

***In vitro* Untersuchungen zur Wirkung von  
Stickstoffmonoxidgas auf cystische Fibrose assoziierte  
Bakterien und deren Biofilme**

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

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

**vorgelegt von  
Kellert, Johannes**

**2016**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichtersteller: Professor Dr. I. B. Autenrieth

2. Berichtersteller: Professor Dr. R. Handgretinger

## Abkürzungen

h	Stunde(n)
min	Minute(n)
s	Sekunde(n)
g	Gramm
M	molare Masse (g/mol)
mg	Milligramm
l	Liter
ml	Milliliter
µl	Microliter
CF	cystische Fibrose
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
CFU	koloniebildende Einheiten
gNO	Englisch: gaseous NO; Deutsch: Stickstoffmonoxidgasgemisch
OD	optische Dichte
ppm	parts per million
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
n.d.	nicht detektiert
O <sub>2</sub>	Sauerstoff

## **Inhalt**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
<b>1.1</b>	<b>Cystische Fibrose</b>	<b>4</b>
1.1.1	Definition und Epidemiologie	4
1.1.2	Chronische Lungeninfektionen und Erregerspektrum	5
1.1.3	Biofilm	8
1.1.4	Therapiemöglichkeiten der Lungeninfektionen	11
<b>1.2</b>	<b>Stickstoffmonoxid</b>	<b>14</b>
1.2.1	Grundlagen	14
1.2.2	Effekt von Stickstoffmonoxid auf Mikroorganismen	15
1.2.3	Stickstoffmonoxid als therapeutischer Wirkstoff	17
<b>1.3</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>Geräte und Materialien</b>	<b>20</b>
<b>2.2</b>	<b>Reagenzien und Chemikalien</b>	<b>20</b>
<b>2.3</b>	<b>Medien und Stammlösungen</b>	<b>21</b>
<b>2.4</b>	<b>Bakterienstämme</b>	<b>22</b>
<b>2.5</b>	<b>Anzucht der Bakterien</b>	<b>23</b>
<b>2.6</b>	<b>Fermentersversuche</b>	<b>23</b>
2.6.1	Aufbau des Fermentersystems	23
2.6.2	Vorbereitungen der Bakterien	24
2.6.3	Vorbereitung der Fermenter	25
2.6.4	Durchführung	26
<b>2.7</b>	<b>Biofilmversuche</b>	<b>27</b>
2.7.1	Anzucht des Biofilms	27
2.7.2	Aufbau und Durchführung der Versuche	28
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>gNO-Exposition von planktonischen Bakterien in einem Fermentersystem</b>	<b>31</b>

3.1.1 Etablierung des Versuchsaufbaus .....	31
3.1.2 Versuche mit planktonischen CF-assoziierten Bakterienstämmen .....	36
<b>3.2 gNO-Expositionsversuche mit Bakterien in Biofilmen .....</b>	<b>41</b>
3.2.1 Etablierung des Versuchsaufbaus .....	41
3.2.2 Anwendung von gNO auf Biofilme CF assoziierter Erreger .....	44
3.2.3 Intermittierende Begasungstechnik mit gNO.....	45
<b>4    DISKUSSION .....</b>	<b>47</b>
<b>4.1 gNO wirkt auf CF-assoziierte planktonische Bakterien toxisch .....</b>	<b>47</b>
<b>4.2 Der durch Nitritbildung fallende pH hat großen Einfluss auf die Verfügbarkeit von NO im Flüssigmedium .....</b>	<b>49</b>
<b>4.3 CF-assoziierte Bakterien in Biofilmen können durch 200 ppm gNO abgetötet werden .....</b>	<b>50</b>
<b>4.4 Möglichkeiten der Integrierung von gNO in die CF Therapie.....</b>	<b>52</b>
<b>4.5 Unterschiedliche Toleranz der getesteten Bakterienspezies.....</b>	<b>53</b>
<b>5    ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>55</b>
<b>6    LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>56</b>
<b>Erklärung zum Eigenanteil .....</b>	<b>65</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>66</b>
<b>Curriculum vitae .....</b>	<b>67</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Cystische Fibrose

### 1.1.1 Definition und Epidemiologie

Cystische Fibrose (CF, Mukoviszidose) ist die häufigste zum Tode führende autosomal rezessive Erberkrankung in der kaukasischen Bevölkerung mit einer Inzidenz von 1:2500 Lebendgeburten (Ratjen and Doring 2003, Lindemann H 2004). Entsprechend dem Vererbungsmuster tritt die Erkrankung nur bei Homozygotie des betroffenen Allels auf, wobei jeder 20. Kaukasier heterozygot ist (Hauber HP 2001). Die mittlere Lebenserwartung beträgt derzeit 41,1 Jahre. Aufgrund des medizinischen und wissenschaftlichen Fortschritts liegt sie damit um etwa 10 Jahre höher als 2002 (Cystic\_Fibrosis\_Foundation 2012). Das breite Symptomspektrum der Erkrankung wird durch eine Mutation auf Chromosom 7 (7q31.2) verursacht. Dieses Gen besteht aus 230 Kilobasenpaaren und codiert für den Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) (Kerem et al. 1989, Rommens et al. 1989, Lindemann H 2004). Insgesamt sind derzeit über 1900 verschiedene Genmutationen dieses Proteins bekannt, wobei die häufigste zu einer Deletion von Phenylalanin an der Position 508 (F508del) führt (Morral et al. 1994, Cystic\_Fibrosis\_Genetic\_Analysis\_Consortium 2013). CFTR ist ein von Adenosintriphosphat abhängiges Membranprotein in der apikalen Zellmembran von Epithelzellen und reguliert dort den Wasser und Elektrolyttransport (Riordan et al. 1989, Ratjen and Doring 2003). Das CFTR-Protein hat die Fähigkeit, Chloridionen in das Organlumen zu pumpen, woraufhin Wassermoleküle passiv folgen. Somit sorgt CFTR für eine physiologische Viskosität des Organsekrets. Die CFTR-mutierte Epithelzelle ist jedoch nicht mehr fähig, eine adäquate Menge Chlorid in das Lumen zu sezernieren. Weiterhin besteht dadurch eine abnorme Natriumresorption aus dem Lumen über den epithelialen Natriumtransporter (ENaC), der in Epithelzellen durch CFTR reguliert wird (Abb. 1b). Passiv, zur Kompensation der dadurch bedingten Hypotonie des Sekrets, folgt Wasser aus dem Lumen nach intrazellulär, woraus eine Viskositätssteigerung des intraluminalen Organsekrets resultiert (Ratjen and Doring 2003, Lindemann H 2004).

Dieser Pathomechanismus führt bei verschiedenen Organmanifestationen der Erkrankung zu unterschiedlichen Symptomen.

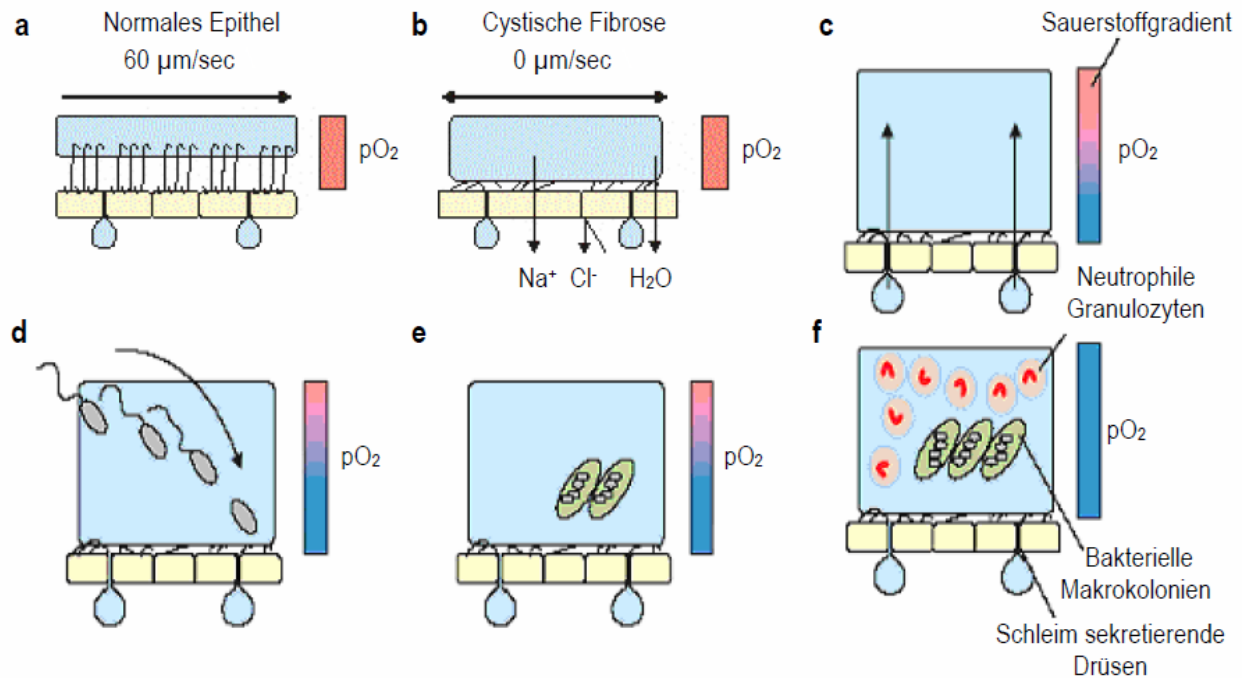
Im Pankreas der CF-Patienten hat das Sekret einen zu geringen Wasser- und Bikarbonatgehalt und verstopft wegen seiner hohen Viskosität die Ausführungsgänge. Durch die fehlenden Pankreasenzyme und den unphysiologischen pH im Darmlumen kommt es zu einem Malabsorptionssyndrom. Der unvollständige Lipidverdau durch die fehlende Pankreaslipase äußert sich bei den Patienten in Form von Fettstühlen. Eine frühzeitige Aktivierung der Pankreasenzyme im Ganglumen führt weiterhin zu Pankreatitiden und einer exokrinen Pankreasinsuffizienz. Der nachfolgende fibrotische Umbau kann auch die endokrinen Funktionen des Pankreas beeinträchtigen und zu einer Störung des Glukosestoffwechsels führen (Lewis et al. 2003). Der CFTR-Defekt geht weiterhin zu 95% mit einer verfrühten Obliteration der vasa deferentia einher, was zur Infertilität des männlichen Patienten führt (Kaplan et al. 1968, Ratjen and Doring 2003, Lindemann H 2004). Auch heterozygote Träger des CFTR-Defekts können hiervon betroffen sein (Chillon et al. 1995).

Die pulmonale Manifestation hat jedoch den größten Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung und macht mit ca. 80-95% den größten Anteil der Mortalität bei CF in Form von Ateminsuffizienz und bakteriellen Infektionen aus (Lyczak et al. 2002).

### **1.1.2 Chronische Lungeninfektionen und Erregerspektrum**

In der Lunge führt der hypervisköse Mukus zu einer Behinderung der sogenannten „mukoziliären Clearance“: Unter physiologischen Bedingungen wird eine dünnflüssige Schleimschicht auf dem Bronchialepithel gebildet, durch die Zilien des Epithels nach oral transportiert und abgehustet. So schützt sich der Körper vor Mikropartikeln und Erregern, die durch den Atemprozess in Kontakt mit der Schleimhaut des Respirationstraktes kommen. Das Lungensekret der Patienten mit homozygoter CFTR-Mutation ist jedoch zu zähflüssig, um durch den Zilientransport nach oral zu gelangen. Das Epithel reagiert daraufhin mit einer gesteigerten Produktion des mukösen Schleims. Die dadurch

entstehenden Schleimmassen im Bronchotracheallumen führen zu Obstruktion und bilden einen mikroaerophilen bis anaeroben Nährboden für verschiedene Erreger (Abb. 1) (Worlitzsch et al. 2002). Dies führt aufgrund von chronischen Lungeninfektionen, einer progredienten respiratorischen Insuffizienz und pulmonaler Hypertonie zum Tod der Patienten (Lewis et al. 2003).



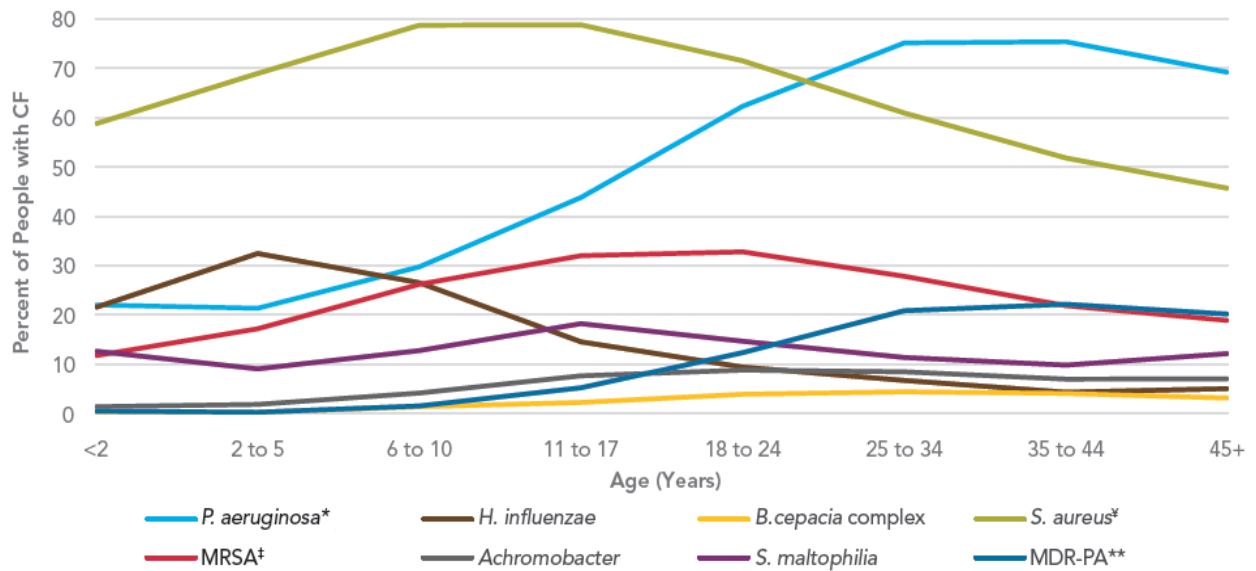
### Abbildung 1 Pathogenese der chronischen Lungeninfektion in CF-Luftwegen.

In gesunden Individuen wird der dünnflüssige Mukus (hellblau) vom Zilienschlag des respiratorischen Zylinderepithels (gelb) abtransportiert (a). Ein Normaler  $O_2$ -Verbrauch des Epithels bildet hier keinen  $O_2$  Gradienten (roter Balken) über dem Lungenoberflächenfilm. Im CF-Oberflächenepithel hingegen, sorgt die drastische Volumenminderung für den Verlust des periziliären Flüssigkeitsfilms. Der Mukus wird wandadhärent zur Epitheloberfläche und kann nicht mehr abtransportiert werden (b). Die kontinuierliche Hypersekretion führt zu einer Ansammlung an intraluminalen Sekret. Der erhöhte Sauerstoffverbrauch des CF-Epithels generiert einen wachsenden  $O_2$ -Gradienten (zunehmend blau werdender Balken) in der Mukusschicht (c). In dieser Grafik penetriert exemplarisch *Pseudomonas aeruginosa* in die hypoxische Mukusschicht (d). Die Bakterien reagieren auf die hypoxischen Umweltbedingungen mit Alginateproduktion und Bildung von Biofilmkolonien und sind dadurch vermutlich besser adaptiert (e). Anschließend infiltrieren neutrophile Granulozyten und führen bei der Interaktion mit den intraluminalen Erregern zu chronischen Lungenentzündungen (f). Adaptiert aus (Worlitzsch et al. 2002)



Die Lungeninfektionen der CF sind vor allem assoziiert mit *Pseudomonas aeruginosa*, gefolgt von *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* und *Stenotrophomonas maltophilia* (Ratjen and Doring 2003, Cystic\_Fibrosis\_Foundation 2012). Damit unterscheidet sich das Erregerspektrum deutlich von dem gewöhnlicher Lungeninfektionen. Die Prävalenz der verschiedenen Bakterienspezies in den CF-Lungen hängt vom Alter des Patienten ab (Abb. 2).

Das Gramnegative Stäbchen *P. aeruginosa* ist ein ubiquitäres Umweltbakterium und opportunistischer Leitkeim der CF assoziierten Lungeninfektionen (Ratjen and Doring 2003). Im Alter von 2 Jahren sind ca. 20% der Patientenlungen mit *P. aeruginosa* infiziert, im Alter von 18 Jahren sind es bereits über 70% (Cystic\_Fibrosis\_Foundation 2012). Chronische Infektionen mit *P. aeruginosa* sind die Hauptursache für die Verschlechterung der Lungenfunktion, Morbidität und Mortalität bei CF (Hoiby et al. 2005). Neben den genannten Erregern werden bei einigen Patienten auch Bakterienarten wie *Burkholderia cepacia*, *Achromobacter xylosooxidans* und *Mycobacterium abscessus* isoliert, die wegen ihrer Resistenzlage und Pathogenität eine besondere Herausforderung an die antibiotische Therapie stellen. (Zaidi et al. 2009, Uyan et al. 2010, Cystic\_Fibrosis\_Foundation 2012).



\**P. aeruginosa* includes people with MDR-PA.

\*\*MDR-PA is multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*).

‡*S. aureus* includes people with MRSA.

†MRSA is methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).

## Abbildung 2 Prävalenz der wichtigsten Keime bei CF-Patienten (in %) in Abhängigkeit von deren Alter.

Die Häufigkeitsverteilung verschiedener Bakterienspezies in CF-Lungen hängt vom Alter der Patienten ab. *S. aureus* und *H. influenzae* sind vorwiegend bei Kindern und Jugendlichen frequentiert, während *P. aeruginosa* vor allem bei Erwachsenen Patienten dominiert. Seltener kommen *S. maltophilia* sowie vereinzelt auch Bakterien der Gattungen *B. cepacia* und *A. xylosooxidans* vor. Adaptiert von (Cystic\_Fibrosis\_Foundation 2012)

Eine besondere Problematik ergibt sich aus der Tatsache, dass viele dieser Keime in der Lage sind Biofilme zu bilden, welche teilweise auch unter Antibiose in den Lungen persistieren und eine Eradikationstherapie unmöglich machen.

### 1.1.3 Biofilm

Biofilme sind definiert als sessile bakterielle Gemeinschaften, die von einer selbstgebildeten Matrix umschlossen sind und aneinander oder auf Oberflächen adhären. Bakterielle Biofilme stellen eine Wachstumsform dar, die sich vom planktonischen Wachstum wesentlich unterscheidet. Sie kommen in der Natur ubiquitär vor und sind charakterisiert durch ihre Variabilität in Bezug auf Spezieszusammensetzung,

Zellverteilung, Adhärenz und Ernährungsbedingungen. Dabei können neben unterschiedlichen Bakteriangattungen in einem Biofilm auch andere mikrobiologische Spezies wie Amöben und Flagellaten integriert sein (Donlan and Costerton 2002).

Die Biofilmbildung ist ein schrittweiser Prozess. Zu Beginn setzen sich einzelne planktonische Bakterien mit Hilfe von Adhäsinen auf einer Oberfläche ab, die in der CF-Lunge durch die zähvisköse Mukusschicht über dem Epithel gebildet wird. Aus einem dadurch entstehenden Monolayer differenziert sich eine bakterielle Mikrokolonie. Anschließend wechseln die Bakterien ihren Phänotyp. Sie verlieren dabei zum Beispiel ihre Geißeln und beginnen mit der Produktion von extrazellulären Polysacchariden (EPS), welche mit Wasser, Proteinen, Nukleinsäuren und Phospholipiden eine schleimige Extrazellulärmatrix bilden (Davey and O'Toole G 2000, Sutherland 2001a). Ein charakteristisches Exopolysaccharid bei der Biofilmbildung durch *P. aeruginosa* ist Alginat, welches für den mukoiden Phänotyp bei chronischer Lungeninfektion verantwortlich ist (Govan and Deretic 1996). Die Produktion von Exopolysacchariden wird nach erfolgter Adhärenz durch Genaktivierung hochreguliert (Davies et al. 1998). Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix gibt dem Biofilm die nötige Stabilität. Die Struktur ist gelartig und viskoelastisch, wodurch der Biofilm auf mechanische Beanspruchungen reagieren kann und darauf gewissermaßen unempfindlich ist (Stoodley et al. 2002).

Durch Einsatz von konfokaler Laser Scanning Mikroskopie ist es gelungen, die Struktur des Biofilms und der darin Lebenden Bakterien *in vitro* zu untersuchen. Der ca. 100 µm dicke (Lawrence et al. 1991), durch *P. aeruginosa* gebildete Biofilm, variiert in seiner Oberflächenstruktur von flachen, homogenen Zellschichten bis hin zu pilzartigen Wachstumskonfigurationen und ist von zahlreichen Wasserkanälen durchzogen (Greenberg 2003). Diese Wasserkanäle begünstigen den Nährstofftransport in dem hauptsächlich durch Diffusion ernährten Biofilm und gleichzeitig den Abtransport von Stoffwechselprodukten der Bakterien (Stoodley et al. 1994). Die extrazelluläre Matrix als Diffusionsbarriere schafft einen Gradienten für Sauerstoff- und Nährstoffgehalt, welcher unterschiedliche

Umweltbedingungen innerhalb des Biofilms generiert. Infolgedessen existiert eine große Heterogenität in der bakteriellen Stoffwechselaktivität innerhalb des Biofilms (Sutherland 2001b, Hoiby et al. 2010).

Die Biofilmbildung ist kein statischer Prozess, sondern ist durch dynamische Umbau- und Austauschmechanismen charakterisiert. Im Biofilm integrierte Bakterien können diesen wieder verlassen und in ihre planktonische Form zurückkonvertieren, um in benachbarte, unbesiedelte Regionen zu gelangen (Stoodley et al. 2002). Weiterhin können Anpassungsmechanismen im Biofilm schneller ablaufen, da in der Biofilmgemeinschaft ein reger Plasmidaustausch und Gentransfer stattfindet (Angles et al. 1993, Webb et al. 2003). Neben regulatorischen Effekten hat dies auch klinische Relevanz, da diese „beschleunigte Evolution“ innerhalb des Biofilms die Entstehung und Verbreitung von Antibiotikaresistenzen begünstigt. Es wurde nachgewiesen, dass Bakterien in Biofilmen ihren Phänotyp derart ändern können, dass andere Effluxpumpen oder Membranproteine exprimiert werden, als in der planktonischen Wachstumsform (Mah and O'Toole 2001, Hoiby et al. 2010). Darüber hinaus werden biofilmeigene Faktoren für die erhöhte Antibiotikaresistenz verantwortlich gemacht. Es wurde herausgefunden, dass die EPS-Matrix die Diffusion von Antibiotika erschwert, wobei die Fähigkeit zur Penetration in den Gruppen der Antibiotika variiert (Costerton et al. 1999). Bakterien in den tiefen, hypoxischen Schichten des Biofilms verlangsamen ihre Wachstumsgeschwindigkeit und inaktivieren große Teile ihrer Stoffwechselprozesse. Dies führt dazu, dass Antibiotika die in den Zellzyklus und in Stoffwechselwege eingreifen und ansonsten wirksam gegen die Bakterienspezies sind, ihre Toxizität verlieren (Brown et al. 1988).

Aufgrund dieser Prozesse sind Bakterien in Biofilmen bis zu 1000-fach weniger antibiotikasensibel als in ihrer planktonischen Form und gleichzeitig besser vor Phagozytose und ebenso dem menschlichen Immunsystem geschützt (Hoyle and Costerton 1991, Gilbert et al. 1997, Costerton et al. 1999, Brooun et al. 2000, Donlan and Costerton 2002).

Daraus wird deutlich, dass es für die Behandlung der CF von enormer Bedeutung ist, die Bewertung der Effektivität antibiotischer Therapie auch auf die Biofilmkonfiguration zu beziehen, da sich diese im Vergleich zur planktonischen Wachstumsform deutlich unterscheiden kann.

#### **1.1.4 Therapiemöglichkeiten der Lungeninfektionen**

Die Therapie der CF gestaltet sich zur Zeit rein symptomatisch, da eine kausale Therapie des Gendefekts noch nicht möglich ist. Lediglich CF-Patienten mit einer seltenen „Gating-Mutation“, die so genannte G551D-Mutation können derzeit mit dem neuen Medikament Ivacaftor (Vertex Pharmaceuticals) kausal therapiert werden. Bei dieser Mutation wird CFTR zwar korrekt in die Biomembran eingebaut, jedoch ist die Chloridtransportwahrscheinlichkeit ca. 100fach geringer als bei normalem CFTR. Die Therapie kann jedoch nur sehr wenigen Patienten angeboten werden, da die G551D-Mutation in Europa nur mit einer Häufigkeit von 1-5% aller CF-Erkrankten vorkommt (Sermet-Gaudelus 2013, Barry et al. 2014). Therapeutische Ansätze bei allen anderen Mutationen stützen sich auf die Limitierung der bakteriellen Besiedelung und Atemwegsdestruktion, sowie die Elimination von überschüssigem Bronchialsekret.

Durch den Einsatz von Mukolytika mit DNase-Aktivität kann die Viskosität des Sekrets durch Enzymverdau abgestorbener neutrophiler Granulozyten verbessert werden (Shak et al. 1990). Weiterhin können inhalative, hypertone Salzlösungen zur Verstärkung der körpereigenen mukoziliären Clearance angewendet werden (Robinson et al. 1997). Physiotherapeutische Ansätze sind standardisierte Perkussion, Handvibration und gezielte Atemübungen. Dadurch wird versucht, eine mechanische Mobilisierung des Mukus zu erreichen, so dass er abgehustet werden kann (McIlwaine and Davidson 1996). Die Reduktion der Schleimmassen führt zu einer Verminderung des Atemwegswiderstands und beseitigt die Grundsubstanz für bakterielle Kolonisation. Darüber hinaus kann die Behandlung von CF-Patienten mit antiinflammatorisch aktiven Substanzen, wie Steroiden, eine Milderung der Entzündungssymptomatik und Verlangsamung der Verschlechterung der Lungenfunktion bewirken (Auerbach et al. 1985).

Der Schwerpunkt der Therapie liegt auf der Bekämpfung chronischer Lungeninfektionen mit Antibiotika. Aufgrund der Optimierung antibiotischer Therapie konnte in den letzten Jahrzehnten eine erhebliche Verbesserung bezüglich der Lebenserwartung und Lebensqualität erzielt werden (FitzSimmons 1993). Gleichzeitig stellt die Bakterienbekämpfung aber auch zukünftig ein wachsendes Problem dar, da typische CF-assoziierte Keime ein progredientes Resistenzspektrum aufweisen.

Die initiale, meist das Kindesalter betreffende Kolonisation mit *S. aureus*, wird mittels Staphylokokken-wirksamer Antibiotikakombination (z.B: Dicloxacillin und Fusidinsäure) für einen Zeitraum von 2-4 Wochen behandelt, was in 75% der Fälle für eine Eradikation sorgt. Für die frühe Infektion mit *H. influenzae* steht eine effektive Antibiose mit einem Aminopenicillin in Kombination mit Rifampicin oder Ciprofloxacin zur Verfügung (Szaff and Hoiby 1982, Doring et al. 2004). Beim erstmaligen Nachweis von *P. aeruginosa* im tiefen Rachenabstrich oder im provozierten Sputum ist eine antibiotische Eradikationstherapie indiziert. Ziel hierbei ist eine chronisch mukoide Infektion zu verhindern, bei der eine Eradikationstherapie nach aktuellen Mitteln nahezu unmöglich ist (Valerius et al. 1991, Doring et al. 2004). Wenn beim frühzeitigen Nachweis einer Infektion mit *P.aeruginosa* mit einer Eradikationstherapie begonnen wird, konnte ein progressionsfreies 7 Jahres Intervall bei >80% des Patientenkollektivs erreicht werden, in welchem die Patienten keine chronisch mukoiden Infektionen bekamen (Frederiksen et al. 1999).

Bei der Infektion mit *P. aeruginosa* stehen als Mittel der Wahl entweder eine Kombination aus oralem Ciprofloxacin und inhalativem Colistin, oder eine inhalative Monotherapie aus Colistin oder Tobramycin zur Verfügung. Aktuelle Studien sehen einen Vorteil in einer inhalativen Kombinationstherapie aus Tobramycin und Colistin (Littlewood et al. 1985, Gibson et al. 2003, Hoiby et al. 2005, Herrmann et al. 2010). Weiterhin gibt es neben dem oralen und inhalativen Applikationsweg auch die Möglichkeit der intravenösen Gabe von pseudomonaswirksamen Penicillinen, Aminoglykosiden und Cephalosporinen wie zum

Beispiel Ceftazidim. Dies bietet sich vor allem bei akuten pulmonalen Exazerbationen an (Doring et al. 2000).

Aufgrund der physiochemischen Bedingungen im Respirationstrakt kommt ein Großteil der applizierten Antibiotika jedoch nicht mit den Bakterien in Kontakt. Deshalb ist eine erhebliche Dosisanpassung des Antibiotikums notwendig. Um eine bakterizide Wirkung im Sputum zu erreichen, sind teilweise Antibiotikakonzentrationen vom 25-fachen der minimalen Hemmkonzentration notwendig (Mendelman et al. 1985). Diese Dosen sind mit intravenöser Therapie aufgrund der Toxizität nicht mehr realisierbar, ohne erhebliche Nebenwirkungen beim Patienten zu verursachen. Bei zu niedrigen Dosen steigt wiederum das Selektionsrisiko für Antibiotikaresistenzen (Doring et al. 2000, Canton et al. 2005).

Auch wenn viele bakterielle Erreger durch eine aggressive, hochdosierte antibiotische Therapie erfolgreich eradiziert und chronische Infektionen über Jahre hinausgezögert werden können, sterben die meisten CF-Patienten an wiederkehrenden Infektionen, hauptsächlich verursacht durch *P. aeruginosa*, die ab dem chronischen Infektionsstadium kaum mehr therapierbar sind. Probleme ergeben sich vor allem durch die verminderte Penetration der Substanzen in bakterielle Biofilme, die von CF-typischen Erregern im mukoiden Infektionsstadium gebildet werden (Hoiby et al. 2005).

Um den vorzeitigen Tod der CF Patienten durch chronische Lungeninfektionen zu verhindern ist es dringend notwendig eine antibakterielle Substanz zu finden, die gegen multiresistente CF-Keime in Biofilmen wirkt und gleichzeitig klinisch gut applizierbar ist.

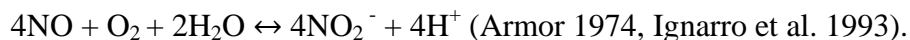
## 1.2 Stickstoffmonoxid

### 1.2.1 Grundlagen

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein zweiatomiges, freies Radikal, welches neben seinen biologischen Funktionen als Vasodilatator, Angiogeneseinduktor, Neurotransmitter und Wundheilungsregulator eine Schlüsselrolle in der natürlichen Reaktion des Immunsystems auf Infektionen spielt (Marletta et al. 1990, Moncada et al. 1991). Inflammatorisch aktive Zellen wie Makrophagen und neutrophile Granulozyten produzieren NO, um eingedrungene Mikroorganismen zu bekämpfen (MacMicking et al. 1997). Deshalb gehen Infektionen des menschlichen Körpers mit einem Anstieg an endogener NO-Produktion einher (Fang 1997). Das im Körper durch die NO-Synthase produzierte NO ist damit maßgeblich an der Fähigkeit beteiligt, effektiv gegen die Proliferation unterschiedlichster pathogener Keime vorzugehen (MacMicking et al. 1997). Hierzu wurde gezeigt, dass Mäuse ohne induzierbare NO-Synthase eine erheblich größere Anfälligkeit gegenüber Infektionen haben, als der NO-Synthase positive Wildtyp (MacLean et al. 1998).

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Bronchialepithelzellen in den Lungen von CF-Patienten die Fähigkeit verloren haben, NO als Antwort auf bakterielle Invasion zu bilden. Die beschriebene NO-Synthase-Inaktivität in den Epithelzellen scheint somit eine große Rolle für die CF typischen chronischen Lungeninfektionen und die schlechte antimikrobielle Abwehr in CF Lungen zu spielen (Kelley and Drumm 1998, de Winter-de Groot and van der Ent 2005).

Charakteristisch für NO ist seine Instabilität und daher kurze biologische Halbwertszeit von unter 5 s (Moncada et al. 1991). Dies hat zur Folge, dass NO in biologischem Gewebe und in Flüssigkeiten unter Anwesenheit von O<sub>2</sub> rasch weiterreagiert. Als Produkt entsteht vor allem NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (Synonym: salpetrige Säure, Nitrit) (Ignarro et al. 1993, Wink et al. 1993). Diese Oxidation in flüssigem Medium geschieht unter Anwesenheit von O<sub>2</sub> nach folgendem vereinfachten Reaktionsschema:

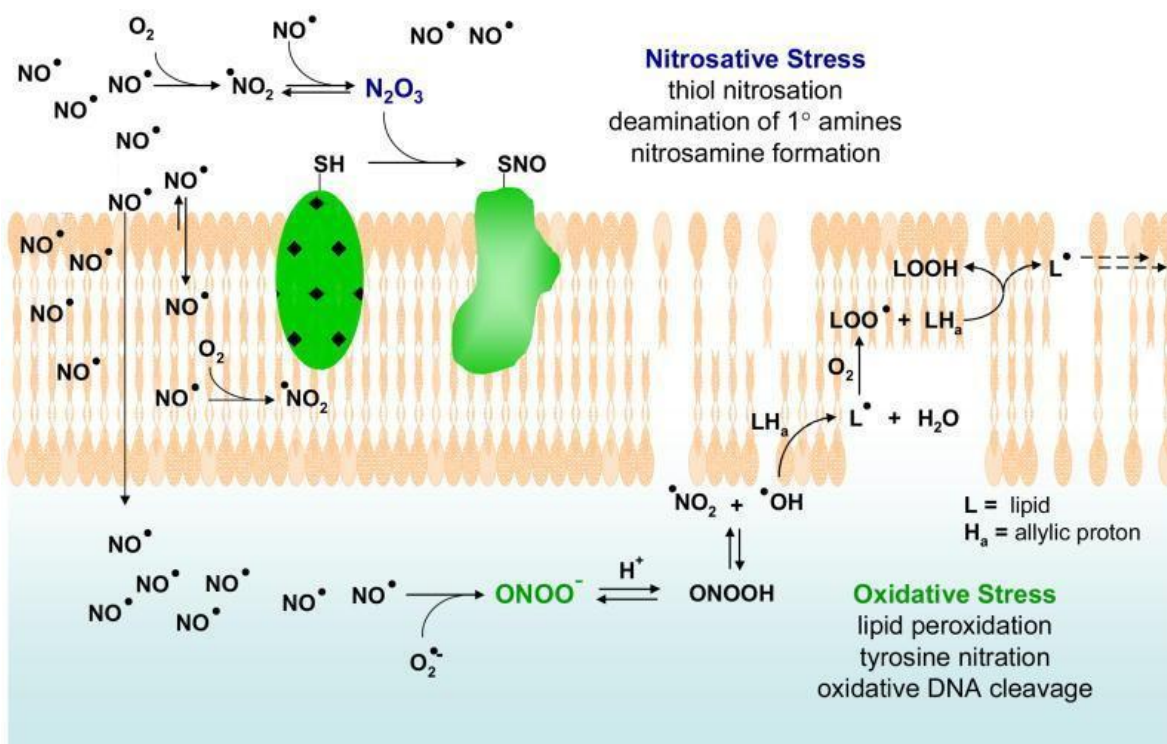




Die Reaktionsfolge ist eine chemische Gleichgewichtsreaktion. Das bedeutet in diesem Fall, dass NO in wässriger Lösung so lange zu Nitrit weiterreagiert, bis sich ein chemisches Equilibrium eingestellt hat.

### **1.2.2 Effekt von Stickstoffmonoxid auf Mikroorganismen**

Die antimikrobielle Potenz von NO und seinen reaktiven Nebenprodukten ist charakterisiert durch seine nitrosativen und oxidativen Eigenschaften. Neben der DNA-Desaminierung reagieren NO-Reaktionsspezies wie  $N_2O_3$  mit intrazellulären Proteinen wie auch mit Proteinen in Biomembranen (Fang 1997, Wink and Mitchell 1998, Fang 2004, Ridnour et al. 2004). Dabei kommt es unter anderem zur S-Nitrosylierung an freien Thiolgruppen an den Aminosäuren der Proteine, was zu einer Umbildung von Disulfidbrücken führt und letztendlich den Funktionsverlust der Proteine zur Folge hat (Stamler 1995, Fang 1997). Der oxidative Stress wird bestimmt durch die Bildung von Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ), welches aus der Reaktion von NO mit endogenen Superoxidmolekülen ( $O_2^-$ ) hervorgeht (McCord and Fridovich 1978). Peroxynitrit führt zur Lipidperoxidierung und damit zur Zerstörung der Membranlipide. Beide Destruktionsprozesse, die Nitrosylierung von Proteinen und die Peroxidierung von Lipiden (Abb. 3), werden durch die Anreicherung von NO in Biomembranen, aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften, stark beschleunigt und sind ausschlaggebend für die bakterizide Aktivität von NO (Moller et al. 2007) (Abb.3).



### Abbildung 3 Wirkungsmechanismen von NO als antibakterielle Substanz

Die bakteriotoxischen Eigenschaften von NO sind sowohl durch den nitrosativen- als auch den oxidativen Stress von reaktiven Beiprodukten wie  $N_2O_3$  und  $ONOO^-$  (Peroxinitrit) gekennzeichnet. Nitrosativer Stress ist verantwortlich für Nitrosylierungen von Thiolgruppen an Proteinen (grüne Strukturen) und DNA Desaminierung, während oxidativer Stress für die Membranzerstörung (oranger Doppellayer) durch Lipidperoxidierung sorgt. Adaptiert von (Hetrick et al. 2008)

NO greift also nicht wie viele Antibiotika als Hemmstoff in Stoffwechselprozesse oder Zellzyklen ein, sondern reagiert chemisch aktiv mit Zellbestandteilen der Mikroorganismen. Dies macht NO zu einem möglichen Agens, um auch gegen stoffwechsellinaktive Bakterien in Biofilmen mit Antibiotikaresistenzen vorzugehen.

### 1.2.3 Stickstoffmonoxid als therapeutischer Wirkstoff

Neben seiner Anwendung als Vasodilatator für Krankheitsbilder wie Angina Pectoris und pulmonaler Hypertension soll in dieser Studie der Fokus auf die Anwendung als Antibiotikum gelegt werden. Experimentelle *in vitro* Versuche haben hinreichend belegt, dass appliziertes NO eine antimikrobielle Potenz gegen ein breites Spektrum an potentiellen Krankheitserregern wie Bakterien, Viren und Pilzen besitzt (Mancinelli and McKay 1983, De Groote and Fang 1995, Fang 1997, Ghaffari et al. 2006, Regev-Shoshani et al. 2013b). Verschiedene Applikationsformen wurden in den letzten Jahren entwickelt, um das instabile, hochreaktive und toxische NO auch für den klinischen Alltag gebrauchsfähig zu machen. Hierzu zählen neben der Kopplung von NO an organische Moleküle auch Verbindungen mit Metallen und Siliciumnanopartikeln, die allmählich NO-Moleküle abgeben und als NO-Donatoren bezeichnet werden (Maragos et al. 1991, Wang et al. 2002, Hetrick et al. 2008). Diese Festkörperverbindungen haben ebenfalls einen toxischen Effekt auf bakterielle Biofilme *in vitro* und können durch Beschichtung medizinischer Instrumente vor der Bildung neuer Biofilme schützen (Barraud et al. 2009, Hetrick et al. 2009, Regev-Shoshani et al. 2010).

Eine mögliche inhalative Darreichungsform ist die Zuführung des reaktiven Moleküls über ein NO-Luftgemisch, genannt „gaseous NO“ (gNO) (Ghaffari et al. 2006). Dieses wird experimentell vor allem auf dem Gebiet der Haut-, Wundheilungs-, sowie Pneumonieforschung eingesetzt. So konnte mit gNO in einer therapeutischen Dosis von 160-200 parts per million (ppm) bereits eine Reduktion der bakteriellen Belastung *in vivo* bei chronischen Wundinfektionen, Hautinfektionen und Pneumonien in Rattenlungen nachgewiesen werden (Webert et al. 2000, Miller et al. 2004, McMullin et al. 2005, Ghaffari et al. 2007, Miller et al. 2013). Ob inhalatives gNO jedoch auch bakterielle Biofilme abtöten kann, wurde noch nicht untersucht.

Zur Zeit ist gNO nur bei Frühgeborenen und bei Patienten mit hypoxischem Lungenversagen mit einer Dosis von 20 ppm zugelassen (U.S. Food and Drug Administration 2013). Grund für diesen Wert sind potentielle

Nebenwirkungen wie Nitrosylierungen von Proteinen und anderen Zellbestandteilen, aber vor allem die Anreicherung von Methämoglobin im Blut. Methämoglobin entsteht bei der Bindung von inhaliertem gNO an das Transportmolekül Hämoglobin und führt zu einem Abfall der Sauerstofftransportkapazität des Blutes (Young et al. 1994, Young et al. 1996). Für eine inhalative Anwendung in Menschenlungen sollte also der NO-Partialdruck in der zugeführten Atemluft so gewählt werden, dass einerseits eine gute mikrobielle Toxizität gegeben ist, andererseits eine durch NO verursachte Methämoglobinbildung und Erhöhung der Serumnitrate im Blutkreislauf des Patienten einen toxischen Grenzwert bei längerer Exposition nicht überschreitet. Dieser therapeutische Wert liegt in einem Bereich von 160-200 ppm NO, den gesunde Probanden in einer Phase I Studie gut tolerierten (Miller et al. 2012).

Eine aktuelle Patientenstudie der Universitätskinderklinik Tübingen untersuchte erstmalig die therapeutische Wirkung von inhalativem gNO auf chronische Lungeninfektionen bei CF-Patienten. Neben der Verbesserung der Lungenfunktion zeigte sich hier eine Reduktion der Bakterienzahl im provozierten Sputum nach zweiwöchiger Inhalation von 160 ppm NO, dreimal täglich für 30 min (Riethmüller et al. unveröffentlicht).

### **1.3 Zielsetzung der Arbeit**

Diese Studie wurde aufgegriffen, um in der folgenden Arbeit die *in vitro* Nachweise für folgende bisher ungeklärte Fragestellungen zu liefern:

1. Wirkt gNO auf typische Erreger der chronischen Lungeninfektion bei CF in der planktonischen Wachstumsform bakteriotoxisch?
2. Kann gNO in therapeutischer Dosis diese Erreger auch in einem Biofilm bekämpfen oder sogar eradizieren?
3. Gibt es dabei sichtbare Unterschiede in den Ansprechraten von gNO auf verschiedene Bakterienarten

Um dies zu klären sollen Methoden gewählt werden, die nah an den Bedingungen im menschlichen Respirationstrakts arbeiten, um die klinische Relevanz zu sichern.

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Geräte und Materialien**

96 -Micro Well™-Platten aus Polystyrol, steril (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden)

96 -Zapfenplatten, Nunc Immuno TSP aus Polystyrol, steril (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden)

Autoklav (KSG Sterilisation, Olching)

Blutagarplatten Columbia-blood agar (Heipha Dr. Müller GmbH, Heidelberg)

Einkanal-Pipetten Reference, 10-100µl und 200-1000µl (Eppendorf AG, Hamburg)

Einmalspritze, 10ml/ 20ml (Braun, Melsungen)

Elastische Abdichtfolie PARAFILM® M (Brand GmbH, Wertheim)

Eppendorf-Cups, 1,5ml und 2ml Volumen (Eppendorf AG, Hamburg)

Falcon-Tubes, 50ml und 15ml Volumen, konisch, mit Schraubverschluss (Beckerton Dickinson Labware, Le Pont de Claix, Frankreich)

Gasexpositions-kammer aus Plexiglas (Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von C. Miller, Vancouver, Kanada)

Heiz- und Rührplatte Ikamag RCT (Ika Labortechnik, Staufen im Breisgau)

Küvette (Sarstedt AG & Co., Nürnberg)

Laborfermentersystem Biostat® B Plus (Sartorius, Göttingen)

NO-Partialdruckmesser, AeroNOx (Pulmonox Medical Inc., Tofield, Canada)

Photometer Ultrospec III (Pharmacia LKB Biochrom Ltd., Cambridge, UK)

Sterilbank Lamin-Air® HBB2448 (Heraeus, Hanau)

Sterilfilter Millex- GS 0,22µm Porengröße (Millipore Corporation, Bedford, MA, U.S.A.)

Vortex Genie 2 TM (Bender und Hobein AG, Zürich, Schweiz)

Zentrifuge, Multifuge 3SR Plus (Heraeus, Hanau)

### **2.2 Reagenzien und Chemikalien**

Alginat-Lyase (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Antischaummittel Ucolub N115 (Fragol Industrieschmierstoffe, Mühlheim)

CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Chaps 0,1% (Sigma-Aldrich, Steinheim)  
D-(+)-Glucose (Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Druckluft 10L, verdichtet, gasförmig (Westfalen AG, Münster)  
EDTA 0,1% (Merck, Darmstadt)  
HCl 1M (Merck, Darmstadt)  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt)  
Luria Bertani (LB) Broth Base (Invitrogen, Karlsruhe)  
M9, Minimal Salts, X5 (Sigma-Aldrich, Steinheim)  
MgSO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, Steinheim)  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt)  
NaCl (Merck, Darmstadt)  
NaOH 1M (Merck, Darmstadt)  
Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim)  
Stickstoffmonoxid/N<sub>2</sub> 5000ppm 50L, gasförmig, verdichtet (PRAXAIR, Düsseldorf)  
Tryptone Soy Broth (TSB) (OXOID, Basing Stoke, Hampshire, UK)

## **2.3 Medien und Stammlösungen**

### *Luria Bertani (LB) Nährmedium*

15 g LB Broth Base in 1 l Aqua dest. lösen und autoklavieren

### *Phosphate buffered saline (PBS) (20-fache Stammlösung)*

85,05 g NaCl

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

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

In 500 ml Aqua dest. lösen, gut mischen und autoklavieren

### *Einfache PBS-Gebrauchslösung*

Verdünnung der Stammlösung 1:20 mit Aqua bidest, autoklavieren

### *M9-Minimalnährmedium*

750 ml steriles Wasser vorlegen

200 ml sterile M9 Salzlösung

2 ml steriles 1 M MgSO<sub>4</sub>

20 ml sterile 20% Glukose

100 µl steriles 1 M CaCl<sub>2</sub>

mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen und autoklavieren

### *Tryptone Soy Broth-Nährmedium (TSB)*

30g TSB in 1 l Aqua dest. lösen und autoklavieren

## **2.4 Bakterienstämme**

Für die Versuche wurden folgende Spezies und Stämme verwendet:

*Burkholderia cepacia* (J2315; Ein CF-spezifischer Stamm und Patientenisolat)

*Escherichia coli* (Ein ESBL-Patientenisolat, Mikrobiologische Diagnostik Tübingen)

*Mycobacterium abscessus* (Ein Patientenisolat, Mikrobiologische Diagnostik Tübingen)

*Pseudomonas aeruginosa* (PAO1; Ein Laborstamm)

*Pseudomonas aeruginosa* (PA14; Ein hochvirulentes Patientenisolat)

*Pseudomonas aeruginosa* (PDO300; Ein mukoider, exzessiver Alginat- und Biofilmbildner)

*Staphylococcus aureus* (Tü 7; Ein stark Biofilmbildendes CF-Patientenisolat)

Damit wurde eine Auswahl getroffen, die sowohl einige typische CF assoziierte Lungenpathogene als auch seltenere, dafür aber multiresistente und besonders pathogene Keime enthält.



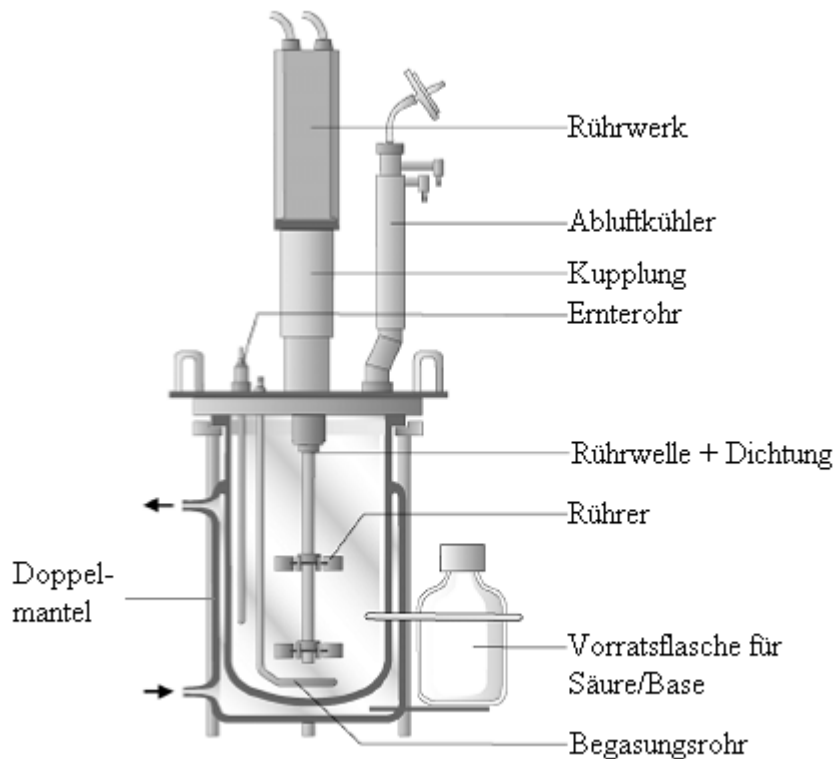
## **2.5 Anzucht der Bakterien**

Jeweils eine Einzelkolonie des Bakterienstamms wurde mit einer Plastiköse unter der Sterilbank von der Agarplatte in 20 ml TSB-Medium, für *E. coli* in 20 ml LB-Medium überführt. Anschließend wurden die Kulturen je nach Stamm für unterschiedliche Zeit im Schüttler bei 37°C inkubiert. Für die meisten Bakterienstämme genügte hier die Inkubation über Nacht. *B. cepacia* wurde 24 h bebrütet, und *M. abscessus* eine Woche bei Raumtemperatur, um genügend Bakterienmaterial für die Überführung in die Fermenter anzuzüchten.

## **2.6 Fermenterversuche**

### **2.6.1 Aufbau des Fermentersystems**

Für die Versuche, in welchen die Wirkung von NO auf planktonische Bakterien überprüft werden sollte, wurde das Fermentersystem BIOSTAT® B plus der Firma Sartorius verwendet. Dabei handelt es sich um ein kompaktes Laborfermentersystem, bestehend aus einer Steuereinheit und bis zu zwei Fermentern mit je 3 l Füllvolumen. Mit Hilfe der Steuereinheit ist es möglich, die Temperatur, den pH Wert, die Sauerstoffsättigung, die Gasflussstärke und die Rotationsgeschwindigkeit des Rührwerks am jeweiligen Fermenter zu regulieren. Die dafür benötigten Daten werden über die jeweiligen, in den Fermenter integrierten Elektroden erhoben. Der Fermenter selbst besteht aus einem Kulturgefäß, welches von einem zweiten Glasmantel umschlossen ist. Zwischen Kulturgefäß und Glasmantel (sog. Doppelmantelsystem) kann vom Steuergerät temperiertes Wasser zugeführt werden, um optimale Temperaturbedingungen im Kulturgefäß zu generieren. Abb. 4 zeigt einen vereinfachten Aufbau des Fermenters.



**Abbildung 4 Aufbau der Fermentergefäße vom Typ UniVessel®** (Bereitgestellt und adaptiert von Sartorius AG, Göttingen)

### 2.6.2 Vorbereitungen der Bakterien

Die im Schüttler bei 37°C angezüchteten Bakterien wurden zentrifugiert, das Zellpellet wurde in PBS gewaschen, anschließend in 10 ml PBS gelöst und gevortext. Diese Suspension repräsentierte die Bakterienstammlösung. Anschließend musste eine Zelldichtebestimmung der Stammlösung durchgeführt werden, um zu wissen, wie viel ml der Lösung in das Kulturgefäß der Fermenter angeimpft werden mussten. Ziel hierbei war es, eine Bakterienzeldichte von ca.  $10^7$  Kolonie bildenden Einheiten (CFU/ml) im Kulturgefäß des Fermenters zu erzeugen, da dies näherungsweise der Zelldichte einer infizierten CF-Lunge entspricht. Dazu wurde die optische Dichte (OD) der Bakterienstammlösung mit Hilfe des Photometers ermittelt. Exemplarisch für *P. aeruginosa* entspricht eine Zelldichte von  $10^7$  CFU/ml ungefähr einer OD von 0,05 bei 600 nm Wellenlänge. Die entsprechende Menge der Bakterienstammlösung, die nötig ist um

eine solche OD und somit Zelldichte im Fermenter zu erzeugen, wurde nun in einer Einmalspritze aufgezogen und neben dem Fermenter bereitgelegt.

### **2.6.3 Vorbereitung der Fermenter**

Zunächst wurden beide Fermenter mit 1 l des jeweiligen Mediums befüllt. Bei der Nutzung von TSB als Medium wurde zusätzlich 400 µl Antischaummittel hinzugegeben, um einem Mediaustritt durch Schaumbildung während des Versuchs vorzubeugen. Das Kulturgefäß wurde mit der Deckplatte verschlossen und alle zu- und ableitenden Schläuche der Deckplatte wurden mit Hilfe von Schlauchklemmen abgedichtet, um einen Mediaustritt aufgrund des während des Sterilisationsprozesses herrschenden Überdrucks zu verhindern. Die pH- und Sauerstoffelektroden beider Fermenter wurden nach Anleitung des Herstellers kalibriert und in die vorgesehenen Öffnungen luftdicht verschraubt. Anschließend wurden die befüllten Fermenter für 20 min bei 121°C autoklaviert. Nach der Sterilisation wurden die Fermenter an das Steuergerät angeschlossen. Dazu wurden die Elektromotoren auf die Kupplung der Rührwelle montiert, und alle Messelektroden über dafür vorgesehene Kabel mit dem Steuergerät verbunden. Der Zu- und Ablauf des Temperiersystems wurde mit dem Doppelmantelssystem am Kulturgefäß konnektiert und destilliertes Wasser in den Doppelmantel gepumpt, welches nun zwischen Thermostat im Steuergerät und Doppelmantel zirkulieren konnte. Danach wurde am Steuergerät eine Solltemperatur von 37°C eingestellt. Den Zuluftschläuchen beider Fermenter wurde je ein Zuluftfilter vorgeschaltet. Die Fermenter wurden über unterschiedliche Donorsysteme mit Zuluft versorgt. Der Fermenter, der die Kontrollgruppe repräsentiert, wurde an eine Gasflasche mit komprimierter Luft angeschlossen. Die Versuchsgruppe hingegen wurde mit einem Gasgemisch aus der gNO-Flasche und Luft aus dem laborinternen Luftversorgungssystem gespeist, welches, bevor es den Fermenter erreichte, über das Steuergerät lief, da hier die Gasflussstärke eingestellt werden konnte. Die Abluft des Versuchsfermenters wurde an den NO-Partialdruckmesser AeroNOx angeschlossen, um die korrekte Luftzusammensetzung im Fermenter während des Versuchs zu kontrollieren. Die Drehzahl des Rührwerks wurde auf 516 Rotationen pro Minute eingestellt und die O<sub>2</sub>-Elektroden so kalibriert, dass bei einer Luftzufuhr von 3 l/min die Sauerstoffsättigung auf

100% gesetzt wurde. Diese Werte wurden vom Steuergerät überwacht und über den Versuch konstant gehalten. Vor dem unmittelbaren Versuchsstart musste nun noch der korrekte NO-Partialdruck von ca. 200 ppm am Versuchsfermenter eingestellt werden. Dies wurde durch Feinjustierung der Stellräder an den zuführenden Gasflaschen unter Kontrolle des NO-Partialdruckmessers realisiert.

#### **2.6.4 Durchführung**

Der Versuch wurde durch das Beimpfen der vorgeheizten Kulturgefäße gestartet. Dabei wurde die vorbereitete Bakteriensuspension (Kap. 2.6.2) in einer sterilen Injektionsspritze über den Anstechstutzen in das Kulturgefäß injiziert. Zu diesem Zeitpunkt  $t = 0$  haben in beiden Fermentern die Parameter folgende Werte angenommen:

Temperatur = 37°C

pH = 7,3

Luftsauerstoffanteil: 21% (zu 100% absolut gesetzt)

Zuluftstromstärke: 3 l/min

Bakterienzeldichte: ca.  $10^7$  CFU/ml

Füllvolumen: 1 l

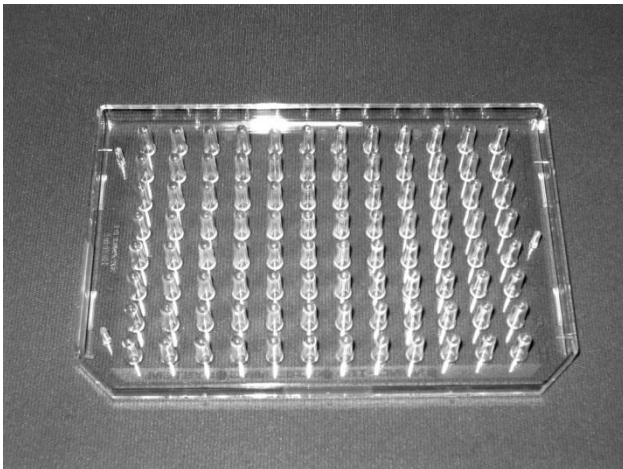
Die Bakterienpopulation im ersten Fermenter wurde einem NO-Partialdruck von anteilig 200 ppm ausgesetzt und repräsentierte die Versuchsgruppe. Die Bakterienpopulation im zweiten Fermenter wurde einem reinen Luftgemisch ausgesetzt und repräsentierte die Kontrollgruppe. Daraufhin wurden halbstündlich eine 10 ml Probe über das Ernterohr aus dem Kulturgefäß entnommen, die den derzeitigen Zustand der Bakterienpopulation widerspiegeln sollte. Dabei wurden die ersten 5 ml der Probe verworfen, um eine Manipulation der Probe durch Bakterienresiduen im Ernterohr zu verhindern. Von jeder gewonnenen Probe wurden 100 µl entnommen und damit eine Verdünnungsreihe von 1:10<sup>1</sup> bis 1:10<sup>7</sup> mit PBS als Verdünnungsmittel angefertigt. Sowohl von der entnommenen Probe als auch von jeder Verdünnungsstufe wurden je 3x10 µl auf eine Blutagarplatte getropft. Die so beimpften Agarplatten wurden anschließend bei 37°C bebrütet. Am nächsten Tag wurde die geringste Verdünnung ermittelt, bei der einzeln auszählbare Bakterienkolonien in

einem 10 µl Tropfen zu sehen waren. Der Mittelwert der ausgezählten Kolonien einer Verdünnungsstufe wurde nun mit 100 multipliziert, um den Wert auf 1000 µl = 1 ml zu beziehen. Damit konnte die Bakterienzahl jeder Probe aus den Fermentern über die CFU/ml bestimmt und ein Bereich von  $10^2$  bis  $10^9$  CFU/ml abgedeckt werden.

## 2.7 Biofilmversuche

### 2.7.1 Anzucht des Biofilms

Um die Wirkung von gNO auf bakterielle Biofilme nachzuweisen, wurde eine etablierte Methode zur Biofilmgenerierung herangezogen und modifiziert: Das Calgary Biofilm Device (Ceri et al. 1999). Es besteht aus zwei Hauptelementen: Einer 96-Zapfenplatte (Abb.5) und einer dazu passenden 96-Well Platte.



**Abbildung 5 Eine 96-Zapfenplatte des Calgary Biofilm Device**

Die Nöpfchen (Wells) einer 96-Well Platte wurden mit 200 µl einer 0,1%-Poly-L-Lysin-Lösung befüllt, die 96-Zapfen-Platte darüber gestülpt und 30 min lang bei 37°C inkubiert. Die Beschichtung mit Poly-L-Lysin verbesserte die Adhäsion der Bakterien an die Polystyroloberfläche der Zapfen. Wie in Kap. 2.5 beschrieben wurde eine angezüchtete Übernachtskultur mit frischem TSB auf eine OD von 0,05 verdünnt. Anschließend wurden jeweils 200 µl dieser Bakterienlösung in die Nöpfchen einer neuen 96-Well-Platte gefüllt und die mit Poly-L-Lysin beschichtete Zapfenplatte darin eingesetzt (Abb. 6 A). Dieses Plattenkombinat wurde nun für 2 h im Schüttelbrutschrank unter aeroben Bedingungen

bebrütet, damit die Bakterien aus der TSB-Suspension an den Zapfen adhären (Abb. 6 B). Danach wurde die Zapfenplatte in eine neue mit frischem TSB befüllte Well-Platte überführt, mit Parafilm luftdicht verschlossen und unter diesen anaeroben Bedingungen für 48 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit bildeten die adhären Bakterien an den Zapfen einen Biofilm (Abb. 6 C). Um zurückgebliebene planktonische Bakterien zu entfernen, wurde die Zapfenplatte nach der Inkubation in PBS gewaschen und war anschließend bereit für die gNO Exposition.

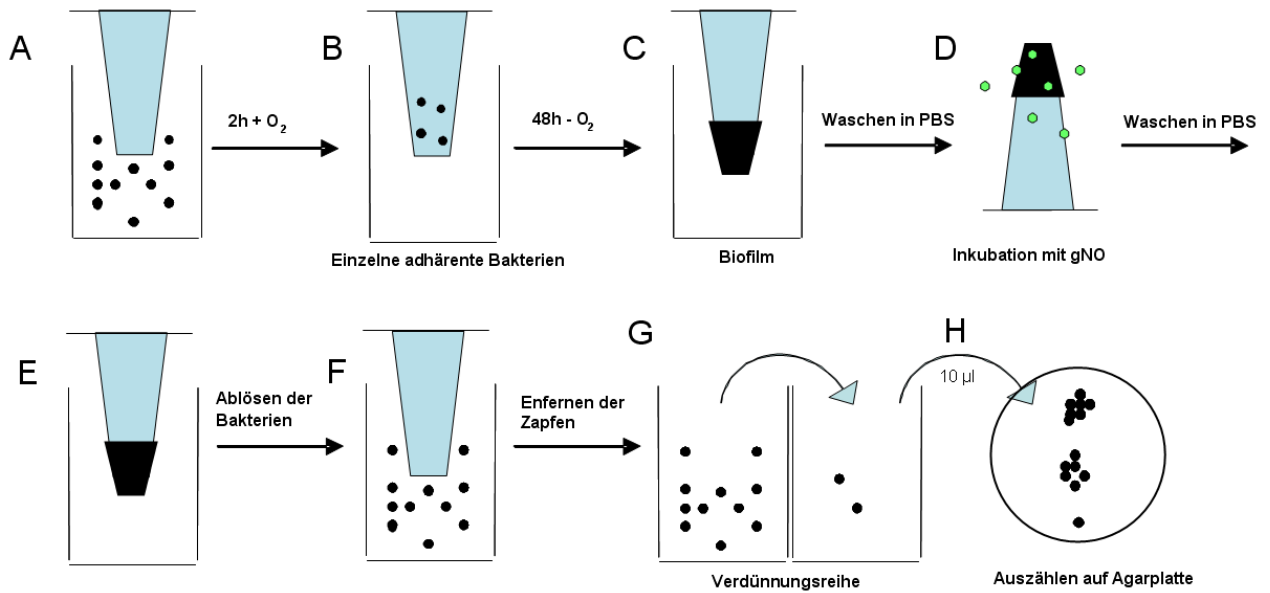
### **2.7.2 Aufbau und Durchführung der Versuche**

Um die *in vivo* Verhältnisse einer ventilierten Lunge zu simulieren und um zu verhindern, dass der Biofilm durch die Begasung austrocknet, musste das zugeführte Gasgemisch vor Erreichen der Expositionskammer mit den Zapfenplatten angefeuchtet und temperiert werden. Dies wurde mit einem speziell hierfür entworfenen Befeuchtungssystem realisiert. Das Gasgemisch wurde dabei zunächst in einen mit 1 l H<sub>2</sub>O befüllten und autoklavierten Fermenter geleitet, der an das BIOSTAT® B plus Steuergerät angeschlossen wurde. Das Wasser im Fermenter wurde wie in Kap. 2.6.3 beschrieben auf eine Temperatur von 37°C aufgeheizt und eine Gasflussstärke von 3 l/min am Steuergerät eingestellt. Die so erwärmte, befeuchtete Abluft des Fermenters repräsentierte gleichzeitig die Zuluft für die Gasexpositionskammer. Vor Erreichen der Kammer wurde ein Teil der Zuluft abgezweigt und erreichte den NO-Partialdruckmesser, mit dessen Hilfe die korrekte Zusammensetzung des Gasgemisches mit anteilig 200 ppm gNO eingestellt werden konnte. Die Expositionskammer selbst wurde zusätzlich mit feuchten Tüchern ausgelegt, um die Luftfeuchtigkeit konstant zu halten.

Es wurden zwei Zapfenplatten mit je vier mit Biofilm bestückten Zapfen in der Expositionskammer platziert und der Deckel verschlossen. Anschließend wurde mit der Begasung der Biofilme durch NO begonnen (Abb. 6 D). Die erste Platte wurde nach 3 h NO-Exposition aus der Kammer entfernt und die Zweite nach 6 h. Eine dritte Platte wurde 6 h mit Luft ohne NO-Anteil begast, um auszuschließen, dass reine Luft einen Effekt auf die CFU/ml im Biofilm hat. Die Biofilme einer vierten Platte wurden direkt nach der

Anzucht wieder wie unten beschrieben abgelöst und deren CFU/ml ermittelt, um die Ausgangskonzentration der Bakterien pro Biofilm vor der Behandlung zu bestimmen.

Nach der Begasung wurden die Zapfenplatten in PBS gewaschen. Anschließend wurde der Biofilm von den Zapfen abgelöst, indem die Zapfen in eine neue 96-Well-Platte überführt wurden, die mit 200 µl eines Lösungsgemisches aus 0,1 M EDTA, 0,1% CHAPS und 100 µg/ml Alginase (in PBS gelöst) befüllt war. Die Zapfen, die nun in dem Lösungsgemisch eintauchten, wurden für 1 h bei 37°C und 200 Umdrehungen pro Minute im Schüttelbrutschrank inkubiert (Abb. 6 E-F). Danach wurden die dadurch entstandenen 200 µl Bakteriensuspension aus den Näpfchen der 96-Well Platte in 1,5 ml Eppendorf-Cups überführt und gevortext. Um die Bakterienzahl in der entstandenen Bakterienlösung zu bestimmen, wurde eine Verdünnungsreihe angelegt, wie sie unter 2.6.4 beschrieben ist (Abb. 6 G). Von jeder Verdünnungsstufe und von der unverdünnten Bakteriensuspension wurden 3x 10 µl auf Blutagarplatten getropft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag konnten die entstandenen koloniebildenden Einheiten in den drei 10 µl-Tropfen der geringsten auszählbaren Verdünnungsstufe jedes abgelösten Biofilms bestimmt und der Mittelwert daraus gebildet werden (Abb. 6 H).



### Abbildung 6 Versuchsablauf des modifizierten Calgary Biofilm Device mit NO-Begasung

Die mit 0,1 % Poly L-Lysin beschichteten Zapfen wurden in die mit der Bakterien suspension ( $\pm$ OD 0,05) befüllten Wells der 96-Well Platte eingesetzt (A). Nach 2 h Inkubation bei 37°C unter aeroben Bedingungen adhären die Bakterien (schwarze Punkte) an die Zapfen (B). Unter anaeroben Bedingungen wurde nach zweitägiger Inkubation bei 37°C der Biofilm erzeugt (C). Anschließend erfolgte die drei- oder sechsständige Begasung mit gNO (grüne Punkte)(D). Danach wurde die Zapfenplatte gewaschen und in Wells überführt die mit einer PBS Pufferlösung versetzt mit 0,1 M EDTA, 0,1% CHAPS und 100 µg/ml Alginase befüllt waren (E). Daraus resultierte das Ablösen der Bakterien von den Zapfen, ohne dabei die Bakterien abzutöten oder in ihrer Koloniefähigkeit einzuschränken (F). Die Bakterien wurden nun über die CFU/ml quantifiziert, indem man eine Verdünnungsreihe anfertigte, diese auf Agarplatten überführte und nach Kolonien auszählte (G, H) (Ceri et al. 1999) (Adaptiert und modifiziert von Dr. Martina Ulrich, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Tübingen).



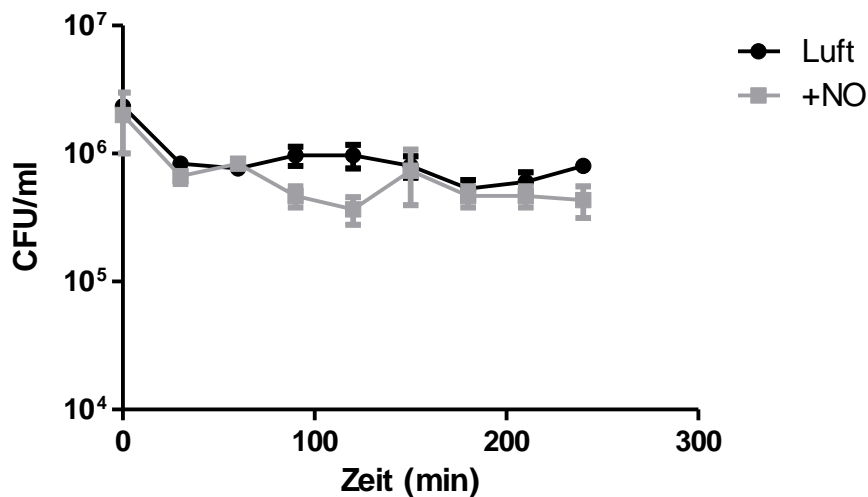
### **3 ERGEBNISSE**

Die folgenden Abbildungen sind die grafisch dargestellten Ergebnisse jeweils eines repräsentativen Experiments. Wenn nicht anders angegeben wurden die Versuche mindestens zweimal durchgeführt.

#### **3.1 gNO-Exposition von planktonischen Bakterien in einem Fermentersystem**

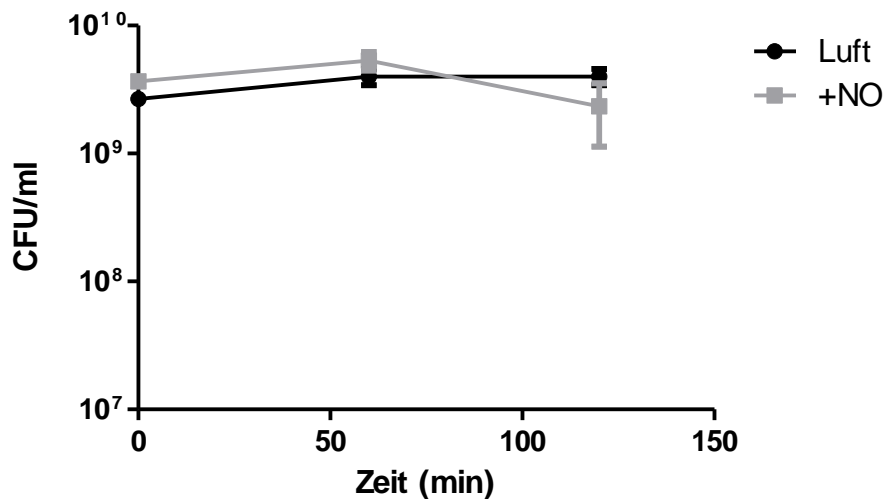
##### **3.1.1 Etablierung des Versuchsaufbaus**

Zur Etablierung des fermentergestützten Versuchsaufbaus auf die hier untersuchte Fragestellung wurden einige Vorversuche durchgeführt, um die optimalen Versuchsparameter für den bakteriziden Effekt von gNO auf planktonisch wachsende Bakterien herauszufinden. Die ersten Fermenterversuche wurden mit dem *P. aeruginosa* Laborstamm PAO1 und PBS als Medium im Fermenterkulturgefäß durchgeführt. Im Vergleich zu anderen Medien ist mit PBS eine relativ konstante Bakterienzahl während des Versuchs gewährleistet, da die Bakterien in PBS nicht wachsen. Nach 4 Stunden Begasung mit 200 ppm NO zeigte sich jedoch in der quantitativen Bestimmung keine signifikante Änderung der CFU / ml im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne NO (Abb. 7).



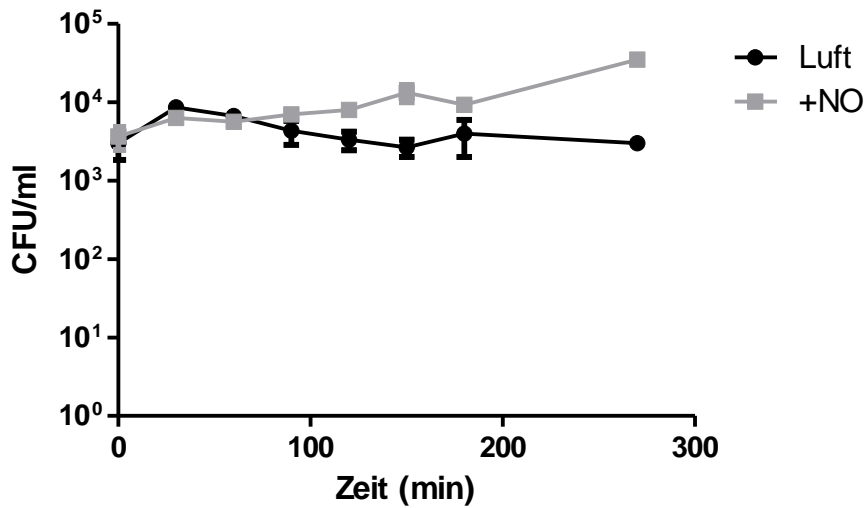
**Abbildung 7** Keimzahlbestimmung von *P. aeruginosa* (PAO1) in 1 l PBS und einer Startkonzentration von  $\sim 5 \times 10^6$  CFU/ml im Fermenter. Die Versuchsgruppe wurde mit 200 ppm gNO begast. Die Kontrollgruppe wurde mit Luft begast. Die Keimzahl sank in beiden Fermentern im untersuchten Zeitraum nur unwesentlich.

Um einen Effekt der Bakteriendichte auf den Effekt von gNO auszuschließen, wurde eine zweite Versuchsreihe mit einer anfänglichen Bakterienkonzentration im Medium von  $5 \times 10^9$  statt  $5 \times 10^6$  CFU/ml durchgeführt. Auch hier wurde keine signifikante Änderung der CFU/ml im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet (Abb. 8).

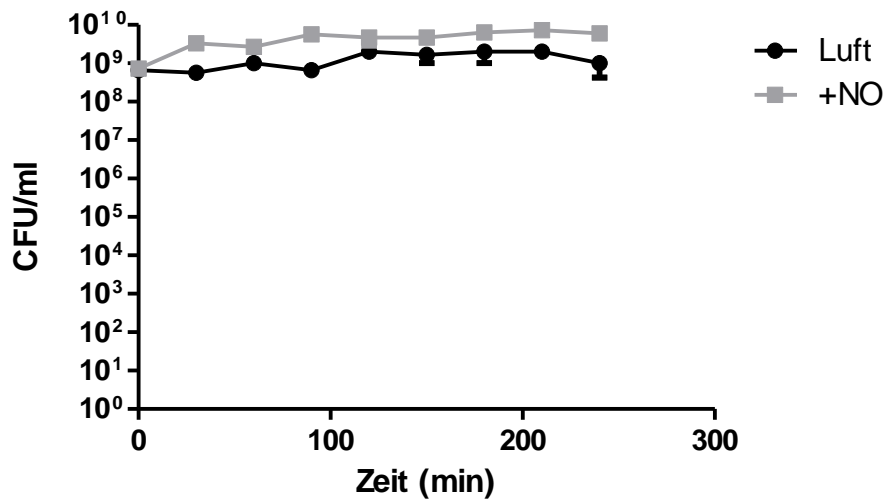


**Abbildung 8:** Keimzahlbestimmung von *P. aeruginosa* (PAO1) in 1 l PBS und einer Startkonzentration von  $\sim 5 \times 10^9$  CFU/ml im Fermenter. Die Versuchsgruppe wurde mit 200 ppm gNO begast. Die Kontrollgruppe wurde mit Luft begast. Die Keimzahl sank in beiden Fermentern im untersuchten Zeitraum nur unwesentlich.

Um auszuschließen, dass NO in dieser Applikationsform möglicherweise nur auf proliferierende Bakterien wirken kann, wurde das Medium variiert. PBS wäre in diesem Fall als Medium ungeeignet, da unter diesen Bedingungen kein Bakterienwachstum stattfinden kann. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden die Versuche in M9-Minimalnährmedium mit Glukose und in TSB Vollnährmedium wiederholt. Außerdem wurde wie in der eingangs erwähnten Studie (Regev-Shoshani et al. 2013a), 0,9% Saline als Flüssigmedium verwendet. Doch sowohl in TSB als auch in M9 und 0,9% Saline (Daten nicht gezeigt) konnte unter der Begasung von PAO1 mit 200ppm NO keine Verringerung der Bakterienzeldichte erzielt werden (Abb. 9 u. 10)



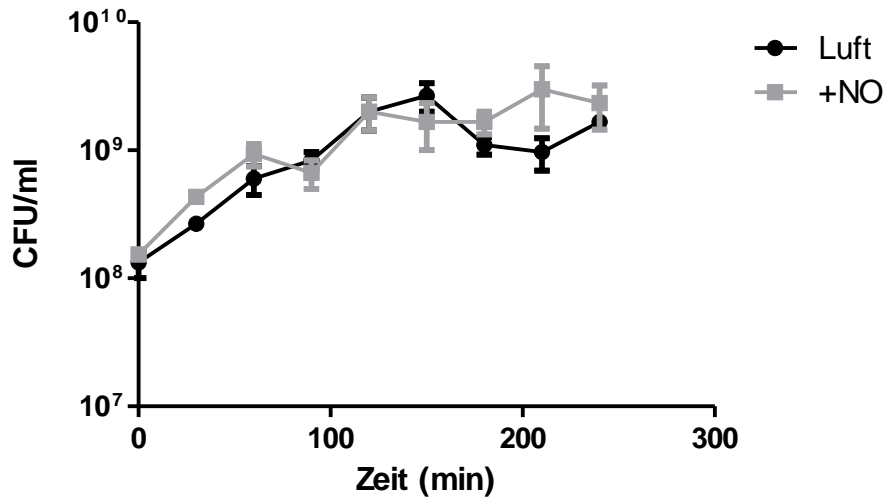
**Abbildung 9:** *P. aeruginosa* (PAO1) in 1 L M9 Minimalnährmedium und Glukose. Die Versuchsgruppe wurde mit 200 ppm NO begast.



**Abbildung 10:** *P. aeruginosa* (PAO1) in 1 l TSB unter 200 ppm NO Begasung.

Da PAO1 eine NO-Reduktase besitzt, welche NO zu anderen Metaboliten verstoffwechselt und somit die bakterizide Wirkung von NO reduzieren kann, wurden die Versuche zunächst mit einer anderen Bakterienspezies durchgeführt. Es wurde *S. aureus* (SA Tü 7) verwendet und der Versuch mit TSB als Nährmedium wiederholt (Abb.11). Hier zeigte sich sogar ein

Wachstum in Versuchs- und Kontrollgruppe. Ein sichtbarer Effekt des NO konnte nicht beobachtet werden.



**Abbildung 11:** *S. aureus* (SA Tü 7) in 1 l TSB mit 200 ppm NO Begasung

Nachdem mit den bisherigen Versuchen kein signifikanter Nachweis der Bakterientoxizität von NO erbracht werden konnte, wurde in Erwägung gezogen, dass das Model des Fermenters in dem Bakterien gelöst sind, nicht kongruent mit den *in vivo* Bedingungen einer bakterienbesiedelten Patientenlunge ist. *In vivo* sind Bakterien in der Patientenlunge in einer Sputumphase gelöst oder befinden sich integriert in einem bakteriellen Biofilm. Das NO muss hier nicht erst in 1 l Flüssigkeit gelöst werden, um mit den Bakterien in Kontakt zu kommen. NO selbst ist unter Standardbedingungen in Wasser mit einem Löslichkeitskoeffizienten von 67 mg/l schlecht löslich und konnte so eventuell gar nicht mit den Bakterien interagieren. Folglich lag die Dosis, denen planktonische Bakterien im bisherigen Versuchsaufbau ausgesetzt waren, vermutlich weit unter den therapeutisch notwendigen 160 ppm.

Um die Verfügbarkeit im Medium zu erhöhen und einen bakteriziden Effekt zu erzielen, wurde die gNO-Dosis deshalb auf 1000 ppm erhöht. Außerdem wurde die Gasflussstärke

am Steuergerät auf 3 l/min eingestellt. Als Fermentermedium wurde erneut 1 l PBS verwendet.

Mit diesen Einstellungen konnte nun erstmals PAO1 innerhalb von 4 h gNO Exposition vollständig eradiziert werden, während die CFU/ml in der Kontrollgruppe nahezu konstant blieben (Abb.12). Die bakterizide Wirkung von gNO konnte somit erstmals in den durchgeführten Versuchen gezeigt werden.

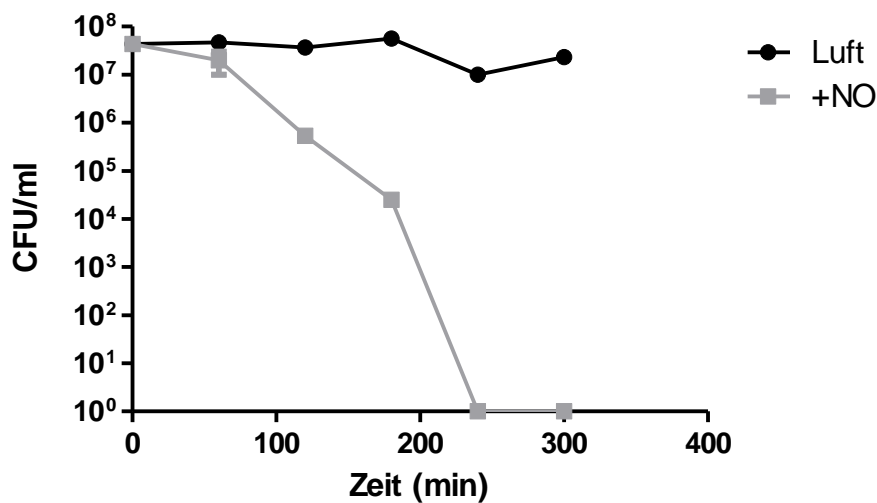
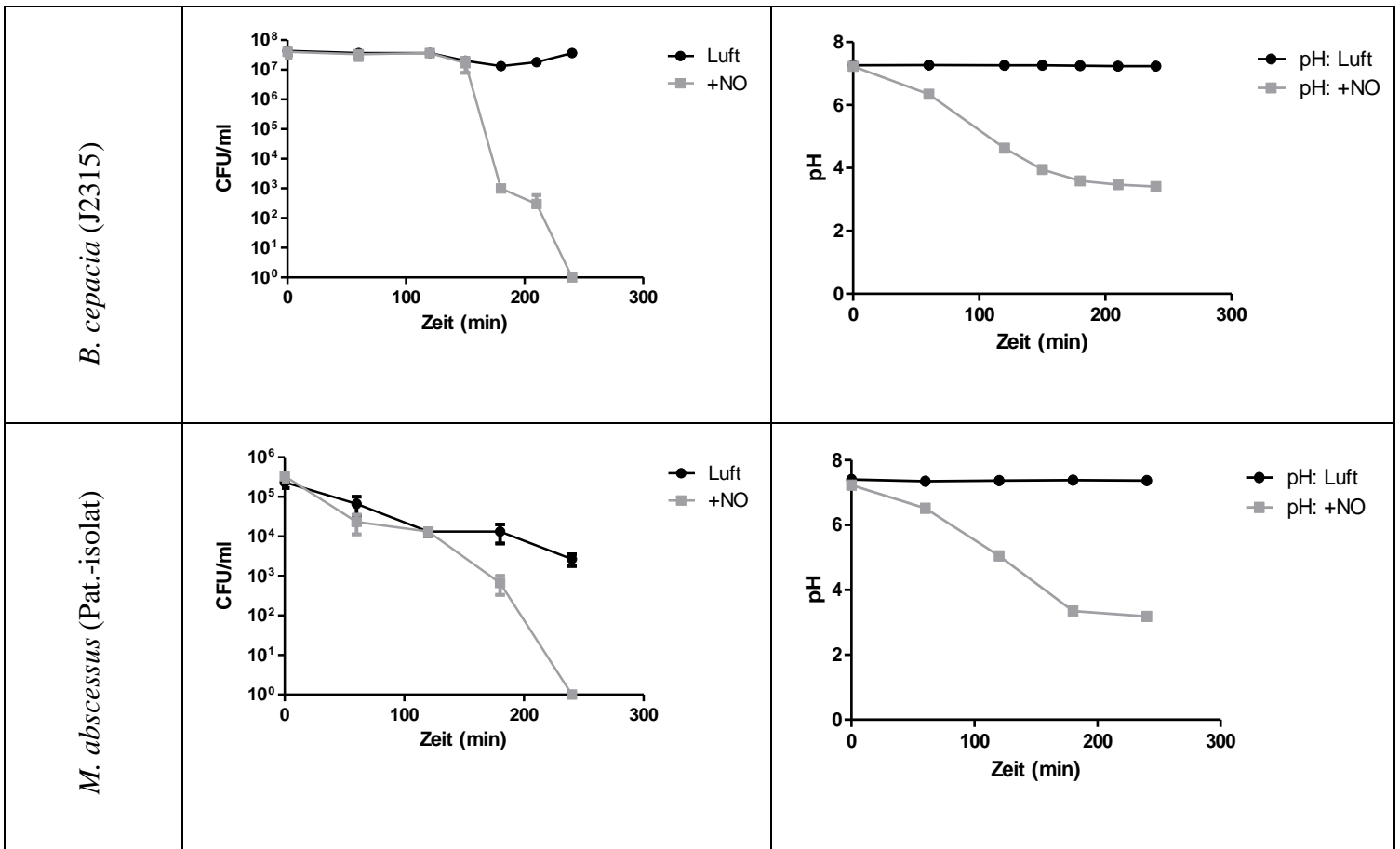


Abbildung 12 PAO1 in 1 l PBS mit 1000 ppm NO-Begasung

### 3.1.2 Versuche mit planktonischen CF-assozierten Bakterienstämmen

Nach der Etablierung wurden nun weitere CF-assozierte Bakterienstämme in diesem Versuchsaufbau getestet. Zu jedem Versuch wurde der pH-Verlauf über den gesamten Versuch aufgezeichnet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung dargestellt (Abb.13). Bei den verwendeten Stämmen handelte es sich um Isolate von CF Patienten.

Getesteter Bakterien- Stamm	CFU/ml über der Zeit	pH über der Zeit
<i>P. aeruginosa</i> (PA14)	<p>CFU/ml über der Zeit for <i>P. aeruginosa</i> (PA14). The graph shows that the presence of NO (+NO) leads to a complete reduction of bacterial concentration to 10<sup>0</sup> CFU/ml within 180 minutes, while the control (Luft) remains at 10<sup>8</sup> CFU/ml.</p>	<p>pH über der Zeit for <i>P. aeruginosa</i> (PA14). The pH of the +NO condition decreases significantly from approximately 7.2 to 2.2 over 240 minutes, while the pH of the Luft condition remains stable at approximately 7.2.</p>
<i>S. aureus</i> (SA Tü 7)	<p>CFU/ml über der Zeit for <i>S. aureus</i> (SA Tü 7). The +NO condition results in a reduction of bacterial concentration from 10<sup>8</sup> to 10<sup>2</sup> CFU/ml over 240 minutes, whereas the Luft condition remains near 10<sup>7</sup> CFU/ml.</p>	<p>pH über der Zeit for <i>S. aureus</i> (SA Tü 7). The pH of the +NO condition decreases from approximately 7.2 to 3.2 over 240 minutes, while the Luft condition remains stable at approximately 7.2.</p>
<i>E. coli</i> (Pat.-isolat)	<p>CFU/ml über der Zeit for <i>E. coli</i> (Pat.-isolat). The +NO condition leads to a complete reduction of bacterial concentration to 10<sup>0</sup> CFU/ml by 240 minutes, while the Luft condition remains at approximately 10<sup>7</sup> CFU/ml.</p>	<p>pH über der Zeit for <i>E. coli</i> (Pat.-isolat). The pH of the +NO condition decreases from approximately 7.2 to 3.2 over 240 minutes, while the Luft condition remains stable at approximately 7.2.</p>



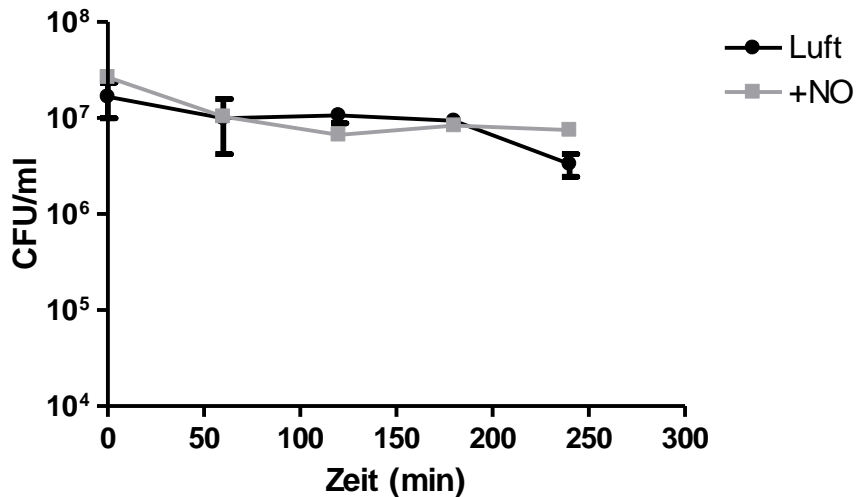
**Abbildung 13 CF-assoziierte Bakterienspezies in 1 l PBS bei 1000 ppm NO-Begasung für 4 h.** Für jede getestete Bakterienspezies wurde sowohl der Verlauf der CFU/ml aus den stündlich gewonnenen Proben ermittelt, als auch der bei jeder Probenentnahme gemessene pH-Wert dokumentiert. Diese Versuche wurden nur jeweils einmal durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die verwendete Dosis für alle getesteten Bakterien toxisch ist. Die CFU/ml reduzierte sich nach vierstündiger NO-Begasung bei dem verwendeten *S. aureus* (SA Tü 7) auf ca.  $10^2$  CFU/ml, bei allen anderen Bakterienstämmen sanken die CFU/ml unter die Nachweisgrenze. Bei Betrachtung der pH-Kurven wird deutlich, dass die Toxizität jedoch erst ab einem pH ca.  $<4$  auftritt. Sobald der pH-Wert der 1 L PBS-Lösung im Fermenter pH 4 unterschritt, fielen auch die CFU/ml rapide ab.

Ein weiterer Versuch sollte nun zeigen, ob man eine Bakterieneradikation im Fermenter auch ohne einen pH-Abfall unter 4 erreichen kann. Dazu wurde mit Hilfe des Steuergeräts



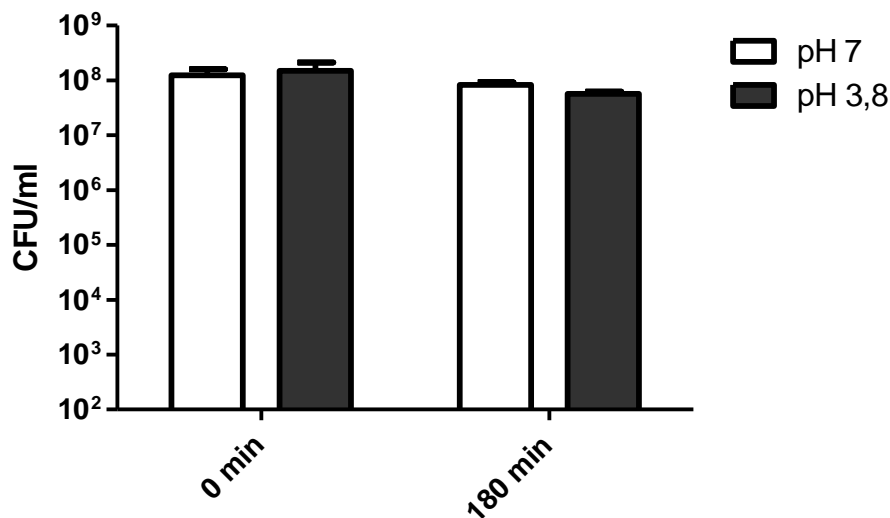
Natronlauge (NaOH) automatisch in das Kulturgefäß zugepumpt sobald der pH einen Wert von 6,5 unterschritt. Als Bakterienstamm wurde für diesen Versuch PA14 verwendet.



**Abbildung 14** PA14 in 1 L PBS, 1000 ppm Begasung und konstant gehaltenem pH 6,5. Dieser Versuch wurde nur einmal durchgeführt.

Abb.14 zeigt, dass die Bakterienzahl in den Fermentern konstant blieb, sobald auch der pH konstant gehalten wurde. Der pH-Abfall ist also notwendig damit die 1000 ppm gNO einen toxischen Effekt auf die Bakterien haben.

Um auszuschließen, dass das saure Milieu alleine für die Bakterienreduktion verantwortlich ist, wurde exemplarisch mit *B. cepacia* ein Säuretoleranzversuch durchgeführt (Abb.15). Hierbei wurde ein Glaskolben mit 50 ml PBS mit einer Ausgangskonzentration von ca.  $1 \times 10^8$  CFU/ml *B.cepacia* beimpft. Anschließend wurde der pH im Glaskolben auf pH 3,8 titriert. Nach dreistündiger Exposition im Schüttelbrutschrank, wurde erneut die CFU/ml bestimmt. Als Kontrolle wurden Bakterien bei gleichen Bedingungen einem pH von 7 ausgesetzt.



**Abbildung 15** *B. cepacia* (J2315) im Säuretoleranzversuch nach 3 h-Exposition in pH 7 (heller Balken) und pH 3,8 (dunkler Balken). Dieser Versuch wurde nur einmal durchgeführt.

Die Bakterienkonzentration reduzierte sich während der Inkubation bei pH 3,8 nur unwesentlich. Für die Bakterienreduktion in den o.g. Versuchen (Abb. 12, 13) war daher der toxische Effekt des gNO und dessen Beiprodukte und nicht das saure Milieu verantwortlich. Gleichzeitig war der pH-Abfall <4 notwendig, damit ein bakterizider Effekt von 1000 ppm gNO beobachtet werden konnte.

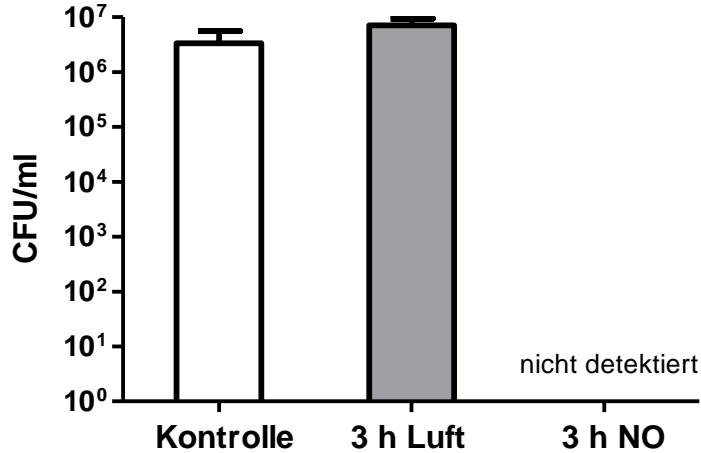
In den o.g. Versuchen (Abb. 12,13) konnte eine bakterizide Wirkung erst bei einem Partialdruck von 1000 ppm erzielt werden. Dieser Wert liegt um ein vielfaches höher als die Dosis in der eingangs erwähnten klinischen Studie, sowie in der Phase I-Studie mit gesunden Probanden verwendet wurde (Miller et al. 2012). Allerdings sind die Versuchsbedingungen nicht mit *in vivo* Bedingungen zu vergleichen und deshalb nicht auf die gNO Therapie anwendbar, zeigen aber die toxische Wirkung von gNO auf sämtliche getestete CF-assoziierte Bakterienstämme. Erhebliche Störgrößen sind die reduzierte Bioverfügbarkeit von NO in Flüssigkeiten und der Einfluss des pH-Werts. Um diese Störgrößen auszuschalten und die o.g. Ergebnisse (Abb.12,13) mit den *in vivo* Bedingungen

einer mit Biofilm besiedelten Patientenlunge besser vergleichen zu können, wurde der Versuchsaufbau des Calgary Biofilm Device hinzugezogen.

## **3.2 gNO-Expositionsversuche mit Bakterien in Biofilmen**

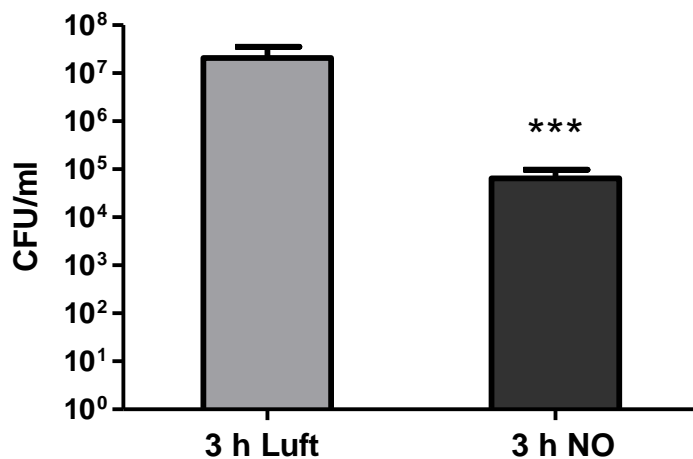
### **3.2.1 Etablierung des Versuchsaufbaus**

Es wurde mit dem unter 2.7 beschriebenen Versuchsaufbau untersucht, ob eine Dosis von 200 ppm ausreicht, um die Bakterienkonzentration in einem Biofilm zu senken. Mit diesem Versuchsaufbau muss NO nicht in Lösung gehen, sondern kann direkt mit den Oberflächenstrukturen bzw. Bakterien des Biofilms interagieren. Zunächst wurde eine mit *P. aeruginosa* (PA14)-Biofilm bewachsene Zapfenplatte, analog zu den Fermenterversuchen, einem NO Partialdruck von 1000 ppm (Abb.16), eine andere Biofilm-Zapfenplatte einem Partialdruck 200 ppm (Abb. 17) über 3 h ausgesetzt. Zu jedem Versuch wurde eine weitere mit PA14-Biofilm bewachsene Zapfenplatte 3 h befeuchteter Luft (medical air) ausgesetzt. Eine dritte Platte repräsentierte die Kontrollgruppe. In der Kontrollgruppe wurden die Bakterien direkt nach der Anzucht von den Zapfen gelöst und die CFU/ml bestimmt (Kontrolle) um zu untersuchen, ob die Behandlung mit 3 h Luft einen Einfluss auf die CFU/ml hat. Jeder der Folgenden Abbildungen repräsentiert ein unabhängiges Experiment.



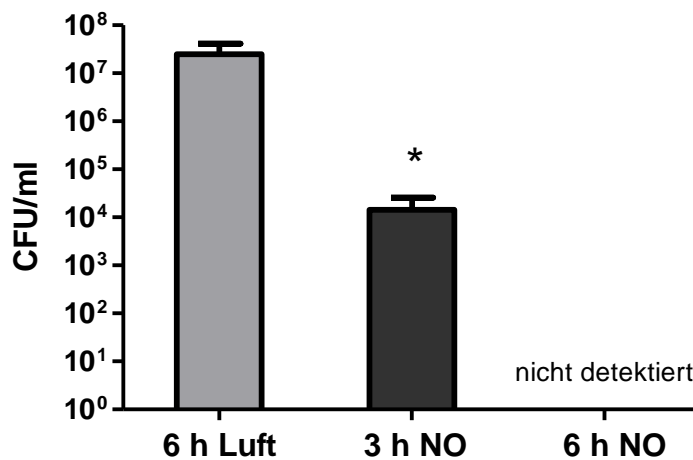
**Abbildung 16** PA14-Biofilm wurde 3 h einem NO-Partialdruck von 1000 ppm ausgesetzt. Eine zweite Zapfenlatte wurde mit 3 h Luft begast. Eine dritte Platte repräsentiert die Kontrollgruppe. Die Kontrolle spiegelt den Ausgangswert an Bakterien im Biofilm wieder. Dieser Versuch wurde nur einmal durchgeführt.

Die Versuchsergebnisse zeigen, dass PA14 nach 3 h mit 1000 ppm NO unter die Nachweisgrenze abgetötet wurde. Außerdem ist zu erkennen, dass sich die CFU/ml der Kontrollgruppe zu der mit 3 h Luft behandelten Gruppe kaum unterscheidet. Dieses Ergebnis belegt, dass die Applikation von befeuchteter Luft ohne NO nahezu keinen Einfluss auf die CFU/ml der Biofilme hat. Dies zeigte sich auch in den folgenden Experimenten. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde in den folgenden Grafiken die Kontrollgruppe nicht mit aufgeführt.



**Abbildung 17** PA14-Biofilm wurde 3 h einem NO-Partialdruck von 200 ppm ausgesetzt.

Mit 200 ppm NO ist eine Reduktion der CFU/ml um ~3 Zehnerpotenzen gegenüber der mit Luft behandelten Biofilme zu beobachten (Abb. 17) \*\*\*, P value <0.0005 (Welch's t test). Der Versuch wurde auf 6 h ausgeweitet, um zu untersuchen, ob eine weitere Bakterienreduktion bei längerer Exposition mit 200 ppm NO zu beobachten ist.



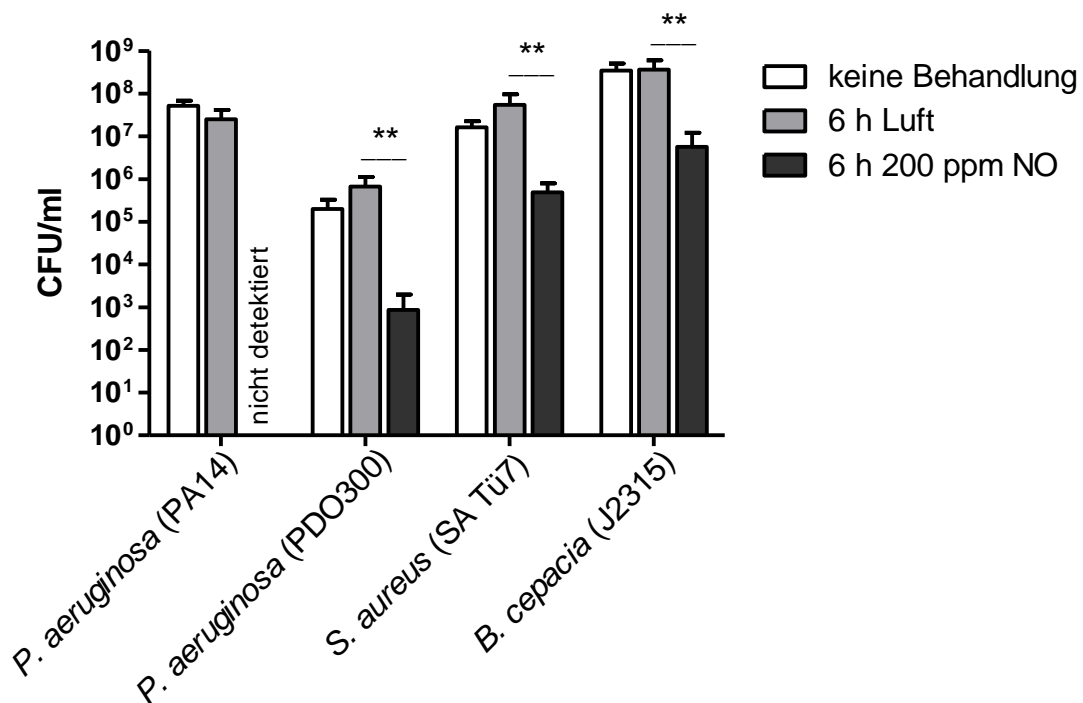
**Abbildung 18** PA-14 Biofilm wurde 6 h einem NO-Partialdruck von 200 ppm ausgesetzt. Die Erste mit Biofilm bestückte Zapfenplatte wurde nach 3 h der Expositionskammer entnommen, die Zweite nach 6 h. Die dritte Zapfenplatte wurde mit 6 h Luft begast.

Die Reduktion der Bakterienzahl nach 3 h NO Begasung um ~3 Zehnerpotenzen konnte reproduziert werden. Nach 6-stündiger Exposition sind bei 200 ppm NO keine *P. aeruginosa* im Biofilm mehr nachweisbar (Abb.18). \*, P value <0.05 (Mann Whitney U Test)(Vergleich zwischen 6 h Luft und 3 h NO)

Mit dem so etablierten Versuch konnten nun weitere bakterielle Erreger für die bekannt ist, dass sie Biofilme bilden und die aus CF-Patientenlungen isoliert wurden, untersucht werden.

### 3.2.2 Anwendung von gNO auf Biofilme CF assoziierter Erreger

Hierzu wurden *P. aeruginosa* (PDO300), *S. aureus* (SA-Tü-7) und *B. cepacia* (J2315) den etablierten Versuchsbedingungen ausgesetzt (Abb.19).



#### Abbildung 19 Ergebnisse der Biofilmversuche

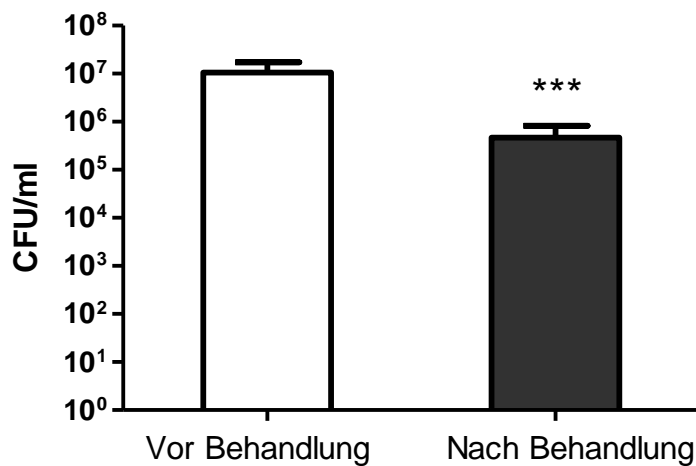
Die verschiedenen Bakterienspezies wurden 6 h einem NO-Partialdruck von 200 ppm ausgesetzt. Eine zweite Zapfenlatte mit den jeweiligen Bakterienspezies wurde mit 6 h Luft begast. Eine dritte Platte repräsentiert die Kontrollgruppe. In der Kontrollgruppe wurden

die verschiedenen Biofilme direkt nach der Anzucht (t=0) von den Zapfen gelöst (keine Behandlung) und die CFU/ml bestimmt, um zu untersuchen, ob die Behandlung mit 6 h Luft einen Einfluss auf die CFU/ml hat.

Die Ergebnisse zeigten, dass gNO auf den Biofilm jeder untersuchten Bakterienspezies einen toxischen Effekt hatte, wobei die Stämme unterschiedlich sensibel auf die Behandlung reagierten. Während PA14 nach 6 h komplett eradiziert wurde, fiel die Bakterienkonzentration bei PDO300-Biofilm um ~3 Zehnerpotenzen (3 log-Stufen) im Vergleich zur Behandlung mit Luft von  $\sim 7 \times 10^5$  auf  $\sim 9 \times 10^2$  (\*\*, P value <0.005 (Welch's t test)). Die Bakterienkonzentration von SA Tü-7-Biofilm fiel um ~2 Zehnerpotenzen von  $\sim 5 \times 10^7$  auf  $\sim 5 \times 10^5$  (\*\*, P value <0.005 (Welch's t test)). Den geringsten Konzentrationsunterschied im Vergleich zur Behandlung mit Luft konnte bei *B. cepacia* (J2315) verzeichnet werden. Hier reduzierte sich die Bakterienkonzentration von  $\sim 4 \times 10^8$  auf  $\sim 6 \times 10^6$ , also um ~2 Zehnerpotenzen (\*\*, P value <0.005 (Welch's t test)). Die unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen der Bakterienstämme kommen dadurch zustande, indem sich streng an das unter 2.7.1 aufgeführte Anzuchtprotokoll gehalten wurde. Weil die Bakterienstämme mit unterschiedlicher Geschwindigkeit wuchsen, variierte deren Konzentration zum Versuchsstart.

### **3.2.3 Intermittierende Begasungstechnik mit gNO**

Aufgrund der Bildung toxischer Level an Methämoglobin und Serumnitrat im Patientenblut ist eine 6-stündige Inhalation von 200 ppm NO im klinischen Alltag nicht realisierbar. In Anlehnung an die Anwendung von NO bei infizierten CF-Patientenlungen wurde deshalb ein Versuchsaufbau mit intermittierender NO-Exposition auf die *in vitro* Versuche übernommen. In einer ersten klinischen Studie inhalierten CF-Patienten, in 3 h-Abständen, 30 min lang, ein NO-Luftgemisch mit anteilig ca. 200 ppm gNO. Im Experiment wurde dies mit einer intermittierenden 30 min gNO-Begasung mit anschließender dreistündiger Luft-Begasung umgesetzt. Dieser Zyklus wurde fünfmal wiederholt, was einer Gesamtbegasung mit NO von 2,5 h entspricht.



**Abbildung 20** PA-14 Biofilm wurde einer intermittierenden 200 ppm NO-Dosis von 5x30 min ausgesetzt. Zwischen den 30 min gNO-Begasung wurde eine Pause von jeweils 3 h eingelegt. Dieser Versuch wurde nur einmal durchgeführt.

Es zeigte sich eine Reduktion der CFU/ml um mehr als 1,5 Zehnerpotenzen im Vergleich zum Ausgangswert von  $\sim 1 \times 10^7$  auf  $\sim 4,7 \times 10^5$  (Abb.20). \*\*\*, P value  $< 0.0005$  (Welch's t test). Auch mit einer intermittierenden Behandlungsart ließ sich also die Zahl der Bakterien in einem Biofilm reduzieren, jedoch nicht so effektiv wie mit einer vergleichbaren Zeitdosis unter konstanter Begasung (Vgl. Abb. 17).



## 4 DISKUSSION

Intensive Forschung und immer weiter entwickelte Regimen in der antimikrobiellen Therapie haben die Lebenserwartung von CF-Patienten bereits signifikant erhöht. Trotzdem ist die langfristige Besiedelung der Lungen durch verschiedene Bakterienspezies, angeführt von *P. aeruginosa*, maßgeblich verantwortlich für die Morbidität und Mortalität bei CF-Patienten (Hoiby and Koch 1990, Hoiby et al. 2005). Die fortschreitende Resistenzbildung der Bakterienstämme gegen Antibiotika sowie die problematische Behandlung von Bakterien in Biofilmen fordern die Entwicklung von neuen Therapiestrategien und potentiellen antimikrobiellen Substanzen.

Es wurde bereits gezeigt, dass appliziertes gNO nachweislich antimikrobielle Eigenschaften gegen planktonisch wachsende Bakterien hat (Ghaffari et al. 2006, Miller et al. 2013). Die toxische Wirkung auf Bakterien beruht vermutlich auf nitrosativen und oxidativen Eigenschaften von NO. Diese führen dazu, dass bakterielle Bestandteile wie Proteine, DNA und Membranlipide nitrosyliert oder oxidiert werden und so ihre Funktion verlieren (Ridnour et al. 2004, Hetrick et al. 2008). Die genauen zu Grunde liegenden Mechanismen sind bisher jedoch nicht vollständig verstanden.

### 4.1 gNO wirkt auf CF-assozierte planktonische Bakterien toxisch

Die Ergebnisse der in dieser Studie durchgeführten Fermenterversuche konnten die Toxizität von gNO auf planktonisch wachsende Bakterienstämme, die typisch für CF-Patienten sind, bestätigen. Dies betrifft die Stämme *B. cepacia* (J2315), *E. coli* (ESBL-Patientenisolat), *M. abscessus* (Patientenisolat), *P. aeruginosa* (PAO1), *P. aeruginosa* (PA14, Patientenisolat) und *S. aureus* (Tü 7; Patientenisolat) (Abb.12,13). Die erhobenen Resultate sind vergleichbar mit den Ergebnissen vorheriger Studien, bei denen die bakteriostatischen und bakteriotoxischen Eigenschaften von gNO in verschiedenen Applikationsformen auf *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *E. coli* gezeigt wurden (McMullin et al. 2005, Ghaffari et al. 2006). Weiterhin wurde in dieser Studie experimentell gezeigt, dass

das breite Wirkspektrum von gNO auch multiresistente Keime wie *B. cepacia* und *M. abscessus* mit einbezieht, die mit einer schnellen Verschlechterung der Lungenfunktion sowie einer schlechten Prognose in Zusammenhang gebracht werden (Lewis et al. 2003, Uyan et al. 2010).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine weitaus höhere NO-Dosis benötigt wurde, als in anderen vergleichbaren Studien und weitaus mehr als klinisch realisierbar ist. Um die getesteten Bakterien in 4 h weitgehend zu eradizieren, wurden statt 160-200 ppm NO-Partialdruck eine Dosis von 1000 ppm NO benötigt. Die höhere benötigte Dosis liegt vermutlich in dem gewählten Versuchsaufbau begründet. Die geringe Löslichkeit von NO unter Standardbedingungen in Wasser mit einem Löslichkeitskoeffizienten von 67 mg/l (AIR\_LIQUIDE\_Deutschland\_GmbH 2013) resultiert in einem erheblichen Dosisverlust im Flüssigmedium. Da sich die Bakterien im Flüssigmedium befinden, ist der NO-Partialdruck, welchem die Bakterien ausgesetzt sind, entsprechend geringer als der von den verwendeten Instrumenten in der Gasphase gemessene Partialdruck. Jedoch auch mit einer erhöhten Dosis von 1000 ppm, konnte eine signifikante Reduktion der Bakterienzahl erst erzielt werden, wenn durch die konstante gNO Zuleitung der pH-Wert im Kulturgefäß auf unter pH 4 fiel (Abb.13, 14). Der verminderte pH alleine ist jedoch nicht für die toxische Wirkung auf die Bakterien verantwortlich, wie die Ergebnisse des pH-Toleranzversuchs zeigten (Abb.15). Der beobachtete bakteriotoxische Effekt liegt also wahrscheinlich in der NO-Wirkung begründet.

## 4.2 Der durch Nitritbildung fallende pH hat großen Einfluss auf die Verfügbarkeit von NO im Flüssigmedium

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Toxizität von NO wurde schon in anderen aktuellen Studien beobachtet. Regev-Shoshani et al. untersuchten die Wirkung von gNO in wässriger Lösung auf Dermatophyten (Hautpilze), sowie Influenzaviren. Hierbei wurde beschrieben, dass der antimikrobielle Effekt von NO erheblich verstärkt, in Kombination mit einem nitrithaltigem Flüssigmediums mit pH 3,7, nachweisbar ist, obwohl der pH von 3,7 alleine keinerlei Effekt auf die Vitalität der Mikroorganismen hatte (Regev-Shoshani et al. 2013a, Regev-Shoshani et al. 2013b). Es liegt also nahe, dass der sinkende pH-Wert einen Effekt auf die Bioverfügbarkeit von NO hat.

Andererseits haben Armor et. al 1974 beschrieben, dass die Löslichkeit von NO in wässriger Lösung im pH Bereich von 2-13 konstant ist und die H<sup>+</sup>-Konzentration somit keinen Einfluss auf die Löslichkeit von NO im verwendeten Flüssigmedium besitzt, jedenfalls nicht in dem pH-Bereich in welchem sich die o.g. Versuche bewegen (Abb.13).

Um die ablaufenden Prozesse im Fermenter näherungsweise erklären zu können, werden zunächst kurz einige Aspekte zur NO-Chemie betrachtet. Der in Abb.14 verzeichnete pH-Abfall bei allen durchgeführten Versuchen, kann mit Hilfe der eingangs erwähnten chemischen Eigenschaften von NO erklärt werden. NO wird in Flüssigkeiten unter Anwesenheit von O<sub>2</sub> nach der vereinfachten Reaktionsgleichung

$4\text{NO} + \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow 4\text{NO}_2^- + 4\text{H}^+$  oxidiert (Armor 1974, Ignarro et al. 1993).

Die dabei entstehende Salpetrige Säure (HNO<sub>2</sub>) ist für die Verringerung des pH Wertes verantwortlich. Zunächst werden die Protonen durch den Phosphatpuffer im verwendeten PBS neutralisiert. Ab einer gewissen Menge an NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (Nitrit) ist die Pufferkapazität jedoch erschöpft und der pH fällt. Erst bei zunehmender Nitritanreicherung, sichtbar durch den sinkenden pH, wird die Flüssigkeit zunehmend zu einer „Nitric Oxide Releasing Solution“ (NORS), einer Lösung, die nicht nur NO aufnimmt, sondern auch wieder freisetzt (Regev-Shoshani et al. 2013a, Regev-Shoshani et al. 2013b). Eine mögliche Erklärung ist die Verschiebung des chemischen Gleichgewichts während des Versuches. Je mehr salpetrige

Säure durch die Zuführung von NO in H<sub>2</sub>O unter konstanter Sauerstoffzufuhr gebildet wird, desto weiter verschiebt sich das Reaktionsgleichgewicht auf die Seite der Edukte. Die Lösung ist zunehmend mit NO-Reaktionsprodukten gesättigt und die Reaktionsgeschwindigkeit zum Produkt HNO<sub>2</sub> sinkt. Somit wird NO aus der Lösung wieder freigesetzt und kann mit den Bakterien interagieren. Dabei gilt laut Regev-Shoshani, Vimalanathan et al. 2013b folgendes: Je länger die Expositionszeit und je größer die gNO-Konzentration (Partialdruck) des zugeführten Gases ist, umso schneller und tiefer sinkt der pH, umso höher wurde die Konzentration von HNO<sub>2</sub> im Kulturgefäß und umso stärker war die antimikrobielle Potenz gegen die getesteten Mikroorganismen. Dies konnte auch in den durchgeführten Versuchen dieser Arbeit bestätigt werden. Diese Kausalkette lässt vermuten, dass auch ein NO-Partialdruck von 200 ppm im zuführenden Gas ausreichen würde, um einen bakteriziden Effekt im Flüssigmedium zu erzielen. Dies würde aber eine längere Zeit in Anspruch nehmen, wenn das Medium nicht zu Versuchsstart bereits mit Nitriten gesättigt ist. Diese Hypothese müsste in zukünftigen Versuchen verifiziert werden.

Da der Versuchsaufbau mit planktonischen Bakterien jedoch weit entfernt von den *in vivo* Bedingungen in der Lunge eines CF-Patienten ist, wurden die weiteren Versuche zur Wirkung von gNO auf Biofilme durchgeführt.

### **4.3 CF-assoziierte Bakterien in Biofilmen können durch 200 ppm gNO abgetötet werden**

Die Ergebnisse der Biofilmversuche zeigen, dass die Applikation einer Dosis von 200 ppm gNO ausreichend ist, um destruktiv auf den Biofilm und/oder toxisch auf die darin befindlichen Bakterien zu wirken, welche im Gegensatz zu den Fermenterversuchen nicht in einem Flüssigmedium gelöst, sondern in sessiler Form im Biofilm integriert sind. Dies betrifft die getesteten Stämme *P. aeruginosa* (PA14), *P. aeruginosa* (PDO300), *S. aureus* (Tü 7) und *B. cepacia* (J2315) wobei die Stämme unterschiedlich sensibel auf die Exposition reagierten (Abb.19).

Bei der therapeutischen Verwendung von bakteriotoxischen Dosen gNO (100-200 ppm) wäre eine kontinuierliche Applikation über Stunden hinweg klinisch derzeit nicht möglich,

da diese Dosen erheblichen nitrosativen Stress auf das Lungengewebe ausüben und zu toxischen Methämoglobinleveln im Patientenblut führen würden (Young et al. 1994, Young et al. 1996). Diese Nebenwirkungen können jedoch durch die intermittierende Applikation von bakteriotoxischen Dosen gNO mit 30 min gNO-Begasung und mehrstündigen Begasungspausen auf ein tolerables Level reduziert werden (Miller et al. 2012). Wie in Abb. 20 aufgeführt konnte nachgewiesen werden, dass gNO auch bei der intermittierenden Begasungsform einen bakteriotoxischen Effekt auf einen *P. aeruginosa*-Biofilm besitzt. Jedoch scheint die intermittierende Begasungsform (~1,5 log CFU/ml-Reduktion) weniger effektiv zu sein als eine vergleichbare Zeitdosis kontinuierlicher Begasung (~3 log CFU/ml-Reduktion) (Abb.17, 18). Dies könnte mit dem Wachstum der Bakterien des Biofilms in den begasungsfreien Intervallen oder auch mit der Adaptation der Bakterien an nitrosativen Stress zusammenhängen.

Die beobachteten biofilmzerstörenden Eigenschaften von 200 ppm gNO sind ansatzweise mit zwei verschiedenen Prozessen erklärbar: Zum einen die bereits erwähnten antimikrobiellen Eigenschaften von NO (s.o.), zum anderen fungiert NO als Signalmolekül in den dynamischen Auf- und Abbauprozessen von Biofilmen:

Explizit initiiert NO den bakteriellen Zelltod in Biofilmen sowie die Konvertierung von sessilen Bakterien zu ihrer planktonischen Form. Dieser als „Biofilm dispersal“ (Deutsch: Biofilmzerstreuung, -dispersion) bekannte Vorgang spielt eine Rolle bei der Ausbreitung von Biofilm (Barraud et al. 2015). Die Rolle von NO als Signalmolekül des Biofilmzyklus wurde erstmals für *P. aeruginosa* von Barraud et. al 2006 beschrieben, ist aber auch bei einer großen Zahl anderer Spezies wie z.B. *E. coli* oder *S. aureus* beobachtet worden (Schlag et al. 2007, Barraud et al. 2009).

Erst kürzlich wurde der zu Grunde liegende Mechanismus untersucht. Vermutlich aktiviert NO bakterielle Phosphodiesterasen, die wiederum das intrazelluläre Level von c-di-GMP senken (Barraud et al. 2009). C-di-GMP ist ein ubiquitärer sekundärer Botenstoff und fungiert als zentraler Regulator vieler wichtiger bakterieller Prozesse, unter anderem der

Biofilmbildung (Romling et al. 2013). Somit sorgt NO dafür, dass sich Bakterien wieder aus der Biofilmgemeinschaft lösen und in den planktonischen Zustand übergehen.

#### **4.4 Möglichkeiten der Integrierung von gNO in die CF Therapie**

Die bakteriziden und biofilmdispersiven Eigenschaften von NO eröffnen Möglichkeiten, neue und effiziente Therapien gegen biofilmassoziierte Erkrankungen wie CF zu entwickeln und Antibiotikaresistenzen zu umgehen. Während die Exposition von höheren NO Dosen (100-200 ppm) zusätzlich einen toxischen Effekt auf Bakterien besitzt, zeigen auch geringere NO Dosen, dass sie Biofilmdispersion initiieren können und aus dem Biofilm freigesetzte planktonische Bakterien wieder erhöhte Sensibilität auf eine Vielzahl von antibiotischen Substanzen haben (Barraud et al. 2009). Dies legt nahe, dass die standardmäßige antibiotische Therapie bei Biofilm-assoziierten Infektionserkrankungen von einer Ergänzung mit NO profitieren kann. In diesem Zuge könnten schon geringe Dosen NO ausreichen, um über den c-di-GMP Signalweg Biofilmdispersion zu initiieren und somit die aus dem Biofilm herausgelösten Bakterien wieder sensibel auf herkömmliche Antibiotika zu machen.

Eine erste klinische Studie beschäftigt sich mit der Wirkung einer Kombination von „low dose“ gNO mit Antibiotika bei CF. Hierbei wurden 12 CF Patienten mit akuter Exazerbation und *P. aeruginosa* Besiedelung der Lungen mit einer Kombination aus „low dose“ gNO (5-10 ppm) für 8 h täglich und zusätzlich intravenöser Ceftazidim/ Tobramycin Antibiose therapiert. Nach 7 Tagen Therapie zeigte sich eine signifikante Reduktion der *P. aeruginosa* Biofilmaggregate und der CFU/ml sowie eine leichte Verbesserung der Lungenfunktion im Vergleich zur Placebogruppe, die anstatt mit 5-10 ppm gNO mit Luft behandelt wurde (Cathie et al. 2014).

Ein weiterer Ansatzpunkt für die Therapie bei CF wäre die Applikation von gNO in Kombination mit der durch Herrmann et al. 2010 favorisierten inhalativen Tobramycin- und Colistintherapie (Herrmann et al. 2010). Hierbei könnte womöglich ein stärkerer Synergieeffekt von inhalativen Antibiotika und inhalativem NO durch ihre gleiche lokale

Applikation erzielt werden als bei intravenöser Antibiose. Künftige Versuche müssen untersuchen, ob es sinnvoller ist, die CF Therapie durch „low dose“ gNO, oder intermittierendem 100-200 ppm gNO zu ergänzen. Dabei haben gNO Dosen von 100-200 ppm vermutlich sowohl bakteriotoxische als auch biofilmdispersive Eigenschaften, erzeugen aber Nebenwirkungen bei den Patienten. „Low dose“ gNO hingegen scheint nicht toxisch für Bakterien zu sein, jedoch initiiert es ebenfalls Biofilmdispersion und vermindert somit die bakterioprotektiven Eigenschaften eines Biofilms gegenüber Antibiotika, ohne dabei gravierende Nebenwirkungen zu verursachen (Ghaffari et al. 2006, Barraud et al. 2009, Barraud et al. 2015).

In der Abwesenheit chronischer Infektionen wäre es weiterhin denkbar, gNO als Infektionsprophylaxe zu applizieren. Allerdings müssen gleichzeitig praktikablere Applikationsgeräte entwickelt werden, die den einfachen Umgang mit inhalativem NO und eine präzise Dosierung ermöglichen. Mit einer intensiven Patientenschulung wäre es dann durchaus möglich, gNO auch im ambulanten Behandlungssektor einzusetzen.

#### **4.5 Unterschiedliche Toleranz der getesteten Bakterienspezies**

Beim Vergleich der Ansprechraten fällt auf, dass *P. aeruginosa* in den Biofilmversuchen die größte Reduktion der CFU/ml aufweist. PA14 konnte nach 6 h á 200 ppm gNO vollständig eradiziert werden, Beim exzessiven Alginatbildner PDO300 fiel die Bakterienkonzentration um ~3 Zehnerpotenzen. Bei *S. aureus* und *B. cepacia* hingegen konnte bei gleicher Behandlung lediglich eine Reduktion der CFU/ml um ~2 Zehnerpotenzen verzeichnet werden. Ebenfalls war der verwendete *S. aureus* bei den bereits diskutierten Fermentationsversuchen der einzige Stamm, welcher nach 4 h á 1000 ppm gNO noch Kolonien bildete. Der NO-Metabolismus jeder einzelnen verwendeten Bakterienspezies ist bisher noch nicht hinreichend aufgeklärt, jedoch sind einige Ergebnisse anderer Autoren kongruent mit den Beobachtungen aus dieser Studie. Allgemein scheint *P. aeruginosa* nitrosativen Stress schlechter zu tolerieren als *S. aureus*. Dies konnte auch bei McMullin et al. 2005 beobachtet werden, welcher diese beiden Bakterienspezies in planktonischer Wachstumsform gNO aussetzte, ähnlich der in dieser Studie durchgeführten

Fermentationsversuche. Es zeigte sich eine vollständige Eradikation von *P. aeruginosa* nach 2 h, bei *S. aureus* hingegen erst nach 4 h (McMullin et al. 2005).

Die geringere Ansprechrate vom mukoiden PDO300 im Vergleich zu PA14 ist durch seine exzessive Produktion an Exopolysaccharid zu erklären. Mukoide *P. aeruginosa* wie PDO300 sind charakteristisch für die späten Stadien der chronischen Lungeninfektion bei CF (Govan and Deretic 1996, Bjarnsholt et al. 2009). Das von PDO300 exzessiv gebildete Alginat hat einen protektiven Effekt gegenüber antibakteriellen Substanzen und Immunzellen (Leid et al. 2005). Es wurde beschrieben, dass stimulierte Makrophagen von CF-Patienten nicht genügend freie Radikale produzieren können, um Alginat zu degradieren und weiterhin, dass die Alginatproduktion von *P. aeruginosa* durch oxidativen Stress hochreguliert wird (Bayer et al. 1990, Simpson et al. 1993). Somit ist es denkbar, dass mukoiden Pseudomonaden durch das produzierte Alginat vor freien Radikalen wie NO und seinen nitrosativen wie oxidativen Eigenschaften partiell geschützt werden.

Analog zu den mukoiden *P. aeruginosa* Stämmen ist auch das Vorkommen von *B. cepacia* meist in den chronischen Infektionsstadien der CF zu beobachten und geht überdies mit einer hohen Mortalität einher. Dabei ist *B. cepacia* gekennzeichnet durch eine hohe Resistenz gegen antibiotische Therapie und stellt ein großes Problem für die klinische Behandlung der CF dar. (Lyczak et al. 2002, Regan and Bhatt 2014). *B. cepacia* reagierte auf die Begasung mit gNO in den Biofilmversuchen deutlich weniger sensibel als PA14. Jedoch zeigt *B. cepacia* bei den Ergebnissen anderer Studien eine ähnliche Sensitivität auf nitrosativen Stress wie *P. aeruginosa* (Major et al. 2010). Dabei führten Major et al. 2010 die Versuche in nitrithaltigem Flüssigmedium durch. Die Ergebnisse sind vereinbar mit den in dieser Arbeit durchgeführten Fermenterversuchen, in denen *B. cepacia* nach 4 h eradiziert werden konnte.



## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Chronische Atemwegsinfektionen haben den größten Einfluss auf Morbidität und Mortalität bei Patienten mit cystischer Fibrose (CF). Dabei ist die Bildung von Biofilm ein wesentlicher Mechanismus für die Persistenz verschiedener Bakterienspezies in den Atemwegen, was eine antibiotische Eradikation kaum noch möglich macht. Deshalb ist es notwendig, neue antibiotische Substanzen zu finden, die gegen multiresistente CF-assoziierte Keime in Biofilmen, bakterizid wirken und gleichzeitig klinisch gut applizierbar sind. Das Radikal Stickstoffmonoxid (NO) hat durch seine nitrosativen und oxidativen Eigenschaften bei einer Dosis von 100-200 ppm nachweislich eine breite antibiotische Potenz gegen Bakterien, Viren und Pilze. Weiterhin wurde bereits gezeigt, dass inhalatives NO (gNO), intermittierend appliziert bei gesunden Probanden gut toleriert wird. In einer klinischen Studie der Universitätskinderklinik Tübingen wurde mit der inhalativen gNO-Therapie gute Ergebnisse hinsichtlich der bakteriellen Besiedelung und der Lungenparameter gezeigt. Diese Arbeit untersucht *in vitro* die Wirkung von 200 ppm gNO auf CF-assoziierte Bakterien in planktonischer Form wie auch im Biofilm. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass gNO ein suffizientes Agens ist, um für die CF charakteristische Bakterienspezies abzutöten, oder zumindest in ihrer Zahl deutlich zu vermindern. Für die planktonische Wachstumsform hat sich die Verwendung von Flüssigmedium als beachtliche Störgröße herausgestellt. Um einen Effekt zu beobachten, musste hier die Dosis erheblich erhöht werden. Bei der Begasung von Biofilmen genügte 200 ppm gNO, um einen bakteriziden Effekt zu demonstrieren. Explizit die Biofilme des *P. aeruginosa* Patientenisolat PA14 zeigten eine vergleichsweise gute Sensibilität und konnten nach 6 h Begasung mit 200 ppm gNO komplett eradiziert werden. Da *P. aeruginosa* der Leitkeim der CF ist und mit zunehmendem Alter die Inzidenz dieses Bakteriums in CF-Patientenlungen auf über 70% steigt, scheint die Therapie mit gNO eine vielversprechende Therapieergänzung zu sein. Ziel weiterer Forschung sollte es sein, die Wirkung verschiedener gNO-Dosen und Applikationsformen *in vivo* zu evaluieren und optimal an die CF-Therapie anzupassen.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

AIR\_LIQUIDE\_Deutschland\_GmbH (2013). "Sicherheitsdatenblatt Stickstoffmonoxid." <http://www.airliquide.de/gasekatalog/sdb/088-DE-DE-Stickstoffmonoxid.pdf> (besucht am 30.03.2015).

Angles, M. L., K. C. Marshall and A. E. Goodman (1993). "Plasmid Transfer between Marine Bacteria in the Aqueous Phase and Biofilms in Reactor Microcosms." Appl Environ Microbiol **59**(3): 843-850.

Armor, J. N. (1974). "Influence of Ph and Ionic-Strength Upon Solubility of No in Aqueous-Solution." Journal of Chemical and Engineering Data **19**(1): 82-84.

Auerbach, H. S., M. Williams, J. A. Kirkpatrick and H. R. Colten (1985). "Alternate-day prednisone reduces morbidity and improves pulmonary function in cystic fibrosis." Lancet **2**(8457): 686-688.

Barraud, N., D. J. Hassett, S. H. Hwang, S. A. Rice, S. Kjelleberg and J. S. Webb (2006). "Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*." Journal of bacteriology **188**(21): 7344-7353.

Barraud, N., M. J. Kelso, S. A. Rice and S. Kjelleberg (2015). "Nitric oxide: a key mediator of biofilm dispersal with applications in infectious diseases." Curr Pharm Des **21**(1): 31-42.

Barraud, N., D. Schleheck, J. Klebensberger, J. S. Webb, D. J. Hassett, S. A. Rice and S. Kjelleberg (2009). "Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal." J Bacteriol **191**(23): 7333-7342.

Barraud, N., M. V. Storey, Z. P. Moore, J. S. Webb, S. A. Rice and S. Kjelleberg (2009). "Nitric oxide-mediated dispersal in single- and multi-species biofilms of clinically and industrially relevant microorganisms." Microbial biotechnology **2**(3): 370-378.

Barry, P. J., B. J. Plant, A. Nair, S. Bicknell, N. J. Simmonds, N. J. Bell, N. T. Shafi, T. Daniels, S. Shelmerdine, I. Felton, C. Gunaratnam, A. M. Jones and A. R. Horsley (2014). "Effects of Ivacaftor in cystic fibrosis patients carrying the G551D mutation with severe lung disease." Chest.

Bayer, A. S., F. Eftekhar, J. Tu, C. C. Nast and D. P. Speert (1990). "Oxygen-dependent up-regulation of mucoid exopolysaccharide (alginate) production in *Pseudomonas aeruginosa*." Infection and immunity **58**(5): 1344-1349.

Bjarnsholt, T., P. O. Jensen, M. J. Fiandaca, J. Pedersen, C. R. Hansen, C. B. Andersen, T. Pressler, M. Givskov and N. Hoiby (2009). "*Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients." Pediatr Pulmonol **44**(6): 547-558.

Brooun, A., S. Liu and K. Lewis (2000). "A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." Antimicrob Agents Chemother **44**(3): 640-646.

Brown, M. R., D. G. Allison and P. Gilbert (1988). "Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect?" J Antimicrob Chemother **22**(6): 777-780.

Canton, R., N. Cobos, J. de Gracia, F. Baquero, J. Honorato, S. Gartner, A. Alvarez, A. Salcedo, A. Oliver, E. Garcia-Quetglas and P. Spanish Consensus Group for Antimicrobial Therapy in the Cystic Fibrosis (2005). "Antimicrobial therapy for pulmonary pathogenic colonisation and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients." Clin Microbiol Infect **11**(9): 690-703.

Cathie, K., R. Howlin and M. Carroll (2014). "G385 RATNO – Reducing Antibiotic Tolerance using Nitric Oxide in Cystic Fibrosis: report of a proof of concept clinical trial." Arch Dis Child **99**:A159 doi:10.1136/archdischild-2014-306237.367

Ceri, H., M. E. Olson, C. Stremick, R. R. Read, D. Morck and A. Buret (1999). "The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms." J Clin Microbiol **37**(6): 1771-1776.

Chillon, M., T. Casals, B. Mercier, L. Bassas, W. Lissens, S. Silber, M. C. Romey, J. Ruiz-Romero, C. Verlingue, M. Claustres and et al. (1995). "Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens." N Engl J Med **332**(22): 1475-1480.

Costerton, J. W., P. S. Stewart and E. P. Greenberg (1999). "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections." Science **284**(5418): 1318-1322.

Cystic\_Fibrosis\_Foundation (2012). "Annual Data Report 2012." <http://www.cysticfibrosisdata.org/LiteratureRetrieve.aspx?ID=149756> (besucht am 13.01.2014).

Cystic\_Fibrosis\_Genetic\_Analysis\_Consortium (2013). "Cystic Fibrosis Mutation Database." <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html> (besucht am 13.01.2014).

Davey, M. E. and A. O'Toole G (2000). "Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics." Microbiol Mol Biol Rev **64**(4): 847-867.

Davies, D. G., M. R. Parsek, J. P. Pearson, B. H. Iglewski, J. W. Costerton and E. P. Greenberg (1998). "The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm." Science **280**(5361): 295-298.

De Groote, M. A. and F. C. Fang (1995). "NO inhibitions: antimicrobial properties of nitric oxide." Clin Infect Dis **21 Suppl 2**: S162-165.

de Winter-de Groot, K. M. and C. K. van der Ent (2005). "Nitric oxide in cystic fibrosis." J Cyst Fibros **4 Suppl 2**: 25-29.

Donlan, R. M. and J. W. Costerton (2002). "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms." Clin Microbiol Rev **15**(2): 167-193.

Doring, G., S. P. Conway, H. G. Heijerman, M. E. Hodson, N. Hoiby, A. Smyth and D. J. Touw (2000). "Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus." Eur Respir J **16**(4): 749-767.

Doring, G., N. Hoiby and G. Consensus Study (2004). "Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus." J Cyst Fibros **3**(2): 67-91.

Fang, F. C. (1997). "Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity." Journal of Clinical Investigation **100**(12): S43-S50.

Fang, F. C. (1997). "Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity." J Clin Invest **99**(12): 2818-2825.

Fang, F. C. (2004). "Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies." Nat Rev Microbiol **2**(10): 820-832.

FitzSimmons, S. C. (1993). "The changing epidemiology of cystic fibrosis." J Pediatr **122**(1): 1-9.

Frederiksen, B., C. Koch and N. Hoiby (1999). "Changing epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infection in Danish cystic fibrosis patients (1974-1995)." Pediatr Pulmonol **28**(3): 159-166.

Ghaffari, A., R. Jalili, M. Ghaffari, C. Miller and A. Ghahary (2007). "Efficacy of gaseous nitric oxide in the treatment of skin and soft tissue infections." Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society **15**(3): 368-377.

Ghaffari, A., C. C. Miller, B. McMullin and A. Ghahary (2006). "Potential application of gaseous nitric oxide as a topical antimicrobial agent." Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society **14**(1): 21-29.

Gibson, R. L., J. Emerson, S. McNamara, J. L. Burns, M. Rosenfeld, A. Yunker, N. Hamblett, F. Accurso, M. Dovey, P. Hiatt, M. W. Konstan, R. Moss, G. Retsch-Bogart, J. Wagener, D. Waltz, R. Wilmott, P. L. Zeitlin, B. Ramsey and G. Cystic Fibrosis Therapeutics Development Network Study (2003). "Significant microbiological effect of inhaled tobramycin in young children with cystic fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **167**(6): 841-849.

Gilbert, P., J. Das and I. Foley (1997). "Biofilm susceptibility to antimicrobials." Adv Dent Res **11**(1): 160-167.

Govan, J. R. and V. Deretic (1996). "Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*." Microbiol Rev **60**(3): 539-574.

Greenberg, E. P. (2003). "Bacterial communication: tiny teamwork." Nature **424**(6945): 134.

Hauber HP, R. D., Pforte A (2001). "Epidemiologie der CF - Erkrankung." **Springer - Verlag**.

Herrmann, G., L. Yang, H. Wu, Z. Song, H. Wang, N. Hoiby, M. Ulrich, S. Molin, J. Riethmuller and G. Doring (2010). "Colistin-tobramycin combinations are superior to monotherapy concerning the killing of biofilm *Pseudomonas aeruginosa*." J Infect Dis **202**(10): 1585-1592.

Hetrick, E. M., J. H. Shin, H. S. Paul and M. H. Schoenfisch (2009). "Anti-biofilm efficacy of nitric oxide-releasing silica nanoparticles." Biomaterials **30**(14): 2782-2789.

Hetrick, E. M., J. H. Shin, N. A. Stasko, C. B. Johnson, D. A. Wespe, E. Holmuhamedov and M. H. Schoenfisch (2008). "Bactericidal efficacy of nitric oxide-releasing silica nanoparticles." ACS nano **2**(2): 235-246.

Hoiby, N., T. Bjarnsholt, M. Givskov, S. Molin and O. Ciofu (2010). "Antibiotic resistance of bacterial biofilms." Int J Antimicrob Agents **35**(4): 322-332.

Hoiby, N., B. Frederiksen and T. Pressler (2005). "Eradication of early *Pseudomonas aeruginosa* infection." J Cyst Fibros **4 Suppl 2**: 49-54.

Hoiby, N. and C. Koch (1990). "Cystic fibrosis. 1. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis and its management." Thorax **45**(11): 881-884.

Hoyle, B. D. and J. W. Costerton (1991). "Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms." Prog Drug Res **37**: 91-105.

Ignarro, L. J., J. M. Fukuto, J. M. Griscavage, N. E. Rogers and R. E. Byrns (1993). "Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(17): 8103-8107.

Kaplan, E., H. Shwachman, A. D. Perlmutter, A. Rule, K. T. Khaw and D. S. Holsclaw (1968). "Reproductive failure in males with cystic fibrosis." N Engl J Med **279**(2): 65-69.

- Kelley, T. J. and M. L. Drumm (1998). "Inducible nitric oxide synthase expression is reduced in cystic fibrosis murine and human airway epithelial cells." J Clin Invest **102**(6): 1200-1207.
- Kerem, B., J. M. Rommens, J. A. Buchanan, D. Markiewicz, T. K. Cox, A. Chakravarti, M. Buchwald and L. C. Tsui (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis." Science **245**(4922): 1073-1080.
- Lawrence, J. R., D. R. Korber, B. D. Hoyle, J. W. Costerton and D. E. Caldwell (1991). "Optical sectioning of microbial biofilms." J Bacteriol **173**(20): 6558-6567.
- Leid, J. G., C. J. Willson, M. E. Shirtliff, D. J. Hassett, M. R. Parsek and A. K. Jeffers (2005). "The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing." J Immunol **175**(11): 7512-7518.
- Lewis, M. J., E. H. Lewis, 3rd, J. A. Amos and G. J. Tsongalis (2003). "Cystic fibrosis." Am J Clin Pathol **120 Suppl**: S3-13.
- Lindemann H, T. B., Dockter G (2004). "Mukoviszidose - Zystische Fibrose." **Thieme**.
- Littlewood, J. M., M. G. Miller, A. T. Ghoneim and C. H. Ramsden (1985). "Nebulised colomycin for early pseudomonas colonisation in cystic fibrosis." Lancet **1**(8433): 865.
- Lyczak, J. B., C. L. Cannon and G. B. Pier (2002). "Lung infections associated with cystic fibrosis." Clin Microbiol Rev **15**(2): 194-222.
- MacLean, A., X. Q. Wei, F. P. Huang, U. A. Al-Alem, W. L. Chan and F. Y. Liew (1998). "Mice lacking inducible nitric-oxide synthase are more susceptible to herpes simplex virus infection despite enhanced Th1 cell responses." J Gen Virol **79** ( Pt 4): 825-830.
- MacMicking, J., Q. W. Xie and C. Nathan (1997). "Nitric oxide and macrophage function." Annu Rev Immunol **15**: 323-350.
- MacMicking, J. D., R. J. North, R. LaCourse, J. S. Mudgett, S. K. Shah and C. F. Nathan (1997). "Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(10): 5243-5248.
- Mah, T. F. and G. A. O'Toole (2001). "Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents." Trends Microbiol **9**(1): 34-39.
- Major, T. A., W. Panmanee, J. E. Mortensen, L. D. Gray, N. Hoglen and D. J. Hassett (2010). "Sodium nitrite-mediated killing of the major cystic fibrosis pathogens *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Burkholderia cepacia* under anaerobic planktonic and biofilm conditions." Antimicrob Agents Chemother **54**(11): 4671-4677.

Mancinelli, R. L. and C. P. McKay (1983). "Effects of nitric oxide and nitrogen dioxide on bacterial growth." Appl Environ Microbiol **46**(1): 198-202.

Maragos, C. M., D. Morley, D. A. Wink, T. M. Dunams, J. E. Saavedra, A. Hoffman, A. A. Bove, L. Isaac, J. A. Hrabie and L. K. Keefer (1991). "Complexes of .NO with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide. Vasorelaxant effects." J Med Chem **34**(11): 3242-3247.

Marletta, M. A., M. A. Tayeh and J. M. Hevel (1990). "Unraveling the biological significance of nitric oxide." Biofactors **2**(4): 219-225.

McCord, J. M. and I. Fridovich (1978). "The biology and pathology of oxygen radicals." Ann Intern Med **89**(1): 122-127.

McIlwaine, M. P. and A. G. Davidson (1996). "Airway clearance techniques in the treatment of cystic fibrosis." Curr Opin Pulm Med **2**(6): 447-451.

McMullin, B. B., D. R. Chittock, D. L. Roscoe, H. Garcha, L. Wang and C. C. Miller (2005). "The antimicrobial effect of nitric oxide on the bacteria that cause nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients in the intensive care unit." Respiratory care **50**(11): 1451-1456.

Mendelman, P. M., A. L. Smith, J. Levy, A. Weber, B. Ramsey and R. L. Davis (1985). "Aminoglycoside penetration, inactivation, and efficacy in cystic fibrosis sputum." Am Rev Respir Dis **132**(4): 761-765.

Miller, C., M. Miller, B. McMullin, G. Regev, L. Serghides, K. Kain, J. Road and Y. Av-Gay (2012). "A phase I clinical study of inhaled nitric oxide in healthy adults." J Cyst Fibros **11**(4): 324-331.

Miller, C. C., C. A. Hergott, M. Rohan, K. Arsenault-Mehta, G. Doring and S. Mehta (2013). "Inhaled nitric oxide decreases the bacterial load in a rat model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia." Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society.

Miller, C. C., M. K. Miller, A. Ghaffari and B. Kunimoto (2004). "Treatment of chronic nonhealing leg ulceration with gaseous nitric oxide: a case study." Journal of cutaneous medicine and surgery **8**(4): 233-238.

Moller, M. N., Q. Li, J. R. Lancaster, Jr. and A. Denicola (2007). "Acceleration of nitric oxide autoxidation and nitrosation by membranes." IUBMB Life **59**(4-5): 243-248.

Moncada, S., R. M. Palmer and E. A. Higgs (1991). "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology." Pharmacol Rev **43**(2): 109-142.

Morrall, N., J. Bertranpetit, X. Estivill, V. Nunes, T. Casals, J. Gimenez, A. Reis, R. Varon-Mateeva, M. Macek, Jr., L. Kalaydjieva and et al. (1994). "The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations." Nat Genet **7**(2): 169-175.

Ratjen, F. and G. Doring (2003). "Cystic fibrosis." Lancet **361**(9358): 681-689.

Regan, K. H. and J. Bhatt (2014). "Eradication therapy for Burkholderia cepacia complex in people with cystic fibrosis." Cochrane Database Syst Rev **10**: CD009876.

Regev-Shoshani, G., A. Crowe and C. C. Miller (2013a). "A nitric oxide-releasing solution as a potential treatment for fungi associated with tinea pedis." J Appl Microbiol **114**(2): 536-544.

Regev-Shoshani, G., M. Ko, C. Miller and Y. Av-Gay (2010). "Slow release of nitric oxide from charged catheters and its effect on biofilm formation by Escherichia coli." Antimicrobial agents and chemotherapy **54**(1): 273-279.

Regev-Shoshani, G., S. Vimalanathan, B. McMullin, J. Road, Y. Av-Gay and C. Miller (2013b). "Gaseous nitric oxide reduces influenza infectivity in vitro." Nitric Oxide-Biology and Chemistry **31**: 48-53.

Ridnour, L. A., D. D. Thomas, D. Mancardi, M. G. Espey, K. M. Miranda, N. Paolocci, M. Feelisch, J. Fukuto and D. A. Wink (2004). "The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations." Biol Chem **385**(1): 1-10.

Riordan, J. R., J. M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J. L. Chou and et al. (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA." Science **245**(4922): 1066-1073.

Robinson, M., A. L. Hemming, J. A. Regnis, A. G. Wong, D. L. Bailey, G. J. Bautovich, M. King and P. T. Bye (1997). "Effect of increasing doses of hypertonic saline on mucociliary clearance in patients with cystic fibrosis." Thorax **52**(10): 900-903.

Romling, U., M. Y. Galperin and M. Gomelsky (2013). "Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger." Microbiol Mol Biol Rev **77**(1): 1-52.

Rommens, J. M., M. C. Iannuzzi, B. Kerem, M. L. Drumm, G. Melmer, M. Dean, R. Rozmahel, J. L. Cole, D. Kennedy, N. Hidaka and et al. (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping." Science **245**(4922): 1059-1065.

Schlag, S., C. Nerz, T. A. Birkenstock, F. Altenberend and F. Gotz (2007). "Inhibition of staphylococcal biofilm formation by nitrite." J Bacteriol **189**(21): 7911-7919.



- Sermet-Gaudelus, I. (2013). "Ivacaftor treatment in patients with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation." Eur Respir Rev **22**(127): 66-71.
- Shak, S., D. J. Capon, R. Hellmiss, S. A. Marsters and C. L. Baker (1990). "Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(23): 9188-9192.
- Simpson, J. A., S. E. Smith and R. T. Dean (1993). "Alginate may accumulate in cystic fibrosis lung because the enzymatic and free radical capacities of phagocytic cells are inadequate for its degradation." Biochem Mol Biol Int **30**(6): 1021-1034.
- Stamler, J. S. (1995). "S-nitrosothiols and the bioregulatory actions of nitrogen oxides through reactions with thiol groups." Curr Top Microbiol Immunol **196**: 19-36.
- Stoodley, P., D. Debeer and Z. Lewandowski (1994). "Liquid flow in biofilm systems." Appl Environ Microbiol **60**(8): 2711-2716.
- Stoodley, P., K. Sauer, D. G. Davies and J. W. Costerton (2002). "Biofilms as complex differentiated communities." Annu Rev Microbiol **56**: 187-209.
- Sutherland, I. (2001a). "Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework." Microbiology **147**(Pt 1): 3-9.
- Sutherland, I. W. (2001b). "The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment." Trends Microbiol **9**(5): 222-227.
- Szaff, M. and N. Hoiby (1982). "Antibiotic treatment of Staphylococcus aureus infection in cystic fibrosis." Acta Paediatr Scand **71**(5): 821-826.
- U.S. Food and Drug Administration (2013). Pediatric Focused Safety Review: INOmax®(nitric oxide): <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/PediatricAdvisoryCommittee/UCM343569.pdf> (besucht am 02.04.2015).
- Uyan, Z. S., R. Ersu, S. Oktem, E. Cakir, O. K. Koksalan, B. Karadag, F. Karakoc and E. Dagli (2010). "Mycobacterium abscessus infection in a cystic fibrosis patient: a difficult to treat infection." The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease **14**(2): 250-251.
- Valerius, N. H., C. Koch and N. Hoiby (1991). "Prevention of chronic Pseudomonas aeruginosa colonisation in cystic fibrosis by early treatment." Lancet **338**(8769): 725-726.
- Wang, P. G., M. Xian, X. Tang, X. Wu, Z. Wen, T. Cai and A. J. Janczuk (2002). "Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications." Chem Rev **102**(4): 1091-1134.

Webb, J. S., L. S. Thompson, S. James, T. Charlton, T. Tolker-Nielsen, B. Koch, M. Givskov and S. Kjelleberg (2003). "Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development." J Bacteriol **185**(15): 4585-4592.

Webert, K. E., J. Vanderzwan, M. Duggan, J. A. Scott, D. G. McCormack, J. F. Lewis and S. Mehta (2000). "Effects of inhaled nitric oxide in a rat model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia." Critical care medicine **28**(7): 2397-2405.

Wink, D. A., J. F. Darbyshire, R. W. Nims, J. E. Saavedra and P. C. Ford (1993). "Reactions of the bioregulatory agent nitric oxide in oxygenated aqueous media: determination of the kinetics for oxidation and nitrosation by intermediates generated in the NO/O<sub>2</sub> reaction." Chem Res Toxicol **6**(1): 23-27.

Wink, D. A. and J. B. Mitchell (1998). "Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide." Free radical biology & medicine **25**(4-5): 434-456.

Worlitzsch, D., R. Tarran, M. Ulrich, U. Schwab, A. Cekici, K. C. Meyer, P. Birrer, G. Bellon, J. Berger, T. Weiss, K. Botzenhart, J. R. Yankaskas, S. Randell, R. C. Boucher and G. Doring (2002). "Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients." J Clin Invest **109**(3): 317-325.

Young, J. D., O. Dyar, L. Xiong and S. Howell (1994). "Methaemoglobin production in normal adults inhaling low concentrations of nitric oxide." Intensive Care Med **20**(8): 581-584.

Young, J. D., J. W. Sear and E. M. Valvini (1996). "Kinetics of methaemoglobin and serum nitrogen oxide production during inhalation of nitric oxide in volunteers." Br J Anaesth **76**(5): 652-656.

Zaidi, S., O. Elidemir, J. S. Heinle, E. D. McKenzie, M. G. Schechter, S. L. Kaplan, M. K. Dishop, D. L. Kearney and G. B. Mallory (2009). "Mycobacterium abscessus in cystic fibrosis lung transplant recipients: report of 2 cases and risk for recurrence." Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society **11**(3): 243-248.

# ***In vitro* Untersuchungen zur Wirkung von Stickstoffmonoxidgas auf cystische Fibrose assoziierte Bakterien und deren Biofilme**

Johannes Kellert

## **Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene zunächst unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Gerd Döring und nach dessen Ableben durch Herrn Prof. Dr. Ingo B. Autenrieth durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Gerd Döring in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Annika Schmidt, die meine Arbeit mitbetreute.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Frau Dr. Annika Schmidt und Frau Maria Haug von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Frau Dr. Sandra Schwarz, in deren Forschungsgruppe diese Arbeit eingegliedert wurde.

Die Literaturrecherche erfolgte ausschließlich durch mich.

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

## **Danksagung**

Mein Dank gilt Prof. Dr. Gerd Döring (verstorben am 02. Juli 2013), der mir die Möglichkeit gab, an diesem interessanten Thema in seinen Laborräumen im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene zu arbeiten. Sein konstruktiver Rat und die hilfreichen Diskussionen trotz schwerer körperlicher Krankheit waren von enormem Wert für mich.

Ich danke Prof. Dr. Ingo B. Autenrieth der anschließend die Betreuung meiner Arbeit übernahm und Dr. Sandra Schwarz, die mich in ihre Forschungsgruppe aufnahm und mit ihrer wissenschaftlichen Expertise zur Seite stand.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Annika Schmidt und Maria Haug für ihre langjährige Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung.

## **Curriculum vitae**

Name: Johannes Kellert

Geburtsdatum: 29.10.1991

Geburtsort: Erfurt

Nationalität: Deutsch

Schule:

1998-2002: Grundschule in Erfurt

2002-2010: Edith-Stein-Gymnasium Erfurt

Studium: Humanmedizin

10/2010-09/2012: Vorklinischer Abschnitt, Eberhard-Karls-Universität Tübingen

09/2012: 1. Ärztliche Prüfung

09/2012-aktuell: Klinischer Abschnitt, Eberhard-Karls-Universität Tübingen

10/2015: Schriftlicher Teil der 2. Ärztlichen Prüfung

29.11.2016: Mündlicher Teil der Ärztlichen Prüfung

Promotion:

2013-2016: Am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen