

**Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der
Universität Tübingen**

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. I. B. Autenrieth

**Entwicklung eines polyklonalen Antikörpers gegen
Burkholderia cepacia Exopolysaccharid**

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

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

vorgelegt von

Christopher Bernd Hartwig

aus

Schwäbisch Gmünd

2009

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. G. Döring

2. Berichterstatter:

Professor Dr. B. Flehmig

Für meine Eltern

Edeltraud und Bernd Hartwig

INHALTSVERZEICHNIS:

1	EINLEITUNG	4
1.1	Cystische Fibrose.....	4
1.2	Der <i>Burkholderia cepacia</i> Komplex als Erreger von Pneumonien bei Patienten mit CF.....	5
1.3	Vorkommen von <i>Burkholderia cepacia</i> und Virulenzfaktoren	6
1.4	Taxonomie des <i>Burkholderia cepacia</i> Komplex	8
1.5	Bedeutung des Exopolysaccharids	9
1.6	Ziel dieser Arbeit	10
2	MATERIAL UND METHODEN	11
2.1	Reagenzien und Chemikalien.....	11
2.2	Geräte	12
2.3	Puffer und Lösungen	13
2.4	Bakterien und Sputen	14
2.5	Kultivierung der Bakterien.....	16
2.6	<i>Burkholderia cepacia</i> EPS	17
2.7	Gewinnung eines polyklonalen Antikörpers durch Immunisierung von Kaninchen mit <i>Burkholderia cepacia</i> EPS	17
2.8	ELISA zum Nachweis von spezifischem IgG aus Kaninchenserum gegen das <i>Burkholderia cepacia</i> EPS	18

2.9	IgG Reinigung aus Kaninchen Serum	19
2.10	IgG Adsorption an <i>Burkholderia cepacia</i> Stämmen	20
2.11	Dot blot zum Nachweis von gelöstem EPS	20
2.12	Zellwandpräparation für den Immunoblot	21
2.13	Immunoblot zur Überprüfung unspezifischer AK-Bindungen.....	21
2.14	Gramfärbung zum Nachweis Gram-negativer Bakterien in Patienten Sputum.....	22
2.15	Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von EPS auf <i>Burkholderia cepacia</i> Stämmen	23
3	ERGEBNISSE	25
3.1	Suche spezifischer IgG AK gegen <i>Burkholderia cepacia</i> EPS, nach Immunisation mit Lipopeptid Adjuvans mittels ELISA.....	25
3.2	Nachweis spezifischer IgG AK gegen das <i>Burkholderia cepacia</i> EPS nach Immunisation mit Freund´s Adjuvans mittels ELISA	27
3.3	Dot Blot zum Test auf spezifische Bindung des polyklonalen AK an EPS und <i>Burkholderia cepacia</i>	29
3.4	Immunfluoreszenz mit <i>Burkholderia cepacia</i> Stämmen zum Nachweis von EPS auf der Bakterienoberfläche	30
3.5	Gramfärbung von Sputum Proben zum Nachweis Gram-negativer Stäbchen	38

3.6	Nachweis von <i>Burkholderia cepacia</i> mittels Immunfluoreszenz in den Sputum Proben.....	39
4	DISKUSSION.....	41
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	45
6	ABKÜRZUNGEN.....	46
7	LITERATURVERZEICHNIS	48
8	DANKSAGUNG.....	61
9	LEBENS LAUF.....	62

1 Einleitung

1.1 Cystische Fibrose

Die cystische Fibrose (CF) ist die häufigste autosomal rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung der weißen Rasse. Der Gendefekt tritt mit einer Frequenz von 1:3000 bei Neugeborenen auf (29). Bis heute liegt das durchschnittlich erreichte Alter dieser Patienten nur etwas über 30 Jahre (19; 32). 1989 konnte das für CF verantwortliche Gen identifiziert werden, welches auf dem langen Arm des Chromosoms 7 lokalisiert ist. Bis jetzt sind über 1500 Mutationen dieses Gens beschrieben (20). Die häufigste Mutation $\Delta F 508$ hat eine Deletion von drei Basenpaaren und damit den Verlust eines Phenylalaninrestes an der Stelle 508 des 1480 Aminosäuren langen Proteins zur Folge. Dieses trägt den Namen „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ (CFTR) (44; 71; 73) und funktioniert als cAMP abhängiger Chloridkanal (28). Betroffen davon sind alle exokrinen Drüsen des Körpers, deren muköses Sekret dadurch zu viskös wird, nicht abfließen kann und die Ausführungsgänge verlegt. Es entsteht eine Entzündung durch aufgestautes Sekret mit zystisch-fibrotischem Umbau des Gewebes. Ursache für die CF ist eine Maldigestion durch Pankreasinsuffizienz, erhöhter Natriumchloridgehalt im Schweiß und rezidivierende Lungenerkrankungen. Dabei imponieren chronischer produktiver Husten, rezidivierende Bronchitiden und Pneumonien, die häufig durch *Staphylococcus aureus*, *Hämophilus influenzae* und *Pseudomonas aeruginosa* ausgelöst werden (33). Diese Infektionen werden von zähem Sekret, das die mukoziliäre Clearance behindert, gefördert (32; 69). Es entsteht ein Teufelskreis aus chronischer Inflammation und Infektion, wobei nicht geklärt ist, ob die Inflammation auch schon vor der Infektion bestehen kann (2; 45).

1.2 Der *Burkholderia cepacia* Komplex als Erreger von Pneumonien bei Patienten mit CF

Ein weiterer Erreger von Lungeninfektionen ist der *Burkholderia cepacia* Komplex (BCC) (siehe 1.4). Er stellt ein immer größer werdendes Problem bei Patienten mit CF dar (82). Zusätzlich werden neuerdings noch unbekannte Bakterienstämme diskutiert, an den Infektionen beteiligt zu sein (72). Die Prävalenz und Inzidenz der BCC Infektionen sind in den CF-Zentren weltweit nicht einheitlich (16). In Nordamerika liegen sie etwas niedriger als in Großbritannien, da dort durch die Ausbreitung eines epidemischen Stammes mehr Patienten erkrankt sind (35). In Deutschland gibt es je nach Zentrum unterschiedliche Zahlen, jedoch liegen diese ebenfalls niedriger als in Großbritannien. Der Altersgipfel, wie Abb. 1 zeigt, liegt für den BCC zwischen 25 und 34 Jahren. Zu entnehmen ist dieser Grafik auch die insgesamt Häufigkeit der Infektionen im Vergleich zu anderen Erregern.

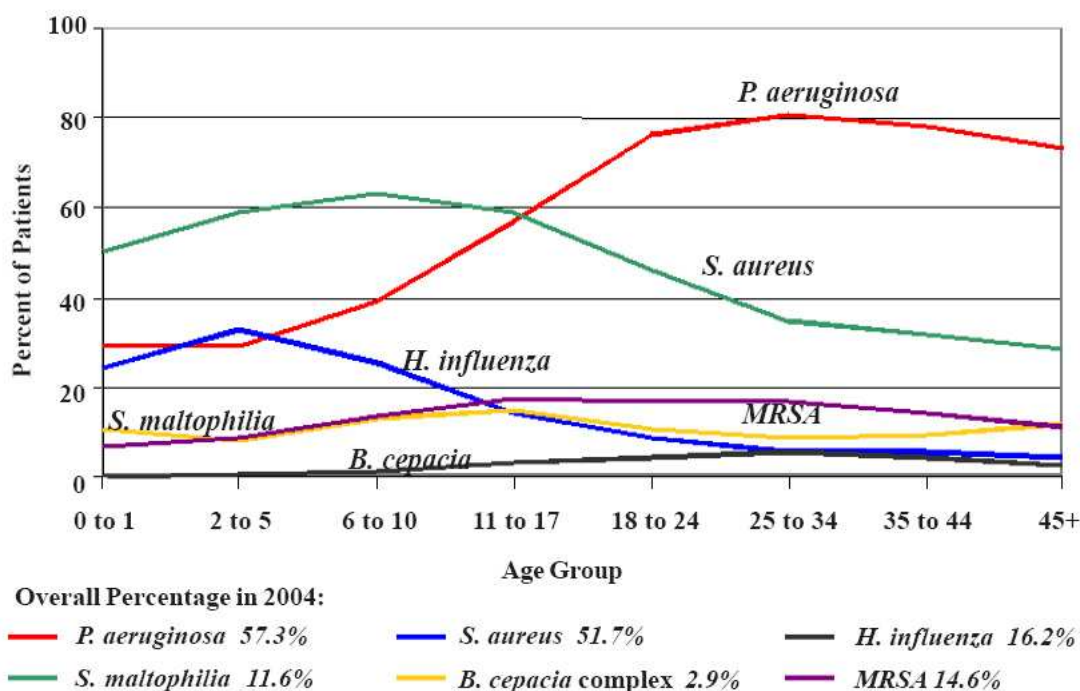


Abb. 1: Insgesamte Häufigkeit der bakteriellen Infektionen bei Patienten mit CF in Abhängigkeit des Alters; Cystic Fibrosis Foundation, Patient Registry 2004 Annual Report, Bethesda, Maryland (19)

Die Infektion durch Stämme des BCC erfolgt häufig als Kreuzinfektion zwischen den CF Patienten einer Station während des Klinikaufenthalts (78), aber auch der Kontakt mit dem Pflegepersonal sowie eine Übertragung durch Aerosole werden diskutiert (42). Dies bedeutet für die Patienten eine weitere massive Einschränkung der Lebensqualität, da auf Grundlage dieser Erkenntnisse vermehrt strikte Trennung von BCC besiedelten und nicht besiedelten Patienten empfohlen wurde (35; 37; 80). Ebenfalls möglich ist die Besiedelung eines Patienten mit einem weiteren Stamm des BCC, was noch drastischere Hygienemaßnahmen und zusätzlich eine Trennung der schon mit BCC besiedelten Patienten untereinander erfordert (48).

Die Infektion der Patienten mit einem Stamm des BCC führt häufig zu einer rapiden Verschlechterung der Lungenfunktion, Leukozytose, Bakteriämie und erhöhter Blutsenkungsgeschwindigkeit - dem so genannten „Cepacia Syndrom“, einem septischen Krankheitsbild mit Todesfolge (43). Eine Therapie dieses Syndroms gestaltet sich sehr schwierig, da sich die Stämme des BCC als multiresistent gegenüber der antibiotischen Therapie erwiesen haben (11; 34; 68). Außerdem gibt es Hinweise auf ein intrazelluläres Eindringen von BCC Stämmen in Makrophagen und Pneumozysten (56; 76).

1.3 Vorkommen von *Burkholderia cepacia* und Virulenzfaktoren

B. cepacia wurde, als Erreger der Zwiebfäule, erstmals 1950 von Burkholder beschrieben (3). Es gilt als ein anspruchsloser Umweltkeim (7; 30), der im Boden, auf Pflanzen und im Abwasser gefunden wird (4; 65). Allerdings gelingt der Nachweis selten, wie eine Untersuchung zeigt, in der nur auf 4% der verschiedenen Gemüseproben BCC gefunden wurde. Ein Nachweis in Wohnungen von Patienten mit CF war ebenfalls möglich (65). BCC Stämme halten in Böden hohe pH-Werte aus (40); allerdings sind sie hitzelabil und können Temperaturen >65°C länger als 10 min (Minute n) nicht überleben (25). Die Anspruchslosigkeit und metabolische Vielseitigkeit hat BCC für die Agrarindustrie interessant gemacht, denn dort gibt es vielversprechende

Ansätze beim Einsatz gegen Pilzkrankungen von Pflanzen und im Abbau von aromatischen Chlorverbindungen. Die Freisetzung von BCC-Stämmen in die Umwelt führt aber zu einem Einspruch der CF-Forschung, die ein Übergreifen dieser Stämme auf CF-Patienten befürchtet, da es noch nicht ausreichend geklärt ist, ob die dazu verwendeten Stämme keine humanpathogene Auswirkung haben können (22; 38; 41; 64; 67).

Das Adhären von Keimen an die Schleimhaut oder das respiratorische Epithel ist ein wichtiger Schritt zu Beginn einer Infektion. Viele Bakterien, wie auch BCC, besitzen deshalb Pili, mit denen sie an diesen Oberflächen besser haften können (81). Weiterhin wurde beobachtet, dass BCC-Stämme in Anwesenheit von *P. aeruginosa* verstärkt an respiratorisches Epithel binden (74). Dies konnte in weiteren Untersuchungen nicht bestätigt werden, da ein großer Teil der Patienten mit CF ohne vorherige Besiedelung mit *P. aeruginosa* trotzdem an Vertretern des BCC erkranken konnte (35). Gestützt wird dies unter anderem durch die Fähigkeit des BCC, an Mucine die vom respiratorischen Epithel sezerniert werden, adhären zu können (75). Auf der Suche nach Virulenzfaktoren, die bei der Krankheitsentstehung eine Rolle spielen, fanden sich Proteasen, Lipasen, Hämolyse und Exopolysaccharid, aber so gut wie keine Hinweise darauf, dass diese dabei eine Rolle spielen (36). Exotoxin A, einer der Hauptvirulenzfaktoren bei *P. aeruginosa*, konnte in mehreren Versuchen beim BCC nicht nachgewiesen werden (66; 85). Eine Protease, die von BCC produziert wird und die Fähigkeit zum Spalten von Gelatine und Kollagen, aber nicht von humanen Antikörpern hat, wurde beschrieben. Eine Immunisierung von Ratten mit dieser Protease brachte keinen Schutz bei der nachfolgenden Infektion mit BCC (61). Weitere in vielen Bakterien bekannte Virulenzfaktoren sind Hämolyse. Bei *B. cepacia* konnten diese in einigen Patienten- sowie Umweltisolaten nachgewiesen werden (86). In dieser Untersuchung war ein weiteres Augenmerk auf die Phospholipase C (PLC) gerichtet, die Phosphatidylcholin, ein Bestandteil des Surfactants in der Lunge, spalten kann und gegen die bei Infektionen mit *P. aeruginosa* Antikörper nachgewiesen werden können. Es stellte sich heraus, dass PLC von Stämmen

des BCC produziert werden kann, aber insgesamt viele Stämme keine lipolytische, hämolytische oder proteolytische Aktivität zeigen und diese Enzyme wahrscheinlich keine große Rolle bei der Infektion mit BCC spielen (36). Siderophor-Eisentransportsysteme, welche es Bakterien ermöglichen, mit denen des Wirts zu konkurrieren, sind ein wichtige Virulenzfaktoren bakterieller Infektionen und werden ebenfalls in BCC Stämmen gefunden. Es spielen vier verschiedene Siderophore eine Rolle, die bei BCC Stämmen vorkommen können (21). Zusätzlich fanden sich bei der Untersuchung von 119 BCC Stämmen Katalase, Ornithin-Decarboxylase, Vanillin-Aminopeptidase, C₁₄-Lipase, Alginase und Trypsin sowie eine Reduktion von Nitrat zu Nitrit und die Hydrolyse von Harnstoff (31). Als weiterer Virulenzfaktor wird eine Zink-Metalloprotease diskutiert, die Einfluss auf die Abwehrmechanismen des Immunsystems nimmt. Die tatsächliche Bedeutung dieser Faktoren für die Lungenschädigung bei Patienten mit CF ist noch unklar. Als erwiesen gilt die insgesamt entzündungssteigernde Wirkung von BCC Stämmen. Zusätzlich findet sich bei BCC besiedelten Patienten eine deutlich höhere Ko-Infektion mit anderen Erregern als bei Patienten, die mit *P. aeruginosa* besiedelt sind. Jedoch ist die Ursache dafür noch unklar (62). Ein anderer Weg, der es BCC Stämmen wahrscheinlich ermöglicht, die Immunabwehr zu umgehen, ist das Eindringen in Makrophagen und Zellen des respiratorischen Epithels. Eine Eigenschaft, die nicht alle Stämme gemeinsam haben, die es diesen aber ermöglichen kann sich auch außerhalb der Lunge zu manifestieren (56; 76).

1.4 Taxonomie des *Burkholderia cepacia* Komplex

Die Vielfältigkeit von *B. cepacia* findet man in unterschiedlichen Stämmen, auch Genomovare genannt, wieder. Die eigentlichen zu *B. cepacia* gehörigen Stämme werden als der *B. cepacia* Komplex bezeichnet. Gegenwärtig umfasst der *B. cepacia* Komplex neun phänotypisch ähnliche Arten. Dazu zählen *B. cepacia* (Genomovar I), *B. multivorans* (Genomovar II), *B. cenocepacia* (Genomovar III), *B. stabilis* (Genomovar IV), *B. vietnamensis* (Genomovar V), *B. dolosa* (Genomovar VI), *B. ambifaria* (Genomovar VII), *B. anthina*

(Genomovar VIII) und *B. pyroccinia* (Genomovar IX) (13; 14; 50; 83; 84; 87). Davon ist *B. cenocepacia* der am häufigsten isolierte Stamm und kann selbst wiederum in bisher vier bekannte Untergruppen aufgeteilt werden (6; 34; 49; 55). Ein zehnter Stamm könnte nach neuesten Erkenntnissen noch hinzukommen (88). Der Begriff *B. cepacia* wird im folgenden stellvertretend für den BCC verstanden.

1.5 Bedeutung des Exopolysaccharids

Interessant für einige Stämme des BCC und für diese Arbeit ist, dass die Biosynthese eines Exopolysaccharids (EPS) nicht so selten auftritt wie zuvor angenommen, sondern bei der Untersuchung von portugiesischen Patientenisolaten in 70% der Fälle vorkam (18; 70). Die genaue biochemischen Untersuchungen der Exopolysaccharide, die von verschiedenen Isolaten desselben Zentrums gemacht wurden, zeigten eine identische Struktur (10), ebenso 13 weitere Stämme mit mucoidem und nicht-mucoidem Phänotyp, die aus anderen Quellen stammten (9). Der Name „Cepacian“ wurde auf Grund des regelmäßigen und immer wieder gleichen Vorkommens für das EPS vorgeschlagen (18; 79). Die Strukturformel des „Cepacian“ ist in Abb. 2 wiedergegeben.

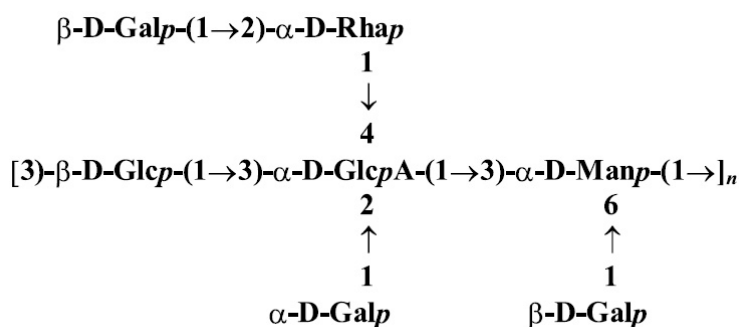


Abb. 2: Struktur des *B. cepacia* EPS (Cepacian) (79)

Die klinische Bedeutung des EPS liegt in der erhöhten Virulenz und Persistenz von BCC. Auch die Bildung von Biofilmen wurde beschrieben (15; 17; 18).

Mit *P. aeruginosa* gelang es auf der Basis eines Lipopolysaccharids durch aktive Immunisierung einen hochaffinen Antikörper in Patienten mit CF zu erhalten. Damit ließen sich die *P. aeruginosa* Infektionsraten bei Patienten mit CF signifikant senken (47). Im Zusammenhang mit der Flagella Vakzine von *P. aeruginosa* sind die Phase I und II Studien abgeschlossen (26) und Phase III Studien kürzlich veröffentlicht worden (23; 24). Dabei handelte es sich ebenfalls um eine aktive Immunisierung. Des Weiteren gelang es auf der Basis eines EPS mit *S. aureus* eine Vakzine zu entwickeln (60), die in einem Mausmodell schon den Schutz gegen eine Infektion zeigen konnte (53; 59). Ein Schutz konnte sowohl für die passive als auch für die aktive Immunisierung in dieser Untersuchung festgestellt werden.

Bereits vorhandene Impfungen, vor allem auch gegen Pneumokokken, werden den Patienten empfohlen. Zum Schutz vor bakteriellen Infektionen oder zur Therapie dieser sind weitere aktive bzw. passive Impfungen gegen bakterielle Infektionen nötig (54). Dazu könnte in Zukunft auch eine Impfung gegen das EPS des BCC gehören.

1.6 Ziel dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollte zum einen der Frage nachgegangen werden, ob die Entwicklung eines spezifischen polyklonalen Antikörpers, analog zum *S. aureus* EPS und *P. aeruginosa* Alginat, gegen das BCC EPS möglich ist. Zum anderen sollte dann die Spezifität des gewonnenen Antikörpers getestet werden. Damit könnten dann serologische Tests bzw. aktive oder passive Immunisierungen entwickelt werden, die eine wesentliche Verbesserung zur bisher angewandten Antibiotika-Therapie darstellen würden.

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien und Chemikalien

Substanz	Hersteller
Acrylamid	Bio Rad
Agar	Becton Dickinson, Heidelberg
Ammoniumpersulfat 10%	Bio Rad
Aqua bidest	Seralpur
BSA (Bovines Serumalbumin)	Sigma Chemie
CaCl ₂ 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Casamion Acid	Becton Dickinson, Heidelberg
CY3 - konjugierter Ziege-Antikörper gegen Kaninchen IgG	DAKO, Hamburg
DAPI	Böhringer, Mannheim
ECL+Plus, Western blotting detection reagents	Amersham Pharmacia Biotech
Ethanol 99,8%	Merck, Darmstadt
FeSO ₄ 7 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Fluorescent Mounting Medium	DAKO
Freund´s Adjuvans komplett	Sigma Chemie
Freund´s Adjuvans inkomplett	Sigma Chemie
Fuchsin	Merck, Darmstadt
Glucose	Merck, Darmstadt
HiTrap [®] Protein A Säule	Pharmacia Biotech
Immunfluoreszenzeindeckmedium	DAKO
K ₂ SO ₄	Merck, Darmstadt
Karbolgentiana Violett	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Lipopeptid Adjuvans	EMC microcollections, Tübingen
Lugolsche Lösung	Merck, Darmstadt

Meerrettich Peroxidase konjugierter Anti-Hasen-Antikörper	DAKO
MgSO ₄ 7 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Nitrocellulose Membran	Schleicher & Schüll
OPD (o-Phenyldiamindihydrochlorid)	Sigma Chemie
Phosphat-Citrat-Pufferkapsel	Sigma Chemie
Pierce BCA Protein Assay Reagenz	Pierce, Rockford IL (USA)
Protein A	Pharmacia
Proteinmarker (Western Blot)	Invitrogen
Schweineserum	DAKO
SDS 10%	Bio Rad
Skim Milk	Disko
TEMED	Bio Rad
Tween 20	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Yeast Extract	Becton Dickinson, Heidelberg

2.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoradiographie Film	Kodak
Axioplan Lichtmikroskop mit Kamera AxioCam	Zeiss, Jena
Bio Dot Apparatus	Bio Rad
Einmalkanülen, Einmalspritzen	Braun Melsungen AG
ELISA- Auswertung	SLT GmbH / Tecan AG
Entwicklungsgerät	Kodak
Eppendorf Röhrchen	Eppendorf Hamburg
Falcon 50 ml Gefäß mit Verschluss	Becton Dickinson, Heidelberg
Gelelektrophorese Halterung	Bio Rad
Mikrotiterplatten	Greiner

Objektträger	R. Langenbrinck
Papier-Schreiber, UV Cord, Pumpe	LKB, Pharmacia
pH - Meter	Metrohm
Photometer; ELISA, Proteinbest.	Pharmacia
Pipetten	Costar
Silikonstift	DAKO
Sterilfilter Millex- GS 0,22µm	Millipore, Bedford, USA
Vortex	Uniequipe GmbH

2.3 Puffer und Lösungen

PBS 20x

NaCl	170,00 g
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	14,14 g
KH ₂ PO ₄	2,70 g

Mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.

Zum Gebrauch wird die Lösung 1:20 verdünnt.

Tris 1 M pH 8,0

Tris	121,10 g
------	----------

Mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.

Einstellen des pH Wertes mit dem pH-Meter unter Zugabe von HCl.

Glycin 0,1 M pH 2,8

Glycin	75,07 g
--------	---------

Mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.

Einstellen des pH Wertes mit dem pH-Meter unter Zugabe von HCl.

2.4 Bakterien und Sputen

Die verwendeten *B. cepacia* Stämme sind Patientenisolat von Patienten mit CF, die im Sta. Maria Hospital in Lissabon behandelt wurden (70). Die Isolation erfolgte aus Bronchialsekret zwischen 1995 und 1999 (16). Die BCC Stämme dienten zur Überprüfung der Spezifität des gewonnenen Antikörpers. Zu Verfügung gestellt wurden die *B. cepacia* Stämme freundlicherweise von Dr. Jorge Leitão (Instituto Superior Técnico in Lissabon). Eine Übersicht ist aus Tab. 1 zu entnehmen.

Tab. 1: Bezeichnung der *B. cepacia* Stämme, der Isolationszeitpunkt, Alter und Geschlecht des Patienten sowie Genomovar und Fähigkeit zur EPS Produktion

Stamm	Isolationsdatum	Alter des Pat.	Geschlecht	Genomovar	EPS
IST 408	31.01.1995	2	weiblich	I, <i>B. cepacia</i>	+
IST 408 N				I, <i>B. cepacia</i> (nicht mucoide Mutante)	-
IST 411	09.12.1995	10	weiblich	III B, <i>B. cenocepacia</i>	-
IST 410	01.06.1995			I, <i>B. cepacia</i>	-
IST 405	07.04.1995			III B, <i>B. cenocepacia</i>	-
IST 402	13.04.1995	19	männlich	IV, <i>B. stabilis</i>	+
IST 450	09.06.1999	9	weiblich	III B, <i>B. cenocepacia</i>	?
IST 401	28.08.1995	4 Monate	weiblich	I, <i>B. cepacia</i>	+

Des Weiteren wurden sieben *B. cepacia* Stämme und die Sputen, aus denen sie isoliert wurden, verwendet. Diese stammten von Patienten mit CF aus der Universität Genua. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Graziana Manno, Laboratoria Clinica di Malattie Infettive Genua.

Bakterienstämme, die zu Tests auf Kreuzreaktionen und zur Kontrolle der Spezifität der gewonnenen IgG verwendet wurden, sind Tab. 2 und Tab. 3 zu entnehmen.

Tab. 2: *B. cepacia* Stämme die zu Tests auf Kreuzreaktionen verwendet wurden mit Name und Genomovar Status (51)

Stamm	Nr.
<i>B. cepacia</i> , Genomovar I	ATCC 25416
	ATCC 17759
<i>B. multivorans</i> , Genomovar II	ATCC 17616
<i>B. cenocepacia</i> , Genomovar III	ATCC 17765
	J2315

Tab. 3: Bakterienstämme die nicht zum *B. cepacia* Komplex gehören und für Tests auf Kreuzreaktionen verwendet wurden.

Stamm	Nr.
<i>Haemophilus influenzae</i>	1
<i>Haemophilus influenzae</i>	2
<i>Escherichia coli</i>	ATCC
<i>Staphylococcus aureus</i>	8325-4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO 1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DB 1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CF 18

2.5 Kultivierung der Bakterien

Kulturmedium

Angaben für 500 ml Medium:

Na ₂ HPO ₄	5,00	g
KH ₂ PO ₄	1,50	g
K ₂ SO ₄	0,50	g
NaCl	0,50	g
MgSO ₄ 7 H ₂ O	0,10	g
Hefe	0,50	g
Casaminoacids	0,50	g
CaCl ₂ 2 H ₂ O	0,01	g/l
FeSO ₄ 7 H ₂ O	0,001	g/l

Die Substanzen wurden in 400 ml Aqua dest. gelöst und autoklaviert. Danach wurde 10 g Glucose in 100 ml Aqua dest. gelöst, steril filtriert und mit dem Rest des Mediums vermischt.

Um ein festes Medium zu erhalten wurde zu den Substanzen für das flüssige Medium zusätzlich 7,5 g Agar hinzugefügt und ebenfalls autoklaviert. Das feste Medium wurde in der Mikrowelle wieder verflüssigt, mit vorgewärmter, steril filtrierter Glucose Lösung (10g/100ml) gemischt und in Mengen von 15-20 ml in Petrischalen gegossen.

Die Anzucht der Bakterienstämme in der Flüssigkultur erfolgte über Nacht unter aeroben Bedingungen im Schüttelbrutschrank bei einer Temperatur von 37°C. Die mit den Bakterienstämmen beimpften festen Kulturplatten wurden bei 37°C unter aeroben Bedingungen über Nacht bzw. bis zu max. 3 Tage bebrütet.

2.6 *Burkholderia cepacia* EPS

Das EPS wurde vom Instituto Superior Técnico Lissabon (IST) zur Verfügung gestellt. Gewonnen wurde es nach der von Richau J. A., Leitão J. H. et. al. beschriebener Methode (70). Verwendet wurde der BCC Stamm IST 408, welcher 1995 von einem Patienten mit CF des St. Maria Krankenhauses in Lissabon isoliert wurde. Der Stamm wurde als *B. cepacia* Genomovar I klassifiziert (16).

2.7 Gewinnung eines polyklonalen Antikörpers durch Immunisierung von Kaninchen mit *Burkholderia cepacia* EPS

Zur Gewinnung der IgG Antikörper wurden zwei New Zealand White Kaninchen verwendet. Immunisiert wurden die Tiere mit *B. cepacia* EPS und Lipopeptid Adjuvans. Dazu wurden 1 mg des Polysaccharids in 1 ml PBS und das Adjuvans in 1,5 ml PBS gelöst. Die EPS Lösung und 1 ml des Adjuvans wurden gevortext. Die Immunisierung erfolgte mit 1 ml Impfstoff pro Kaninchen subcutan, dorsal entlang der Wirbelsäule an ungefähr 8 – 10 Stellen. Die Boosterung erfolgte weitere zweimal nach jeweils 3 Wochen mit derselben Menge Antigen und Adjuvans. Zwei weitere Kaninchen wurden mit komplettem Freundschem Adjuvans, sowie 3 und 6 Wochen später mit inkomplettem Freundschem Adjuvans immunisiert und geboostert. Dabei wurden 2 mg EPS in 2 ml EPS gelöst und mit 2 ml des jeweiligen Adjuvans gemischt, bis eine Suspension entstand. Die Immunisierung der Kaninchen selbst erfolgte analog zu dem Vorgehen mit dem Lipopeptid Adjuvans. Die Blutabnahme fand 3 Wochen nach der letzten Boosterinjektion statt. Dazu wurde den Kaninchen aus den marginalen Ohrvenen oder der zentralen Ohrarterie jeweils 4-5 ml Blut entnommen. Vor der Abnahme wurden die Ohren der Kaninchen mit 70% Alkohol desinfiziert. Zur Punktion wurde eine 21 G Butterfly Kanüle mit auf ca. 10 cm gekürztem Schlauch verwendet, aus welchem dann das Blut in ein Serumröhrchen tropfte. Das in den Röhrchen geronnene Blut wurde mit 2000 rpm 20 min zentrifugiert und das Serum im Überstand vorsichtig abpipettiert. Die Aufbewahrung der Seren erfolgte bei -20°C.

2.8 ELISA zum Nachweis von spezifischem IgG aus Kaninchenserum gegen das *Burkholderia cepacia* EPS

Die Beschichtung der Flachboden ELISA-Mikrotiterplatten erfolgte mit EPS Lösung in einer Konzentration von 10 µg EPS / 100 µl PBS. Davon wurden in jedes Nöpfchen der Platte 100 µl pipettiert und die Platte dann über 24 h bei 4°C inkubiert. Danach erfolgte ein dreimaliger Waschvorgang der Platte mit PBS - Tween 0,05%. Eine Absättigung freier Bindungsstellen erreichte man dadurch, dass eine 1% BSA Lösung in PBS-Tween 0,05% angesetzt wurde, die Nöpfchen erneut mit 100 µl beschickte und die Platte 24 h bei 4° C inkubierte. Danach wurde die Platte wieder gewaschen. Beim Auftragen der Serumverdünnungsreihen von 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} und 10^{-7} wurden für jede Verdünnung zwei Nöpfchen zur Doppelbestimmung genutzt, wobei in jedes Nöpfchen jeweils wieder 100 µl pipettiert wurden. Die Verdünnung wurde mit einem 1% BSA in PBS / Tween 0,05% Puffer angesetzt. Die Inkubationsdauer betrug ebenfalls 24 h bei 4° C. Da nach wurde die Platte erneut gewaschen. Der Meerrettich-Peroxidase konjugierte Anti-Kaninchen Antikörper wurde in einem 1% BSA in PBS - Tween 0,05% Puffer 1:250 verdünnt, mit 100 µl pro Nöpfchen aufgetragen, 2h bei 37°C inkubiert und dreimal gewaschen. Zur Herstellung des Substratpuffers (pH 5) wurde eine Kapsel Citrat in 100 ml Aqua dest. gelöst. Kurz vor dem Pipettieren wurde zusätzlich das Substrat (O-Phenyldiamin Hydrochlorid Tabletten) in einem lichtgeschützten Gefäß aufgelöst. Die Nöpfchen wurden dann wieder mit jeweils 100 µl gefüllt und die Platte 20 min bei 37° C in Dunkelheit inkubiert. Durch Abbau des Substrats entstand eine Färbung, deren Extinktionen bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und die Werte der Doppelbestimmungen gemittelt wurden. Die grafische Darstellung erfolgte durch Auftragen der Serumverdünnungen logarithmisch auf der Abszisse und der Extinktionswerte linear auf der Ordinate.

2.9 IgG Reinigung aus Kaninchen Serum

Das gesamt IgG des Kaninchen-Serums wurde durch eine Hi-Trap[®] Protein A Säule isoliert. IgG bindet in einem weiten pH Bereich an Protein A. Durch einen Puffer mit einem pH von ca. 3 kann IgG dann wieder gelöst werden.

Die Protein A Säule, zur Reinigung von IgG aus Kaninchen-Serum, wurde 15 min mit 1 x PBS mit einem Fluß von 2ml / min gespült, bevor 3 - 6 ml Serum auf die Säule gegeben wurden. Danach wurde wieder mit PBS gespült. Der Proteingehalt des Durchlaufs wurde photometrisch gemessen und auf einem Papierschreiber festgehalten, wobei der Papiervorschub des Schreibers auf 0,1 cm / ml eingestellt war. Sobald der Schreiber Proteine in Form eines Peaks anzeigte, wurde der Durchlauf in einem Gefäß aufgefangen. Das Spülen mit PBS erfolgte so lange, bis auf dem Schreiber wieder die Nulllinie erreicht war. Die Elution der IgG Fraktion erfolgte mit 0,1 M Glycin Puffer mit pH 2,8, welcher ebenfalls mit 2 ml / min auf die Säule gegeben wurde. Dabei wurde das Eluat, sobald der Schreiber über die Nulllinie stieg, aufgefangen. In dem Gefäß zum Auffangen des Eluats waren 100 µl Trispuffer (pH 8,0), zum Einstellen des Eluat auf pH 7, vorgelegt. Zur weiteren Aufreinigung wurde der Durchlauf nochmals nach obigem Protokoll auf die Säule gegeben. Zur quantitativen Bestimmung der Proteinmenge in der Probe wurde der Pierce Protein Assay verwendet. Dieser beruhte auf dem Prinzip der Bindung von Kupferionen in einem alkalischen Medium an Proteine. Das Kupfer selbst wiederum bildete mit Bichinonsäure einen Komplex, dessen Konzentration photometrisch bei 562 nm bestimmt wurde.

2.10 IgG Adsorption an *Burkholderia cepacia* Stämmen

Damit unspezifische, nicht an Exopolysaccharid bindende Antikörper reduziert werden konnten, wurde die IgG Fraktion mit dem Stamm IST 411 inkubiert. Dazu wurde 1 ml des *B. cepacia* Stammes in einer PBS Lösung von 10^9 Bakterien vorgelegt und 1 ml Antikörper mit einer Konzentration von $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ dazugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 4°C wurde die Lösung zur Entfernung der Bakterien steril filtriert.

2.11 Dot blot zum Nachweis von gelöstem EPS

Für den Dot blot wurde eine Nitrocellulosemembran verwendet, die in den Biodot Apparat eingespannt wurde. Der Membran lag dadurch von oben eine Kunststoffplatte mit 8×12 Löchern an. In diese wurde sowohl in PBS gelöstes *B. cepacia* Exopolysaccharid in verschiedenen Verdünnungsstufen, als auch der Überstand von gewaschenen Bakterien gegeben. Die Bakterien wurden dazu in PBS gelöst und 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert, bevor der Überstand abpipetiert werden konnte. Mittels einer Wasserstrahlpumpe wurde auf die Membran ein Unterdruck ausgeübt, der so lange aufrechterhalten wurde, bis die aufgegebenen Proben eingetrocknet waren. Dann wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit Skim Milk ($5 \text{ g} / 100 \text{ ml}$) inkubiert. Danach wurde diese in PBS Tween 0,5% kurz, 10 min und 5 min abgewaschen. Der erste Antikörper wurde in 12 ml PBS 1:1000 verdünnt und die Membran darin 1 h inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein erneuter Waschschrift, bevor der 2. Antikörper ebenfalls in 12 ml PBS 1:1000 verdünnt für 1 h inkubiert wurde und ein letzter Waschschrift folgte. Zur Detektion wurde der ECL+ Kit der Firma Amersham Pharmacia Biotech verwendet. Die Lumineszenz konnte mit einem Autoradiographie Film nachgewiesen werden. Dieser wurde in der Dunkelkammer zwischen 1 und 30 sec belichtet. Die Entwicklung erfolgte automatisch.

2.12 Zellwandpräparation für den Immunoblot

Für den Immunoblot wurden denaturierte Proteine von *B. cepacia* benötigt, damit sie nach Ihrer Größe getrennt werden konnten. Dazu wurden *B. cepacia* Stämme in Flüssigmedium kultiviert und bei 5000 rpm abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde gewonnen, in SDS-Puffer gelöst und bei 95°C 10 min inkubiert. Die Abtrennung unlöslicher und fester Bestandteile erfolgte durch erneutes Abzentrifugieren bei 5000 rpm. Der Überstand fand dann im Immunoblot Verwendung.

2.13 Immunoblot zur Überprüfung unspezifischer AK-Bindungen

Der Immunoblot diente zum Nachweis von Antikörpern, die an *B. cepacia* Zellwandbestandteile binden. Diese wurden dafür nach ihrer Größe durch eine Gelelektrophorese getrennt. Das für den Blot verwendete Gel war ein 12% Acrylamidgel. Die Zusammensetzung ist Tab. 4 zu entnehmen.

Tab. 4: Zusammensetzung eines 12%igen Acrylamidgels

	Sammelgel	Trenngel
Acrylamidgel	1,3 ml	4 ml
Aqua bidest	6,1 ml	3,35 ml
SDS 10%	100 µl	100 µl
0,5 M Tris pH 8,8	1,3 ml	2,5 ml
Temed	10 µl	5 µl
Ammoniumpersulfat (APS) 10%	50 µl	50 µl

Nach dem Pipettieren der ersten Hälfte der Lösungen wurde zum Starten der Polymerisation Temed und APS zugesetzt. Das fertige, noch nicht ausgehärtete Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen und im Anschluss mit Isopropanol überschichtet. Die Polymerisationszeit betrug 30 min. Nach Entfernen des Alkohols wurde das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet und sofort ein Kamm zur Bildung von 10 Taschen hineingesteckt. Nach dem

Aushärten des Gels wurde dieser wieder entfernt. Die erste Tasche des Gels wurde mit einem Proteinmarker, die folgenden mit *B. cepacia* Zellwandproteinen gefüllt. Das Gel wurde in den Pufferbehälter gestellt und dieser mit Laufpuffer (1 x Tris/Glycin/SDS, 25 mM Tris, 250 mM Glycin, pH 8,3, 0,1% SDS) aufgefüllt. Eine Spannung von 200 V wurde für ca. 45-60 min angelegt. Diese wurde so lange belassen, bis die erste Bande des Markers den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Das Gel wurde dann zwischen den Glasplatten herausgenommen und auf eine Nitrocellulosemembran gelegt. Die Membran und das Gel wurden zwischen je zwei Blätter Papier und zwei mit Graphit beschichteten Platten gelegt. Zwischen diesen floss für 1 h ein Strom von 0,6 mA / cm². Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran in Skim Milk inkubiert und wie in 2.11 beschrieben weiterbehandelt.

2.14 Gramfärbung zum Nachweis Gram-negativer Bakterien in Patienten Sputum

Die Gramfärbung wurde für die aus Italien (siehe 2.4) erhaltenen Sputumproben verwendet. Diese ließ man als Tropfen auf dem Objektträger trocknen. Die Proben wurden dann durch Hitze fixiert, indem der Objektträger mit der Unterseite zweimal kurz durch die nicht leuchtende Bunsenbrennerflamme gezogen wurde. Der Farbstoff Karbolgentianaviolett wurde aufgetragen und musste 1 min einwirken. Danach konnte man diesen abgießen, Lugolsche Lösung auftropfen und wiederum 1min einwirken lassen. Das Differenzieren geschah mit 1/1 Ethanol / Aceton so lange, bis keine blauen Farbwolken mehr abgingen; danach wurde direkt mit Wasser nachgespült. Fuchsin musste 30 sec einwirken, bevor wieder mit Wasser nachgespült wurde. Das Präparat wurde dann zwischen Filterpapier getrocknet und unter dem Mikroskop bei 1000-facher Vergrößerung betrachtet.

2.15 Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von EPS auf *Burkholderia cepacia* Stämmen

Die Proben mussten zur Vorbereitung für die Immunfluoreszenz auf dem Objektträger fixiert werden. Dies geschah durch Trocknen auf dem Objektträger, Umkreisen mit einem Silikonstift und anschließender Fixierung mit 4%iger Formaldehyd-Lösung innerhalb der gesetzten Markierung. Alternativ wurde zur Fixierung von Sputum-Proben Hitze eingesetzt. Die Proben wurden dafür ebenfalls auf dem Objektträger getrocknet, bevor sie dann zweimal kurz mit der Unterseite des Objektträgers durch die nicht leuchtende Bunsenbrennerflamme gezogen wurden.

Die zur Immunfluoreszenz verwendeten Bakterienstämme wurden sowohl aus der Flüssigkultur, als auch von Agarplatten dreimal in PBS gewaschen. Dazu suspendierte man die Bakterien in PBS, zentrifugiert sie bei 5000 rpm für 5 min, pipetiert den Überstand ab und resuspendierte die Bakterien wieder. Auf einem Objektträger wurden dann jeweils zwei Tropfen aufgetragen. Mit 4%iger Formaldehyd - Lösung wurden die getrockneten Tropfen 10 min bei Raumtemperatur fixiert und anschließend das Formaldehyd wieder abgesaugt. Das Waschen erfolgte durch das Auftragen von PBS Tween innerhalb der Silikonmarkierungen. Dieser Schritt erfolgte dreimal bei Raumtemperatur jeweils 5 min. Danach wurden unspezifische Bindungsstellen mit Schweineserum (1:10) 30 min abgesättigt und wieder dreimal 5 min mit PBS Tween gewaschen. Als erstes wurde der *B. cepacia* EPS Antikörper 1:20 verdünnt, was einer Konzentration von 32 µg/ml entsprach, und auf die erste Probe aufgetragen, die zweite Probe ohne Kaninchen AK wurde als Kontrolle verwendet. Bei IgG Fraktionen mit niedrigeren Konzentrationen wurde eine entsprechend angepasste Verdünnung gewählt. Nach erneutem Waschen wurde der 2. Antikörper (1:500) auf beide Tropfenproben aufgetragen und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei handelte es sich um einen CY3 markierten Anti-Kaninchen-AK. Um Bakterien unter dem Mikroskop sichtbar zu machen, wurde die bakterielle DNA mit DAPI angefärbt. Dies erfolgte nach einem weiteren Waschvorgang mit 1:1000 verdünntem DAPI für 5 min. Der

letzte Waschschrift wurde mit Aqua bidest. dreimal 5 min durchgeführt, bevor die Präparate getrocknet wurden. Zum Betrachten mit dem Fluoreszenzmikroskop wurde noch ein Deckglas durch Immunfluoreszenzeindeckmedium auf dem Objektträger aufgebracht.

3 Ergebnisse

3.1 Suche spezifischer IgG AK gegen *Burkholderia cepacia* EPS, nach Immunisation mit Lipopeptid Adjuvans mittels ELISA

Der Erfolg der Immunisierung wurde mit einem ELISA kontrolliert. Dazu wurde die Platte des ELISA mit dem *B. cepacia* Polysaccharid beschichtet und die Seren der Kaninchen ①, ② und ③ in aufsteigenden Verdünnungsreihen aufgetragen. Das Serum von Kaninchen ① und ② stammte von immunisierten Tieren. Kaninchen ③ ist ein nicht immunisiertes Tier zur Kontrolle. Die Auswertung des ELISA erfolgte photometrisch, wobei für jede Verdünnungsstufe eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde. Das Ergebnis ist in Tab. 5 und graphisch in Abb. 3 dargestellt:

Tab. 5: Antikörpertiter gegen *B. cepacia* EPS im Serum der immunisierten Tiere. Die Seren der immunisierten Tiere ① und ② sowie des nicht immunisierten Kaninchens ③ wurden verdünnt und die Absorptionswerte (Mittelwert nach Doppelbestimmung) der einzelnen Verdünnungen bestimmt. Der Leerwert wurde zur Kontrolle jeweils mitbestimmt.

Verdünnung/Titer	1:100	1:1000	1:10000	1:100000
Kaninchen ①	1,876	1,853	1,671	1,094
Kaninchen ②	2,002	1,928	1,494	0,744
Kaninchen ③	2,15	2,128	1,758	0,869
Leerwert	0,071	0,062	0,059	0,057

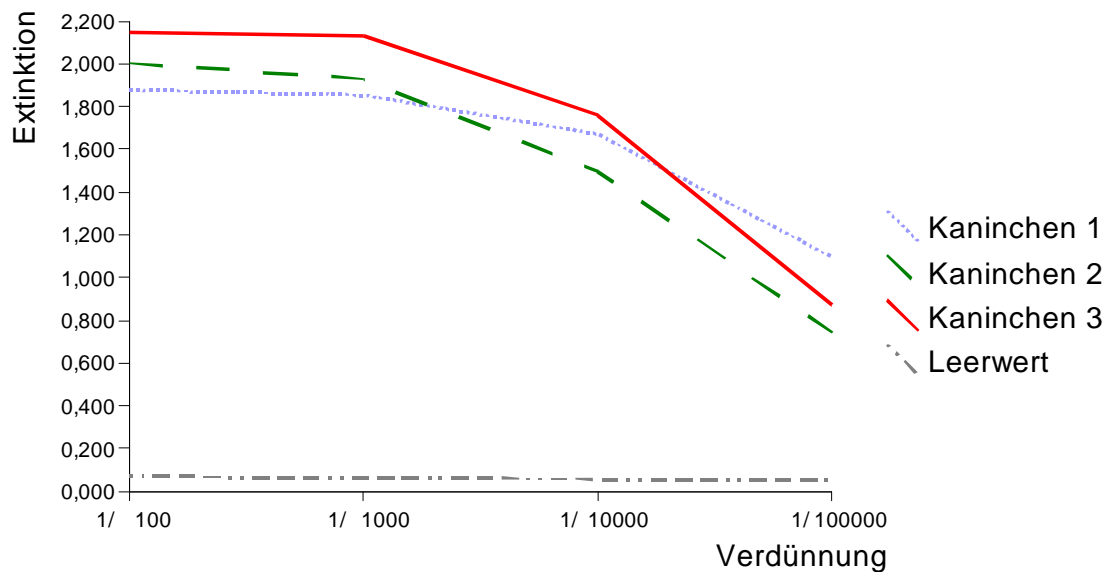


Abb. 3: Vergleich der Absorptionswerte für die Titerbestimmung mittels ELISA nach Immunisation mit *B. cepacia* EPS und Lipopeptid Adjuvans. Die Seren der immunisierten Tiere ① und ② sowie des nicht immunisierten Kaninchens ③ wurden für den ELISA verwendet. Zur Kontrolle wurde der Leerwert mit aufgetragen. Auf der X-Achse sind die Verdünnungsstufen, auf der Y-Achse die jeweils dafür bestimmten Absorptionswerte (Mittelwert nach Doppelbestimmung) aufgetragen.

Über den gesamten abgedeckten Verdünnungsbereich zeigte sich keine signifikanter Unterschied zwischen den Absorptionswerten der Seren immunisierter Kaninchen im Vergleich zum Serum des nicht immunisierten Kontrollkaninchens. Zusammenfassend zeigt sich, dass im Serum der Tiere ① und ② nach Immunisation mit EPS in Kombination mit Lipopeptid Adjuvans keine spezifischen an *B. cepacia* EPS bindenden Antikörper nachgewiesen werden konnten.

3.2 Nachweis spezifischer IgG AK gegen das *Burkholderia cepacia* EPS nach Immunisation mit Freund's Adjuvans mittels ELISA

Eine weitere Möglichkeit zur Immunisation der Tiere gegen das Polysaccharid bestand in der Verwendung von Freund's Adjuvans in der kompletten und inkompletten Form. Zur Klärung der Frage, ob spezifische Antikörper von den Kaninchen gebildet wurden, fand ebenfalls wieder ein ELISA Verwendung. Das Blut der immunisierten Kaninchen ③_i und ④_i (nach Immunisation mit Freund'schem Adjuvans) wurde getestet und das Blut von Kaninchen ② und ③ (gewonnen und tiefgefroren vor Immunisation mit Lipopeptid Adjuvans) zur Kontrolle verwendet. Das Serum von Kaninchen ② und ③ vor Immunisation mit Lipopeptid Adjuvans wird im Folgenden als ②_v und ③_v bezeichnet. Die aus der photometrischen Bestimmung erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 6 und Abb. 4 dargestellt. Die weiteren Versuche wurden mit dem Serum von Kaninchen ③_i durchgeführt.

Tab. 6: Antikörpertiter gegen *B. cepacia* EPS im Serum der immunisierten Tiere. Die Seren der immunisierten Tiere ③_i und ④_i sowie der nicht immunisierten Kaninchen ②_v und ③_v wurden verdünnt und die Absorptionswerte (Mittelwert nach Doppelbestimmung) der einzelnen Verdünnungen bestimmt. Der Leerwert wurde zur Kontrolle jeweils mitbestimmt.

Verdünnung/Titer	1:10	1:100	1:1000	1:10000	1:100000	1:1000000
Kaninchen ③ _i	1,905	1,975	2,026	1,690	0,951	0,303
Kaninchen ④ _i	1,906	1,984	2,001	1,687	0,733	0,234
Kaninchen ② _v	1,850	1,435	0,462	0,156	0,124	0,121
Kaninchen ③ _v	1,994	1,814	0,964	0,304	0,185	0,125
Leerwert	0,118	0,111	0,116	0,111	0,115	0,125

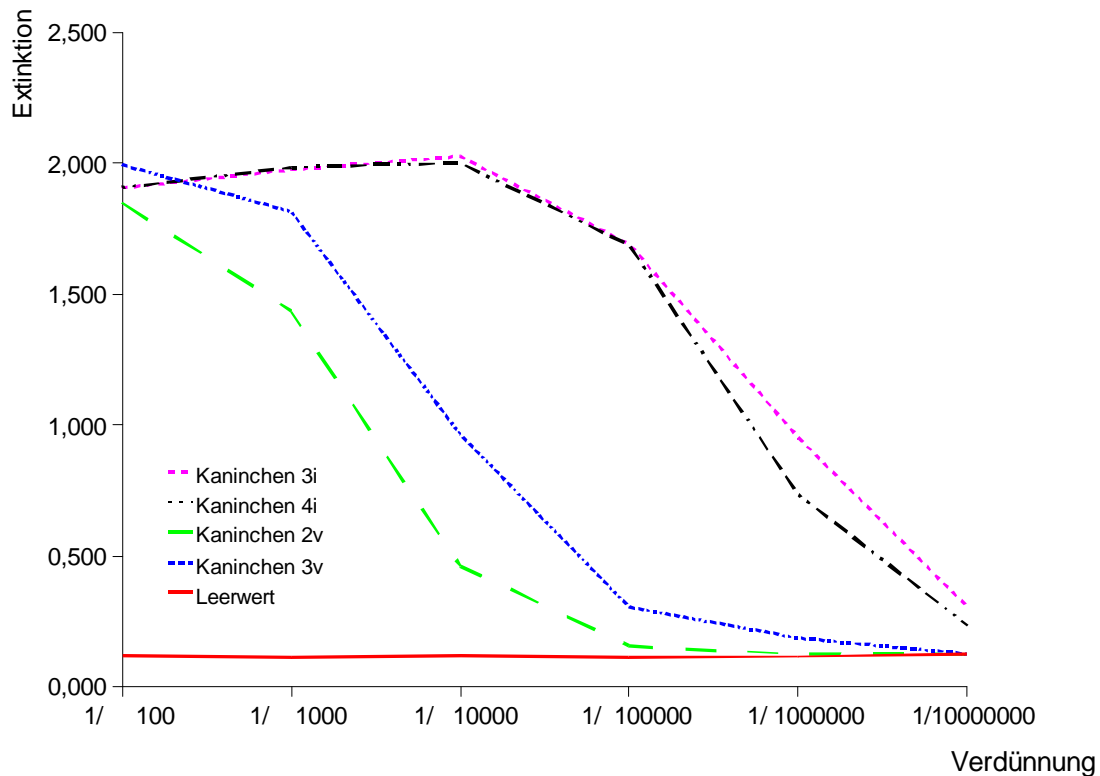


Abb. 4: Vergleich der Absorptionswerte für die Titerbestimmung mittels ELISA nach Immunisation mit *B. cepacia* EPS und Freundschem Adjuvans. Die Seren der immunisierten Tiere ③_i und ④_i sowie der nicht immunisierten Kaninchen ②_v und ③_v wurden für den ELISA verwendet. Zur Kontrolle wurde der Leerwert mit aufgetragen. Auf der X-Achse sind die Verdünnungsstufen, auf der Y-Achse die jeweils dafür bestimmten Absorptionswerte (Mittelwert nach Doppelbestimmung) aufgetragen.

Es zeigt sich eine spezifische Bindung der Antikörper aus dem Serum der Tiere ③_i und ④_i (nach Immunisation mit *B. cepacia* EPS und Freundschem Adjuvans) an die mit EPS beschichtete ELISA Platte, da die Titer für die nicht immunisierten Tiere deutlich niedriger ausfallen.

3.3 Dot Blot zum Test auf spezifische Bindung des polyklonalen AK an EPS und *Burkholderia cepacia*

Für den Dot Blot wurde die IgG Fraktion von Kaninchen ③_i nach der Immunisation mit EPS und Freundschem Adjuvans verwendet. Die IgG Fraktion wurde durch Aufreinigen des Serums von Kaninchen ③_i nach der in 2.9 beschriebenen Methode hergestellt. Es sollte die Bindung sowohl an freies EPS als auch an *B. cepacia* Stämme überprüft werden. Der Dot Blot bestand aus 8 Reihen A – H und 12 Spalten 1 – 10. Beschichtet wurde die Nitrocellulosemembran nach dem in Abb. 5 aufgeführten Schema. Die IgG Fraktion wurde in nicht - adsorbierter Form in den Reihen A – H und adsorbiert (siehe 2.10) in E - H verwendet. Unverdünnt wurde diese in Spalte 1 und verdünnt von 10^{-1} – 10^{-9} in den Spalten 2 – 10 aufgetragen.

In den Verdünnungsstufen von 1:1 bis 10^{-4} war das Signal auf dem Film zu stark und deshalb nicht verwertbar. Ab 10^{-5} zeigte sich für die Reihen mit IST 408 und EPS ein deutliches Signal, das sich mit zunehmender Verdünnung abschwächte. In der Kontrolle sowie für den nicht EPS produzierenden Stamm IST 411 fand sich kein Signal. Der Dot Blot ist Abb. 5 dargestellt.

Der Dot Blot zeigt eine spezifische Bindung der IgG Antikörper - Fraktion des immunisierten Kaninchens ③_i sowohl an den EPS produzierenden Stamm IST 408 als auch direkt an EPS selbst. Da in der Kontrolle mit PBS und für den getesteten Stamm IST 411 kein Signal nachweisbar war ist dies als weiterer Hinweis für die Spezifität des AK zu werten.

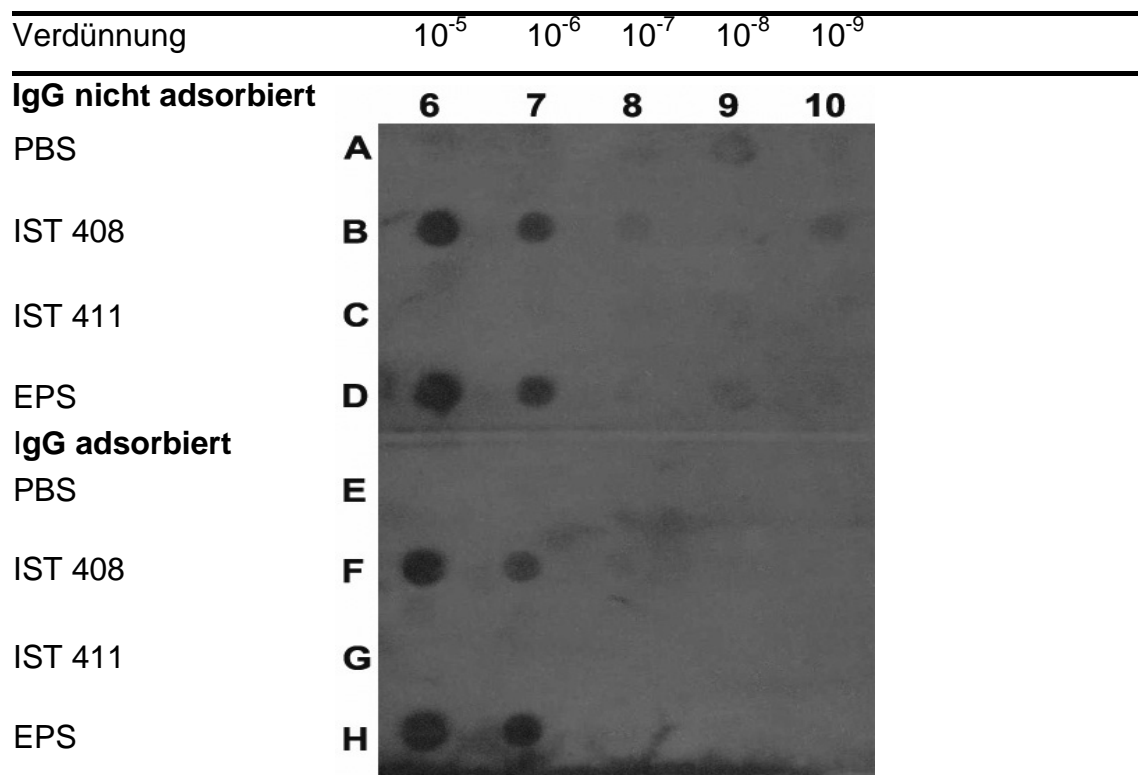


Abb. 5: Der Dot Blot zeigt Bindungen des polyklonalen Antikörpers an EPS und *B. cepacia* Stämme. Gezeigt wird in den Spalten 6-10 die Verdünnungsreihe des in adsorbierter und nicht adsorbierter Form verwendeten Antikörpers (siehe 2.10). In den Reihen A-H sind die untersuchten *B. cepacia* Stämme IST 408 und IST 411 sowie das EPS und als Kontrolle PBS aufgetragen.

3.4 Immunfluoreszenz mit *Burkholderia cepacia* Stämmen zum Nachweis von EPS auf der Bakterienoberfläche

Der Nachweis von EPS auf der Oberfläche von *B. cepacia* Stämmen erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenz. Die IgG Fraktion von Kaninchen ③_i wurde sowohl nicht adsorbiert als auch adsorbiert an IST 408N und 411 verwendet. Ein Ausschluss von Kreuzreaktionen erfolgte durch Immunfluoreszenz mit *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* und *H. influenzae* Stämmen.

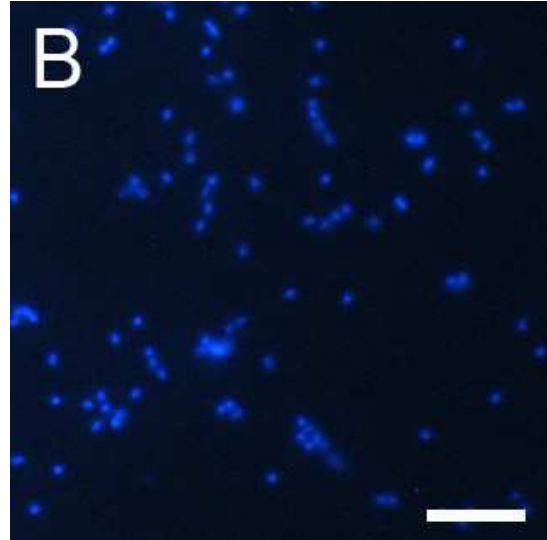
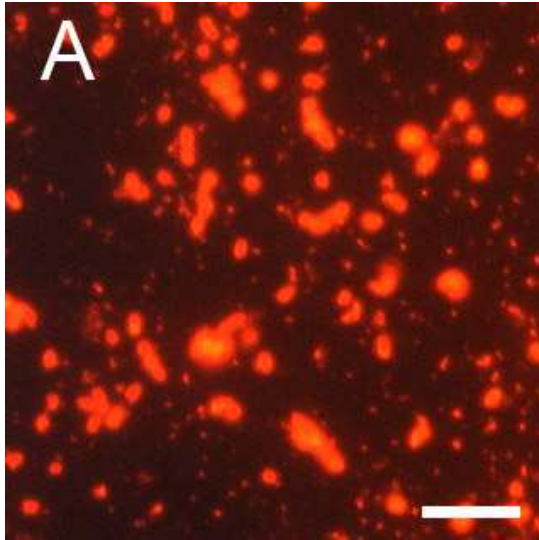
3.4.1 Immunfluoreszenz mit nicht adsorbiertem Antikörper zum Nachweis der Bindung des polyklonalen Antikörpers

Die Bindung der IgG - Fraktion von Kaninchen ③_i an EPS produzierende und nicht produzierende Stämme wurde durch indirekte Immunfluoreszenz überprüft. Die IgG Fraktion wurde zuvor an keinem anderen *B. cepacia* Stamm adsorbiert. Die verwendeten *B. cepacia* Stämme und deren Bindungsreaktionen sind in Tab. 7 aufgeführt. Bei einer Bindung des IgGs an die verwendeten Stämme konnte nachfolgend der CY3 markierte Anti-Kaninchen AK an diese binden. Eine sichtbare CY3 Färbung zeigte somit eine spezifische Bindung des polyklonalen AK an. Fehlte die CY3 Färbung, waren die Proben nur an Hand der DNA Färbung mit DAPI sichtbar.

Tab. 7: *B. cepacia* Stämme, an die der polyklonale Antikörper in der Immunfluoreszenz bindet (AK nicht adsorbiert).

Stamm	IST 408	IST 408N	IST 411	IST 405
Antikörper Bindung	+	+	-	-
Stamm	IST 402	IST 410	IST 401	IST 450
Antikörper Bindung	-	-	+	+

IST 408



IST 411

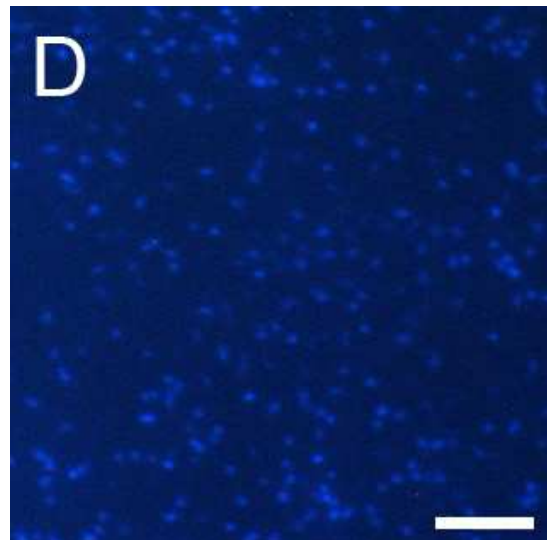
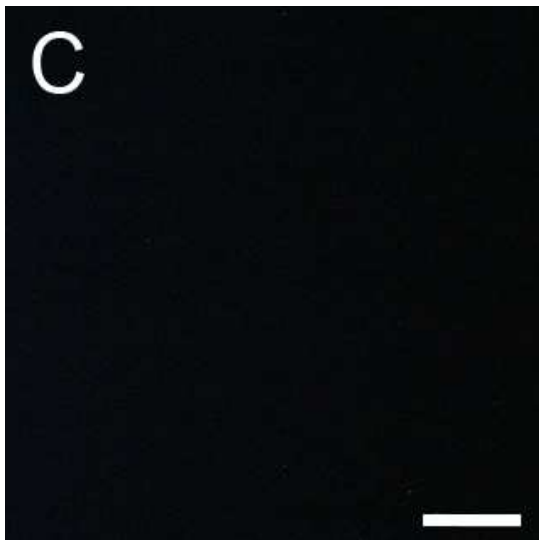


Abb. 6: Bindung des polyklonalen Antikörpers an den EPS positiven Stamm IST 408. Bild A zeigt den polyklonalen AK an IST 408 mit Detektion durch den CY3 markierten Anti-Kaninchen-AK. Bild B macht die DNA von IST 408 durch Färbung mit DAPI für denselben Ausschnitt sichtbar. In Bild C wurde ebenfalls mit dem polyklonalen AK beschichtet und eine Detektion mit CY3 durchgeführt. Hier konnte keine Bindung sichtbar gemacht werden. In der DAPI Färbung zeigen sich jedoch eindeutig Stäbchen in der untersuchten Probe. Vergrößerung für A-E x1000, Balken = 10 µm.

Die Bindung der IgG Fraktion an den EPS produzierenden Stamm IST 408 und seine nicht - mukoide Mutante 408N konnte mit der Immunfluoreszenz gezeigt werden. Ein weiteres deutliches Signal zeigte der ebenfalls auf EPS positiv getestete Stamm IST 401. Für die Stämme IST 411, 405, 402 und 410 konnte eine Bindung des polyklonalen Antikörpers nicht nachgewiesen werden. Mit Ausnahme der nicht - mukoiden Mutante IST 408N bindet der AK in dieser Immunfluoreszenz an EPS positive *B. cepacia* Stämme und nicht an EPS negative Stämme.

3.4.2 Immunfluoreszenz mit an IST 408N adsorbiertem Antikörper zur weiteren Differenzierung der Antikörperspezifität

Zur weiteren Differenzierung der Antikörper Spezifität wurde die IgG Fraktion an die *B. cepacia* Stämme IST 408N und 408 adsorbiert. Dies wurde unter unterschiedlichen Bedingungen mit Veränderung der Inkubationszeiten durchgeführt. Da es sich bei IST 408N um einen nicht Exopolysaccharid bildenden Stamm handelt, sollten damit unspezifisch bindenden Antikörper aus der IgG Fraktion eliminiert werden. Die zur Adsorption benutzten Stämme wurde in verschiedenen Nährmedien gezüchtet. Der Unterschied bestand in der Verwendung eines Glucose beinhaltenden und nicht Glucose beinhaltenden Mediums. Es ergab sich dabei bei den getesteten Stämmen das in Tab. 8 dargestellte Ergebnis.

Tab. 8: Immunfluoreszenz mit polyklonalem AK nach Adsorption an IST 408N oder 408. Variiert wurde die Inkubationsdauer (B) und Verdünnung (C) der IgG Fraktion. Die zur Adsorption verwendeten *B. cepacia* Stämme (A) wurden mit und ohne Glucose (Glc.) im Nährmedium gezüchtet (D). (RT-Raumtemperatur)

				<i>B. cepacia</i> Stamm			
A	B	C	D	408	408N	411	Kontrolle
408N	5 min RT	1:250	Glc.	+	+	-	-
408N	10 min RT	1:250	Glc	-	-	-	-
408N	5 min RT	1:1	Glc.	+	+	-	-
408N	5 min RT	1:10	Glc.	-	-	-	-
408	5 min, RT	1:1	Ø Glc.	+	+	-	-
408	5 min, RT	1:10	Ø Glc	-	-	-	-

Dieses Ergebnis zeigt erneut eine Bindung der IgG Antikörper an den EPS produzierenden Stamm IST 408, die nicht - mukoide Mutante IST 408N und keine Bindung an IST 411 trotz vorheriger Adsorption des Antiköpers. Die Kontrollen sind negativ. Glucose im Nährmedium scheint keinen Einfluss auf die Oberflächenstruktur zu haben, an welche das IgG bindet. Die Bindungseigenschaften des AK entsprechen damit weiterhin den bisher bereits gefundenen.

3.4.3 Immunfluoreszenz mit an IST 411 adsorbiertem IgG

Eine weitere Möglichkeit, um unspezifische Bindungen zu beseitigen, wurde durch Adsorption an IST 411 getestet. Dieser *B. cepacia* Stamm produziert kein

Exopolysaccharid. Damit können IgG Antikörper, die an *B. cepacia*, aber nicht an EPS binden, eliminiert werden. Zum Vergleich wurde eine Immunfluoreszenz ohne adsorbierten Antikörper durchgeführt. Das Ergebnis ist in Tab. 9 dargestellt.

Tab. 9: Immunfluoreszenz mit polyklonalem AK und Detektion mit CY3 markiertem Anti-Kaninchen Antikörper nach Adsorption an IST 411. Im Vergleich zur Immunfluoreszenz ohne adsorbiertem Antikörper. Adsorptionsbedingungen: Inkubationsdauer 30 min, 4°C, IgG Fraktion unverdünnt. Zur Kontrolle diente eine Probe die nur mit CY3 ohne polyklonalen AK beschichtet wurde.

<i>B. cepacia</i> Stamm	Adsorbiertes IgG	Kontrolle
IST 408	+	-
IST 408N	+	-
IST 411	-	-
IST 402	-	-
IST 410	+	+
IST 401	+	+
IST 405	-	-
IST 450	-	-
Nicht adsorbiertes IgG		
IST 408	+	-
IST 408N	+	-
IST 411	-	-
IST 402	-	-
IST 410	-	-
IST 401	+	-
IST 405	-	-
IST 450	-	-

Eine Spezifität des IgG zu Oberflächenantigenen von IST 408 und 401, konnte gezeigt werden. Es handelt sich dabei um EPS produzierende Stämme. Der Stamm IST 408N ist positiv, obwohl als nicht EPS produzierende Mutante von IST 408 kein Signal erwartet hätte werden dürfen. Dies kann für spezifisches aber nicht EPS gebundenes adhären an IST 408N sprechen. Das Signal des nicht EPS exprimierenden Stamms IST 410 ist durch ein Signal sowohl in der Probe als auch in der Kontrolle nicht als positiv zu werten. Der AK bindet somit wieder nur an EPS produzierende Stämme. Eine Ausnahme bleibt weiterhin der Stamm IST 408N.

3.4.4 Immunfluoreszenz mit *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Haemophilus influenzae* Stämmen zum Test auf Kreuzreaktionen

Eine weitere Eingrenzung der Spezifität der IgG Fraktion erfolgte durch Immunfluoreszenz an verschiedenen *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* und *H. influenzae* Stämmen. Es sollten dadurch unspezifische Bindungen an nicht zum *B. cepacia* Komplex gehörenden, aber bei Patienten mit CF häufig vorkommenden Bakterienstämmen ausgeschlossen werden. Dazu wurden diese Stämme sowohl mit an IST 411 adsorbiertem als auch mit nicht adsorbiertem Antikörper getestet. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tab. 10 dargestellt.

Tab. 10: Immunfluoreszenz mit polyklonalem AK zum Test auf Kreuzreaktionen mit Bakterienstämmen, die bei Patienten mit CF häufig vorkommen. Detektion mit CY3 markiertem Anti-Kaninchen Antikörper nach Adsorption an IST 411. Im Vergleich zur Immunfluoreszenz ohne adsorbiertem Antikörper. Adsorptionsbedingungen: Inkubationsdauer 30 min, 4°C, IgG Fraktion unverdünnt. Zur Kontrolle diente eine Probe die nur mit CY3 ohne polyklonalen AK beschichtet wurde.

Stamm	Adsorbiertes IgG	Kontrolle
<i>Haemophilus influenzae</i> 1	-	-
<i>Haemophilus influenzae</i> 2	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 8325-4	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DB1	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CF18	-	-
	Nicht adsorbiertes IgG	
<i>Haemophilus influenzae</i> 1	-	-
<i>Haemophilus influenzae</i> 2	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 8325-4	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DB1	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CF18	-	-

Es zeigt sich, dass die Antikörper der IgG Fraktion mit keinem der getesteten Bakterienstämme eine Verbindung eingehen und somit spezifisch an *B. cepacia* binden. Das Kaninchen ③ hat auf Grund der fehlenden Bindungen zu dem nicht adsorbiertem IgG folglich auch noch keinen immunologisch wirksamen Kontakt zu den verwendeten Stämmen gehabt.

3.5 Gramfärbung von Sputum Proben zum Nachweis Gram-negativer Stäbchen

Das Ziel der Gramfärbung war es, herauszufinden, ob Sputum Proben mit einer genügend hohen Anzahl an Gram-negativen Stäbchen vorhanden sind. Eine Immunfluoreszenz mit den Sputumproben wäre sonst nicht sinnvoll, da mit der Immunfluoreszenz dann geklärt werden soll, ob *B. cepacia* mit dem polyklonalen AK in Sputumproben detektiert werden kann. Dafür wurde eine Gramfärbung der sieben aus Italien erhaltenen Proben (siehe 2.4) durchgeführt. Eindeutige Ansammlungen von Gram-negativen Stäbchen waren lediglich in Sputum Probe vier und fünf nachweisbar. Diese sind in Abb. 7 dargestellt.

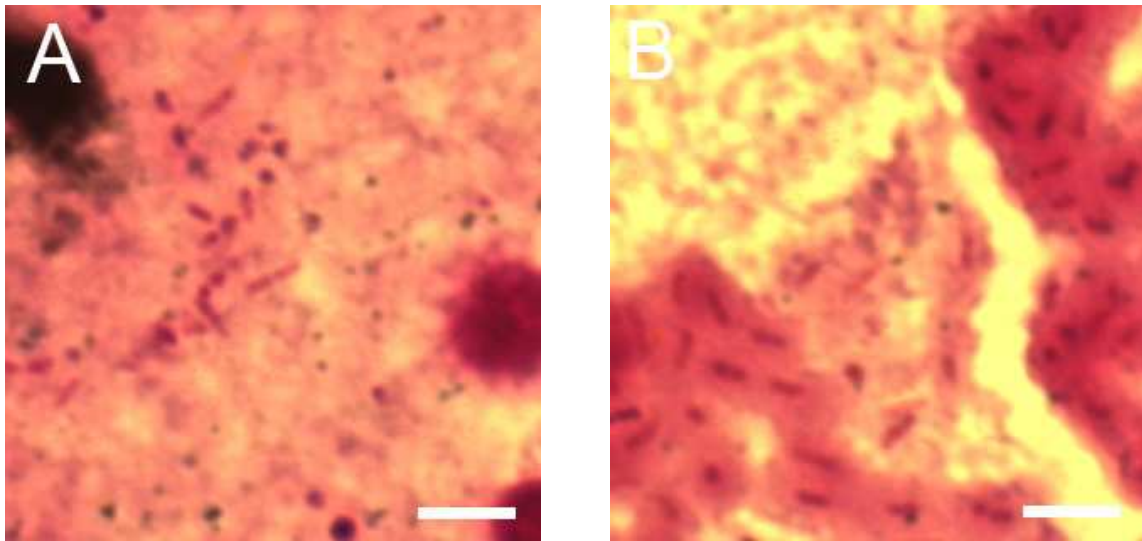


Abb. 7: Gramfärbung von Sputumproben zum Nachweis Gram-negativer Stäbchen. A: Sputumprobe 4, gramnegative Stäbchen; B: Sputum 5, gramnegative Stäbchen; Vergrößerung für A und B x1000, Balken = 10µm.

In zwei der getesteten Sputumproben fanden sich Gram-negative Stäbchen. An Hand dieser Proben kann eine Immunfluoreszenz mit dem gewonnenen polyklonalen AK durchgeführt werden. Dies soll dann zeigen, ob ein Nachweis von *B. cepacia* in Sputumproben mittels AK möglich ist.

3.6 Nachweis von *Burkholderia cepacia* mittels Immunfluoreszenz in den Sputum Proben

Die in 3.5 verwendeten Sputumproben wurden jetzt zur Immunfluoreszenz eingesetzt. Es sollte geklärt werden, ob es möglich ist mit dem gereinigten IgG einen Nachweis von *B. cepacia* in den Sputumproben zu führen. Die Detektion der Bindungen des polyklonalen AKs erfolgte wieder mit CY3 markiertem Anti-Kaninchen Antikörper. Es fanden sich dann sowohl in den Proben als auch in den ohne polyklonalem AK durchgeführten Kontrollen positive Ergebnisse nach Färbung mit dem CY3 markierten Antikörper. Dies lag wahrscheinlich an

unspezifischen Bindungen sowohl des polyklonalen AK als auch des CY3 markierten AK an Bestandteile des Sputums.

Ein Nachweis von *B. cepacia* in Patienten Sputum war somit mit dem nach Immunisation von Kaninchen mit *B. cepacia* EPS erhaltenem polyklonalem AK nicht möglich. Unspezifische Bindungen von CY3 an Sputumproben verhinderten eine Aussage.

4 Diskussion

Die Infektion mit Erregern aus der Gruppe BCC führt zu einer sehr raschen Verschlechterung der Lungenfunktion bei Patienten mit CF. Die Multiresistenz der Erreger gegenüber den meisten Antibiotika macht die Infektionen so gefährlich (11; 34; 46; 58). Alternative Therapien gegen Infektionen mit *B. cepacia* sind deshalb gefragt. Analog zu *P. aeruginosa* liegt die Entwicklung einer Vakzine gegen ein von *B. cepacia* auf der Zelloberfläche exprimiertes Exopolysaccharid nahe. Für *P. aeruginosa* gibt es eine viel versprechende Vakzine, die bereits in einer multizentrischen Phase III Studie im Einsatz war und in der Phase II Studie hohe und lang anhaltende Antikörper - Titer im Serum und Sekreten der Atemwege gezeigt hat (23; 24; 26). Im Fall von *S. aureus* gelang es einen polyklonalen Antikörper gegen ein oberflächenständiges Polysaccharid zu gewinnen. Im Weiteren war es hierdurch möglich, Mäuse mit diesem Polysaccharid zu immunisieren und sie damit vor einer Infektion zu bewahren (59; 60). In Kaninchen konnten durch ein an Diphtherie Toxin konjugiertes EPS erfolgreich ein signifikanter Antikörper - Titer erreicht werden (53). Es sollten auf Grund dessen Kaninchen mit *B. cepacia* EPS immunisiert werden, um die Möglichkeit einer aktiven Immunisierung mit diesem EPS hinsichtlich der Produktion von spezifischem IgG zu überprüfen.

Die Immunisierung der Kaninchen mit *B. cepacia* EPS erfolgte zunächst unter Verwendung von Lipopeptid Adjuvans. Dies führte zu keinem im ELISA nachweisbaren spezifischen Antikörper. Das Freundschs Adjuvans wurde in Rücksprache mit der Tierschutzkommission erst nach erfolglosem Versuch mit Lipopeptid Adjuvans verwendet, da es damit zu deutlich höheren Nebenwirkungen bei den Tieren hätte kommen können. Nach Verwendung von Freundschem Adjuvans zeigte sich dann im ELISA ein deutlicher Unterschied zwischen der Serumantikörperaffinität zu EPS von immunisierten und nicht immunisierten Tieren. Der Antikörper - Titer ist mit 100000 im Vergleich zu 1000 bei der Kontrolle signifikant höher. Dies lässt auf spezifische IgG Antikörper im

Kaninchenserum schließen, die durch die Antigene hervorgerufen wurden. Nach Immunisation mit einem von *S. aureus* stammenden EPS wurden in der Literatur ähnliche Ergebnisse beschrieben (52; 53).

Die weitere Differenzierung der Spezifität des gewonnenen polyklonalen IgG Antikörpers erfolgte durch den Dot Blot. Dabei zeigte sich eine deutliche Affinität zu dem EPS produzierenden Stamm IST 408 im Vergleich zu dem nicht EPS produzierenden IST 411. Der AK zeigte auch, analog zum Ergebnis mittels ELISA, eine Affinität zu gereinigtem EPS. Der dann ausgeführte Immunoblot sollte zwischen Bindungen des AK an EPS und Bindungen der AK an andere Oberflächenmerkmale von *B. cepacia*-Stämmen differenzieren. Dazu wurden die Proteine der *B. cepacia*-Stämme IST 408, 408N und 411 denaturiert und über die Gelelektrophorese aufgetrennt. Es ergaben sich in beiden Ansätzen sowohl für den an IST 411 adsorbierten als auch den nicht adsorbierten Antikörper deutliche Bindungen des AK an die aufgetrennten Proteine. Dies kann auf eine Kreuzreaktion der Antikörper mit von *B. cepacia* stammenden Antigenen hinweisen. Häufig ist jedoch die Verunreinigung des zur Immunisierung verwendeten EPS mit LPS (Lipopolysaccharid) die Ursache, da es technisch schwierig ist LPS von EPS zu trennen, ohne das EPS zu verändern oder zu zerstören (1).

Mit der indirekten Immunfluoreszenz sollte der Nachweis einer spezifischen Bindung des polyklonalen Antikörpers an *B. cepacia* Stämmen, die EPS produzieren, gezeigt werden. Es war für insgesamt drei der getesteten Stämme gelungen eine Affinität nachzuweisen. Stamm IST 408 und IST 401 waren EPS produzierende Stämme. Der Stamm IST 408N ist eine Mutante des Stamms 408, die kein EPS exprimiert. Die Bindung des IgG an diesen Stamm kann durch eine erneute Mutation hin zur EPS Produktion oder ein Reaktion mit oben bereits genanntem LPS erklärt werden. Die Immunfluoreszenz mit anderen bei Patienten mit CF häufig vorkommenden Erregern wurde zum Ausschluss unspezifischer Kreuzreaktionen durchgeführt. Dies schloss verschiedene Stämme von *P. aeruginosa*, *H. influenza* und *S. aureus* ein. Es konnte mit dem

polyklonalen Antikörper an keinem der getesteten Bakterienstämme eine Bindung festgestellt werden. Dies kann als weiterer Hinweis für die Spezifität des IgG für *B. cepacia* EPS gewertet werden. Offen war noch die Frage, ob das getestete IgG an EPS oder an andere Oberflächenantigene der *B. cepacia* Stämme bindet. Zur Klärung erfolgte vor Durchführung der Immunfluoreszenz die Adsorption des IgG an die *B. cepacia* Stämme IST 411 und IST 408N. Damit sollten unspezifische, an die Bakterienoberfläche bindende Antikörper eliminiert werden. Die Immunfluoreszenz unter diesen Bedingungen zeigte erneut eine Affinität des IgG zum getesteten EPS produzierenden Stamm im Vergleich zu den nicht EPS produzierenden Stämmen. Es fand sich jedoch auch wieder eine Bindung an den Stamm IST 408N.

Durch der Immunfluoreszenz mit Sputumproben sollte überprüft werden, ob *B. cepacia* direkt in Patienten Sputum mittels des polyklonalen Antiköpers nachweisbar ist. Der Nachweis gelang auf Grund positiver Kontrollen nicht. Es kam zu positiven Reaktionen mit dem CY3 markiertem AK sowohl in den Proben als auch in den negativ erwarteten Kontrollen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen daß der entwickelte polyklonale Kaninchen AK spezifisch an *B. cepacia* Stämme bindet. Eine Reaktion mit anderen Bakterienstämmen, die im Rahmen von Infektion bei Patienten mit CF vorkommen, war nicht nachweisbar. In den durchgeführten Versuchen zeigte sich die Bindung spezifisch zu EPS produzierenden *B. cepacia* Stämmen. Eine Ausnahme bildete jedoch die Mutante IST 408N, welche kein EPS exprimiert, aber in allen Versuchen konstant positiv getestet wurde. Eine mögliche Begründung dazu wurde weiter oben bereits genannt.

Sollte es möglich sein, *B. cepacia* durch einen serologischen Test im Sputum nachzuweisen, würde dies die Dauer der Diagnostik erheblich verkürzen. Somit könnte sofort eine gezielte Antibiotikatherapie begonnen werden. Bisher stellte sich die Identifikation von *B. cepacia* als sehr schwierig und aufwendig dar, da sowohl mittels herkömmlicher Tests, die auf der Verwendung von selektiven

Medien beruhen, als auch mit biochemischen Tests keine zuverlässige Diagnose zu erreichen war (8; 39; 63; 77). Die Identifikation erfordert immer eine vorhergehende Kultivierung der Erreger und somit einen Zeitverlust, bevor mit der Diagnostik begonnen werden kann. Mittlerweile ist es allerdings gelungen *B. cepacia* mittels PCR direkt, ohne vorherige Kultur in Sputumproben von Patienten mit CF nachzuweisen (27; 57). Das Selbe könnte mit dem polyklonalen AK möglich sein.

Geht man davon aus, dass *B. cepacia* EPS analog zu *S. aureus* und *P. aeruginosa* ein Virulenzfaktor ist, dann ist eine Weiterentwicklung des AK in Richtung Vakzine zur aktiven Immunisierung sinnvoll. Einen Schutz vor jedem Stamm des BCC kann nicht erreicht werden, da nicht jeder Stamm EPS produziert (siehe Tab. 1). Untersuchungen an Mäusen konnten zeigen, dass die Menge an EPS, die ein Stamm produziert, einhergeht mit der Persistenz in Lungengewebe (12). Vollkommen geklärt ist die Rolle als Virulenzfaktor jedoch noch nicht. Unterschiedliche *B. cepacia* Stämme mit verschieden ausgeprägter Formation von Biofilm führten nicht zu vorhersagbaren klinischen Verläufen bei den Patienten von welchen sie isoliert wurden (17). Neuerdings konnte allerdings festgestellt werden, dass *B. cepacia* EPS wie auch Alginat von *P. aeruginosa* vor der Phagozytose durch neutrophile Granulozyten schützt (5; 15).

Der in dieser Arbeit hergestellte polyklonale IgG Antikörper gegen *B. cepacia* EPS sowie gegen weitere noch nicht eindeutig geklärte Antigene, ist somit ein erster Schritt in Richtung der Herstellung einer Vakzine. Dies könnte dann in Form einer passiven Immunisierung mittels polyklonalem IgG oder aktiv durch eine Vakzine mit EPS erfolgen.

5 Zusammenfassung

Patienten mit CF leiden häufig an Lungeninfektionen mit Erregern, die dem *B. cepacia* Komplex zugeordnet werden. Der Krankheitsverlauf kann sehr dramatisch sein und wird als Cepacia Syndrom bezeichnet. Die eigentlich Pflanzen pathogenen, bei Patienten mit CF aber opportunistischen Erreger, zeigen eine ausgeprägte Resistenz gegenüber den vorhandenen Antibiotika. Es wurde gezeigt, dass viele BCC Stämme die Fähigkeit besitzen, ein Exopolysaccharid zu produzieren. Die Entwicklung einer Vakzine auf Basis eines EPS ist bei *S. aureus* in Tierexperimenten beziehungsweise bei *P. aeruginosa* in klinischen Studien bereits gelungen. Beides sind bei Patienten mit CF häufig vorkommende Erreger. Es wurden deshalb in dieser Arbeit Kaninchen mit dem vom BCC Stamm IST 408 gewonnenen EPS immunisiert. Das EPS kommt in gleicher Struktur bei verschiedenen BCC Stämmen vor und wurde Cepacian genannt. Bei der Immunisierung konnte gezeigt werden, dass der dabei gewonnene polyklonale IgG Antikörper spezifisch an BCC Stämme bindet. Aufgefallen ist allerdings eine Affinität des polyklonalen IgG zu einem nicht EPS produzierendem BCC Stamm und zu Zellwandproteinen anderer BCC Stämme. Eine Aufreinigung des EPS mit sicherer Elimination des LPS und erneute Durchführung einer Immunisierung mit diesem EPS könnte zur Klärung beitragen. Konstant reproduzierbar war die Bindung des IgG an den Stamm IST 408, 408N und 401 sowie an das Exopolysaccharid selbst. Weiterhin wurde untersucht, ob es zu Kreuzreaktionen mit anderen Erregern kommt, die bei CF-Patienten häufig sind. Es konnten dabei keine Kreuzreaktionen zu *S. aureus*, *P. aeruginosa* und *H. influenzae* festgestellt werden. Es ist also gelungen einen spezifischen polyklonalen Antikörper gegen Stämme des BCC zu entwickeln. Ob die Spezifität ausschließlich auf der Affinität zu EPS beruht oder doch auf eine Verunreinigung des EPS mit LPS, lässt sich abschließend nicht beurteilen.

6 Abkürzungen

°C	Temperatur in Grad Celsius
µl	Mikroliter
AK	Antikörper
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
<i>B. cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	Cyklisches Adenosin Monophosphat
CF	cystische Fibrose
CFTR	cystic fibrosis transmembrane regulator
cm	Zentimeter
CY3	Carbo Cyanin 3 konjugierter Ziege-Antikörper gegen Kaninchen IgG
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung von DANN
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
EPS	Exopolysaccharid
G	Gauge, Maßeinheit für den Außendurchmesser von Kanülen
Glc.	Glucose
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
IgG	Immunglobulin Typ G
IST	Instituto Superior Técnico, Lissabon
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
min	Minuten
ml	Milliliter

OPD	o-Phenyldiamindihydrochlorid
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	potentia Hydrogenii, Maß für die Stärke der sauren bzw. basischen Wirkung einer wässrigen Lösung
PLC	Phospholipase C
rpm	Rounds per minute; Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	Tetramethylethyldiamin (Polymerisations"katalysator")
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

7 Literaturverzeichnis

- (1) **Adam, O., Vercellone, A., Paul, F., Monsan, P. F., and Puzo, G.** (1995), A nondegradative route for the removal of endotoxin from exopolysaccharides, *Anal. Biochem.* 225: 321 - 327
- (2) **Armstrong, D. S., Grimwood, K., Carlin, J. B., Carzino, R., Gutierrez, J. P., Hull, J., Olinsky, A., Phelan, E. M., Robertson, C. F., and Phelan, P. D.** (1997), Lower airway inflammation in infants and young children with cystic fibrosis, *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 156: 1197 - 1204
- (3) **Burkholder, W. H.** (1950), Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs, *Phytopathology.* 40: 115 - 117
- (4) **Butler, S. L., Doherty, C. J., Hughes, J. E., Nelson, J. W., and Govan, J. R.** (1995), *Burkholderia cepacia* and cystic fibrosis: do natural environments present a potential hazard, *J. Clin. Microbiol.* 33: 1001 - 1004
- (5) **Bylund, J., Burgess, L. A., Cescutti, P., Ernst, R. K., and Speert, D. P.** (2006), Exopolysaccharides from *Burkholderia cenocepacia* inhibit neutrophil chemotaxis and scavenge reactive oxygen species, *J. Biol. Chem.* 281: 2526 - 2532
- (6) **Campana, S., Taccetti, G., Ravenni, N., Favari, F., Cariani, L., Sciacca, A., Savoia, D., Collura, A., Fiscarelli, E., De Intinis, G., Busetti, M., Cipolloni, A., d'Aprile, A., Provenzano, E., Collebrusco, I., Frontini, P., Stassi, G., Trancassini, M., Tovagliari, D., Lavitola, A., Doherty, C. J., Coenye, T., Govan, J. R., and Vandamme, P.** (2005), Transmission of *Burkholderia cepacia* complex: evidence for new epidemic clones infecting cystic fibrosis patients in Italy, *J. Clin. Microbiol.* 43: 5136 - 5142

- (7) **Carson, L. A., Favero, M. S., Bond, W. W., and Petersen, N. J.** (1973), Morphological, biochemical, and growth characteristics of *Pseudomonas cepacia* from distilled water, *Appl. Microbiol.* 25: 476 - 483

- (8) **Carson, L. A., Tablan, O. C., Cusick, L. B., Jarvis, W. R., Favero, M. S., and Bland, L. A.** (1988), Comparative evaluation of selective media for isolation of *Pseudomonas cepacia* from cystic fibrosis patients and environmental sources, *J. Clin. Microbiol.* 26: 2096 - 2100

- (9) **Cerantola, S., Bounery, J., Segonds, C., Marty, N., and Montrozier, H.** (2000), Exopolysaccharide production by mucoid and non-mucoid strains of *Burkholderia cepacia*, *FEMS Microbiol. Lett.* 185: 243 - 246

- (10) **Cescutti, P., Bosco, M., Picotti, F., Impallomeni, G., Leitao, J. H., Richau, J. A., and Sa-Correia, I.** (2000), Structural study of the exopolysaccharide produced by a clinical isolate of *Burkholderia cepacia*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273: 1088 - 1094

- (11) **Chernish, R. N. and Aaron, S. D.** (2003), Approach to resistant gram-negative bacterial pulmonary infections in patients with cystic fibrosis, *Curr. Opin. Pulm. Med.* 9: 509 - 515

- (12) **Chung, J. W., Altman, E., Beveridge, T. J., and Speert, D. P.** (2003), Colonial morphology of *Burkholderia cepacia* complex genomovar III: implications in exopolysaccharide production, pilus expression, and persistence in the mouse, *Infect. Immun.* 71: 904 - 909

- (13) **Coenye, T., LiPuma, J. J., Henry, D., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Gillis, M., Speert, D. P., and Vandamme, P.** (2001), *Burkholderia cepacia* genomovar VI, a new member of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from cystic fibrosis patients, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 271 - 279

- (14) **Coenye, T., Vandamme, P., Govan, J. R., and LiPuma, J. J.** (2001), Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex, *J. Clin. Microbiol.* 39: 3427 - 3436
- (15) **Conway, B. A., Chu, K. K., Bylund, J., Altman, E., and Speert, D. P.** (2004), Production of exopolysaccharide by *Burkholderia cenocepacia* results in altered cell-surface interactions and altered bacterial clearance in mice, *J Infect. Dis.* 190: 957 - 966
- (16) **Cunha, M. V., Leitao, J. H., Mahenthiralingam, E., Vandamme, P., Lito, L., Barreto, C., Salgado, M. J., and Sa-Correia, I.** (2003), Molecular analysis of *Burkholderia cepacia* complex isolates from a Portuguese cystic fibrosis center: a 7-year study, *J. Clin. Microbiol.* 41: 4113 - 4120
- (17) **Cunha, M. V., Sousa, S. A., Leitao, J. H., Moreira, L. M., Videira, P. A., and Sa-Correia, I.** (2004), Studies on the involvement of the exopolysaccharide produced by cystic fibrosis-associated isolates of the *Burkholderia cepacia* complex in biofilm formation and in persistence of respiratory infections, *J Clin. Microbiol.* 42: 3052 - 3058
- (18) **Cunha, M. V., Sousa, S. A., Leitao, J. H., Moreira, L. M., Videira, P. A., and Sa-Correia, I.** (2004), Studies on the involvement of the exopolysaccharide produced by cystic fibrosis-associated isolates of the *Burkholderia cepacia* complex in biofilm formation and in persistence of respiratory infections, *J. Clin. Microbiol.* 42: 3052 - 3058
- (19) **Cystic Fibrosis Foundation**, Patient Registry 2004 Annual Report, Bethesda, Maryland.
- (20) **Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium**, Cystic fibrosis mutation database, <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html>, 8-9-2006

- (21) **Darling, P., Chan, M., Cox, A. D., and Sokol, P. A.** (1998), Siderophore production by cystic fibrosis isolates of *Burkholderia cepacia*, *Infect. Immun.* 66: 874 - 877
- (22) **Daubaras, D. L., Danganan, C. E., Hubner, A., Ye, R. W., Hendrickson, W., and Chakrabarty, A. M.** (1996), Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by *Burkholderia cepacia* strain AC1100: evolutionary insight, *Gene.* 179: 1 - 8
- (23) **Döring, G., Meisner, C., and Stern, M.** (2007), A double-blind randomized placebo-controlled phase III study of a *Pseudomonas aeruginosa* flagella vaccine in cystic fibrosis patients, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 11020 - 11025
- (24) **Döring, G. and Dorner, F.** (1997), A multicenter vaccine trial using the *Pseudomonas aeruginosa* flagella vaccine IMMUNO in patients with cystic fibrosis, *Behring Inst. Mitt.:* 338 - 344
- (25) **Döring, G., Jansen, S., Noll, H., Grupp, H., Frank, F., Botzenhart, K., Magdorf, K., and Wahn, U.** (1996), Distribution and transmission of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in a hospital ward, *Pediatr. Pulmonol.* 21: 90 - 100
- (26) **Döring, G., Pfeiffer, C., Weber, U., Mohr-Pennert, A., and Dorner, F.** (1995), Parenteral application of a *Pseudomonas aeruginosa* flagella vaccine elicits specific anti-flagella antibodies in the airways of healthy individuals, *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 151: 983 - 985
- (27) **Drevinek, Pavel, Hrbáková, Hana, Cínek, Ondřej, Bartošová, Jana, Nyc, Otakar, Nemeč, Alexandr, and Pohunek, Petr** (2002), Direct PCR Detection of *Burkholderia cepacia* Complex and Identification of Its Genomovars by Using Sputum as Source of DNA, *Journal of Clinical Microbiology.* 40: 3485 - 3488

- (28) **Drumm, M. L., Pope, H. A., Cliff, W. H., Rommens, J. M., Marvin, S. A., Tsui, L. C., Collins, F. S., Frizzell, R. A., and Wilson, J. M.** (1990), Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus-mediated gene transfer, *Cell*. 62: 1227 - 1233
- (29) **Eichler, I., Speer, C. P., Gahr, M.**, 1. Auflage 2001, Pädiatrie, Springer-Verlag, Seite 558 - 565
- (30) **Geftic, S. G., Heymann, H., and Adair, F. W.** (1979), Fourteen-year survival of *Pseudomonas cepacia* in a salt solution preserved with benzalkonium chloride, *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 505 - 510
- (31) **Gessner, A. R. and Mortensen, J. E.** (1990), Pathogenic factors of *Pseudomonas cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis, *J. Med. Microbiol.* 33: 115 - 120
- (32) **Gibson, R. L., Burns, J. L., and Ramsey, B. W.** (2003), Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis, *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 168: 918 - 951
- (33) **Gilligan, P. H.** (1991), Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis, *Clin. Microbiol. Rev.* 4: 35 - 51
- (34) **Golini, G., Cazzola, G., and Fontana, R.** (2006), Molecular epidemiology and antibiotic susceptibility of *Burkholderia cepacia*-complex isolates from an Italian cystic fibrosis centre, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 25: 175 - 180
- (35) **Govan, J. R., Brown, P. H., Maddison, J., Doherty, C. J., Nelson, J. W., Dodd, M., Greening, A. P., and Webb, A. K.** (1993), Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis, *Lancet*. 342: 15 - 19

- (36) **Govan, J. R. and Deretic, V.** (1996), Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*, *Microbiol. Rev.* 60: 539 - 574
- (37) **Govan, J. R., Hughes, J. E., and Vandamme, P.** (1996), *Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues, *J. Med. Microbiol.* 45: 395 - 407
- (38) **Govan, J. R. and Vandamme, P.** (1998), Agricultural and medical microbiology: a time for bridging gaps, *Microbiology.* 144 (Pt 9): 2373 - 2375
- (39) **Henry, D. A., Campbell, M. E., LiPuma, J. J., and Speert, D. P.** (1997), Identification of *Burkholderia cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis and use of a simple new selective medium, *J. Clin. Microbiol.* 35: 614 - 619
- (40) **Hirte, W.** (1970), [Studies of the reciprocal effect between soil reaction and microorganisms. 1. The change in the soil reaction by the microflora of the soil], *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg.* 125: 458 - 470
- (41) **Holmes, A., Govan, J., and Goldstein, R.** (1998), Agricultural use of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*: a threat to human health?, *Emerg. Infect. Dis.* 4: 221 - 227
- (42) **Humphreys, H., Peckham, D., Patel, P., and Knox, A.** (1994), Airborne dissemination of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* from adult patients with cystic fibrosis, *Thorax.* 49: 1157 - 1159
- (43) **Isles, A., Maclusky, I., Corey, M., Gold, R., Prober, C., Fleming, P., and Levison, H.** (1984), *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem, *J. Pediatr.* 104: 206 - 210

- (44) **Kerem, B., Rommens, J. M., Buchanan, J. A., Markiewicz, D., Cox, T. K., Chakravarti, A., Buchwald, M., and Tsui, L. C.** (1989), Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis, *Science*. 245: 1073 - 1080
- (45) **Khan, T. Z., Wagener, J. S., Bost, T., Martinez, J., Accurso, F. J., and Riches, D. W.** (1995), Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis, *Am. J. Respir. Crit Care Med*. 151: 1075 - 1082
- (46) **Lambiase, A., Raia, V., Del Pezzo, M., Sepe, A., Carnovale, V., and Rossano, F.** (2006), Microbiology of airway disease in a cohort of patients with cystic fibrosis, *BMC. Infect. Dis*. 6: 4
- (47) **Lang, A. B., Schaad, U. B., Rudeberg, A., Wedgwood, J., Que, J. U., Furer, E., and Cryz, S. J., Jr.** (1995), Effect of high-affinity anti-*Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide antibodies induced by immunization on the rate of *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis, *J. Pediatr*. 127: 711 - 717
- (48) **Ledson, M. J., Gallagher, M. J., Corkill, J. E., Hart, C. A., and Walshaw, M. J.** (1998), Cross infection between cystic fibrosis patients colonised with *Burkholderia cepacia*, *Thorax*. 53: 432 - 436
- (49) **LiPuma, J. J.** (2005), Update on the *Burkholderia cepacia* complex, *Curr. Opin. Pulm. Med*. 11: 528 - 533
- (50) **LiPuma, J. J., Spilker, T., Gill, L. H., Campbell, P. W., III, Liu, L., and Mahenthalingam, E.** (2001), Disproportionate distribution of *Burkholderia cepacia* complex species and transmissibility markers in cystic fibrosis, *Am. J. Respir. Crit Care Med*. 164: 92 - 96
- (51) **Mahenthalingam, E., Coenye, T., Chung, J. W., Speert, D. P., Govan, J. R., Taylor, P., and Vandamme, P.** (2000), Diagnostically and

- experimentally useful panel of strains from the *Burkholderia cepacia* complex, *J Clin. Microbiol.* 38: 910 - 913
- (52) **Maira-Litran, T., Kropec, A., Abeygunawardana, C., Joyce, J., Mark, G., III, Goldmann, D. A., and Pier, G. B.** (2002), Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide, *Infect. Immun.* 70: 4433 - 4440
- (53) **Maira-Litran, Tomas, Kropec, Andrea, Goldmann, Donald A., and Pier, Gerald B.** (2005), Comparative Opsonic and Protective Activities of *Staphylococcus aureus* Conjugate Vaccines Containing Native or Deacetylated Staphylococcal Poly-N-Acetyl- β -(1-6)-Glucosamine, *Infection and Immunity.* 73: 6752 - 6762
- (54) **Malfroot, A., Adam, G., Ciofu, O., Doring, G., Knoop, C., Lang, A. B., Van Damme, P., Dab, I., and Bush, A.** (2005), Immunisation in the current management of cystic fibrosis patients, *J. Cyst. Fibros.* 4: 77 - 87
- (55) **Manno, Graziana, Dalmastrì, Claudia, Tabacchioni, Silvia, Vandamme, Peter, Lorini, Renata, Minicucci, Laura, Romano, Luca, Giannattasio, Alessandro, Chiarini, Luigi, and Bevivino, Annamaria** (2004), Epidemiology and Clinical Course of *Burkholderia cepacia* Complex Infections, Particularly Those Caused by Different *Burkholderia cenocepacia* Strains, among Patients Attending an Italian Cystic Fibrosis Center, *Journal of Clinical Microbiology.* 42: 1491 - 1497
- (56) **Martin, D. W. and Mohr, C. D.** (2000), Invasion and intracellular survival of *Burkholderia cepacia*, *Infect. Immun.* 68: 24 - 29
- (57) **McDowell, A., Mahenthiralingam, E., Moore, J. E., Dunbar, K. E., Webb, A. K., Dodd, M. E., Martin, S. L., Millar, B. C., Scott, C. J., Crowe, M., and Elborn, J. S.** (2001), PCR-based detection and

- identification of *Burkholderia cepacia* complex pathogens in sputum from cystic fibrosis patients, *J. Clin. Microbiol.* 39: 4247 - 4255
- (58) **McGowan, J. E., Jr.** (2006), Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum, *Am. J. Infect. Control.* 34: S29 - S37
- (59) **McKenney, D., Pouliot, K., Wang, Y., Murthy, V., Ulrich, M., Doring, G., Lee, J. C., Goldmann, D. A., and Pier, G. B.** (2000), Vaccine potential of poly-1-6 beta-D-N-succinylglucosamine, an immunoprotective surface polysaccharide of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, *J. Biotechnol.* 83: 37 - 44
- (60) **McKenney, D., Pouliot, K. L., Wang, Y., Murthy, V., Ulrich, M., Doring, G., Lee, J. C., Goldmann, D. A., and Pier, G. B.** (1999), Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo-expressed antigen, *Science.* 284: 1523 - 1527
- (61) **McKevitt, A. I., Bajaksouzian, S., Klinger, J. D., and Woods, D. E.** (1989), Purification and characterization of an extracellular protease from *Pseudomonas cepacia*, *Infect. Immun.* 57: 771 - 778
- (62) **McManus, T. E., McDowell, A., Moore, J. E., and Elborn, S. J.** (2004), Organisms isolated from adults with cystic fibrosis, *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 3: 26
- (63) **McMenamin, J. D., Zacccone, T. M., Coenye, T., Vandamme, P., and LiPuma, J. J.** (2000), Misidentification of *Burkholderia cepacia* in US cystic fibrosis treatment centers: an analysis of 1,051 recent sputum isolates, *Chest.* 117: 1661 - 1665
- (64) **Melnikov, A., Zaborina, O., Dhiman, N., Prabhakar, B. S., Chakrabarty, A. M., and Hendrickson, W.** (2000), Clinical and

- environmental isolates of *Burkholderia cepacia* exhibit differential cytotoxicity towards macrophages and mast cells, *Mol. Microbiol.* 36: 1481 - 1493
- (65) **Mortensen, J. E., Fisher, M. C., and LiPuma, J. J.** (1995), Recovery of *Pseudomonas cepacia* and other *Pseudomonas* species from the environment, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 16: 30 - 32
- (66) **Nelson, J. W., Butler, S. L., Krieg, D., and Govan, J. R.** (1994), Virulence factors of *Burkholderia cepacia*, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 8: 89 - 97
- (67) **Park, J. L., Coenye, T.,** *Burkholderia cepacia* Friend or Foe?, <http://www.apsnet.org/education/feature/BurkholderiaCepacia/top.html>, 29-9-2000
- (68) **Pitt, T. L., Kaufmann, M. E., Patel, P. S., Benge, L. C., Gaskin, S., and Livermore, D. M.** (1996), Type characterisation and antibiotic susceptibility of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis in the United Kingdom and the Republic of Ireland, *J. Med. Microbiol.* 44: 203 - 210
- (69) **Ratjen, F. and Doring, G.** (2003), Cystic fibrosis, *Lancet.* 361: 681 - 689
- (70) **Richau, J. A., Leitao, J. H., Correia, M., Lito, L., Salgado, M. J., Barreto, C., Cescutti, P., and Sa-Correia, I.** (2000), Molecular typing and exopolysaccharide biosynthesis of *Burkholderia cepacia* isolates from a Portuguese cystic fibrosis center, *J. Clin. Microbiol.* 38: 1651 - 1655
- (71) **Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J. L., and .**

- (1989), Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA, *Science*. 245: 1066 - 1073
- (72) **Rogers, G. B., Carroll, M. P., Serisier, D. J., Hockey, P. M., Kehagia, V., Jones, G. R., and Bruce, K. D.** (2005), Bacterial activity in cystic fibrosis lung infections, *Respir. Res.* 6: 49
- (73) **Rommens, J. M., Iannuzzi, M. C., Kerem, B., Drumm, M. L., Melmer, G., Dean, M., Rozmahel, R., Cole, J. L., Kennedy, D., Hidaka, N., and .** (1989), Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping, *Science*. 245: 1059 - 1065
- (74) **Saiman, L., Cacalano, G., and Prince, A.** (1990), *Pseudomonas cepacia* adherence to respiratory epithelial cells is enhanced by *Pseudomonas aeruginosa*, *Infect. Immun.* 58: 2578 - 2584
- (75) **Sajjan, U. S., Corey, M., Karmali, M. A., and Forstner, J. F.** (1992), Binding of *Pseudomonas cepacia* to normal human intestinal mucin and respiratory mucin from patients with cystic fibrosis, *J. Clin. Invest.* 89: 648 - 656
- (76) **Sajjan, U. S., Yang, J. H., Hershenson, M. B., and LiPuma, J. J.** (2006), Intracellular trafficking and replication of *Burkholderia cenocepacia* in human cystic fibrosis airway epithelial cells, *Cell Microbiol.* 8: 1456 - 1466
- (77) **Shelly, D. B., Spilker, T., Gracely, E. J., Coenye, T., Vandamme, P., and LiPuma, J. J.** (2000), Utility of commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* complex from cystic fibrosis sputum culture, *J. Clin. Microbiol.* 38: 3112 - 3115
- (78) **Siddiqui, A. H., Mulligan, M. E., Mahenthiralingam, E., Hebden, J., Brewrink, J., Qaiyumi, S., Johnson, J. A., and LiPuma, J. J.** (2001),

- An episodic outbreak of genetically related *Burkholderia cepacia* among non-cystic fibrosis patients at a university hospital, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 22: 419 - 422
- (79) **Sist, P., Cescutti, P., Skerlavaj, S., Urbani, R., Leitao, J. H., Sa-Correia, I., and Rizzo, R.** (2003), Macromolecular and solution properties of Cepacian: the exopolysaccharide produced by a strain of *Burkholderia cepacia* isolated from a cystic fibrosis patient, *Carbohydr. Res.* 338: 1861 - 1867
- (80) **Smith, D. L., Gumery, L. B., Smith, E. G., Stableforth, D. E., Kaufmann, M. E., and Pitt, T. L.** (1993), Epidemic of *Pseudomonas cepacia* in an adult cystic fibrosis unit: evidence of person-to-person transmission, *J. Clin. Microbiol.* 31: 3017 - 3022
- (81) **Sun, L., Jiang, R. Z., Steinbach, S., Holmes, A., Campanelli, C., Forstner, J., Sajjan, U., Tan, Y., Riley, M., and Goldstein, R.** (1995), The emergence of a highly transmissible lineage of *cbl+* *Pseudomonas* (*Burkholderia*) *cepacia* causing CF centre epidemics in North America and Britain, *Nat. Med.* 1: 661 - 666
- (82) **Thomassen, M. J., Demko, C. A., Klinger, J. D., and Stern, R. C.** (1985), *Pseudomonas cepacia* colonization among patients with cystic fibrosis. A new opportunist, *Am. Rev. Respir. Dis.* 131: 791 - 796
- (83) **Vandamme, P., Henry, D., Coenye, T., Nzula, S., Vancanneyt, M., LiPuma, J. J., Speert, D. P., Govan, J. R., and Mahenthiralingam, E.** (2002), *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 33: 143 - 149

- (84) **Vandamme, P., Holmes, B., Coenye, T., Goris, J., Mahenthiralingam, E., LiPuma, J. J., and Govan, J. R.** (2003), *Burkholderia cenocepacia* sp. nov.--a new twist to an old story, *Res. Microbiol.* 154: 91 - 96
- (85) **Vasil, M. L., Chamberlain, C., and Grant, C. C.** (1986), Molecular studies of *Pseudomonas* exotoxin A gene, *Infect. Immun.* 52: 538 - 548
- (86) **Vasil, M. L., Krieg, D. P., Kuhns, J. S., Ogle, J. W., Shortridge, V. D., Ostroff, R. M., and Vasil, A. I.** (1990), Molecular analysis of hemolytic and phospholipase C activities of *Pseudomonas cepacia*, *Infect. Immun.* 58: 4020 - 4029
- (87) **Vermis, Karen, Coenye, Tom, LiPuma, John J., Mahenthiralingam, Eshwar, Nelis, Hans J., and Vandamme, Peter** (2004), Proposal to accommodate *Burkholderia cepacia* genomovar VI as *Burkholderia dolosa* sp. nov, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 54: 689 - 691
- (88) **Zhang, L. and Xie, G.** (2007), Diversity and distribution of *Burkholderia cepacia* complex in the rhizosphere of rice and maize, *FEMS Microbiol Lett.* 266: 231 - 235

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Döring für die Überlassung des Themas, den immer konstruktiven Dialog und geduldiges Korrekturlesen.

Weiterhin möchte ich Dr. Martina Ulrich danken für die intensive Betreuung des experimentellen Teils im Labor.

Ein besonderer Dank gilt auch Maria Haug für die immer freundliche, geduldige und ausdauernde Hilfe im Labor.

9 Lebenslauf

- Persönliche Daten:** Christopher Hartwig
geboren am 09.02.1976 in Schwäbisch Gmünd
ledig
- Schulbildung:** 1982-1986: Silcherschule Eislingen/Fils
1986-1995: Erich-Kästner-Gymnasium Eislingen/Fils
- Zivildienst:** 1995-1996: Rettungssanitäter beim Deutschen Roten Kreuz
in Göppingen
- Studium:** 1997: Studium der Medizin in Tübingen
1999: Physikum in Tübingen
2000: 1. Staatsexamen in Tübingen
2002: 2. Staatsexamen in Tübingen
19.11.2003: 3. Staatsexamen in Friedrichshafen
Gesamtnote gut