

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der
Universität Tübingen

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

**Die DEAD-Box Helicase P als Pathogenitätsfaktor von
Pseudomonas aeruginosa im Galleria mellonella Modell**

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanmedizin**

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

**vorgelegt von
Moritz, Alexander Thomas**

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Willmann

2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Wagner

Tag der Disputation: 29.01.2021

Widmung:

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	6
Verwendete Abkürzungen	7
1. Einleitung.....	8
1.1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Vorkommen und Ökologie.....	8
1.1.2. Genetische Besonderheiten und Schlüsseigenschaften.....	8
1.2. Klinisches Auftreten und Übertragungswege	9
1.2.1. Infektionsarten und Demographie	9
1.2.2. Infektionswege	11
1.3. Grundlagen und Epidemiologie von Sepsis und SIRS	13
1.3.1. Epidemiologie und Relevanz von <i>Pseudomonas</i> -bedingter Sepsis	14
1.3.2. Diagnostik und Therapie von Sepsis.....	15
1.4. Grundlagen zur Pathogenität von <i>P. aeruginosa</i>	16
1.4.1. Relevanz von mikrobiellen Biomarkern sowie deren Diagnostik.....	17
1.4.2. <i>hslP</i> als Kandidat für einen bakteriellen prognostischen Biomarker	20
1.5. Ansätze zur experimentellen Überprüfung von Pathogenitätsfaktoren.....	21
1.5.1. Wirtsorganismen für <i>P. aeruginosa</i> und Pathogenitätsmodelle in vivo	21
1.5.2. <i>Galleria</i> als Tiermodell	21
1.5.3. Mensch und Motte: Immunologische Parallelitäten in der angeborenen Immunabwehr.....	22
1.5.4. Die Sonderposition von <i>Galleria mellonella</i> unter wirbellosen Modellorganismen .	22
1.5.5. Praktische und ethische Aspekte	23
2. Zielsetzung und zentrale Fragestellung.....	24
3. Material und Methoden.....	25
3.1. Selektion der Bakterienstämme.....	25
3.2. Verwendete Materialien	26
3.2.1. Kultursubstrate.....	26
3.2.2. Pipettieren und OD Messungen	26
3.2.3. Injektionsmaterial und <i>Galleria</i> Larven	27
3.2.4. Mikrotiterplatten und Wachstumskurven	28
3.3. Versuchsmethoden für die <i>Galleria</i> Experimente.....	28

3.3.1. Herstellen einer Bakteriensuspension von ca. 1000 CFU/ml	28
3.3.2. Injektion in <i>Galleria mellonella</i> Larven.....	29
3.3.3. Dokumentation der Mortalität.....	32
3.4. Versuchsmethoden für Fitness-Assays in verschiedenen Medien und Temperaturen ...	33
3.4.1. Herstellen einer Bakteriensuspension von 1000 CFU/ml	33
3.4.2. Animpfen und Inkubation der Mikrotiterplatten.....	33
3.5. Datenauswertung und Visualisierung	35
3.5.1. Gallerien Überlebensanalysen und Hazard Ratios	35
3.5.2. Wachstumsanalyse der Fitness-Assays	36
4. Ergebnisse	37
4.1. Ergebnisse der Gallerienversuche.....	37
4.1.1. Erfolgsrate der Gallerien-Inokulationen.....	37
4.1.2. Überleben in Abhängigkeit von <i>helP</i> in den einzelnen Vergleichspaaren	37
4.1.3. Ergebnisse der Kaplan-Meier Kurven.....	42
4.1.4. Hazard Ratio von <i>helP</i> kumuliert auf alle <i>P. aeruginosa</i> Stämme.....	42
4.1.5. Einfluss der injizierten CFU auf die Gallerienmortalität.....	42
4.1.6. Hazard Ratios von <i>helP</i> in den einzelnen Vergleichspaaren	43
4.2. Ergebnisse der Fitnessassays in verschiedenen Medien.....	45
4.2.1. Wachstum Gesamteffekte in RPMI, LB und Serum.....	45
5. Diskussion der Ergebnisse	50
6. Zusammenfassung.....	60
7. Literaturverzeichnis.....	62
8. Erklärung zum Eigenanteil.....	67
9. Danksagung.....	68

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: A= letztes Nachschieberfußpaar, B= vorletztes Nachschieberfußpaar, C= Kopfende mit 3 thorakalen Beinpaaren.....	30
Abbildung 2: A= letztes Nachschieberfußpaar, B= vorletztes Nachschieberfußpaar, C= Kopfende mit 3 thorakalen Beinpaaren.....	30
Abbildung 3: Injektion unter Verwendung des Fingerschutzes	31
Abbildung 4: vier tote Gallerienlarven in einer Petrischale. Die Tiere sind zum Dokumentationszeitpunkt in variablen Anteilen dunkel verfärbt oder normal cremefarben.	32
Abbildung 5: Überlebenskurven nach Injektion von PA14/PA14-helP.....	38
Abbildung 6: Überlebenskurven nach Injektion von ID155/ID83.....	39
Abbildung 7: Überlebenskurven nach Injektion von ID177/ID113	39
Abbildung 8: Überlebenskurven nach Injektion von ID114/ID120	40
Abbildung 9: Überlebenskurven nach Injektion von ID109/ID165	40
Abbildung 10: Überlebenskurven nach Injektion von ID106/ID166	41
Abbildung 11: Hazards nach Vergleichspaaren	43
Abbildung 12: Wachstum bei 37°C in LB Medium	45
Abbildung 13: Wachstum bei 40°C in LB Medium	46
Abbildung 14: Wachstum bei 37°C in RPMI Medium	47
Abbildung 15: Wachstum bei 40°C in RPMI Medium	47
Abbildung 16: Wachstum bei 37°C in Humanserum.....	48
Abbildung 17: Wachstum bei 40°C in Humanserum.....	49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gegenüberstellung der verglichenen P.aeruginosa Stämme nach Vorhandensein von helP	25
Tabelle 2: Vergleichspaare für die statistische Auswertung	26
Tabelle 3: Bedingungen und Medien für die Wachstumsassays	33
Tabelle 4: Gesamtvergleich der Hazard Ratios helP positiv/negativ	43
Tabelle 5: Hazards nach Vergleichspaaren (multivariate Werte nach Korrektur für CFU Inokulum)	44

Verwendete Abkürzungen

CRP	<i>C-reaktives Protein</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immuno-Assay</i>
Eppi	<i>Eppendorf Tube</i>
ESBL	<i>Extended Spectrum Betalactamases</i>
HR	<i>Hazard Ratio</i>
LB	<i>Liquid Broth</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
LR	<i>Log Rank</i>
LR Test	<i>LogRank Test</i>
MALDI-TOF MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight - Mass Spectrometry</i>
Mbp	<i>Megabasenpaare</i>
OD	<i>Optische Dichte</i>
OD600	<i>OD bei 600 nm, OD bei 600 nm Wellenlänge</i>
<i>P.aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase-Chain-Reaction</i>
qSOFA	<i>quick Sequential Organ Failure Assesement</i>
rt q-PCR	<i>real-time quantitative PCR</i>
SAPS II	<i>Simplified Acute Physiology Score II</i>
SIRS	<i>Severe Inflammatory Response Syndrome</i>
T3SS	<i>Typ 3 Sekretionssystem</i>
TSA	<i>Trypton-Soya-Agar</i>

1. Einleitung

1.1.1. *Pseudomonas aeruginosa* Vorkommen und Ökologie

Pseudomonas aeruginosa ist ein gramnegatives, fakultativ anaerobes begeißeltes Stäbchenbakterium, welches ubiquitär vor allem auf feuchten Oberflächen, im Boden und im Wasser vorkommt (Eschbach et al., 2004). Mit einer thermischen Beständigkeit und Wachstum selbst bei 42°C hebt es sich von einigen anderen pathogenen Bakterienspezies ab (Kung et al., 2010). Es ist in der Lage, von Lebensmitteln über Wasserleitungen bis hin zu medizinischen Geräten eine enorme Vielfalt an Lebensräumen zu besiedeln und dort gegen äußere Einflüsse widerstandsfähige Biofilme zu bilden, wobei es auch in Anwesenheit von anderen pathogenen Bakterienspezies eine dominante Rolle einnimmt (Cheng et al., 2019). Insbesondere in diesen aus Alginaten und anderen Biopolymeren gebildeten Biofilmen zeigt es sich z.B. gegenüber chemischen Desinfektionsmaßnahmen relativ unempfindlich (Sagripanti and Bonifacino, 2000, Xue et al., 2013).

1.1.2. Genetische Besonderheiten und Schlüsseigenschaften

Es gibt eine Reihe an Schlüsseigenschaften, die *P. aeruginosa* zu seiner Anpassungsfähigkeit verhelfen. Die meisten Stämme, die in der Natur vorkommen sowie humanpathogene Stämme aus klinischen Isolaten haben ein mit teils über 6 Megabasenpaaren (Mbp) sehr umfangreiches Genom. Zudem haben sie mit ca. 8% einen der größten Anteile an regulatorisch wirksamen Genen. Diese tragen sicher zur metabolischen Diversität bei (Kung et al., 2010).

Dieses ermöglicht ihnen unter anderem verschiedenste Kohlenwasserstoffe als Energiequelle zu nutzen und damit in den meisten Umgebungen zu überleben sowie zu proliferieren (Toll-Riera et al., 2016).

Weiterhin kodieren viele Gene von *P. aeruginosa* für Mechanismen, die eine intrinsische Resistenz gegen Antibiotika und das Potential zur raschen zusätzlichen Resistenzentwicklung bedingen. Dazu gehören beispielsweise die Cephalosporinase AmpC, mehrere Effluxpumpensysteme zum Ausschleusen von Xenobiotika, und DNA-modifizierende Gyrasen und Topoisomerasen, die allesamt durch Hochregulation und strukturelle Mutationen auch gegen bisher wirksame Antibiotika Resistenzen auslösen können (Valot et al., 2015).

1.2. Klinisches Auftreten und Übertragungswege

1.2.1. Infektionsarten und Demographie

Pseudomonas aeruginosa ist einer der bedeutendsten gramnegativen Infektionserreger bei Menschen und verursacht Infektionen in vielen Organsystemen; Bis zu 16 % der Pneumonien, 10% der Harnwegsinfektionen, 4% der systemischen Infektionen mit Bakteriämien und 10% der Haut - und Weichteilinfektionen (inklusive infizierte chirurgische Wunden und Brandverletzungen) werden durch diesen Keim hervorgerufen (Trautmann et al., 2005).

Pseudomonaden-Pneumonien sind häufig nosokomialer Genese; im ambulanten Bereich ist nur ein geringer Anteil der Patienten kolonisiert, was trotz lückenhafter Datenlage diese Ätiologie untergeordnet erscheinen lässt (Falkinham et al., 2015). Wichtige Risikofaktoren für nosokomiale *Pseudomonaden*-Pneumonien sind mechanische Beatmung, Immunsuppression (darunter besonders Neutropenie (Kang et al., 2003)) sowie Cystische Fibrose und COPD (Kung et al., 2010, Moradali et al., 2017). Bei genannten Risikopatienten (Immunsuppression, Cystische Fibrose und COPD) sind dabei aufgrund der Vulnerabilität auch häufig ambulant erworbene Fälle vertreten. In Patienten mit Cystischer Fibrose kann sich der Keim aufgrund der gestörten Mukoziliären Clearance mit viskösen und wasserarmen Schleimbildungen schon im Kleinkindalter etablieren, wo er sich an die Gegebenheiten der Atemwege anpasst und als persistierende therapierefraktäre Infektion in vielen Fällen nach Jahren zum Tode führt (Moradali et al., 2017). Diese Pneumonien sind aufgrund

hoher Antibiotikaresistenz und oft chronischen Verläufen mit einer besonders großen Morbidität und Mortalität von teilweise 40% verbunden (Trautmann et al., 2005).

Als opportunistischer Krankheitserreger verursacht *P. aeruginosa* Harnwegsinfektionen, die vor allem bei immunsupprimierten und katheterisierten Patienten auftreten (Bassetti et al., 2018). Derartige Infektionen zeigen eine erhöhte Mortalität, wenn sie mit einer gleichzeitigen Atemwegsbeteiligung auftreten (Ferreiro et al., 2017). Andere hervorzuhebende Risikofaktoren sind das Vorhandensein metabolischer Beeinträchtigungen etwa durch Leberschädigung, Diabetes mellitus und chronisches Nierenversagen (Ferreiro et al., 2017).

Die dritte große Gruppe der *P. aeruginosa*-bedingten, oft schwer verlaufenden Infektionen, sind die Haut- und Weichteilinfekte. Bei immunkompetenten Menschen ohne größere Hautdefekte sind *P. aeruginosa*-Infekte generell selten. Hier tritt am ehesten bei Schwimmern und Menschen mit Gehörgangsstenosen die Otitis externa auf, die bei Durchbruch mit Knochenbeteiligung zur Otitis externa maligna exazerbieren kann (Wiegand et al., 2019). Weitaus wichtiger sind Komplikationen von großen Wundflächen, darunter insbesondere Brandverletzungen. Brandwunden bieten eine einfache Eintrittspforte aus verschiedenen Gründen: Die geschädigte Hautoberfläche kann schnell mit Verunreinigungen kontaminiert und somit besiedelt werden. Die gestörte Hautbarriere führt durch Exsudate zu einem feuchten und nährstoffreichen Milieu. Insbesondere in den nekrotischen Gewebeanteilen können sich neben *P. aeruginosa* noch viele andere Bakterien ansiedeln und vermehren (Azzopardi et al., 2014). Thermische Wundflächen sind in den tieferen Schichten mit enormen Zellschäden und damit einer starken Freisetzung von Entzündungsmediatoren assoziiert. Bei Dissemination in den Blutkreislauf führt dies zu einer reaktiven Gegenregulation, was schließlich eine systemische Immunsuppression zur Folge hat (Mayhall, 2003). Falls *P. aeruginosa* tiefer ins Wundbett migriert und eine Bakteriämie mit septischem Krankheitsbild auslöst, ist die Infektion mit deutlich erhöhter Mortalität verbunden (Turner et al., 2014).

Alle genannten Infektionen mit *P. aeruginosa* können in die Blutbahn übertreten und somit zu einem septischen Krankheitsgeschehen fortschreiten (Ferreiro et al., 2017, Choi et al., 2018, Mayhall, 2003, Turner et al., 2014).

1.2.2. Infektionswege

Die Infektionswege, auf denen Menschen mit *P.aeruginosa* besiedelt und schließlich auch symptomatisch infiziert werden können, unterscheiden sich je nach situativem Hintergrund. In den Atemwegen von Patienten, die unter Cystischer Fibrose leiden, lassen sich oft *P. aeruginosa*-Isolate nachweisen, welche angesichts nachweisbarer genetischer Unterschiede aus unterschiedlichen Infektionsquellen stammen müssen und in diesem Patientenkollektiv, zumindest was die Erstbesiedelung betrifft, einen direkten Zusammenhang mit dem Kontakt zum Gesundheitswesen unwahrscheinlich macht (Schelstraete et al., 2008).

Nosokomiale Infektionen mit *P.aeruginosa* lassen sich auf vier Hauptübertragungswege zurückführen: Verwendung von kontaminierten medizinischen Gegenständen, Kontakt mit kontaminiertem Wasser aus dem sanitären Bereich, Übertragung durch Gesundheitspersonal und Patient-zu-Patient-Transmission (Deutsch et al., 2016, Russotto et al., 2015).

Bei Medizinprodukten werden beispielsweise EKG-Kabel besiedelt, die zwar meist mit intakter Haut in Berührung kommen, allerdings lässt sich Kontakt und damit Übersiedlung zu Wundflächen nicht ganz ausschließen (Russotto et al., 2015). Sehr bedeutsam ist außerdem die Tendenz von *P. aeruginosa*, Biofilme auf feuchten Oberflächen zu bilden, die bei unzureichender Desinfektion als Ausgangspunkt für dauerhafte Kolonisierungen von Gerätschaften dienen. Dies ist gerade bei Beatmungssystemen auf Intensivstationen der Fall, wo sich *P. aeruginosa* regelmäßig im Luftzirkulationssystem, bevorzugt an Stellen wie Wasserabscheidern und Luftbefeuchtern, nachweisen lässt (Russotto et al., 2015). Schließlich ist die Biofilmbildung auch problematisch für die viel genutzte Sonographietechnik. Biofilme von *P. aeruginosa* können sich auf und in allen Bestandteilen des Geräts inklusive Sonde, Tastatur und Schallgel befinden (Russotto et al., 2015). In einer japanischen Fallserie ist es alleine durch das

Vorhandensein eines kleinen Oberflächendefekts in einer Transoesophagealen Echokardiographie-Sonde zu letal verlaufenden Pneumonien mit multiresistenten *P. aeruginosa* gekommen (Seki et al., 2013).

Dass *P. aeruginosa* auch auf trockenen Oberflächen bis zu mehrere Monate lang infektiös bleiben kann, verdeutlicht die Relevanz von solchen über Medizinprodukte vermittelten Transmissionen des Keims (Kramer et al., 2006).

Kolonisation und Infektionen durch *P. aeruginosa* können von fast allen wasserhaltigen Medien ausgehen, wie etwa von Bädern in der heutzutage selten gewordenen Balneotherapie von Verbrennungswunden (Deutsch et al., 2016) oder insbesondere aus Leitungswasser mit den assoziierten Gegenständen wie Waschbecken und Wasserhähnen. In diesen peripheren Anteilen der Trinkwasserleitungssysteme können Populationen von *P. aeruginosa* nach erstmaliger Besiedelung mehrere Monate lang nachweisbar persistieren und als Infektionsquelle fungieren (Trautmann et al., 2005). Hervorzuheben ist dabei, dass diese „exogene“ Art der Übertragung in Ausbruchssituationen anteilmäßig weit über dem „endogenen“ Weg liegt. „Endogen“ bedeutet, dass ein Patient bereits vor der stationären Aufnahme z.B. intestinal mit dem Stamm von *P. aeruginosa* besiedelt ist. Diese kann dann im Verlauf des Klinikaufenthalts zu einer Infektion führen. (Trautmann et al., 2005, Matt et al., 2014).

Man kann mutmaßlich davon ausgehen, dass periphere Wasserleitungen zu einem bestimmten Zeitpunkt durch besiedelte Patienten mit den entsprechenden *P. aeruginosa*-Stämmen inokuliert werden, unter anderem da sich im Wasser der zugrundeliegenden Hauptleitungen zumeist keine derartigen Keime nachweisen lassen (Falkinham et al., 2015, Trautmann et al., 2005).

Da auf Intensivstationen die Prävalenz und auch die assoziierten Risiken von *P. aeruginosa*-Infektionen besonders hoch sind (Kapitel 1.2.1., S. 9), spielt der beschriebene Transfer über Personal und Wassertechnik eine bedeutsame Rolle. Dies verlangt nach erhöhter Aufmerksamkeit im Hygieneverhalten und ließe sich durch effektive, aber teure Maßnahmen wie Wasserfilter zurückdrängen (Falkinham et al., 2015, Trautmann et al., 2005).

1.3. Grundlagen und Epidemiologie von Sepsis und SIRS

Das „Severe Inflammatory Response Syndrome“ (SIRS) wird, wenn es auf Grundlage einer bakteriellen Infektion entsteht, auch als bakterielle Sepsis bezeichnet. In der seit 2016 bestehenden Sepsis-3 Definition wurde dabei der diagnostische Schwerpunkt auf Organdysfunktionen im Rahmen einer Infektion gelegt. Dabei spielt der qSOFA-Score eine wichtige Rolle. Die Erfüllung von 2 Punkten weisen auf das mögliche Vorhandensein einer Sepsis hin. Zusätzliche Anzeichen eines Schocks, wie therapiebedürftiger Blutdruckabfall und Dysregulationen im Säure-Base-Haushalt steigern nach der Sepsis-3 Definition die Mortalität noch um ein Vielfaches (Singer et al., 2016). Hier soll das Geschehen septischer Infektionen noch einmal näher beleuchtet werden: Im Unterschied zu einer normal ablaufenden Infektion, bei welcher die eingedrungenen Erreger insbesondere durch neutrophile Granulozyten nach kurzer Zeit phagozytiert werden, kommt es beim septischen Infekt zu einer zusätzlichen hochgradigen Stimulation der angeborenen sowie der adaptiven Immunabwehr mit anschließender Dysregulation (Stearns-Kurosawa et al., 2011).

Diese Dysregulation beinhaltet sowohl übersteigerte proinflammatorische Reaktionen mit resultierenden Gewebe- und Organschäden als auch fehlerhafte antiinflammatorische Tendenzen. Dies mündet oft in einem Zustand des septischen Schocks mit Multiorganversagen und hoher Mortalität (Remick, 2007). Immer noch liegt die Sterblichkeit von Patienten mit Sepsis bei über 24%, was die Wichtigkeit dieses Krankheitsgeschehens noch einmal verdeutlicht (Fleischmann et al., 2016).

Mit zunehmender Erregerlast und entzündlich bedingter Durchlässigkeit der Endothelien können insbesondere bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) und andere Endotoxine zusammen mit noch vitalen Bakterien in den Blutstrom gelangen.

Durch die Zunahme von systemisch freiwerdenden Entzündungsmediatoren aus neutrophilen Granulozyten sowie Makrophagen kommt es zu einer

generalisierten Aktivierung des Endothels mit konsekutiv erhöhter Permeabilität und Flüssigkeitsverlust ins Interstitium (Mahapatra and Heffner, 2019).

Der verlangsamte Blutstrom mit gleichzeitig verringertem Blutvolumen zieht eine Minderversorgung der Gewebe nach sich, welche akute Nierenschäden verursacht (Majumdar, 2010) und in dem Vollbild eines septischen Schocks mit Laktatazidose und genereller metabolischer Entgleisung münden kann (Mahapatra and Heffner, 2019).

Hier kann die Bildung von infektiösen Mikrothromben mit anschließender Absiedelung in die Kapillargebiete verschiedener Organe sowie eine im Rahmen des septischen Geschehens ausgelöste Koagulopathie mit disseminierter intravasaler Gerinnung (Disseminated intravascular coagulation, DIC) das Risiko für schwere Organschäden bis hin zum multiplen Organversagen weiter erhöhen (Ding et al., 2018).

Während die durch Sepsis bedingte Mortalität vor allem in den USA und Australien zurückgegangen ist, steigt sowohl in den USA als auch in Europa die Sepsis-Inzidenz weiter an, da durch die demographische Entwicklung und immunsuppressiv-wirksamen Therapien das für Sepsis anfällige Patientenkollektiv anwächst (Fleischmann et al., 2016).

1.3.1. Epidemiologie und Relevanz von *Pseudomonas*-bedingter Sepsis

In den westlichen Industrienationen besitzt die durch *P. aeruginosa* hervorgerufene Sepsis eine hohe klinische Relevanz. So werden ca. 19% der mikrobiologisch nachgewiesenen Fälle durch Keime der Gattung *Pseudomonas* hervorgerufen, wobei *P. aeruginosa* mit bis zu 77% die höchste Mortalität verglichen mit anderen gram-negativen und den an Häufigkeit zunehmenden gram-positiven Infektionen bedingt (Mayr et al., 2014).

Die Aggravation einer *P. aeruginosa*-Besiedlung zur Pseudomonaden-Sepsis wird durch bestimmte Risikokonstellationen besonders begünstigt: Cystische Fibrose und invasive Beatmung von hospitalisierten Patienten, starke Immunsuppression, sowie Wundinfektionen auf dem Substrat von Brandwunden,

welche eine lokal eingeschränkte Bakterienabwehr aufweisen (Alhazmi, 2015). Weitere Risikofaktoren für Infektionen mit *P. aeruginosa* sind das Vorhandensein von venösen Zugängen, der Zustand nach großen chirurgischen Eingriffen, sowie die Verwendung von Blasenkathetern (Gellatly and Hancock, 2013). Die endotracheale Intubation wird jedoch nach wie vor mit dem höchsten Risiko und der höchsten Mortalität unter nosokomialen *P. aeruginosa*-Infektionen assoziiert (Williams et al., 2010).

Typisch für eine pseudomonadenbedingte Sepsis ist zusammen mit der bakteriämischen Streuung das Auftreten von Hautläsionen vom Bild eines Ecthyma gangraenosum mit konsekutiv stark erhöhter Mortalität von bis zu über 50% (Martinez-Longoria et al., 2017).

1.3.2. Diagnostik und Therapie von Sepsis

Unter therapeutischen Gesichtspunkten ist dabei besonders zu beachten, dass im Falle einer bakteriellen Sepsis, die grundsätzlich einen medizinischen Notfall darstellt, möglichst rasch eine Behandlung und weiterführende Diagnostik (über Blutkulturen, Abstriche und mikrobiologische Analysen) erfordert. Dabei können schon zeitliche Verzögerungen von nur wenigen Stunden zu einer signifikant erhöhten Mortalität bei den Patienten führen (Liu et al., 2017).

Das Screening findet im Rahmen des neuen qSOFA-Scores (Kriterien Atemfrequenz >22 /Minute, Bewusstseinsveränderungen und systolischer Blutdruck <100 mmHg) statt, um anschließend durch den definitiven SOFA Score die Diagnose einer Sepsis zu sichern und eine rasche Behandlung einzuleiten (Richter et al., 2019).

Eine feinere Unterteilung der Einschätzung von Morbidität und Mortalität lässt sich mit dem SAPS II Score (Simplified Acute Physiology) Score treffen. Dieser findet insbesondere in der Intensivmedizin Anwendung und grenzt die Risikobewertung von Patienten durch mehr physiologische Parameter ein als der qSOFA (Agha et al., 2002).

Die Behandlung ist insofern von hoher Relevanz, als dass die meisten von einer schweren *P. aeruginosa*-Infektion betroffenen Patienten aufgrund ihrer Komorbiditäten (Immunsuppression nach Organtransplantation, hohes Alter, Diabetes Mellitus, Tumorleiden und Chemotherapien, Vorhandensein von Fremdkörpern als Biofilmsubstrat) zur effektiven und dauerhaften Senkung der Erregerlast auf hochwirksame antibiotische Therapiemaßnahmen angewiesen sind. Problematisch ist dabei, dass *P. aeruginosa* eine Vielzahl natürlicher Resistenzen besitzt, etwa gegen Beta-Lactam-Antibiotika, bestimmte Aminoglykoside und manche Fluorchinolone, denen sich das Bakterium mithilfe von Effluxmechanismen und veränderter Permeabilität der Zellmembranen entziehen kann (Bassetti et al., 2018). Zusätzlich ist wie auch bei vielen anderen pathogenen Bakterien ein hoher Anteil von erworbenen Resistenzen zu beobachten, etwa in Süd- und Osteuropa gegen die Gruppen der Fluorchinolone, Aminoglykoside, Cephalosporine, Carbapeneme und Piperacillin-Tazobactam mit über 18% kombinierter Resistenzen gegen Vertreter aus mindestens zwei der aufgeführten Antibiotikaklassen (ECDC, 2018).

1.4. Grundlagen zur Pathogenität von *P.aeruginosa*

Sowohl bei chronischen Infektionen als auch bei akuten Krankheitsgeschehen sind von *P. aeruginosa* bereits verschiedene, meist ubiquitäre oder zumindest sehr häufige Pathogenitätsfaktoren bekannt. Zur besseren Besiedlung des Wirts dienen dabei etwa Zellstrukturen wie Flagellen und Adhäsionspili. Zusätzlich kann sich das Pathogen aufgrund einer vermehrten Expression von Alginaten und ähnlichen Polysacchariden durch Biofilmbildung vor verschiedenen Abwehrmechanismen schützen (z.B. Phagozytose, Immunglobuline) (Pritt et al., 2007).

Neben den Faktoren, die zum Überleben und für die Besiedelung des Wirtsorganismus nötig sind, zeichnet sich die Pathogenität von *P. aeruginosa* durch einige direkt Zell- und Gewebsschädigende Eigenschaften aus: Zur Zersetzung von extrazellulärer Matrix sowie Fibronectin, etwa in Wundbelägen, kann *P. aeruginosa* eine Alkalische Protease sezernieren. Ebenfalls aktiv

sezerniert werden die Elastasen LasA und LasB, welche unter anderem die opsonierend wirkenden Surfactant-Proteine A und B inaktivieren (Beatty et al., 2005). Als wichtiger für direkte Zytotoxizität involvierter Faktor ist der Transmembranproteinkomplex des Typ3 Sekretionssystems zu nennen. Das System injiziert Effektorproteine wie ExoS und ExoU in humane Wirtszellen, welche diese unmittelbar absterben lassen und so Zellnekrosen verursachen (Gellatly and Hancock, 2013). Der größten Bedeutung kommt dabei der Phospholipase ExoU zu, die über Zerstörung der Zellmembranen schon in der Frühphase einer Infektion das spätere Outcome deutlich beeinträchtigen kann (Howell et al., 2013).

Eine weitere wichtige Voraussetzung für die Pathogenität und Anpassungsfähigkeit von *P. aeruginosa* besteht darin, sich möglichst effizient auf rasche Änderungen der Umgebungsbedingungen einstellen zu können. Ein Paradebeispiel hierfür ist insbesondere der Wechsel von der Umwelt in den Wirt oder im Falle von Sepsis der Übertritt aus Schleimhäuten, Wundbelägen oder dem interzellulären Raum in das Blutgefäßsystem. Auf solche und andere drastische Ereignisse ist *P. aeruginosa* durch einen mit schätzungsweise 8% sehr großen Anteil an regulatorisch wirksamen Genen am Genom im Vergleich mit vielen anderen Bakterienspezies gut vorbereitet (Gellatly and Hancock, 2013).

1.4.1. Relevanz von mikrobiellen Biomarkern sowie deren Diagnostik

Wie bereits angesprochen, ist es im Falle einer systemischen Infektion unerlässlich, möglichst früh, durch korrekte und sensitive Diagnostik gestützt, eine zielgerichtete und wirksame antibiotische Therapie durchzuführen (Micek et al., 2005).

Es muss dabei unterschieden werden zwischen diagnostischen und prognostischen Biomarkern. Diagnostische Biomarker wie ein erhöhtes CRP (C-reaktives Protein) und Procalcitonin werden schon seit einigen Jahren verwendet und helfen vor allem, eine mögliche infektiöse Genese schnell zu erkennen,

woraufhin dann der Versuch eines Erregernachweis folgt und die empirische Therapie angepasst werden kann.

Ein gewisser prognostischer Wert kommt dabei vor allem dem Procalcitonin zu, welches bei erhöhten Serumspiegeln und kombiniert mit erniedrigtem Albuminspiegel mit einem höheren Mortalitätsrisiko verbunden sein kann (Higashikawa et al., 2018). Insbesondere bei Sepsis-Patienten ist das von Bedeutung, da hier rasche Interventionen überlebensentscheidend sind (Kibe et al., 2011). Eine Problematik besteht dabei allerdings darin, dass die verwendeten Marker fast ausschließlich vom Patienten selbst stammen. Es kann also nur aufgrund der systemischen Reaktionen des Organismus das Risiko abgeschätzt werden. Auch die immer noch geringe prognostische Aussagekraft dieser Marker stellt ein Problem dar.

Es ist jedoch annehmbar, dass nicht nur Patientenfaktoren, sondern vor allem das Pathogen selbst die Prognose beeinflusst. So können Bakterienstämme pathogener sein als andere und mit einer schlechteren Prognose einhergehen.

Wäre es möglich, schnell zu bestimmen, ob eine Infektion mit einem Hoch- oder Niedrigrisiko-*P.aeruginosa* Stamm vorliegt, könnte mit dieser Information eine Stratifizierung von Patienten stattfinden. Dies zöge ein unterschiedliches Management nach sich, zum Beispiel das Abwägen zwischen Mono- oder Kombinationstherapien. Eine derart personalisierte Behandlung würde Kosten sparen und zugleich evtl. unnötige medikamentöse Belastungen der Patienten reduzieren (Patel and Bergl, 2019). Daher ist es sinnvoll, auch nach pathogenspezifischen Faktoren zu suchen, die bei einfacher Nachweisbarkeit eine Aussage über das prognostische Risiko erlauben.

Neben Aussagen über das Mortalitätsrisiko könnten solche Biomarker auch als Transmissionsmarker verwendet werden. Hierbei läge der Fokus besonders darauf, Keime zu identifizieren, die durch ihre genetischen Eigenschaften besonders dazu neigen könnten, sich im Krankenhaus erfolgreicher auszubreiten als andere.

Die älteste und am weitesten verbreitete Methode der mikrobiologischen Diagnostik ist die Kultivierung mit anschließender Resistenztestung. Obwohl als Goldstandard anzusehen, hat die Kultur folgende Schwächen: Eine recht lange Dauer von teils mehr als 2 Tagen inklusive Resistenztestung, die besonders bei septischen Patienten zu lange sein kann und in deren Rahmen es regelmäßig zu inadäquaten empirischen Therapieansätzen kommt (Wu et al., 2014, Micek et al., 2005). Weiterhin sind septische Infektionen teils mit falsch negativen und kontaminierten Blutkulturen behaftet (Rogers et al., 2019). Noch erschwerend lassen sich kleine Erregermengen kulturell oft nicht nachweisen und *P. aeruginosa* kann einen „nicht-kultivierbaren“ Zustand einnehmen, der den Nachweis erschwert (Hery-Arnaud et al., 2017).

Als diagnostische Methoden sollen hier noch PCR (Polymerase-Chain-Reaction) inklusive der neueren qPCR (quantitative-PCR) und Multiplex-PCR. Diese neueren Verfahren lassen sich zur schnellen und sensitiven Diagnostik von akuten Infektionen einsetzen. Selbst die Unterscheidung von therapeutisch relevanten Merkmalen wie Resistenzen ist molekularbiologisch limitiert möglich (Tang et al., 2017).

Molekularbiologische Verfahren können zudem genotypisch verschiedene Sequenztypen (ST) identifizieren. Bestimmte STs sind im klinischen Setting durchaus relevant, da sie als Risikostämme weltweit besonders inzident sind. Beispiele dafür sind ST111, ST175, und ST235, die auch mittels MALDI-TOF identifiziert werden können (Juan et al., 2017, Tang et al., 2017).

Im Hinblick auf Prävention von Ausbreitung und größeren Ausbrüchen besonders pathogener *P. aeruginosa*-Stämme sollten jedoch nicht nur STs, sondern vor allem wichtige bakterielle Pathogenitätsfaktoren betrachtet werden, deren Vorkommen in *P. aeruginosa* das klinische Mortalitätsrisiko für Patienten signifikant erhöht. Diese könnten als prognostische Biomarker dienen. Aufgrund deren Detektion ließe sich z.B. durch zielgerichtete Therapien und Isolationsmaßnahmen die Verbreitung dieser Stämme einschränken. Insbesondere wenn eine Ausbreitung jener Faktoren durch horizontalen

Gentransfer stattfinden kann, sind solche Maßnahmen zur lokalen Begrenzung von besonderer Bedeutung.

Als Beispiel für oben beschriebene Pathogenitätsfaktoren lassen sich die Pathogenitätsinseln PAPI-1 und PAPI-2 Inseln nennen, die eine Ansammlung verschiedener Virulenzgene im Genom darstellen. Diese verschaffen Stämmen wie PA-14 eine erhöhte *in vitro* Virulenz und sind zugleich am horizontalen Gentransfer beteiligt, was das Spektrum an zu kontrollierenden und zu untersuchenden Pathogenitätsfaktoren über die Ebene einzelner kodierender Gene hinaus erweitert. (Harrison et al., 2010, He et al., 2004). Da in der Regel aber nur *in vitro* Nachweise erfolgen, ist die klinische Relevanz solcher Faktoren oft unklar.

1.4.2. *helP* als Kandidat für einen bakteriellen prognostischen Biomarker

Mithilfe mehrerer isolierter klinischer Stämme aus Patienten mit *Pseudomonas aeruginosa*-assoziiertes Sepsis konnte durch sowohl genomische als auch proteomische Analysen retrospektiv gezeigt werden, dass die DEAD/DEAH box Helicase *HelP* (GenBank Nummer: KY940721) im klinischen Setting die Mortalität signifikant erhöht (Hazard Ratio = 2.01, $p = 0.05$) (Willmann et al., 2018).

Das Gen *helP* ist auf der Pathogenitätsinsel PAPI-1 lokalisiert. Da PAPI-1 über Konjugationspili zwischen einzelnen Zellen ausgetauscht werden kann, besitzt es *helP* die zentrale Fähigkeit, sich über horizontalen Gentransfer in verschiedenen *Pseudomonas*-Populationen auszubreiten (Hong et al., 2017). Dies kann insbesondere im klinischen Zusammenhang von großer Bedeutung sein kann (Filloux, 2010).

1.5. Ansätze zur experimentellen Überprüfung von Pathogenitätsfaktoren

Für eine experimentelle Untersuchung von Vorgängen während einer Pseudomonadensepsis beim Menschen liegt es nahe, auf ein Tiermodell zurückzugreifen, welches in Hinblick auf das Immunsystem dem menschlichen ähnelt. Aus diesem Grund wurde auf ein *Galleria mellonella* Tiermodell zurückgegriffen (Kapitel 1.5.2., S. 21).

1.5.1. Wirtsorganismen für *P. aeruginosa* und Pathogenitätsmodelle in vivo

Als Pathogen kann *P. aeruginosa* die meisten Klassen mehrzelliger Lebewesen befallen.

Pseudomonas aeruginosa ließe sich somit in diversen der bekannten Modellorganismen auf pathogene Eigenschaften testen. Zu diesen gehören Pflanzen, frei lebende Einzeller/Protozoen, Wirbeltiere wie Zebrafische und Mäuse, Nematoden und Insekten wie *Drosophila melanogaster* und eben auch *Galleria mellonella* (Bodey et al., 1983, Cafora et al., 2019, Lee et al., 2018, Pukatzki et al., 2002, Starkey and Rahme, 2009).

1.5.2. *Galleria* als Tiermodell

Galleria mellonella hat sich bereits als Infektionsmodell zur Untersuchung der Pathogenitätsfaktoren diverser Bakterienspezies und Hefen etabliert, darunter auch *Pseudomonas aeruginosa* und andere wichtige Keime wie *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* und Enterokokken (Junqueira, 2012).

Entscheidend dabei ist, dass sich die Virulenz und Letalität der meisten getesteten Erreger inklusive *P. aeruginosa* in Gallerienlarven sehr ähnlich wie in Säugetieren und menschlichen Patienten verhält und somit in gewissen Grenzen die Ergebnisse übertragbar sind (Jander et al., 2000, Kay et al., 2019, Six et al., 2018, Miyata et al., 2003).

1.5.3. Mensch und Motte: Immunologische Parallelitäten in der angeborenen Immunabwehr

Da *Galleria mellonella* als Insekt phylogenetisch weit vom Menschen entfernt ist und darüberhinaus im Gegensatz zum Menschen keine adaptive humorale und zelluläre Immunabwehr besitzt, ist es in seiner Aussagekraft zu infektionsphysiologischen Vergleichen begrenzt.

Für die Untersuchung septischer Infektionen sind Gallerien aus mehreren Gründen gut geeignet: Septische Krankheitsverläufe laufen meist akut ab und betreffen damit vor allem Funktionen der angeborenen Immunabwehr. Trotz großer Unterschiede geht man heutzutage davon aus, dass diese „unspezifische“ Immunabwehr mit großer Ähnlichkeit in Insekten und Wirbeltieren abläuft. So besitzt *Galleria mellonella* mehrere Typen von sogenannten Hämozyten, die von Wundverschluss über Phagozytose und Einkapselung von Pathogenen ähnliche Aufgaben übernehmen wie Monozyten und Granulozyten (Tsai et al., 2016, Cools et al., 2019). Weiterhin besitzen Gallerien als humorale Faktoren proteinbasierte Opsonine, welche an pathogenassoziierte Strukturen binden können, sowie antimikrobielle Peptide, die auch bei Wirbeltieren vorkommen (Tsai et al., 2016).

1.5.4. Die Sonderposition von *Galleria mellonella* unter wirbellosen Modellorganismen

Aus biologischer Sicht besitzt *Galleria mellonella* besondere Eigenschaften, die sie als Modellorganismus zur Studie von menschlichen Infektionen geeignet machen. Ein wichtiger Punkt ist die Tatsache, dass Gallerien als Bienenstockparasiten natürlicherweise an recht hohe Temperaturen mit Idealwerten von um 30°C und einer weiten Toleranz bis über 37°C in ihrer Entwicklung angepasst sind (Kwadha et al., 2017). Das ist insofern von Bedeutung, als dass Bakterien wie *P. aeruginosa* beim Übergang von einer kühleren Umgebung in das warme Milieu eines (menschlichen) Wirts ihrem Metabolismus stark umstellen und die Pathogenitätsfaktoren, die für den

Menschen besonders relevant sind, erst unter diesen Bedingungen nennenswert exprimieren (Barbier et al., 2014). In anderen Organismen mit begrenzter Temperaturtoleranz (z.B. Zebrafische oder Drosophila) sind solche Untersuchungen daher nicht sinnvoll (Junqueira, 2012, Meeker and Trede, 2008).

1.5.5. Praktische und ethische Aspekte

Mit ihrer Größe von 2 bis 3 cm sind Gallerienlarven relativ einfach in der Handhabung und können mit einer bestimmbar Anzahl an Bakterien infiziert werden. Da das letzte Larvenstadium vor der Verpuppung nur noch wenig Nahrung aufnimmt, sind auch keine besonderen Behältnisse oder Vorkehrung zur Handhabung von Nöten. Nicht zuletzt ist es auch aus ethischer Sicht nachvollziehbar und vermutlich auch vernünftig, auf Gallerienlarven zurückzugreifen und somit die Beteiligung von Wirbeltieren wie Fischen und Nagern zu reduzieren (Tsai et al., 2016).

2. Zielsetzung und zentrale Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, die epidemiologisch ermittelte klinische Relevanz der DEAD-Box Helicase *helP* als prognostischen Biomarker und potenziellen Pathogenitätsfaktor experimentell zu überprüfen. Dabei sollen als Analogie zur Pseudomonadensepsis Gallerienlarven als *in vivo* Modell dienen. Grundlage des Vergleichs sind dabei Paare an *helP* positiven und *helP* negativen Stämmen, welche gemäß ihrer vorhandenen Virulenzfaktoren bis auf *helP* übereinstimmen.

Schwerwiegende Verläufe von Pseudomonadensepsis können jedoch sowohl auf der Aggressivität des Erregers als auch auf seiner ökologischen Fitness beruhen. Eine hohe ökologische Fitness inklusive schneller Anpassungsfähigkeit verhilft dem Bakterium zu effizienterer Vermehrung und erhöht somit automatisch den Druck auf das Immunsystem des Patienten. Unter Berücksichtigung dieser Aussage lässt sich über das Wachstumsverhalten unter wirtsähnlichen Bedingungen mit Stressoren wie fieberhohen Temperaturen oder Nährstoffmangel näher ermitteln, welchen Einfluss *helP* im Allgemeinen auf die Ökologie von *P. aeruginosa* haben könnte. Daher sollen neben der *in vivo* Virulenz auch die Wachstumseigenschaften der verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämme unter unterschiedlichen Bedingungen mit Stressoren und die Auswirkung von *helP* darauf untersucht werden.

3.Material und Methoden

3.1. Selektion der Bakterienstämme

Auf ihre Pathogenität untersucht wurden insgesamt 14 verschiedene *P. aeruginosa* Stämme (Tabelle 1):

<i>helP</i> positiv	<i>helP</i> negativ
PA 14	PA 14 - <i>helP</i>
ID 83	ID 155
ID 113	ID 177
ID 120	ID 114
ID 165	ID 109
ID 166	ID 106

Tabelle 1: Gegenüberstellung der verglichenen P.aeruginosa Stämme nach Vorhandensein von helP

Der Laborstamm PA 14 (Accession Number NC_008463.1) sowie eine daraus abgeleitete *helP*-freie Mutante, hier genannt PA 14-*helP*, dienen als nicht-klinisches Modell. Diese *helP*-freie PA14-Mutante wurde als In-Frame Mutant von der AG Bohn hergestellt: Hierzu wurden mit einem Suizidplasmid durch Konjugation aus *E.coli* in PA14 Rekombinanten produziert. Anschließend wurden über Sucrosegegenselenktion und Antibiotikaselektion Zweitrekombinanten isoliert. Der Nachweis der In-Frame Mutation im Leseraster von *helP* erfolgte durch PCR und Elektrophorese.

Währenddessen sind die restlichen 10 verwendeten Stämme (ID83 bis ID177) allesamt klinische Isolate von erwachsenen Patienten mit positiven Blutkulturen und septischem Krankheitsbild. Sie wurden ohne molekulargenetische Modifikationen in ihrer jeweiligen Wildtypform verwendet.

Um eine gute Vergleichbarkeit zu gewährleisten und Störfaktoren zu minimieren, wurden die Isolate zu Vergleichspaaren gematcht. So besitzen sie jeweils ähnliche von *helP* unabhängige Pathogenitätsfaktoren, bei den zugehörigen Patienten gleiche SAPS II Scores und den gleichen Behandlungsstatus was Antibiotika betrifft, unterscheiden sich aber in dem Vorhandensein von *helP*.

Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Universität Tübingen anerkannt (Referenznummer: 364/2013R).

Im Folgenden wurden bestimmte Stämme stets paarweise verglichen, wobei Stamm1 dem entsprechenden Stamm2 gegenübergestellt wurde (Tabelle 2).

Vergleichspaar	Stamm 1	Stamm 2
1	PA 14	PA14 - <i>helP</i>
2	ID 83	ID 155
3	ID 113	ID 177
4	ID 120	ID 114
5	ID 165	ID 109
6	ID 166	ID 106

Tabelle 2: Vergleichspaare für die statistische Auswertung

3.2. Verwendete Materialien

3.2.1. Kultursubstrate

Zur Kultivierung der *Pseudomonas aeruginosa* Stämme wurden als solide Medien Petrischalen mit TSA-Agar und TSA-Blut-Agar verwendet. Die verbrauchten Flüssigmedien waren:

- 200ml Humanserum (Blutgruppe A, Rh negativ) der Universität Tübingen
- RPMI-1640 Medium (R7509-1L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- aus Pulver angerührtes LB Medium (LB-Lennox von Roth, Karlsruhe, Deutschland Art.Nr.X964.4)
- PBS als zehnfache Verdünnung einer Fertiglösung (10x PBS P5493-1L von Sigma Aldrich, St. Louis, USA)

3.2.2. Pipettieren und OD Messungen

Alle Versuche bis auf das Messen der Optischen Dichte (OD) wurden unter der sterilen Werkbank durchgeführt. Pipettiert wurde mit:

- mechanische Eppendorf Research Pipetten der Volumina 100-1000µl, 10-100µl und 1-10µl (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

- Sarstedt Pipettenspitzen 200µl (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland)
- greiner bio-one Pipettenspitzen 1000µl (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich)
- 100µl Pipettenspitzen long von BrandTech (Brand Tech Scientific Inc, Essex, USA)

Für die OD Messungen wurden Sarstedt Küvetten 10*4*45mm aus Polystyrol (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) zusammen mit dem Eppendorf BioPhotometer (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) benutzt.

3.2.3. Injektionsmaterial und Galleria Larven

Die verwendeten TruLarv *Galleria mellonella* Larven waren im fünften Larvenstadium und wurden von der Firma BioSystems Technology (Biosystems Technology Ltd., Exeter, England) bestellt und bei Raumtemperatur gelagert.

Bis zur Injektion wurden die Tiere nicht länger als 5 und durchschnittlich 2 Tage gelagert. Zur Injektion wurde das Dispenser System PB-6001 (Hamilton Company, Reno, USA, PAT.3161323) zusammen mit den Hamilton Gastight#1750 1ml Glasspritzen und Sterican 0,40 x 20mm 27 G x 3/4“ Einmalkanülen (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) als Aufsatz verwendet.

Die Larven wurden zur Inkubation für 36 Stunden bei 37°C in quadratische Petrischalen (120x120x17mm, 688102, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) verbracht.

Alle mehrfach verwendeten Geräte und Oberflächen (Dispenser, Glasspritzen und Spritzenkolben) wurden nach Gebrauch mit 80%vol. vergällter Ethanol/Wasser Lösung gereinigt und desinfiziert, die Glasspritzen wurden bis zu den nächsten Versuchen mit genannter Ethanollösung gefüllt aufbewahrt.

3.2.4. Mikrotiterplatten und Wachstumskurven

Zum Erstellen der Wachstumskurven wurden Nuclon Delta Surface 48 well Platten von (Thermo fisher Scientific, Waltham, USA), SealPlate film sterile Abdeckplatten (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) sowie als Ablesegerät der EPOCH2 microplate reader (BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland) verwendet. Unter Microsoft Windows© wurde das Gerät vom PC aus mit dem Programm Gen5 3.00 angesteuert.

3.3. Versuchsmethoden für die *Galleria* Experimente

3.3.1. Herstellen einer Bakteriensuspension von ca. 1000 CFU/ml

Am Vortag werden von den ausgewählten Stämmen *P.aeruginosa* Flüssigkulturen in ca. 20ml LB angesetzt und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Es werden fünf 2ml Plastikgefäße (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) (Gefäß 1 bis Gefäß 5) pro zu verdünnendem Stamm benötigt. Gefäß 1 wird mit 1900µl LB, Gefäß 3, 4 und 5 jeweils mit 980µl PBS gefüllt. Als erster Verdünnungsschritt werden nun 100µl aus der Übernachtskultur in Gefäß 1 pipettiert und ca. 5 Sekunden bei ca. 3000 rpm in waagerechter Position gevortext. Aus der entstandenen Suspension soll eine Stammsuspension mit einer OD600 = 0,1 hergestellt werden.

Dazu wird die OD600 von 700µl aus Gefäß 1 gegen 700µl reines LB als Nullwert gemessen. Nach den Berechnungen $0,1 / \text{Messwert} = V_s$ und $1 - V_s = V_{pbs}$, beide Angaben in ml, wird zuerst das Volumen V_{pbs} und danach das Volumen V_s in Gefäß 2 pipettiert und wiederum ca. 5 Sekunden waagrecht gevortext. In Gefäß 2 sollte sich nun 1ml dieser neuen Stammsuspension befinden.

Die Gefäße 3, 4 und 5 werden mit jeweils 980 µl PBS gefüllt. Anschließend werden aus Gefäß 2 20,2 µl in Gefäß 3 pipettiert, dieses wird ca. 5 bis 10s lang gevortext. Aus Gefäß 3 werden wiederum 20,2 µl in Gefäß 4 pipettiert und nach Vortexen aus Gefäß 4 20,2 µl in Gefäß 5 überführt. Die Konzentration der Suspension in Gefäß 5 sollte nun ca. 1000 CFU/ml betragen. Als CFU (Colony forming Unit) wird dabei eine Bakterienmenge bezeichnet, die ausgebracht auf ein festes Vollmedium auf Agar zur Bildung von einer homogenen Bakterienkolonie führt. Entsprechend würden nach Ausstreichen von 10 µl einer

1CFU/µl Suspension durchschnittlich 10 distinkte Kolonien wachsen. Je nach Stamm kann bei größeren Abweichungen der CFU das Verhältnis der aus Gefäß 4 entnommenen Menge zum PBS in Gefäß 5 entsprechend angepasst werden.

Zum Detektieren von möglichen Kontaminationen durch andere Bakterienspezies werden aus Gefäß 4 jeweils 20,2 µl auf eine Blutagarplatte pipettiert und wie die Gallerien bei 37°C inkubiert, um das Koloniewachstum beurteilen zu können.

3.3.2. Injektion in *Galleria mellonella* Larven

Die bakterielle Suspension wird aus Gefäß 5 in die Spritze aufgezogen und anschließend die Injektionsnadel aufgeschraubt. Auf eine Entfernung etwaiger Luftblasen im Zylinder ist zu achten, um Ungenauigkeiten und Verzögerungen bei der Injektion sowie der Injektion von Luft vorzubeugen.

Zur Überprüfung der korrekten CFU werden aus dem montierten Injektionssystem jeweils zweimal 10 µl (10 µl entspricht einem Druckstoß des Injektors) auf TSA-Platten ausgestrichen, welche bei 37°C parallel zu den Gallerienlarven inkubiert werden. Nach der Inkubation dienen diese Platten als Richtwert der korrespondierenden, in die Larven injizierten, Suspension und werden ausgezählt. Die als akzeptabel festgelegte Spannweite beträgt dabei zwischen 8 und 16 CFU, Durchläufe bei denen die CFU außerhalb dieses Bereichs liegen, werden parallel mit den anderen zur Vollständigkeit mit dokumentiert.

In jedem Versuchsdurchlauf werden 30 Larven mit einem Stamm infiziert, welche übersichtshalber zu je 15 Stück auf zwei Petrischalen verteilt werden.

Für die Injektion wird die Gallerialarve auf dem Boden der Petrischale in Längsrichtung so mit einem Finger fixiert, dass die ventrale Seite zum Versuchsdurchführer gerichtet ist. Anschließend wird mit der anderen Hand ein Druckstoß aus dem Injektor in die Basis eines der beiden vorletzten Nachschieberfüße appliziert (Abbildung 1, S.30).

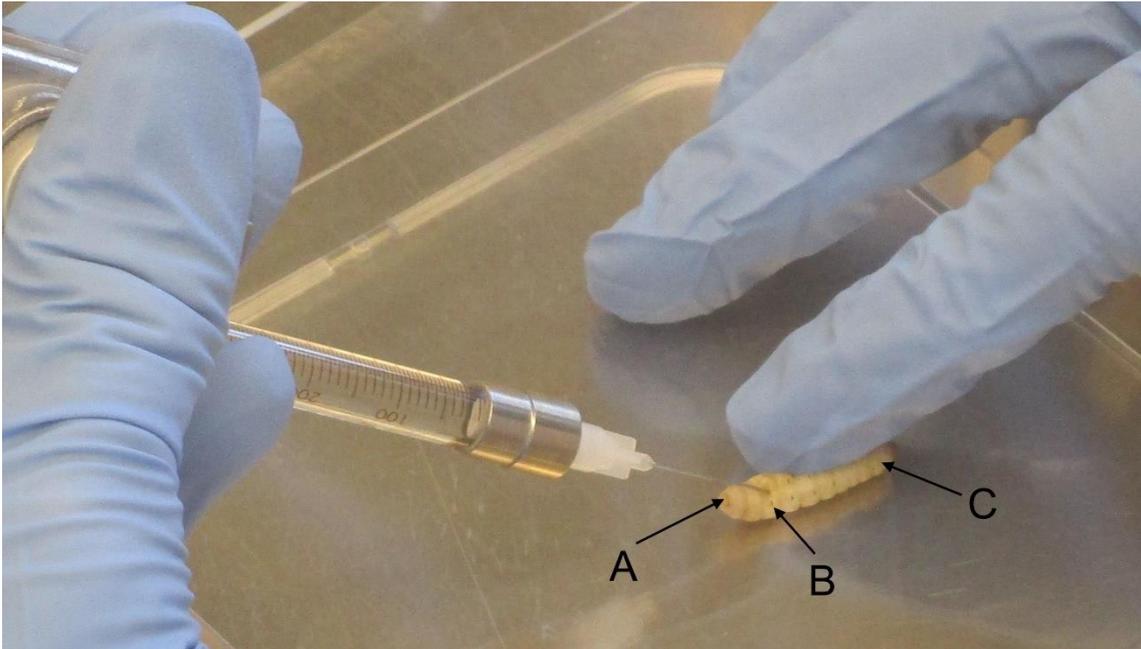


Abbildung 1: A= letztes Nachschieberfußpaar, B= vorletztes Nachschieberfußpaar, C= Kopfende mit 3 thorakalen Beinpaaren

Um ein übermäßiges Austreten von Hämolymphe und eventuell auch Injektionsmaterial zu verhindern, wird die Larve nun losgelassen und mit möglichst wenig Druck von der Injektionskanüle gezogen (Abbildung 2, S. 30).

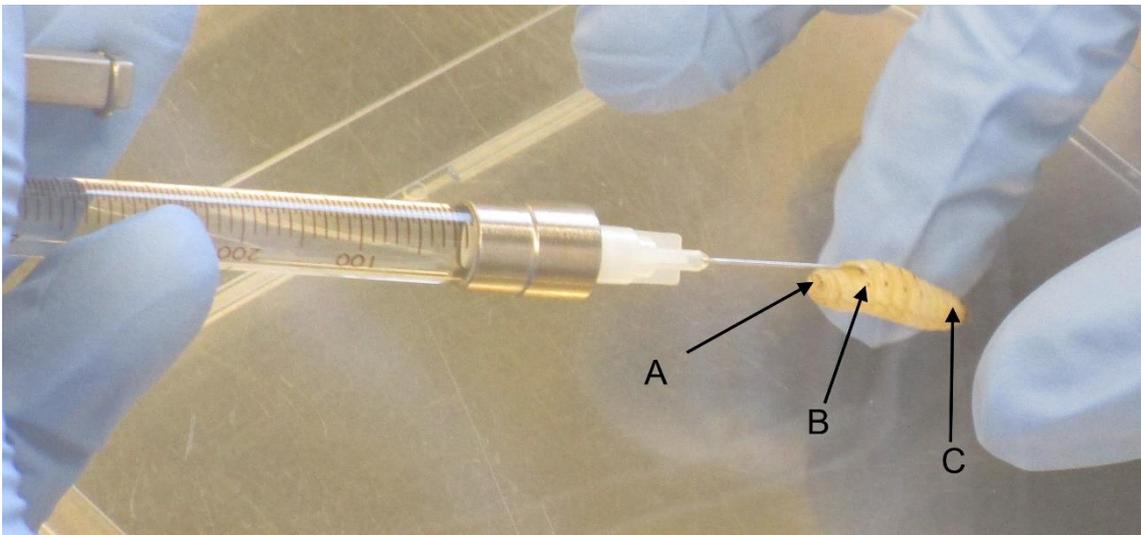


Abbildung 2: A= letztes Nachschieberfußpaar, B= vorletztes Nachschieberfußpaar, C= Kopfende mit 3 thorakalen Beinpaaren

Indem der Finger, der zur Fixierung und anschließenden Entfernung der Larve von der Kanüle dient, zum Beispiel durch den Zylinder einer Plastikspritze geschützt wird, lässt sich die Verletzungsgefahr für die injizierende Person minimieren und die Larve mit der Spitze des Spritzenzylinders von der Kanüle leicht abstreifen (Abbildung 3, S. 31).

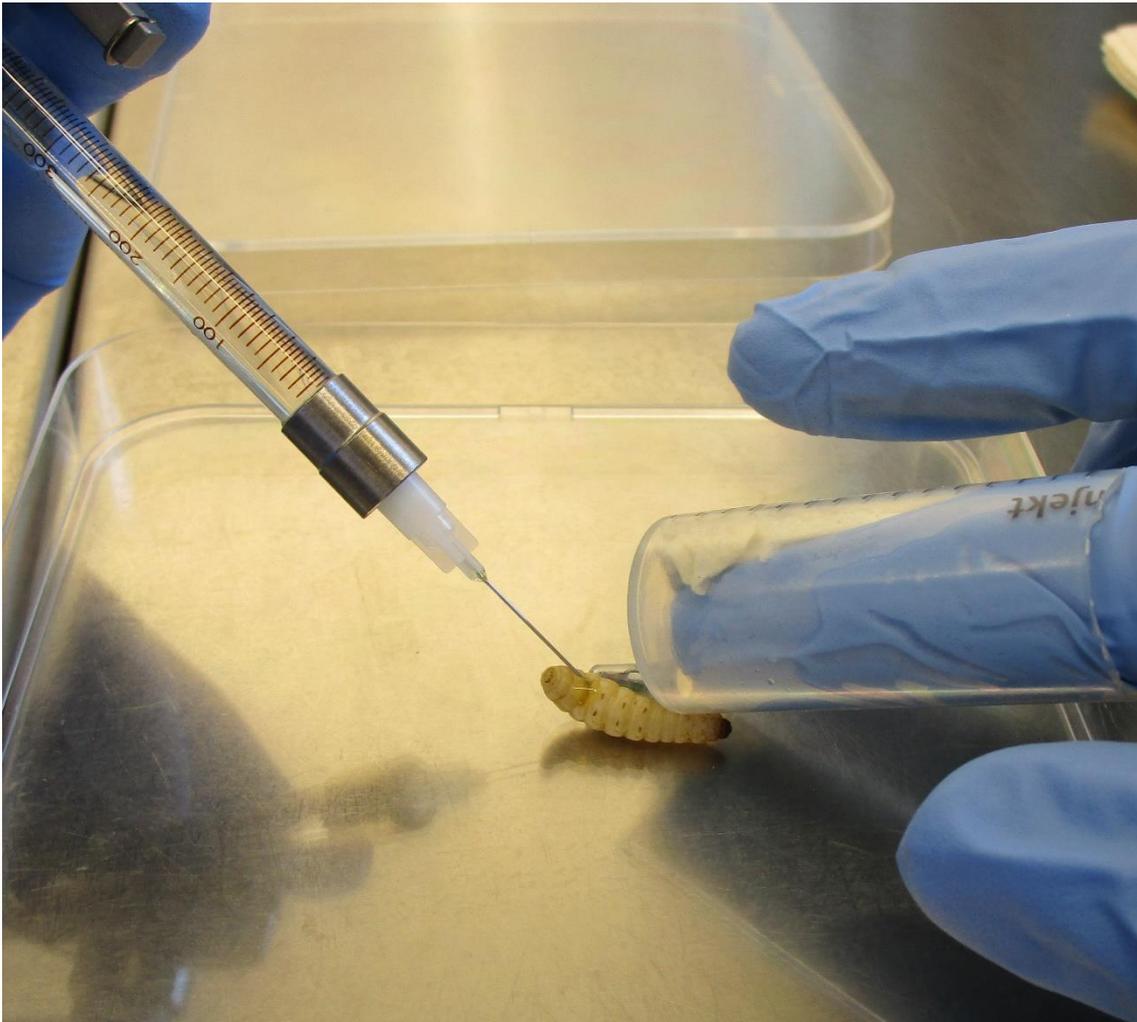


Abbildung 3: Injektion unter Verwendung des Fingerschutzes

Als Negativkontrolle werden zusätzlich zu jedem Durchlauf noch 30 Gallerien mit reinem PBS zu je 10 μl auf die gleiche Weise injiziert wie die Verum-Gruppen.

Die Petrischalen mit den Gallerien sowie die Platten mit der Kontaminations- und CFU-Kontrolle werden bei 37°C im Dunkeln inkubiert.

3.3.3. Dokumentation der Mortalität

Ab 12 Stunden Inkubationszeit werden die Gallerien alle 2 Stunden auf Todesfälle hin untersucht. Eine Larve wird als tot eingetragen, wenn sie weder spontan noch auf mehrmalige mechanische Reizung am Hinter-sowie am Vorderende eine motorische Reaktion zeigt. Zusätzlich sollte am dorsalen Herzschlauch keine Bewegung mehr erkennbar sein (Abbildung 4, S. 32).



Abbildung 4: vier tote Gallerienlarven in einer Petrischale. Die Tiere sind zum Dokumentationszeitpunkt in variablen Anteilen dunkel verfärbt oder normal cremefarben.

Tote Gallerien werden nach der Dokumentation sofort in einem Falcon Tube bei -80°C verbracht, bevor sie zum Autoklavieren entsorgt werden.

Der Beobachtungszeitraum erstreckt sich von 12 bis 24 Stunden mit einer letzten Nachkontrolle nach 36 Stunden. Kontaminationen mit andersartigen Bakterienkolonien lassen sich bereits nach 24 Stunden optisch erkennen. Die zugehörigen Larven, die mit diesem Inokulum injiziert wurden, werden von der statistischen Auswertung ausgeschlossen. Die ermittelte CFU wird für jeden Versuchsdurchlauf dokumentiert.

Für jeden untersuchten *P.aeruginosa* Stamm sollen schließlich mindestens 3 Durchgänge mit jeweils 30 injizierten Larven (insgesamt 90 Larven als Triplikate) vorliegen, deren CFU sich im Bereich von 8 bis 16 befindet. Dieser Bereich soll eingehalten werden, um zu große Störeffekte durch verschiedene CFU Zahlen in den Larven möglichst zu begrenzen.

3.4. Versuchsmethoden für Fitness-Assays in verschiedenen Medien und Temperaturen

3.4.1. Herstellen einer Bakteriensuspension von 1000 CFU/ml

Aus einer Übernachtskultur bei 37°C des gewählten Stamms *P.aeruginosa* auf Blut-TSA-Platte wird eine Kolonie entnommen und in einem Gefäß mit 2 ml PBS suspendiert sowie gevortext.

Mit 700 µl der Suspension wird gegen reines PBS die OD600 gemessen und in einem weiteren Gefäß auf Basis dieser Messung 1ml mit einer OD600= 0,1 angesetzt (Kapitel 3.3.1., S. 28).

3.4.2. Animpfen und Inkubation der Mikrotiterplatten

Der Stamm wird nun unter folgenden Bedingungen auf sein Wachstum getestet (Tabelle 3, S. 33):

Kulturmedium	Temperatur
LB	37°C
	40°C
RPMI	37°C
	40°C
Humanserum	37°C
	40°C

Tabelle 3. Bedingungen und Medien für die Wachstumsassays

Vor der Verwendung wird das Humanserum einmalig für 30 Minuten bei 56°C steril inkubiert, um vorhandenes Komplement als Störfaktor weitestgehend zu inaktivieren.

Auf der 48Well-Platte wird jedes Well mit 500 µl Medium gefüllt, anschließend werden von der vorbereiteten Suspension je 5 µl hinzugegeben. Das führt zu einer rein durch die bakterielle Zelldichte verursachten OD600 von rechnerisch 0.001, was zugleich an der unteren Messgrenze des verwendeten OD-Readers liegt.

Die Mikrotiterplatte wird zum Verdunstungsschutz und gegen Kreuzkontaminationen mit einer Abdeckfolie abgeklebt und für 24 Stunden im OD-Reader inkubiert.

3.5. Datenauswertung und Visualisierung

3.5.1. Gallerien Überlebensanalysen und Hazard Ratios

Für die graphische Darstellung des kumulativen Überlebens im Verlauf der Zeit wurden die Daten der Gallerienversuche mit dem Programm SPSS Statistics 25 (IBM, New York, USA) in Kaplan-Meier-Kurven umgesetzt.

In der Analyse der Gallerienmortalität gibt es folgende Variablen zu beachten: Das Sterbeereignis einer Larve als abhängige Variable, das Vorhandensein von *helP* und die Anzahl injizierter CFU von *P.aeruginosa* als unabhängige Variablen.

Es soll zur Einschätzung des Einflusses dieser beiden Variablen auf die Galleriensterblichkeit auf die Anwendung einer Cox-Regression zurückgegriffen werden. Hierbei interessiert nicht nur die Gesamtmortalität der verschiedenen Gruppen als Endpunktanalyse. Um die Überlebensfunktionen besser beurteilen zu können, muss auch die Mortalität in ihrem Verlauf über mehrere Beobachtungszeitpunkte miteingeschlossen werden. Daher soll in dieser Überlebenszeitstudie zur Interpretation der Cox-Regression die Hazard-Funktion angewendet werden, um im Kontext des zeitlichen Verlaufs die Risiken einschätzen zu können.

Eine Hazard Ratio von 1 würde dabei bedeuten, dass das Risiko für Mortalität im Beobachtungszeitraum durch die unabhängige Variable nicht beeinflusst wird bzw. in den Vergleichsgruppen gleich ist. Bei einer Hazard-Ratio (HR) von <1 ist das Risiko entsprechend reduziert gegenüber der Vergleichsgruppe. Währenddessen ist bei einer HR von >1 das Risiko erhöht: so wäre hier bei einer HR von 1,3 das Risiko, mit der Ausprägung der unabhängigen Variable im Beobachtungszeitraum zu sterben, 30% erhöht gegenüber der Vergleichsgruppe.

Die Hazard-Ratios wurden mit dem Programm Stata Version 12.1 (Stat Corp., College 582 Station, USA) mit Unterstützung von Prof. Dr. Matthias Willmann ermittelt. Zusammengehörende Stämme wurden dabei als Cox-Regression analysiert. Um über alle Vergleichspaare und dem damit verbundenen Matching hinweg die Effekte von *helP* und injizierten CFU zu ermitteln, wurde zusätzlich

auf ein covariates Shared frailty Modell zurückgegriffen, welches die zufällige zu erwartende Heterogenität unter den Vergleichspaaren mit einbezieht. Unter den angegebenen Bedingungen wurden die Hazard-Ratios sowohl für die einzelnen isolierten Vergleichspaare als auch für die Gesamtheit an Gallerien in Abhängigkeit von *help* und der injizierten CFU errechnet. Variablen aus statistisch signifikante univariable Beziehungen wurden einer multivariaten Testung unterzogen.

Um herauszufinden, ob die eventuellen Unterschiede der untersuchten Stämme in den Kaplan-Meier-Kurven über den gesamten Beobachtungszeitraum signifikant ausfielen, wurden diese dem Log-Rank Test unterzogen. Das Signifikanzniveau sei dabei $\alpha=0,05$. Weiterhin sollte getestet werden, ob die Einflüsse der unabhängigen Variablen *help* und CFU einen signifikanten Einfluss auf die Mortalität der Larven haben. Zu diesem Zweck wurde die Cox-Regression dem Likelihood-Ratio unterzogen, ebenfalls mit dem Signifikanzniveau von 0,05. Beide Operationen wurden ebenfalls in Stata durchgeführt.

3.5.2. Wachstumsanalyse der Fitness-Assays

Zur graphischen Veranschaulichung wurden die Werte des OD-Readers mit SPSS 25 Statistics (IBM, New York, USA) als Punktediagramme graphisch dargestellt.

Um das Wachstum der Stämme unter den verschiedenen Bedingungen vergleichbarer darzustellen, wurden die Punktwolkendiagramme der OD-Werte mit Stata über lineare Regression zu Steigungswerten zusammengefasst.

Die mit Stata (Stat Corp., College 582 Station, USA) gewonnenen linearen Regressionswerte wurden zur Anschaulichkeit in SPSS 25 Statistics (IBM, New York, USA) als Fehlerbalken-Diagramme mit Whiskers als 95%-Konfidenzintervall graphisch dargestellt: So ließen sich sowohl die mittleren linearen Regressionswerte als auch die Streubreite innerhalb des 95%-Konfidenzintervalls übersichtlich und nebeneinander vergleichbar zeigen.

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der Gallerienversuche

4.1.1. Erfolgsrate der Gallerien-Inokulationen

Von insgesamt 2220 beobachteten Gallerienlarven lagen 67,6% innerhalb des eingangs festgelegten Bereichs von 8 bis 16 CFU pro Injektion. Die restlichen 32,4% deren CFU außerhalb dieses Bereichs lagen wurden dokumentiert, jedoch nicht in die auf den vorgehenden Seiten beschriebenen Analysen mit einbezogen, da die Mortalität insbesondere bei sehr hohen CFU Zahlen teils drastisch erhöht sein könnte und dabei andere Effekte, etwa durch *helP*, überlagern würde. Zudem würde eine zu große Streubreite der CFU die Vergleichbarkeit der Versuchsreihen deutlich einschränken.

4.1.2. Überleben in Abhängigkeit von *helP* in den einzelnen Vergleichspaaren

Die Inokulation mit den *P. aeruginosa* Stämmen haben bei den Gallerienlarven sowohl verschiedene Gesamtmortalitäten als auch variable zeitliche Verläufe im Sterbeverhalten hervorgerufen. Zur grafischen Veranschaulichung wurden für jedes Vergleichspaar entsprechende Kaplan-Meier Diagramme erstellt. Die Kreuze stehen dabei für die jeweiligen Beobachtungsendpunkte mit den verbliebenen überlebenden Larven. (Abbildung 5 - 10, S. 38 bis S. 41):

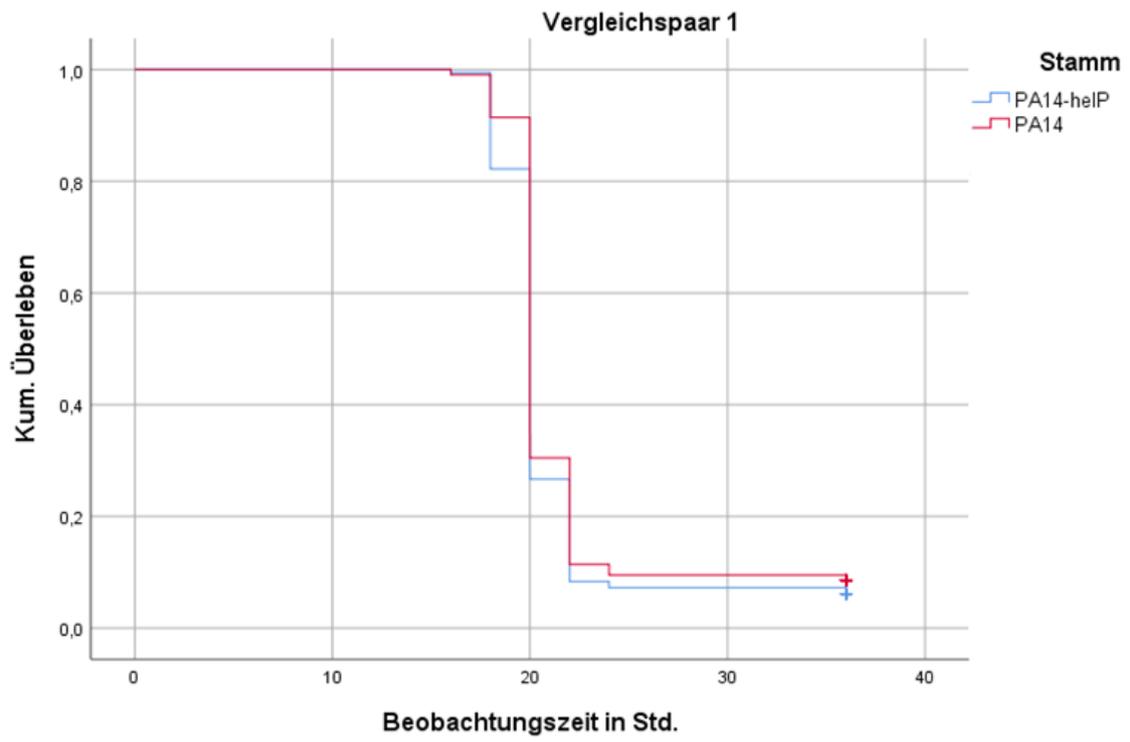


Abbildung 5: Überlebenskurven nach Injektion von PA14/PA14-helP

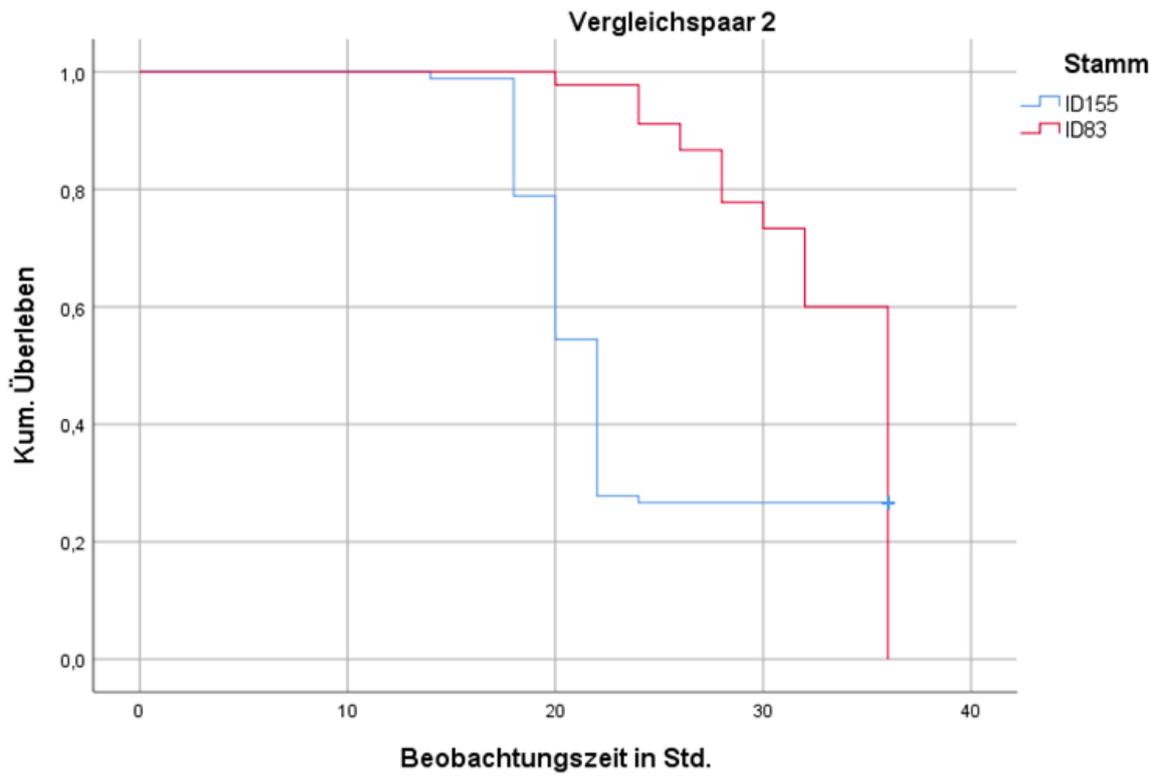


Abbildung 6: Überlebenskurven nach Injektion von ID155/ID83

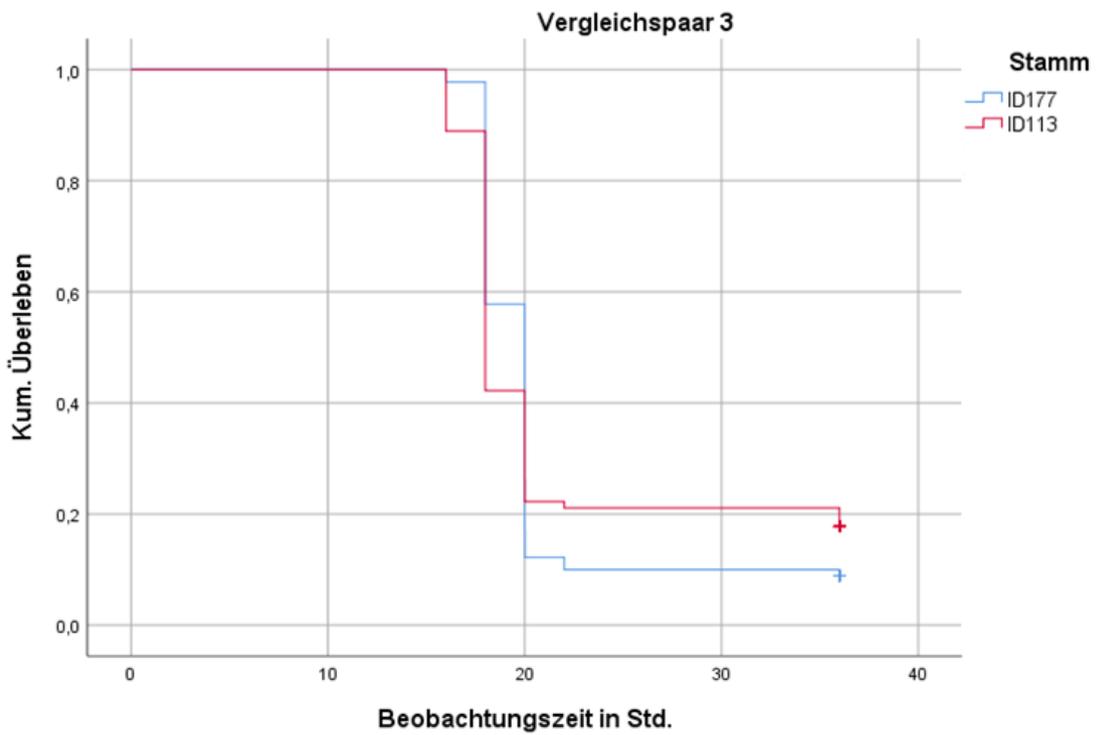


Abbildung 7: Überlebenskurven nach Injektion von ID177/ID113

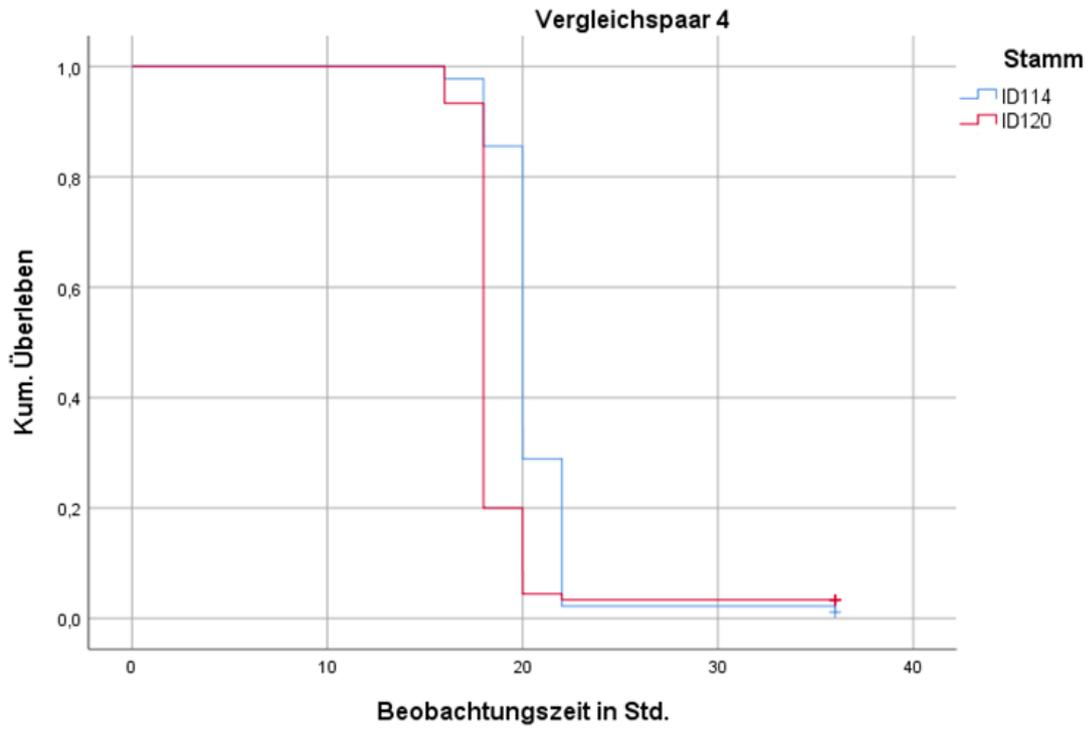


Abbildung 8: Überlebenskurven nach Injektion von ID114/ID120

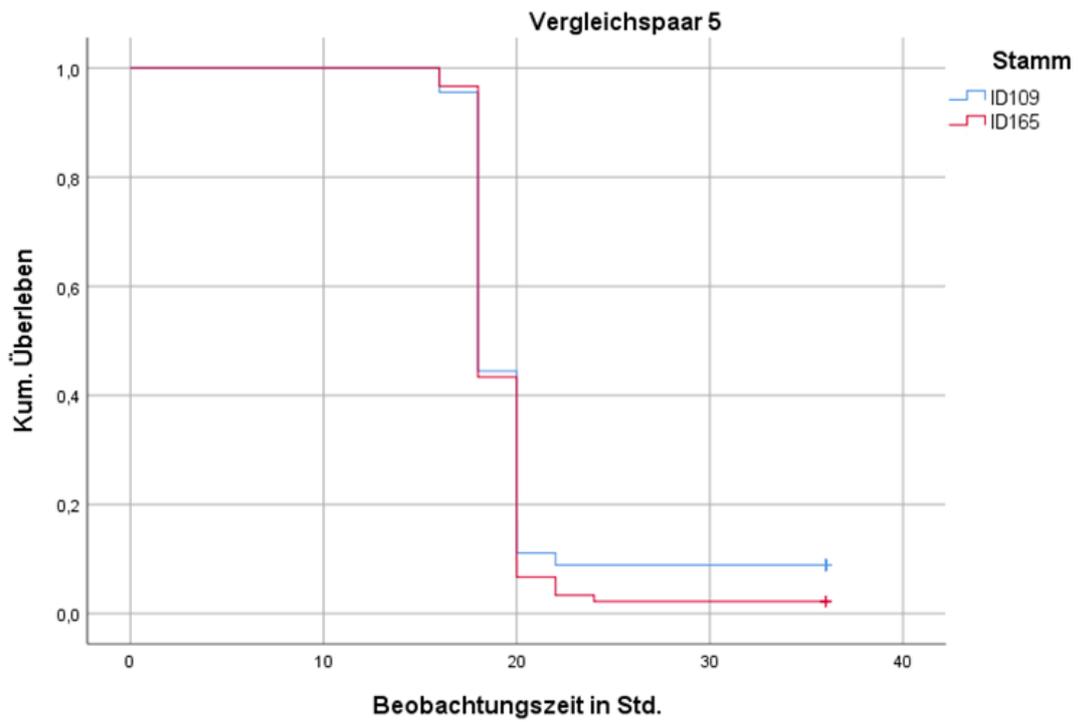


Abbildung 9: Überlebenskurven nach Injektion von ID109/ID165

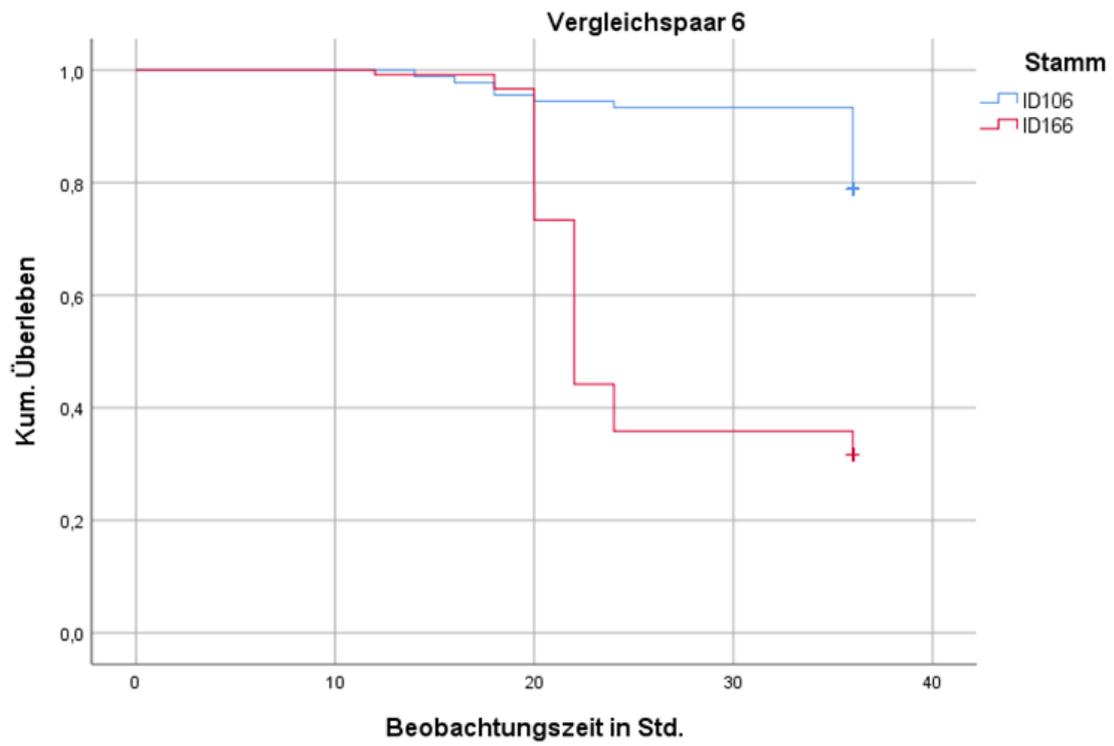


Abbildung 10: Überlebenskurven nach Injektion von ID106/ID166

4.1.3. Ergebnisse der Kaplan-Meier Kurven

Es ist zu erkennen, dass bei einigen Vergleichspaaren sowohl der Endpunkt als auch die zeitliche Dynamik der Mortalität zwischen den Stämmen sehr ähnlich verlaufen. Zu diesen gehören Vergleichspaar 1 (PA 14 / PA 14 -*helP*, Abbildung 5, S. 38), Vergleichspaar 3 (ID 113 / ID 177, Abbildung 7, S. 39), Vergleichspaar 4 (ID120 / ID 114, Abbildung 8, S. 40) sowie Vergleichspaar 5 (ID 109 / ID 165, Abbildung 9, S. 40).

Im Schaubild zu Vergleichspaar 2 (ID 83 / ID 155, Abbildung 6, S. 39) findet sich zunächst bei ID155(*helP*-negativ) ein um ca. 10 Std. nach vorne verschobener und steilerer Abfall der Überlebenskurve. Das Gesamtüberleben ist dabei dennoch höher als in ID83(*helP*-positiv).

In Vergleichspaar 6 ist zu sehen, dass die Gesamtmortalität und auch die Zeit des ersten steilen Abfalls an überlebenden Larven bei ID166 (*helP* positiv) im Vergleich zu ID106 (*helP* negativ) erhöht (Überleben <40% verglichen mit ca. 80%) und zeitlich um bis zu 15 Std. vorverschoben sind.

4.1.4. Hazard Ratio von *helP* kumuliert auf alle *P. aeruginosa* Stämme

In der Gesamtheit der untersuchten klinischen *P. aeruginosa* Stämme (10 Stämme und fünf Paare, PA14 und PA14-*helP* ausgenommen) zeigte sich die Anwesenheit von *helP* als unabhängiger Risikofaktor für eine erhöhte Mortalität in den Gallerienlarven mit einer Hazard-Ratio von 1.62 (Tabelle 4, S. 43). Dies ist gleichbedeutend mit einem um 62% gesteigerten Mortalitätsrisikos bei Vorhandensein von *helP* im Genom von *P. aeruginosa* in den klinischen Isolaten.

4.1.5. Einfluss der injizierten CFU auf die Gallerienmortalität

Es hat sich herausgestellt, dass die Mortalität in einem signifikanten Umfang von der Anzahl der injizierten CFU pro Gallerienlarve abhängig ist. Über alle Stämme hinweg und unabhängig von der Anwesenheit von *helP* zeigte sich ein Anstieg der Hazard Ratio auf 1,11 bei einem 95% Konfidenzintervall zwischen 1,08 und 1,15 sowie Ergebnissen der Wald Tests und LR Tests von <0,001. Dies bedeutet, dass das Mortalitätsrisiko pro CFU Inokulum um 11% zunimmt.

Variable	Hazard Ratio	95%-Konfidenzintervall	Wald Test	LR Test
help positiv kumuliert ohne Pa14/Pa14- help	1.62	1.39 - 1.89	<0.001	<0.001
CFU des Inokulums	1.11	1.08 - 1.15	<0.001	<0.001

Tabelle 4: Gesamtvergleich der Hazard Ratios *help* positiv/negativ

4.1.6. Hazard Ratios von *help* in den einzelnen Vergleichspaaren

Bis auf PA14 & PA14-*help*, sind die hier gezeigten Stämme Wildtyp-Isolate. Die Ergebnisse in Bezug auf *help* unterscheiden sich teilweise deutlich; signifikante Hazard-Ratio Erhöhungen ($HR > 1$) sind dabei in den Vergleichspaaren PA 120/PA114 ($HR 2,26$, $p < 0.001$) und PA166/PA106 ($HR 2,39$, $p < 0.001$) zu beobachten (Tabelle 5, S. 44, Abbildung 11, S. 43).

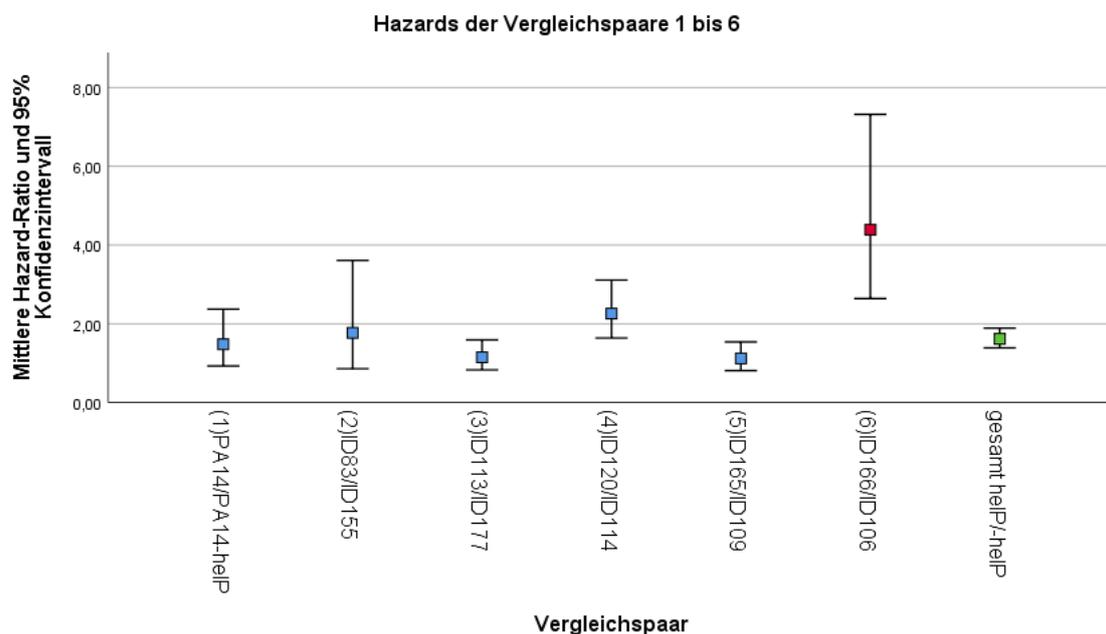


Abbildung 11: Hazards nach Vergleichspaaren

Vergleichspaar	Hazard Ratio	95%-Konfidenzintervall	Wald Test	LR Test
PA14/PA14- <i>helP</i>	1.48	0.93 - 2.37	0.1	0.1
ID 83/ID155	1.77	0.86 - 3.61	0.12	0.12
ID113/ID177	1.15	0.83 - 1.59	0.39	0.39
ID120/ID114	2.26	1.64 - 3.11	<0.001	<0.001
ID165/ID109	1.12	0.81 - 1.54	0.49	0.49
ID166/ID106	2.39	2.64 - 7.32	<0.001	<0.001

Tabelle 5: Hazards nach Vergleichspaaren (multivariate Werte nach Korrektur für CFU Inokulum)

Nicht signifikante Unterschiede in der Mortalität (HR mit 95% KI-Intervall <1 und >1 sowie Werten >0.05 im Wald- oder LR-Test) sind in folgenden Vergleichspaaren zu beobachten gewesen: PA14/PA14-*helP*, ID83/ID155, ID113/ID177 und ID165/ID109.

Im Falle von PA14/PA14-*helP* ergab sich jedoch trotz fehlender statistischer Signifikanz eine deutliche Tendenz in Richtung erhöhter HR durch *helP* (HR = 1.48, 95% KI-Intervall 0.93-2.37, p=0.1). Dies bedeutet, dass der PA14-Wildtyp mit einem 48% höheren Mortalitätsrisiko einhergeht gegenüber der PA14-Mutante ohne *helP*.

4.2. Ergebnisse der Fitnessassays in verschiedenen Medien

4.2.1. Wachstum Gesamteffekte in RPMI, LB und Serum

Als Überprüfung eines eventuellen Effekts von *helP* auf das Wachstumsverhalten unter unterschiedlichen Umweltbedingungen, wurden die OD-Werte in Log-Ranks umgesetzt und grafisch nebeneinandergestellt. Zugleich diene das der einfachen Vergleichbarkeit des Wachstums.

Zunächst geht es um das Wachstum der untersuchten Stämme in LB Medium bei 37°C bzw 40°C (Abbildung 12, S. 45 und Abbildung 13, S. 46):

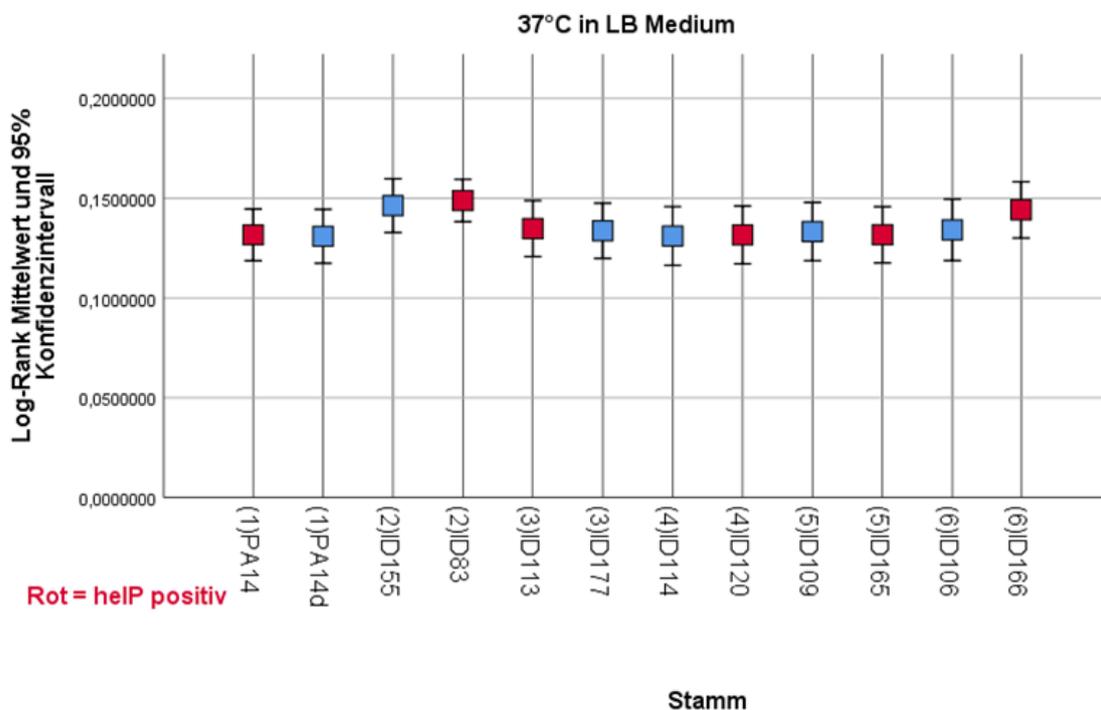


Abbildung 12: Wachstum bei 37°C in LB Medium

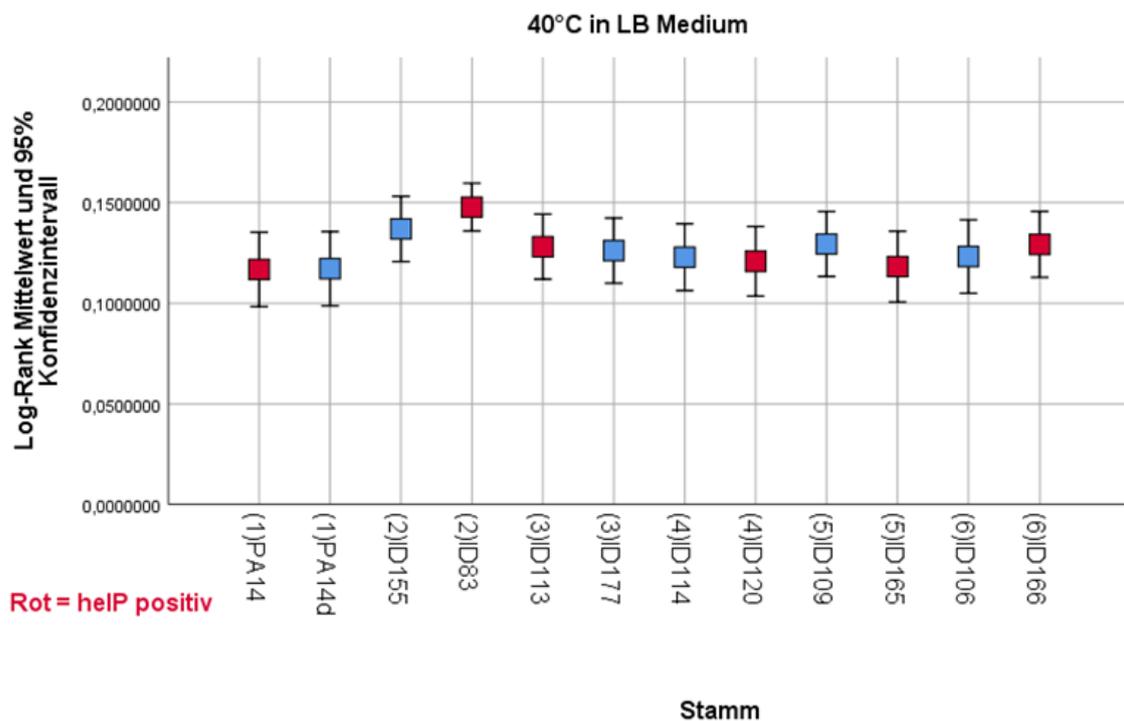


Abbildung 13: Wachstum bei 40°C in LB Medium

Bis auf ein verstärktes Wachstum von ID83 sowohl bei 37°C als auch bei 40°C sind hier keine relevanten Unterschiede feststellbar. Alle getesteten Stämme waren bei 40°C vital und haben Wachstum gezeigt.

In RPMI Medium hat sich folgendes Bild ergeben (Abbildung 14, S. 47 und Abbildung 15, S.47):

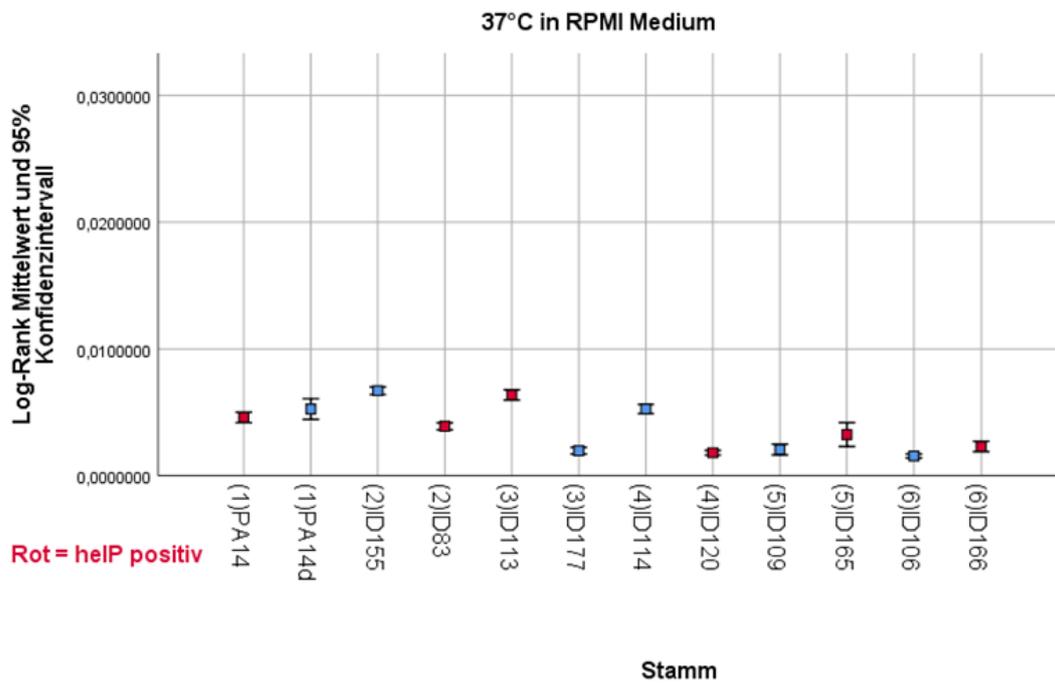


Abbildung 14: Wachstum bei 37°C in RPMI Medium

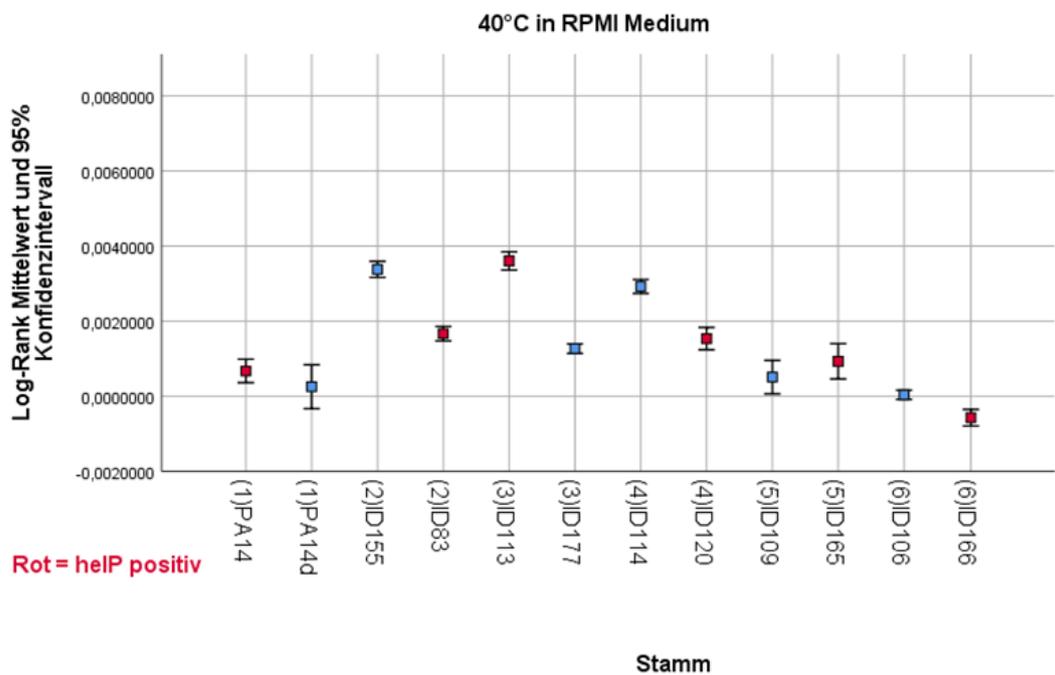


Abbildung 15: Wachstum bei 40°C in RPMI Medium

Bei 40°C hat sich insgesamt ein verstärktes Wachstum gezeigt, allerdings mit einer großen Schwankungsbreite zwischen den einzelnen Stämmen.

Ein ganz anderes Muster präsentiert sich bei der Analyse des Wachstums in inaktiviertem Humanserum; es herrscht eine große Schwankungsbreite an unterschiedlichen Log-Rank Werten in den einzelnen Stämmen ohne eindeutige Zuordnung zu *helP* als unabhängige Variable (Abbildung 16, S. 48 und Abbildung 17, S.49):

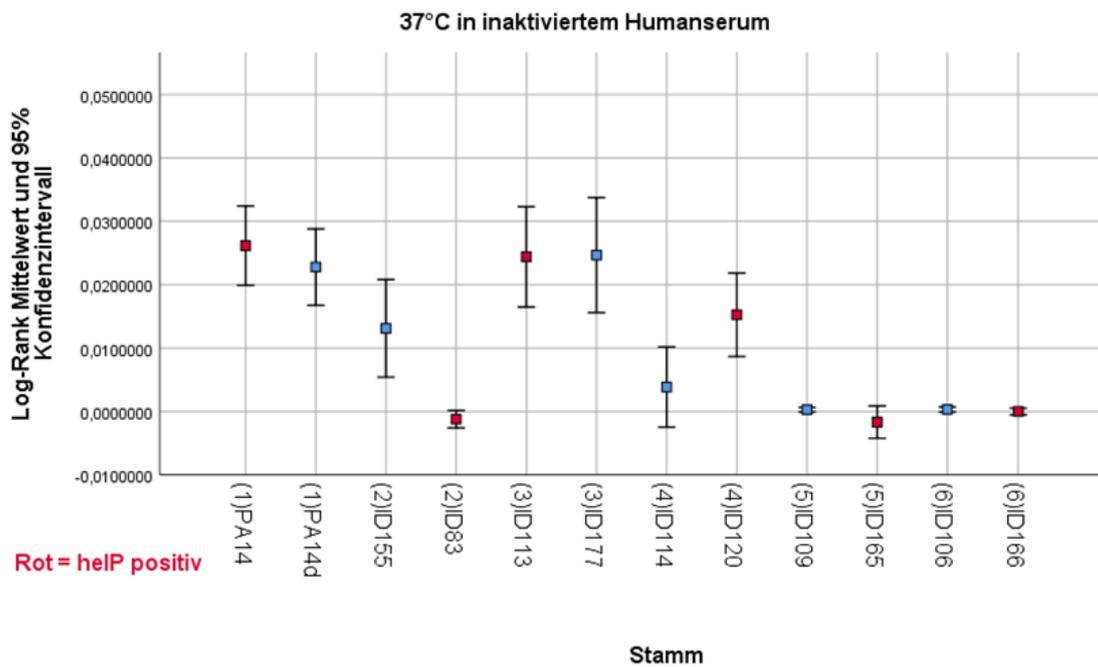


Abbildung 16: Wachstum bei 37°C in Humanserum

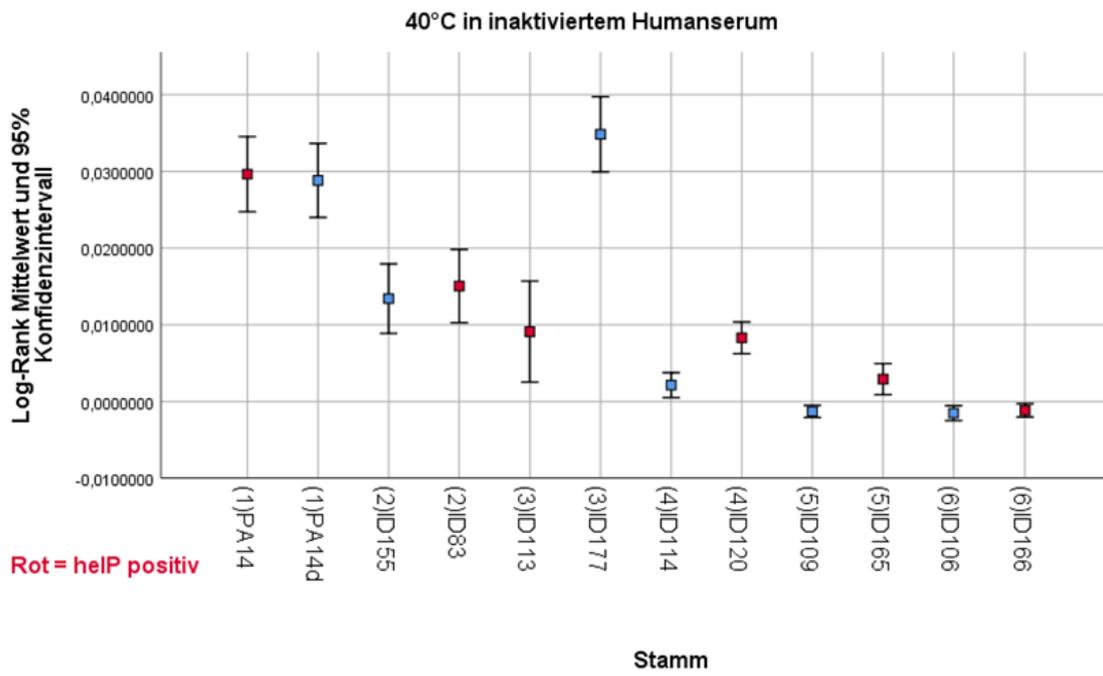


Abbildung 17: Wachstum bei 40°C in Humanserum

5. Diskussion der Ergebnisse

Die über alle 10 untersuchten *P.aeruginosa* Stämme ermittelte Hazard Ratio im Galleria-Modell belief sich auf 1.62 mit einem 95%-Konfidenzintervall von 1.39-1.89 und $p < 0.001$, während in der eingangs erwähnten klinischen Analyse in der analysierten Patientenkohorte die Mortalität bei pseudomonaden-assoziiertes Sepsis durch *heIP* in einem etwas stärkeren Maße signifikant erhöht war (Hazard Ratio=2.01, $p=0.05$) (Willmann et al., 2018). Trotz dieser Differenz liegt die Hazard Ratio im Galleria-Modell recht eng an jener der klinischen Analyse und legt somit nahe, dass *heIP* in *P.aeruginosa* bei Verbringung in *Galleria mellonella* signifikant die Mortalität erhöht und damit als Pathogenitätsfaktor mit erhöhtem Risiko in Betracht kommt.

Während die über alle Stämme ermittelte Hazard Ratio durch *heIP* recht nah an den klinischen Analysen liegt, so fällt doch auf, dass zwischen den einzelnen Vergleichspaaren teilweise erhebliche Unterschiede bestehen.

Am deutlichsten wird dies bei den Paaren PA14/PA14-*heIP* sowie ID106/ID166 sichtbar. PA14 ist als relativ hoch virulenter *P.aeruginosa* Stamm mit einem breiten Wirtsspektrum bekannt und besitzt die beiden Pathogenitätsinseln PAPI-1 sowie PAPI-2 (Harrison et al., 2010), wobei sich *heIP* auf PAPI-1 befindet, was einen horizontalen Gentransfer ermöglicht (Willmann et al., 2018). Im Vergleich zur *heIP*-negativen Mutante PA14-*heIP* ist die Hazard Ratio von PA14 mit 1.48 (95% KI 0.93-2.37) im Cox-Regressionsmodell zwar nicht signifikant erhöht. Dennoch war eine recht deutliche Tendenz in Richtung eines erhöhten Mortalitätsrisikos sichtbar. Es ist also anzunehmen, dass die Anwesenheit von *heIP* prinzipiell ein Risiko im Sinne eines Pathogenitätsfaktors darstellen kann, dieser Effekt jedoch im Falle des künstlich erzeugten Vergleichspaares PA14/PA14-*heIP* nur recht gering ausfällt.

Interessant ist, dass diese Tendenz in den Kaplan-Meier Kurven graphisch nicht immer ablesbar gewesen ist. Hier scheint im Falle von PA14/PA14-*heIP* sogar die Mortalität im *heIP*-negativen Stamm ausgeprägter zu sein. Dabei ist allerdings zu bedenken, dass die Kaplan-Meier Kurven nur die Sterbeereignisse aufzeigen können, da sie im Gegensatz zum kovariaten Cox-

Regressionsmodell keine Gewichtungen der Variablen vornehmen können. Der Einfluss des CFU-Inokulums, welcher wie schon besprochen signifikant hoch ist (Kapitel 4.1.5, S. 42), wird dabei nicht berücksichtigt und kommt in den Kurven entsprechend nicht zum Vorschein.

Bevor auf die möglichen Hintergründe dieses Verhaltens eingegangen wird, seien noch einmal die Resultate der Wachstums-Assays beleuchtet. Hier interessiert besonders die Fragestellung, ob *helP* einen Fitnessfaktor im Sinne eines besseren Überlebens in verschiedenen Milieus darstellt oder nicht.

Wie in den Ergebnissen der Fitness-Assays zu sehen ist (Kapitel 4.2.1., S. 45), sind die Unterschiede im Wachstumsverhalten, sichtbar durch die Log-Rank Werte, sehr vielfältig ausgeprägt. LB-Medium zeigt hierbei die geringste Varianz sowohl bei 37°C als auch bei 40°C, wobei das Wachstum im Vergleich mit den anderen verwendeten Wachstumsmedien insgesamt am stärksten ausfiel. Diese Beobachtung ist insofern nicht überraschend, als dass LB ein Vollmedium mit einem sehr reichen Nährstoffangebot darstellt; die Bakterien sind keinem erhöhten metabolischen Stress ausgesetzt und können im Nährstoffüberangebot ihr volles Wachstumspotential entfalten.

Anders sieht es in den Mangelmedien RPMI und Humanserum aus. Zunächst sei das Wachstum in RPMI betrachtet: Am Wachstumsabfall unter erhöhter Temperatur (Äquivalenz zu Fieber in vivo) zeigt sich jetzt, dass im nährstoffarmen RPMI Medium die Pseudomonaden einem höheren Stresslevel ausgesetzt sind, welches das Wachstum deutlich behindern kann. Dass DEAD-Box Helicasen die Anpassung an veränderte Temperaturen verbessern, ist bereits bekannt, allerdings gilt dies in vielen Fällen vor allem für kühle Bedingungen statt Hitzestress (Vakulskas et al., 2014). Man könnte also vermuten, dass *helP* in diesem Falle auch die Temperaturreistenz unter Mangelbedingungen verbessert. Interessanterweise ist dieser Effekt hier nicht zwischen PA14/PA14-*helP* oder ID106/ID166 zu sehen gewesen. Das Wachstum gleicht sich in den Paaren fast genau. Diese starke Diskrepanz zwischen dem Gallerienmodell und der Wachstumsanalyse deuten darauf hin, dass *helP* sich nicht förderlich auf das Wachstum unter Stress- und Mangelbedingungen auswirkt. Effekte durch *helP*

sind demnach wahrscheinlich nicht im Sinne einer gesteigerten Fitness zu deuten.

Schließlich sei noch auf das Verhalten in inaktiviertem Humanserum eingegangen: Die Streuung der einzelnen Log-Ranks ist hier am größten und ein genereller Trend zugunsten *helP*-positiven Stämmen ist nicht auszumachen. Auch hier ist das Wachstum bei 40°C eher vermindert, es zeigen sich allerdings Ausreißer durch ID177 und das Paar PA14/PA14-*helP*. Ein Störfaktor, der für die große Streubreite im Serum verantwortlich sein könnte, ist das Serum an sich: trotz Inkubation unter automatischem Schütteln und damit homogenem Durchmischen und trotz der vorherigen Inaktivierung bei 56°C bildeten sich in den Wells in variierendem Maße flockige Präzipitate aus, die dem Proteinanteil des Serums entspringen dürften. Durch Lichtstreuung könnten diese einen negativen Einfluss auf die Messgenauigkeit durch den OD-Reader gehabt haben.

In der Kultur auf Schafsblutagar haben sich die *helP*-positiven Stämme morphologisch und vom Wachstumsverhalten nicht merklich von den *helP*-negativen unterschieden. Auch andere Auffälligkeiten wie neu aufgetretenes Mukoides Wachstum, welches mit einer höheren Persistenz assoziiert ist (Moradali et al., 2017), traten im Beobachtungszeitraum nicht auf.

Wie oben bereits angedeutet, fanden sich hier zwischen den einzelnen Vergleichspaaren erhebliche Variationen, was das Risiko für Mortalität betrifft.

Während in den Vergleichspaaren ID106/ID166 und ID120/ID114 ein deutlicher und statistisch signifikant erhöhter Anstieg der Mortalität beobachtbar war, waren in den anderen Paaren (ID1137/ID177, ID165/ID177, ID83/ID155) bei fehlender Signifikanz nur Tendenzen in Richtung eines erhöhten Risikos sichtbar.

Es stellt sich automatisch die Frage, woher diese Unterschiede in den Vergleichspaaren kommen könnten. Hierzu sollte betrachtet werden, auf welche Weise sich HelP in seiner exprimierten Form als DEAD-Box Helicase auf den Zellstoffwechsel von *P. aeruginosa* auswirken könnte:

Im Allgemeinen sind DEAD-Box Helicasen RNA-bindende Enzyme, die sowohl Konformationsänderungen als auch Translokationen bewirken können. Diese in

vielen Bakteriengenera vorkommenden Proteine üben verschiedene Funktionen aus: Sie können auf der RNA-Ebene regulatorisch wirken, indem sie sowohl beim Abbau von RNA beteiligt sind als auch ähnlich Chaperonen deren Faltung und Stabilität beeinflussen (Redder et al., 2015). Weiterhin spielen einige Vertreter dieser Proteinfamilie eine Rolle beim Aufbau ribosomaler Strukturen in der Bakterienzelle (Iost and Dreyfus, 2006).

Von dieser Arbeit unabhängige Studien haben gezeigt, dass gentechnisch mutierte DEAD-Box Helicasen in *P.aeruginosa* Mausinfektionsmodell eine deutlich herabgesetzte Virulenz bei Pneumonien besitzen. Dabei waren auch nachweislich die Expressionsraten von Exotoxinen wie ExoS vermindert (Tan et al., 2016). Es handelte sich aber in dieser Arbeit um eine andere DEAD-Box Helicase als *helP*, die nicht näher mit dieser verwandt war. Von anderen DEAD-Box Helicasen ist außerdem bekannt, dass sie durch Eingreifen in die DNA-Struktur und die Regulation von Ribosomen eine direkte Stimulation von verschiedenen Genexpressionsmustern herbeiführen können. Im Falle von *P. aeruginosa* betrifft dies etwa das Typ-III Sekretionssystem (T3SS), welches durch Adhäsionsfunktionen und Ermöglichung von Zytotoxizität einen bekannten und wichtigen Virulenzfaktor dieses Keims darstellt (Intile et al., 2015).

Bisher ist noch nicht genau bekannt, welche Mechanismen den Effekten von *helP* zugrunde liegen. Es liegt jedoch nahe, dass auch hier durch die Homologie zu anderen DEAD-Box Helicasen eine regulatorische Funktion vorliegt.

Um zu sehen, in welche Richtung diese Regulationen ablaufen könnten, sei noch einmal auf einige Grundlagen der Virulenz von *P. aeruginosa* und anderen bakteriellen Erregern verwiesen: Einerseits Faktoren wie Flagellen, Siderophore, Adhäsionspili, Lipopolysaccharide und Proteasen, welche dem Bakterium ermöglichen, Abwehrmaßnahmen des Wirts zu umgehen, überlebenswichtige Ressourcen zu sichern und sich an geeigneten Lokalisationen im Gewebe des Wirts anzusiedeln (Gellatly and Hancock, 2013, Al-Wrafy et al., 2017). Andererseits jene, die einen direkt zytotoxischen Effekt haben wie Lipasen, Phospholipasen, weitere Proteasen und Injektionssysteme (insbesondere T3SS) und damit Zellen und Gewebe des Wirts aktiv schädigen (Gellatly and Hancock,

2013, Al-Wrafy et al., 2017). Somit lässt sich sagen, dass es neben den direkt schädigenden auch solche Virulenzfaktoren gibt, die dem Bakterium vor allem einen Überlebensvorteil sichern und durch gesteigerte Fitness die Besiedlungswahrscheinlichkeit des Wirts erhöhen.

Dies muss nicht unbedingt durch wirtsspezifische Faktoren geschehen, sondern kann auch durch eine allgemein gesteigerte zeitlich flexible Anpassungsfähigkeit des Bakteriums von statten gehen. Beim Wechsel von einer kontaminierten Umwelt in den menschlichen Organismus und zurück im Sinne einer Übertragung spielen dabei unmittelbar einige Faktoren eine wichtige Rolle: starke Änderungen der Temperatur und des Säure-Base-Haushalts, oxidativer Stress durch die schnell rekrutierte unspezifische Immunabwehr. Das interzelluläre Milieu erzeugt zusätzlich Stress durch den Mangel an essenziellen Nährstoffen, insbesondere Eisen, was die Etablierung eines Bakteriums zusätzlich erschwert. Viele der Anpassungen an diese Bedingungen funktionieren bei Bakterien, die defekte DEAD-Box Gene besitzen, nur noch in einem geringeren Umfang, weshalb die Vertreter dieser Proteinfamilie auch in der Rolle als Faktoren für genetische Fitness und Flexibilität zu betrachten sein könnten (Redder et al., 2015).

Entsteht nun durch eine solche verbesserte Fitness die Fähigkeit zur Massenvermehrung, führt diese über einen gesteigerten Wirt-Pathogen-Kontakt zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit, dass die Immunantwort im Sinne einer Sepsis durch Pro- und Antiinflammation dysreguliert wird und entgleist. In diesem Zusammenhang wurde gerade bei *P. aeruginosa* schon nachgewiesen, dass eine verkürzte Zeit zur positiven Blutkultur und damit eine erhöhte Erregerlast im Blut (als Folge von starker Vermehrung des Keims) mit einem verschlimmerten Outcome einer solchen Sepsis assoziiert ist (Willmann et al., 2013).

Es soll nun darauf eingegangen werden, wie die großen Unterschiede in den verschiedenen Stämmen zustande gekommen sein könnten. Wie bereits beschrieben, hat *P. aeruginosa* eine relativ große Vielfalt an Pathogenitätsfaktoren zur Verfügung. Zugleich besitzt es einen großen Anteil an regulatorischen Elementen, die deren Expression situationsabhängig hoch- und

runterregulieren können (Gellatly and Hancock, 2013). Die Kombination aus diesen Eigenschaften macht ersichtlich, dass durch die genetische Ausstattung eines jeweiligen *P.aeruginosa* Stammes eine Art Grundvirulenz entsteht, die darauf basiert, welche Pathogenitätsfaktoren wann exprimiert werden. Es entsteht damit auch ein bestimmter Ausprägungsbereich, innerhalb dessen sich der Pseudomonadenstamm bewegen kann und auf den er letztlich auch genetisch begrenzt ist. *HelP* als regulatorisches Element wäre also nicht in der Lage, diese Grundvirulenz über die vom Kerngenom festgelegten Grenzen hinaus zu beeinflussen. Folglich hätte der Pool an Pathogenitätsfaktoren, der die Grundvirulenz ausmacht, einen viel größeren Effekt als *HelP*. Dies könnte die Unterschiede in den Risikoausprägungen der Vergleichspaare und auch den relativ geringen Effekt in PA14/PA14-*helP* erklären.

Noch dazu kommt, dass *HelP* nicht die einzige DEAD-Box Helicase in *P. aeruginosa* ist. Es dürfte also Interaktionen zwischen *helP* und anderen regulatorischen Elementen geben, die sich wiederum auf die Expression direkt schädigender Pathogenitätsfaktoren auswirken. Wenn nun das Genom von *P. aeruginosa* über die anderen Regulationsmechanismen gewissermaßen die Priorität von *helP* moduliert, entstünde noch eine weitere Quelle für Varianz zwischen verschiedenen Stämmen, auch wenn alle *helP* im Genom besäßen.

Sollte durch Transposition des Gens im Zusammenhang mit der PAPI-1 Region oder durch Mutationen benachbarter Gene *helP* hochreguliert werden, könnten betroffene Stämme durch diese Art der Hyperexpression noch gefährlicher für Patienten werden. Auch wenn solche Ereignisse insgesamt relativ selten sein dürften, besteht eindeutig noch Forschungsbedarf im Zusammenhang mit der Regulierung von *helP* und anderen DEAD-Box Helicasen. Auch in der Diagnostik könnte es sinnvoll sein, bei einem Test auf *helP* zusätzlich dessen Expressionsniveau der Isolate zu bestimmen, um die jeweiligen klinischen Risiken besser abzuwägen.

Im Großen und Ganzen eignet sich *Galleria mellonella* zwar gut als Modellorganismus zur Untersuchung von septischem Krankheitsgeschehen, da die Tiere ein komplexes humorales und zelluläres angeborenes Immunsystem

besitzen. Dieses ist aber vor allem auf den Bereich von akuten Abwehrgeschehen im Rahmen weniger Tage ausgelegt und entbehrt völlig den Lymphozyten- und Immunglobulinbasierten adaptiven Immunantworten der Wirbeltiere inklusive Menschen, welche auch bei septischen Krankheitsbildern einen Einfluss auf die Dynamik und die Pathogen-Wirt-Interaktion haben (Tsai et al., 2016). Auch aufgrund der anatomischen Differenzen (kein geschlossenes Kreislaufsystem mit Kapillaren und dementsprechenden Kompartimenten, Tracheen als nicht mit Lungen vergleichbares Atmungsorgan und viele andere) muss man trotz experimentell ermittelter Parallelen die Begrenztheit dieses Modells einsehen, da eine organspezifische Ermittlung von Folgeschäden und Akutwirkungen eines Pathogens vom Insekt nach bisherigem Stand schwierig direkt auf Wirbeltiere übertragbar ist. Im Spezialfall *Galleria mellonella* wird dies noch dadurch verschärft, dass in der Genomik und Proteomik anders als z.B. bei *Drosophila melanogaster* noch viele Lücken zu füllen sind (Tsai et al., 2016) und erst vor relativ kurzer Zeit eine Sequenzierung des Genoms durchgeführt wurde (Lange et al., 2018). Aufgrund dieser relativen Neuheit und der schlichtweg frappierenden Unterschiede zwischen *Galleria mellonella* und menschlichen Patienten sollte von einem unkritischen Direktvergleich also auch im Zusammenhang mit Krankheitserregern und deren Pathogenitätsfaktoren eher abgesehen werden. Die Aussagekraft dieses Vergleichs ist ergo vor allem auf grobe Tendenzen limitiert. Wirtsspezifische Interaktionen lassen sich dabei kaum vergleichen und müssen auch in Bezug auf *heIP* gesondert für Menschen betrachtet werden.

Ein anderer nicht zu unterschätzender Punkt beim Experimentieren mit Gallerienlarven ist die Standardisierung der Injektionsmethoden. In der Arbeit mit *P.aeruginosa* hat sich herausgestellt, dass unabhängig von *heIP* jede zusätzlich injizierte CFU die Mortalität der Larven um ca. 11% erhöhen kann (Kapitel 4.1.5. S. 42). Im Hinblick auf die Diskrepanzen zwischen den Kaplan-Meier Kurven und der Cox-Regression muss daher noch einmal betont werden, dass Kaplan-Meier Kurven in Studien wie der Vorliegenden als alleiniges Analysewerkzeug nicht ausreichen, um sichere Aussagen treffen zu können. Insbesondere Effekte relativ geringer Größenordnungen werden durch zufällige Varianzen in den injizierten

CFU dabei in der graphischen Darstellung entweder komplett überdeckt oder sogar ins scheinbare Gegenteil verkehrt. Daraus folgt, dass das genaue Einhalten vorher definierter Grenzen (hier zwischen 8 und 16 CFU) sowie die Berücksichtigung des Inokulums als eigenständiger Cofaktor in zukünftigen Analysen beachtet werden sollten.

Was die Fitness-Assays betrifft, kann die Durchführung in Form einzelner Wachstumsanalysen als Limitation des Studiendesigns betrachtet werden. So konnte zwar isoliert das Wachstum betrachtet werden, allerdings nicht der Aspekt der genetischen Fitness, welcher sich in der Fähigkeit zur innerartlichen Konkurrenz ausdrückt. Um diese Konkurrenzunterschiede feststellen zu können, müsste auf ein quasiökologisches Experiment zurückgegriffen werden. Dazu könnten die entsprechenden Stämme etwa mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern versehen werden, um sie anschließend zu gleichen Anteilen zusammen im gleichen Medium wachsen zu lassen. Die eventuellen Änderungen in der Häufigkeit nach einer gewissen Inkubationsdauer könnten anschließend z.B. mikroskopisch ausgewertet werden. Daraus ließen sich Schlüsse ziehen, in wie weit *helP*-besitzende Stämme in den Vergleichspaaren eventuell dem jeweiligen Gegenstamm konkurrenzmäßig überlegen wären.

Geht man nun davon aus, dass die Grundpathogenität einen großen Einfluss auf die Wirkstärke von *HelP* hat, fällt ein weiterer Störfaktor auf: Die Vergleichspaare, welche aus klinischen Wildtypisolaten stammen, wurden nach möglichst hoher Ähnlichkeit hinsichtlich weiterer Risikofaktoren ausgewählt, was im Umkehrschluss eine nahe „Virulenz“-Verwandtschaft mit wenigen Unterschieden garantieren sollte.

Es darf dabei nicht vergessen werden, dass diese Vergleichspaare dennoch relativ stark voneinander abweichen in dem Sinne, dass nicht nur *helP*, sondern eine Vielzahl anderer Gene in unterschiedlicher Weise in deren Genomen vorhanden sind. Sie sind also trotz ihrer Ähnlichkeiten nicht als direkte Schwesterstämme zu bezeichnen. Um dieses Problem zu umgehen, könnten zwei Methoden angewendet werden: Einmal die Herstellung weiterer *helP*-negativen Mutanten analog zu PA14/PA14-*helP*. Andererseits auch die

Transformation zuvor *helP*-negativer Stämme mittels eines entsprechenden Vektors (bspw. eines Plasmids). Der Vergleich mit dem Wildtyp könnte dann noch eindeutiger darstellen, welche genauen Effekte allein durch die Anwesenheit von *helP* auf das Kerngenom und damit auch auf die Virulenz zustande kämen.

Auch ist nicht bekannt, wie stark das Gen *helP* in den einzelnen Stämmen exprimiert wird oder wie diese Expression reguliert sein könnte. Da diese Aspekte, wie oben angesprochen, einen Einfluss auf die Wirkung als Pathogenitätsfaktor haben könnten, könnte auch in diese Richtung weiter geforscht werden. So ließe sich der genaue Einfluss von *helP* besser evaluieren, indem zuvor *helP*-negative Stämme beispielsweise über einen Vektor transformiert würden. Die entstehenden Virulenzunterschiede ließen dann auf die Bedeutung von *helP* im Gesamtgenom schließen.

Dabei könnte die genaue Funktion von *HelP* mittels z.B. RNA-Analysen ermittelt werden: Veränderungen im Expressionsmuster anderer Gene, die für direkte Virulenzfaktoren kodieren, wären dabei besonders aufschlussreich. Es könnte darauf basierend auch ersichtlich werden, bei welchen Stämmen etwa das Risiko für einen deutlichen Pathogenitätsanstieg gegeben wäre. Dieser würde etwa durch die Akquirierung von *helP* mittels horizontalen Gentransfers möglich, wie oben bereits erwähnt.

Weitere Einschränkungen sind durch den Umfang der Studie gegeben: Es wurden nur 10 verschiedene klinische Isolate untersucht, was nicht für das gesamte Patientenkollektiv der klinischen Analyse repräsentativ genug sein dürfte, um generalisieren zu können. Eine Ausweitung auf mehr unterschiedliche Stämme in kommenden Studien wäre deshalb ratsam.

Trotz der genannten Limitationen gibt es, wie oben bereits angesprochen, deutliche Tendenzen in Richtung einer unter Beteiligung von *helP* erhöhten Pathogenität. Damit könnte *helP* im Zusammenhang mit der möglichen Verbreitung zwischen Pseudomonadenpopulationen ein Kandidat für zukünftige klinische infektiologische Biomarker sein. Aufgrund der relativ einfachen Nachweisbarkeit mittels z.B. PCR wäre ein entsprechendes Screening bei Risikopatienten gut durchführbar.

Bevor es jedoch so weit kommen kann, sind noch weitere Rahmenbedingungen zu klären: Die ursprüngliche klinische Datenanalyse beinhaltete lediglich 166 Fälle . Diese Anzahl ist zwar in Kombination mit den Resultaten der Gallerienversuche ausreichend, um einen signifikanten Effekt darzustellen, allerdings verglichen mit dem gesamten Spektrum klinischer Fälle noch nicht repräsentativ genug.

Da der Effekt von *heIP* einer großen Variabilität zwischen den verschiedenen Stämmen unterlag, ist es auch sinnvoll, in Zukunft weitere (Wildtyp-) Stämme von neuen Isolaten zu testen und darüber hinaus zu untersuchen, auf welche Weise *heIP* den zellulären Stoffwechsel beeinflusst und selbst reguliert wird. Dies würde eine weitere Eingrenzung besonders gefährlicher Stämme ermöglichen und damit sowohl Screening als auch präventive Maßnahmen in der Therapie erleichtern. Es böte sich darum an, weitere klinische Studien anzuschließen. Diese sollten große Evaluationskohorten beinhalten und mit Patienten aus verschiedenen Settings durchgeführt werden.

So ist vorstellbar, nicht nur septische Krankheitsverläufe, sondern auch bei Patienten mit chronischen Infektionen von Wunden und COPD- und Mukoviszidosepatienten den Einfluss von *heIP* zu untersuchen. Idealerweise ließe sich ein derart breites Patientenspektrum durch das Einbeziehen unterschiedlicher Fachbereiche erreichen, wie etwa mehreren Teilbereichen der Inneren Medizin (inkl. Pulmonologie) und chirurgischen Fächern (bspw. Unfallchirurgie). Da hierbei die Settings sehr stark voneinander abweichen würden, müssten die Untersuchungen allerdings für jeden Fachbereich und wenn möglich jede Krankheitsinstanz auf voneinander unabhängige Studien aufgeteilt werden. Damit wäre die Bedingung studienintern homogener Patientenkollektive immer noch gewahrt. Weiterhin könnte es notwendig sein, zum Erreichen einer repräsentativen Evaluationskohorte Patientendaten, Proben sowie Krankheitsverläufe aus mehreren klinischen Zentren zusammenzufassen. Damit wären sowohl akute als auch langzeitliche Verläufe abgedeckt, was ersichtlich machen würde, in welchen Settings *heIP* die größte klinische Relevanz hat und konsequenterweise getestet werden müsste.

6. Zusammenfassung

Es besteht bezüglich Infektionen durch das weitverbreitete Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* ein Mangel an prognostischen Pathogen-Biomarkern. Diese werden benötigt, um Stämme mit einer höheren Pathogenität zu erkennen, denn diese erhöhen das Patientenrisiko für einen schweren oder gar tödlichen Verlauf. Als Konsequenz könnte eine personalisierte Sepsis-Therapie erfolgen, z.B. antibiotische Kombinations-Therapien für Patienten mit Hochrisikostämmen.

Anhand klinischer Analysen hat sich die DEAD-Box Helicase *heIP*, welche das Potential zur Ausbreitung über horizontalen Gentransfer besitzt, als Kandidat mit einem bis zweifach erhöhtem Mortalitätsrisiko bei Pseudomonadensepsis herausgestellt (Willmann et al., 2018). In dieser Arbeit sollte anhand eines Infektionsmodells in Larven der Wachsmotte *Galleria mellonella* dieser Effekt experimentell überprüft werden. Es hat sich dabei gezeigt, dass in diesem Modell das Vorhandensein von *heIP* im Pseudomonasgenom nach Analyse in einem Cox-Regressionsmodell zu einer Erhöhung des Mortalitätsrisikos um 62% führt. Eine *heIP*-freie Mutante vom Stamm PA14 war dabei tendenziell gegenüber der Wildform mit einem reduzierten Mortalitätsrisiko assoziiert.

Als zusätzliche und neue Erkenntnis wurde dabei deutlich, dass allein die Erhöhung der Injektionsdosis in die Larven um eine Colony Forming Unit (CFU) zu einer außerordentlichen Steigerung des Mortalitätsrisikos um 11% führte. Dies wird bislang von der wissenschaftlichen Gesellschaft bei derartigen Experimenten nicht bedacht. Daher sollten solche Experimente möglichst mit Covariate-Modelle ausgewertet werden, wobei die Injektionsdosis exakt dokumentiert und als eigenständiger Risikofaktor in die Modelle eingefügt werden sollte.

Der beobachtete Effekt durch *heIP* könnte in einer Veränderung des Virulenzverhaltens oder einer erhöhten genetischen Fitness der betreffenden *Pseudomonas*-Stämme begründet liegen. Da in durchgeführten Wachstumsassays mit Temperaturmedien und Mangelmedien keine durch *heIP* begründbaren Unterschiede im Wachstum zu sehen waren, sollte eher weniger

von einem Fitness als eher von einem Virulenzeffekt durch *helP* ausgegangen werden.

HelP besäße dabei als Helicase höchstwahrscheinlich eine regulatorische Funktion auf andere Virulenzgene von *P.aeruginosa*. Der genaue Wirkmechanismus ist noch nicht aufgeklärt. Dafür kommen experimentelle Studien inklusive weiterer Gallerienversuche mit Mutanten und Transformanten, sowie Genexpressionsanalysen in Frage. Im klinischen Umfeld böte es sich weiterhin an, Evaluationsstudien mit größeren Fallzahlen anzuschließen. Damit ließen sich Risikostämme im Zusammenhang besonders gefährdeter Patientensettings stratifizieren. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse könnten so zur Verbesserung der Behandlung im Sinne einer Personalisierung der Infektionsmedizin beitragen.

7. Literaturverzeichnis

- AGHA, A., BEIN, T., FROHLICH, D., HOFER, S., KRENZ, D. & JAUCH, K. W. 2002. ["Simplified Acute Physiology Score" (SAPS II) in the assessment of severity of illness in surgical intensive care patients]. *Chirurg*, 73, 439-42.
- AL-WRAFY, F., BRZOWSKA, E., GORSKA, S. & GAMIAN, A. 2017. Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa* - the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 71, 78-91.
- ALHAZMI, A. 2015. *Pseudomonas aeruginosa* – Pathogenesis and Pathogenic Mechanisms. *International Journal of Biology*, 7.
- AZZOPARDI, E. A., AZZOPARDI, E., CAMILLERI, L., VILLAPALOS, J., BOYCE, D. E., DZIEWULSKI, P., DICKSON, W. A. & WHITAKER, I. S. 2014. Gram negative wound infection in hospitalised adult burn patients--systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 9, e95042.
- BARBIER, M., DAMRON, F. H., BIELECKI, P., SUAREZ-DIEZ, M., PUCHALKA, J., ALBERTI, S., DOS SANTOS, V. M. & GOLDBERG, J. B. 2014. From the environment to the host: re-wiring of the transcriptome of *Pseudomonas aeruginosa* from 22 degrees C to 37 degrees C. *PLoS One*, 9, e89941.
- BASSETTI, M., VENA, A., CROXATTO, A., RIGHI, E. & GUERY, B. 2018. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs Context*, 7, 212527.
- BEATTY, A. L., MALLOY, J. L. & WRIGHT, J. R. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* degrades pulmonary surfactant and increases conversion in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 32, 128-34.
- BODEY, G. P., BOLIVAR, R., FAINSTEIN, V. & JADEJA, L. 1983. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis*, 5, 279-313.
- CAFORA, M., DEFLORIAN, G., FORTI, F., FERRARI, L., BINELLI, G., BRIANI, F., GHISOTTI, D. & PISTOCCHI, A. 2019. Phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections in a cystic fibrosis zebrafish model. *Sci Rep*, 9, 1527.
- CHENG, Y. Y., YAM, J. K. H., CAI, Z., DING, Y. C., ZHANG, L. H., DENG, Y. Y. & YANG, L. 2019. Population dynamics and transcriptomic responses of *Pseudomonas aeruginosa* in a complex laboratory microbial community. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 5.
- CHOI, Y., PAIK, J. H., KIM, J. H., HAN, S. B. & DUREY, A. 2018. Clinical Predictors of *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia in Emergency Department. *Emerg Med Int*, 2018, 7581036.
- COOLS, F., TORFS, E., AIZAWA, J., VANHOUTTE, B., MAES, L., CALJON, G., DELPUTTE, P., CAPPOEN, D. & COS, P. 2019. Optimization and Characterization of a *Galleria mellonella* Larval Infection Model for Virulence Studies and the Evaluation of Therapeutics Against *Streptococcus pneumoniae*. *Front Microbiol*, 10, 311.
- DEUTSCH, G., BOKEHI, L. C., SILVA, A. E. G. P. R., GUIMARAES, L. M., RODRIGUES, R., ESPER, L. M. R., GONZALEZ, A. G. M., DE PAULA, G. R., DE CASTILHO, S. R. & TEIXEIRA, L. A. 2016. Balneotherapy is a potential risk factor for *Pseudomonas aeruginosa* colonization. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 52, 125-132.
- DING, R., MENG, Y. & MA, X. 2018. The Central Role of the Inflammatory Response in Understanding the Heterogeneity of Sepsis-3. *Biomed Res Int*, 2018, 5086516.
- ECDC 2018. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe – Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017. Stockholm: ECDC; 2018. *Surveillance of*

antimicrobial resistance in Europe – Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net).

- ESCHBACH, M., SCHREIBER, K., TRUNK, K., BUER, J., JAHN, D. & SCHOBERT, M. 2004. Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. *J Bacteriol*, 186, 4596-604.
- FALKINHAM, J. O., 3RD, HILBORN, E. D., ARDUINO, M. J., PRUDEN, A. & EDWARDS, M. A. 2015. Epidemiology and Ecology of Opportunistic Premise Plumbing Pathogens: *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium avium*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Health Perspect*, 123, 749-58.
- FERREIRO, J. L. L., OTERO, J. A., GONZALEZ, L. G., LAMAZARES, L. N., BLANCO, A. A., SANJURJO, J. R. B., CONDE, I. R., SONEIRA, M. F. & AGUADO, J. D. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infections in hospitalized patients: Mortality and prognostic factors. *Plos One*, 12.
- FILLOUX, A. 2010. A variety of bacterial pili involved in horizontal gene transfer. *J Bacteriol*, 192, 3243-5.
- FLEISCHMANN, C., THOMAS-RUEDDEL, D. O., HARTMANN, M., HARTOG, C. S., WELTE, T., HEUBLEIN, S., DENNLER, U. & REINHART, K. 2016. Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis. *Dtsch Arztebl Int*, 113, 159-66.
- GELLATLY, S. L. & HANCOCK, R. E. 2013. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis*, 67, 159-73.
- HARRISON, E. M., CARTER, M. E., LUCK, S., OU, H. Y., HE, X., DENG, Z., O'CALLAGHAN, C., KADIOGLU, A. & RAJAKUMAR, K. 2010. Pathogenicity islands PAPI-1 and PAPI-2 contribute individually and synergistically to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14. *Infect Immun*, 78, 1437-46.
- HE, J., BALDINI, R. L., DEZIEL, E., SAUCIER, M., ZHANG, Q., LIBERATI, N. T., LEE, D., URBACH, J., GOODMAN, H. M. & RAHME, L. G. 2004. The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 2530-5.
- HERY-ARNAUD, G., NOWAK, E., CAILLON, J., DAVID, V., DIROU, A., REVERT, K., MUNCK, M. R., FRACHON, I., HALOUN, A., HOREAU-LANGLARD, D., LE BIHAN, J., DANNER-BOUCHER, I., RAMEL, S., PELLETIER, M. P., ROSEC, S., GOURIOU, S., POULHAZAN, E., PAYAN, C., FEREC, C., RAULT, G., LE GAL, G. & LE BERRE, R. 2017. Evaluation of quantitative PCR for early diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: a prospective cohort study. *Clinical Microbiology and Infection*, 23, 203-207.
- HIGASHIKAWA, T., OKURO, M., ISHIGAMI, K., MAE, K., SANGEN, R., MIZUNO, T., USUDA, D., SAITO, A., KASAMAKI, Y., FUKUDA, A., SAITO, H., MORIMOTO, S. & KANDA, T. 2018. Procalcitonin and albumin as prognostic biomarkers in elderly patients with a risk of bacterial infection. *J Int Med Res*, 46, 2606-2614.
- HONG, T. P., CARTER, M. Q., STRUFFI, P., CASONATO, S., HAO, Y. A., LAM, J. S., LORY, S. & JOUSSON, O. 2017. Conjugative type IVb pilus recognizes lipopolysaccharide of recipient cells to initiate PAPI-1 pathogenicity island transfer in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bmc Microbiology*, 17.
- HOWELL, H. A., LOGAN, L. K. & HAUSER, A. R. 2013. Type III secretion of ExoU is critical during early *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *MBio*, 4, e00032-13.
- INTILE, P. J., BALZER, G. J., WOLFGANG, M. C. & YAHR, T. L. 2015. The RNA Helicase Dead Stimulates ExsA Translation To Promote Expression of the *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System. *J Bacteriol*, 197, 2664-74.
- IOST, I. & DREYFUS, M. 2006. DEAD-box RNA helicases in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 34, 4189-97.

- JANDER, G., RAHME, L. G. & AUSUBEL, F. M. 2000. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J Bacteriol*, 182, 3843-5.
- JUAN, C., PENA, C. & OLIVER, A. 2017. Host and Pathogen Biomarkers for Severe *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *J Infect Dis*, 215, S44-S51.
- JUNQUEIRA, J. C. 2012. *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens: recent studies and new perspectives. *Virulence*, 3, 474-6.
- KANG, C. I., KIM, S. H., KIM, H. B., PARK, S. W., CHOE, Y. J., OH, M. D., KIM, E. C. & CHOE, K. W. 2003. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. *Clin Infect Dis*, 37, 745-51.
- KAY, S., EDWARDS, J., BROWN, J. & DIXON, R. 2019. *Galleria mellonella* Infection Model Identifies Both High and Low Lethality of *Clostridium perfringens* Toxigenic Strains and Their Response to Antimicrobials. *Front Microbiol*, 10, 1281.
- KIBE, S., ADAMS, K. & BARLOW, G. 2011. Diagnostic and prognostic biomarkers of sepsis in critical care. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, li33-li40.
- KRAMER, A., SCHWEBKE, I. & KAMPF, G. 2006. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis*, 6, 130.
- KUNG, V. L., OZER, E. A. & HAUSER, A. R. 2010. The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 74, 621-41.
- KWADHA, C. A., ONG'AMO, G. O., NDEGWA, P. N., RAINA, S. K. & FOMBONG, A. T. 2017. The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*. *Insects*, 8.
- LANGE, A., BEIER, S., HUSON, D. H., PARUSEL, R., IGLAUER, F. & FRICK, J. S. 2018. Genome Sequence of *Galleria mellonella* (Greater Wax Moth). *Genome Announc*, 6.
- LEE, Y. J., JANG, H. J., CHUNG, I. Y. & CHO, Y. H. 2018. *Drosophila melanogaster* as a polymicrobial infection model for *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol*, 56, 534-541.
- LIU, V. X., FIELDING-SINGH, V., GREENE, J. D., BAKER, J. M., IWASHYNA, T. J., BHATTACHARYA, J. & ESCOBAR, G. J. 2017. The Timing of Early Antibiotics and Hospital Mortality in Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, 196, 856-863.
- MAHAPATRA, S. & HEFFNER, A. C. 2019. Septic Shock (Sepsis). *StatPearls*. Treasure Island (FL).
- MAJUMDAR, A. 2010. Sepsis-induced acute kidney injury. *Indian J Crit Care Med*, 14, 14-21.
- MARTINEZ-LONGORIA, C. A., ROSALES-SOLIS, G. M., OCAMPO-GARZA, J., GUERRERO-GONZALEZ, G. A. & OCAMPO-CANDIANI, J. 2017. Ecthyma gangrenosum: a report of eight cases. *An Bras Dermatol*, 92, 698-700.
- MATT, B., MITTEREGGER, D., RENNER, S., PRESTERL, E., ASSADIAN, O. & DIAB-ELSCHAHAWI, M. 2014. Successful implementation of infection control strategies prevents *P. aeruginosa* transmission among cystic fibrosis patients inside the hospital. *GMS Hyg Infect Control*, 9, Doc20.
- MAYHALL, C. G. 2003. The epidemiology of burn wound infections: Then and now. *Clinical Infectious Diseases*, 37, 543-550.
- MAYR, F. B., YENDE, S. & ANGUS, D. C. 2014. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*, 5, 4-11.
- MEEKER, N. D. & TREDE, N. S. 2008. Immunology and zebrafish: spawning new models of human disease. *Dev Comp Immunol*, 32, 745-57.
- MICEK, S. T., LLOYD, A. E., RITCHIE, D. J., REICHEL, R. M., FRASER, V. J. & KOLLEF, M. H. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 1306-11.
- MIYATA, S., CASEY, M., FRANK, D. W., AUSUBEL, F. M. & DRENKARD, E. 2003. Use of the *Galleria mellonella* Caterpillar as a Model Host To Study the Role of the Type III Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa* Pathogenesis. *Infection and Immunity*, 71, 2404-2413.

- MORADALI, M. F., GHODS, S. & REHM, B. H. 2017. Pseudomonas aeruginosa Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front Cell Infect Microbiol*, 7, 39.
- PATEL, J. J. & BERGL, P. A. 2019. COUNTERPOINT: Should Broad-Spectrum Antibiotics Be Routinely Administered to All Patients With Sepsis as Soon as Possible? No. *Chest*, 156, 647-649.
- PRITT, B., O'BRIEN, L. & WINN, W. 2007. Mucoid Pseudomonas in cystic fibrosis. *Am J Clin Pathol*, 128, 32-4.
- PUKATZKI, S., KESSIN, R. H. & MEKALANOS, J. J. 2002. The human pathogen Pseudomonas aeruginosa utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba Dictyostelium discoideum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 3159-64.
- REDDER, P., HAUSMANN, S., KHEMICI, V., YASREBI, H. & LINDER, P. 2015. Bacterial versatility requires DEAD-box RNA helicases. *FEMS Microbiol Rev*, 39, 392-412.
- REMICK, D. G. 2007. Pathophysiology of sepsis. *Am J Pathol*, 170, 1435-44.
- RICHTER, D. C., HEININGER, A., BRENNER, T., HOCHREITER, M., BERNHARD, M., BRIEGEL, J., DUBLER, S., GRABEIN, B., HECKER, A., KRUGER, W. A., MAYER, K., PLETZ, M. W., STORZINGER, D., PINDER, N., HOPPE-TICHY, T., WEITERER, S., ZIMMERMANN, S., BRINKMANN, A., WEIGAND, M. A. & LICHTENSTERN, C. 2019. Bacterial sepsis : Diagnostics and calculated antibiotic therapy. *Anaesthesist*, 68, 40-62.
- ROGERS, A. J., LOCKHART, D. S., CLARKE, R., BENNETT, H. V., KADOOM, Y., TURNER, J. E., DRYDEN, M. & CROW, M. A. 2019. Rapid Rule Out of Culture-Negative Bloodstream Infections by Use of a Novel Approach to Universal Detection of Bacteria and Fungi. *The Journal of Applied Laboratory Medicine*, 3, 534-544.
- RUSSOTTO, V., CORTEGIANI, A., RAINERI, S. M. & GIARRATANO, A. 2015. Bacterial contamination of inanimate surfaces and equipment in the intensive care unit. *J Intensive Care*, 3, 54.
- SAGRIPANTI, J. L. & BONIFACINO, A. 2000. Resistance of Pseudomonas aeruginosa to liquid disinfectants on contaminated surfaces before formation of biofilms. *J AOAC Int*, 83, 1415-22.
- SHELSTRAETE, P., VAN DAELE, S., DE BOECK, K., PROESMANS, M., LEBECQUE, P., LECLERCQ-FOUCART, J., MALFROOT, A., VANECHOUTTE, M. & DE BAETS, F. 2008. Pseudomonas aeruginosa in the home environment of newly infected cystic fibrosis patients. *Eur Respir J*, 31, 822-9.
- SEKI, M., MACHIDA, H., YAMAGISHI, Y., YOSHIDA, H. & TOMONO, K. 2013. Nosocomial outbreak of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa caused by damaged transesophageal echocardiogram probe used in cardiovascular surgical operations. *J Infect Chemother*, 19, 677-81.
- SINGER, M., DEUTSCHMAN, C. S., SEYMOUR, C. W., SHANKAR-HARI, M., ANNANE, D., BAUER, M., BELLOMO, R., BERNARD, G. R., CHICHE, J. D., COOPERSMITH, C. M., HOTCHKISS, R. S., LEVY, M. M., MARSHALL, J. C., MARTIN, G. S., OPAL, S. M., RUBENFELD, G. D., VAN DER POLL, T., VINCENT, J. L. & ANGUS, D. C. 2016. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315, 801-10.
- SIX, A., KRANJANGWONG, S., CRUMLISH, M., ZADOKS, R. & WALKER, D. 2018. Galleria mellonella as an infection model for the multi-host pathogen Streptococcus agalactiae reflects hypervirulence of ST283. *bioRxiv*, 407171.
- STARKEY, M. & RAHME, L. G. 2009. Modeling Pseudomonas aeruginosa pathogenesis in plant hosts. *Nat Protoc*, 4, 117-24.
- STEARNS-KUROSAWA, D. J., OSUCHOWSKI, M. F., VALENTINE, C., KUROSAWA, S. & REMICK, D. G. 2011. The pathogenesis of sepsis. *Annu Rev Pathol*, 6, 19-48.

- TAN, H., ZHANG, L., ZHAO, Q., CHEN, R., LIU, C., WENG, Y., PENG, Q., BAI, F., CHENG, Z., JIN, S., WU, W. & JIN, Y. 2016. DeaD contributes to *Pseudomonas aeruginosa* virulence in a mouse acute pneumonia model. *FEMS Microbiol Lett*, 363.
- TANG, Y. J., ALI, Z., ZOU, J., JIN, G., ZHU, J. C., YANG, J. & DAI, J. G. 2017. Detection methods for *Pseudomonas aeruginosa*: history and future perspective. *Rsc Advances*, 7, 51789-51800.
- TOLL-RIERA, M., SAN MILLAN, A., WAGNER, A. & MACLEAN, R. C. 2016. The Genomic Basis of Evolutionary Innovation in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genet*, 12, e1006005.
- TRAUTMANN, M., LEPPER, P. M. & HALLER, M. 2005. Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism. *Am J Infect Control*, 33, S41-9.
- TSAI, C. J., LOH, J. M. & PROFT, T. 2016. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*, 7, 214-29.
- TURNER, K. H., EVERETT, J., TRIVEDI, U., RUMBAUGH, K. P. & WHITELEY, M. 2014. Requirements for *Pseudomonas aeruginosa* acute burn and chronic surgical wound infection. *PLoS Genet*, 10, e1004518.
- VAKULSKAS, C. A., PANNURI, A., CORTES-SELVA, D., ZERE, T. R., AHMER, B. M., BABITZKE, P. & ROMEO, T. 2014. Global effects of the DEAD-box RNA helicase DeaD (CsdA) on gene expression over a broad range of temperatures. *Mol Microbiol*, 92, 945-58.
- VALOT, B., GUYEUX, C., ROLLAND, J. Y., MAZOUZI, K., BERTRAND, X. & HOCQUET, D. 2015. What It Takes to Be a *Pseudomonas aeruginosa*? The Core Genome of the Opportunistic Pathogen Updated. *PLoS One*, 10, e0126468.
- WIEGAND, S., BERNER, R., SCHNEIDER, A., LUNDERSHAUSEN, E. & DIETZ, A. 2019. Otitis Externa. *Dtsch Arztebl Int*, 116, 224-234.
- WILLIAMS, B. J., DEHNBOSTEL, J. & BLACKWELL, T. S. 2010. *Pseudomonas aeruginosa*: host defence in lung diseases. *Respirology*, 15, 1037-56.
- WILLMANN, M., GÖTTING, S., BEZDAN, D., MAČEK, B., VELIC, A., MARSCHAL, M., VOGEL, W., FLESCHE, I., MARKERT, U., SCHMIDT, A., KÜBLER, P., HAUG, M., JAVED, M., JENTZSCH, B., OBERHETTINGER, P., SCHÜTZ, M., BOHN, E., SONNABEND, M., KLEIN, K., AUTENRIETH, I. B., OSSOWSKI, S., SCHWARZ, S. & PETER, S. 2018. Multi-omics approach identifies novel pathogen-derived prognostic biomarkers in patients with *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection. *bioRxiv*, 309898.
- WILLMANN, M., KUEBART, I., VOGEL, W., FLESCHE, I., MARKERT, U., MARSCHAL, M., SCHROPPEL, K., AUTENRIETH, I. B., HOLZL, F. & PETER, S. 2013. Time to positivity as prognostic tool in patients with *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection. *J Infect*, 67, 416-23.
- WU, X. M., CHEN, J., ZHAO, Y. P. & ZUGHAIER, S. M. 2014. Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* biomarkers in biological fluids using surface-enhanced Raman scattering. *Smart Biomedical and Physiological Sensor Technology Xi*, 9107.
- XUE, Z., HESSLER, C. M., PANMANEE, W., HASSETT, D. J. & SEO, Y. 2013. *Pseudomonas aeruginosa* inactivation mechanism is affected by capsular extracellular polymeric substances reactivity with chlorine and monochloramine. *FEMS Microbiol Ecol*, 83, 101-11.

8. Erklärung zum Eigenanteil

Diese Arbeit wurde am Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Tübingen durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Matthias Willmann. Die Betreuung sowie Unterstützung bei der Durchführung bei der statistischen Analyse der Hazard Ratios oblag Herrn Prof. Dr. med. Matthias Willmann. Praktische Experimente, Dokumentation und sonstige statistische Auswertungen wurden nach Einarbeitung durch die Laborkollegen Benedikt Jentzsch, Viola Ueltzhöffer und Mumina Javed von mir durchgeführt.

Die Mutante PA14-helP wurde von der AG Bohn entwickelt, ansässig am Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Tübingen.

Alle verwendeten Stämme für die Gallerienversuche wurden durch Viola Ueltzhöffer verblindet und ausgegeben.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig mit Anleitung durch Prof. Dr. Matthias Willmann verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

Alexander Thomas Moritz

9.Danksagung

Ich möchte mich herzlich bedanken bei Prof. Dr. Matthias Willmann für die sehr gute und sehr freundliche Betreuung während des gesamten Projekts. Mein besonderer Dank gilt außerdem Viola Ueltzhöffer für die gute Betreuung und Beratung bei der Laborarbeit. Weiterhin danke ich Mumina Javed für die gute Betreuung und ihren Beitrag für eine positive Stimmung in der Arbeitsgruppe. Ebenfalls danken möchte ich Benedikt Jentzsch für die Heranführung an die Experimentiertechnik. Darüberhinaus bedanke ich mich bei meiner Familie für die gute Unterstützung und den Rückhalt während der gesamten Bearbeitungszeit dieser Arbeit.

Tübingen, den

Alexander Thomas Moritz