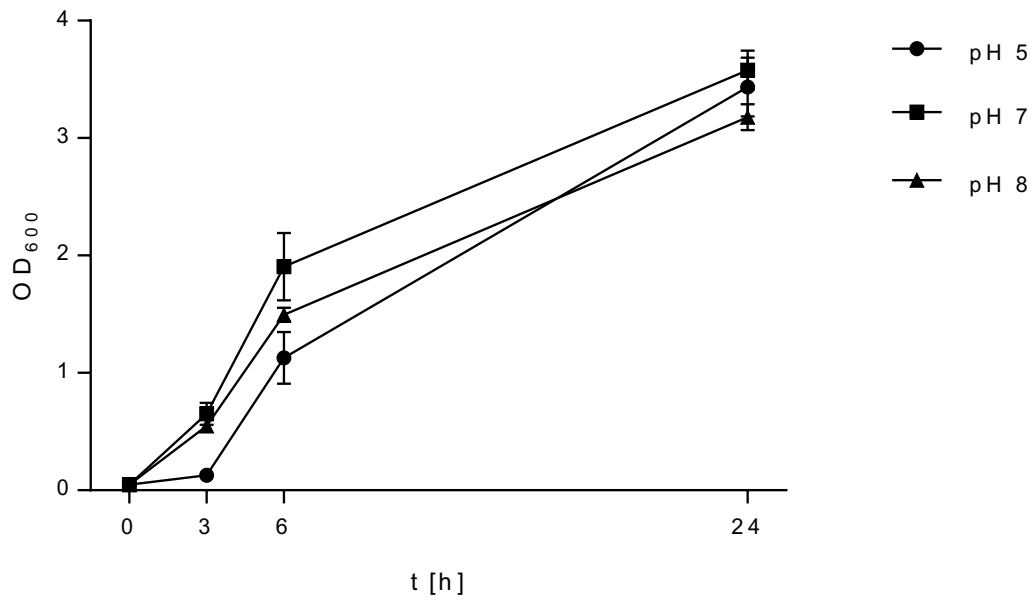


Abbildung 10 Wachstumskurven von ID173 wt in 0,2 M Phosphatpuffer nach Sørensen bei pH 5, pH 7 und pH 8 und einer Start-OD<sub>600</sub> von 0,05.

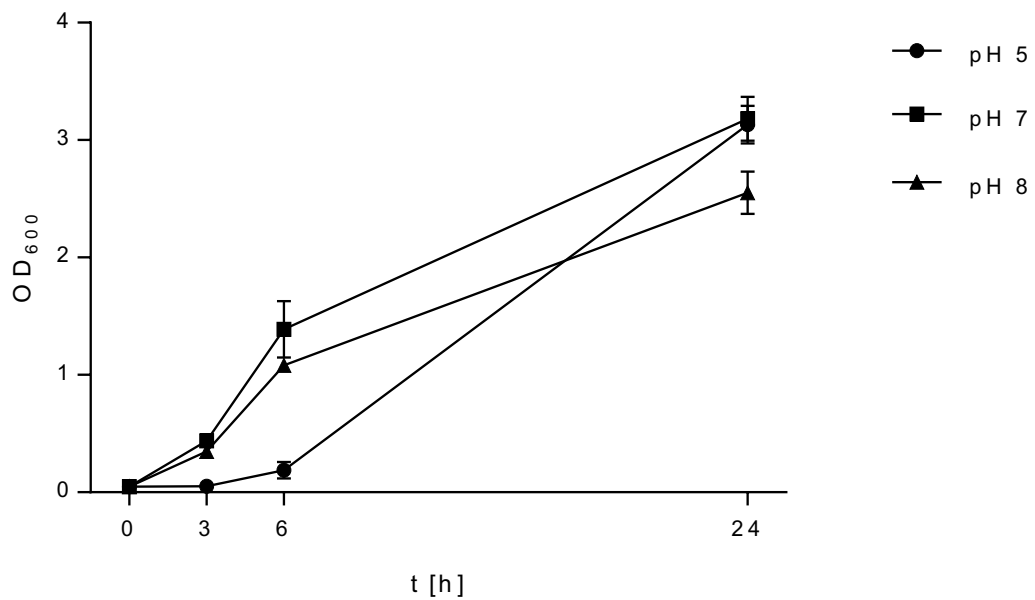


Abbildung 11 Wachstumskurven von ID50 wt in 0,2 M Phosphatpuffer nach Sørensen bei pH 5, pH 7 und pH 8 und einer Start-OD<sub>600</sub> von 0,05.

Nach Abschluss der Versuche wurde beobachtet, dass ID50 wt und seine Mutanten unter sauren Bedingungen (pH 5) mehr an grünlichem Pigment produziert hatten (Abb. 12, Mutanten nicht dargestellt). Besonders deutlich wurde dieser Unterschied bei Versuchen, die mit einer niedrigeren Pufferkonzentration (0,1 M) durchgeführt worden waren (Abb. 13). ID173 wt bildete dagegen bei höherem pH (pH 7 und 8) vermehrt grünes Pigment (Abb. 12 und 13). Der pH-Wert könnte somit einen Einfluss auf die Produktion von Siderophoren haben.

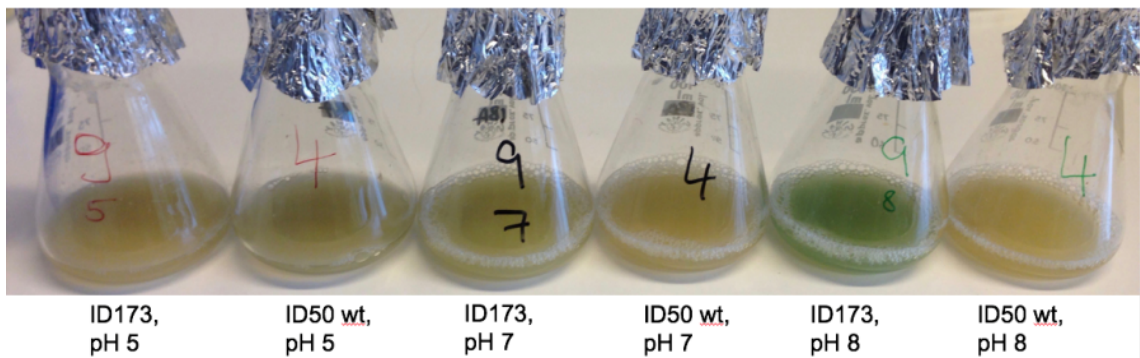


Abbildung 12 Versuchsansätze von ID173 wt und ID50 wt bei pH 5, pH 7 und pH 8 in 0,2 M Phosphatpuffer nach Sörensen nach 24 h. Mutanten nicht abgebildet.

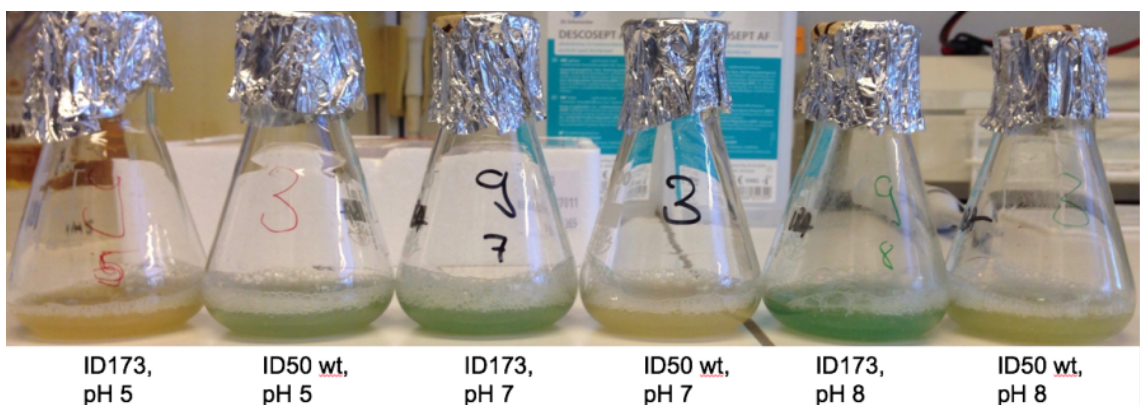


Abbildung 13 Versuchsansätze von ID173 wt und ID50 wt bei pH 5, pH 7 und pH 8 in 0,1 M Phosphatpuffer nach Sörensen nach 24 h. Mutanten nicht abgebildet.

### 3.1.3 Wachstum bei 27 °C, 37 °C und 40 °C

Neben dem pH-Wert ist die Temperatur ein wichtiger Umweltfaktor. Wie im Kapitel »1.1.1 Epidemiologie und klinische Bedeutung« erwähnt, kann *P. aeruginosa* viele verschiedene Nischen auch im Krankenhaus besiedeln (Siphons, Blumenvasen, Medizinprodukte). Hier ist das Bakterium einer Temperatur von ca. 21 °C ausgesetzt. Im menschlichen Körper liegt die physiologische Temperatur dagegen bei 37 °C und steigt bei Fieber auf über 38 °C an. Ausgehend vom Reservoir des Erregers, über die Kolonisierung des Wirts, bis zur manifesten Infektion mit Fieberreaktion, muss der Erreger mit sehr unterschiedlichen Temperaturniveaus umgehen können. Damit einhergehende Wachstumsunterschiede zwischen den Isolaten sowie das Wachstum eines Isolats bei verschiedenen Temperaturen wurden daher untersucht. In je 15 ml LB-Medium wurden die Bakterien ausgehend von einer Start-OD<sub>600</sub> von 0,5 über 24 h bei 200 rpm inkubiert. Als Temperaturen wurden 27 °C, 37 °C und 40 °C gewählt.

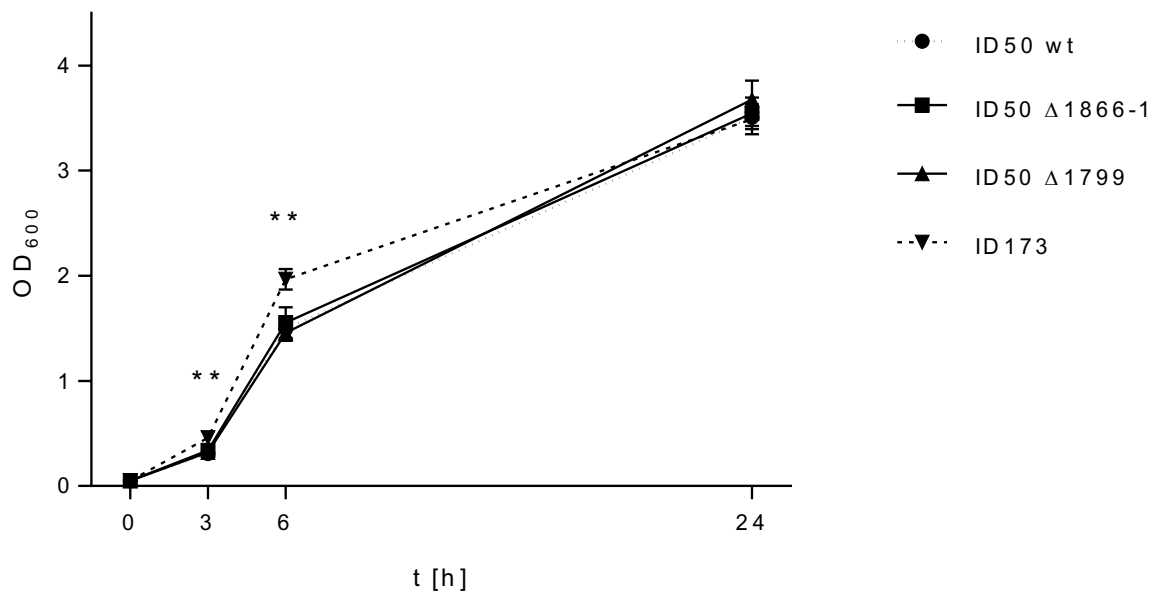
Die Ergebnisse zeigten signifikante Unterschiede zwischen ID173 wt und ID50 wt. ID173 wt wuchs bei 27 °C, 37 °C und 40 °C innerhalb der ersten 6 h besser, nach 24 h zeigte ID173 wt nur noch bei 37 °C ein signifikant stärkeres Wachstum als ID50 wt (*Abb. 14 bis 16*). Es fiel auf, dass ID173 wt zwar insgesamt weiterhin stärker wächst als ID50 wt, allerdings waren die Unterschiede zwischen beiden Stämmen bei 27 °C und 40 °C relativ schwächer als bei 37 °C (*Tab. 4*): So betrug beispielsweise die OD<sub>600</sub> von ID173 wt bei 37°C nach 6 h das 1,58-Fache der OD<sub>600</sub> von ID50 wt. Bei 27 °C betrug dieser Unterschied nur das 1,32-Fache und bei 40 °C das 1,2-Fache. Im Gegensatz zum Wachstum bei 37 °C ergab sich nach 24 h beim Wachstum unter 27 °C und 40 °C überhaupt kein signifikanter Unterschied mehr zwischen ID173 wt und ID50 wt.

Im Gesamten gesehen benötigte *P. aeruginosa* bei niedrigeren Temperaturen eine längere Zeit der Anpassung als bei 37 °C oder 40 °C. Dann allerdings wurde die stationäre Phase auf einem höheren Niveau erreicht als beim Wachstum unter 40 °C. Betrachtet man den 24 h-Zeitraum schien das Wachstum bei 37 °C optimal. Zu beachten gilt allerdings, dass innerhalb der ersten 6 h der Erreger bei 40 °C einen Wachstumsvorteil hatte. Das Wachstum bei 40 °C betrug im Vergleich zu 37°C nach

6 h bei ID50 wt das 1,55-Fache, bei ID173 wt immerhin das 1,18-Fache (Abb. 17 und 18).

Auch die Messergebnisse der Deletionsmutanten wurden mit denen des Wildtyps verglichen. Dabei ergab sich nach 6 h bei 37 °C für ID50  $\Delta$ 1866 ein signifikant stärkeres Wachstum um das 1,23-Fache gegenüber ID50 wt ( $P = 0,0050$ ; Mann-Whitney-U-Test).

Das Experiment deutet darauf hin, dass ID173 wt relativ empfindlicher gegenüber Temperaturen größer bzw. kleiner 37 °C ist als ID50 wt. Außerdem könnten höhere Temperaturen im Wirtsorganismus, wie sie bei Fieber üblich sind, unter Umständen einen Vorteil für den Erreger bieten. Die Deletion der Gene 1799 und *help* hatte im Gesamten betrachtet keinen Einfluss auf das Wachstum.



**Abbildung 14** Wachstumskurven von ID50 wt, ID50  $\Delta$ 1866-1, ID50  $\Delta$ 1799 und ID173 wt in LB-Medium bei 27 °C. Die Start-OD<sub>600</sub> betrug 0,05. Mann-Whitney-U-Test mit ID50 wt und ID173 wt durchgeführt: \*\*,  $P_3 = 0,0065$ ,  $P_6 = 0,0022$

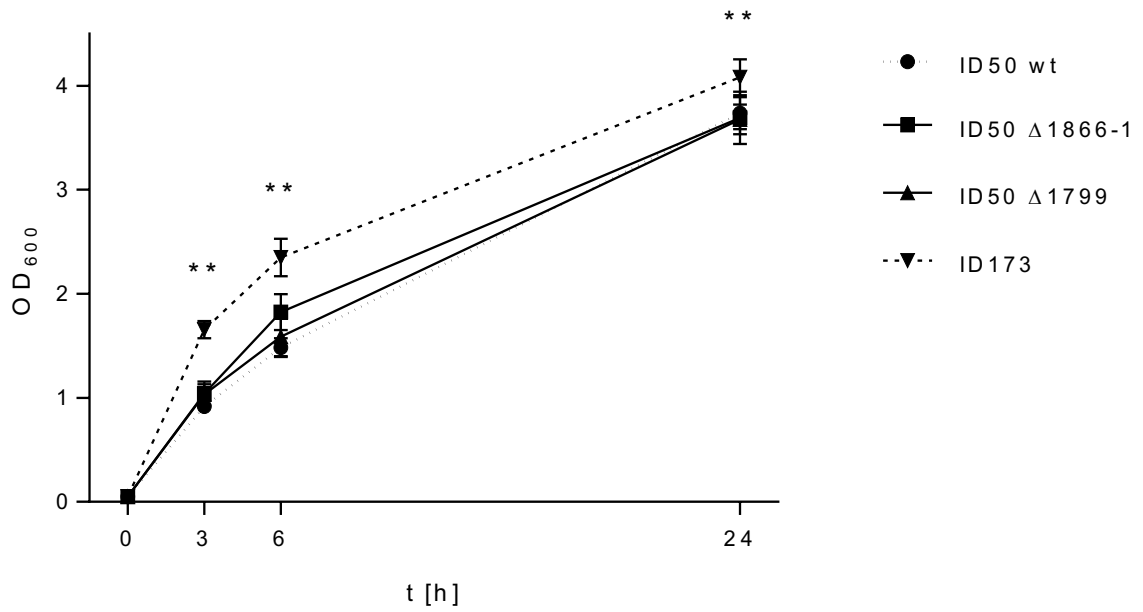


Abbildung 15 Wachstumskurven von ID50 wt, ID50  $\Delta$ 1866-1, ID50  $\Delta$ 1799 und ID173 wt in LB-Medium bei 37 °C. Die Start-OD<sub>600</sub> betrug 0,05. Mann-Whitney-U-Test mit ID50 wt und ID173 wt durchgeführt: \*\*, P<sub>3+6</sub> = 0,002, P<sub>24</sub> = 0,0065

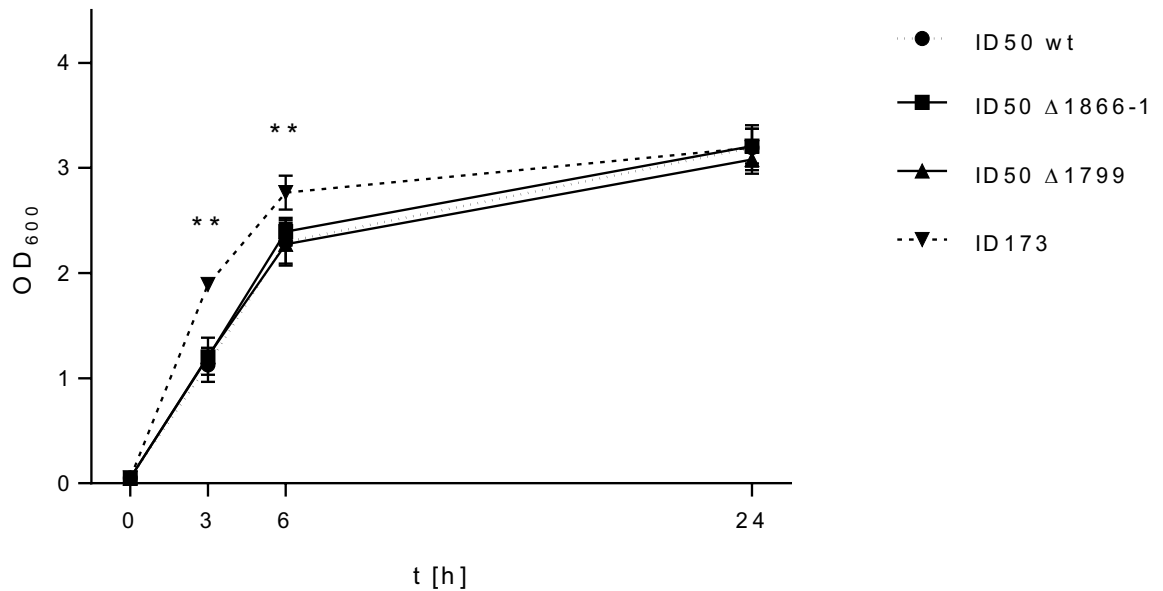


Abbildung 16 Wachstumskurven von ID50 wt, ID50  $\Delta$ 1866-1, ID50  $\Delta$ 1799 und ID173 wt in LB-Medium bei 40 °C. Die Start-OD<sub>600</sub> betrug 0,05. Mann-Whitney-U-Test mit ID50 wt und ID173 wt durchgeführt: \*\*, P<sub>3</sub> = 0,0022, P<sub>6</sub> = 0,0043

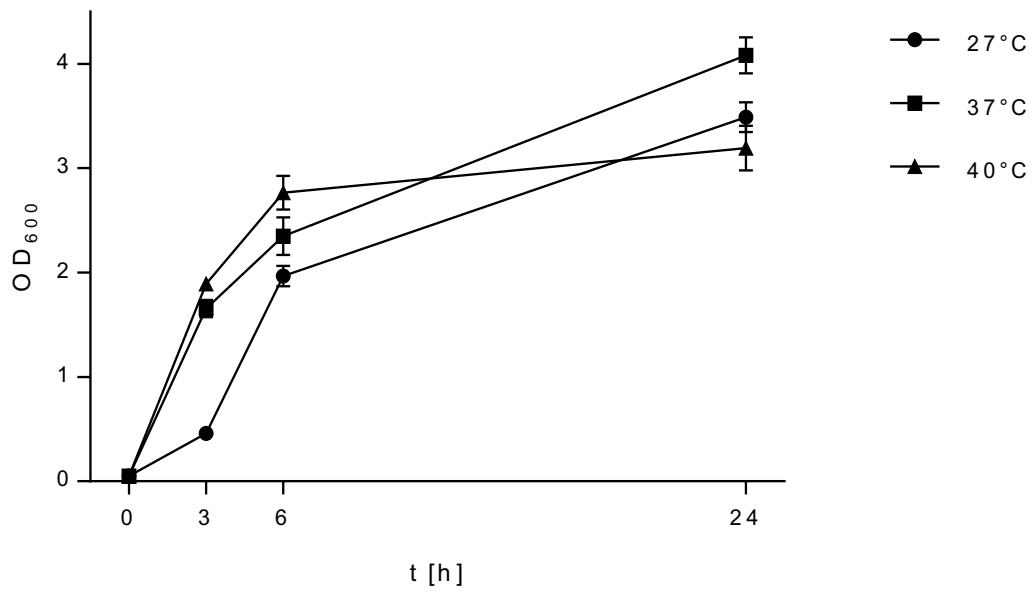


Abbildung 17 Wachstumskurven von ID173 wt bei 27 °C, 37 °C und 40 °C in LB-Medium. Die Start-OD<sub>600</sub> betrug 0,05.

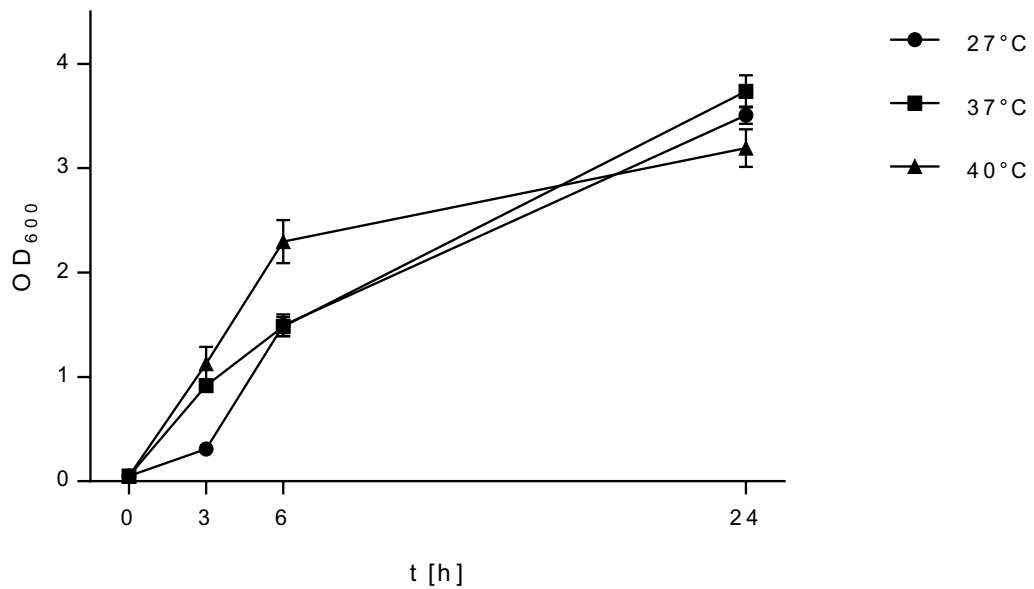


Abbildung 18 Wachstumskurven von ID50 wt bei 27 °C, 37 °C und 40 °C in LB-Medium. Die Start-OD<sub>600</sub> betrug 0,05.

**Tabelle 4 Vielfache der mittleren OD<sub>600</sub> von ID173 wt zu ID50 wt zu den Zeitpunkten 3, 6 und 24 h bei den Temperaturen 27 °C, 37 °C, 40 °C.**

Temperatur Inkubationszeit	27 °C	37 °C	40 °C
3 h	1,48 x	1,8 x	1,68 x
6 h	1,32 x	1,58 x	1,2 x
24 h	1 x (P = ns)	1,09 x	1 x (P = ns)

### 3.1.4 Wachstum in defibriniertem Schafblut

Um sich den physiologischen Verhältnissen im menschlichen Blut anzunähern, wurde ein Experiment in defibriniertem Schafblut durchgeführt. Dies geschah auch im Hinblick darauf, dass die Isolate, bis auf PAO1, aus Blutproben septischer Patienten gewonnen worden waren. In Kulturröhrchen mit je 2 ml sterilem und defibriniertem Schafblut wurden die Bakterien bei 37 °C und 200 rpm angezüchtet. Da Blut als Medium verwendet wurde, konnte die OD nicht gemessen werden. Es wurde daher die CFU/ml bestimmt.

Die Bakterien vermehrten sich innerhalb von 6 h ausgehend von  $5 \times 10^7$  CFU/ml auf im Schnitt  $6,71 \times 10^9$  CFU/ml (*Abb. 19*). Vergleicht man das Wachstum im defibrinierten Schafsblut mit dem in LB-Medium, ist ein deutlich schnelleres Wachstum im Blut erkennbar. Nach 6 h in LB-Medium hatten sich die Erreger im Schnitt auf  $2,5 \times 10^9$  CFU/ml vermehrt, das Wachstum in Blut war im Vergleich dazu um das 2,7-Fache stärker.

Im Gegensatz zu den bisherigen Experimenten, bei denen ID173 wt meist ein besseres Wachstum als ID50 wt zeigte, konnten hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Isolaten festgestellt werden (*Abb. 19*). Zu beachten gilt jedoch, dass sich große Standardabweichungen ergaben. Möglicherweise aufgrund der schwierigen Homogenisierung des dickflüssigen Mediums zur Messung der CFU/ml.

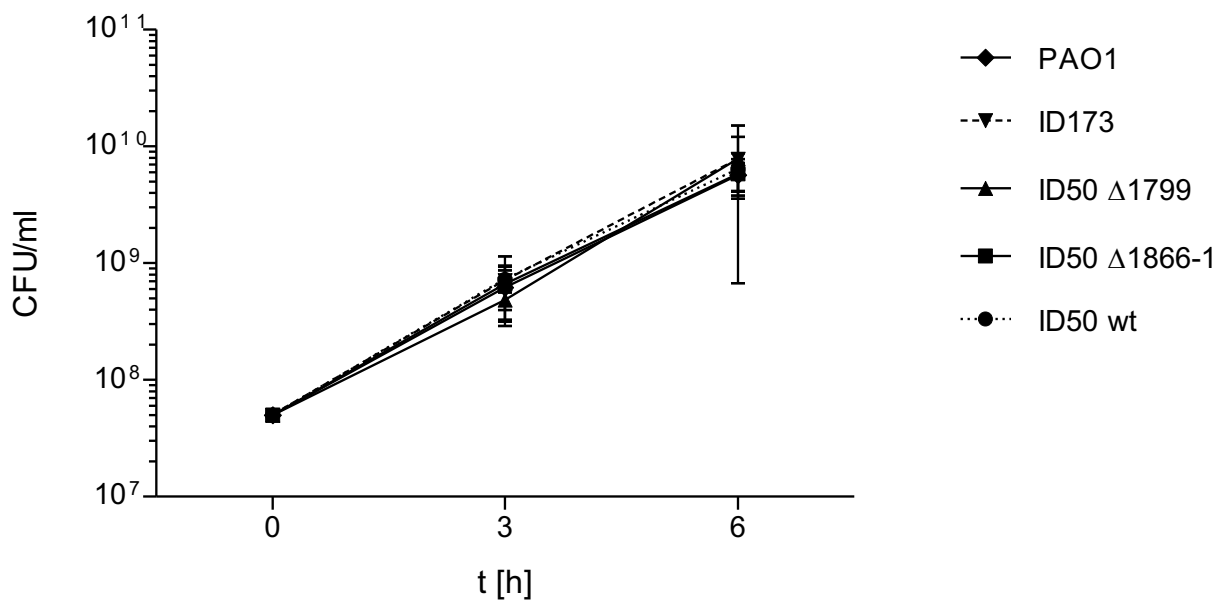


Abbildung 19 Wachstumskurven von ID50 wt, ID50  $\Delta$ 1866-1, ID50  $\Delta$ 1799, ID173 wt und PAO1 in defibriniertem Schafblut. Die Startkonzentration betrug  $\sim 5 \times 10^7$  CFU/ml. Mann-Whitney-U-Test mit ID50 wt und ID173 wt durchgeführt:  $P > 0,05$  (nach 0, 3 und 6 h).

### 3.1.5 Biofilmbildung

Biofilme ermöglichen *P. aeruginosa* Oberflächen zu besiedeln und machen das Bakterium unempfindlicher gegenüber unwirtlichen Umweltbedingungen, dem Immunsystem oder Antibiotika (Donlan et al. 2002). Biofilmbildung spielt insbesondere bei chronischen Lungeninfektionen im CF-Patienten, aber auch bei Katheterinfektionen eine Rolle (Costerton et al. 1999; Donlan 2001). Da die Fähigkeit Biofilme zu bilden ein sehr wichtiger Virulenzfaktor des Bakteriums ist, war es von besonderem Interesse die Isolate auf Unterschiede hin zu untersuchen. Es wurde der Zapfenplatten-Assay nach Ceri et al. (1999) verwendet. Dabei wurden mit 0,1 %igem Poly-L-Lysin beschichtete Zapfenplatten in einer Bakteriensuspension in LB-Medium ( $OD_{600}$  0,05) bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Nach 24 h wurde die Anzahl der Bakterien bestimmt, die im Biofilm gewachsen waren.



ID173 wt wuchs stärker im Biofilm als ID50 wt. Es zeigte sich ein sehr signifikanter Unterschied zwischen beiden Isolaten ( $P = 0,0022$ ; Mann-Whitney-U-Test) (Abb. 20). Im Schnitt befanden sich  $1,72 \times 10^8$  CFU/ml im Biofilm von ID173 wt, hingegen nur  $2,488 \times 10^7$  CFU/ml im Biofilm von ID50 wt. Außerdem war der Biofilm von ID173 wt mit bloßem Auge deutlich erkennbar. Für ID50 wt und dessen Mutanten traf dies nicht zu. Ein signifikanter Unterschied zwischen diesen konnte darüber hinaus nicht festgestellt werden.

Das Experiment demonstriert, dass alle Stämme in der Lage sind, Biofilme zu bilden. ID173 wt zeigte dabei jedoch ein knapp 7 x stärkeres Wachstum im Biofilm als ID50 wt. Dieser Unterschied ist deutlich stärker ausgeprägt als die Unterschiede, die während des planktonischen Wachstums gemessen wurden. Zwei Gründe können dabei zur höheren CFU-Zahl im Biofilm geführt haben: Einerseits eine stärkere Biofilmbildung, die u. a. zu einer besseren Adhärenz der Bakterien führt. Andererseits eine an sich verstärkte Zellteilung im Biofilm.

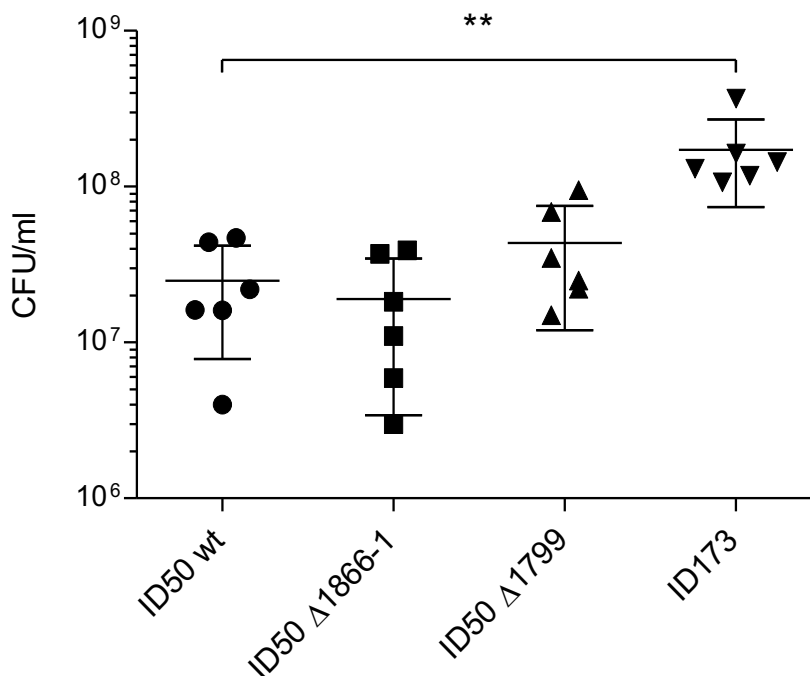


Abbildung 20 Bestimmung der CFU/ml von ID50 wt, ID50  $\Delta$ 1866-1, ID50  $\Delta$ 1799 und ID173 wt nach 24 h Wachstum im Biofilm. Die Startkonzentration betrug  $\sim 5 \times 10^7$  CFU/ml. Mann-Whitney-U-Test mit ID50 wt und ID173 wt durchgeführt: \*\*,  $P = 0,0022$ .

## 3.2 Motilität

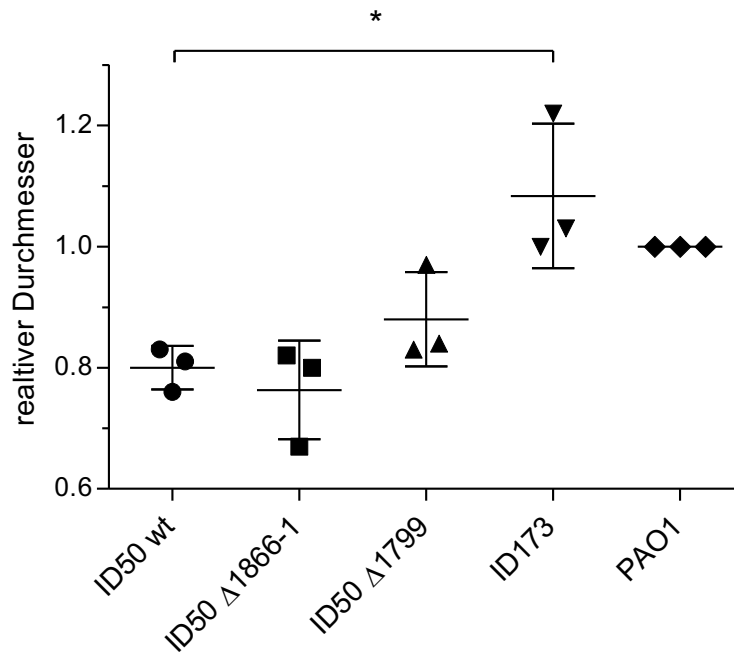
*P. aeruginosa* ist in der Lage sich über verschiedene Mechanismen fortzubewegen. Dazu gehören die hier untersuchten Fortbewegungsarten Swimming und Swarming, welche sich stark voneinander unterscheiden. Der wesentliche Faktor beim Swimming ist die Flagelle. Das Swarming ist dagegen wesentlich komplexer. Flagellen spielen hier ebenfalls eine Rolle, darüber hinaus aber auch Pili und Rhamnolipide, deren Produktion und Sekretion über Quorum-Sensing-Mechanismen gesteuert wird. Swimming ist in erster Linie eine Einzelleistung des Bakteriums, Swarming dagegen eine Kollektivleistung der Bakterienpopulation (Kearns 2010). Interessant ist die Motilität, da ihre Faktoren, wie z.B. Flagellen, immunogen wirken (Amiel et al. 2010). Das Gencluster eines Typ-4-Pilus-Systems, das für das Swarming eine Rolle spielen könnte, liegt in der Nähe des *helP*-Gens. Es könnte daher möglicherweise einen regulativen Einfluss ausüben. Overhage et al. (2008) konnten außerdem Swarming mit der erhöhten Expression von Virulenzfaktoren assoziieren.

### 3.2.1 „Swimming“

In die Mitte der 0,2 %igen Swimming-Agarplatten wurden mittels Impfnadel je 1  $\mu$ l konzentrierter Bakteriensuspension ( $OD_{600}$  3,5) eingebracht. Die beimpften Platten wurden bei 37 °C für 6 h inkubiert. In einem zweiten Experiment wurden beimpfte Swimming-Agarplatten bei 30 °C für 12 h inkubiert. Nach Inkubation wurde der Durchmesser der Ausbreitungsfläche der Bakterien gemessen (*Abb. 23*). In den Schaubildern sind die Mittelwerte der Duplikate für die drei Versuche abgebildet. Die mittleren Durchmesser von PAO1 wurden dabei auf 1 gesetzt und die Mittelwerte der anderen Stämme dazu in ein relatives Verhältnis gestellt – d.h. nach PAO1 normalisiert.

In beiden Experimenten schwamm ID173 wt signifikant besser als ID50 wt. Im Ersten bei 37 °C und 6 h Inkubation betrug der Durchmesser von ID173 wt im Mittel das 1,35-Fache von ID50 wt (*Abb. 21*). Im zweiten Experiment bei 30 °C und 12 h Inkubation lag dieser Unterschied beim 1,19-Fachen (*Abb. 22*). Die geringere Temperatur und längere Inkubationszeit dienten dazu, genauere Ergebnisse mit

kleinerer Standardabweichung zu erhalten. Zwischen ID50 wt und seinen Mutanten konnte hingegen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.



**Abbildung 21** Relative Durchmesser von ID50 wt, ID50 Δ1866-1, ID50 Δ1799, ID173 wt und PAO1 bei 37 °C nach 6 h. Es wurden drei Versuche in Duplikaten durchgeführt Die mittleren Durchmesser wurden nach PAO1 normalisiert. Welch-t-Test mit ID50 wt und ID173 durchgeführt: \*, P = 0,0446.

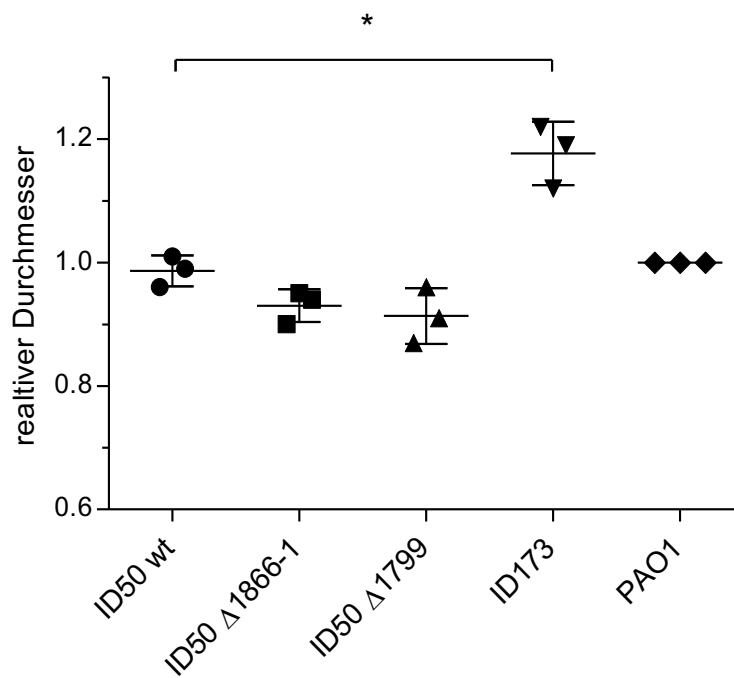


Abbildung 22 Relative Durchmesser von ID50 wt, ID50  $\Delta$ 1866-1, ID50  $\Delta$ 1799, ID173 wt und PAO1 bei 30 °C nach 12 h. Es wurden drei Versuche in Duplikaten durchgeführt Die mittleren Durchmesser wurden nach PAO1 normalisiert. Welch-t-Test mit ID50 wt und ID173 wt durchgeführt: \*, P = 0,0113.

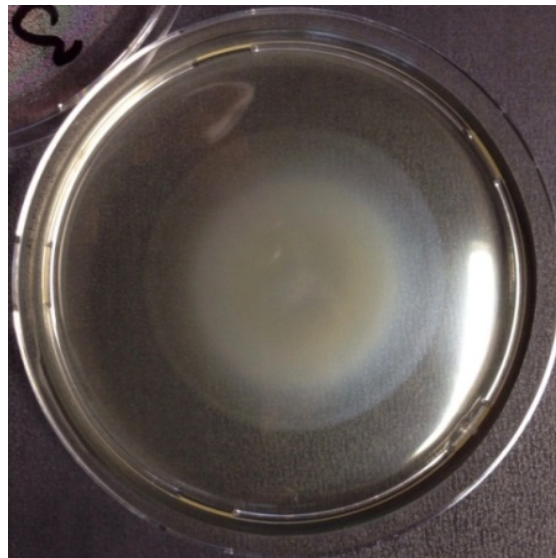


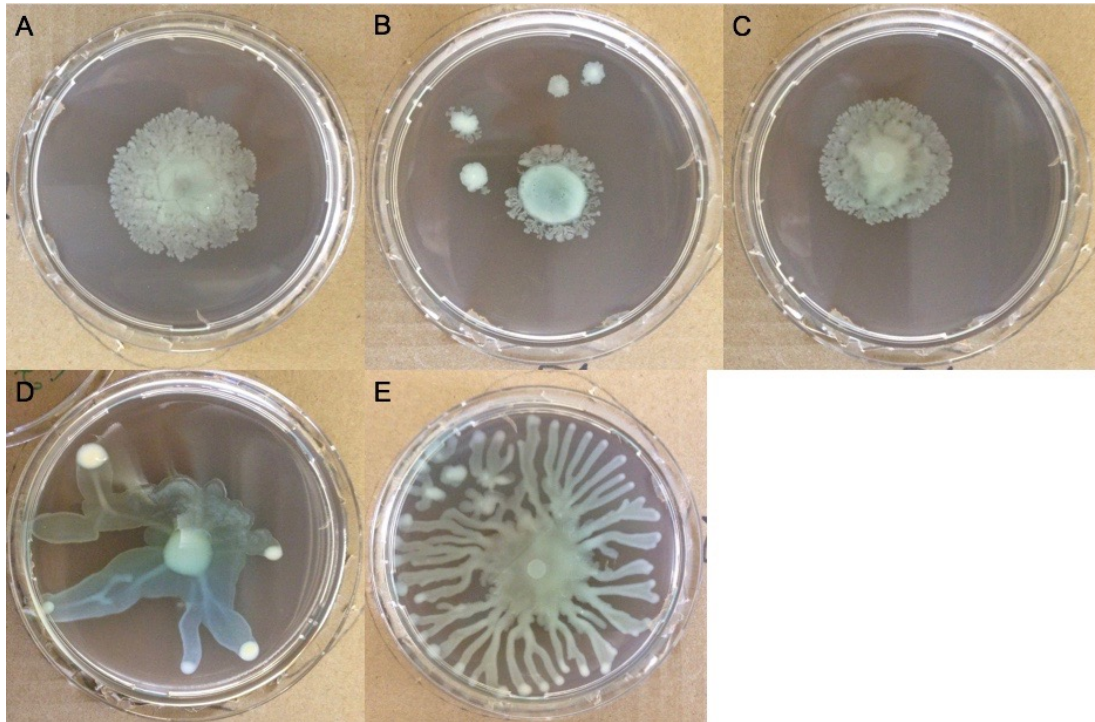
Abbildung 23 Beispiel einer Swimming-Agarplatte: ID50 wt, bei 30 °C für 12 h. Deutlich erkennbar ist der durch Swimming entstandene Randsaum der getrübbten Fläche, der die Ausbreitung der Bakterien vom Inokulationspunkt aus in Richtung Plattenrand anzeigt.

### 3.2.2 „Swarming“

Swarming ist eine weitere Fortbewegungsform von *P. aeruginosa*. Es wurden 0,5 %ige Swarming-Agarplatten verwendet. In der Mitte der Platte wurden 5 µl konzentrierte Bakteriensuspension (OD<sub>600</sub> 3,5) aufgebracht und die Platten bei 37 °C für 24 h inkubiert. Der Swarming-Agar wurde für die Mutanten mit dem pME6032-Plasmid zusätzlich mit 0,1 mM IPTG versetzt. Zum Vergleich wurden die pME6032-tragenden Mutanten ebenfalls auf regulären Swarming-Agarplatten ohne IPTG aufgebracht.

#### 1. Swarming des ID50 wt und der Deletionsmutante ID50 Δ1866-1

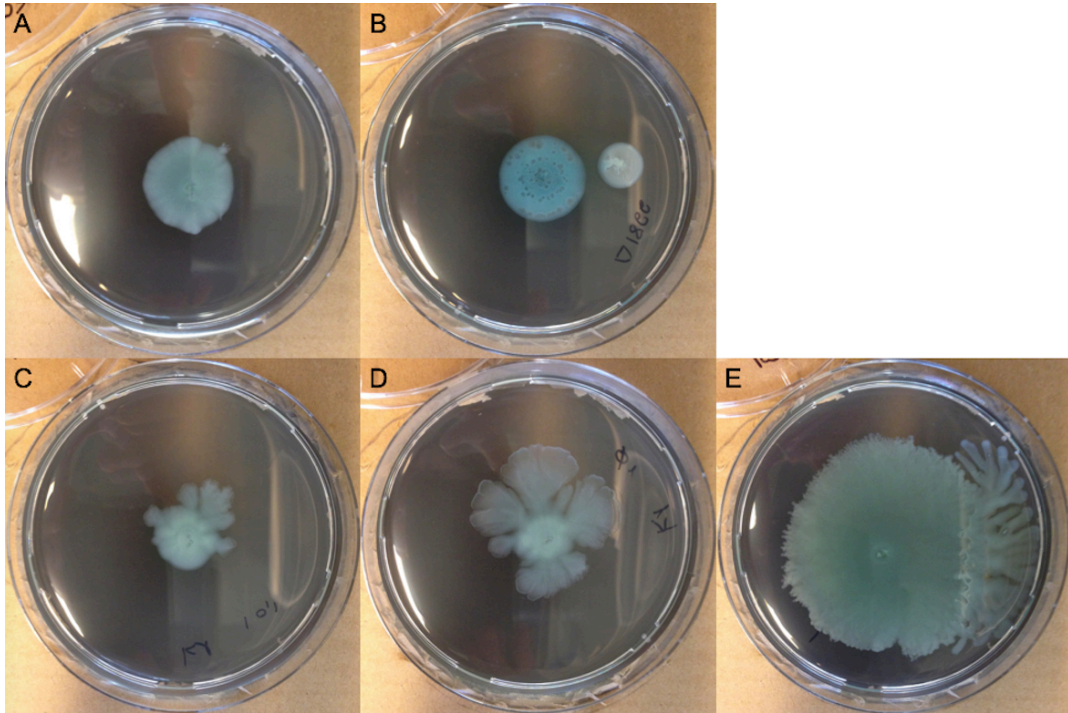
Es ergaben sich wesentliche Unterschiede zwischen den untersuchten Isolaten, insbesondere zwischen ID50 wt und seiner Mutante ID50 Δ1866-1. Der Wildtyp zeigte ein feines dendritisches Muster (Abb. 24A), wohingegen ID50 Δ1866-1 kaum schwärmte (Abb. 24B). Dieses Ergebnis könnte auf eine Beteiligung von *help* beim Swarming schließen lassen. Die Swarming-Muster von ID173 wt (Abb. 24D), von ID50 wt (Abb. 24A) und auch PAO1 (Abb. 24E) unterschieden sich ebenfalls. Das Muster von ID173 wt war deutlich größer und die zurückgelegte Strecke vom Inokulationspunkt war größer, verglichen zu ID50 wt. Das Muster von PAO1 bestand aus mittelgroben Dendriten und bedeckte bereits die gesamte Platte. Diese Differenzen legen zumindest eine unterschiedliche Regulierung des Swarmings in den drei Stämmen nahe. Im Vergleich zwischen ID50 wt und der ID50 Δ1799-Mutante war kein Unterschied festzustellen (Abb. 24A und C). Alle Isolate bildeten zudem ein blau-grünliches Pigment. PAO1 wurde in diesem Experiment in erster Linie als Positivkontrolle genutzt, da das Experiment sehr sensibel auf äußere Faktoren reagiert: Schwärmt PAO1 nicht, sind die Swarming-Agarplatten nicht optimal getrocknet.



**Abbildung 24** Repräsentative Aufnahme des Swarming-Musters von A) ID50 wt, B) ID50  $\Delta$ 1866-1, C) ID50  $\Delta$ 1799, D) ID173 wt, E) PAO1 auf Swarming-Agar nach 24 h.

## 2. Swarming der Deletionsmutante ID50 $\Delta$ 1866-1 und Komplementationsmutante ID50 $\Delta$ 1866-1 / pME6032::1866

Um zu zeigen, dass tatsächlich das Gen 1866 für den Unterschied zwischen ID50 wt und der Deletionsmutante verantwortlich war, wurde das Experiment mit einer komplementierten Mutante wiederholt. Die komplementierte Mutante ID50  $\Delta$ 1866-1 / pME6032::1866 wurde auf einem Swarming-Agar mit 0,1 mM IPTG und einmal ohne IPTG inkubiert (*Abb. 25C und D*). Das IPTG induzierte das Plasmid. Der Wildtyp schwärmte in diesem Versuch relativ schlecht (*Abb. 25A*). Die komplementierte Deletionsmutante (*Abb. 25C und D*) war aber im Gegensatz zur Deletionsmutante selbst (*Abb. 25B*) in der Lage zu schwärmen. Die komplementierte Mutante schwärmte schlechter, wenn sie mit IPTG induziert worden war (*Abb. 25C*).



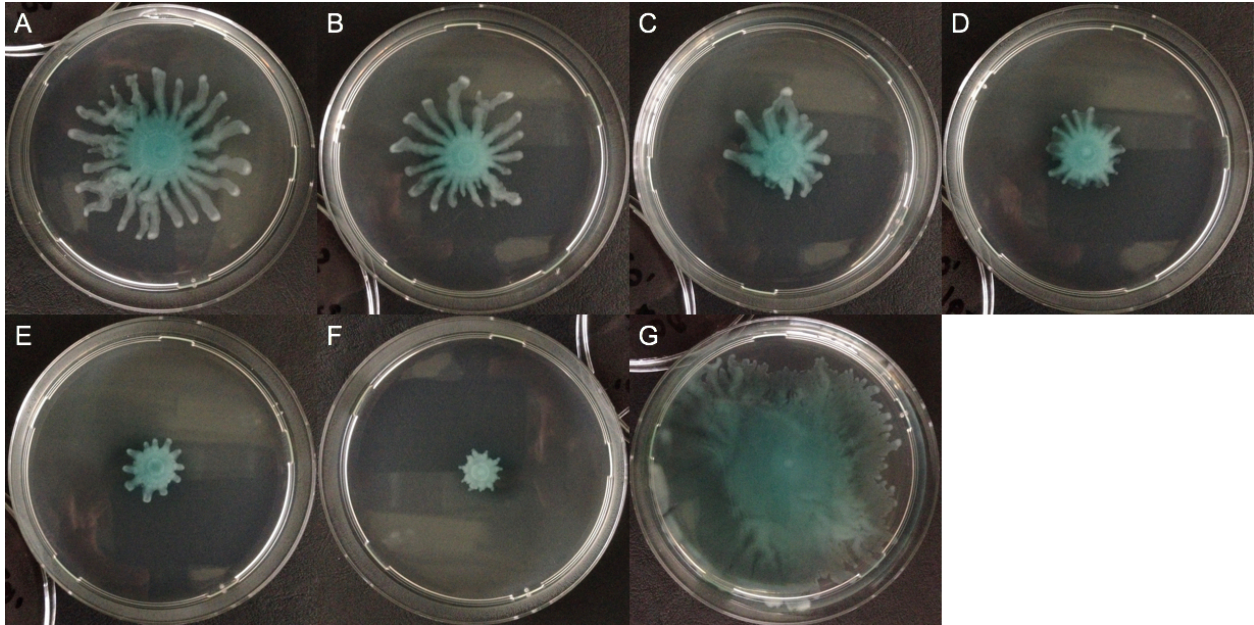
**Abbildung 25** Repräsentative Aufnahme des Swarming-Musters von A) ID50 wt, B) ID50  $\Delta$ 1866-1, C) ID50  $\Delta$ 1866-1 / pME6032::1866 mit 0,1 mM IPTG im Agar, D) ID50  $\Delta$ 1866-1 / pME6032::1866 ohne IPTG, E) PAO1 auf Swarming-Agar nach 24 h. Das Experiment wurde einmal in Duplikaten durchgeführt.

### 3. Swarming der Deletionsmutante ID50 $\Delta$ 1866-2

Im Verlauf der Arbeit zeigte ein mRNA-Expressionstest, dass die Deletionsmutante ID50  $\Delta$ 1866-1 noch das Gen 1866 / *helP* ablesen kann. Die genetische Instabilität dieser Mutante wurde in einer PCR-Analyse bestätigt: Zumindest ein Teil der Bakterien besaß noch das *helP*-Gen. Aus diesem Grund wurde das Swarming-Experiment mit der Deletionsmutante ID50  $\Delta$ 1866-2 wiederholt. Diese wurde aus einer anderen Einzelkolonie des ID50 wt hergestellt. Das Experiment wurde zwei Mal in Triplikaten durchgeführt.

In diesem Experiment zeigte ID50 wt ein Muster mit deutlichen Dendriten (Abb. 26A). Dessen Deletionsmutante ID50  $\Delta$ 1866-2 war ebenfalls in der Lage zu schwärmen und zeigte ein vergleichbares dendritisches Swarming-Muster (Abb. 26B). Die komplementierten Mutanten ID50  $\Delta$ 1866-2 / pME6032::1866 bildeten ebenfalls ein dendritisches Muster aus (Abb. 26C und D). Allerdings schwärmten sie schlechter als der Wildtyp und die Deletionsmutante ID50  $\Delta$ 1866-2.

Die Mutante allerdings, die nur mit dem Plasmid, aber ohne das *help*-Gen transformiert worden war, konnte so gut wie nicht schwärmen (Abb. 26E und F). IPTG behinderte auch in diesem Experiment das Swarming (Abb. 26D und F).



**Abbildung 26** Repräsentative Aufnahme des Swarming-Musters aus Versuch 2 von A) ID50 wt, B) ID50  $\Delta$ 1866-2, C) ID50  $\Delta$ 1866-2 / pME6032::1866 ohne IPTG, D) ID50  $\Delta$ 1866-2 / pME6032::1866 mit 0,1 mM IPTG im Agar, E) ID50  $\Delta$ 1866-2 / pME6032 ohne IPTG, F) ID50  $\Delta$ 1866-2 / pME6032 mit 0,1 mM IPTG im Agar, G) PAO1 auf Swarming-Agar nach 24 h. Das Experiment wurde zweimal in Triplikaten durchgeführt.

Um einen möglichen quantitativen Unterschied bezüglich des Swarmings festzustellen, wurden die Durchmesser verglichen und auf Signifikanz getestet. Die Deletionsmutante ID50  $\Delta$ 1866-2 (Abb. 27B) schwärmte im Mittel etwas schlechter als der Wildtyp (Abb. 27A). Dieser Unterschied erwies sich jedoch nicht als signifikant. Ein deutlicherer Unterschied zeigte sich im Vergleich der komplementierten Deletionsmutante (Abb. 27C und D) mit der Deletionsmutante, die lediglich mit dem Plasmid transformiert worden war (Abb. 27E und F). Die Unterschiede erreichten jedoch ebenso wenig ein signifikantes Niveau. Zu beachten sind allerdings die großen Differenzen innerhalb eines Isolats zwischen den Swarming-Durchmessern des ersten und denen des zweiten Versuchs. Diese Beobachtung betrifft gerade die komplementierte Deletionsmutante und die mit dem



Plasmid transformierte Mutante. Im jeweils ersten und im jeweils zweiten Versuch schwärmte die komplementierte Deletionsmutante (Abb. 26C und D) deutlich besser als die transformierte Mutante ohne *help* (Abb. 26E und F). Schlussendlich wird jedoch die Rolle von *help* beim Swarming von diesen Resultaten in Frage gestellt, insbesondere aufgrund des nicht signifikanten Unterschieds zwischen Wildtyp und Deletionsmutante.

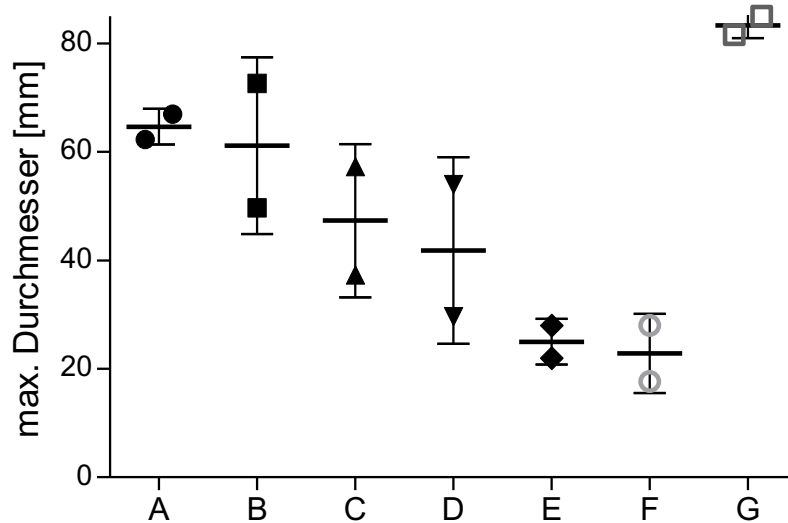


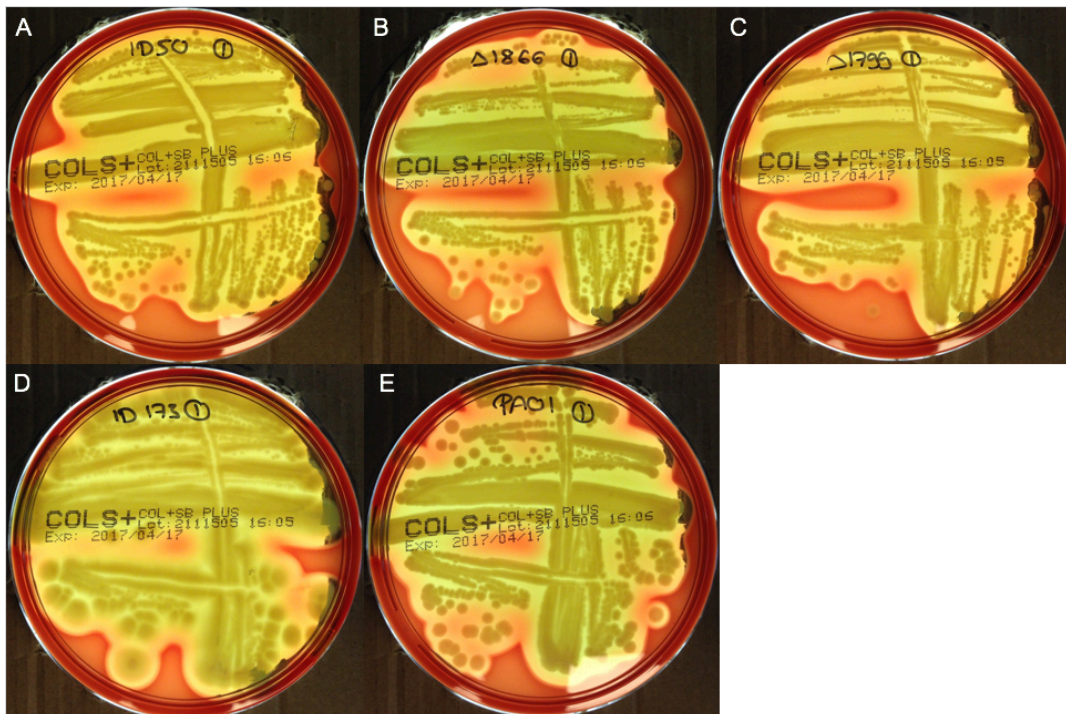
Abbildung 27 Durchmesser der Swarming-Muster nach 24 h) von A) ID50 wt, B) ID50 Δ1866-2, C) ID50 Δ1866-2 / pME6032::1866, D) ID50 Δ1866-2 / pME6032::1866 mit 0,1 mM IPTG im Agar, E) ID50 Δ1866-2 / pME6032, F) ID50 Δ1866-2 / pME6032 mit 0,1 mM IPTG im Agar, G) PAO1 auf Swarming-Agar. Dargestellt sind die Mittelwerte und die SD. Das Experiment wurde zweimal in Triplikaten durchgeführt.

### 3.3 Hämolytische Aktivität

β-Hämolysine sind porenformende Toxine, die es dem Bakterium erlauben, Erythrozyten zu lysieren. Dadurch erhalten die Bakterien Zugang zum Hämoglobin-Eisen. Eisen wiederum ist essentiell für die Vermehrung des Erregers. In Ergänzung zum Wachstumsexperiment in defibriniertem Schafblut, sollte deshalb die hämolytische Aktivität der verschiedenen Isolate überprüft werden. Unterschiede bezüglich der hämolytischen Aktivität verschiedener Stämme wurden bereits

beschrieben (Hrv et al. 2016). Die Bakterien wurden auf Blutagarplatten ausgestrichen, bei 37°C inkubiert und nach 48 h die hämolytische Aktivität bewertet. Der Virulenzfaktor ist auch deshalb interessant, da es sich bei ID50 wt und ID173 wt um Blutisolate handelt.

Bei der Inspektion fiel bei allen Platten eine Entfärbung des Agars um die Kolonien herum auf (Abb. 28). Alle untersuchten Isolate waren in der Lage, die Erythrozyten im Schafblutagar zu lysieren, ein qualitativer Unterschied zwischen ID50 wt, seinen Deletionsmutanten oder zu ID173 wt konnte demnach nicht festgestellt werden.

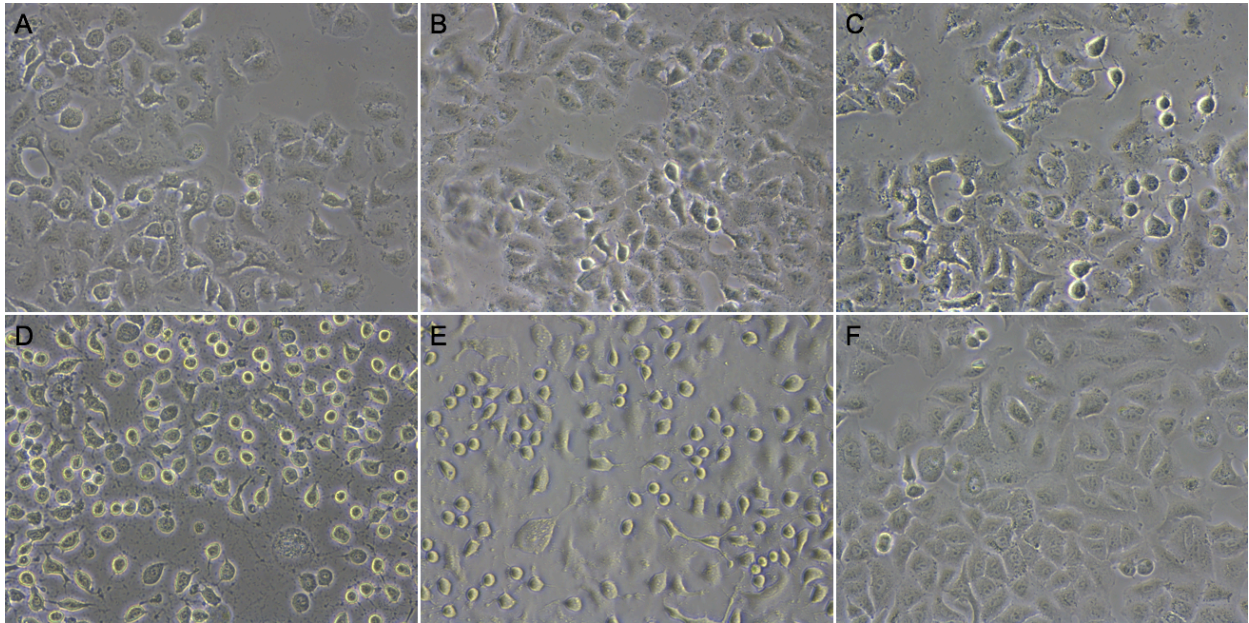


**Abbildung 28** Repräsentativer Dreiecksausstrich von A) ID50 wt, B) ID50  $\Delta$ 1866-1, C) ID50  $\Delta$ 1799, D) ID173 wt, E) PAO1 auf Schafblutagar, 42 h Inkubation bei 37 °C.

### 3.4 Zytotoxizitäts-Assay

Neben Hämolysinen kann *P. aeruginosa* eine Vielzahl anderer Faktoren produzieren, die auf menschliche Zellen toxisch wirken. Beispielhaft genannt seien die Effektorproteine des Typ-3-Sekretionssystems ExoS und ExoU oder das Pyocyanin (Hall et al. 2016; Hauser 2009). Ziel war es hier die Wirkung der zytotoxischen Virulenzfaktoren direkt zu untersuchen und etwaige Unterschiede zwischen den Isolaten aufzuzeigen. Dazu wurden immortalisierte Lungenepithelzellen (A549) mit den *P. aeruginosa*-Isolaten inkubiert und die Zytotoxizität dann anhand der Morphologie der Epithelzellen bestimmt.

Während in der nicht infizierten Kontrolle ein fast intakter Rasen morphologisch normaler A549-Zellen erkennbar war (Abb. 29F), zeigten die infizierten Epithelzellen deutliche Veränderungen. Bei ID173 wt (Abb. 29D) und PAO1 (Abb. 29E) waren die meisten Zellen zwar abgerundet, aber noch nicht abgelöst. Größere Lücken im Zellrasen waren nicht erkennbar. Im Gegensatz dazu zeigten sich bei ID50 wt nur wenige abgerundete Zellen (Abb. 29A). Allerdings fielen größere Lücken im Zellrasen auf, wo sich die Epithelzellen entweder abgelöst hatten oder nicht ausgesät worden waren. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei ID50  $\Delta$ 1799: Einige abgerundete Zellen und ein lückenhafter Zellrasen (Abb. 29C). Vergleich man jedoch ID50 wt mit der Deletionsmutante ID50  $\Delta$ 1866-1 (Abb. 29B) erschien der Zellrasen verhältnismäßig unversehrt. Es scheint, dass ID50 wt hier zytotoxischer wirkte als die Deletionsmutante ID50  $\Delta$ 1866-1 und ID173 wt. Die mit ID173 wt infizierten Zellen waren zwar vorwiegend abgerundet, aber noch nicht abgelöst wie bei ID50 wt.



**Abbildung 29** Repräsentative mikroskopische Aufnahmen (400x) von A549-Zellen nach Infektion mit A) ID50 wt, B) ID50  $\Delta$ 1866-1, C) ID50  $\Delta$ 1799, D) ID173 wt, E) PAO1 und F) nicht infizierte Kontrolle nach 3 h. Die MOI betrug 10. Die Zytotoxische Aktivität lässt sich qualitativ anhand der Morphologie oder Ablösen der A549-Zellen einschätzen.

### 3.5 Wachstum auf MacConkey-Agar

MacConkey-Agar dient in der mikrobiellen Diagnostik gewöhnlich als Selektivmedium für gramnegative Bakterien. Kristallviolett und Gallensalze inhibieren das Wachstum grampositiver Mikroorganismen. Zusätzlich kann zwischen Laktose fermentierenden Bakterien und Nonfermentern differenziert werden. Wird die Laktose abgebaut, führt dies zu einer Verringerung des pH-Wertes, sodass ein ebenfalls im Agar vorhandener Indikator nach rot umschlägt. *P. aeruginosa* gilt als Nonfermenter (Murray 1999). Da eine endogene Infektion des Blutes nach Translokation aus dem Verdauungstrakt des Patienten möglich ist (Defez et al. 2004), ist die Resistenz der Isolate und Mutanten gegenüber Gallensalzen von Interesse.

Alle untersuchten Isolate waren in der Lage auf MacConkey-Agar zu wachsen (Abb. 30). In der verwendeten Konzentration konnten die Gallensalze das Wachstum der Erreger nicht hemmen. Rot gefärbte Kolonien konnten nach 24 h nicht

nachgewiesen werden, somit war erwartungsgemäß keines der Isolate zum Laktoseabbau fähig.

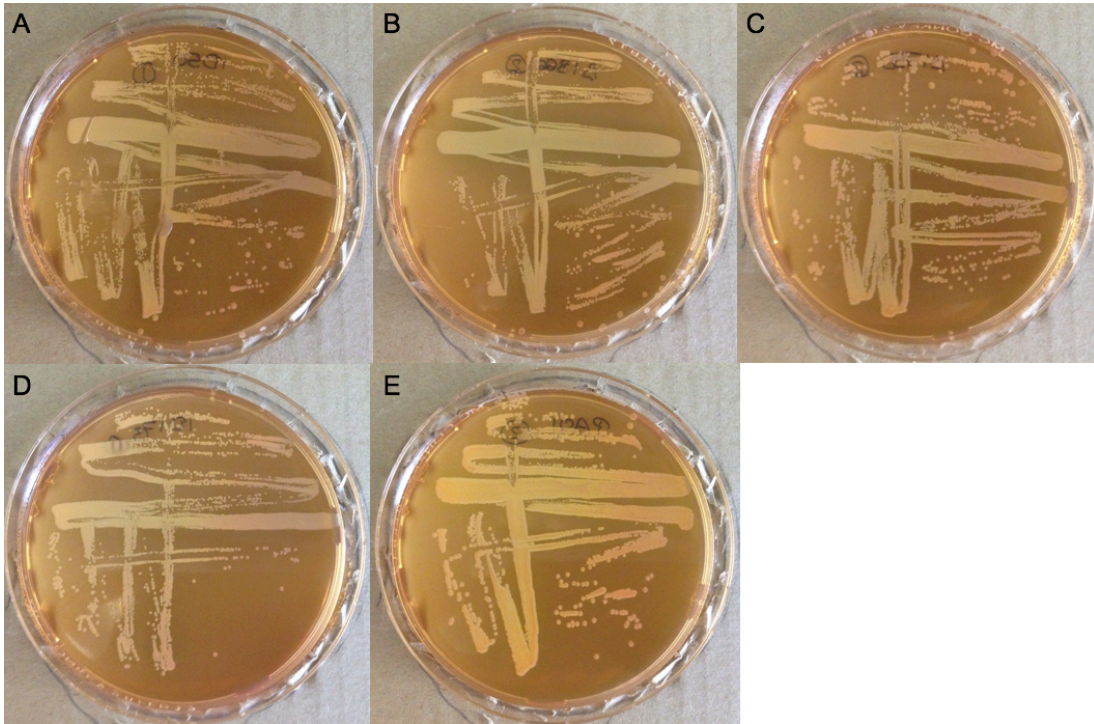
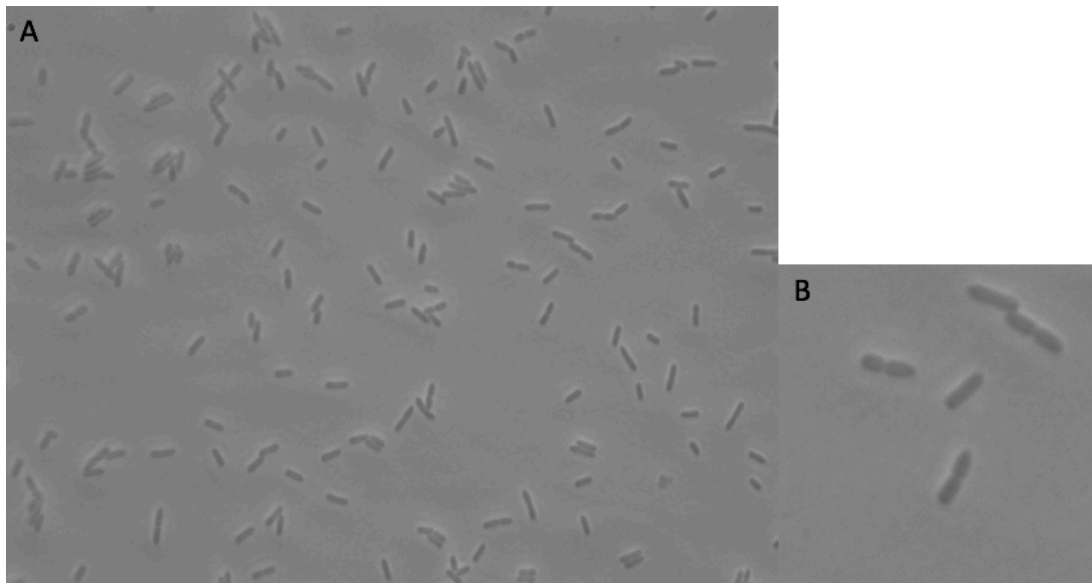


Abbildung 30 Dreißenausstrich von A) ID50 wt, B) ID50  $\Delta$ 1866-1, C) ID50  $\Delta$ 1799, D) ID173 wt, E) PAO1 auf MacConkey-Agar nach 24 h Inkubation bei 37 °C.

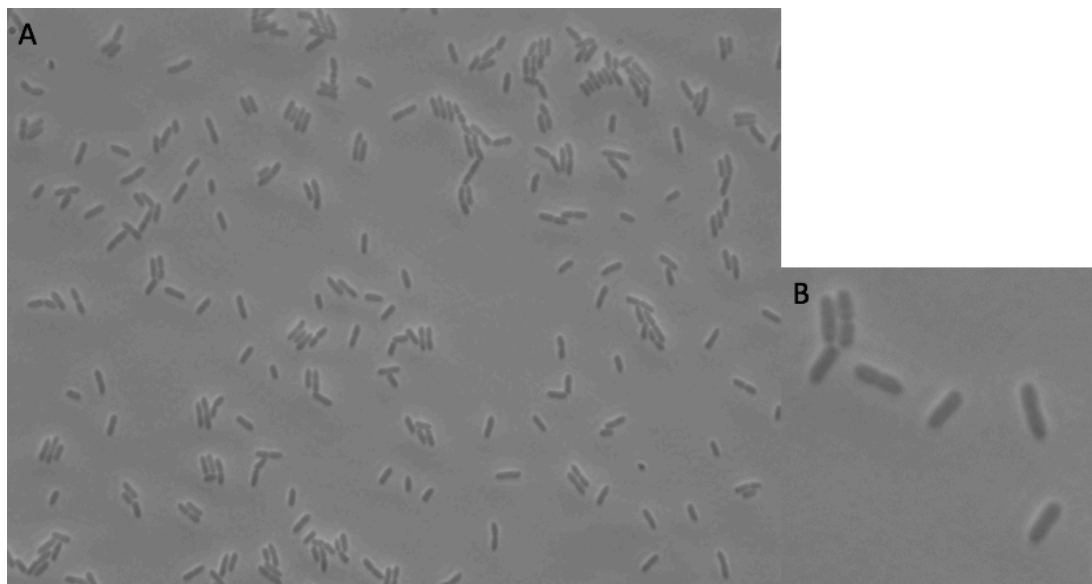
### 3.6 Lichtmikroskopische Betrachtung der *P. aeruginosa*-Isolate

*P. aeruginosa* ist ein stäbchenförmiges, gramnegatives Bakterium. Um die Morphologie der Isolate zu untersuchen, wurden diese mit dem DMRE-Mikroskop von Leica im Phasenkontrast mikroskopiert.

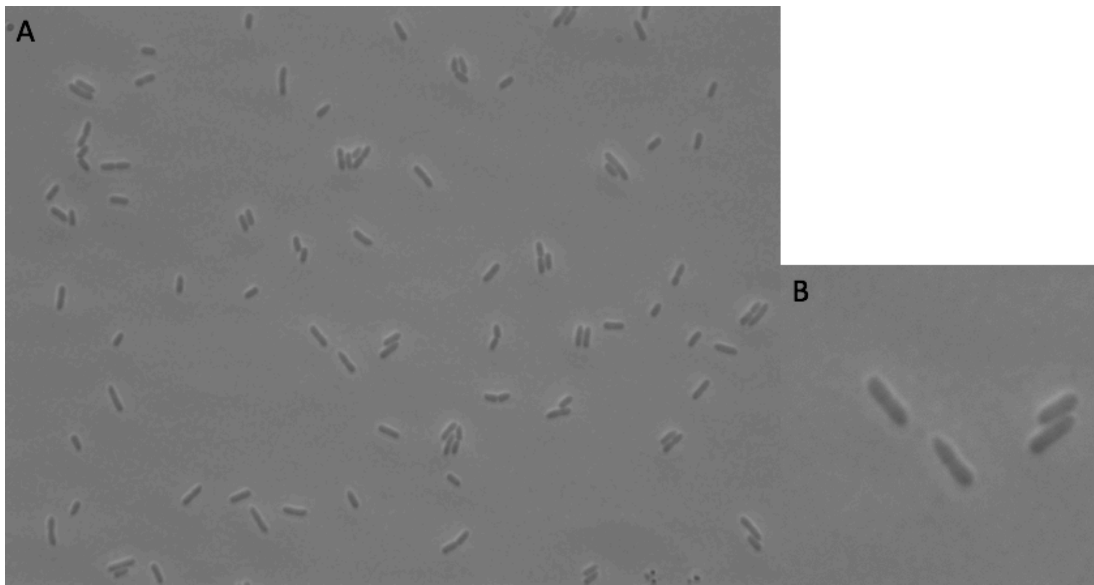
Die Bakterien wurden in LB-Medium angezüchtet und befanden sich zum Betrachtungszeitpunkt in der frühen exponentiellen Phase. Sie präsentierten sich erwartungsgemäß als Stäbchen. Teilungen konnten beobachtet werden. Offensichtliche Unterschiede bezüglich der Morphologie zwischen den Isolaten und den Mutanten waren nicht erkennbar (Abb. 31 bis 35).



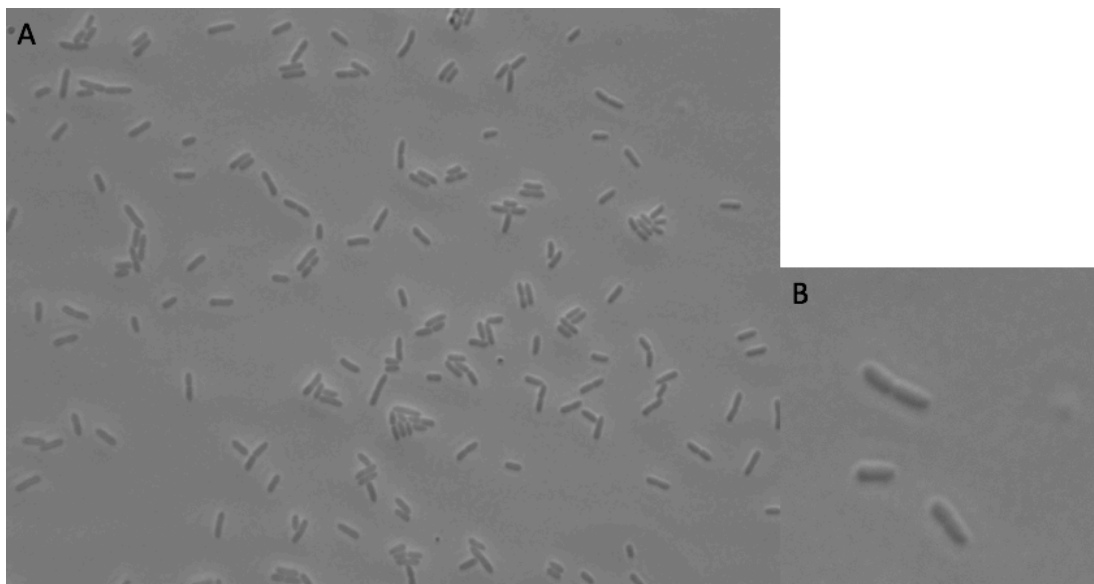
**Abbildung 31** Repräsentative mikroskopische Aufnahme von PAO1 nach Wachstum in LB bis zur exponentiellen Phase (1000x). A) Übersichtsaufnahme, B) Detailaufnahme.



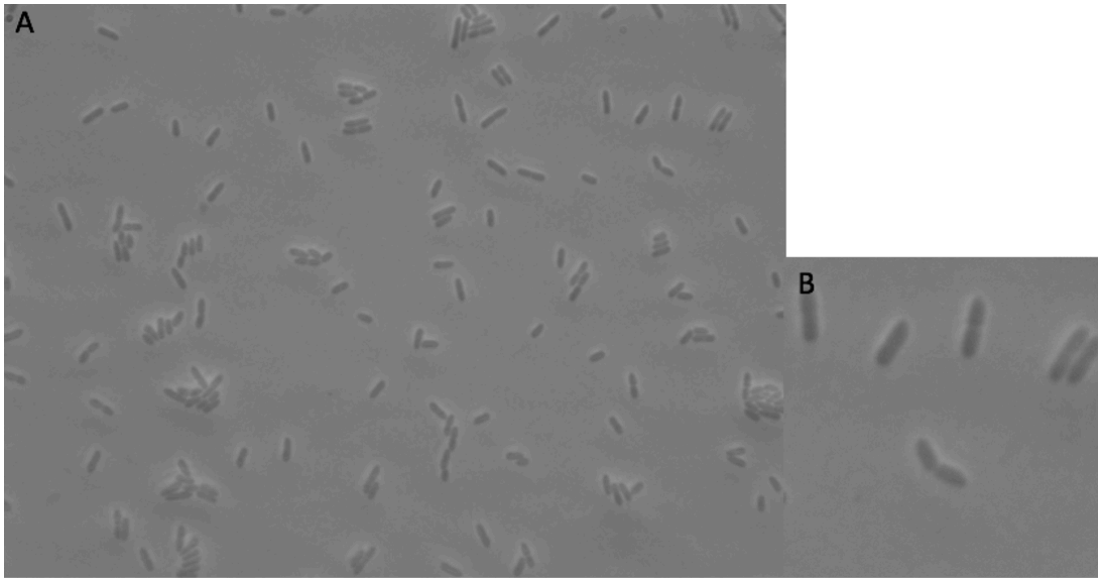
**Abbildung 32** Repräsentative mikroskopische Aufnahme von ID50 wt nach Wachstum in LB bis zur exponentiellen Phase (1000x). A) Übersichtsaufnahme, B) Detailaufnahme.



**Abbildung 33** Repräsentative mikroskopische Aufnahme von ID50  $\Delta$ 1866-1 nach Wachstum in LB bis zur exponentiellen Phase (1000x). A) Übersichtsaufnahme, B) Detailaufnahme.



**Abbildung 34** Repräsentative mikroskopische Aufnahme von ID50  $\Delta$ 1799 nach Wachstum in LB bis zur exponentiellen Phase (1000x). A) Übersichtsaufnahme, B) Detailaufnahme.



**Abbildung 35** Repräsentative mikroskopische Aufnahme von ID173 wt nach Wachstum in LB bis zur exponentiellen Phase (1000x). A) Übersichtsaufnahme, B) Detailaufnahme.



## 4 Diskussion

Diese Arbeit ist in die VARPA-Studie von Professor Dr. Matthias Willmann eingebettet, in deren Kontext 166 *P. aeruginosa*-Blutisolate aus Sepsispatienten gesammelt wurden. Dabei ergab die statistische Analyse, in die Genom-, Proteom- und Patientendaten miteinbezogen worden waren, ein erhöhtes HR für die Gene *help* und 1799 sowie für das ACC-Cluster 2. ID50 wt, positiv für die Gene *help*, 1799 und das ACC-Cluster 2, wurde als Hochrisiko-Isolat dem ID173 wt als Niedrigrisiko-Isolat gegenübergestellt. ID173 wt ist negativ für die Gene *help*, 1799 und das ACC-Cluster 2. Diese Arbeit stellt einen neuen Ansatz dar, bei dem erstmalig der Versuch angestrengt wurde klinisch und statistisch erfasste Virulenzunterschiede zweier klinischer Isolate sowie ausgewählter Gene phänotypisch zu untersuchen.

### 4.1 Zusammenhang zwischen Wachstum und Virulenz

In der vorliegenden Arbeit wurde insbesondere auf das Wachstum der verschiedenen Isolate unter standardisierten *in vitro*-Bedingungen eingegangen. Bereits mehrfach und für unterschiedliche Erreger konnte die Intensität der Bakteriämie mit der Schwere des Krankheitsverlaufes assoziiert werden: Rello et al. (2009) konnten für die Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* zeigen, dass mit der Erregerlast das Risiko für einen septischen Schock und die Mortalität ansteigen. Darüber hinaus konnte für *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* eine kurze Time-to-Positivity mit einer höheren Mortalität assoziiert werden (Liao et al. 2009; Marra et al. 2006; Palmer et al. 2013; Peralta et al. 2007). Die Time-to-Positivity ist die Zeit vom Start der Inkubation der Blutkulturen bis zum automatischen Alarmsignal des diagnostischen Blutkulturinstruments. Es wird davon ausgegangen, dass die Time-to-Positivity in erster Linie von der Erregeranzahl im Blut abhängt: Hohe Erregerzahl spiegelt sich in kürzerer Time-to-Positivity wider. Ein vergleichbares Ergebnis konnten Willmann, Kuebart, Vogel, et al. (2013) auch bereits für *P. aeruginosa* zeigen.

#### 4.1.1 Vergleich von ID50 wt und ID173 wt

Die Isolate wurden zunächst in LB-Medium angezchtet und ihr Wachstum gemessen. Im LB-Medium, einem Vollmedium, sollten sich die Isolate unter optimalen Bedingungen so stark wie möglich vermehren. In den folgenden Experimenten wurde die Anpassungsfähigkeit an unterschiedliche, suboptimale Umweltbedingungen untersucht. M9 als Minimalmedium mit Natriumcitrat als Kohlenstoffquelle sollte die entgegengesetzte Situation zum Wachstum in LB nachbilden: Wie gehen die Isolate mit einem restriktiven Nährstoffangebot um? Wie beeinflussen weiter pH und Temperatur das Wachstum? Zeigen sich die Isolate unterschiedlich anpassungsfähig?

Tatsächlich konnte beobachtet werden, dass sich ID50 wt und ID173 wt unterschiedlich stark vermehren. Durchweg zeigten sich signifikant und teilweise sehr stark differierende Wachstumskurven, so beispielsweise bei pH 5 in der exponentiellen Phase. Interessanterweise zeigte aber nicht ID50 wt das stärkere Wachstum, sondern ID173 wt. In LB betragen die Werte für die CFU/ml von ID173 wt in der exponentiellen Phase das rund 1,6-Fache der Werte von ID50 wt. Wobei sich die Werte in der stationären Phase wieder weitgehend angleichen.

Betrachtet man das Wachstum unter optimalen Bedingungen in LB zeigt ID173 wt prinzipiell eine stärkere Vermehrungsfähigkeit als ID50 wt. Auch scheint ID173 wt besser anpassungsfähig an veränderte Bedingungen zu sein. So war das Wachstum in M9 erwartungsgemäß geringer als in LB, doch vermehrte sich ID173 wt innerhalb der ersten 6 h mehr als doppelt so gut wie ID50 wt.

Diese Ergebnisse sprechen nicht dafür, dass die beobachteten Virulenzunterschiede auf die Vermehrungsfähigkeit zurückzuführen sind. Die Vermehrungsfähigkeit und die Anpassungsfähigkeit, die unter eng definierten *in vitro* Bedingungen getestet wurden, bedingen jedoch möglicherweise nur zum Teil die Erregerlast im Wirtsorganismus, bzw. in dessen Blut. Ein Hinweis darauf, dass sich die Situation *in vivo* anders darstellen könnte, erlaubt der Wachstumsversuch in defibriniertem Schafblut: Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Einschränkend muss angemerkt werden, dass aufgrund des visköseren Mediums im Vergleich zu LB, die Messgenauigkeit mutmaßlich geringer war und kleinere Unterschiede nicht

festgestellt werden konnten. Nichtsdestoweniger spiegelt der Versuch die physiologisch relevanteren Umweltbedingungen wider. Hier stehen Ressourcen wie beispielsweise Eisen nur in gebundener Form zur Verfügung und die Bakterien treten in Interaktion mit den zellulären und humoralen Faktoren des Immunsystems. Dies sind weitere Faktoren neben der Vermehrungsfähigkeit, die die Erregerlast beeinflussen könnten.

In Zusammenhang mit dieser Überlegung steht außerdem die Frage, wie ID50 wt die Ressourcen, die er nicht zur Vermehrung gebraucht, alternativ nutzt. Der Gedanke liegt nahe, dass ID50 wt mit den freien Ressourcen auch Faktoren produziert, die die beobachtete Virulenz bedingen. Solche Faktoren könnten den Erreger in die Lage versetzen, Barrieren des Körpers wie das Alveolarepithel besser zu penetrieren. Dies wiederum würde vermutlich eine höhere Bakteriämie und eine stärkere Entzündungsreaktion bedingen.

#### **4.1.2 Vergleich von ID50 wt mit den Deletionsmutanten ID50 $\Delta$ 1866-1 und ID50 $\Delta$ 1799**

Das Wachstum von ID50 wt wurde auch mit den Deletionsmutanten ID50  $\Delta$ 1866-1 und ID50  $\Delta$ 1799 verglichen. Der ursprünglichen Hypothese folgend, dass die Vermehrungsfähigkeit die Erregerlast wesentlich mitbeeinflusst, könnten diese mit deutlich erhöhtem HR assoziierten Gene, das Wachstum beeinflussen.

In den verschiedenen Versuchen zeigten sich tatsächlich immer wieder signifikante Unterschiede. Allerdings zeigten dabei die Deletionsmutanten das stärkere Wachstum. In der Zusammenschau muss festgestellt werden, dass es sich hierbei jedoch um punktuelle Unterschiede handelte und das Wachstum absolut nur um wenig differierte. Das Fehlen der Gene *helP* und 1799 übt demzufolge wohl keinen negativen Einfluss auf das Wachstum aus. Die Hypothese, dass die genannten Gene im direkten Zusammenhang mit dem Wachstum und der Vermehrungsfähigkeit stehen, sollte somit verworfen werden.

Die Beobachtung, dass die mit erhöhter HR assoziierten Gene nicht der unmittelbaren Vermehrungsfähigkeit dienen, passt wiederum zur vorangegangenen Beobachtung: Der virulentere Erreger wächst langsamer als der weniger virulente.

Damit lässt sich die Virulenz von ID50 wt im Vergleich zu ID173 wt sowie der Gene *helP* und 1799 wahrscheinlich nicht auf die Vermehrungsfähigkeit zurückführen.

#### **4.2 Zytotoxizitäts- und Biofilm-Assay weisen auf unterschiedlich starke Invasivität hin**

Die unterschiedlich starke Biofilmbildung und die möglichen Unterschiede bei der Zytotoxizität weisen in eine weitere Richtung. Dem aktuellen pathophysiologischen Konzept zur Sepsis folgend, spielen die zytokinvermittelten Reaktionen des Wirtsorganismus eine Hauptrolle bei der Entwicklung des Krankheitsbildes. Eine Bakteriämie ist häufig zu beobachten, aber nicht zwingend. Die Arbeit von Kurahashi et al. (1999) unterstreicht die Bedeutung des Zytokinaustritts aus dem Infektionsfokus in den systemischen Kreislauf. Die Arbeitsgruppe induzierte eine Pneumonie in einem Kaninchen-Modell, einmal mit einem zytotoxischen *P. aeruginosa*-Stamm und einmal mit einer nicht-zytotoxischen Mutante. Wildtyp und Mutante lösten beide starke TNF- $\alpha$ -Produktion im Alveolarraum aus. Beim zytotoxischen Wildtyp führte die Infektion zu einer gesteigerten Permeabilität des Alveolarepithels und zu einem TNF- $\alpha$ -Anstieg im Plasma sowie zu Sepsis mit Bakteriämie. Bei der nicht-zytotoxischen Mutante wurde keine gesteigerte Permeabilität beobachtet, die Pneumonie führte weder zu einem systemischen TNF- $\alpha$ -Anstieg noch zu Sepsis und Bakteriämie. Eine direkt intravenös induzierte Bakteriämie mit dem Wildtyp führte nicht zum Bild einer Sepsis.

In dieser Arbeit wurde die Zytotoxizität der Isolate an immortalisierten Lungenepithelzellen untersucht. Sowohl die Isolate ID50 wt und ID173 wt sowie die Deletionsmutanten ID50  $\Delta$ 1866-1 und ID50  $\Delta$ 1799 erwiesen sich als zytotoxisch. Die Epithelzellen, die mit ID173 wt inkubiert worden waren, zeigten sich morphologisch verändert, jedoch war der Zellrasen weitgehend intakt. Im Gegensatz dazu hatten sich die mit ID50 wt inkubierten Epithelzelle vermehrt abgelöst. Interessanterweise erschien der Zellrasen der Deletionsmutante ID50  $\Delta$ 1866-1 weniger angegriffen. Die Aussagekraft des Experiments wird dadurch eingeschränkt, dass keine quantitative Analyse erfolgt war. Dennoch ist die Beobachtung ein erstes,

starkes Indiz darauf, dass ID173 wt und ID50 wt unterschiedlich stark zytotoxisch wirken. Das Gen *help* scheint dabei Einfluss auf die Zytotoxizität zu nehmen.

Im Gegensatz zu ID50 wt scheint ID173 wt vermehrt zur Bildung von Biofilmen zu tendieren. Im entsprechenden Assay befanden sich im Biofilm von ID173 wt etwa 7x mehr Erreger. Biofilmbildung ist jedoch mit chronischen Infektionen und verringerter Virulenz assoziiert. Biofilme sind typisch für die Besiedelung der Lunge von CF-Patienten (Costerton et al. 1999; Hogardt et al. 2010). Hogardt et al. (2004) konnten darüber hinaus zeigen, dass das Typ-3-Sekretionssystem beim Wachstum im Biofilm über Zweikomponentensysteme herunterreguliert wird. Solch eine chronische Infektion geht mit einer konstanten, aber relativ leichten Entzündung einher. Diese führt zu einer progredienten Destruktion des umliegenden Gewebes, jedoch nicht zu einer überwältigenden, systemischen Entzündungsreaktion.

Weiterhin eröffnet das Swimming-Experiment eine weitere Perspektive. ID173 wt schwamm deutlich besser als ID50 wt und dessen Deletionsmutanten. Dies könnte als Hinweis darauf gewertet werden, dass es regulatorische oder strukturelle Unterschiede im Flagellarapparat gibt. Flagellen sind wesentlich für den Phänotyp verantwortlich und spielen im Rahmen der Infektion als Adhäsion eine wichtige Rolle (Kearns 2010; Arora et al. 1998). Darüber hinaus konnte bei unbegeißelten Mutanten ein Virulenzverlust im Mausmodell beobachtet werden (Montie et al. 1982). Andererseits ist der Hauptbestandteil der Flagelle, das Flagellin, stark immunogen und aktiviert Toll-like-Rezeptoren-5 (Hayashi et al. 2001; Zhang et al. 2005). Dies wiederum könnte eine bessere Eliminierung von ID173 wt durch das Immunsystem zur Folge haben.

Zytotoxizitäts- und Biofilm-Assay weisen darauf hin, dass Infektionen mit ID50 wt oder ID173 wt mit unterschiedlich starker Invasivität einhergehen und konsekutiv eine größere Menge an Zytokinen systemisch wirksam werden könnten. Die Unterschiede im Swimming-Verhalten werfen außerdem die Frage auf, ob das Immunsystem unterschiedlich stark auf die beiden Isolate reagiert. Gleichzeitig konnte höhere Virulenz nicht mit größerer Vermehrungsfähigkeit in Verbindung gebracht werden. Wobei die starke Evidenz bleibt, dass eine hohe Erregerlast im Blut mit einem schlechteren Krankheitsverlauf korreliert. Diese Beobachtung ließe sich

jedoch gut mit den Ergebnissen von Kurahashi et al. (1999) in Verbindung bringen: Eine Bakteriämie an sich scheint zwar im Vergleich zum Zytokinaustritt aus dem Infektionsfokus nur eine untergeordnete Rolle in der Sepsis zu spielen. Es ist aber denkbar, dass Bakteriämie und Zytokinaustritt beide von der Zytotoxizität und Invasivität des Erregers abhängen. Beide Phänomene würden demnach miteinander korrelieren. Die Erregerlast im Blut könnte damit als indirekter Marker für den Zytokinaustritt dienen. Dies würde die Bedeutung der Erregerlastbestimmung unterstreichen.

### **4.3 Exkurs zu den experimentellen Ergebnissen des chronischen *P. aeruginosa*-Isolats PAO1**

Der Laborstamm PAO1 diene als Vergleichsisolat bei den Untersuchungen der Blutisolate ID50 wt und ID173 wt, die eine akute Infektion verursacht hatten. PAO1 wurde ursprünglich 1955 aus einer Wunde isoliert. Die klinischen Umstände des Patienten sind nicht weiter bekannt. Man darf jedoch im Sinne der Originalpublikation (Holloway 1955) davon ausgehen, dass es sich um eine chronische Wunde bei einem ansonsten weitgehend immunkompetenten Patienten gehandelt haben dürfte. Hierheraus eröffnet sich noch eine weitere Perspektive, nämlich der Vergleich zum Isolat aus einer chronischen, nicht-invasiven Infektion.

Im Zytotoxizitäts-Assay zeigten die mit PAO1 und ID173 wt infizierten Lungenepithelzellen interessanterweise eine ähnliche Morphologie: Sie waren größtenteils abgerundet, bei weitgehend erhaltenem Zellrasen. Die Epithelzellen, die mit ID50 wt inkubiert worden waren, waren morphologisch weniger stark verändert, hatten sich aber vermutlich vermehrt abgelöst. Das Hochrisiko-Isolat ID50 wt interagierte in diesem *in vitro*-Versuch auf andere Art und Weise mit den Lungenepithelzellen als PAO1 und das Niedrigrisiko-Isolat ID173 wt. Die beiden letzteren könnten vielleicht auf ähnliche Art und Weise mit den Lungenepithelzellen interagiert haben. Vor dem Hintergrund, dass ID50 wt und ID173 wt wahrscheinlich unterschiedlich virulent sind, ist dieses Experiment ein Hinweis darauf, dass dies möglicherweise in einer unterschiedlich starken Zytotoxizität begründet liegen könnte. Darüber hinaus ist es ein möglicher Hinweis darauf, dass auch PAO1 als

chronisches Isolat primär weniger virulent sein könnte, gegebenenfalls aufgrund einer schwächeren Zytotoxizität.

In den Swimming-Versuchen nahm PAO1 tendenziell einen Platz zwischen ID50 wt und ID173 wt ein. In den Swarming-Versuchen zeigte PAO1 hingegen durchgehend die stärkste Oberflächenbeweglichkeit. Es erscheint naheliegend, dass eine stark entwickelte Swarming-Fähigkeit bei einer Wundinfektion aus Erregersicht sehr vorteilhaft sein kann.

In der Zusammenschau sind diese Versuchsergebnisse erste Hinweise auf die äußerst komplexen Wechselwirkungen, die bei einer Infektion zwischen Erreger und Wirt auftreten, bzw. zwischen dessen Virulenzfaktoren, dem Infektionsfokus und dem Immunsystem. Die Auseinandersetzung mit den Bedingungen für akute und chronische *P. aeruginosa*-Infektionen und den Unterschieden zwischen beiden Formen, würde ein weiteres interessantes Forschungsfeld eröffnen. Es ist denkbar, auf diese Weise wichtige bakterielle Faktoren zu identifizieren, die der Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Ansätze dienen können.

#### **4.4 Ausblick**

Um den möglichen Unterschieden zwischen ID50 wt und ID173 wt in Bezug auf die Invasivität nachzugehen, sollte zunächst die Zytotoxizität der Isolate und deren Mutanten quantitativ *in vitro* bestimmt werden. In einem zweiten Schritt würde sich ein *in vivo*-Versuch anbieten, angelehnt an das Vorgehen bei Kurahashi et al. (1999). In diesem wären folgende Fragen für die einzelnen Isolate zu klären:

- Wie stark erhöht sich die Permeabilität des Alveolarepithels bei einer Pneumonie?
- Wie hoch steigt die Zytokinkonzentrationen systemisch und in der Lunge?
- Wie hoch ist die Erregerlast im Blut, wie hoch in den Lungen der Versuchstiere?
- Wie korrelieren die Zytokinkonzentration und die Erregerlast?
- Wie verändern sich im Verlauf die physiologischen Parameter Blutdruck, Herzzeitvolumen sowie labormedizinisch der Basenexzess?

- Wie korrelieren Erregerlast im Blut und Überleben der Versuchstiere?

Ausgehend von der Zytotoxizität *in vitro*, wird *in vivo* die Schädigung des Alveolarepithels über dessen Permeabilitätssteigerung quantifiziert. Hierzu kann radioaktiv-markiertes Albumin verwendet werden (Wiener-Kronish et al. 1991). Dieses wird gemeinsam mit den Bakterien appliziert und im Verlauf die in den Blutkreislauf übergetretene Menge bestimmt. Als für die Sepsis wesentliches Zytokin kann TNF- $\alpha$  im Blut bestimmt werden, parallel dazu die Erregerlast. Die Stärke der Entzündungsreaktion und die Erregerlast im Infektionsfokus selbst sollten ebenfalls quantifiziert werden. Zur Messung der TNF- $\alpha$ -Konzentration im Infektionsfokus, wird am Ende des Experiments den Versuchstieren die Lunge entnommen und eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt. In der gewonnenen Flüssigkeit wird die TNF- $\alpha$ -Konzentration bestimmt. Zur Messung der Erregerlast wird ebenfalls am Ende des Experiments den Versuchstieren die Lunge entnommen, diese anschließend homogenisiert und daraus die CFU bestimmt. Während des Beobachtungszeitraums wird der klinische Zustand der Versuchstiere festgehalten. Zuletzt sollte die Erregerlast im Blut und das Überleben korreliert werden. Um die Bedeutung der Bakteriämie selbst für die Sepsis einzuschätzen, sollten Erreger ebenfalls direkt intravenös verabreicht werden und im Verlauf TNF- $\alpha$  bestimmt und der klinische Verlauf beobachtet werden. Von Interesse ist nun, inwieweit die genannten Parameter miteinander korrelieren und zwischen den Isolaten differieren. Dieses Experiment könnte möglicherweise weitere Hinweise auf die Mechanismen und Unterschiede im Hinblick auf die Virulenz der verschiedenen Isolate liefern. Außerdem würde es die Zusammenhänge zwischen Erregerlast und Krankheitsverlauf erhellen helfen und gegebenenfalls die Bedeutung der Erregerlast im Blut als Prädiktor unterstreichen.



## 5 Zusammenfassung

Insbesondere die durch *P. aeruginosa* ausgelöste Sepsis ist mit einer hohen Mortalität assoziiert. Die Wechselwirkungen in der akuten Infektion zwischen diesem Erreger und dem Wirtsorganismus sind aber bisher weitestgehend unbekannt. Welche Rolle die genetische Ausstattung von *P. aeruginosa* spielt, war Gegenstand einer vorangegangenen Studie, in der die Genome verschiedener *P. aeruginosa*-Blutisolate von Sepsispatienten sequenziert worden waren. Das Vorhandensein der Gene 1799 und 1866, genannt *helP*, konnte dabei jeweils mit erhöhter Mortalität assoziiert werden. Die Funktion der Gene ist allerdings unbekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, die statistischen Ergebnisse der genetischen Untersuchung mit phänotypischen Unterschieden in Verbindung zu bringen. Es wurden erstmalig zwei klinische Blutisolate von Sepsispatienten, mit wahrscheinlich unterschiedlicher Virulenz, *in vitro* miteinander verglichen: ID50 wt wurde als Hochrisiko-Isolat eingeschätzt und trägt die mortalitätsassoziierten Gene 1799 und *helP*. Das zweite Isolat ID173 wt trägt diese Gene hingegen nicht und wurde als Niedrigrisiko-Isolat gewertet. Um die Bedeutung der zwei Gene näher zu beleuchten, wurde das ID50-Wildtypisolat mit seiner Deletionsmutante des jeweiligen Gens verglichen.

Die Höhe der Erregerlast im Blut konnte bereits mit dem Krankheitsverlauf assoziiert werden. Daher konzentrierte sich diese Arbeit auf die Vermehrungsfähigkeit der Erreger unter unterschiedlichen *in vitro*-Bedingungen. Ein Zusammenhang zwischen Vermehrungsfähigkeit und Erregervirulenz konnte jedoch nicht festgestellt werden. Ein Zusammenhang zwischen der Vermehrungsfähigkeit und den mortalitätsassoziierten Genen 1799 und *helP* konnte ebenfalls nicht gezeigt werden. Dahingegen weisen Zytotoxizitäts- und Biofilm-Assay auf eine unterschiedlich starke Invasivität der beiden Erreger hin. Dieser Ansatz sollte nun weiterverfolgt werden, da die Invasivität mit der Erregerlast im Blut potenziell in engem Zusammenhang steht.

## 6 Literaturverzeichnis

- Ader, F., R. Le Berre, K. Faure, P. Gosset, O. Epaulard, B. Toussaint, B. Polack, E. Nowak, N. B. Viget, E. Kipnis, and B. P. Guery. 2005. 'Alveolar response to *Pseudomonas aeruginosa*: role of the type III secretion system', *Infect Immun*, 73: 4263-71.
- Aird, W. C. 2003. 'The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome', *Blood*, 101: 3765-77.
- Alobaidi, R., R. K. Basu, S. L. Goldstein, and S. M. Bagshaw. 2015. 'Sepsis-associated acute kidney injury', *Semin Nephrol*, 35: 2-11.
- Aloush, V., S. Navon-Venezia, Y. Seigman-Igra, S. Cabili, and Y. Carmeli. 2006. 'Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact', *Antimicrob Agents Chemother*, 50: 43-8.
- Amiel, E., R. R. Lovewell, G. A. O'Toole, D. A. Hogan, and B. Berwin. 2010. 'Pseudomonas aeruginosa evasion of phagocytosis is mediated by loss of swimming motility and is independent of flagellum expression', *Infect Immun*, 78: 2937-45.
- Angus, D. C., W. T. Linde-Zwirble, J. Lidicker, G. Clermont, J. Carcillo, and M. R. Pinsky. 2001. 'Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care', *Crit Care Med*, 29: 1303-10.
- Arora, S. K., B. W. Ritchings, E. C. Almira, S. Lory, and R. Ramphal. 1998. 'The *Pseudomonas aeruginosa* flagellar cap protein, FliD, is responsible for mucin adhesion', *Infect Immun*, 66: 1000-7.
- Ayliffe, G. A., J. R. Babb, B. J. Collins, E. J. Lowbury, and S. W. Newsom. 1974. '*Pseudomonas aeruginosa* in hospital sinks', *Lancet*, 2: 578-81.
- Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao. 1997. 'The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12', *Science*, 277: 1453-62.
- Bodey, G. P., L. Jadeja, and L. Elting. 1985. '*Pseudomonas* bacteremia. Retrospective analysis of 410 episodes', *Arch Intern Med*, 145: 1621-9.
- Brealey, D., M. Brand, I. Hargreaves, S. Heales, J. Land, R. Smolenski, N. A. Davies, C. E. Cooper, and M. Singer. 2002. 'Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock', *Lancet*, 360: 219-23.
- Breidenstein, E. B., C. de la Fuente-Nunez, and R. E. Hancock. 2011. '*Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance', *Trends Microbiol*, 19: 419-26.
- Buret, A., and A. W. Cripps. 1993. 'The immunoevasive activities of *Pseudomonas aeruginosa*. Relevance for cystic fibrosis', *Am Rev Respir Dis*, 148: 793-805.

- Burrows, Lori L. 2012. 'Pseudomonas aeruginosa Twitching Motility: Type IV Pili in Action', *Annual Review of Microbiology*, 66: 493-520.
- Carmeli, Y., N. Troillet, G. M. Eliopoulos, and M. H. Samore. 1999. 'Emergence of antibiotic-resistant Pseudomonas aeruginosa: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents', *Antimicrob Agents Chemother*, 43: 1379-82.
- Carter, Michelle Qiu, Jianshun Chen, and Stephen Lory. 2010. 'The Pseudomonas aeruginosa Pathogenicity Island PAPI-1 Is Transferred via a Novel Type IV Pilus', *J Bacteriol*, 192: 3249-58.
- Ceri, H., M. E. Olson, C. Stremick, R. R. Read, D. Morck, and A. Buret. 1999. 'The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms', *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 1771-76.
- Church, D., S. Elsayed, O. Reid, B. Winston, and R. Lindsay. 2006. 'Burn wound infections', *Clin Microbiol Rev*, 19: 403-34.
- Cordin, Olivier, Josette Banroques, N. Kyle Tanner, and Patrick Linder. 2006. 'The DEAD-box protein family of RNA helicases', *Gene*, 367: 17-37.
- Cornelissen, C. N., and P. F. Sparling. 1994. 'Iron piracy: acquisition of transferrin-bound iron by bacterial pathogens', *Mol Microbiol*, 14: 843-50.
- Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg. 1999. 'Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections', *Science*, 284: 1318-22.
- D'Argenio, D. A., L. A. Gallagher, C. A. Berg, and C. Manoil. 2001. 'Drosophila as a model host for Pseudomonas aeruginosa infection', *J Bacteriol*, 183: 1466-71.
- Dacheux, D., B. Toussaint, M. Richard, G. Brochier, J. Croize, and I. Attree. 2000. 'Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis isolates induce rapid, type III secretion-dependent, but ExoU-independent, oncosis of macrophages and polymorphonuclear neutrophils', *Infect Immun*, 68: 2916-24.
- Davey, M. E., and A. O'Toole G. 2000. 'Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics', *Microbiol Mol Biol Rev*, 64: 847-67.
- de Kievit, T. R., and B. H. Iglewski. 2000. 'Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships', *Infect Immun*, 68: 4839-49.
- Defez, C., P. Fabbro-Peray, N. Bouziges, A. Gouby, A. Mahamat, J. P. Daures, and A. Sotto. 2004. 'Risk factors for multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa nosocomial infection', *J Hosp Infect*, 57: 209-16.
- Diaz, M. H., C. M. Shaver, J. D. King, S. Musunuri, J. A. Kazzaz, and A. R. Hauser. 2008. 'Pseudomonas aeruginosa induces localized immunosuppression during pneumonia', *Infect Immun*, 76: 4414-21.
- Donlan, R. M. 2001. 'Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process', *Clin Infect Dis*, 33: 1387-92.
- Donlan, R. M., and J. W. Costerton. 2002. 'Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms', *Clin Microbiol Rev*, 15: 167-93.

- Doring, G., S. P. Conway, H. G. Heijerman, M. E. Hodson, N. Hoiby, A. Smyth, and D. J. Touw. 2000. 'Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus', *Eur Respir J*, 16: 749-67.
- Doring, G., C. Meisner, M. Stern, and Group Flagella Vaccine Trial Study. 2007. 'A double-blind randomized placebo-controlled phase III study of a *Pseudomonas aeruginosa* flagella vaccine in cystic fibrosis patients', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 11020-5.
- ECDC. 2013. "Point Prevalence Survey of Healthcare-Associated Infections and Antimicrobial Use in European Acute Care Hospitals." In.
- . 2015. "Annual epidemiological report 2014. Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections." In.
- . 2018. "Surveillance of antimicrobial resistance in Europe – Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017." In.
- El-Solh, A. A., A. Hattemer, A. R. Hauser, A. Alhajhusain, and H. Vora. 2012. 'Clinical outcomes of type III *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia', *Crit Care Med*, 40: 1157-63.
- Engel, L. S., J. M. Hill, J. M. Moreau, L. C. Green, J. A. Hobden, and R. J. O'Callaghan. 1998. '*Pseudomonas aeruginosa* protease IV produces corneal damage and contributes to bacterial virulence', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39: 662-5.
- Engelmann, B., and S. Massberg. 2013. 'Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity', *Nat Rev Immunol*, 13: 34-45.
- Estahbanati, H. K., P. P. Kashani, and F. Ghanaatpisheh. 2002. 'Frequency of *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics', *Burns*, 28: 340-8.
- Falagas, M. E., and S. K. Kasiakou. 2006. 'Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies', *Crit Care*, 10: R27.
- Feltman, H., G. Schulert, S. Khan, M. Jain, L. Peterson, and A. R. Hauser. 2001. 'Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*', *Microbiology*, 147: 2659-69.
- Finck-Barbancon, V., J. Goranson, L. Zhu, T. Sawa, J. P. Wiener-Kronish, S. M. Fleiszig, C. Wu, L. Mende-Mueller, and D. W. Frank. 1997. 'ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury', *Mol Microbiol*, 25: 547-57.
- Fleiszig, S. M., D. J. Evans, N. Do, V. Vallas, S. Shin, and K. E. Mostov. 1997. 'Epithelial cell polarity affects susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* invasion and cytotoxicity', *Infect Immun*, 65: 2861-7.
- Fridkin, S. K., and R. P. Gaynes. 1999. 'Antimicrobial resistance in intensive care units', *Clin Chest Med*, 20: 303-16, viii.
- Frithz-Lindsten, E., Y. Du, R. Rosqvist, and A. Forsberg. 1997. 'Intracellular targeting of exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* via type III-dependent

translocation induces phagocytosis resistance, cytotoxicity and disruption of actin microfilaments', *Mol Microbiol*, 25: 1125-39.

- Ganter, M. T., J. Roux, G. Su, S. V. Lynch, C. S. Deutschman, Y. G. Weiss, S. C. Christiaans, B. Myazawa, E. Kipnis, J. P. Wiener-Kronish, M. Howard, and J. F. Pittet. 2009. 'Role of small GTPases and alphavbeta5 integrin in Pseudomonas aeruginosa-induced increase in lung endothelial permeability', *Am J Respir Cell Mol Biol*, 40: 108-18.
- Gao, H., T. W. Evans, and S. J. Finney. 2008. 'Bench-to-bedside review: sepsis, severe sepsis and septic shock - does the nature of the infecting organism matter?', *Crit Care*, 12: 213.
- Goehring, U. M., G. Schmidt, K. J. Pederson, K. Aktories, and J. T. Barbieri. 1999. 'The N-terminal domain of Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases', *J Biol Chem*, 274: 36369-72.
- Gooderham, W. J., and R. E. Hancock. 2009. 'Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in Pseudomonas aeruginosa', *FEMS Microbiol Rev*, 33: 279-94.
- Green, Sylvia K., Milton N. Schroth, John J. Cho, Spyros D. Kominos, and Vilma B. Vitanza-Jack. 1974. 'Agricultural Plants and Soil as a Reservoir for Pseudomonas aeruginosa', *Applied Microbiology*, 28: 987-91.
- Gregory, D. W., and W. Schaffner. 1987. 'Pseudomonas infections associated with hot tubs and other environments', *Infect Dis Clin North Am*, 1: 635-48.
- Hahn, H. P. 1997. 'The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of Pseudomonas aeruginosa--a review', *Gene*, 192: 99-108.
- Hall, S., C. McDermott, S. Anoopkumar-Dukie, A. J. McFarland, A. Forbes, A. V. Perkins, A. K. Davey, R. Chess-Williams, M. J. Kiefel, D. Arora, and G. D. Grant. 2016. 'Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of Pseudomonas aeruginosa', *Toxins (Basel)*, 8.
- Hattemer, A., A. Hauser, M. Diaz, M. Scheetz, N. Shah, J. P. Allen, J. Porhomayon, and A. A. El-Solh. 2013. 'Bacterial and clinical characteristics of health care- and community-acquired bloodstream infections due to Pseudomonas aeruginosa', *Antimicrob Agents Chemother*, 57: 3969-75.
- Hauser, A. R. 2009. 'The type III secretion system of Pseudomonas aeruginosa: infection by injection', *Nat Rev Microbiol*, 7: 654-65.
- Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill, and A. Aderem. 2001. 'The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5', *Nature*, 410: 1099-103.
- Hempenstall, A., G. D. Grant, S. Anoopkumar-Dukie, and P. J. Johnson. 2015. 'Pyocyanin inhibits both nitric oxide-dependent and -independent relaxation in porcine coronary arteries', *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 42: 186-91.
- Henderson, F. C., O. L. Miakotina, and R. K. Mallampalli. 2006. 'Proapoptotic effects of P. aeruginosa involve inhibition of surfactant phosphatidylcholine synthesis', *J Lipid Res*, 47: 2314-24.

- Hof, Herbert, and Rüdiger Dörries. 2014. *Medizinische Mikrobiologie : [Virologie, Bakteriologie, Mykologie, Parasitologie, Immunologie, klinische Infektiologie, Hygiene]* (Thieme: Stuttgart).
- Hogardt, M., and J. Heesemann. 2010. 'Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung', *Int J Med Microbiol*, 300: 557-62.
- Hogardt, M., M. Roeder, A.M. Schreff, L. Eberl, and J. Heesemann. 2004. 'Expression of *Pseudomonas aeruginosa* *exoS* is controlled by quorum sensing and RpoS', *Microbiology*, 150: 843-51.
- Hoiby, N., O. Ciofu, H. K. Johansen, Z. J. Song, C. Moser, P. O. Jensen, S. Molin, M. Givskov, T. Tolker-Nielsen, and T. Bjarnsholt. 2011. 'The clinical impact of bacterial biofilms', *Int J Oral Sci*, 3: 55-65.
- Holloway, B. W. 1955. 'Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*', *J Gen Microbiol*, 13: 572-81.
- Hotchkiss, R. S., and I. E. Karl. 2003. 'The pathophysiology and treatment of sepsis', *N Engl J Med*, 348: 138-50.
- Hrv, R., R. Devaki, and V. Kandi. 2016. 'Comparison of Hemagglutination and Hemolytic Activity of Various Bacterial Clinical Isolates Against Different Human Blood Groups', *Cureus*, 8: e489.
- Intile, P. J., G. J. Balzer, M. C. Wolfgang, and T. L. Yahr. 2015. 'The RNA Helicase DeaD Stimulates ExsA Translation To Promote Expression of the *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System', *J Bacteriol*, 197: 2664-74.
- Jimenez, P. N., G. Koch, J. A. Thompson, K. B. Xavier, R. H. Cool, and W. J. Quax. 2012. 'The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*', *Microbiol Mol Biol Rev*, 76: 46-65.
- Kang, Cheol-In, Sung-Han Kim, Hong-Bin Kim, Sang-Won Park, Young-Ju Choe, Myoung-don Oh, Eui-Chong Kim, and Kang-Won Choe. 2003. 'Pseudomonas aeruginosa Bacteremia: Risk Factors for Mortality and Influence of Delayed Receipt of Effective Antimicrobial Therapy on Clinical Outcome', *Clinical Infectious Diseases*, 37: 745-51.
- Kaufman, M. R., J. Jia, L. Zeng, U. Ha, M. Chow, and S. Jin. 2000. 'Pseudomonas aeruginosa mediated apoptosis requires the ADP-ribosylating activity of *exoS*', *Microbiology*, 146 ( Pt 10): 2531-41.
- Kearns, D. B. 2010. 'A field guide to bacterial swarming motility', *Nat Rev Microbiol*, 8: 634-44.
- Kim, Y. J., Y. H. Jun, Y. R. Kim, K. G. Park, Y. J. Park, J. Y. Kang, and S. I. Kim. 2014. 'Risk factors for mortality in patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia; retrospective study of impact of combination antimicrobial therapy', *BMC Infect Dis*, 14: 161.
- Koch, C., and N. Hoiby. 1993. 'Pathogenesis of cystic fibrosis', *Lancet*, 341: 1065-9.

- Kohler, T., M. Michea-Hamzehpour, U. Henze, N. Gotoh, L. K. Curty, and J. C. Pechere. 1997. 'Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*', *Mol Microbiol*, 23: 345-54.
- Kumar, A. 2014. 'An alternate pathophysiologic paradigm of sepsis and septic shock: implications for optimizing antimicrobial therapy', *Virulence*, 5: 80-97.
- Kumar, Vinay, Abul K. Abbas, and Jon C. Aster. 2015. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease* (Elsevier Saunders: Philadelphia).
- Kurahashi, K., O. Kajikawa, T. Sawa, M. Ohara, M. A. Gropper, D. W. Frank, T. R. Martin, and J. P. Wiener-Kronish. 1999. 'Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia', *J Clin Invest*, 104: 743-50.
- Lambert, P. A. 2002. 'Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*', *J R Soc Med*, 95 Suppl 41: 22-6.
- Lapouge, K., M. Schubert, F. H. Allain, and D. Haas. 2008. 'Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour', *Mol Microbiol*, 67: 241-53.
- Lau, G. W., D. J. Hassett, H. Ran, and F. Kong. 2004. 'The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection', *Trends Mol Med*, 10: 599-606.
- Lee, Andrew, Stanley Mirrett, L. Barth Reller, and Melvin P. Weinstein. 2007. 'Detection of Bloodstream Infections in Adults: How Many Blood Cultures Are Needed?', *Journal of Clinical Microbiology*, 45: 3546-48.
- Li, X. Z., H. Nikaido, and K. Poole. 1995. 'Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*', *Antimicrob Agents Chemother*, 39: 1948-53.
- Liao, C. H., C. C. Lai, M. S. Hsu, Y. T. Huang, F. Y. Chu, H. S. Hsu, and P. R. Hsueh. 2009. 'Correlation between time to positivity of blood cultures with clinical presentation and outcomes in patients with *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia: prospective cohort study', *Clin Microbiol Infect*, 15: 1119-25.
- Lieber, M., B. Smith, A. Szakal, W. Nelson-Rees, and G. Todaro. 1976. 'A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells', *Int J Cancer*, 17: 62-70.
- Linscheid, Philippe, Dalma Seboek, Dominik J. Schaer, Henryk Zulewski, Ulrich Keller, and Beat Müller. 2004. 'Expression and secretion of procalcitonin and calcitonin gene-related peptide by adherent monocytes and by macrophage-activated adipocytes\*', *Critical Care Medicine*, 32: 1715-21.
- Lisboa, Thiago, Grant Waterer, and Jordi Rello. 2010. 'We should be measuring genomic bacterial load and virulence factors', *Critical Care Medicine*, 38: S656-S62.
- Lowbury, E. J., and A. G. Collins. 1955. 'The use of a new cetrimide product in a selective medium for *Pseudomonas pyocyanea*', *J Clin Pathol*, 8: 47-8.

- Marra, A. R., M. B. Edmond, B. A. Forbes, R. P. Wenzel, and G. M. Bearman. 2006. 'Time to blood culture positivity as a predictor of clinical outcome of Staphylococcus aureus bloodstream infection', *J Clin Microbiol*, 44: 1342-6.
- Marre, R. 2000. *Klinische Infektiologie* (Urban und Fischer: München).
- Martinez-Solano, L., M. D. Macia, A. Fajardo, A. Oliver, and J. L. Martinez. 2008. 'Chronic Pseudomonas aeruginosa infection in chronic obstructive pulmonary disease', *Clin Infect Dis*, 47: 1526-33.
- Mathee, K., G. Narasimhan, C. Valdes, X. Qiu, J. M. Matewish, M. Koehrsen, A. Rokas, C. N. Yandava, R. Engels, E. Zeng, R. Olavarietta, M. Doud, R. S. Smith, P. Montgomery, J. R. White, P. A. Godfrey, C. Kodira, B. Birren, J. E. Galagan, and S. Lory. 2008. 'Dynamics of Pseudomonas aeruginosa genome evolution', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 3100-5.
- Matsumoto, T., K. Tateda, N. Furuya, S. Miyazaki, A. Ohno, Y. Ishii, Y. Hirakata, and K. Yamaguchi. 1998. 'Efficacies of alkaline protease, elastase and exotoxin A toxoid vaccines against gut-derived Pseudomonas aeruginosa sepsis in mice', *J Med Microbiol*, 47: 303-8.
- Matthay, M. A., L. B. Ware, and G. A. Zimmerman. 2012. 'The acute respiratory distress syndrome', *J Clin Invest*, 122: 2731-40.
- McCarthy, K. L., and D. L. Paterson. 2017. 'Long-term mortality following Pseudomonas aeruginosa bloodstream infection', *J Hosp Infect*, 95: 292-99.
- Meyer, J. M., A. Neely, A. Stintzi, C. Georges, and I. A. Holder. 1996. 'Pyoverdinin is essential for virulence of Pseudomonas aeruginosa', *Infect Immun*, 64: 518-23.
- Mikkelsen, H., M. Sivaneson, and A. Filloux. 2011. 'Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa', *Environ Microbiol*, 13: 1666-81.
- Mittal, R., S. Aggarwal, S. Sharma, S. Chhibber, and K. Harjai. 2009. 'Urinary tract infections caused by Pseudomonas aeruginosa: a minireview', *J Infect Public Health*, 2: 101-11.
- Montie, T. C., D. Doyle-Huntzinger, R. C. Craven, and I. A. Holder. 1982. 'Loss of virulence associated with absence of flagellum in an isogenic mutant of Pseudomonas aeruginosa in the burned-mouse model', *Infect Immun*, 38: 1296-8.
- Mosquera-Rendon, J., A. M. Rada-Bravo, S. Cardenas-Brito, M. Corredor, E. Restrepo-Pineda, and A. Benitez-Paez. 2016. 'Pangenome-wide and molecular evolution analyses of the Pseudomonas aeruginosa species', *BMC Genomics*, 17: 45.
- Murray, Patrick R. (ed.) (eds.). 1999. *Manual of clinical microbiology* (ASM Press: Washington, D.C.).
- Nagachandrika, T., U. Kumar, S. Dumpati, S. Chary, P. S. Mandathara, and V. M. Rathi. 2011. 'Prevalence of contact lens related complications in a tertiary eye centre in India', *Cont Lens Anterior Eye*, 34: 266-8.



- Nakano, M., T. Deguchi, T. Kawamura, M. Yasuda, M. Kimura, Y. Okano, and Y. Kawada. 1997. 'Mutations in the *gyrA* and *parC* genes in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*', *Antimicrob Agents Chemother*, 41: 2289-91.
- Ninkovic, G., V. Dullo, and N. C. Saunders. 2008. 'Microbiology of otitis externa in the secondary care in United Kingdom and antimicrobial sensitivity', *Auris Nasus Larynx*, 35: 480-4.
- Nixon, G. M., D. S. Armstrong, R. Carzino, J. B. Carlin, A. Olinsky, C. F. Robertson, and K. Grimwood. 2001. 'Clinical outcome after early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis', *J Pediatr*, 138: 699-704.
- O'Loughlin, C. T., L. C. Miller, A. Siryaporn, K. Drescher, M. F. Semmelhack, and B. L. Bassler. 2013. 'A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 17981-6.
- Ogle, J. W., L. B. Reller, and M. L. Vasil. 1988. 'Development of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem, norfloxacin, and ciprofloxacin during therapy: proof provided by typing with a DNA probe', *J Infect Dis*, 157: 743-8.
- Overhage, J., M. Bains, M. D. Brazas, and R. E. Hancock. 2008. 'Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance', *J Bacteriol*, 190: 2671-9.
- Palmer, H. R., E. L. Palavecino, J. W. Johnson, C. A. Ohl, and J. C. Williamson. 2013. 'Clinical and microbiological implications of time-to-positivity of blood cultures in patients with Gram-negative bacilli bacteremia', *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 32: 955-9.
- Parker, M. M., J. H. Shelhamer, S. L. Bacharach, M. V. Green, C. Natanson, T. M. Frederick, B. A. Damske, and J. E. Parrillo. 1984. 'Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock', *Ann Intern Med*, 100: 483-90.
- Pena, C., G. Cabot, S. Gomez-Zorrilla, L. Zamorano, A. Ocampo-Sosa, J. Murillas, B. Almirante, V. Pomar, M. Aguilar, A. Granados, E. Calbo, J. Rodriguez-Bano, F. Rodriguez-Lopez, F. Tubau, L. Martinez-Martinez, A. Oliver, and Diseases Spanish Network for Research in Infectious. 2015. 'Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections', *Clin Infect Dis*, 60: 539-48.
- Peralta, G., M. P. Roiz, M. B. Sanchez, J. C. Garrido, B. Ceballos, M. J. Rodriguez-Lera, F. Mateos, and I. De Benito. 2007. 'Time-to-positivity in patients with *Escherichia coli* bacteraemia', *Clin Microbiol Infect*, 13: 1077-82.
- Peterson, J. W. 1996. 'Bacterial Pathogenesis.' in th and S. Baron (eds.), *Medical Microbiology* (Galveston (TX)).

- Pierrakos, C., and J. L. Vincent. 2010. 'Sepsis biomarkers: a review', *Crit Care*, 14: R15.
- Pirnay, J. P., S. Matthijs, H. Colak, P. Chablain, F. Bilocq, J. Van Eldere, D. De Vos, M. Zizi, L. Triest, and P. Cornelis. 2005. 'Global *Pseudomonas aeruginosa* biodiversity as reflected in a Belgian river', *Environ Microbiol*, 7: 969-80.
- Poole, K. 2001. 'Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms', *J Mol Microbiol Biotechnol*, 3: 255-64.
- Poole, K., N. Gotoh, H. Tsujimoto, Q. Zhao, A. Wada, T. Yamasaki, S. Neshat, J. Yamagishi, X. Z. Li, and T. Nishino. 1996. 'Overexpression of the mexC-mexD-oprJ efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*', *Mol Microbiol*, 21: 713-24.
- Poole, K., K. Krebs, C. McNally, and S. Neshat. 1993. 'Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon', *J Bacteriol*, 175: 7363-72.
- Py, Béatrice, Christopher F. Higgins, Henry M. Krisch, and Agamemnon J. Carpousis. 1996. 'A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome', *Nature*, 381: 169.
- Rahme, L. G., E. J. Stevens, S. F. Wolfort, J. Shao, R. G. Tompkins, and F. M. Ausubel. 1995. 'Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals', *Science*, 268: 1899-902.
- Ramphal, R., M. T. McNiece, and F. M. Polack. 1981. 'Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to the injured cornea: a step in the pathogenesis of corneal infections', *Ann Ophthalmol*, 13: 421-5.
- Rello, J., T. Lisboa, M. Lujan, M. Gallego, C. Kee, I. Kay, D. Lopez, G. W. Waterer, and D. NA-Neumococo Study Group. 2009. 'Severity of pneumococcal pneumonia associated with genomic bacterial load', *Chest*, 136: 832-40.
- Rene, R., A. Mas, C. M. Villabona, M. C. Ricart, A. Bassa, and F. Tolosa. 1990. 'Otitis externa maligna and cranial neuropathy', *Neurologia*, 5: 222-7.
- Reuter, S., A. Sigge, H. Wiedeck, and M. Trautmann. 2002. 'Analysis of transmission pathways of *Pseudomonas aeruginosa* between patients and tap water outlets', *Crit Care Med*, 30: 2222-8.
- Ryder, C., M. Byrd, and D. J. Wozniak. 2007. 'Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development', *Curr Opin Microbiol*, 10: 644-8.
- Sadeghifard, N., A. Valizadeh, M. R. Zolfaghary, M. H. Maleki, A. Maleki, R. Mohebi, S. Ghafourian, and A. Khosravi. 2012. 'Relationship between the Presence of the nalC Mutation and Multidrug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*', *Int J Microbiol*, 2012: 575193.
- Safdar, N., J. Handelsman, and D. G. Maki. 2004. 'Does combination antimicrobial therapy reduce mortality in Gram-negative bacteraemia? A meta-analysis', *Lancet Infect Dis*, 4: 519-27.

- Saliba, A. M., D. O. Nascimento, M. C. Silva, M. C. Assis, C. R. Gayer, B. Raymond, M. G. Coelho, E. A. Marques, L. Touqui, R. M. Albano, U. G. Lopes, D. D. Paiva, P. T. Bozza, and M. C. Plotkowski. 2005. 'Eicosanoid-mediated proinflammatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU', *Cell Microbiol*, 7: 1811-22.
- Sato, H., D. W. Frank, C. J. Hillard, J. B. Feix, R. R. Pankhaniya, K. Moriyama, V. Finck-Barbancon, A. Buchaklian, M. Lei, R. M. Long, J. Wiener-Kronish, and T. Sawa. 2003. 'The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU', *EMBO J*, 22: 2959-69.
- Sayner, S. L., D. W. Frank, J. King, H. Chen, J. VandeWaa, and T. Stevens. 2004. 'Paradoxical cAMP-induced lung endothelial hyperpermeability revealed by *Pseudomonas aeruginosa* ExoY', *Circ Res*, 95: 196-203.
- Schmidt, Robert F. (ed.)^(eds.). 2010. *Physiologie des Menschen : mit Pathophysiologie; mit 85 Tabellen; mit herausnehmbaren Repetitorium* (Springer: Heidelberg).
- Schulert, G. S., H. Feltman, S. D. Rabin, C. G. Martin, S. E. Battle, J. Rello, and A. R. Hauser. 2003. 'Secretion of the toxin ExoU is a marker for highly virulent *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from patients with hospital-acquired pneumonia', *J Infect Dis*, 188: 1695-706.
- Shrout, J. D., D. L. Chopp, C. L. Just, M. Hentzer, M. Givskov, and M. R. Parsek. 2006. 'The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional', *Mol Microbiol*, 62: 1264-77.
- Singer, M., C. S. Deutschman, C. W. Seymour, M. Shankar-Hari, D. Annane, M. Bauer, R. Bellomo, G. R. Bernard, J. D. Chiche, C. M. Coopersmith, R. S. Hotchkiss, M. M. Levy, J. C. Marshall, G. S. Martin, S. M. Opal, G. D. Rubinfeld, T. van der Poll, J. L. Vincent, and D. C. Angus. 2016. 'The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)', *JAMA*, 315: 801-10.
- Smith, H. 1977. 'Microbial surfaces in relation to pathogenicity', *Bacteriol Rev*, 41: 475-500.
- Stock, A. M., V. L. Robinson, and P. N. Goudreau. 2000. 'Two-component signal transduction', *Annu Rev Biochem*, 69: 183-215.
- Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrener, M. J. Hickey, F. S. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. Hancock, S. Lory, and M. V. Olson. 2000. 'Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen', *Nature*, 406: 959-64.
- Sutterwala, F. S., L. A. Mijares, L. Li, Y. Ogura, B. I. Kazmierczak, and R. A. Flavell. 2007. 'Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome', *J Exp Med*, 204: 3235-45.

- Takeuchi, O., and S. Akira. 2010. 'Pattern recognition receptors and inflammation', *Cell*, 140: 805-20.
- Tam, V. H., C. A. Rogers, K. T. Chang, J. S. Weston, J. P. Caeiro, and K. W. Garey. 2010. 'Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia on patient outcomes', *Antimicrob Agents Chemother*, 54: 3717-22.
- Tang, B. M., G. D. Eslick, J. C. Craig, and A. S. McLean. 2007. 'Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: systematic review and meta-analysis', *Lancet Infect Dis*, 7: 210-7.
- Tang, G. J., S. L. Huang, H. W. Yien, W. S. Chen, C. W. Chi, C. W. Wu, W. Y. Lui, J. H. Chiu, and T. Y. Lee. 2000. 'Tumor necrosis factor gene polymorphism and septic shock in surgical infection', *Crit Care Med*, 28: 2733-6.
- Taplin, D., and P. M. Mertz. 1973. 'Flower vases in hospitals as reservoirs of pathogens', *Lancet*, 2: 1279-81.
- Tettelin, H., V. Massignani, M. J. Cieslewicz, C. Donati, D. Medini, N. L. Ward, S. V. Angiuoli, J. Crabtree, A. L. Jones, A. S. Durkin, R. T. Deboy, T. M. Davidsen, M. Mora, M. Scarselli, I. Margarit y Ros, J. D. Peterson, C. R. Hauser, J. P. Sundaram, W. C. Nelson, R. Madupu, L. M. Brinkac, R. J. Dodson, M. J. Rosovitz, S. A. Sullivan, S. C. Daugherty, D. H. Haft, J. Selengut, M. L. Gwinn, L. Zhou, N. Zafar, H. Khouri, D. Radune, G. Dimitrov, K. Watkins, K. J. O'Connor, S. Smith, T. R. Utterback, O. White, C. E. Rubens, G. Grandi, L. C. Madoff, D. L. Kasper, J. L. Telford, M. R. Wessels, R. Rappuoli, and C. M. Fraser. 2005. 'Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome"', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 13950-5.
- Theander, T. G., A. Kharazmi, B. K. Pedersen, L. D. Christensen, N. Tvede, L. K. Poulsen, N. Odum, M. Svenson, and K. Bendtzen. 1988. 'Inhibition of human lymphocyte proliferation and cleavage of interleukin-2 by *Pseudomonas aeruginosa* proteases', *Infect Immun*, 56: 1673-7.
- Thompson, C. M., T. D. Holden, G. Rona, B. Laxmanan, R. A. Black, G. E. O'Keefe, and M. M. Wurfel. 2014. 'Toll-like receptor 1 polymorphisms and associated outcomes in sepsis after traumatic injury: a candidate gene association study', *Ann Surg*, 259: 179-85.
- Tsang, K. W., A. Rutman, E. Tanaka, V. Lund, A. Dewar, P. J. Cole, and R. Wilson. 1994. 'Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with human respiratory mucosa in vitro', *Eur Respir J*, 7: 1746-53.
- Walsh, T. R., M. A. Toleman, L. Poirel, and P. Nordmann. 2005. 'Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm?', *Clin Microbiol Rev*, 18: 306-25.
- Warren, H. S. 1997. 'Strategies for the treatment of sepsis', *N Engl J Med*, 336: 952-3.
- Wei, Q., and L. Z. Ma. 2013. 'Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*', *Int J Mol Sci*, 14: 20983-1005.

- Wiener-Kronish, J. P., K. H. Albertine, and M. A. Matthay. 1991. 'Differential responses of the endothelial and epithelial barriers of the lung in sheep to Escherichia coli endotoxin', *J Clin Invest*, 88: 864-75.
- Williams, B. J., J. Dehnbostel, and T. S. Blackwell. 2010. 'Pseudomonas aeruginosa: host defence in lung diseases', *Respirology*, 15: 1037-56.
- Willmann, M., I. Kuebart, M. Marschal, K. Schroppel, W. Vogel, I. Flesch, U. Markert, I. B. Autenrieth, F. Holzl, and S. Peter. 2013. 'Effect of metallo-beta-lactamase production and multidrug resistance on clinical outcomes in patients with Pseudomonas aeruginosa bloodstream infection: a retrospective cohort study', *BMC Infect Dis*, 13: 515.
- Willmann, M., I. Kuebart, W. Vogel, I. Flesch, U. Markert, M. Marschal, K. Schroppel, I. B. Autenrieth, F. Holzl, and S. Peter. 2013. 'Time to positivity as prognostic tool in patients with Pseudomonas aeruginosa bloodstream infection', *J Infect*, 67: 416-23.
- Winzer, K., and P. Williams. 2001. 'Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria', *Int J Med Microbiol*, 291: 131-43.
- Wolfgang, M. C., B. R. Kulasekara, X. Liang, D. Boyd, K. Wu, Q. Yang, C. G. Miyada, and S. Lory. 2003. 'Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of Pseudomonas aeruginosa', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 8484-9.
- Wood, S., J. Goldufsky, and S. H. Shafikhani. 2015. 'Pseudomonas aeruginosa ExoT Induces Atypical Anoikis Apoptosis in Target Host Cells by Transforming Crk Adaptor Protein into a Cytotoxin', *PLoS Pathog*, 11: e1004934.
- Wood, S. J., J. W. Goldufsky, D. Bello, S. Masood, and S. H. Shafikhani. 2015. 'Pseudomonas aeruginosa ExoT Induces Mitochondrial Apoptosis in Target Host Cells in a Manner That Depends on Its GTPase-activating Protein (GAP) Domain Activity', *J Biol Chem*, 290: 29063-73.
- Worlitzsch, D., R. Tarran, M. Ulrich, U. Schwab, A. Cekici, K. C. Meyer, P. Birrer, G. Bellon, J. Berger, T. Weiss, K. Botzenhart, J. R. Yankaskas, S. Randell, R. C. Boucher, and G. Doring. 2002. 'Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients', *J Clin Invest*, 109: 317-25.
- Yahr, T. L., A. J. Vallis, M. K. Hancock, J. T. Barbieri, and D. W. Frank. 1998. 'ExoY, an adenylate cyclase secreted by the Pseudomonas aeruginosa type III system', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 13899-904.
- Zhang, Z., J. P. Louboutin, D. J. Weiner, J. B. Goldberg, and J. M. Wilson. 2005. 'Human airway epithelial cells sense Pseudomonas aeruginosa infection via recognition of flagellin by Toll-like receptor 5', *Infect Immun*, 73: 7151-60.

## **7. Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Tübingen zunächst unter der Betreuung von Professor Dr. Ingo B. Autenrieth und im Verlauf unter der Betreuung von Professorin Dr. Julia-Stefanie Frick durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch den Leiter der VARPA-Studie Professor Dr. Matthias Willmann in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Sandra Schwarz, in deren Forschungsgruppe diese Arbeit integriert wurde.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Maria Haug und Frau Dr. Annika Schmidt von mir eigenständig durchgeführt. Die Mutanten (»2.12 Herstellung der Deletionsmutanten und deren Komplementierung«) wurden mir von Frau Dr. Annika Schmidt bereitgestellt. Das Mikroskopieren der Bakterien (»2.11 Lichtmikroskopie«) erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Jan Lennings. Der Zytotoxizitäts-Assay (»2.9 Zellkultur und Zytotoxizitäts-Assay«) wurde von Frau Maria Haug durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte durch mich nach Anleitung durch Frau Dr. Sandra Schwarz.

Die Literaturrecherche erfolgte ausschließlich durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben. Die Korrektur des Manuskripts erfolgte durch Frau Dr. Sandra Schwarz und Frau Dr. Annika Schmidt.

Tübingen, den

## **Danksagung**

Mein Dank gilt Professor Dr. Ingo B. Autenrieth und Professorin Dr. Julia-Stefanie Frick für die Betreuung meiner Arbeit und die Möglichkeit in den Laborräumen des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene zu forschen.

Außerdem möchte ich Professor Dr. Matthias Willmann und Dr. Sandra Schwarz danken, die mir die Gelegenheit gaben, mich diesem Thema zu widmen und mit mir ihre Expertise teilten. Dr. Sandra Schwarz nahm mich dazu in Ihre Forschungsgruppe auf und ihr Rat war mir während der Erstellung dieser Arbeit stets von großer Hilfe.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Annika Schmidt, Maria Haug und Jan Lennings für ihre unentwegt große Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Für die Gestaltung der in *Abbildung 1* verwendeten Graphik danke ich sehr herzlich der mexikanischen Künstlerin Lynda Tovar Castro.