

**Mikroevolution von *Pseudomonas aeruginosa* in Isolaten  
von Patienten mit cystischer Fibrose**

Von der  
Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

**Doktorin der Naturwissenschaften**

Dr. rer. nat.  
genehmigte Dissertation

von

Dipl. Biochem. Nina Cramer  
geboren am 20.04.1978 in Leer

2009

**Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Burkhard Tümmler im Zeitraum vom 01.08.2005 – 31.01.2009 in der klinischen Forschergruppe „Molekulare Pathologie der Mukoviszidose“ im Zentrum Biochemie und Zentrum Kinderheilkunde der Medizinischen Hochschule Hannover angefertigt.**

Referent: Prof. Dr. Dr. Burkhard Tümmler  
Klinische Forschergruppe Molekulare Pathologie der Mukoviszidose  
Zentrum Biochemie und Zentrum Kinderheilkunde der Medizinischen  
Hochschule Hannover

Korreferent: Prof. Dr. Peter Valentin-Weigand  
Institut für Mikrobiologie, Zentrum für Infektionsmedizin  
Tierärztliche Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 06.07.2009

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

### **Erklärung nach § 6 Absatz 1b der Ordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät für die Promotion zum Doktor/Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover**

Hiermit erkläre ich, die hier vorliegende Dissertation selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie die zu Hilfsleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben zu haben.

Diese Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 01.05.2009

.....

Nina Cramer

# DANKSAGUNG

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Dr. Burkhard Tümmler für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, sein stetes Interesse und seine engagierte Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Peter Valentin-Weigand danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. Burkhard Tümmler und Frau Helga Riehn-Kopp danke ich für die gelungene Organisation der International Research Training Group „*Pseudomonas*: Pathogenicity and Biotechnology“, sowie der DFG für die Finanzierung dieses Projekts.

Bei Dr. Lutz Wiehlmann möchte ich mich für seine Betreuung und seine Begeisterung bedanken, mit der er mich zwischendurch wieder aufgerichtet hat, als nichts funktionierte. Danke auch für den unerschütterlichen Glauben daran, dass alles gut wird.

Dr. Frauke Stanke und Dr. Jens Klockgether danke ich dafür, dass ich mit allen praktischen Problemen zu ihnen kommen durfte.

Ebenso möchte ich mich herzlich bei meinen Laborkollegen Sarah, Steffi, Silke, Sonja, Antje, Gesa und allen anderen der jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der Klinischen Forschergruppe für die Unterstützung, die Hilfsbereitschaft und die vielen schönen Stunden während und nach der Arbeit bedanken.

Besonders möchte ich mich auch bei meinen Eltern bedanken, die mich während der gesamten Zeit mit Rat und Tat unterstützt haben.

Allen meinen Freunden gilt mein großer Dank für ihre Freundschaft und Unterstützung in den letzten Monaten. Besonderer Dank gilt Maike, Insa und Sarah für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Ihr habt tapfer durchgehalten!

Der Kindertagesstätte „Die Hirtenkinder“ danke ich für die tolle Betreuung meines Sohnes.

Oma Luise danke ich dafür, dass sie des häufigeren den weiten Weg von Ostfriesland nach Hannover auf sich genommen hat, um in den Zeiten auf Jesse aufzupassen, in denen er durch Krankheit nicht zur KiTa gehen konnte.

Meinem Ehemann Herwig und meinem Sohn Jesse danke ich für die moralische Unterstützung während der Doktorarbeit und vor allem für ihre grenzenlose Geduld mir gegenüber während der letzten Monate, in denen er und Jesse oft auf mich verzichten mussten. Schön euch beide an meiner Seite zu haben!

*Gewidmet  
meinem Sohn Jesse*

## Kurzfassung

*Pseudomonas aeruginosa* ist ein Bakterium, welches sich durch die Vielseitigkeit in der Substratverwertung und das lange Überleben unter nährstoffarmen Bedingungen auszeichnet. Diese hohe metabolische Versatilität führt zu einer Nachweisbarkeit in unterschiedlichen Habitaten. Neben der Umwelt stellt vor allem auch der Mensch einen bevorzugten Kolonisationsraum dar.

Zur Analyse der allgemeinen Populationsstruktur wurden in einem ersten Schritt verschiedene *P. aeruginosa* Isolate aus einem breiten Spektrum an Habitaten und unterschiedlicher geographischer Herkunft mit Hilfe eines SNP-Chips genotypisiert. Es wurde eine hohe Klondiversität nachgewiesen, die sich nicht in eine Gleichverteilung der Klone aufgliedern lässt. Sie weist einerseits einige wenige sehr häufig vorkommende Klone (dominante Klone), andererseits sehr viele Einzelklone auf. Die dominanten Klone wurden dabei ubiquitär in verschiedenen Habitaten detektiert. Durch eine eBurst- und eine Hauptkomponentenanalyse konnte nachgewiesen werden, dass das Genom von *P. aeruginosa* eine Mosaikstruktur aufweist, die sich durch klon-spezifische Segmente des Kern- und des akzessorischen Genoms sowie durch frei rekombinierbare Blöcke charakterisieren lässt. *P. aeruginosa* zeigt nach dieser Analyse sowohl Merkmale einer klonalen als auch einer panmiktischen Populationsstruktur. Der Vergleich dieser Sammlung an Isolaten mit zwei europaweiten Studien sowie einer lokalen Isolatsammlung ergab vergleichbare klonale Spektren mit wenigen dominierenden Klonen und vielen Einzelklonen.

Der zweite Teil der Arbeit befasste sich detaillierter mit der Erkrankung der Cystischen Fibrose (CF) und der Besiedlung der CF-Lunge mit *P. aeruginosa*. Der Vergleich verschiedener Isolate aus den oberen und unteren Atemwegen von CF-Patienten zeigte in 24 von 25 Fällen die Besiedlung durch den gleichen Klon in beiden Kompartimenten. Die oberen Atemwege bilden demnach die Eintrittspforte für eine Besiedlung mit *P. aeruginosa* und ermöglichen somit erst die akute und später die chronische Besiedlung der unteren Atemwege. Zur Analyse des Anpassungsprozesses von *P. aeruginosa* an die CF-Lunge wurden sequentielle Isolate zweier CF-Kliniken (Medizinische Hochschule Hannover und CF-Ambulanz Kopenhagen) genotypisiert. Es konnten im Infektionsverlauf 1-5 Klone pro Patient detektiert werden. Während in Hannover ein Drittel der Patienten nur mit einem Klon besiedelt war, konnte in Kopenhagen nur ein Patient mit einem Klon beobachtet werden. Zudem wurden in Hannover lange persistierende Klone mit zwischenzeitlicher Ko-Kolonisation nachgewiesen, in Kopenhagen dagegen persistierten die initialen Klone nur eine kurze Zeit und wurden von zwei verschiedenen Klonen verdrängt. Das klonale Spektrum beider Kliniken zeigte ebenfalls große Unterschiede. Während Hannover ein klonales Spektrum aufwies, welches der globalen Population ähnelte, konnte in Kopenhagen die Durchsetzung zweier stark an die dort herrschende hochdosierte Antibiotikatherapie angepassten Klone beobachtet werden. Bei Vergleich des Krankheitsverlaufs mit den Typisierungsergebnissen scheint ein milder Verlauf mit einer adaptiven Radiation des besiedelnden Bakteriums assoziiert zu sein. Zudem zeigten die Klone, die im Rahmen einer eBurst Analyse in einen klonalen Komplex eingeordnet werden konnten, ebenfalls eine Assoziation mit einem milderem Krankheitsverlauf.

Die phänotypische Analyse mehrerer sequentieller Isolate verschiedener Patienten zeigte zwar einen generellen Adaptationsprozess an die Lunge, wies aber auch die Existenz vieler klonaler Varianten mit unterschiedlichen Anpassungen auf. Des Weiteren zeigten Fitnessexperimente, dass die Akkumulation der pathoadaptiven Mutationen zu einem Fitnessvorteil in der CF-Lunge führt, andererseits aber mit einem Fitnessnachteil in der Umwelt einhergeht.

**Schlüsselwörter:** *Pseudomonas aeruginosa*, Populationsstruktur, CF, Adaptation

## Abstract

*Pseudomonas aeruginosa* is a bacterium well known for its ability to grow on a wide range of different substrates under nutrient poor conditions. Due to this high metabolic versatility, *P. aeruginosa* has been detected in a plethora of different habitats. In addition to environmental habitats, humans also represent a common niche for this bacterium.

In order to analyse the general population structure, various *P. aeruginosa* isolates from a wide spectrum of habitats of diverse geographical origin were genotyped using a SNP chip. A large clonal diversity was recognised, which was not characterised by a normal distribution of clones, but consisted of a few very common clones (dominant clones) and a large number of single clones. Dominant clones were detected ubiquitously in various habitats. An eBurst and subsequent principal component analysis showed that the genome of *P. aeruginosa* has a mosaic structure, which can be differentiated into clone-specific segments in the core and accessory genome as well as freely recombining blocks. It is apparent from this analysis that *P. aeruginosa* displays features of a clonal and panmictic population structure. Comparison of this collection of isolates with two European studies as well as a local isolate collection resulted in comparable clonal spectra with few dominant and many singular clones.

The second part of the thesis focuses on the colonisation of the cystic fibrosis (CF) lung with *P. aeruginosa*. The comparison of different isolates from the upper and lower airways of CF patients showed colonisation of both compartments by the same clone in 24 out of 25 subjects. The upper airways are the reservoir for the descending infection with *P. aeruginosa* on the lung in CF and facilitate the initially acute and later chronic colonisation of the lower airways. To analyse the adaptation process of *P. aeruginosa* in the CF lung, sequential isolates from two CF clinics (Hanover Medical School and Copenhagen CF clinic) were genotyped. Between one and five clones could be detected per patient over the course of infection. While in Hannover one third of patients were only colonised by one clone, only a single patient with one clone could be observed in Copenhagen. In addition persistent clones with intermittent co-colonisations were found in Hanover, while in Copenhagen initial clones typically only persisted for a short period and were then displaced by two different clones. Large differences were also observed in the clonal spectrum of both clinics. While Hanover displayed a clonal spectrum which resembled the global population, in Copenhagen two dominant clones that are well adapted emerged to the regular high-dose antimicrobial therapy. Comparison of the clinical course with genotyping results suggests that a mild infection course is associated with adaptive radiation of the colonising bacterium. Clones assigned to a clonal complex by an eBurst analysis also showed an association with a milder clinical course.

Phenotypic analyses of several sequential isolates from various patients displayed a general adaptation process to the lung environment, but pointed to the existence of many clonal variants with different adaptations. Furthermore, competitive fitness experiments demonstrated a fitness advantage due to pathoadaptive mutations in the CF lung, but a concurrent fitness disadvantage in environmental habitats.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, population structure, CF, adaptation



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. <i>Pseudomonas</i> und seine Lebensräume.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Populationsbiologie von <i>P. aeruginosa</i> .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2.1 Das Kerngenom .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2.2 Variable Regionen .....</b>	<b>5</b>
<b>1.3 Pathogenität und Virulenzmechanismen von <i>P. aeruginosa</i> .....</b>	<b>6</b>
<b>1.4 Cystische Fibrose und <i>P. aeruginosa</i> .....</b>	<b>8</b>
<b>1.5 Anpassung von <i>P. aeruginosa</i> an die CF-Lunge .....</b>	<b>10</b>
<b>2. ZIELE DER ARBEIT .....</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1 Material .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1.1 Chemikalien .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1.2 Enzyme .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1.3 Verwendete Kits .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1.4 Puffer/Lösungen .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1.5 Verbrauchsmaterial .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.6 Geräte .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.7 <i>In silico</i>-Analysen .....</b>	<b>21</b>
3.1.7.1 Literaturrecherche .....	21
3.1.7.2 Sequenzanalyse <i>in silico</i> .....	22
3.1.7.3 Stammbaumdarstellung mit dem Programm eBurst .....	22
3.1.7.4 Programme zur Auswertung des PATA1-Arrays.....	23
<b>3.1.8 Statistik.....</b>	<b>23</b>
3.1.8.1 Simpson Index .....	23
3.1.8.2 Shannon-Index .....	24
3.1.8.3 Hauptkomponentenanalyse („Principal Component Analysis, PCA“) .....	24
3.1.8.4 Wilcoxon-Rangsummentest .....	25
3.1.8.5 Monte Carlo Simulation mit Hilfe der Clump-Software.....	26
<b>3.2 Mikrobiologische Methoden .....</b>	<b>26</b>
<b>3.2.1 Bakterienstämme.....</b>	<b>26</b>
3.2.1.1 Referenzstammsammlung.....	27
3.2.1.2 <i>P. aeruginosa</i> Isolate aus der Geschwister und Zwillingstudie.....	27
3.2.1.3 Sequentielle <i>P. aeruginosa</i> Isolate von Patienten mit cystischer Fibrose .....	28
3.2.1.4 <i>P. aeruginosa</i> Isolate aus einer anderen Patientenkohorte der Medizinischen Hochschule Hannover.....	29
3.2.1.5 Studie zum Vergleich von <i>P. aeruginosa</i> Isolaten aus den oberen Atemwegen (Nasen-Rachenraum) und den unteren Atemwegen.....	29
<b>3.2.2. Verwendete Nährmedien .....</b>	<b>30</b>

<b>3.2.3 Anzucht der Bakterien</b> .....	31
<b>3.2.4 Lagerung von Bakterien</b> .....	31
3.2.4.1 Glycerinkulturen in Kryoröhrchen .....	31
3.2.4.2 Minitübs .....	31
<b>3.2.5 Bestimmung der Bakterienzellzahl</b> .....	32
<b>3.3 Zellkultur</b> .....	32
<b>3.3.1 Kultivierung der Zelllinie</b> .....	32
<b>3.3.2 Passagieren von Zellen</b> .....	33
<b>3.3.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen</b> .....	33
<b>3.4 Molekularbiologische Methoden</b> .....	33
<b>3.4.1 Präparation genomischer DNA</b> .....	33
3.4.1.1 Präparation von genomischer DNA mit Phenol-Chloroform Extraktion .....	33
3.4.1.2 Präparation von genomischer DNA mit dem Blood and Tissue Kit .....	34
<b>3.4.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren</b> .....	34
<b>3.4.3 Polymerase-Kettenreaktion</b> .....	35
3.4.3.1 Standard PCR-Ansatz .....	36
3.4.3.2 Einzel PCR-Ansatz mit der Goldstar-Taq-Polymerase .....	37
3.4.3.3 Multiplex PCR .....	38
3.4.3.4 PCR für die Clondiag-Chip Detektion .....	38
<b>3.4.4 Agarosegelelektrophorese</b> .....	39
<b>3.4.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen</b> .....	40
<b>3.4.6 Restriktionsendonuklease-Verdau</b> .....	41
<b>3.4.7 Analyse mit dem Array Tube- Chip der Firma Clondiag</b> .....	41
3.4.7.1 Aufbau des Array-Tube Chips .....	41
3.4.7.2 Aufreinigung der Bakterien aus der Kultur .....	42
3.4.7.3 Hybridisierung mit anschließender Konjugation und Detektion .....	43
3.4.7.4 Auswertung des AT-Chips .....	44
<b>3.4.8 Überprüfung der Isolate auf vorhandene Hypermutatoren</b> .....	46
<b>3.4.9 Phänotypische Assays</b> .....	48
3.4.9.1 Kolonie-Morphologie .....	48
3.4.9.2 Bewegung .....	48
3.4.9.3 Autolyse und Hämolyse .....	49
3.4.9.4 Protease-Sekretion .....	50
3.4.9.5 Siderophore-Sekretion .....	50
3.4.9.6 Pyocyanin .....	51
3.4.9.7 Bestimmung des Hämolysins .....	51
3.4.9.8 Elastaseaktivität .....	52
<b>3.4.10 Adhärenz-Assay</b> .....	53
<b>3.4.11 <i>P. aeruginosa</i>-Tiling-Array 1</b> .....	53
<b>3.4.12 Southern-Blot</b> .....	56
<b>4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b> .....	<b>60</b>
<b>4.0 Allgemeines zur Genotypisierung von <i>P. aeruginosa</i> Isolaten</b> .....	61
<b>4.1 Populationsstruktur von <i>P. aeruginosa</i></b> .....	63

---

<b>4.2 Klonales Spektrum zweier getrennter Populationen .....</b>	<b>74</b>
<b>4.3 Klonspezifität an der Medizinischen Hochschule Hannover .....</b>	<b>77</b>
<b>4.4 Klonspezifität im CF-Patienten.....</b>	<b>81</b>
<b>4.5 Klonale Vielfalt von <i>P. aeruginosa</i> im CF-Patienten über den gesamten Zeitraum der Infektion .....</b>	<b>84</b>
<b>4.5.1 Klondiversität in sequentiellen Isolaten .....</b>	<b>91</b>
<b>4.5.2 Klondiversität innerhalb eines Patienten über einen langen Zeitraum der Infektion betrachtet.....</b>	<b>94</b>
<b>4.5.3 Untersuchung der Stammsammlungen auf Persistenz des initialen Klon und auf Ko-Kolonisationen .....</b>	<b>96</b>
<b>4.5.4 Auswertung der verschiedenen Therapieformen im Zusammenhang mit der Detektion von verschiedenen <i>P. aeruginosa</i> Klonen.....</b>	<b>102</b>
<b>4.5.5 Populationsstruktur der sequentiellen Isolate beider Kliniken unter Berücksichtigung des klinischen Verlaufs .....</b>	<b>106</b>
<b>4.5.6 Adaptive Radiation in sequentiellen Isolaten aus Patienten mit cystischer Fibrose .....</b>	<b>108</b>
<b>4.6 Adaptationsprozesse von <i>P. aeruginosa</i> an die Lunge eines CF-Patienten während des Infektionsverlaufs .....</b>	<b>112</b>
<b>4.6.1 Auswahl der Patientenisolate .....</b>	<b>112</b>
<b>4.6.2 Phänotypisierung der ausgewählten sequentiellen Isolate .....</b>	<b>116</b>
<b>4.6.3 Adhärenz von <i>P. aeruginosa</i> an Lungenepithelzellen .....</b>	<b>136</b>
<b>4.6.4 Virulenz- und Persistenzüberprüfung einiger sequentieller Isolate im Agarbead-Lungeninfektionsmodell.....</b>	<b>140</b>
<b>4.6.5 Wachstumsverhalten sequentieller Isolate unter verschiedenen Nährstoffbedingungen .....</b>	<b>144</b>
<b>4.6.6 Fitnessexperimente mit Früh- und Spätisolaten .....</b>	<b>151</b>
4.6.6.1 Markersuche und Optimierung .....	151
4.6.6.2 Durchführung und Ergebnisse der Kompletions-/Fitnessexperimente .....	168
<b>5. SYNOPSE UND AUSBLICK.....</b>	<b>183</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>186</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>195</b>
<b>8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>212</b>
<b>9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>213</b>
<b>10. ANHANG .....</b>	<b>217</b>
<b>10.1 Informationen zur Patientenkohorte aus Hannover und Kopenhagen.....</b>	<b>217</b>

---

<b>10.2 Verwendete Primersequenzen</b> .....	<b>218</b>
<b>10.3 Primärdaten</b> .....	<b>220</b>
<b>WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATIONEN</b> .....	<b>221</b>
<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>222</b>

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. *Pseudomonas* und seine Lebensräume

*Pseudomonas* sind gramnegative, fakultativ anaerobe, polar-begeißelte Stäbchen, die im Jahr 1894 von Migula das erste Mal beschrieben wurden (siehe Abb. 1.1.1). Heute werden sie, basierend auf ihren 16S-rRNA-Sequenzen, der Gruppe der  $\gamma$ -Proteobakterien zugeordnet (Schlegel et al., 1992; Olsen et al., 1994). Die Gattung *Pseudomonas* verkörpert den Prototyp dieser Familie. Innerhalb dieser Gattung werden verschiedene *Pseudomonas*arten unterschieden. Durch die Vielseitigkeit in der Substratverwertung und das lange Überleben unter extrem nährstoffarmen Bedingungen kommen diese Bakterien in einer Vielzahl von Umwelthabitaten vor (Spiers et al., 2000). Die metabolische Versatilität schlägt sich ebenfalls in der Größe des Genoms nieder. *Pseudomonaden* besitzen im Vergleich zu anderen Bakterien mit 6,0 - 6,6 Mb ein eher großes Genom (Stover et al., 2000; Nelson et al., 2002; Rainley & Bailey, 1996)



Abb. 1.1.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *P. aeruginosa*

Bei *Pseudomonas aeruginosa* handelt es sich um die bekannteste und zugleich humanpathogen bedeutsamste Spezies dieser Gattung. Der Name lässt sich auf die Bildung von wasserlöslichen Pigmenten zurückführen, wie z.B. auf das blau-grüne Phenazinderivat Pyocyanin (Barrett et al., 1986) oder Pyoverdin (Braveny & Krump-Schmidt et al., 1985), durch die eine schnelle Unterscheidung von anderen Keimen möglich ist.

Durch die ubiquitäre Verbreitung dieser Spezies wurden *P. aeruginosa* in verschiedenen aquatischen Lebensräumen wie in Flüssen, marinen Küstengewässern (Pellet et al., 1983), im Abwasser (Rhame et al., 1980), aber auch in Wasserleitungen (Hardalo & Edberg, 1997) nachgewiesen. Andere Isolate stammen wiederum aus der Rhizosphäre (Botzenhardt & Döring, 1993) oder von der Oberfläche von Pflanzen (Cho et al., 1975). Einige *P. aeruginosa*

Stämme konnten auch aus kontaminierten Böden und Gewässern (auch aus dem Ozean) isoliert werden, wo sie an der Biodegradation von toxischen Komponenten beteiligt sind (Ridgway et al., 1990).

Neben der breiten Verteilung in der Umwelt spielt *P. aeruginosa* aber auch im Habitat Mensch und Tier eine wichtige Rolle. Unabhängig vom Habitat werden bei der Kolonisation die gleichen Virulenzfaktoren verwendet (Costerton et al., 1980). Für den gesunden Menschen verläuft die Infektion mit *P. aeruginosa* im Allgemeinen harmlos, da die intakte Immunabwehr nicht überwunden wird (Botzenhardt & Döring, 1993). Eine Ausnahme bilden die Augen, wo eine Kontamination mit *P. aeruginosa* bereits bei gesunden Personen zu einer starken Infektion führen kann.

So befällt dieser opportunistische Keim vorwiegend Personen mit einem lokal oder systemisch geschwächten Immunsystem. Neben Patienten, die mit Immunsuppressiva behandelt werden, gelten auch großflächigere Hautdefekte (z.B. Verbrennungen), das „*Human Immunodeficiency Virus*“ (HIV) sowie Malignome zu den typischen prädisponierenden Faktoren (Schaal et al., 1994). Aber auch Patienten mit cystischer Fibrose (CF), die in der Regel ein intaktes Immunsystem aufweisen, werden häufig von *P. aeruginosa* besiedelt.

Darüber hinaus tritt *P. aeruginosa* vermehrt als Erreger von nosokomialen Infektionen auf (Quinn, 1998) und wurde vor allem bei Infektionen des Urogenitaltraktes detektiert (Horan, 1984). Bei Patienten mit cystischer Fibrose kommt es zumeist nach der Besiedlung der oberen Atemwege auch zur Besiedlung der unteren Atemwege. Damit verbunden ist eine Inflammation und Destruktion des befallenen Lungengewebes, die die Hauptursachen für die reduzierte Lebenserwartung von CF-Patienten bilden (Govan & Deretic, 1996). Der Befall der Lunge mit *P. aeruginosa* ist dabei der entscheidende Faktor für den Krankheitsverlauf des Patienten.

Eine Therapie von *P. aeruginosa* Infektionen ist aufgrund der breiten natürlichen Resistenz gegenüber vielen Antibiotika schwierig. Somit erhalten prophylaktische Maßnahmen einen besonderen Stellenwert. Durch die Anwesenheit des Keims im gesamten Klinikbereich und der Neigung zur Bildung von Biofilmen werden diese Maßnahmen allerdings erschwert (Botzenhardt & Döring, 1993).

## 1.2 Populationsbiologie von *P. aeruginosa*

Die genetische Vielfalt, in die sich eine Bakterienspezies aufteilt, lässt sich zum einen auf die Anzahl und Größe der chromosomalen und extrachromosomalen Elemente und zum anderen auf die Nukleotidsubstitutions- und Rekombinationsrate zurückführen.

Die verschiedenen bekannten *P. aeruginosa* Genotypen formen jeweils einen Cluster von klonalen Varianten, die von identischen Allelen repräsentiert werden (Kiewitz et al., 2000). Der weitverbreitete Klon C sowie andere häufig vorkommende Klone zeigen Ähnlichkeiten in ihren Genotypen, so dass wahrscheinlich eine gemeinsame evolutionäre Entwicklung stattgefunden hat.

*P. aeruginosa* weist durch die hohe genetische Variabilität die Fähigkeit auf, eine Vielzahl von verschiedenen ökologischen Nischen zu kolonisieren. Klone, die häufig detektiert wurden, werden als dominante Klone bezeichnet. In Ölproben sowie in der Lunge eines CF-Patienten konnte der gleiche *P. aeruginosa* Klon detektiert werden. Somit kann das Bakterium als ubiquitär bezeichnet werden (Foght et al., 1996; Morales et al., 2004). Patienten- und Umweltisolate mit *P. aeruginosa* unterscheiden sich zwar in ihrem Genotyp und den chemotaktischen Möglichkeiten (Foght et al., 1996; Morales et al., 2004), sind aber in einigen Eigenschaften für die Virulenz und den Stoffwechsel funktionell äquivalent (Alonso et al., 1999).

Sequenzierreaktionen und Hybridisierungen weisen darauf hin, dass das *P. aeruginosa* Genom aus einem konservierten Kerngenom und variablen Anteilen besteht. Diese Aufteilung lässt sich eventuell auf die Integration fremder DNA-Fragmente in ein ursprünglich kleineres Genom zurückführen (Palleroni, 1993). Im Laufe der Zeit kam es zu weiteren Integrationen kleiner DNA-Elemente, die als variable Bereiche bezeichnet werden.

Während im Kerngenom überwiegend nur die essentiellen genetischen Informationen vorliegen, kodieren die variablen Bereiche zusätzliche Funktionen. Zu den variablen DNA-Anteilen gehören mobile Elemente wie z.B. Plasmide, Bakteriophagen, Transposons sowie Geninseln.

### 1.2.1 Das Kerngenom

Das Genom von *P. aeruginosa* lässt sich in ein Kerngenom (80 %) und ein variables akzessorisches Genom (20 %) untergliedern. Das Kerngenom weist dabei eine interklonale Sequenzdiversität von 0,5 % auf (Kiewitz et al., 2000; Spencer et al., 2003), die zum größten Teil auf Punktmutationen zurückzuführen ist.

Nach der Veröffentlichung von Spencer et al. (2003) gehören zu den Genomsequenzen mit einer hohen Sequenzvielfalt die Gene, deren Proteine in die Biosynthese des Flagellins sowie des Siderophoren Pyoverdins involviert sind. Bei den Pyoverdinen werden jeweils drei Subtypen unterschieden. Alle drei werden von einer nicht-ribosomalen Peptidsynthetase synthetisiert und unterscheiden sich jeweils durch eine unterschiedliche Peptidkette. Bei *FpvA* (PA2398), dem Pyoverdinrezeptor der äußeren Membran, handelt es sich mit über 50 % Sequenzvielfalt um das Gen mit der größten Variabilität (de Chail et al., 2003; Lamont & Martin, 2003; Ravel & Cornelis, 2003). Die hohe Variabilität in diesem Bereich des Kerngenoms wird als starker Beweis für eine positive Selektion angesehen (Ghysels et al., 2004; Smith et al., 2005). Bei den Genen mit der nächsthöheren Divergenz (ca. 40%) handelt es sich um Gene des ABC-Transporters sowie der nicht-ribosomalen Peptidsynthetase, die mit dem Pyoverdinlocus assoziiert sind.

Zu den ebenfalls stark variierenden Genen des Kerngenoms gehören die Gene der Flagellin-Biosynthese. Das Flagellum ermöglicht Bewegung, Chemotaxis und das Anheften an Zellen und Oberflächen und ist daher für die Kolonisation und das Eindringen in den Wirt während einer Infektion mitverantwortlich. Bei den Flagellinen werden zwei Subtypen unterschieden: *fliCa* und *fliCb*. Während die Abweichungen in der Sekundär- und Tertiärstruktur dieser beiden Subtypen eher gering sind, liegt ein 37 - 38 %iger Unterschied in ihrer Primärstruktur vor. Ein weiterer Unterschied ist, dass *fliCa* im Gegensatz zu *fliCb* glykosyliert vorliegen kann (Brimer & Montie, 1998).

Neben Genclustern, die eine hohe Variabilität aufweisen, gibt es auch Einzelgene, denen diese Eigenschaft zugeordnet werden kann. Hierzu gehören z.B. die *pilA* Gene. Die Expression von Typ IV-Pili spielt bei der Adhäsion des Bakteriums an das Wirtsgewebe eine entscheidene Rolle. Gene, die Proteine kodieren, die über das Typ III-Sekretionssystem sezerniert werden, weisen ebenfalls eine Variabilität auf. Hier werden vor allem vier wichtige Virulenzdeterminanten unterschieden: ExoS, ExoT, ExoU und ExoY.

ExoS und ExoT besitzen neben einer ADP-Ribosyltransferase-Aktivität zusätzlich noch eine GTPase-aktivierende Domäne für Rho-GTPasen (Barberi, 2000). Bei ExoY handelt es sich um eine Adenylatcyclase und ExoU besitzt eine Phospholipaseaktivität (Sato et al., 2003; Vallis et al., 1999). Die Mehrheit der bis heute untersuchten *P. aeruginosa* Stämme weist ExoS auf, ExoU dagegen ist sehr viel seltener vertreten. Eine Detektion beider Proteine in einem Stamm ist nahezu ausgeschlossen (Kulasekara et al., 2006).



Weiter produziert die Mehrheit aller *P. aeruginosa* zwei variable Formen von O-Antigenen (genannt A- und B-Bande), die zu den Lipopolysacchariden zusammengefasst werden (Feltmann et al., 2001).

Eine weitere Quelle der genetischen Variabilität sind Nukleotidsubstitutionen (Ernst et al., 2003). Hierbei handelt es sich um Gene wie z.B. *ampC*, *fliC*, *oprL* und *oprI*, die sich durch ein variables Nukleotid charakterisieren lassen. Diese Art von Veränderungen wird als „*single nucleotide polymorphism*“ bezeichnet (siehe Abb. 1.2.1).

```
...AGGTTCGTCGTGCATGCCCTACCGT...  
...AGGTTCGTCGTGCGTGCCCTACCGT...
```

Abb. 1.2.1: Gensequenz mit einem „*single nucleotide polymorphism*“

### 1.2.2 Variable Regionen

Die genomische Divergenz der variablen Regionen ist sowohl in den Genominseln als auch in den mobilen Elementen wie Phagen, Plasmide und Transposons, zu finden.

Bei Genominseln handelt es sich um in das Genom inserierte größere DNA-Abschnitte, die nicht zum Kerngenom gehören (Dobrindt et al., 2004) und durch horizontalen Gentransfer mit Hilfe mobiler Elemente ins Chromosom integriert werden. Diese Regionen sind zumeist in kurze Genblöcke zusammengeschlossen und zeigen eine hohe Variabilität in ihrer genetischen Ausstattung.

Einige dieser genomischen Inseln kodieren für Pyocine oder Phagenproteine.

Die Mehrzahl der genomischen Inseln inseriert in tRNA-Gene. Typischerweise sind diese von IS-Elementen oder *direct repeats* flankiert. In den meisten Fällen lassen sie sich anhand ihres unterschiedlichen GC-Gehalts und der atypischen Oligonukleotidzusammensetzung vom Kerngenom unterscheiden (Dobrindt et al., 2004; Reva et al., 2005).

Die hypervariable Region, in der sich die größte Anzahl der Veränderungen befindet, liegt in der Nähe der *lipH*-Gene (Larbig et al., 2002). Die linke Grenze der Inseln wird durch einen Cluster von tRNA-Genen festgelegt. *PAGI-2* und *PAGI-3* werden dabei als Prototypen der tRNA assoziierten Geninseln bezeichnet (Klockgether et al., 2007 und 2008). Aber auch Plasmide wie *pKLC102* und *pKLC106* sowie die Inseln *PAGI-4* und *PAPI-2* sind in der Nähe von tRNA-Genen angeordnet (Klockgether et al., 2007; Würdemann et al., 2007). Die Genominsel *PAGI-1* bildet die einzige bekannte Ausnahme und ist nicht mit tRNA-Genen

assoziiert. Eine weitere Genominsel, *PAPI-I*, konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt ausschließlich in PA14 Klonen detektiert werden (Qui et al., 2006).

Einige der genomischen Inseln kodieren unter anderem Virulenzfaktoren und werden daher als „Pathogenitätsinseln“ bezeichnet (Hacker et al., 2002). Genomische Inseln sind aber nicht zwangsläufig mit Virulenz assoziiert. Es wurden vergleichbare Strukturen auch im Genom nichtpathogener Bakterien entdeckt. Hier kodieren sie für verschiedene Funktionen wie z. B. metabolische Leistungen, Sekretionssysteme, Symbiosefaktoren oder Resistenzen. Je nach ihrer Funktion werden sie dementsprechend als Metabolismusinseln, Resistenzinseln oder Pathogenitätsinseln bezeichnet (Dobrindt et al., 2004).

Alle variablen Gene, sowohl Geninseln als auch mobile Elemente, lagern sich in das Kerngenom ein und führen so zu einem Repertoire an stammspezifischen Merkmalen.

### **1.3 Pathogenität und Virulenzmechanismen von *P. aeruginosa***

*P. aeruginosa* ist ein humanpathogen bedeutsamer Keim, der in Europa und Nordamerika für 16 % der nosokomialen Pneumonien verantwortlich ist (Wiblin, 1996). Bei einer beatmungsassoziierten Pneumonie (*Ventilator associated Pneumonia, VAP*) gehört *P. aeruginosa* zu den häufigsten Erregern (Ibrahim et al, 2001) und stellt daher ein großes Problem auf Intensivstationen dar. Weiter sind 12 % der im Krankenhaus erworbenen Harnwegserkrankungen (Pollack, 1995) sowie 8 % der Wundinfektionen nach chirurgischen Eingriffen (Kluytmans, 1997) und 10 % der Sepsisfälle (Gordon et al., 1998) ebenfalls auf eine Besiedlung mit *P. aeruginosa* zurückzuführen. Bei Verbrennungsoptionen wurden *P. aeruginosa* Infektionen nachgewiesen, die mit einer 60%igen Mortalität assoziiert waren (Richard et al., 1994). In der Studie von Mendelson et al. wurde 1994 nachgewiesen, dass eine akute Bakteriämie mit *P. aeruginosa* bei AIDS-Patienten in 50 % zum Tode führte. Des Weiteren führt eine Kolonisation der Lunge mit *P. aeruginosa* bei Patienten mit einer cystischen Fibrose (CF) zu einer schweren Infektion der Atemwege.

*P. aeruginosa* weist eine Vielzahl von verschiedenen Virulenzfaktoren auf, die in der Regel über 3 verschiedene Sekretionssysteme sekretiert werden.

Über das Typ I-Sekretionssystem wird z.B. eine alkalische Protease sezerniert. Sie bewirkt lokale Läsionen von Gewebestrukturen und die Zerstörung von Teilen der Immunabwehr (Peters & Golloway, 1990; Suter, 1994).

Die Typ II-Sekretion findet über einen Sec-ähnlichen Translokationsapparat statt. Als ein bedeutendes cytotoxisch wirksames Protein ist hier ExoA zu nennen. Es inhibiert durch seine ADP-ribosylierende Eigenschaft den Elongationsfaktor-2 und führt somit zu einer Inhibierung der Proteinbiosynthese (Armstrong et al., 2002; Wedekind et al., 2001, Yates & Merrill, 2001/2004). Auch die Elastasen LasA und LasB werden über dieses System sekretiert. Beide führen durch ihre proteolytischen Eigenschaften ebenfalls zu einer Gewebeschädigung (Kessler et al., 1998).

Über das Typ III-Sekretionssystem werden verschiedene Effektormoleküle, wie z.B. ExoS, ExoU, ExoT und ExoY, direkt beim Zellkontakt in die Wirtszelle injiziert. Die beiden Exoenzyme ExoS und ExoT sind strukturell vergleichbar (Garrity-Ryan et al., 2004) und verhindern durch ihre GTPase-Aktivität die Phagozytose der Bakterien durch Makrophagen (Goehring et al., 1999). ExoU ist eine Phospholipase, die die Membran der Wirtszellen schädigt, und ExoY beeinflusst über eine Adenylatcyclase-Aktivität den intrazellulären cAMP-Spiegel der Wirtszellen (Yahr et al., 1998).

Die Phospholipase C gehört ebenfalls zu den wichtigen Virulenzfaktoren. Zusammen mit den Rhamnolipiden werden mit diesem Enzym die Phospholipide, die sich auf der Oberfläche der Alveolar-Zellen befinden, degradiert. Dadurch ist die Oberflächenspannung herabgesetzt und die Alveolen können beim Atmen kollabieren (Terada et al., 1999).

Im Jahr 2006 wurde außerdem ein Typ IV-Sekretionssystem beschrieben, das den horizontalen Gentransfer ermöglicht und ebenfalls mit der Sezernierung von Virulenzfaktoren assoziiert ist (Juhas et al., 2007).

Die Fähigkeit zur Anheftung an die Zelloberfläche ist ein weiteres wichtiges Kriterium für die Virulenz von *P. aeruginosa*. Um den Zielort zu erreichen, verwendet das Bakterium Flagellen (Feldman et al., 1998), für die Anheftung und die Bewegung auf der Zelloberfläche sind dagegen Typ IV Pili verantwortlich (Mattick et al., 2002). *P. aeruginosa* bildet außerdem zwei Lipopolysaccharid-Formen aus, die an das CFTR-Protein zu binden scheinen (Schroeder et al., 2002).

Ein weiterer, sehr wichtiger Virulenzfaktor und zudem Bestandteil des Biofilms, welcher sich im Laufe der Kolonisation bildet, ist das Alginate. Hierbei handelt es sich um ein Polymer aus  $\beta$ -D-Mannuronsäure und  $\beta$ -L-Glukuronsäure, die  $\beta$ -1,4 glykosidisch miteinander verknüpft sind und die Bakterien vor der Phagozytose schützen (Pier et al., 2001).

Die Produktion von Siderophoren ist ebenfalls mit der Virulenz assoziiert. Siderophore sind eisenbindende Proteine mit komplexbildenden Eigenschaften. Sie werden von Bakterien gebildet und zur Eisenspeicherung verwendet. Die Funktion der Speicherung besteht darin,

hochaffin Fe(III) zu komplexieren, welches anschließend in die Zelle aufgenommen wird. *P. aeruginosa* verfügt über zwei Siderophore zur Eisenaufnahme: Pyochelin und Pyoverdin. Beide binden Fe(III) und können daher das Eisen vom Transferrin lösen (Xiao & Kisaalita, 1997). Das Pyoverdin, welches dem Bakterium den Namen und die charakteristische Farbe verleiht, kann Elektronen aus der Atmungskette aufnehmen und auf Sauerstoff oder Fe(III) übertragen. Bei der Reduktion (Fe(III)  $\rightarrow$  Fe(II)) entstehen reaktive Stoffe wie z.B. Wasserstoffperoxid oder Superoxid, die für den Wirt schädlich sind (Lau et al., 2004).

#### 1.4 Cystische Fibrose und *P. aeruginosa*

Die cystische Fibrose wird durch einen autosomal rezessiv vererbten Gendefekt hervorgerufen und gehört zu den häufigeren Erbkrankheiten (1:2500 in der kaukasischen Bevölkerung; veröffentlicht in den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik e.V. von 2009). Hierbei trägt ein Gen des Chromosoms 7 eine oder mehrere Punktmutationen. Bei dem betroffenen Gen handelt es sich um den „*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*“ (CFTR), der einen Chlorid-Kanal kodiert. Ein Defekt dieses Ionenkanals bewirkt eine fehlerhafte Chloridsekretion. Aufgrund des verminderten Salztransports kommt es zu einer geringeren Hydratisierung des Mukus und des aufgelagerten Flüssigkeitsfilms. Daraus resultiert eine verstärkte Sekretion von zähflüssigem und wasserarmem Schleim. Sowohl der Gastrointestinaltrakt als auch die Atemwege sind von dieser Störung betroffen.

Dabei lassen sich Krankheitserscheinungen wie z.B. ein Mekoniumileus bei Neugeborenen, eine Leberzirrhose oder die Entwicklung von Diabetes mellitus dem Gastrointestinaltrakt zuordnen. Krankheitserscheinungen, die sich in den Atemwegen bemerkbar machen, sind z.B. chronische Bronchitis, Bronchiektasen, Lungenfibrosen oder Emphyseme.

Der Krankheitsverlauf und die damit verbundene Lebenserwartung (Median bei CF-Patienten von 36,4 Jahren) werden wesentlich durch die chronischen Atemwegsinfektionen mit verschiedenen opportunistischen Krankheitserregern bestimmt (Pier et al., 1985; Hoiby et al., 1986).

Insgesamt konnten bis heute über 1600 verschiedene Mutationen des *CFTR*-Gens beschrieben werden. Je nach Mutation ist die Funktionsfähigkeit des Chlorid-Kanals unterschiedlich stark beeinträchtigt. Man unterscheidet fünf verschiedene Mutationsklassen (siehe Abb. 1.4.1). Die Klasse I umfasst Mutationen, die zu einer massiven Reduktion der Menge an vollständigem und funktionsfähigem CFTR Protein führen. Die Mutationen der Klasse II führen zu einer

Reifestörung und Mutationen der Klasse III zu einer Blockierung der Kanalöffnung. Die Mutationen der Klasse IV führen zu einer Störung der Leitfähigkeit des Anionenkanals und Mutationen der Klasse V zu einer eingeschränkten Synthese oder einem vorzeitigen Abbau des Proteins (Teich et al., 2002; Lindemann et al., 2004). Letztere Mutationen werden zuweilen auch als Mutationen der Klasse VI bezeichnet.

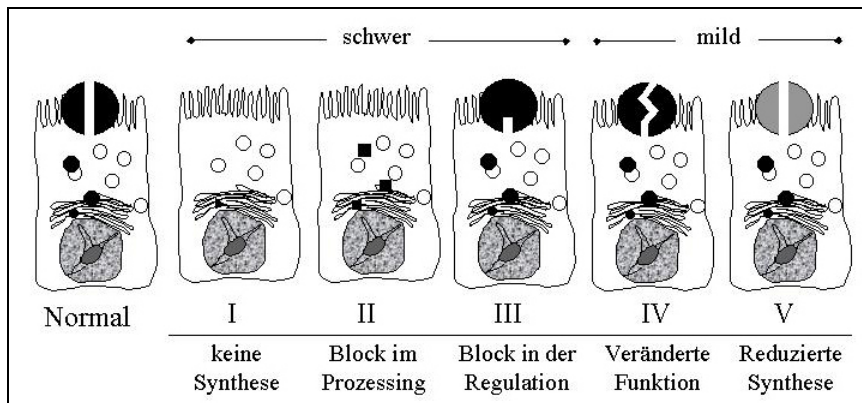


Abb. 1.4.1: Klassifikation der Mutationen im CFTR Gen nach deren funktionellen Bedeutung (Teich et al., 2002)

Die häufigste Mutation ist F508del (Deletion eines Phenylalaninrestes an Position 508 auf mindestens einem Chromosom). Diese wird in Abhängigkeit von der ethnischen Zugehörigkeit europaweit bei 22 % - 87 % der CF-Chromosomen gefunden (Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik e. V., 2009). Das Protein wird durch diese Mutation nicht mehr richtig gefaltet und unterliegt daher dem Abbau (Klasse II).

Das schleimige Sekret in der Lunge bietet Bakterien ein geeignetes Milieu zum Überleben. Nach dem Eintritt von pathogenen Keimen vermindert die Schleimschicht zugleich den Abtransport aus der Lunge. Es kommt zu einer Besiedlung mit verschiedenen Bakterien, die im weiteren Krankheitsverlauf der CF-Patienten eine entscheidene Rolle spielen. In den frühen Lebensjahren werden die CF-Patienten häufig mit *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* und *Streptococcus pneumoniae* besiedelt. Diese führen zu einer akuten Infektion, die aber gut behandelt werden kann. Im weiteren Verlauf der Erkrankung dominieren *P. aeruginosa* und die Genomovare des *Burkholderia cepacia* Komplexes, wobei der Erstere zu den häufigsten Erregern und Ursachen von chronischen Lungenentzündungen zählt. Die Infektionen mit diesen Pathogenen lassen sich schwerer mit Antibiotika behandeln. Zu einem der Hauptgründe, dass *P. aeruginosa* in der Lunge trotz Antibiotikatherapie persistieren kann, zählt die Fähigkeit zur Ausbildung von Biofilmen (Singh et al., 2000; Yoon et al., 2002). In diesen dreidimensionalen Strukturen leben die Bakterien eingehüllt in eine

extrazelluläre Matrix von Alginat und DNA (Whitchurch et al., 2002) und sind so vor Antibiotika (Mah et al., 2003) und vor Immunreaktionen des Wirts geschützt (Pier et al., 2001). Bakterien, die im Biofilm leben, zeigen eine höhere Resistenz gegenüber Antibiotika als planktonisch wachsende Bakterien. Während Bakterien, die direkt an der Oberfläche eines Biofilms wachsen, durch die Antibiotika abgetötet werden, überleben die darunterliegenden Bakterenschichten eine Antibiotikatherapie. Da die *P. aeruginosa* der unteren Schichten nur unzureichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden, weisen sie einen stark reduzierten Stoffwechsel auf. Daraus resultiert eine geringe Antibiotikaaufnahme, die zu einer höheren Überlebensrate dieser Bakterenschicht führt. Durch die Antibiotikatherapie kommt es zwar zu einer Reduktion der Keimzahl, allerdings nur in den seltensten Fällen zu einer vollständigen und andauernden Eliminierung der Bakterien. Aus diesem Grund ist die Nachfrage nach alternativen Behandlungsmöglichkeiten sehr groß.

### **1.5 Anpassung von *P. aeruginosa* an die CF-Lunge**

Bei den meisten Patienten erfolgt die Besiedlung mit *P. aeruginosa* mit nur einem Klon, der anschließend für viele Jahre in der Lunge des CF-Patienten persistiert. Frühere Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe ergaben, dass bei ca. 50 % der untersuchten CF-Patienten der initiale Klon wechselte. Permanente oder transiente Ko-Kolonisationen wurden in mehr als 20 - 30 % der Patienten detektiert.

Zu Beginn der Infektion erfolgt eine wiederholte Besiedlung mit einer nicht-mukösen Form von *P. aeruginosa* (Pitt, 1986). Die hierbei von den Bakterien sezernierten Toxine, wie z.B. Exotoxin und Enzyme wie Elastase, führen bereits zu einer Gewebeschädigung und einer verzögerten Immunantwort (Suter, 1994). Demnach besitzen Frühisolate, die aus der Umwelt aufgenommen wurden, eine Reihe von Virulenzfaktoren, durch die die Besiedlung eines neuen Wirts möglich wird. Im Laufe der Zeit kommt es zu einer Anpassung des Klons an die CF-Lunge. Dieser Vorgang wird Adaptation genannt. *P. aeruginosa* passt sich an unterschiedliche Nischen des Habitats Lunge an. Daraus resultiert mit fortschreitender Infektionsdauer die Auffächerung des einen Klons in verschiedene klonale Varianten (Römling et al., 1994). Durch die Hybridisierung von klinischen *P. aeruginosa* Isolaten auf das gesamte PAO1 Genom und der anschließenden physikalischen Kartierung konnten Rekombinationen, Deletionen und Inversionen in CF-Isolaten identifiziert werden (Ernst et al., 2003; Römling et al., 1997; Kiewitz et al., 2000; Kresse et al., 2003). Weiterhin zeigten

die klonalen Varianten aber auch morphologische sowie phänotypische Unterschiede. Diese phänotypischen Veränderungen sind dabei charakteristisch für das Habitat Lunge und gelten als irreversibel. Stämme werden z.B. unbeweglich (Mahentiringam et al., 1994), LPS und Pyocin defizient und weniger empfänglich für Phagen (Römmling et al., 1994). Zusätzlich kommt es während der chronischen Besiedlung zu einer Abnahme der Cytotoxizität (Lee et al., 2005) und es bilden sich sogenannte „small colony variants“ (Häussler et al., 1999) und mukoide Kolonien (Govan et al., 1996). Eine chronische Besiedlung mit *P. aeruginosa* geht demnach mit einem Verlust von Virulenzfaktoren einher (siehe Abb. 1.4.2).

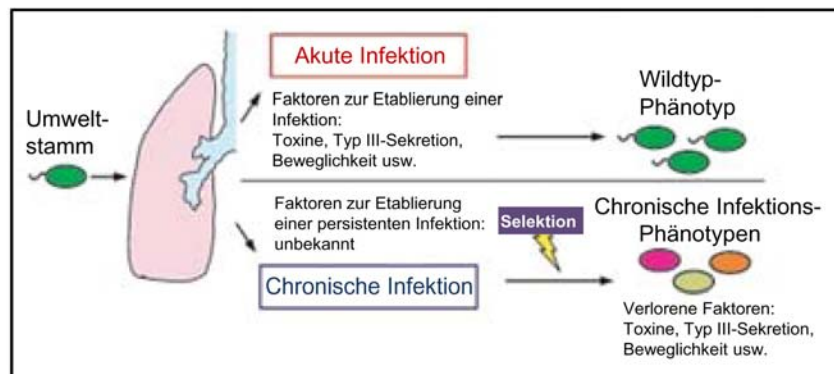


Abb. 1.4.2: Unterschiede in den Faktoren für eine akute und chronische Infektion (Nguyen et al., 2006; übersetzt)

Die Faktoren, die für eine Kolonisation und eine Etablierung der Infektion erforderlich sind, wurden bereits eingehend erforscht. Die Faktoren, die dagegen für eine persistierende Infektion benötigt werden, sind nur unzureichend analysiert. Neben dem Verlust von einigen Virulenzfaktoren ist ein weiteres Charakteristikum von Isolaten aus einer späteren Kolonisationsphase die Entstehung von sogenannten Hypermotoren (Oliver et al., 2000; Mena et al., 2008, Montanari et al., 2007). Diese Stämme weisen einen Defekt im DNA-Reparatursystem auf. Der Defekt der Reparaturmaschinerie führt zu einer Akkumulation von Punktmutationen in anderen Genen. Aus diesem Grund weisen Hypermotoren häufig eine gesteigerte Resistenz gegen Antibiotika auf (Oliver et al., 2000). Die Mutationsfrequenz liegt zu Beginn der Kolonisation bei  $10^{-8}$  und steigt nach einer chronischen Besiedlung von mind. zehn Jahren auf  $10^{-7}$  -  $10^{-5}$ . Somit wird die Evolution innerhalb eines Klons von *P. aeruginosa* in CF-Lungen durch hochmutagene klonale Varianten vorangetrieben.

Da in den letzten Jahren vermehrt Mutatorstämme detektiert wurden, sind diese für die chronische Infektion des menschlichen Respirationstrakts von wachsender Bedeutung und stellen durch die hohe Resistenz gegenüber Antibiotika ein Problem bei der Behandlung dar.

(Marcia et al., 2005). Neben den Genen, die für den Mutator-Phenotypen verantwortlich sind, lassen sich vor allem auch Mutationen in *mucA* im Laufe der Infektion beobachten. Der damit verbundene Übergang von einer nicht-mukoiden zu einer mukoiden Kolonie äußert sich in einer gesteigerten Alginateproduktion (Boucher et al., 1996). Eine Umwandlung zu einem mukoiden Phänotyp erleichtert *P. aeruginosa* z.B. die chronische Infektion der Lunge (Pitt, 1986) und führt zu weiteren Entzündungen und Nekrosen (Hoiby et al., 1986). In Einzelfällen werden ganze Bereiche der Lunge verschlossen. Hier kommt es zu einem irreversiblen Umbau des Lungengewebes, der eine Verkleinerung der Respirationsfläche zur Folge hat und letztendlich zu einer pulmonalen Insuffizienz führen kann.

Nach dem Auftreten der mukösen Form ist eine vollständige Elimination nur noch in Einzelfällen möglich. Durch das Herunterfahren des Stoffwechsels in den unteren Bakterien-schichten (Mangel an Nährstoffen und Sauerstoff) werden die Keimzahlen durch eine Antibiotikatherapie zwar reduziert, aber es findet keine vollständige Eliminierung statt. Zudem weisen *P. aeruginosa* eine hohe Anzahl an Möglichkeiten der Verstoffwechslung von Antibiotika auf (Olsen et al., 1985; Mulgrave, 1991; Iyobe et al., 1991).

Des Weiteren wurden während des Anpassungsprozesses von *P. aeruginosa* an die Lunge eines CF-Patienten die Entstehung von *lasR* Mutanten nachgewiesen (D'Argenio et al., 2007). *LasR* gehört zum *Quorum Sensing System* (QS), mit dem die Bakterien die Begrenztheit des Lebensraums sowie die Verfügbarkeit der Nahrung messen und somit indirekt das Wachstum der Population begrenzen. Das System besteht aus zwei miteinander verschalteten Untersystemen, dem *LasR* und dem *Rhl*-System. Die Aktivierung dieses Systems erfolgt über N-acetylierte Homoserinlactone (AHLs). Dabei kommt es durch 3-Oxo-C<sub>12</sub>-Homoserinlactone, die von *LasI* synthetisiert werden, zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors *lasR*. Dies wiederum führt durch die Sezernierung von 3-Oxo-C<sub>4</sub>-Homoserinlactonen zu einer Aktivierung des *Rhl*-Systems. Über diese Systeme werden PQS (*Pseudomonas quinolone signal*) und eine Reihe von verschiedenen Virulenzfaktoren wie Elastase, Protease und Exotoxine gebildet (siehe Abb. 1.4.3). Für die Etablierung einer Infektion ist dieses System somit von großer Bedeutung. In der Veröffentlichung von D'Argenio et al. (2007) konnte ein Wachstumsvorteil für *lasR* Mutanten nachgewiesen werden. Somit erreichen die Bakterien schneller eine hohe Populationsdichte. Eine Inaktivierung von *lasR* bewirkt einen Verlust der Virulenzfaktoren. Dadurch werden *P. aeruginosa* vom Immunsystem des CF-Patienten nicht mehr so stark angegriffen. Es entsteht eine Art Koexistenz, die mit einer chronischen Besiedlung von *P. aeruginosa* einhergeht. Neben dem Verlust der Virulenzfaktoren konnte bei *lasR* Mutanten weiterhin eine



erhöhte Toleranz gegen Ceftazidim nachgewiesen werden. Auch dieses führt zu einem selektiven Vorteil einer *lasR* Mutation innerhalb einer Bakterienpopulation. In der Veröffentlichung von Köhler et al. (2009) wird beschrieben, dass in Patienten mit einer beatmungsassoziierten Pneumonie (VAP) *lasR*-Mutanten bereits schon nach 10 Tagen detektiert werden konnten. Bei CF kommt es dagegen erst nach mehreren Jahren zur Entstehung von *lasR*-Mutanten. Diese sehr schnelle Adaptation in VAP-Patienten weist auf einen starken Fitnessvorteil der *lasR*-defizienten Bakterien hin. Bei der Koexistenz von *lasR*-Mutanten und wt-Bakterien kommt es zu einer Ausbeutung der kooperierenden wt-Population seitens der *lasR*-Mutanten. Bei einem solchen Vorgang wird von „*social cheating*“ gesprochen (Sandoz et al., 2007).

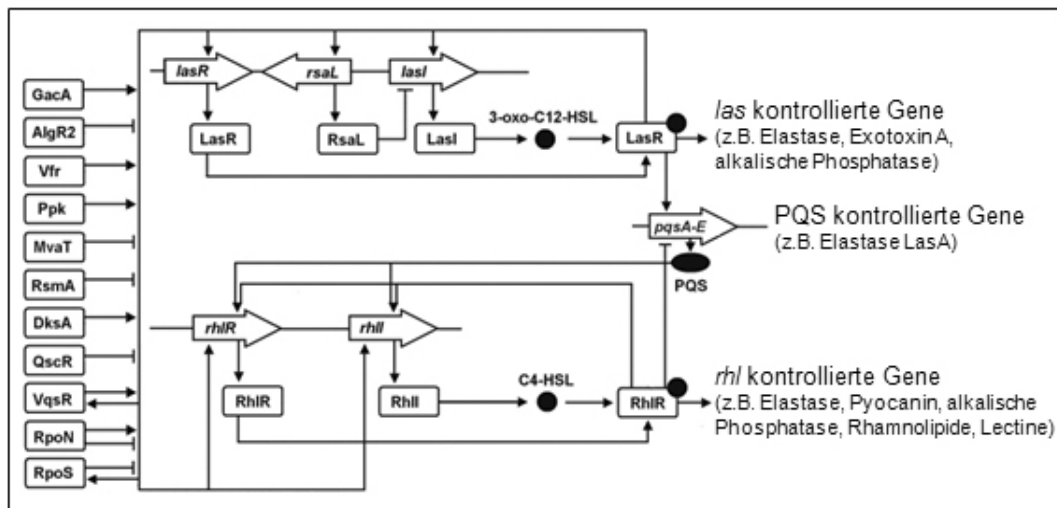


Abb. 1.4.3: Quorum sensing in *P. aeruginosa* (Juhas et al., 2005; übersetzt und ergänzt)

Die genetischen und phänotypischen Veränderungen, die *P. aeruginosa* im Verlauf der CF-Infektion durchläuft, sind zwar in einzelnen Teilen untersucht, in ihrer Gesamtheit aber weiter unaufgeklärt. Beispielsweise bleibt weiterhin eine in der Literatur diskutierte Frage, ob ein initialer Stamm sich im Laufe der Infektion so an die Lunge anpasst, dass daraus ein dominanter, adaptierter Stamm hervorgeht, oder ob es im Verlauf der Infektion zur Bildung einer diversen adaptierten Gemeinschaft an Bakterien kommt (siehe Abb. 1.4.4; Nguyen et al., 2006).

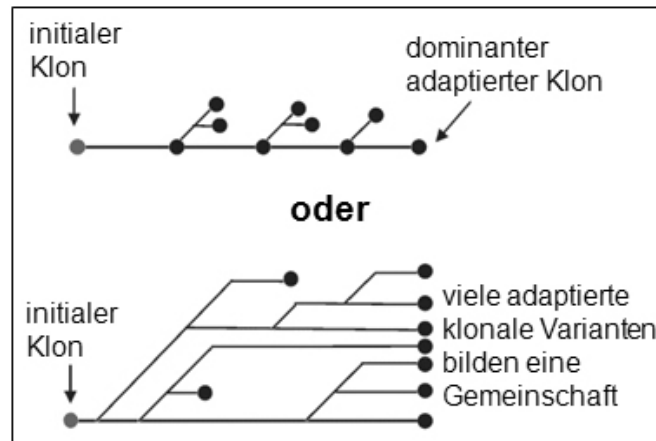


Abb. 1.4.4: Hypothetischer phylogenetischer Baum einer bakteriellen Evolution während einer chronischen Infektion (Nguyen et al., 2006; übersetzt)

## 2. ZIELE DER ARBEIT

In einem ersten Schritt gilt es die allgemeine Populationsstruktur von *P. aeruginosa* zu beschreiben. Dabei soll zwischen den unterschiedlichen Habitaten und der geographischen Herkunft unterschieden werden. Grundlage dafür ist ein Array, der bereits in der Arbeitsgruppe in einer Kooperation mit der Firma Clondiag entwickelt wurde (Wiehlmann et al., 2007). Dieser SNP-Chip ermöglicht die Identifizierung des *P. aeruginosa* Genotypen durch SNP-Typisierung des Kerngenoms und die Detektion von Unterschieden des akzessorischen Genoms. Die Ergebnisse dieser globalen Typisierung sollen mit anderen Isolatsammlungen (europaweit und lokal an der Medizinischen Hochschule Hannover) verglichen werden.

Der Fokus nachfolgender Untersuchungen soll auf dem Habitat CF-Lunge und ihrer Besiedlung mit *P. aeruginosa* liegen. Zuerst soll das klonale Spektrum der aus oberen und unteren Atemwegen isolierten Bakterien miteinander verglichen und so der Infektionsweg des Bakteriums beschrieben werden. Da bisher die genetischen und phänotypischen Veränderungen von *P. aeruginosa* im Laufe der CF-Erkrankung nur an einzelnen CF-Isolaten untersucht worden sind, soll nun mit Hilfe sequentieller Isolate detailliert der Anpassungsprozess an die CF-Lunge analysiert werden. Hierzu sollen sequentielle Isolate von CF-Patienten der Medizinischen Hochschule und der CF-Ambulanz Kopenhagen, die über einen Zeitraum von mehr als 20 Jahren gesammelt wurden, typisiert werden. Dadurch besteht die Möglichkeit, die Adaptationsprozesse verschiedener Klone im CF-Patienten zu untersuchen und anschließend in den klinischen Zusammenhang zu stellen. Hierbei sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Sind die CF-Patienten während des ganzen Beobachtungszeitraums nur von einem einzigen *P. aeruginosa*-Klon besiedelt oder besiedeln verschiedene Klone die CF-Lunge?
- Gibt es Ko-Kolonisationen oder kommt es zu Verdrängungsprozessen innerhalb der CF-Lunge?
- Wie lange persistieren die initialen Klone in der CF-Lunge?
- Gibt es eine Assoziation zwischen Klon/Klonwechsel und Krankheitsstatus und/oder Krankheitsverlauf der Patienten?

Die so erhaltenen Ergebnisse sollen vor allem auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den beiden Patientenkohorten (MHH und Kopenhagen) untersucht werden, um so Klinik- und *Pseudomonas*-spezifische Mechanismen im Infektionsverlauf zu identifizieren.

---

Der detaillierte Anpassungsprozess von *P. aeruginosa* an die CF-Lunge soll exemplarisch anhand ausgewählter sequentieller Isolate durch eine genaue Phänotypisierung unter diversen Wachstumsbedingungen, die die Umwelt oder das Habitat Lunge repräsentieren, untersucht werden. Durch kompetitive Fitnessexperimente soll die Auswirkung der Adaptation von *P. aeruginosa* an die CF-Lunge auf die Überlebensfähigkeit in verschiedenen Habitaten analysiert werden. Führt die Adaptation des Bakteriums an die CF-Lunge zu einer Veränderung der Ausbreitungsfähigkeit, des Habitatspektrums und zu einer Änderung von Pathogenität und Übertragbarkeit?

### 3. MATERIAL UND METHODEN

Die verwendeten Lösungen wurden alle entweder mit bidestilliertem Wasser oder hochreinem Wasser („epure“-Wasser) aus einer entsprechenden Aufbereitungsanlage angesetzt. Alle Lösungen sowie die Verbrauchsmaterialien (Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße etc.) wurden, soweit nicht anders vermerkt, vor Gebrauch mind. 30 min unter 1,2 bar Wasserdampfdruck bei 121°C in einem Hochdruckdampfsterilisator erhitzt und somit sterilisiert.

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien

Anti-Digoxigenin AP	Boehringer
Agarose	Eurogentec
Biotin-16-dUTP	Roche
Biotin-ddUTP	Roche
Blocking Reagenz	Roche
CDP-Star	Tropix
Chloroform	J.T. Baker
Cobaltchlorid	Affymetrix
Chromazurol S (CAS)	Serva
Diethylen-triamin-penta-essigsäure (DTPA)	Roth
Dextranblau	Serva
Dimethylsulfoxid	Roth
100 bp DNA-Leiter	New England Biolabs
Ethanol	J.T. Baker
Ethylendiamintetraessigsäure	Roth
Ficoll Typ 400	Amersham Pharmacia
Glycerin	AppliChem
HEPES	Roth
Hexadecyl-trimethylammonium-bromid (HDTMA)	Fluka
Magnesiumchlorid (für PCR)	InViTek, Roche (je nach Polymerase)
Mucin	Fluka
Natronlauge	Roth
Neutravidin	Pierce
Nukleotidtriphosphate	Roche
Oligonukleotide	MWG
10 x One-Phor-All Buffer	Amersham
Parrafin	Fluka
Tetramethylbenzidin (TMB)	Clondiag
Phenol	Roth
Rifampicin	Appllichem

TRIS	Roth
Saponin	Serva
Sephadex G-50	Pharmacia Fine Chemicals
Triton	Roth

Alle weiteren Chemikalien wurden von den Firmen Merck und Sigma-Aldrich, Gibco BRL und Invitrogen bezogen.

### 3.1.2 Enzyme

DNase I	Amersham
Goldstar-Taq-Polymerase + Puffersysteme	Eugentec
Invitek-Taq-Polymerase + Puffersysteme	InViTek
Klenow-Polymerase	Boehringer
Proteinase K	Roche, Qiagen
Restriktionsendonukleasen + Puffersysteme	New England Biolabs, Fermentas
- ApoI, AseI, AvaII, BfaI, BspDI, BstBI, ClaI, DpnII, Fnu4HI, HaeII, HhaI, HincII, HinpII, HpaII, HpyCH4V, MspI, NcoI, RsaI, SalI, Tsp509I, XhoI	
RNase A (10 mg/ml)	Qiagen
Streptavidin-Peroxidase	Sigma
Terminale Desoxynucleotide Transferase	Roche
Therminator-Polymerase	New England Biolabs

### 3.1.3 Verwendete Kits

- (1) DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen)
- (2) PCR-Extraktion-Kit (Qiagen)

### 3.1.4 Puffer/Lösungen

Anti-Digoxigenin-AP-Konjugat	Anti-Digoxigenin-Antikörper (Fab-Fra) Alkalische Phosphatase gekoppelt → Stammlösung 1 : 5000 in Puffer 2 verdünnt
Auftragspuffer (6x)	15 % Ficoll 0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 0,5 M EDTA → pH 8,0
Blocking-Reagenz (Clondiag-Chip)	20 mg ad 1 ml Hybridisierungspuffer

CDP-Star™	Stammlösung (12,5 mM, Tropix) → 1 : 500 in Puffer III verdünnt
EB-Puffer	10 mM Tris/HCl → pH 8,5
Hybridisierungspuffer (Clondiag-Chip)	6x SSPE 0,1 % SDS
Lysis-Puffer	40 mM TRIS/Acetat 20 mM Natriumacetat 1 mM EDTA 1% SDS
Prähybridisierungspuffer (Southern-Blot)	0,5 M Na-phosphat 7 % SDS 1 mM EDTA 0,5 % <i>Blocking</i> -Reagenz (Roche) → pH 7,2
Puffer 1 (Southern Blot)	100 mM Tris/HCl 150 mM NaCl → pH 7,5
Puffer 2 (Southern-Blot)	Puffer I + 0,5 % <i>Blocking</i> -Reagenz
Puffer 3 (Southern-Blot)	100 mM Tris/HCl 100 mM NaCl 50 mM MgCl <sub>2</sub> → pH 9,5
Proteinase K Stammlösung	50 mg/ml Proteinase K in Wasser
Streptavidin-Peroxidase-Lsg. (Clondiag-Chip)	1 µl ad 100 µl Hybridisierungspuffer
SSPE (10x)	1,5 M NaCl 0,1 M Natriumhydrogenphosphat 0,01 M EDTA → mit NaOH auf pH 7,4 einstellen
SSC (20 x) (Clondiag-Chip)	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat
TBE-Puffer (10x)	0,9 M Tris (108 g/l) 0,9 M Borsäure (55 g/l) 0,02 M EDTA (7,5 g/l) → pH 8,3 – 8,5
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA → pH 8,0

Waschlösung (Southern-Blot)	40 mM Na-phosphat 1 % SDS 1 mM EDTA → pH 7,2
Waschpuffer 1 (Clondiag-Chip)	2 x SSC 0,01 % Triton
Waschpuffer 2 (Clondiag-Chip)	2 x SSC
Waschpuffer 3 (Clondiag-Chip)	0,2 x SSC
Waschpuffer (Regenerierung der Membran, Southern-Blot)	50 mM Na-phosphat → pH 6,5

### Prozentangaben

Die Prozentangaben für die Herstellung von Lösungen geben bei Einwaage von Feststoffen das Verhältnis  $\frac{Masse}{Volumen}$ , bei Zugabe flüssiger Substanzen das Verhältnis  $\frac{Volumen}{Volumen}$  an.

### 3.1.5 Verbrauchsmaterial

Filterpapier GB 003	Schleier und Schuell
Kryoröhrchen	Greiner
Minitüb und dazugehörige Perlen	Minitüb GmbH Abfuell- und Labortechnik
N+-Hybond-Membran	Amersham Pharmacia
Pasteurpipette	Sarstedt
Petrischalen (Ø 9 cm)	Sarstedt
6- und 12 Well-Platten	Greiner
Pipettenspitzen	Sarstedt
Reaktionsgefäß (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Reaktionsgefäß (50 ml, 15 ml)	Greiner
Röntgenfilme „X-OMAT™ AR“	Kodak
Spritzen (1ml, 20ml, 50 ml)	Braun
Sterilfilter	Millipore Corporation
Toilettenpapier	Rossmann
Wattestäbchen	Centramed GmbH

### 3.1.6 Geräte

Analysenwaage 3100S	Sartorius
Analysenwaage BP 210S	Sartorius
AT-Reader (Chip technologies)	Clondiag



Biofuge Primo	Heraeus
Brutschrank	Heraeus
Clondiag-Chip (5. Generation)	Clondiag
Eppendorf-Zentrifuge 5415D	Eppendorf
Eppendorf-Zentrifuge 5436	Eppendorf
Freezer -20°C	Liebherr
Freezer -85°C Ultralow Freezer	Nuaire
Hochdruckdampfsterilisator 50-2-3	KSG Sterilisatoren
Hybridisierungsöfen 400 HY	Bachofer
Kühlschrank	Liebherr
Magnetrührer Ret basics	IKA Labortechnik, Jürgens
Mikrowelle le luxe M710	Miele
pH-Messgerät 761 Calimatic	Knick
Pipetten	Gilson
Reagenzglas-Schüttler Reax 2000	Heidolph
Schüttelinkubator Certomat HK	Braun Biotech International
Schüttelwasserbad Modell G76	New Brunswick Scientific
Schwenktisch HS 250	Janke & Kukel Ika Labortechnik
Sorvall RC 5B Plus Zentrifuge dazu Rotoren: GS-3 (SLA3000) GSA (SLA1500)	Thermo Scientific
Spannungsquelle Power pac 300	Biorad
Spannungsquelle Power Supply Gene line	Beckman
Spectrometer U-3000	Hitachi
Sterilguard Hood, class 2, Type AI83	Baker company
Thermocycler	Landgraf
Thermomixer comfort	Eppendorf
UV- Transluminator	Bachofer
Zentrifuge Rotina 38	Hettich

### 3.1.7 *In silico*-Analysen

#### 3.1.7.1 Literaturrecherche

Für die Literaturrecherche wurde die Literaturdatenbank des „National Center for Biotechnological Information“ (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) verwendet.

### 3.1.7.2 Sequenzanalyse *in silico*

DNA-Sequenzen wurden, sofern sie nicht aus vorherigen Arbeiten bekannt waren, zum einen aus der Sequenzdatenbank „Genbank“ der NCBI-Homepage (Benson et al., 2007) und zum anderen von der Internetseite des Genomsequenzierungsprojektes von *P. aeruginosa* PAO1 (<http://www.pseudomonas.com>) verwendet.

Um verschiedene Genomsequenzen miteinander zu vergleichen und die Ähnlichkeiten bzw. Unterschiede der Sequenzen hervorzuheben, wurde ein „Basic Local Alignment Search Tool“ (Blast) verwendet (Altschul et al., 1990). Das Programm „Blast two sequences“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>) gibt beim Vergleich zweier Nukleotidsequenzen den Grad der Sequenzähnlichkeit an (Johnson et al., 2008). Programme wie Jalview (<http://www.jalview.org>) erlaubten sogar den simultanen Vergleich mehrerer Sequenzen (Clamp et al., 2004; Waterhouse et al., 2009).

### 3.1.7.3 Stammbaumdarstellung mit dem Programm eBurst

Das Programm „eBurst V3“ (<http://www.eBurst.mlst.net>), welches von Feil et al. als Weiterentwicklung des früheren Algorithmus BURST beschrieben wurde, führt eine Gruppierung eines Datensatzes nach der „Multilocus Sequenz Typisierung“ (MLST) durch (Feil et al. 2001, 2004). Die Daten werden hierbei in Gruppen von verwandten Sequenztypen, die sich nicht überschneiden, eingeteilt. Die Einteilung basiert dabei auf der Anzahl der Unterschiede zwischen den einzelnen Sequenztypen, wobei jeder Sequenztyp nur maximal einer Gruppe zugeordnet werden kann. Als klonaler Komplex werden dabei die Sequenztypen bezeichnet, die auf den gleichen „Urstamm“ basieren.

Bei der Analyse kann der Benutzer das Ausmaß an Unterschieden variieren, um so zwei verschiedene Sequenztypen in einen klonalen Komplex einzuordnen. Bei der Voreinstellung hat jeder Sequenztyp mindestens ein „single locus variant“ (SLV) mit sechs gemeinsamen Allelen und einer Abweichung innerhalb der Gruppe. Das Programm eBurst errechnet daraufhin ein Diagramm, in dem alle Sequenztypen dieser Gruppe miteinander verbunden sind und so einen klonalen Komplex formen. Stimmen lediglich nur fünf der insgesamt sieben Allele überein, spricht man von „double locus variant“ (DLV). Zusätzlich erkennt das Programm den Sequenztyp mit den meisten SLV und definiert diesen Stamm als „Gründer“. Basierend auf der Anzahl der SLVs können andere Sequenztypen als „Subgründer“ hervorgehoben werden. In Abb. 3.1.1 wird sowohl die Identifizierung des „Gründers“ als auch die Bedeutung eines SLVs, bzw. DLVs veranschaulicht.

Durch die Gesamtheit dieser Funktionen ermöglicht das Programm eBurst eine modellhafte Darstellung der Diversifikation von Bakterienklonen.

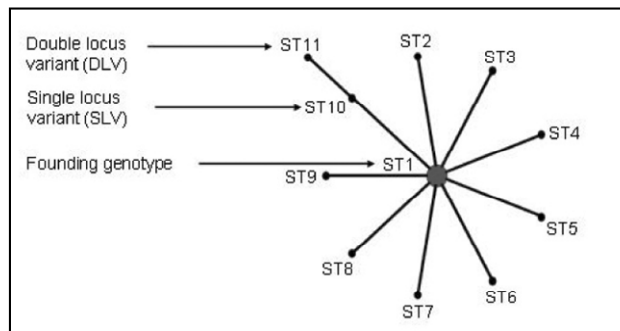


Abb. 3.1.1: Veranschaulichung des Aufbaus eines phylogenetischen Baums mit Hilfe des Programms eBurst

### 3.1.7.4 Programme zur Auswertung des PATA1-Arrays

Für die Auswertung des PATA1-Array, wurde der „Integrated Genome Browser“ (IGB) verwendet. Dieses Programm ist eine Anwendung, um Genome zu visualisieren und zu erforschen und gleichzeitig mit Annotationen von verschiedenen Datenquellen in Verbindung zu bringen.

Der IGB ist kommerziell unter der „Common Public License v1.0“ auf der Homepage von Affymetrix ([http://www.affymetrix.com/support/developer/tools/igbsource\\_terms.affx](http://www.affymetrix.com/support/developer/tools/igbsource_terms.affx)) erhältlich.

## **3.1.8 Statistik**

### 3.1.8.1 Simpson Index

Der Simpson-Index wurde 1949 zur Beschreibung der Biodiversität entwickelt. Dieser Index berechnet die Wahrscheinlichkeit, mit der zwei aus einer Stichprobe zufällig ausgewählten Individuen der gleichen Art angehören. Hierzu werden die Wahrscheinlichkeiten, eine bestimmte Art  $i$  zu wählen und diese in einem zweiten Schritt nochmals zu wählen, wobei bei der zweiten Wahl das erste Individuum nicht mehr zur Verfügung steht, miteinander multipliziert und das Produkt für alle Arten summiert.

$$D = \sum_{i=1}^S \frac{n_i(n_i - 1)}{n(n - 1)}$$

- $n_i$  = Zahl der Individuen einer Art  
 $i$  = Art  
 $n$  = Gesamtzahl der Individuen  
 $S$  = Anzahl der Spezies

### 3.1.8.2 Shannon-Index

Dieser Index wird ebenfalls zur Biodiversitätsbestimmung verwendet. Es werden sowohl die unterschiedliche Artenzahl als auch die Anzahl der Individuen je Art berücksichtigt. Der standardisierte Shannon-Index wird als *Eveness* bezeichnet und ermöglicht die Vergleichbarkeit eines Datenpools unter verschiedenen Aspekten.

$$H' = -\sum_i p_i * \ln p_i$$

$$p = \frac{n_i}{N}$$

- $p_i$  = Anteil einer Spezies  
 $i$  = Spezies  
 $n$  = Gesamtzahl

### 3.1.8.3 Hauptkomponentenanalyse („Principal Component Analysis, PCA“)

Die Hauptkomponentenanalyse gehört zu den Verfahren der multivariaten Statistik und dient dazu, umfangreiche Datensätze zu vereinfachen. Beschrieben wurde diese Methode bereits in den Veröffentlichungen von Rouvier et al. (1966) und Laster et al. (1967). Die Vereinfachung lässt sich dadurch erreichen, dass die Datensätze strukturiert und somit veranschaulicht werden. Die Mehrzahl der statistischen Variablen wird durch eine geringere Zahl möglichst aussagekräftiger Linearkombinationen genähert. Die Linearkombinationen werden als Hauptkomponenten betrachtet (Quinn & Keough, 2002; siehe auch Abb. 3.1.2).

Bei dieser Analyse weist der Datensatz die Struktur einer Matrix auf ( $n$  Punkte im  $p$ -dimensionalen Raum  $R^p$ ). Ziel der Analyse ist es die Datenpunkte  $n$  in einem  $q$ -dimensionalen Unterraum  $R^q$  ( $q < p$ ) zu projizieren und dabei möglichst wenig Informationen zu verlieren. Um dieses Ziel zu erreichen, wird in das  $p$ -dimensionale Koordinatensystem, in dem die Datenpunkte  $n$  als Punktwolke vorliegen, in ein neues Koordinatensystem gelegt und rotiert (Hauptachsentransformation). Dabei wird die erste Achse so durch das Koordinatensystem gelegt, dass die Varianz der Daten maximal wird. Die zweite Achse steht senkrecht zur ersten und trägt die zweitgrößte Varianz. In einem  $p$ -dimensionalen Raum besteht insgesamt die Möglichkeit  $p$  viele Achsen zu bilden, die zueinander orthogonal verlaufen (orthogonale Matrix, die aus Eigenvektoren einer Kovarianzmatrix gebildet wird). Die Gesamtvarianz

berechnet sich dabei aus der Summe aller Achsenvarianzen. Wird der größte Anteil der Gesamtvarianz durch die ersten Achsen abgedeckt, sind diese Faktoren ausreichend für den Informationsgehalt des Datensatzes und die anderen Achsen (Daten) können vernachlässigt werden. Somit kommt es zu einer Datenreduzierung, ohne an Informationsgehalt zu verlieren. Bei einem normalverteilten Datensatz sind die einzelnen Komponenten nach der Hauptkomponentenanalyse voneinander statistisch unabhängig.

Um erstmal eine Vorstellung von der Struktur eines Datensatzes zu bekommen, wird die Hauptkomponentenanalyse häufig auch zur Clusteranalyse verwendet. Wichtig dabei ist, dass die Richtungen mit der größten Streuung (Varianz) die meisten Informationen beinhalten.

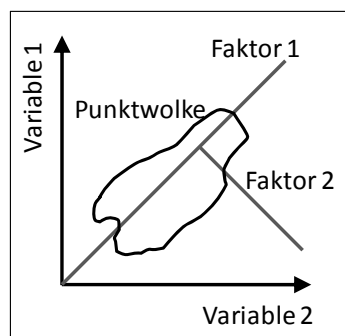


Abb. 3.1.2: Darstellung einer Hauptkomponentenanalyse

#### 3.1.8.4 Wilcoxon-Rangsummentest

Mit dem Wilcoxon-Rangsummentest (Wilcoxon, 1945) wird geprüft, wie sich zwei verbundene Stichproben untereinander verhalten. Es wird vorausgesetzt, dass die Beobachtungswerte in den Stichproben nach der Größe (ihrem Rang) geordnet sind.

Hierzu wurden die Differenzen zwischen den Prüfgrößen beider Stichproben gebildet, der Größe nach sortiert und den Differenzen ein entstehender Rang zugeordnet. Die Rangzahlen mit dem Vorzeichen, das seltener vorkommt, werden aufsummiert und ergeben die Summe  $S$ . Für Stichprobengrößen  $> 25$  kann der Wert  $u$  mit folgender Formel errechnet werden:

$$u = \frac{S - \mu_S}{\sigma_S} = \frac{S - \frac{n(n+1)}{4}}{\sqrt{\frac{n(n+1) * (2n+1)}{n}}}$$

Diese Variable  $u$  ist normalverteilt mit dem Mittelwert 0 und der Varianz 1. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  kann aus einer Tabelle des Buchs „Biologischer Grundriss der Statistik“ abgelesen werden (Weber, 1986).

### 3.4.8.5 Monte Carlo Simulation mit Hilfe der Clump-Software

Die Software Clump (Sham & Curtis, 1995) ermöglicht durch die Durchführung einer Monte Carlo Simulation die Beschreibung der Unterschiedlichkeit zweier Untersuchungsgrößen.

Eine Probe mit N Untersuchungsgrößen erzeugt dabei eine N x 2 Tabelle. Mit dieser Tabelle als Grundlage werden durch die Monte Carlo Simulation z.B. 1000 Tabellen gebildet. Dabei werden für den realen Datensatz und für die simulierten Tabellen jeweils die Prüfgröße  $\chi^2$  ermittelt. Die Clump-Software vergleicht, wie häufig unter den simulierten Tabellen eine ebenso seltene oder seltenere Verteilung auftritt ( $\chi^2_{\text{simulierte Tabelle}} \geq \chi^2_{\text{realer Datensatz}}$ ). Der p-Wert des zu überprüfenden Datensatzes wird vom Programm mit folgender Formel berechnet:

$$p = \frac{\sum (\chi^2_{\text{simulierte Tabelle}} \geq \chi^2_{\text{realer Datensatz}})}{\text{Anzahl simulierter Tabellen}}$$

Das Programm Clump verwendet bei der Simulation und der Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  vier verschiedene Algorithmen (T1-T4).

- Bei T1 werden die Berechnungen anhand einer N x 2 Tabelle durchgeführt.
- Beim Algorithmus T2 werden die Spalten mit kleinen Beobachtungszahlen solange summiert, bis mind. eine Beobachtungszahl von 5 erreicht wird. Die anschließende  $\chi^2$  Berechnung wird mit der reduzierten Spaltenzahl durchgeführt.
- Der Algorithmus T3 vergleicht jeweils eine Spalte mit der Summe aller anderen Spalten. Der beste  $\chi^2$  Wert wird ausgegeben.
- Für die  $\chi^2$  Bestimmung mit dem T4 Algorithmus werden jeweils n Spalten summiert und mit allen Möglichkeiten eine 2 x 2 Tabelle zu erstellen, verglichen. Hier wird ebenfalls der beste  $\chi^2$  Wert ausgegeben.

## **3.2 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN**

### **3.2.1 Bakterienstämme**

Bei allen verwendeten Stämmen handelte es sich um *P. aeruginosa* Isolate, die in LB Medium bei 37°C angezüchtet wurden. Der *P. aeruginosa* Stamm PAO DSM1707 (Holloway, 1955) wurde in den Experimenten als Referenz verwendet. Dieser weist zum sequenzierten Stamm

PAO1 (www.pseudomonas.com; Stover et al., 2000) eine große chromosomale Inversion sowie eine 20 kb große Insertion auf.

Die Habitate, aus denen die verschiedenen Proben isoliert wurden, umfassen die Umwelt (Boden, Wasser, Ozean), das Tier (Nerz) und den Menschen (Isolate von Intensivpatienten, Isolate von Patienten mit Bakteriämien und Ohrinfektionen, Brandwundenisolate sowie Isolate von CF-Patienten aus verschiedenen CF-Zentren weltweit).

### 3.2.1.1 Referenzstammsammlung

Die Referenzstammsammlung umfasst 282 verschiedene *P. aeruginosa* Isolate. Hierzu gehören:

1. 20 Umweltisolate aus Japan, Nordamerika und Europa (zum Teil beschrieben in Morales et al., 2004)
2. 136 CF-Isolate aus 40 verschiedenen europäischen CF-Kliniken (teilweise beschrieben in Morales et al., 2004 und Grothues et al., 1988); siehe auch Kapitel 3.2.1.2
3. 58 Isolate aus 13 Intensivstationen 6 verschiedener Länder (Anb006-2001: Proof-of-concept study to investigate the impact of azithromycin iv. vs. placebo on the prevention of pneumonia in ventilated patients colonized with *P. aeruginosa*); Genotypisierung wurde durchgeführt von Thilo Köhler, Genf
4. 23 *P. aeruginosa* Isolate anderer humaner Infektionskrankheiten (Bakteriämien und Ohrinfektionen) aus 7 verschiedenen Kliniken
5. 15 Isolate aus dem pazifischen Ozean (Küste Japans und Tiefwasserproben)
6. 14 Brandwundenisolate aus Krakau, Polen
7. 13 Nerzisolate aus 5 verschiedenen Ländern
8. 3 verschiedene ATCC Stämme unbekannter Herkunft

### 3.2.1.2 *P. aeruginosa* Isolate aus der Geschwister und Zwillingsstudie

Bei dieser Studie handelt es sich um 85 verschiedene *P. aeruginosa* Isolate von 55 CF Geschwistern und Zwillingspaaren, die von 1996-1998 isoliert wurden. Die Behandlung der Geschwisterpaare wurde in 35 verschiedenen CF-Zentren (11 europäischen Ländern) durchgeführt. Die Kohorte wird in der Veröffentlichung von Bronsveld et al. (2001) näher beschrieben.

### 3.2.1.3 Sequentielle *P. aeruginosa* Isolate von Patienten mit cystischer Fibrose

Weltweit gibt es nur zwei CF-Zentren (Hannover und Kopenhagen) mit sequentiellen *P. aeruginosa* Isolate von verschiedenen CF-Patienten, die über einen Zeitraum von mind. 20 Jahren, demnach von Beginn der Kolonisation bis zum heutigen Zeitpunkt, gesammelt wurden. Die Langzeitverläufe dieser beiden Studien wurden miteinander verglichen.

Im Rahmen der Behandlung wurden alle CF-Patienten in Hannover alle drei Monate überwacht und der klinische Status eines jeden analysiert. In der Kopenhagener CF-Ambulanz fand die Überwachung sogar monatlich statt. In Hannover wurde bei jedem Besuch, jedoch mind. 4-mal jährlich, eine Sputumprobe entnommen und auf An- bzw. Abwesenheit von *P. aeruginosa* überprüft. In Kopenhagen wurde sogar alle 6 Wochen eine Sputumprobe entnommen und bakteriologisch untersucht. Die Isolation und Identifizierung von *P. aeruginosa* aus Sputum wurden in der mikrobiologischen Abteilung der jeweiligen Kliniken durchgeführt. Mit Hilfe eines Selektivagars wurde *P. aeruginosa* zuerst aus dem Sputum isoliert und anschließend durch eine Reihe biochemischer Tests identifiziert. Im halbjährlichen Abstand wurden von jeder *P. aeruginosa* positiven Sputumprobe mind. eine Kolonie jedes Morphotyps bei -80°C eingefroren. Außerdem wurde routinemäßig von allen Sputumproben ein Antibiogramm erstellt.

Zur Analyse wurden verschiedene sequentielle Isolate von insgesamt 46 Patienten so ausgewählt, dass der Langzeitinfektionsverlauf in mind. 5 Jahresabständen dokumentiert werden konnte. Bei dem jeweils frühesten Isolat eines Patienten handelte es sich um den ersten *P. aeruginosa* positiven Befund (in Hannover zwischen 1981-1993; in Kopenhagen zwischen 1978-1991) und bei dem letzten Isolat, sofern die Patienten noch lebten und nicht lungentransplantiert worden waren, um Isolate aus dem Jahr 2004 aus Hannover und dem Jahr 2000 aus Kopenhagen. Bei den Patienten, die während des Beobachtungszeitraums verstarben oder lungentransplantiert worden waren, wurde das jeweils letzte Isolat, welches zur Verfügung stand, genotypisiert.

Die erste Kohorte umfasst 377 sequentielle Isolate von 35 verschiedenen CF-Patienten. Das Geburtsdatum der Probanden liegt zwischen 1964 und 1987 (Median 1967) und das Alter, in dem es zur chronischen Besiedelung mit *P. aeruginosa* kam, lag zwischen 4 und 26 Jahren (Median 11 Jahre).

Die zweite Kohorte kommt aus dem CF-Zentrum des Rigshospitalet in Kopenhagen und umfasst 142 sequentielle Isolate von 12 verschiedenen CF-Patienten. Hier liegt das Geburtsdatum der Studie zugehöriger CF-Patienten zwischen dem Jahr 1960 und 1970



(Median 1967) und das Alter für die chronische Besiedelung mit *P. aeruginosa* lag zwischen dem sechsten und zwölften Lebensjahr (Median 10,5).

42 von 46 Patienten (Hannover und Kopenhagen zusammen) weisen die häufigste der Mutationen in mind. einem *CFTR* Gen auf, die Deletion eines Phenylalaninrestes an der Position 508. Von diesen Patienten sind 29 F508del homozygot und dreizehn F508del compound-heterozygot. Die anderen vier Patienten weisen einen nicht-F508del Mutationsgenotypen auf.

Nähere Informationen zu den Patienten sind aus der Tabelle 10.1.1 des Anhangs zu entnehmen.

#### 3.2.1.4 *P. aeruginosa* Isolate aus einer anderen Patientenkohorte der Medizinischen Hochschule Hannover

Bei diesen Isolaten handelt es sich um Sputumproben mit *P. aeruginosa* von Patienten jüngeren Geburtsdatums, die in der Kinderklinik der Medizinischen Hochschule behandelt werden (Isolierung von 1998-2006). Die Therapie dieser Patienten ist aufgrund des Alters und aufgrund der neuen medizinischen Erkenntnisse eine andere als z.B. in der Langzeitstudie oder der Geschwister- und Zwillingsstudie, die zuvor beschrieben wurde. Durch das junge Alter der Patienten konnte bis zum heutigen Zeitpunkt erst eine kurze Verfolgung stattfinden. Ziel dieser Studie war es sowohl die Klondiversität an der Medizinischen Hochschule zu ermitteln als auch eine Hygienestudie durchzuführen und somit eventuelle Kreuzinfektionen aufzudecken.

Diese Studie umfasst insgesamt 418 *P. aeruginosa* Isolate von 61 Patienten.

#### 3.2.1.5 Studie zum Vergleich von *P. aeruginosa* Isolaten aus den oberen Atemwegen (Nasen-Rachenraum) und den unteren Atemwegen

Hierzu wurden 65 *P. aeruginosa* Isolate von 24 verschiedenen Patienten aus vier deutschen CF-Zentren typisiert. Neben den normalen Sputumproben, die die Flora der unteren Atemwege charakterisieren, wurden auch Proben aus dem Nasenbereich der Patienten entnommen. Somit konnte die Flora der unteren Atemwege mit denen der oberen Atemwege (Nasenraum) verglichen werden. Das Besondere bei den Proben aus dem Nasenraum war, dass sie nicht, wie bisher häufig durchgeführt, durch einen Nasenabstrich sondern durch eine Nasenlavage (Nasenspülung) gewonnen wurden.

Eine Beschreibung aller verwendeten Isolate befindet sich auf der beigegeführten CD in der Datei Genotypisierungen.

### 3.2.2. Verwendete Nährmedien

Artificial Sputum Medium	1 l steriles Wasser 5 g Mucin 4 g DNA(aus Hering Sperma) 5,9 mg DPTA 5 g NaCl 2,2 g KCl 5 ml Eigelb-Suspension 5 g Aminosäuren (250 mg pro Aminosäure) → pH 6,9 mit HEPES einstellen
King A-Medium	20 g/l Trypton 3,3 g/l $MgCl_2 \times 6 H_2O$ 20 g/l KOH 5,5 ml konz. $H_2SO_4$ 10 g/l Glycerin → pH 7,2 mit $H_2SO_4$ einstellen
1 x Luria-Bertani Medium (LB)	15 g/l Caseinhydrolysat 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl → auf pH 7,0 einstellen
LB-Agar	Zur Herstellung eines festen Nährbodens werden 10 g/l Agar eingewogen → 2%, für weniger Prozent, entsprechend weniger Agar einwiegen
10x M9-Medium	6,81 g/l $Na_2HPO_4$ 30 g/l $KH_2PO_4$ 0,5 g/l NaCl 1 g/l $NH_4Cl$ → als Kohlenstoffquelle dient 1% Glycerin
10 x MM9- Medium	10 g/l $NH_4Cl$ 3 g/l $KH_2PO_4$ 5 g/l NaCl
Minimalagar + Casein	0,48 M $Na_2HPO_4$ 0,22 M $KH_2PO_4$ 85 mM NaCl 0,18 M $NH_4Cl$ 1,5 M Na-Benzoesäure 0,8 % Casein 1 % Agar

### 3.2.3 Anzucht der Bakterien

Alle Bakterien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in LB-Medium im Schüttelinkubator bei 37°C mit 200 – 250 rpm angezogen. Für die Anzucht von Bakterien auf festen Nährböden wurde den jeweiligen Medien in der Regel 10 g/l Agar zugegeben.

### 3.2.4 Lagerung von Bakterien

#### 3.2.4.1 Glycerinkulturen in Kryoröhrchen

Sollten Bakterien für eine längere Zeit bei -80°C gelagert werden, wurden diese in einem Einfriermedium eingefroren. Dieses bestand aus LB-Medium, dem 15 % Glycerin zugegeben wurde. Die Bakterien einer Übernachtskultur wurden hierfür in fünf Minuten bei 8000 rpm vom Medium abgetrennt und in einem nächsten Schritt das Pellet in dem Einfriermedium resuspendiert, in Kryoröhrchen gefüllt und bei -80°C eingefroren. Da Bakterien durch Subkultivierung sehr schnell ihren Phänotyp ändern, sollten die Glycerinkulturen nicht ständig auf- und abgetaut werden.

#### 3.2.4.2 Minitübs

Eine sehr platzsparende Methode Kulturen einzufrieren, sind die Minitübs. Hierbei handelt es sich um schmale, dünne Kunststoffröhrchen. Die Enden dieser Röhrchen sind jeweils auf beiden Seiten mit kleinen Perlen verschlossen (siehe Tab. 3.1).

Da es sich bei den sequentiellen *P. aeruginosa* Isolaten der verschiedenen CF-Patienten um eine große Sammlung handelt, wurde hier die Lagerung in Minitübs bevorzugt.

Die Lagerung der Minitübs fand wie auch der herkömmlichen Glycerinkulturen in Kryoröhrchen bei -80°C statt. Während des Transports von der -80°C Truhe zur Sterilbank und bis zum Animpfen wurden die Minitübs in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Enden wurden mit Hilfe einer sterilen Schere abgeschnitten und die Bakteriensuspension aus den Röhrchen auf eine Petrischale mit LB-Medium gegeben, anschließend wurde die Suspension gleichmäßig verteilt. Nachdem diese in den Nährboden vollständig eingezogen war, wurden die Platten bei 37°C über Nacht inkubiert.

Als Einfriermedium diente LB-Medium mit 15-20 % (v/v) Glycerin. Die Bakterien wurden mit einem sterilen Wattestäbchen von der LB-Platte entnommen und in 1ml Einfriermedium so lange resuspendiert bis eine homogene Suspension vorlag. Von dieser Suspension wurde

mit Hilfe einer Glaspipette etwas Lösung entnommen und in ein einseitig mit einer Perle verschlossenes Minitüb gefüllt. Anschließend wurde auch das andere Ende mit einer Perle verschlossen.

Tab. 3.1: Verwendung farbiger Perlen zur Unterscheidung der verschiedenen Subkulturen

Stammkultur	rote Perlen
1. Subkultur	grüne Perlen
2. Subkultur	hellblaue Perlen
3. Subkultur	dunkelblaue Perlen

### 3.2.5 Bestimmung der Bakterienzellzahl

Die Bestimmung der Bakterienzellzahl wurde mittels des Spektrometers U-3000 von Hitachi bei einer Wellenlänge von 578 nm durchgeführt. Der Zusammenhang zwischen optischer Dichte und Zelldichte ist hierbei folgender:

$$P. aeruginosa: \quad 0,6 \text{ OD}_{578 \text{ nm}} \cong \text{ca. } 1 \cdot 10^9 \text{ Zellen/ml}$$

## 3.3 Zellkultur

Alle Arbeiten wurden hierzu unter einer Sterilbank durchgeführt. Die verwendeten Materialien wurden entweder bei 121 °C und 1,1 bar autoklaviert oder es wurden sterile Einwegartikel verwendet. Proteinhaltige Lösungen und Medien wurden durch Filtrieren sterilisiert.

### 3.3.1 Kultivierung der Zelllinie

In dieser Arbeit wurden A549-Zellen verwendet. Hierbei handelt es sich um adhärent wachsende humane Lungenepithelzellen (aus einem Lungenadenokarzinom), die im Brutschrank bei 37°C unter Begasung mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert wurden.

Für die Kultivierung der A549-Zellen wurde das Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) mit 1000 mg/l D-Glukose (Gibco) verwendet. Dem Medium wurden vor der direkten

Verwendung noch fetales Kälberserum (Endkonz. 10%), L-Glutamin (Endkonz. 1%) sowie die Antibiotika Penicillin und Streptomycin (Endkonz. Jeweils 1%) zugeben.

### **3.3.2 Passagieren von Zellen**

Adhärenz gewachsene A549-Zellen wurden vor dem Passagieren zweimal mit 1 x PBS gewaschen und danach durch Inkubation mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (Endkonz. 0,05%) bei 37 °C vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Dieser Vorgang wurde durch Zugabe eines Vollmediums gestoppt. Die Zellen wurden für 5 min bei 1000 rpm sedimentiert und dann in einem definierten Volumen mit Medium aufgenommen. Zur Bestimmung der Zelldichte diente eine Neubauer-Zählkammer. Anschließend wurde durch Zugabe von Medium die Zellsuspension auf die gewünschte Zelldichte eingestellt und in Zellkulturflaschen überführt.

### **3.3.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Die Zellen wurden nach dem Waschen mit einer Lösung bestehend aus 1 x PBS und 0,05 % Trypsin/EDTA vom Schalenboden abgelöst und 5 min bei 1000 rpm sedimentiert. Das Zellpellet wurde in Zelleinfriermedium (20 % FKS, 70 % DMEM, 10 % DMSO) resuspendiert und die Zellsuspension in ein Kryoröhrchen überführt und bei -80°C eingefroren. Die langfristige Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zum Auftauen wurden die Zellen in dem Kryoröhrchen in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, in Vollmedium aufgenommen und kultiviert.

## **3.4 Molekularbiologische Methoden**

### **3.4.1 Präparation genomischer DNA**

#### 3.4.1.1 Präparation von genomischer DNA mit Phenol-Chloroform Extraktion

Für die Präparation von genomischer DNA aus *P. aeruginosa* wurden am Vortag 5 ml LB-Medium mit Bakterien inokuliert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde am nächsten Morgen für 6 min bei 6000 x g zentrifugiert, das entstandene

Bakterienpellet in 900 µl Lysis-Puffer aufgenommen und bis zur vollständigen Suspendierung gemischt. Nach der Zugabe von 300 µl 5 M NaCl- Lösung wurden die bei der Lyse entstandenen Zelltrümmer und Fragmente durch eine Zentrifugation bei 14000 x g und 4°C für 60 min abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß dekantiert, mit 1 µl RNase A (10 mg/ml) versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Abbau aller eventuell vorhandenen RNA-Kontaminationen wurde zur Aufreinigung der DNA eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Hierfür wurden die Proben nacheinander mit jeweils demselben Volumen Phenol, Phenol/Chloroform (1:1), Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gemischt und die Phasen durch Zentrifugation für 20 min bei 14000 x g getrennt.

Lässt sich die wässrige Phase aufgrund von störenden Proteinresten nur schwer oder unvollständig von der Phenolphase trennen, kann dieser Schritt auch wiederholt werden.

Die Ausfällung der DNA erfolgte durch die Zugabe eines gleichen Volumens Isopropanol und langsamen Schwenkens des Reaktionsgefäßes. Die dabei sichtbar werdende DNA wird für 2-3 min bei Raumtemperatur (RT) und 14000 x g abgetrennt.

Nach zweimaligem Waschen des Pellets mit eiskaltem 70 % Ethanol wird dieses bei 37°C vollständig getrocknet. Das trockene DNA-Pellet wurde in einer entsprechenden Menge ddH<sub>2</sub>O oder TE-Puffer (DNA-Endkonzentration ca. 0,5 µg/µl) aufgenommen und zum vollständigen Lösen 2-3 Tage bei Raumtemperatur oder 4°C stengelassen.

#### 3.4.1.2 Präparation von genomischer DNA mit dem Blood and Tissue Kit

Die DNA aus einigen Proben der Competitionsexperimente wurde mit Hilfe des „DNeasy Blood and Tissue Kit“ der Firma Qiagen isoliert. Hierzu wurden zwei bzw. vier ml der Bakterienkulturen abgenommen, die Bakterien in 6 min bei 6000 x g pelletiert und anschließend einmal mit e-pure Wasser gewaschen.

Das gewaschene Bakterienpellet wurde gemäß dem Protokoll des Kits weiter behandelt.

### **3.4.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm (280 nm). Es gilt bei einer Schichtdicke von 1 cm:

$E_{260}$  von 1 entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA

Um die Reinheit der isolierten DNA prüfen, kann der Quotient aus  $\frac{E_{260nm}}{E_{280nm}}$  bestimmt werden.

Dabei sollte der Quotient hochreiner DNA von etwa 1,8 ergeben. Liegt der Wert unter 1,8 handelt es sich um eine RNA-Kontamination, liegt der Quotient über 1,8 handelt es sich um Proteinverunreinigungen.

### 3.4.3 Polymerase-Kettenreaktion

Zu Beginn der 70er Jahre kam Kjell Kleppe aus dem Labor von Ha Gobind Khorana bereits auf die Idee, DNA durch zwei flankierende Primer zu vervielfältigen (Kleppe et al., 1971). Diese Idee geriet allerdings bis 1983 in Vergessenheit. In diesem Jahr wurde die Polymerase Kettenreaktion (PCR) von Kary Mullis erneut erfunden (Saiki et al., 1988).

Innerhalb dieser Reaktion werden drei Schritte vollzogen:

1. Denaturierung bei 94°C, um die doppelsträngige DNA und eventuell zusammengelagerte Primer voneinander zu trennen.
2. Annealing bei ca. 55 – 65°C, hier hybridisieren die Primer an die komplementäre Stelle der Einzelstrang-DNA.
3. Elongation bei 72°C (Temperaturoptimum der *Taq* – Polymerase), hier findet die Verlängerung der Primer mit Nukleotiden anhand der DNA-Matrize statt.

Ein entscheidender und gleichfalls kritischer Faktor der PCR ist das Primerdesign. Bei der Auswahl der jeweiligen Sequenzen wurden folgende Punkte berücksichtigt:

1. Der GC-Gehalt der Primer sollte ungefähr dem der DNA-Matrize entsprechen. Da *P. aeruginosa* einen hohen GC-Gehalt aufweist (65 %), sollte dieser bei mind. 60 % liegen.
2. Die Schmelztemperatur der Primer sollte möglichst oberhalb von 60°C liegen. Dies kann mit der Formel  $T_M = \sum(GC) * 4^\circ C + \sum(AT) * 2^\circ C$  abgeschätzt werden (Marmur et al, 1962).
3. Ein Primerpaar sollte möglichst einen vergleichbaren Schmelzpunkt aufweisen.
4. Die Primer sollten keine selbst-komplementären Strukturen aufweisen. Dies führt zu schlechter bzw. keiner Hybridisierung.
5. Die optimale Primerlänge liegt zwischen 20 und 25 bp.
6. Um fehlerhafte Hybridisierungen oder Leserasterverschiebungen zu vermeiden, sollten nicht vier gleiche Basen aufeinander folgen.

7. Durch ein GC (Guanosin und Cytosin) am 3'-Ende des Primers kommt es zu einer Stabilisierung der Hybridisierung.
8. Durch Abgleich mit einer Datenbank (z.B. unter [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)) sollte sichergestellt werden, dass es möglichst keine homologen Sequenzen im Genom gibt.

Die bei den Versuchen verwendeten Primer werden im jeweiligen Abschnitt „Ergebnisse und Diskussion“ beschrieben. Die dazugehörigen Sequenzen befinden sich im Anhang in Tab. 10.2.1 (Primer für den AT-Chip) und 10.2.2 (alle anderen verwendeten Primer).

### 3.4.3.1 Standard PCR-Ansatz

Für die herkömmliche PCR wurde in den Experimenten die InViTek-Taq-Polymerase verwendet. Das Gesamtvolumen dieses PCR-Ansatzes belief sich dabei auf 25  $\mu\text{l}$ , der nach folgendem Schema angesetzt wurde:

10 x Reaktionspuffer	2,5 $\mu\text{l}$
Primer [ Endkonz. 5 $\mu\text{M}$ ]	je 2,5 $\mu\text{l}$
dNTPs [Endkonz. 8 mM]	2,5 $\mu\text{l}$
[je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP]	
DMSO	1,25 $\mu\text{l}$
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,75 $\mu\text{l}$
InViTek-Taq-Polymerase	0,5 $\mu\text{l}$
bakterielle DNA	100 ng
bidest. Wasser	x $\mu\text{l}$
<b>Endvolumen</b>	<b>25 <math>\mu\text{l}</math></b>

Bei einem anderen Gesamtvolumen wurden die einzelnen Volumina dementsprechend angepasst. Da sich der Deckel des verwendeten Thermocyclers nicht aufheizen ließ, wurde der Reaktionsansatz anschließend mit Paraffin-Öl überschichtet und das PCR-Programm gestartet. Dabei handelt es sich bei  $T_{\text{An}}$  um die Hybridisierungstemperatur der Primer, bei  $t_{\text{Elong}}$  um die gewählte Elongationszeit und bei  $t_{\text{Den}}$  um die gewünschte Denaturierungszeit während der Zyklen:

Denaturierung	300s	96°C	→ 1 Zyklus
Annealing	60s	$T_{\text{An}}$	} 35 Zyklen
Elongation	$t_{\text{Elong}}$	72°C	
Denaturierung	$t_{\text{Den}}$	96°C	
Annealing	60s	$T_{\text{An}}$	} 1 Zyklus
Elongation	$t_{\text{Elong}}$	72°C	
Kühlung	$\infty$	10°C	



Abhängig von der unterschiedlichen Produktlänge, die in den verschiedenen Experimenten variierte, mussten die Elongationszeit und auch die Denaturierungszeit während der Zyklen der Produktgröße angepasst werden. Die Annealingtemperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur der Primer (siehe Kapitel 3.4.3).

In den Experimenten, in denen direkt eine Einzelkolonie von einer Platte in die PCR eingesetzt wurde (*Colony-PCR*), wurde die Polymerase erst nach dem ersten Denaturierungsschritt zum Reaktionsansatz hinzugefügt.

In den meisten Fällen wurde direkt nach der PCR zur Überprüfung der Produktgröße, der Qualität und auch der Ausbeute eine Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 3.4.4) durchgeführt.

Bei der genomischen DNA von *P. aeruginosa* kommt es aufgrund des schon erwähnten hohen GC-Gehaltes häufig zur Bildung von Sekundärstrukturen. Diese können die Amplifikation der betroffenen DNA-Abschnitte stark beeinträchtigen. Aus diesem Grund wurde der PCR das chaotrope Reagenz DMSO hinzugegeben. Dadurch sollte das Aufschmelzen der DNA erleichtert werden. Eine zu hohe DMSO Konzentration kann allerdings auch zu einer Reduktion der Polymeraseaktivität bis auf 50 % führen (Gelfand, 1988).

#### 3.4.3.2 Einzel PCR-Ansatz mit der Goldstar-Taq-Polymerase

Die zuvor beschriebene InViTek-Taq Polymerase arbeitet zwar sehr prozessiv (1 kb/min), besitzt aber keine Korrekturlesefähigkeit und weist somit eine erhöhte Fehlerrate auf.

Für einige der durchgeführten Experimente war es allerdings sehr wichtig, eine Polymerase mit einer Korrekturlesefunktion zu verwenden, z.B. bei Sequenzierung des PCR-Produktes oder bei Produkten, die in „*single nuclear polymorphism*“ (SNP) basierten Restriktionsverdauen eingesetzt wurden. Hier wurde die Goldstar-Taq-Polymerase verwendet. Diese weist eine 5'→3' Exonuklease Aktivität mit einer Fehlerrate von  $5 \cdot 10^{-5}$  auf.

Bei dieser PCR wurde ein Gesamtansatz von 50 µl wie folgt zusammengegeben:

10 x Reaktionspuffer	5 µl
Primer [ Endkonz. 5µM]	je 3 µl
dNTPs [Endkonz. 8 mM]	3 µl
[je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP]	
DMSO	1,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 µl
Goldstar-Taq-Polymerase	0,2 µl
bakterielle DNA	100 ng
bidest. Wasser	x µl
<b>Endvolumen</b>	<b>50 µl</b>

### 3.4.3.3 Multiplex PCR

In einer Multiplex-PCR können unter identischen Bedingungen sowohl verschiedene Parameter einer PCR als auch das DNA-Template oder die Primer variiert werden.

Bei der Markersuche für die Konkurrenzexperimente wurde diese Methode angewendet. Hierbei wurden die PCR unterschiedlicher DNA-Templates mit verschiedenen Primerpaaren und variierenden  $MgCl_2$ -Konzentrationen optimiert und die Produkte anschließend sequenziert.

### 3.4.3.4 PCR für die Clondiag-Chip Detektion

Bei der herkömmlichen Polymerasekettenreaktion (PCR) kann unter Verwendung von zwei spezifischen Oligonukleotiden, einer thermostabilen DNA-Polymerase und eines bestimmten, sich mehrmals wiederholenden Temperaturzyklus DNA fast exponentiell *in vitro* vervielfältigt werden.

Dieses Prinzip konnte bei dem *P. aeruginosa* AT-Array nicht verwendet werden, da die Unterschiede der Signalintensitäten bei der Detektion des Chips durch eine exponentielle Amplifizierung viel größer erscheinen würden als sie es real sein würden. Dieses Problem wurde durch die Verwendung einer linearen Amplifizierung gelöst. Hierbei wird nur ein Primer, der in eine Richtung amplifiziert, verwendet. Unter diesen Reaktionsbedingungen kommt es zu einer selektiven Amplifikation des Stranges, der wiederum an die Sonde bindet. Konkurrenzreaktionen zwischen der Renaturierung der beiden Amplikon-Stränge und der Sondenanlagerung werden somit zu „seinen Gunsten“ verschoben (Lottspeich und Zorbas, 1998). Durch den Einsatz von zwei benachbarten, gleichgerichteten Primern (Abstand zueinander zwischen 30bp-61bp) wurde dieser Effekt noch verstärkt. Die Primer wurden *in silico* auf der Grundlage passender Hybridisierungskinetiken ausgewählt (SantaLucia et al., 1998).

Da die Signale mit der oft verwendeten Oligonukleotid-3'-Endmarkierung bei einer linearen Amplifikation für eine Auswertung zu schwach ausfallen würden, wurden die PCR-Produkte mit Biotin-16-dUTP durchgehend markiert und somit eine Signalverstärkung erzeugt. Die Polymerase musste die Markierung selbst, sowie auch das Biotin-dUTP tolerieren, ohne die Amplifikation abbrechen und den Strang abzubauen.

Diese Eigenschaften wurden von der Terminator-Polymerase erfüllt (Gardner et al., 2002). Da die entstehenden Einzelstränge nicht als weitere Vorlage dienten, fiel die höhere Fehlerquote nur zu einem sehr geringen Prozentsatz ins Gewicht. Nur die Menge der resultierenden Einzelstränge war von Belang.

Durch die Verwendung zweier gleichgerichteter Primer und durch die temperatursensitive „Strand-Displacement-Aktivität“ der Thermanator-Polymerase wurde die Menge des biotinylierten Produkts für alle DNA-Templates erhöht und eine definierte Stranglänge von ca. 250 bp erzeugt.

Mit der Entwicklung dieser Art von PCR war es gelungen, Sonden zu erstellen, bei denen alle Sequenzen dieselbe Spezifität, Sensitivität und Prozessivität aufwiesen.

Für die PCR wurde folgender Ansatz pipettiert:

10 x Thermanator-Puffer	2,5 µl
Primer [ Endkonz. 5µM]	2,5 µl
dNTPs [je 2mM dATP, dGTP, dCTP, 1,5mM dTTP und 0,5 mM dUTP]	2,5µl
DMSO	1,25 µl
Thermanator-Polymerase	0,5 µl
bidest. Wasser	7,75 µl
Bakterien-Template	8 µl
<b>Endvolumen</b>	<b>25 µl</b>

Programmablauf:

Denaturierung	300s	96°C	→ 1 Zyklus
Annealing	20s	60°C	} 40 Zyklen
Elongation	40s	72°C	
Denaturierung	60s	96°C	
Kühlung	∞	10°C	

### 3.4.4 Agarosegelelektrophorese

Die Anwendung der Agarosegelelektrophorese dient der Trennung von Nukleinsäuren für analytische oder präparative Zwecke (Ausubel et al. 1989, Maniatis et al. 1989, Rickwood & Harms 1990). Es wurde mit der Elektrophorese sowohl die Qualität, die Größe als auch die Quantität von PCR-Produkten und genomischer DNA überprüft.

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 1-4 % Agarose verwendet, die Größen betragen 5 x 7 cm, 10 x 14 cm oder 20 x 20 cm. Zur Herstellung der Gele und für die Elektrophorese wurde 1 x TBE verwendet.

Vor dem Auftragen auf ein Gel wurden die Proben mit 6x AP-Puffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte anschließend bei Raumtemperatur mit einer angelegten Feldstärke von 5-8 V/cm oder bei langsamer Auftrennung (über Nacht) bei 4°C und einer Feldstärke von 1,5 – 2 V/cm.

Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Gele in einer Ethidiumbromidlösung (Stammlösung 1 µg/ml) 30 min gefärbt. Das Ethidiumbromid interkaliert dabei zwischen die Basen der DNA und färbt diese an. Nach dem Entfärben für 2 x 20 min in Wasser wurde die DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht (Wellenlänge 312 nm) auf einem Transilluminator sichtbar gemacht. Zur Dokumentation wurden die Gele mit der fluoreszierenden DNA fotografiert.

Neben den zu analysierenden DNA-Proben wurde parallel ein Größenstandard aufgetragen. Anhand der Positionen nach der Elektrophorese konnten die Längen der untersuchten DNA-Fragmente bestimmt werden. Verwendet wurden zwei verschiedene Standards mit folgenden Fragmentgrößen (bp):

**λ-BstII- Marker:**

8454, 7242, 6369, 5686, 4822, 4324, 3675, 2323, 1929, 1371, 1264, 702, 224, 117

**100 bp DNA-Ladder (Fermentas):**

1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100

### **3.4.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Dieses Verfahren wurde verwendet, um PCR-Produkte nach der elektrophoretischen Auftrennung (s. vorheriges Kapitel 3.4.4) aus der Agarosegelmatrix zu isolieren. Hierfür wurde das DNA-Fragment im Agarosegel lokalisiert, das entsprechende Gelstück mit dem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt.

Die nachfolgende Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgte mithilfe des „Purification Kits“ der Firma Qiagen.

### 3.4.6 Restriktionsendonuklease-Verdau

Restriktionsenzyme sind bakterielle Enzyme, welche DNA an bestimmten Positionen schneiden können. Jede Restriktionsendonuklease erkennt dabei eine spezifische DNA-Basensequenz, die Erkennungsstelle.

Der Restriktionsverdau wurde in einem 20 µl Ansatz durchgeführt:

10 x Reaktionspuffer	2 µl
10 x BSA (je nach Enzym)	2 µl
Restriktionsendonuklease (20 Units)	x µl
PCR-Produkt	5 µl
bidest. Wasser	11-x µl
<b>Endvolumen</b>	<b>20 µl</b>

### 3.4.7 Analyse mit dem Array Tube- Chip der Firma Clondiag

#### 3.4.7.1 Aufbau des Array-Tube Chips

Der Array-Tube Chip ermöglicht mit Hilfe von 58 verschiedenen Markern eine schnelle, robuste und informative Genotypisierung von *P. aeruginosa* Isolaten aus verschiedensten Habitaten. Dieser Chip wurde in Zusammenarbeit mit der Firma „Clondiag Chip technologies“ hergestellt und in der Veröffentlichung von Wiehlmann et al., 2007 beschrieben.

Die Typisierung umfasst dabei nicht nur Gene des Kerngenoms, sondern auch Gene des flexibleren akzessorischen Genoms. Dabei wird das Kerngenom durch 13 „*Single-Nuclear-Polymorphisms*“ (SNPs, Einzelnukleotidaustausche innerhalb eines Strangs) aus sieben verschiedenen konservierten Genabschnitten (Morales et al., 2004), zwei multiallelspezifischen Genabschnitten, dem Flagellin *fliC* (Spangenberg et al., 1996), dem Pyoverdinin Rezeptor *fpvA* (Smith et al., 2005) sowie den beiden Toxinen *exoS* und *exoU* (Typ-III Sekretion) repräsentiert. Die ausgewählten SNPs finden sich verteilt über das ganze *P. aeruginosa* PAO1 Genom (Stover et al., 2000) und sind mit einer Frequenz von  $\geq 15\%$  informativ für die selteneren Allele (Morales et al., 2004). Die Differenzierung zwischen unverwandten Klonen beinhaltet eine falsch-positive Wahrscheinlichkeit von  $< 0,01\%$ .

Das akzessorische Genom wird durch 38 genetische Marker repräsentiert. Diese Sequenzen lassen sich auf 10 verschiedene kleinere Genomabschnitte (Wolfgang et al., 2003; Feltman et

al., 2001) und auf 6 verschiedene Geninseln (Tümmler et al., 2006; Larbig et al., 2001; Arora et al., 2004; He et al., 2004; Klockgether et al., 2004) zurückführen.

Die Oligonukleotide der 58 repräsentativen Marker sind wie in Abb. 3.4.1 erkennbar auf dem Chip lokalisiert.

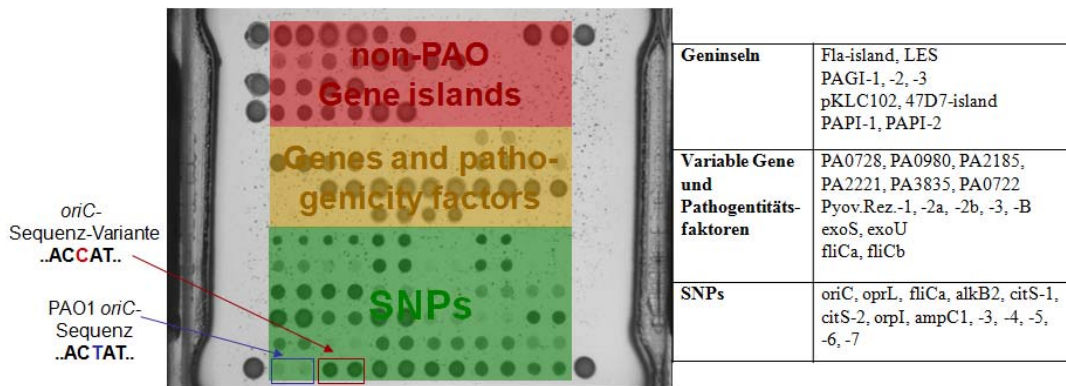


Abb. 3.4.1: Lokalisation der 58 Marker und der entsprechenden Gene auf dem AT-Chip

Isolate, die ein identisches SNP-Muster aufweisen, werden als identische Klone bezeichnet. Stimmt zusätzlich zu den Markern des Kerngenoms auch der akzessorische Teil mit den Virulenzfaktoren und den Geninseln überein, wird vom selben Stamm gesprochen.

Die einzelnen Arbeitsschritte der Typisierung mit Hilfe des Array Tubes werden in der Abb. 3.4.2 schematisch in einem Überblick gezeigt.

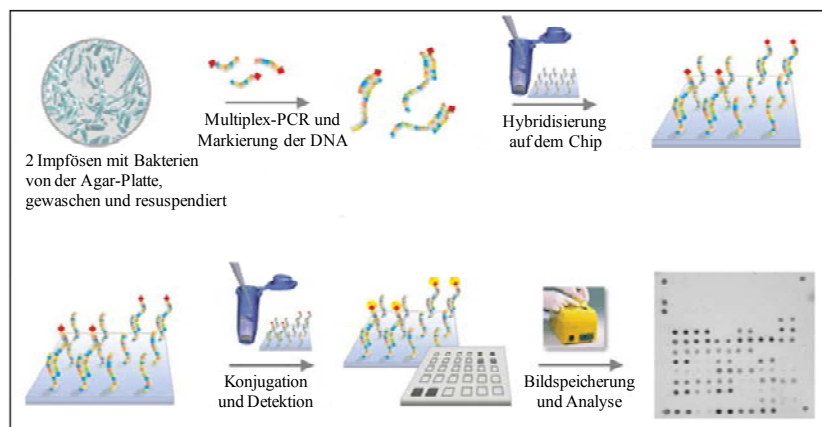


Abb. 3.4.2: Arbeitsschritte der Genotypisierung im Überblick (Wiehmann et al, 2007; modifiziert und übersetzt)

### 3.4.7.2 Aufreinigung der Bakterien aus der Kultur

Von einer LB-Platte wurden etwa zwei Impfösen voll mit Bakterien in 1,5 ml dest. Wasser resuspendiert und mit 3000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet dreimal mit 0,5 mM EDTA-Lösung gewaschen. Zwischen den einzelnen

Waschschritten wurde das Pellet jeweils für 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert und der Waschpuffer entfernt.

Nach dem letzten Waschgang wurde das Bakterienpellet in 50 µl dest. Wasser resuspendiert und in die Polymerasekettenreaktion (siehe Kapitel 3.4.3.4) eingesetzt.

### 3.4.7.3 Hybridisierung mit anschließender Konjugation und Detektion

Zu Beginn wurde der Chip jeweils einmal für 5 min bei 30°C und 550 rpm mit Blockingpuffer und dann mit Hybridisierungspuffer inkubiert. Um den Chip am Boden des Gefäßes nicht zu berühren, wurde der Überstand immer mit einer möglichst feinen Pasteurpipette abgenommen. Nach Überführung von 20 µl des Biotin-markierten PCR-Produkts (ohne Paraffin-Öl) erfolgte eine Vermischung mit 80 µl Hybridisierungspuffer. Diese Lösung wurde, zur Verbesserung der Signalstärke, für 5 min bei 96 °C denaturiert, für 2 min im Eisbad abgeschreckt, auf den Chip gegeben und für 60 min bei 60°C und 550 rpm inkubiert. Nach der Hybridisierung folgten mehrere Waschschritte, um ungebundenes PCR-Produkt zu entfernen. Hierzu wurde nacheinander mit jeweils 500 µl Puffer I und Puffer II gewaschen. Das Waschen mit 500 µl Puffer III erfolgte für 5 min bei Raumtemperatur, wobei zwischendurch das Reaktionsgefäß geschwenkt wurde. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde der Chip für 15 min bei 30°C und 550 rpm mit 100 µl Blockingreagenz inkubiert. Die nachfolgende Konjugation erfolgte mit 100 µl eines 1:100 verdünnten Streptavidin-Peroxidase-Konjugats, dabei bindet das Streptavidin an das Biotin. Dazu wurde der Chip 15 min bei 30°C und 550 rpm mit dieser Lösung inkubiert und anschließend der überschüssige Antikörper mit jeweils 500 µl Puffer I und Puffer II vom Chip gewaschen. Bis zur Detektion wurde der Chip bei 20°C und 550 rpm in Puffer III gelagert. Diese Lagerung ist bei Bedarf auch für mehrere Stunden möglich. Für die Detektion wurde dann der Waschpuffer III abgenommen und 100 µl einer 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin-Lösung (TMB), die vor Gebrauch kurz zentrifugiert wurde, auf den Chip pipettiert und so mit der Detektion gestartet. Eine ablaufende Formazan-Reaktion führte zu einer Schwärzung der Signale, die dadurch auf dem Bildschirm sichtbar und mittels eines AT-Readers und des Programms IconoClust<sup>®</sup>, Version 2.2., dokumentiert wurden. Die mit der Zeit aufkommenden Signale (siehe Abb. 3.4.3) konnten direkt auf dem Bildschirm verfolgt werden. Das Programm zeigte je nach Einstellung, in diesem Fall alle 60 s, ein aktuelles Bild des Chips auf dem Monitor und speicherte dieses parallel auf Festplatte. Die Detektion eines Chips dauert in etwa 10 min.

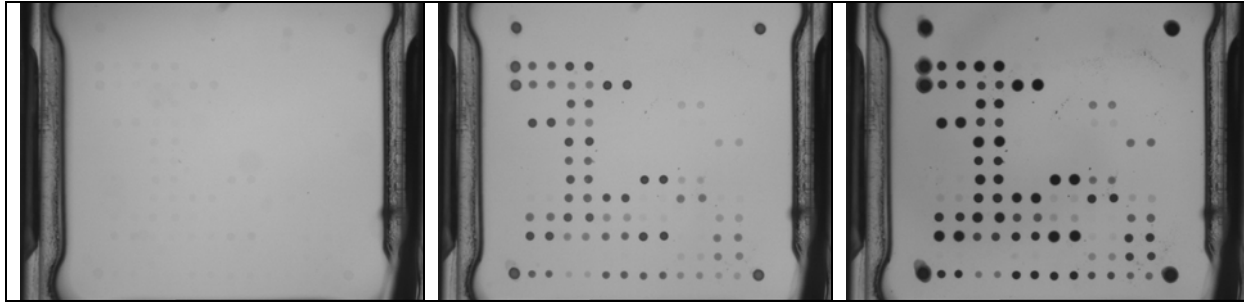


Abb. 3.4.3: a. Detektionsbild nach 0 min; b. Detektionsbild nach 5 min; c. Detektionsbild nach 10 min

3.4.7.4 Auswertung des AT-Chips

Zur Analyse wurde ein Tabellenblatt (siehe Abb. 3.6) entwickelt, auf dem alle auf den Chip gespotteten Oligonukleotide an den entsprechenden Positionen eingetragen waren. Auf diesem Blatt konnte verzeichnet werden, ob das entsprechende Gen in der untersuchten Probe an- oder abwesend war. Die Gensequenz eines SNPs und die dazugehörige Sequenzvariante werden in Abb. 3.4.4 mit „wt“ für den PAO-Wildtyp und „mut“ für den SNP im jeweiligen Gen bezeichnet.

C-45	C-46	C-47	PAGI-3-1	PAGI-3-8	PAGI-2-1
PAGI-2/3-1	PAGI-2/3-4	PAGI-2/3-5	PAGI-2/3-6		
pKL-1	pKL-3	TB-C47-1	TB-C47-2	PAPI-1-Pili-Ch.	PAPI-1-LuBiPr.
pKLC-unbek	pKLC-adhesin	pKLC-stoffw.			
Pyov.Rez.-1	Pyov.Rez.-2a	Pyov.Rez.-2b	Pyov.Rez.-3	Pyov.Rez.-B	LES
PA0636	PA0722			PAGI-1	PAPI-2-PA0980
PA0728	PA2185	fla-island-1	fla-2 orfA	47D7-1	PAPI-2-AcTr.
PA2221	PA3835	fla-2 orfI	fla-2 orfJ	47D7-2	PAPI-2-XF1753
wt ampC-7 mut		fliCa	fliCb	exoS	exoU/PAPI-2
wt ampC-4 mut		wt ampC-5 mut		wt ampC-6 mut	
wt oprI mut		wt ampC-1 mut		wt ampC-3 mut	
wt citS-1 mut		wt citS-2 mut		wt oprI mut	
wt fliCa mut		wt fliCa mut		wt alkB2 mut	
wt oriC mut		wt oprL a mut		wt oprL b mut	

Abb. 3.4.4 Tabellenblatt zur Auswertung der Chipanalysen

Die Bewertung der Signale wird in Abb. 3.4.5 dargestellt.



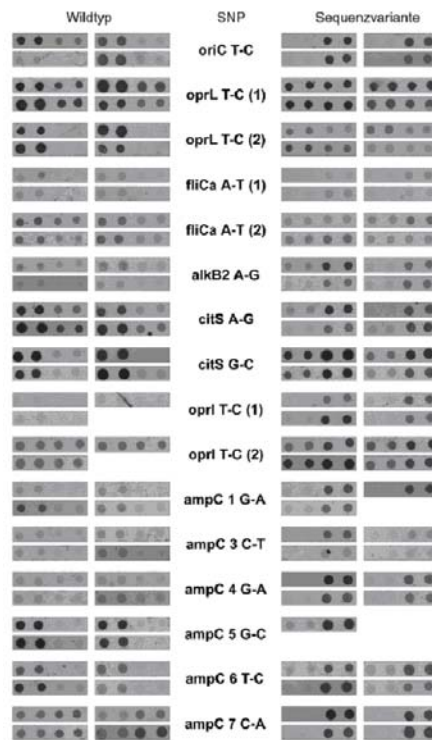


Abb. 3.4.5: Bewertung des SNP-Musters (Wiehlmann et al., 2007)

Die Ergebnisse der Chipanalysen wurden zur besseren und schnelleren Vergleichbarkeit untereinander in eine Exceltabelle eingetragen. War z.B. bei den SNPs die Sequenzvariante oder bei den variablen Genen und Geninseln die Gensequenz vorhanden, wurde in der Tabelle für dieses Gen eine 1 eingetragen, ansonsten eine 0. Dort wo keine sicheren Aussagen zu treffen waren, wurde das vermutete Ergebnis mit grau unterlegt.

Einige der Analysen wurden mit Chips der vorherigen Generation analysiert. Hier waren einige Gene, die auf der neueren Chipgeneration aufgebracht wurden, noch nicht enthalten. Diese wurden in der Tabelle gesondert mit einem x, welches dunkelgrau unterlegt ist, gekennzeichnet.

Um einen noch besseren und schnelleren Vergleich zwischen den verschiedenen Isolaten ziehen zu können, wurden die 16 SNPs in einem vierzähligen Hexadezimalcode dargestellt. Hierzu wurden, wie in Abbildung 3.4.6 dargestellt, die 16 Marker in vier verschiedene Vierergruppen unterteilt und alle 16 verschiedenen Möglichkeiten in jeder Gruppe durch 16 Zahlen/Buchstaben charakterisiert (0-9 und A-F). Der Informationsgehalt aus 16 Markern ließ sich dadurch auf einen vierstelligen Kode reduzieren. Die verschiedenen Isolate konnten somit einfacher und schneller untereinander verglichen werden. Handelte es sich bei zwei Isolaten um den gleichen Klon, wurden diese z.B. mit dem gleichen Hexadezimalcode gekennzeichnet (Wiehlmann et al., 2007).

0 <sub>Hex</sub>	=	0	0	0	0
1 <sub>Hex</sub>	=	0	0	0	1
2 <sub>Hex</sub>	=	0	0	1	0
3 <sub>Hex</sub>	=	0	0	1	1
4 <sub>Hex</sub>	=	0	1	0	0
5 <sub>Hex</sub>	=	0	1	0	1
6 <sub>Hex</sub>	=	0	1	1	0
7 <sub>Hex</sub>	=	0	1	1	1
8 <sub>Hex</sub>	=	1	0	0	0
9 <sub>Hex</sub>	=	1	0	0	1
A <sub>Hex</sub>	=	1	0	1	0
B <sub>Hex</sub>	=	1	0	1	1
C <sub>Hex</sub>	=	1	1	0	0
D <sub>Hex</sub>	=	1	1	0	1
E <sub>Hex</sub>	=	1	1	1	0
F <sub>Hex</sub>	=	1	1	1	1

Abb. 3.4.6: Hexadezimalcode

### 3.4.8 Überprüfung der Isolate auf vorhandene Hypermutatoren

Zur Überprüfung wurde eine Methode herangezogen, die auf die Veröffentlichung von Oliver et al. (2000) zurückgeht. Hier wurde zur Identifizierung von Hypermutatoren Rifampicin eingesetzt. Rifampicin ist ein Antibiotikum, welches die  $\beta$ -Untereinheit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase (Rpl-Protein) hemmt.

Rpl ist ein Teil der Transkriptionsmaschinerie und somit hoch konserviert. Mutationen in dieser Untereinheit können dazu führen, dass die Oberfläche des Proteins so stark modifiziert wird, dass Rifampicin nicht mehr binden und die Transkription somit nicht mehr blockieren kann. Expressieren Bakterien dieses modifizierte Rpl-Protein, kann das Antibiotikum Rifampicin die Polymerase nicht mehr inhibieren, die Zellen sind resistent und wachsen weiter.

Treten Mutationen im Rpl auf, gibt es mit einer hohen Wahrscheinlichkeit auch weitere Mutationen in anderen Loci, wie z.B. im *mutS* Gene. Charakteristisch für hypermutable Stämme sind Veränderungen im DNA-Reparatursystem (Miller et al., 1996; Oliver et al., 2000).

Um die Identifizierung von hypermutablen Stämmen unter Verwendung von Rifampicin zu bestätigen, wurde das Antibiotikum Streptomycin verwendet (Struktur siehe Abb. 3.4.7). Es inhibiert die 30S-Untereinheit der prokaryontischen 70S-Ribosomen, so dass die Aminoacyl-tRNA nicht an die Akzeptorposition binden kann und die Translation blockiert wird. Lassen

sich neben dem Wachstum auf Rifampicinplatten auch wachsende Stämme auf Streptomycin nachweisen, handelt es sich bei dem untersuchten Stamm eindeutig um einen Hypermutator. Da Stämme mit einer stark erhöhten Mutationsrate einen Fitnessnachteil in Wachstumsexperimenten zeigten, wurden für alle Wachstumsexperimente und spätere Charakterisierungen solche Stämme ausgeschlossen.

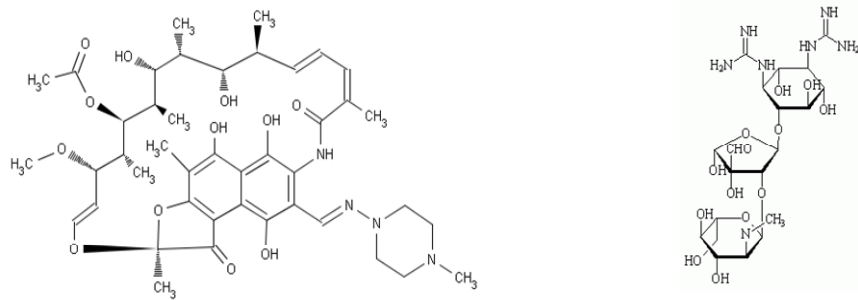


Abb. 3.4.7: a. Strukturformel des Rifampicins; b. Strukturformel von Streptomycin

Um *P. aeruginosa* Isolate auf Hypermutation zu analysieren, wurden die zu testenden Bakterienstämme in LB-Medium inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde dann die optische Dichte bestimmt, anschließend die Bakterien für 8 min bei 6000 x g pelletiert und mit PBS eine OD von 1 eingestellt. Es wurde eine Verdünnungsreihe der Bakteriensuspension hergestellt, bei der PBS zur Verdünnung verwendet wurde. Jeweils 100 µl einer Verdünnungsstufe wurden in einem Dreifachansatz auf Petrischalen mit verschiedenen Nährmedien gegeben. Zum einen wurde reiner LB-Agar verwendet, zum anderen LB-Agar, dem entweder Rifampicin (Endkonz. 300 µg/ml) oder Streptomycin (Endkonz. 500 µg/ml) vor dem Gießen zugesetzt worden war. Ein Aliquot der Verdünnungsstufen 10<sup>-7</sup>-10<sup>-9</sup> wurde auf die LB-Platten pipettiert und plattiert, für die LB-Platten mit Antibiotikazusatz wurden die Verdünnungsstufen 10<sup>0</sup>-10<sup>-2</sup> verwendet.

Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Kolonien aller Platten ausgezählt und schließlich die Mutationsfrequenz mit folgender Formel errechnet:

$$\text{Mutationsfrequenz (Mf)} = \text{Verdünnungsfaktor} * \left( \frac{\text{CFU (Rifampicin - Platten)}}{\text{CFU (LB - Platten)}} \right)$$

War die Mutationsfrequenz >10<sup>-6</sup> handelte es sich nach Definition von Oliver et al. um einen Hypermutator, lag die Frequenz bei <10<sup>-8</sup>, war der untersuchte Stamm definitiv ein Nichthypermutator.

### 3.4.9 Phänotypische Assays

#### 3.4.9.1 Kolonie-Morphologie

Die Kolonieformen und das Aussehen von Kolonien sind bei den einzelnen Mikroorganismenarten unterschiedlich und können daher zu einer groben Differenzierung herangezogen werden. Ein Teil der Charakterisierung der verwendeten sequentiellen Isolate erfolgte durch die Beurteilung der Koloniefarbe, der Größe, anhand der Struktur und der Koloniegestalt.

Für die Untersuchung der Kolonie-Morphologie wurde LB-Agar, dem 40 µg/ml Kongorot zugesetzt wurde, verwendet. Dieser Farbstoff bindet unspezifisch an verschiedene Exopolysaccharide sowie an einige Proteine auf der Zelloberfläche von Bakterien (Römling, 1998). Jeweils 2 µl einer Übernachtskultur wurden auf die rotgefärbte Agarplatte gegeben und die Morphologie nach einer Inkubationszeit von 24-36 h bei 37°C bewertet.

#### 3.4.9.2 Bewegung

Die Bewegung eines Bakteriums in wässriger Umwelt wird durch verschiedene Formen der Translokation gekennzeichnet (Mattick et al., 2002). Innerhalb der Spezies *P. aeruginosa* unterscheidet man drei Arten: das Schwimmen, das Schwärmen und das „*Twitching*“. Das Schwimmen ist eine Bewegungsart, die im Agar stattfindet, wenn dieser eine entsprechende Dicke aufweist. Das mikromorphologische Muster ist dabei ungeordnet. Ist das Nährmedium relativ dünn, werden die Bakterien hyperflagelliert und es folgt eine geordnete Fortbewegung, das Schwärmen. Beide Bewegungsformen werden durch Flagellen ermöglicht (Mattick et al., 2002; Allison & Hughes, 1991; Harshey, 1994).

Die dritte Form der Fortbewegung ist das „*Twitchen*“. Es findet ebenfalls auf festen Oberflächen statt. Das mikromorphologische Muster der Bewegung ist dabei aber weniger geordnet, als das beim Schwärmen (Henrichsen et al., 1983). Im Gegensatz zu den beiden vorherigen Bewegungsarten wird das Twitchen nicht durch Flagellen, sondern durch Typ IV-Pili ermöglicht (Mattick et al., 2002).

#### Schwimmen:

Die Fähigkeit eines Stammes zu schwimmen wurde überprüft, indem 2µl einer Übernachtskultur in einen 0,3%-igen Agar inokuliert wurden (wichtig: Inokulation in den Agar hinein). Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde am nächsten Morgen das Wachstum im

Agar beurteilt (wichtig: nicht das Wachstum an der Oberfläche des Agars ist entscheidend) und zur Auswertung ausgemessen (Whitchurch et al., 2005).

#### Schwärmen:

Um Bakterien auf die Bewegungsform des Schwärmens zu untersuchen, wurde 2 µl einer bakteriellen Übernachtskultur auf eine 0,5%- LB Agarplatte getropft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag war das Schwärmen auf der Oberfläche des Nährbodens zu erkennen und für die Auswertung auszumessen (Whitchurch et al., 2005).

#### Twitching:

Zur Überprüfung des Twitching-Verhaltens eines Stammes wurden 2 µl der zu überprüfenden Übernachtskultur durch den LB-Agar (1 %) hindurch auf die Plastikoberfläche der Petrischale getropft. Zur Inkubation wurden die Platten über Nacht in einen 37°C-Schrank gestellt. Am darauffolgenden Tag wurde der Agar vorsichtig entfernt und die Platte mit einer Coomassie-Lösung (0,05 % Coomassie Brilliant Blue R250, 50 % Methanol, 10 % Essigsäure) gefärbt. Die Twitching-Zone konnte danach ausgemessen werden (Alm et al., 1995).

#### 3.4.9.3 Autolyse und Hämolyse

Einige Mikroorganismen besitzen die phänotypische Eigenschaft, Erythrozyten durch die Zerstörung der Erythrozytenzellwand aufzulösen. Dieser Vorgang wird Hämolyse genannt und kann mit Hilfe von Blutagarplatten nachgewiesen werden. Man unterscheidet drei verschiedene Arten von Hämolyse:  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ -Hämolyse. *P. aeruginosa* zeigt in der Regel die  $\beta$ -Hämolyse. Die Bakterien produzieren Streptolysin O, welches das Hämoglobin aus den Blutagarplatten vollständig zu Hämin abbaut und als klare Hämolysezone um die Kolonie erkennbar wird.

Für diesen Assay wurden 2 µl einer Übernachtskultur auf eine Blutagarplatte getropft und für 48 h bei 37°C inkubiert. Bei vorhandener Hämolyse war ein klarer, orangener Ring um die Kolonie zu erkennen.

Auf der gleichen Agarplatte konnte auch die phänotypische Eigenschaft der Autolyse beurteilt werden. Als Autolyse wird die "Selbstauflösung" durch Enzyme bezeichnet. Diese konnte in der Mitte der Kolonie in Form „kleiner Löcher“ identifiziert werden.

#### 3.4.9.4 Protease-Sekretion

Viele Mikroorganismen sezernieren während ihres Wachstums verschiedene Proteasen. Bei *P. aeruginosa* ist diese Sekretion Quorum Sensing abhängig und über die Aktivatoren dieses Systems, wie z.B. über *lasR*, gesteuert.

Um diese Protease-Sekretion zu quantifizieren, wurden 2 µl einer Übernachtskultur auf Platten mit M9-Minimal Medium inokuliert, die als alleinige Kohlenstoffquelle 0,8% Casein enthielten. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C war die Proteasesekretion durch den Abbau von Casein als weißer Ring um die Kolonie erkennbar.

#### 3.4.9.5 Siderophore-Sekretion

Siderophore sind eisenbindende Proteine mit komplexbildenden Eigenschaften. Sie werden von Bakterien gebildet und zur Eisenspeicherung verwendet. Die Funktion der Speicherung besteht darin, hochaffin Fe<sup>2+</sup>- und Fe<sup>3+</sup>-Ionen zu komplexieren, welche anschließend in die Zelle aufgenommen werden. *P. aeruginosa* kann zwei Siderophore bilden: Pyochelin und Pyoverdine. Beide besitzen eine Eigenfluoreszenz.

Um die Siderophorenssekretion zu messen, wurde der Chromazurol S-Agar Assay durchgeführt (Schwyn & Neiland, 1987). Dieser Agar enthält Fe<sup>3+</sup> als Komplex mit dem Farbstoff Chromazurol S (CAS) und dem Detergenz HDTMA. Werden Siderophore während des Wachstums der Bakterien sezerniert, werden die Eisenionen aus dem Komplex entfernt, die Farbe ändert sich von blaugrün zu orange und es wird ein orangener Ring um die Kolonie erkennbar. Dabei ist die Größe des Rings proportional zur Produktionsrate. Allerdings kann nicht zwischen den beiden verschiedenen Siderophoren unterschieden werden.

Herstellung des CAS-Agars:

100 ml CAS Stammlösung wurden durch die Zusammengabe von 60,5 mg CAS in 50 ml Wasser, 10 ml Eisen(III)-chlorid Lösung und 72,9 mg HDTMA in 40 ml Wasser hergestellt und autoklaviert (dunkelblaue Lösung). Weiter wurden 10 x LB und 10 x MM9-Medium hergestellt und ebenfalls autoklaviert. Für den PIPES-Agar wurden 50 ml 10 x MM9 Medium in 250 ml dest. Wasser verdünnt, 15,55 g PIPES dazugewogen und mit 50% NaOH auf den pH-Wert 6,8 justiert. Vor dem Autoklavieren wurde die Lösung auf 425 ml mit dest. Wasser aufgefüllt und 1% Agar hinzugegeben. Nach der Sterilisation wurde der PIPES Agar auf 50°C abgekühlt und danach 15 ml 10 x LB, 1 ml Glycerin, 1 ml 1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 mL 0,1 M CaCl<sub>2</sub> sowie 50 mL CAS Stammlösung hinzugegeben und in Petrischalen überführt.

Zur Durchführung des Assays wurden 2 µl Übernachtskultur auf den Agar inokuliert und für 24 h bei 37°C inkubiert. Die Siderophorenproduktion wurde durch einen orangenen Ring um die Kolonie erkennbar.

#### 3.4.9.6 Pyocyanin

Ein weiteres Kennzeichen für *P. aeruginosa* ist die Synthese von Farbstoffen. Zu ihnen gehört neben den Farbstoffen Pyoverdin, Pyomelanin und Pyorubin auch das Pyocyanin.

Einige dieser Farbstoffe, vor allem Pyocyanin, weisen eine antimikrobielle Aktivität auf. Stämme, die eine solche Aktivität aufweisen, können nicht von anderen Bakterien, wie z.B. *Staphylokokken*, lysiert werden (Li et al., 1995). Das Quorum Sensing System (LasRI/RhlRI/PQS) reguliert dabei die Biosynthese von Pyocyanin (Lau et al., 2004).

Mit Hilfe des King A Mediums wurde die Pyocyanin Produktion verschiedener *P. aeruginosa* Stämme untersucht (King et al., 1954). 40 ml des King A Mediums wurden mit einer bakteriellen Übernachtskultur zu einer OD<sub>578nm</sub> von 0,2 inokuliert und in den darauffolgenden Stunden bei 37°C mit 230 rpm inkubiert. Über einen Zeitraum von 12 Stunden wurden alle 2 Stunden jeweils 2 ml Probe entnommen. Der letzte Zeitpunkt wurde am nächsten Morgen als 24h Wert abgenommen. Von den entnommenen 2 ml Proben wurde 1 ml zur Bestimmung der OD<sub>578nm</sub> verwendet, der andere ml wurde für die eigentliche Bestimmung des Pyocyanins benötigt. Hierzu wurden in einem ersten Schritt die Bakterien bei einer Zentrifugation für 8 min bei 6000 x g pelletiert und anschließend der Überstand im Photometer bei einer Wellenlänge von 690 nm vermessen. Die Synthese von Pyocyanin wurde durch ansteigende Grünfärbung der Kultur und somit durch das Ansteigen der OD (bei 690 nm) erkennbar.

#### 3.4.9.7 Bestimmung des Hämolytins

Wie schon in Kapitel 3.4.9.3 beschrieben, besitzt *P. aeruginosa* die Fähigkeit, Hämolyse durchzuführen. In der Literatur wurde beschrieben, dass das Hämolytin eine entscheidende Rolle im Verlauf von Augeninfektionen mit *Pseudomonas* spielt (Johnson & Allen, 1978). Dabei besteht das Hämolytin aus zwei verschiedenen hämolytisch wirksamen Stoffen, die im Zusammenspiel bei Entzündungen der Lunge zu irreparablen Gewebeerstörungen führen (Liu et al., 1957). Es werden das hitzestabile Glycolipid und die hitze-instabile Phospholipase unterschieden.

Um das Hämolytin zu bestimmen, wurde die hämolytische Aktivität der verschiedenen *P. aeruginosa* Isolate nach einer abgewandelten Methode von Johnson et al. (1980) und Fujita et al. (1988) bestimmt. Hierzu wurde ein Aliquot einer Übernachtskultur in neues Medium

(LB + 1 % Glucose) inokuliert. Nach 48 h der Inkubation bei 37°C und konstantem Schwenken bei 180 rpm wurden die Bakterien für 20 min bei 3300 x g pelletiert. Der Überstand wurde mit Hilfe von konz. HCl auf den pH 2 eingestellt und letztendlich bei 30.000 x g für 30 min zentrifugiert. Das Präzipitat aus dieser Zentrifugation wurde in Ethanol gelöst und zur Entfernung unlöslicher Substanzen erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben mit PBS verdünnt (Endkonz. des Ethanols < 1 %) und jede Probe in zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt. Der eine Teil der Probe wurde zur Bestimmung des hitzestabilen Glycolipides für 10 min bei 92°C hitzebehandelt, während der andere Teil der Probe zur Bestimmung beider Glycolipide (hitzestabil und -instabil) unvorbehandelt in den Assay eingesetzt wurde.

Für die nachfolgende Messung wurden 100 µl der Lösung (oder verdünnte Lösung, je nachdem wie stark die hämolytische Aktivität ausfiel) zu 100 µl 1%-iger Erythrozyten-Suspension gegeben und diese Lösung für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach der Sedimentation der Erythrozyten durch eine Zentrifugation bei 1000 x g für 3 min wurde die OD des Überstandes bei der Wellenlänge 540 nm gemessen.

#### 3.3.9.8 Elastaseaktivität

Die Elastase ist eine Metalloprotease, welche zum einen Elastin und Kollagen und zum anderen humanes Immunglobulin G und andere komplexe Komponenten abbaut. In *P. aeruginosa* gehört das Enzym zu den virulenzassoziierten Exoproteinen (Nicas et al., 1985), deren Produktion über den TypII-Sekretionsweg kontrolliert wird (Wretling & Pavlovkis, 1984). Es wurde nachgewiesen, dass die Elastase bei respiratorischen Infektionen eine entscheidende Rolle spielt (Baker et al., 1982).

Zur Bestimmung der Elastaseaktivität wurde das Protokoll von Schad et al. (1987) verwendet. Es wurden 100 µl Überstand aus einer bakteriellen Übernachtskultur zu 7 ml einer Elastin-Lösung (30 mM TRIS pH 7,2 und 70 mg Elastin-Kongorot) gegeben und miteinander vermischt. Die Inkubation erfolgte bei 250 rpm und 37°C. Die Elastaseaktivität wurde über 2-2,5 h vermessen. Hierzu wurde je Zeitwert 700 µl Probe entnommen, 1-2 min bei 14000 rpm zentrifugiert und das freie Kongorot aus dem Überstand bei einer Wellenlänge von 495 nm photometrisch vermessen.



### 3.4.10 Adhärenz-Assay

Schon beim Erstkontakt eines Bakteriums mit seinem Wirt können die Epithelzellen so weit stimuliert werden, dass Entzündungsreaktionen eingeleitet werden. Bei der Adhäsion von Bakterien an die Wirtszellen handelt es sich um einen solchen Erstkontakt.

Bakterien binden über sogenannte Adhäsine an verschiedene Strukturen bzw. Zellen des Wirts, dadurch wird der Abtransport des Bakteriums erschwert.

Um die unterschiedliche Fähigkeit des Anheftens an Wirtszellen zwischen einem frühen und einem späten *P. aeruginosa* Isolat eines CF-Patienten zu beurteilen, wurde ein Adhärenz-Assay durchgeführt. Hierfür wurden in einem ersten Schritt Deckgläschen in jedes Well einer 24-Well Platte gegeben und anschließend jedes Well „gecoatet“, d.h. die Oberflächen wurden mit L-Lysin benetzt (erleichtert das Anheften von Zellen). Das L-Lysin wurde nach einer Inkubationszeit von 10 min wieder entfernt und die Wells getrocknet. Danach wurden A549 Zellen mit einer Dichte von  $4 \cdot 10^4$  Zellen in jedes Well gegeben und über Nacht bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Weiter wurde der zu überprüfende *P. aeruginosa* Stamm in LB-Medium inokuliert und ebenfalls bei 37°C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde in einem ersten Schritt die OD der bakteriellen Übernachtskultur bestimmt und dann die Bakterien mit einer MOI von 100 auf die zuvor mit PBS gewaschenen A549 Zellen gegeben. Die nachfolgende Inkubation dauerte 2 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>. Zwischendurch wurde die Platte vorsichtig geschwenkt. Nach der Inkubation wurden zur Entfernung der nicht adhärenen Bakterien die Wells dreimal mit PBS gewaschen. Um eine Verfälschung durch die ans das Plastik adhärierenden Bakterien auszuschließen, wurden die Deckgläschen in eine neue 24-Well Platte überführt. Danach wurden die Bakterien zusammen mit den A549 Zellen durch eine Behandlung mit Saponin (Konz. 50 mg/ml für max. 8 min) vom Deckgläschen abgelöst und in einer Verdünnungsreihe auf LB-Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag ausgezählt.

### 3.4.11 *P. aeruginosa*-Tiling-Array 1

Bei dem PATA1-Array handelt es sich um einen Mikro-Array basierten DNA-Chip, mit dem zum einen adaptive Mutationen und zum anderen Genomorganisationen sowie globale Regulons identifiziert werden können. Angewendet wurde diese ChIP-on-Chip Technik bereits, um Mutationen in *Helicobacter pylori* zu detektieren (Albert et al., 2005). Jetzt wurde

auch ein Chip dieser Art für das *P. aeruginosa* Genom entwickelt (Dötsch et al., 2009). Der Chip bietet eine einfache und ökonomische Alternative zur Genomsequenzierung, die üblicherweise bis jetzt zur Analyse von SNPs herangezogen wurde. 50 % aller theoretisch durch den Chip entdeckten SNPs wurden auch in einer vergleichbaren Hybridisierung des PAO1- und PA14-Genoms detektiert (Spezifität > 0,996). Variationen, die länger als SNPs sind, sollen sogar mit einer noch höheren Sensitivität (ca. 100 %) gefunden werden.

Die Sonden sind im Gegensatz zu anderen bis jetzt bekannten Arrays (wie z.B. Affymetrix PAOI GeneChip® oder andere Mikroarrays) gleichmäßig über das gesamte *P. aeruginosa* Genom verteilt. Der Tiling-Array (PATA1) enthält ca. 250.000 25-mer Oligonukleotide und deckt somit etwa 85 % des PAO1 Genoms ab. Wie in Abb. 3.4.8 ersichtlich, umspannen die Sonden etwa 24-34 bp DNA-Sequenz und weisen dabei 1-9 bp Lücken zwischen den einzelnen DNA-Sonden auf. Somit können neben Insertionen und Deletionen auch Punktmutationen nachgewiesen werden. Die Visualisation der Daten wurde, wie in Kapitel 3.1.7.4 beschrieben, mit dem Integrated Genome Browser (IGB) durchgeführt.

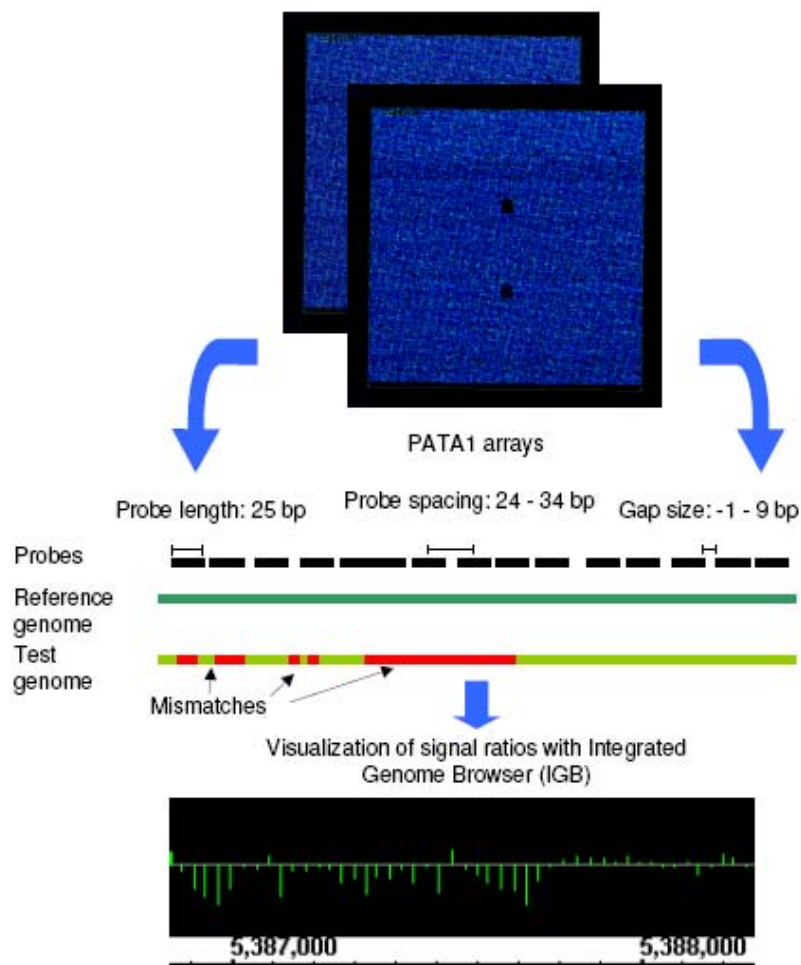


Abb. 3.4.8: Aufbau des “*P. aeruginosa* Tiling Array 1” (Dötsch et al., 2009)

### 3.4.11.1 DNA-Präparation

Da für diese Analyse DNA von hoher Qualität verwendet werden musste, wurde für die Präparation der genomischen DNA das „DNeasy Blood and Tissue Kit“ der Firma Qiagen verwendet.

Die DNA-Konzentration wurde mit dem NanoDrop-Spektrophotometer (am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig) bestimmt.

### 3.4.11.2 Fragmentierung

Für die Hybridisierung auf den Affymetrix-Chip ist es erforderlich, die DNA in Fragmente einer ungefähren Größe von 50-250 bp zu spalten. Dies erfolgte durch eine Fragmentierung der genomischen DNA durch DNase I.

Hierzu wurde folgender Ansatz pipettiert:

DNA	5 µg
DNase [0,35 Units]	3,6 µl
10x One Phor-All- Buffer	5 µl
bideist. Wasser	x µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50 µl</b>

Die DNase-Menge des Fragmentierungsansatzes richtete sich nach der Reinheit der jeweiligen genomischen DNA, so dass die benötigte Enzymmenge sowie auch die Inkubationszeit in einigen Vorversuchen für jede DNA ausgetestet wurden.

Nach den Vorversuchen wurde für die Fragmentierung bei einer DNA Menge von 5 µg 3,6 µl DNase (0,35 Units) eingesetzt und für 9 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 15 min bei 98°C hitzeinaktiviert.

Die Fragmentierung der verschiedenen genomischen DNA-Proben wurde mittels einer Agarosegelelektrophorese überprüft.

### 3.4.11.3 Markierung

Nach der Fragmentierung wurden die Proben markiert. Bei dieser Methode handelte es sich um eine Oligonucleotid-3'-Endmarkierung.

Hierbei wurde jedes DNA-Fragment enzymatisch durch eine matrizenunabhängige Anlagerung von einem Biotin-ddUTP markiert. Da die 3'-Position des ddUTP reduziert vorliegt, kann das Fragment nach Anlagerung eines solchen Nukleotids nicht mehr weiter verlängert werden (→Oligonukleotid-3'-Endmarkierung).

Für die Markierung wurden folgende Reagenzien zusammengegeben:

5 x Reaktionspuffer	12 $\mu$ l
10 x Cobaltchlorid-Lösung	6 $\mu$ l
Biotin-ddUTP	1 $\mu$ l
Terminale DeoxyNukleotide Transferase	1 $\mu$ l
Fragmentationsansatz	39 $\mu$ l
bidest. Wasser	1 $\mu$ l
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>60 <math>\mu</math>l</b>

Dieser Ansatz wurde für 60 min bei 37°C inkubiert und anschließend durch die Zugabe von 2  $\mu$ l 0,5 M EDTA abgestoppt.

Der Erfolg der Markierung wurde mit Hilfe eines Neutravidin-Shifts beurteilt. Hierfür wurden 5  $\mu$ l der markierten DNA-Fragmente mit 5  $\mu$ l Neutravidin-Lösung (400  $\mu$ g/100  $\mu$ l 50 mM Tris, pH 7) für 5 min bei RT inkubiert und anschließend die Markierung auf einem 2 % Agarosegel überprüft.

#### 3.4.11.4 Hybridisierung und Detektion

Die Hybridisierung der Proben sowie die nachfolgende Detektion wurden am Helmholtz-Institut für Infektionsforschung in Braunschweig durchgeführt.

Für die Hybridisierung wurden jeweils 4-5  $\mu$ g der markierten DNA-Proben für 16 h bei 50°C auf PATA1-Arrays (gleiches Lot) inkubiert und danach überschüssige Sonde vom Chip gewaschen. Die nachfolgende Konjugation bestand aus drei Schritten. In einem ersten Schritt wurde Streptavidin an das Biotin gebunden, danach wurde Biotin Anti-Streptavidin an das Streptavidin und in einem letzten Schritt daran Streptavidin-Phycoerythrin gebunden. Die Detektion erfolgte an einer Affymetrix GeneChip Station (nach den Affymetrix Protokollen für Chip Detektion, Santa Clara, CA) im Helmholtz-Institut, Braunschweig.

#### **3.4.12 Southern-Blot**

Die Methode des Southern-Blots ermöglicht in kurzer Zeit den Nachweis einer beliebigen Gensequenz innerhalb eines komplexen DNA-Gemisches (Southern et al., 1975). Es ist dabei nicht nötig, sämtliche Sequenzen des Gemisches zu entschlüsseln.

### 3.4.12.1 Herstellung einer DNA-Sonde

Die zu detektierende Gensequenz wurde in einer PCR generiert und vervielfältigt, mit einer Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 3.4.4) überprüft und aus der Agarose isoliert (siehe Kapitel 3.4.5). 10 µl des Eluats wurden mit 5 µl bidest. Wasser für 4 min bei 94°C erhitzt und umgehend auf Eis abgeschreckt. Die Markierung wurde mit 2 µl Hexanukleotide, 2 µl DIG-DNA-Labeling Mix und 1 µl der Klenow-Polymerase bei 37°C über Nacht durchgeführt. Zu diesem Reaktionsansatz wurden nach der Inkubation 260 µl 1 x TE-Puffer und 8 µl Farbstoff (0,8 % Dextranblau und 0,5 % Phenolrot, gelöst in TE-Puffer) gegeben.

Vor Gebrauch wurde die Sonde mit einer Sephadex G50 Säulen-Gelfiltration aufgereinigt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Hierzu wurde eine leere Insulinspritze mit einer etwa 0,5 cm breiten Glaswollschicht befüllt, luftblasenfrei mit Sephadex G-50 Säulenmaterial aufgefüllt und in ein 15 ml Falkongefäß gestellt. Die Säule wurde mit 2 ml TE-Puffer gespült und der Überstand für 45 s bei 1000 x g zentrifugiert. Unter die Öffnung der Spritze wurde dann zum Auffangen der Gensonde ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt. Die Gensonde wurde auf die Säule pipettiert und für 30 s bei 1000 x g zentrifugiert. Dabei blieben alle nicht verbrauchten Hexanukleotide und dNTPs zusammen mit dem Phenolrot auf der Säule zurück.

### 3.4.12.2 Restriktionsverdau der genomischen DNA

Für den Restriktionsverdau wurde ein Enzym ausgewählt, welches das *P. aeruginosa* Genom zwar relativ häufig schneidet, allerdings keine Erkennungssequenz in dem zu detektierenden Genabschnitt aufweist.

In diesem Falle eignete sich die Restriktionsendonuklease *NcoI*.

Der Ansatz wurde wie folgt pipettiert:

10 x Reaktionspuffer	2 µl
Restriktionsendonuklease <i>NcoI</i>	2 µl
genomische DNA	2 µg
bidest. Wasser	x µl
<hr/>	
Endvolumen	<b>20 µl</b>

Der Restriktionsverdau wurde über Nacht bei 37°C inkubiert und mit einer Agarosegelelektrophorese kontrolliert. Hierzu wurden der ganze Verdau auf ein 1%-iges Agarosegel (20 x 20 cm) aufgetragen und die verdauten Proben 24 h bei 4°C und 1,5 V/cm aufgetrennt. Das Gel wurde nach Beendigung der Elektrophorese im Ethidiumbromid gefärbt, entfärbt und zur Dokumentation ein digitales Photo gemacht. Das Gel wurde mithilfe der

Southern-Blot Methode auf eine Nitrocellulosemembran ( $N^+$ -Hybond Membran) transferiert (siehe nächstes Kapitel).

#### 3.4.12.3 DNA-Fixierung auf Membranen (Southern-Blot)

Für die DNA-Fixierung auf die Nitrocellulosemembran wurde ein Kapillarblot verwendet.

Das Gel mit der verdauten genomischen DNA wurde mit der Oberseite nach unten auf Whatman-Papier gelegt, welches so auf dem Blottisch platziert wurde, dass beide Enden in 0,4 M NaOH reichten. Auf das Gel wurde eine  $N^+$ -Hybond Membran platziert, die wiederum mit zwei Lagen Whatman-Papier bedeckt wurde. Zur Vermeidung von Luftblasen zwischen den verschiedenen Schichten, wurden die einzelnen Lagen immer reichlich mit Puffer benetzt. Um den Kapillareffekt auch über einen längeren Zeitraum zu gewährleisten, wurden auf das Whatman-Papier mehrere Lagen passend auf die Größe des Gels zurechtgerolltes Toilettenpapier gelegt. Die DNA wurde insgesamt mind. 16 h auf die Membran transferiert.

Nach dem Blotten wurde die Membran 2 x für je 5 min in Waschpuffer (für Southern-Blot) neutralisiert und unter dem Abzug luftgetrocknet (dabei Vorsicht vor Verschmutzungen). Um die DNA fest auf die Membran zu fixieren, wurde diese nach dem Trocknen mit UV-Licht für 1 min belichtet. Die Membran wurde in Folie eingeschweißt und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 3.4.12.4 Hybridisierung und Detektion im Rahmen des Southern-Blots

Durch die Hybridisierungsreaktion wurden spezifische Fragmente der genomischen DNA mit den DIG-DNA-Fragmenten markiert. Dafür wurde die Membran in eine Hybridisierungsröhre überführt und mit Prähybridisierungspuffer für mind. 4 h bei  $68^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Der Prähybridisierungspuffer wurde abgegossen, durch die Sonde ersetzt (10 ml Prähybridisierungspuffer + 280  $\mu\text{l}$  hergestelltes Sonden-Aliquot) und über Nacht inkubiert. Die Sonde wurde aufgefangen (bei  $-20^{\circ}\text{C}$  haltbar) und mit Hilfe von Waschpuffer für 2 x 20 min die unspezifisch gebundene DNA entfernt.

Die Detektion der DIG-markierten Fragmente auf der Membran erfolgte dann in Anlehnung an das Protokoll von Guiliano (Guiliano et al., 1999). Die Membran wurde hierzu in eine Plastikschale überführt, für 5 min in Puffer I äquilibriert und für 30 min in Puffer II geblockt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die nachfolgende Konjugation wurde mit Anti-Digoxigenin-alkalische Phosphatase-Konjugat für 30-60 min unter ständigem Schütteln (mind. 4 ml Antikörperlösung pro  $100\text{ cm}^2$  Membran) durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen in Puffer I (je 20 min) wurde die Membran für die nachfolgende Enzymreaktion der

Alkalischen Phosphatase 5 min in Puffer III äquilibriert. Die Inkubation mit einer verdünnten CDP-Star<sup>TM</sup>-Lösung erfolgte für 5-10 min. In diesem Schritt kommt es zur Spaltung von CDP-Star durch die alkalische Phosphatase und somit zu einer Freisetzung von Chemolumineszenz, die dann durch eine Exposition von Röntgenfilmen detektiert wurde (Membran zur Exposition in Plastikfolie einschweißen).

#### 3.4.12.5 Regeneration von hybridisierten DNA-Membranen

Die Membranen konnten nach der Detektion für weitere Experimente regeneriert werden, indem sie zweimal 30 min in Waschpuffer gewaschen wurden. Die alkalilabile Bindung des Digoxigenins an dUTP zerfällt in diesem Puffer, so dass das Digoxigenin (und gebundener Antikörper) freigesetzt wurde.

Um das SDS zu entfernen, wurden die Membranen nach dieser Behandlung gründlich mit Wasser gewaschen, 5 min im Waschpuffer neutralisiert, in Plastikfolie eingeschweißt und bis zur nächsten Verwendung bei -20°C gelagert.

Wenn besonders starke Signale detektiert worden, wurde zum einen die Anzahl der Waschschrte mit Waschpuffer erhöht und zum anderen der Puffer vor Verwendung etwas erwärmt.

Da durch diese Behandlung zwar die DIG-Markierungen, nicht aber die hybridisierte DNA selbst von der Membran gelöst wird, nimmt die Zahl der Bindungsplätze für neue Fragmente bei mehrmaliger Wiederverwendung stetig ab. Die Membranen können daher nicht beliebig oft regeneriert werden.

## 4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

**4.0 Genotypisierung von *P. aeruginosa* Isolaten mit dem AT-Chip**  
 Durchgeführte Genotypisierungen, Reproduzierbarkeit des DNA-Chips sowie der Vergleich zu Sequenzierergebnissen

*P. aeruginosa*

**4.1 Populationsstruktur von *Paeruginosa***  
 Vergleich zwischen den Habitaten Umwelt, Tier und Mensch sowie eine Analyse zum allgemeinen und habitatspezifischen klonalen Spektrum

*P. aeruginosa* in CF / nicht CF

**4.2 Klonales Spektrum im Vergleich zweier Populationen**  
 Europaweiter Vergleich zwischen CF-Isolaten aus der Geschwister- und Zwillingsstudie und Isolaten anderer Herkunft (**Zeitraum 90-iger Jahre**)

**4.3 Klonales Spektrum an der Medizinischen Hochschule Hannover**  
 CF-Isolate verschiedener Patienten aus dem **Zeitraum von 1998-2006**

*P. aeruginosa* im CF-Patienten

**4.4 Klonales Spektrum im Patienten**  
 Vergleich des klonalen Spektrums aus den oberen und unteren Atemwegen eines CF-Patienten

**4.5 Klonale Vielzahl innerhalb eines Patienten (aus der MHH und der CF-Ambulanz Kopenhagen) über den gesamten Krankheitsverlauf der cystischen Fibrose**  
 Typisierung sequenzieller Isolate (Zeitraum > 20 Jahre) verschiedener Patienten aus zwei Kliniken (Kopenhagen, Hannover) unter Berücksichtigung des klinischen Verlaufs und der Therapieform

Adaptationsprozesse

**4.6 Adaptationsprozesse von *P. aeruginosa* in der CF-Lunge über den Zeitraum der Infektion**  
 Untersuchungen zu phänotypischen Veränderungen im Verlauf der Infektion (z.B. Virulenzfaktoren, Adhärenz), Änderungen im Wachstumsverhalten sowie Untersuchungen zur kompetitiven Fitness





Vergleich der Genotypisierung mit Sequenzierergebnissen

Im Rahmen eines Vergleichs unterschiedlicher Detektierungsmöglichkeiten von Genen (PCR, Dot-Blot und AT-Chip) wurden Abweichungen zwischen den Ergebnissen nachgewiesen. Die Genotypisierung mit dem AT-Chip ergab z.B. in einigen sequentiellen Isolaten eines Patienten die Abwesenheit des Gens PA2221, während dieses mit der Dot-Blot Methode oder der PCR teilweise in einigen der Isolate detektiert werden konnte. Um die Verlässlichkeit und das Detektionslimit des Chips genauer zu analysieren, wurde im weiteren Verlauf ein Isolat, welches ein divergentes Ergebnis in der Blot-Methode und der Genotypisierung durch den Chip lieferte, untersucht. In mehreren Kulturansätzen (auf LB-Agarplatten) wurden verschiedene Kolonien einzeln per PCR auf die Anwesenheit des Gens PA2221 getestet. Aus einigen der Kolonien, die ein Signal lieferten (siehe Abb. 4.1.2), wurden 10 ausgesucht (mit 1-10 in der Abb. 4.1.2 gekennzeichnet) und mit Hilfe des Chips genotypisiert. Nach der PCR zeigten die Kolonien 1-3 und 5-9 ein starkes PCR-Produkt für das Gen PA2221, die Kolonien 4 und 10 ein schwaches Signal. Die Genotypisierung mit dem AT-Chip ergab ein abweichendes Ergebnis. In den Kolonien 3 und 7 konnte das Gen detektiert werden, während die anderen Kolonien entweder kein Signal (8-9) oder nur ein sehr schwaches Signal (1-2, 4-6 und 10) für PA2221 zeigten.

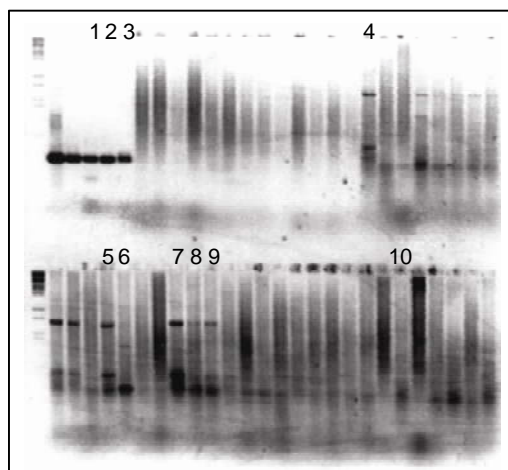


Abb. 4.1.2: PCR-Überprüfung von Einzelkolonien auf die Anwesenheit des Gens PA2221; Auftragung: erste Spur im Gel oben und unten jeweils  $\lambda$ -Bst DNA-Größenstandard; Spur 2-3: PAO Referenzstamm, danach verschiedene Einzelkolonien nach der 5.ten Vereinzelnung; gekennzeichnet von 1-10: Kolonien, die mit dem Chip genotypisiert wurden

Die Kolonie 10, die nur ein sehr schwaches Signal auf dem Chip zeigte, wurde zum einen sequenziert und zum anderen die Menge des Gens in dieser Kolonie durch eine quantitative PCR verifiziert. Die Sequenzierung konnte die Anwesenheit des Gens PA2221 in der

analysierten Kolonie bestätigen. Für die quantitative PCR wurde jeweils ein Aliquot nach 15, 20, 25, 30 und 35 Zyklen abgenommen. Als Positivkontrolle für die PCR wurde der Referenzstamm PAO verwendet. Genotypisierungen dieses Stamms zeigten bereits die Anwesenheit des Gens PA2221. Das Ergebnis dieser PCR wird in Abb. 4.1.3 dargestellt. Aus der Bandenintensität ließ sich berechnen, dass in etwa einem von 10.000 Bakterien das Gen PA2221 vorkommt. Diese geringe Menge konnte durch die Genotypisierung mit dem AT-Chip durch ein sehr schwaches Signal detektiert werden. Hier ist somit das Detektionslimit des Chips erreicht. Der Unterschied in der Detektion zwischen der Genotypisierung mit dem AT-Chip und der Hybridisierung auf eine Membran (Dot-Blot) lässt sich auf eine divergente Sondenbeschaffenheit zurückführen. Bei der Hybridisierung auf eine Membran wird in der Regel eine Sonde verwendet, die mehrere 100 bp lang ist. Somit können hier viele mögliche Variationen des Gens (viele verschiedene Mutationen) detektiert werden. Da es sich bei dem Chip um einen SNP-Chip handelt, besitzt dieser nur kurze Sonden (22-iger Oligos). Dadurch können an diese Sonde nur Sequenzen binden, die ein hohes Maß an Komplementarität aufweisen. Die Detektion von genetischen Variationen ist somit stark eingeschränkt (eher Ja/Nein-Antwort).

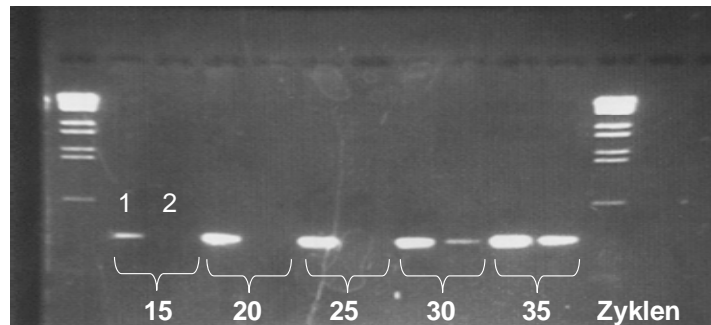


Abb. 4.1.3: Nachweis des Gens PA2221 in einem sequentiellen Patienten Isolat durch eine PCR-Kinetik; Auftragung: erste und letzte Spur:  $\lambda$ -Bst DNA-Größenstandard; Probe 1: PAO; Probe 2: Patientenisolat

#### 4.1 Populationsstruktur von *P. aeruginosa*

Der erste Teil der Arbeit befasste sich mit der allgemeinen Populationsstruktur von *P. aeruginosa*. Hierzu wurden insgesamt 282 Isolate aus verschiedenen Habitaten mit Hilfe des AT-Chips genotypisiert. Bei den Isolaten handelt es sich um 232 *P. aeruginosa* Proben aus dem Habitat Mensch, 13 Isolate aus dem Habitat Tier und 34 aus der Umwelt (siehe Kapitel 3.2.1). Drei Isolate konnten, da sie unbekannter Herkunft waren, nicht weiter

charakterisiert werden. Die Isolate aus dem Habitat Mensch ließen sich noch weiter nach ihrer Herkunft untergliedern: 133 Isolate stammten aus Patienten mit cystischer Fibrose, 85 Isolate aus Intensivstationen, Bakteriämien und Ohrinfektionen sowie 14 Isolate von Patienten mit Brandwunden. Bei den Umweltisolaten handelte es sich sowohl um Boden- als auch um Wasserproben (Fluss und Ozean).

Insgesamt wurden diese Isolate in 11 verschiedenen Ländern weltweit gesammelt und dann der Genotypisierung zur Verfügung gestellt.

Eine detaillierte Liste der Isolate mit genauer Habitatsbeschreibung und spezifischer Herkunft sowie dem Isolationsdatum ist der beigefügten CD zu entnehmen (Datei Genotypisierungen.xls, Tabellenblatt „Referenzstammsammlung“).

Die Genotypisierung der gesamten Stichprobe von 282 Isolaten ergab eine Untergliederung in 116 verschiedene *P. aeruginosa* Klone. Dabei wurden Isolate mit einem übereinstimmenden SNP-Muster (die ersten 15 Marker auf dem Chip) als identischer Klon eingestuft. Die Darstellung erfolgte mit Hilfe des Hexadezimalcodes (siehe Kapitel 3.4.8). 55 der identifizierten Klone wurden mehr als einmal detektiert, bei 61 Klonen handelte es sich um Einzelklone (siehe Tab. 4.1.1). Die Ergebnisse aller Genotypisierungen befinden sich auf der beigefügten CD.

Die 5 häufigsten Genotypen fanden sich in den Klonen E429 (15), D421 (13), F469 (13), 0C2E (10) und 239A (10); sie repräsentierten damit ca. 22 % aller detektierten Klone. Der Klon D421 (der zweithäufigste Klon in der Sammlung) gehört zu den vollständig sequenzierten Stämmen und wird in der Literatur als Referenzstamm PA14 bezeichnet (Lee et al., 2006). Die 15 häufigsten Klone (Genotypen, die mindestens fünfmal typisiert werden konnten) repräsentieren 44 % der gesamten Population. Die 19 häufigsten Klone umfassen die Hälfte der genotypisierten Isolate.

Tab. 4.1.1: Darstellung des klonalen Spektrums der 282 *P. aeruginosa* Isolate unter Verwendung des Hexadezimalcodes

Klon	Anzahl	Klon	Anzahl	Klon	Anzahl	Klon	Anzahl	Klon	Anzahl	Klon	Anzahl	Klon	Anzahl
E429	15	4C12	4	279A	2	EC22	2	2C5A	1	841E	1	E419	1
D421	13	AC2A	4	2C12	2	F421	2	2D9A	1	882A	1	E42A	1
F469	13	D429	4	2C2E	2	F661	2	2E12	1	8C1A	1	E439	1
0C2E	10	0002	3	2C92	2	F66A	2	2F92	1	8C2A	1	E469	1
239A	10	049A	3	2F82	2	002A	1	2FAA	1	A461	1	E4AA	1
1BAE	7	3C2A	3	3412	2	059A	1	3392	1	AC4A	1	E59A	1
2C1A	7	4022	3	4C2E	2	0BA2	1	3C51	1	AC9A	1	E84A	1
C40A	7	7D9A	3	4F8A	2	0C59	1	4612	1	AE9A	1	EC29	1
F429	7	EA0A	3	6C1A	2	0D92	1	46BA	1	AF92	1	EC38	1
812	6	EC4A	3	6C22	2	0D9A	1	4992	1	B01A	1	ED92	1
4012	6	192	2	7C2E	2	2012	1	55AA	1	B420	1	F419	1
6C2A	6	081E	2	85AA	2	241A	1	5BAE	1	C41A	1	F461	1
6D92	6	0B92	2	A5AA	2	259A	1	6512	1	CC29	1	F59A	1
6E12	6	0C1A	2	AC2E	2	261A	1	6B92	1	CC2A	1	F62A	1
EC2A	5	0F9E	2	AF9A	2	281A	1	6C12	1	CD9E	1		
3C52	4	1E1E	2	E41A	2	2992	1	6CA2	1	CDAA	1		
481A	4	249A	2	EC21	2	2C22	1	6FAE	1	DA39	1		

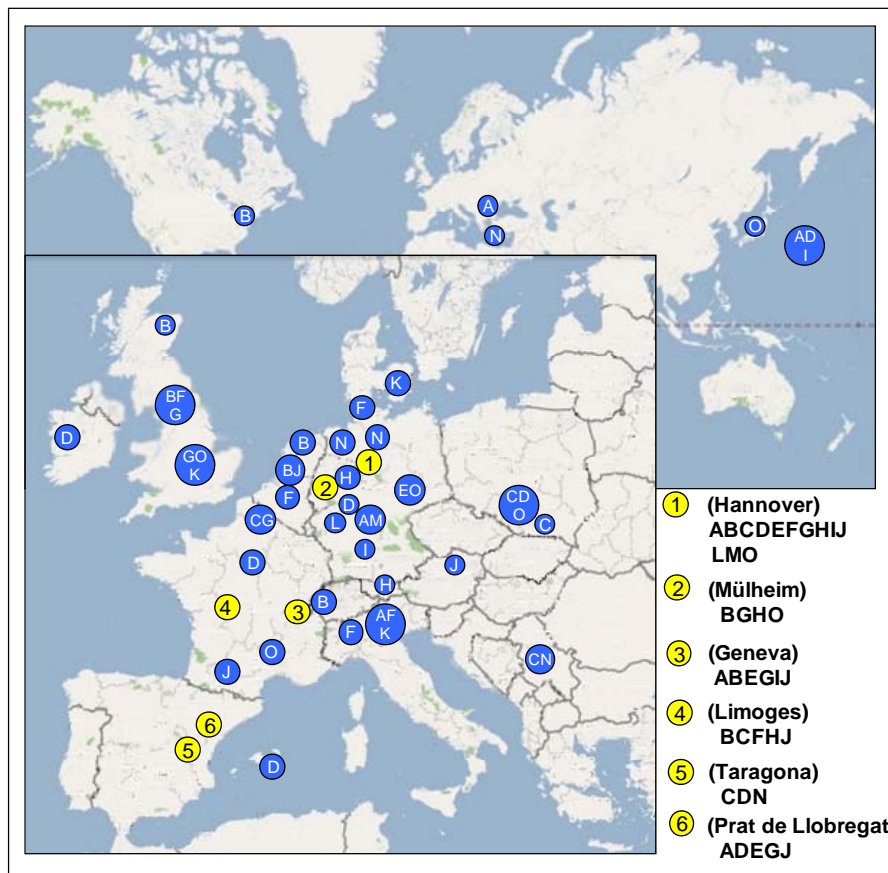


Abb. 4.1.4: globale Verteilung der 15 häufigsten Klone der analysierten 282 Isolate; Darstellung: A = E429, B = D421, C = F469, D = 0C2E, E = 239A, F = 1BAE, G = 2C1A, H = C40A, I = F429, J = 0812, K = 4012, L = 6C2A, M = 6D92, N = 6E12, O = EC2A

In Abb. 4.1.4 wird die globale Verteilung der unterschiedlichen Klone dargestellt. Der bekannte und bereits vollständig sequenzierte Klon PA14 (D421) konnte sowohl an verschiedenen Orten in Europa als auch in den USA nachgewiesen werden. Neben der globalen Verteilung des Stammes wurde dieser auch in den verschiedenen Habitaten Mensch

und Umwelt gefunden. Als weitere Beispiele sind die Klone CHA (EC2A) und PAO (0002) zu nennen. Der Klon CHA wurde sowohl im Boden in Japan als auch in einem Fließgewässer in Deutschland und verschiedenen CF-Patienten in Europa nachgewiesen. Der Laborreferenzstamm PAO konnte bereits vor über 50 Jahren das erste Mal in einem Labor in Melbourne charakterisiert und zusätzlich 1990 in der Schweiz und 2003 in Deutschland aus dem Menschen isoliert werden. Weiter wurde der Klon 0B92 sowohl in einem klinischen Isolat in den USA als auch in der Umwelt in Deutschland nachgewiesen. Der Klon 6C22 konnte ebenfalls in einem Isolat aus den USA und aus Deutschland typisiert werden.

Die Klonverteilung auf der Grundlage des unterschiedlichen Habitats lässt sich anhand der Abb. 4.1.5 erkennen.

Klon	Mensch	Tier	Umwelt	Klon	Mensch	Tier	Umwelt	Klon	Mensch	Tier	Umwelt
E429	9		6	3412			2	55AA			
D421	12		1	4C2E	2			5BAE	1		
F469	13			4F8A	2			6512	1		
0C2E	8		2	6C1A	2			6B92	1		
239A	10			6C22	1		1	6C12	1		
1BAE	7			7C2E	2			6CA2			1
2C1A	5		1	85AA	2			6FAE	1		
C40A	5		2	A5AA	2			841E	1		
F429	6		1	AC2E	2			882A	1		
0812	6			AF9A	2			8C1A		1	
4012	6			F41A	2			8C2A	1		
6C2A	6			EC21			2	A461	1		
6D92	6			EC22	2			AC4A	1		
6E12	6			F421	2			AC9A	1		
EC2A	3		2	F661	2			AE9A		1	
3C52	4			F66A	2			AF92	1		
481A	1		3	002A		1		B01A	1		
4C12	4			059A	1			B420	1		
AC2A	1	3		0BA2	1			C41A	1		
D429	3		1	0C59	1			CC29			1
0002	3			0D92	1			CC2A	1		
049A			3	0D9A	1			CD9E	1		
3C2A	3			2012		1		CDAA		1	
4022	3			241A	1			DA39	1		
7D9A	3			259A		1		E419	1		
EA0A	2		1	261A	1			E42A			
EC4A	3			281A	1			E439	1		
0192	2			2992			1	E469	1		
081E	2			2C22	1			E4AA	1		
0B92	1		1	2C5A	1			E59A	1		
0C1A	1	1		2D9A	1			E84A	1		
0F9E	2			2E12	1			EC29	1		
1E1E		2		2F92	1			EC38	1		
249A	1		1	2FAA	1			ED92	1		
279A	2			3392	1			F419			1
2C12	2			3C51	1			F461	1		
2C2E	1	1		4612	1			F59A	1		
2C92	2			46BA	1			F62A	1		
2F82	2			4992	1						

Abb. 4.1.5: Klonverteilung der 282 typisierten Isolate in den verschiedenen Habitaten

Die Klone, die aus dem Habitat Mensch stammen, verteilen sich gleichmäßig über das gesamte klonale Spektrum. 100 der insgesamt 116 verschiedenen Klone (86 %) lassen sich in diesem Habitat nachweisen.

Bedingt durch die kleine Stichprobengröße an Isolaten aus der Umwelt und den Tierinfektionen ist ein Vergleich der verschiedenen Gruppen mit den Isolaten aus dem Menschen nur bedingt möglich. Dennoch lässt sich erkennen, dass sich einige Umweltklone (13 von 20) auch im Habitat Mensch gefunden haben. Der häufigste Umweltklon gehörte dabei auch zu den häufigsten im Menschen. Bei ca. 80 % der Klone, die in der Umwelt detektiert wurden, handelt es sich um Einzelisolate.

Die Probenanzahl der Tierinfektionsisolate war zwar noch geringer als bei den Umweltisolaten, aber hier wurde erkennbar, dass von 10 gefundenen Klonen nur zwei auch im Menschen nachgewiesen werden konnten.

Demzufolge handelt es sich bei den Tierisolaten um seltene Klone, die daher auch nicht in den Umweltisolaten wiederzufinden waren.

Die *P. aeruginosa* Isolate aus dem Habitat Mensch lassen sich, wie schon zuvor beschrieben, entsprechend ihrer genaueren Herkunft weiter untergliedern: CF-Patienten, Patienten mit akuter Infektion und Patienten mit Bakteriämien oder von Intensivstationen. Bei der Betrachtung der 15 häufigsten Klone innerhalb dieser drei Patientengruppen (siehe Abb. 4.1.6) lässt sich erkennen, dass die Verteilung der Klone aus der Gruppe der CF-Patienten mit der aus der Gruppe der Bakteriämie- oder Intensivstations-Patienten vergleichbar ist. Über die Verteilung der Klone innerhalb einer akuten Infektion kann nur gemutmaßt werden, da auch hier aufgrund der geringen Gruppengröße keine statistischen Aussagen möglich sind. Dennoch lassen sich hier 6 der insgesamt 14 verschiedenen Isolate (43 %) zu einem Klon zusammenfassen.

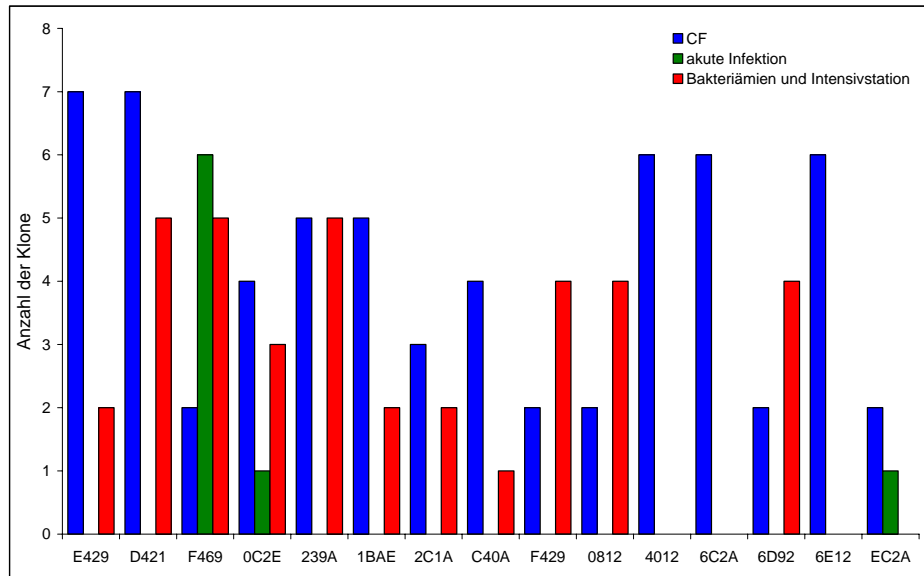


Abb. 4.1.6: Verteilung der 15 häufigsten Klone im Habitat Mensch, untergliedert in Isolate von CF-Patienten, Patienten mit akuter Infektion und Patienten mit/aus Bakteriämien und Intensivstationen

Zur Beurteilung der Biodiversität der einzelnen Habitate wurde in einem ersten Schritt der Simpson Index berechnet. Hiermit lassen sich Aussagen über die Diversität einer Population treffen. Besteht eine Population aus 10 verschiedenen Isolaten, in denen sich genauso viele verschiedene Klone finden lassen, liegt der Simpson Index bei 10, bezogen auf die Populationsgröße bei 1. In Abb. 4.1.7 sind die Simpson Indizes der einzelnen Habitate graphisch dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass die höchste Diversität bei den Isolaten aus der Tierinfektion vorlag. Die Isolate der Habitate Umwelt und Bakteriämien/Intensivstationen variierten in vergleichbarer Weise. Die Diversität der beiden Gruppen CF und akute Infektion war untereinander ebenfalls vergleichbar, aber geringer als in den beiden zuvor beschriebenen Gruppen. Daraus ließ sich schließen, dass die *P. aeruginosa* Population in Patienten mit CF oder einer akuten Infektion weniger verschiedene Klone aufwies als in den anderen Habitaten. Des Weiteren wurde zur Beurteilung der Biodiversität ebenfalls der Shannon Index berechnet. Dieser berücksichtigt nicht nur die Anzahl der verschiedenen Klone einer Population, sondern auch wie häufig jeder Klon nachgewiesen werden konnten. Eine Population mit x Klonen, die jeweils gleichhäufig vorkämen, bekäme den maximalen Shannon Diversitätsindex (normiert auf die Populationsgröße wird der Wert maximal 1).

Zusätzlich zum Simpson Index wurde in der Abb. 4.1.7 auch der Shannon Index dargestellt. Die Werte sind, wie auch beim Simpson Index, auf die jeweilige Populationsgruppe des Habitats normiert. In diesem Fall würde ein Index von 1 bedeuten, dass alle vorkommenden Klone gleichverteilt wären. Insgesamt war der Index in allen untersuchten Habitaten mit



Werten um 0,8 relativ hoch. Die Isolate aus der akuten Infektion zeigten die geringste Gleichverteilung.

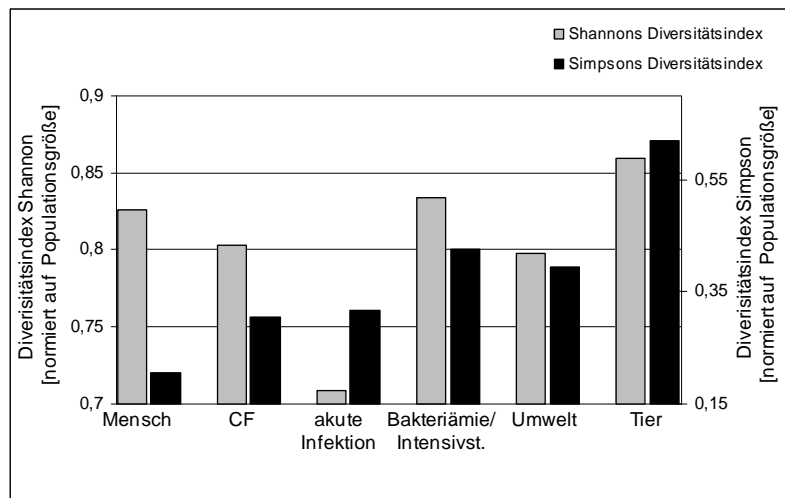


Abb. 4.1.7: Bestimmung der Biodiversitätsindizes nach Shannon und Simpson

Eine Methode zur Vereinfachung von komplexen Datensätzen ist die Hauptkomponentenanalyse. Mit Hilfe dieses Verfahrens ließen sich die Informationen, die sich aus der Genotypisierung der 282 Isolate ergaben, strukturieren und veranschaulichen. Für diese Analyse wurden die Isolate nach dem Habitat in drei Kategorien (Mensch, Tier, Umwelt) eingeordnet. Jeder detektierte Klon in einem Habitat wurde für die Analyse nur einmal herangezogen. Um den Datensatz etwas zu verringern, wurden die 41 Marker des akzessorischen Genoms teilweise zusammengefasst. Z.B. wurden die 5 Marker, die die *PAPII*- und *pKLC*-Inseln repräsentieren, zu einem Marker zusammengefasst. Insgesamt dienten nach der Datenreduzierung 17 Marker des Kerngenoms und 20 Marker des akzessorischen Genoms der Cluster-Analyse als Datengrundlage.

Die Analyse der klonalen Verteilung ergab nur in Einzelfällen die Bildung von Clustern verschiedener Klone. Neben der Variabilität und der Verteilung der detektierten Klone unabhängig vom Habitat ließen sich mit dieser Analysemethode aber auch Aussagen über Assoziationen zwischen dem SNP-Genotyp des Kerngenoms und den Elementen des akzessorischen Genoms treffen. Neben den schon bekannten Verbindungen zwischen z.B. *oriC* Allel 1 (Allel 1 = Mutante im Verhältnis zu PAO) und *ampC7* Allel 0 (Allel 0 = PAO-Sequenz), *citS2* Allel 0, *oprL* Allel 1, *exoU* und der Abwesenheit des Gens PA2185 (Wiehlmann et al., 2007) wurden weitere Assoziationen analysiert. Das Allel 1 bei *citS2* korreliert z.B. mit dem Allel 1 bei *ampC3*, *ampC4*, *fliCa* und sowie der Anwesenheit der Cargoregion der Geninsel *PAGI2*. Als weiteres Beispiel konnte aus der

Hauptkomponentenanalyse eine Verknüpfung zwischen der Anwesenheit von verschiedenen Pyoverdin-Genen, den variablen Genen PA3835 und PA2221 und den Inseln *pKL102* und *PAGI-2* erkannt werden. Ebenfalls wurde eine Assoziation zwischen dem Phagen PA0980, dem Gen *XF1753* und dem Allel 1 des *fliCa*-SNP-Typs oder zwischen *PAGI-1*, *pKLC* und den Allelen 0 der Gene *citS2*, *ampC4* und *ampC3* nachgewiesen (siehe auch Tab. 4.1.2).

Tab. 4.1.2: Veranschaulichung der Assoziationen zwischen verschiedenen Genen des *P. aeruginosa* Genoms

	<i>oriC</i>	<i>ampC3</i>	<i>ampC4</i>	<i>ampC5</i>	<i>ampC7</i>	<i>citS2</i>	<i>oprL</i>	<i>fliCa</i> <i>fliCb</i>	<i>exoU</i> <i>exoS</i>	Pyover- din	<i>pKL102</i>	<i>PAGI2</i>	<i>pKLC</i>
<i>oriC</i>	+					+	+		+				
<i>citS2</i>		+	+					+				+	+
PA0980								+				+	
PA2185	+									+			
PA3835										+			
PA2221										+			
<i>PAGI2</i>										+		+	
<i>pKL102</i>										+			
<i>PAGI1</i>		+	+			+							+

In einer abschließenden Analyse wurden die Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen den 116 verschiedenen *P. aeruginosa* Klonen untersucht. Hierfür wurde der binäre SNP-Code eines jeden Klons in das Programm „eBurst“ eingelesen und mit dieser Datengrundlage das bestehende „Verwandtschaftsverhältnis“ der Genotypen (Klone) errechnet (siehe Kapitel 3.1.7.3).

Die 116 Klone wurden durch Punkte dargestellt, die in Abhängigkeit ihrer Ähnlichkeit untereinander durch Linien verbunden waren. Zur Erklärung der Definition eines Klons und eines klonalen Komplexes wurde in der Abb. 4.1.8 jeweils ein Beispiel in rot dargestellt. In der Darstellung lassen sich zwei große, nicht überlappende klonale Komplexe mit einmal 34 bzw. 24 verschiedenen Klonen erkennen. Des Weiteren zeigt die Abb. 4.1.8 einen Komplex mit 6 Klonen, 7 Komplexe mit 2 bzw. 3 Partnern und 37 Einzelklone ohne Verbindungspartner. Gekennzeichnet sind mit dem Hexadezimalcode die 15 häufigsten Klone, d.h. die Klone, die mind. fünfmal in den 282 Isolaten analysiert werden konnten. 11 dieser Klone lassen sich in den beiden großen Clustern wiederfinden. Zusätzlich wurden zur Veranschaulichung der Referenzstamm PAO sowie der Klon PAK dargestellt.

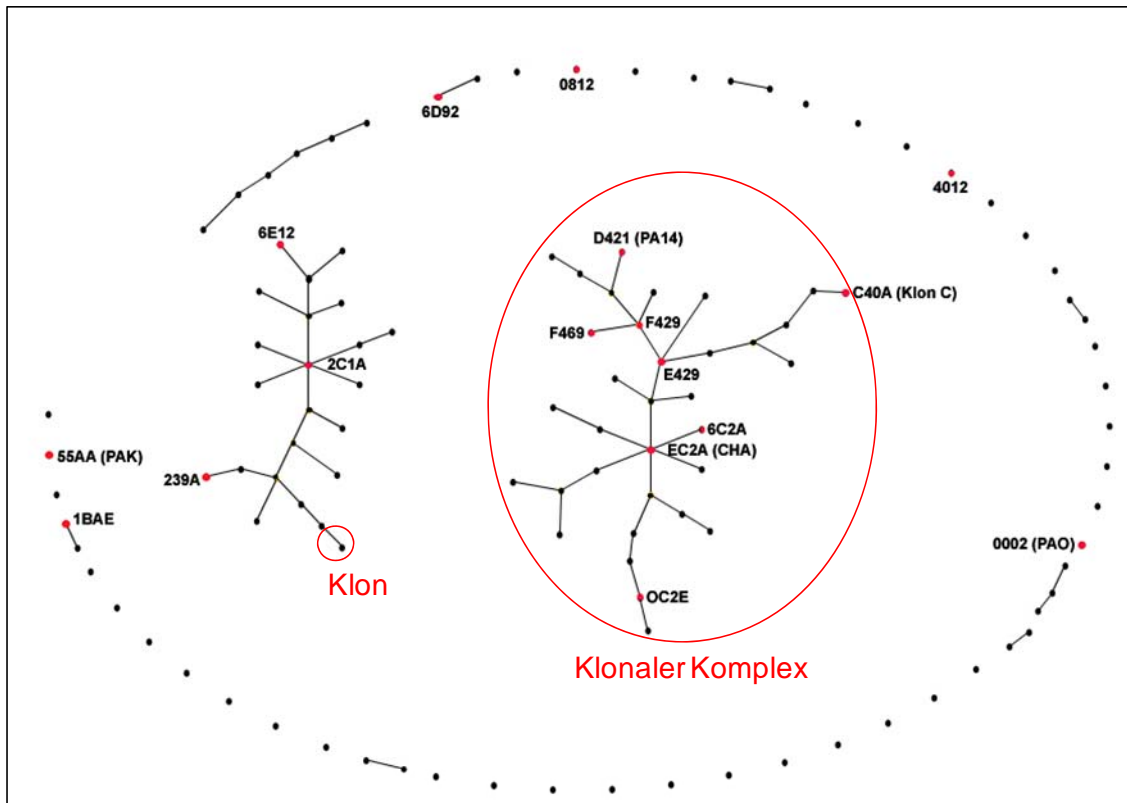


Abb. 4.1.8: Populationsstruktur der Referenzstammsammlung; mit Hexadezimalcode gekennzeichnet sind die 15 häufigsten Klone sowie der Klon PAK und der Referenzstamm PAO; Beispiel für einen Klon und einen klonalen Komplex werden jeweils in rot dargestellt

Die analysierten 282 *P. aeruginosa* Isolate stammten aus verschiedenen Orten und Habitaten, und repräsentierten somit eine große Vielzahl möglicher Proben. Aus diesem Grund ließen sich die Rückschlüsse, die sich aus dieser Analyse ergaben, auf die gesamte *P. aeruginosa* Populationsstruktur verallgemeinern. Die Sammlung der Isolate diente infolgedessen allen nachfolgenden Experimenten als Referenzkohorte und wurde zum Vergleich herangezogen.

Diskussion:

Die Ergebnisse der Genotypisierung der Referenzkohorte führten zur Hypothese, dass die Struktur der *P. aeruginosa* Population durch dominante Klone beschrieben werden kann. In 282 verschiedenen Isolaten wurden insgesamt 116 verschiedene Klone detektiert, wobei die fünf häufigsten Klone in ca. 22 % der Isolate nachgewiesen werden konnten. Somit ließ sich die Population in zwei Bereiche untergliedern. Der eine Bereich zeichnete sich durch einige wenige Klone aus, die dafür aber sehr häufig detektiert wurden (sogenannte dominante Klone). Der andere Bereich ließ sich durch viele verschiedene, sehr selten detektierbare Klone charakterisieren.

Bei dem in der Literatur verwendeten Referenzstamm PA14, der durch den Hexadezimalcode als D421 gekennzeichnet wurde, handelte es sich um den zweithäufigsten Klon in der Referenzsammlung. Anhand dieses Stammes ließ sich nachweisen, dass der gleiche *P. aeruginosa* Klon in verschiedenen Habitaten und Orten anzutreffen ist. Der PA14 Klon gehört zu den dominanten Klonen und wurde sowohl in den USA als auch in Patienten und der Umwelt in Europa nachgewiesen. Somit zeigte dieser Klon eine Wachstumsfähigkeit, die nicht auf ein spezifisches Habitat und/oder einen Ort beschränkt ist. Diese Aussage ließ sich anhand anderer dominanter Klone, die ebenfalls weltweit nachgewiesen werden konnten, bestätigen. Über die Klone, die nur sehr selten detektiert wurden, ließ sich aufgrund der geringen Anzahl keine Aussage über die Habitat- bzw. Ortsgebundenheit treffen.

Viele der detektierten Klone im Habitat Mensch wurden auch in der Umwelt nachgewiesen. Dabei gehörten die häufig nachgewiesenen Klone der Umwelt gleichzeitig auch zu den häufig detektierten Klonen aus dem Habitat Mensch. Phänotypische Daten von Isolaten aus der Umwelt und dem Menschen zeigten bereits in der Vergangenheit ein ähnliches chemotaxonomisches Profil und ein überlappendes Repertoire an metabolischen und Virulenzfaktoren (Foght et al., 1996; Alonso et al., 1999). Weiter wurde auch in einer Feldstudie nachgewiesen, dass verschiedene Proben aus einem kleinen Fluss nicht nur die gleiche Klondiversität aufwiesen wie in der globalen Betrachtung, sondern auch die gleichen Klone gefunden wurden (Pirnay et al., 2002).

Die detaillierte Analyse der Klondiversität im Habitat Mensch ergab ebenfalls eine Ubiquität zwischen den Klonen aus CF-Patienten und Patienten mit Bakteriämien oder von Intensivstationen. In den Patienten mit akuter Infektion schien sich dagegen besonders ein spezifischer Klon (F469) nachweisen zu lassen. Dieser Klon hat sich wahrscheinlich besonders gut an die Situation einer akuten Infektion angepasst.

Mögliche Assoziationen zwischen genetischen Elementen des Kerngenoms und des akzessorischen Genoms wurden mit Hilfe einer Hauptkomponentenanalyse untersucht. Neben den schon bekannten Assoziationen im genetischen Bereich (Wiehlmann et al., 2007), wie z.B. eine Assoziation zwischen *oriC* und *exoS/U* oder den *ampC*-Genen, wurden weitere Assoziationen wie z.B. zwischen Oberflächenproteinen und Phagen oder zwischen *exoS* und verschiedenen variablen Genen gefunden. Die Inkompatibilität zwischen *exoU* und *exoS* bedeutet, dass beide Gene nur mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit in einem Genom zusammen anzutreffen sind (ca. in 1 % der untersuchten Isolate). *ExoU* ist ein in eine tRNA<sup>Lys</sup> Insel integriertes Gen, welches wahrscheinlich im Laufe der Evolution durch horizontalen Gentransfer in das Genom transferiert wurde. Dieses Ereignis ging einher mit der Deletion

des *exoS*-Gens (Kulasekara et al., 2006). Demnach handelt es sich um eine Inkompatibilität der Funktion beider Gene. Der Großteil der *exoU*-Stämme gehörte in der Darstellung der Populationsstruktur zu dem größten klonalen Komplex (siehe Abb. 4.1.9). Bis auf zwei Ausnahmen trugen alle dieser Stämme das *oriC* Allel 1.

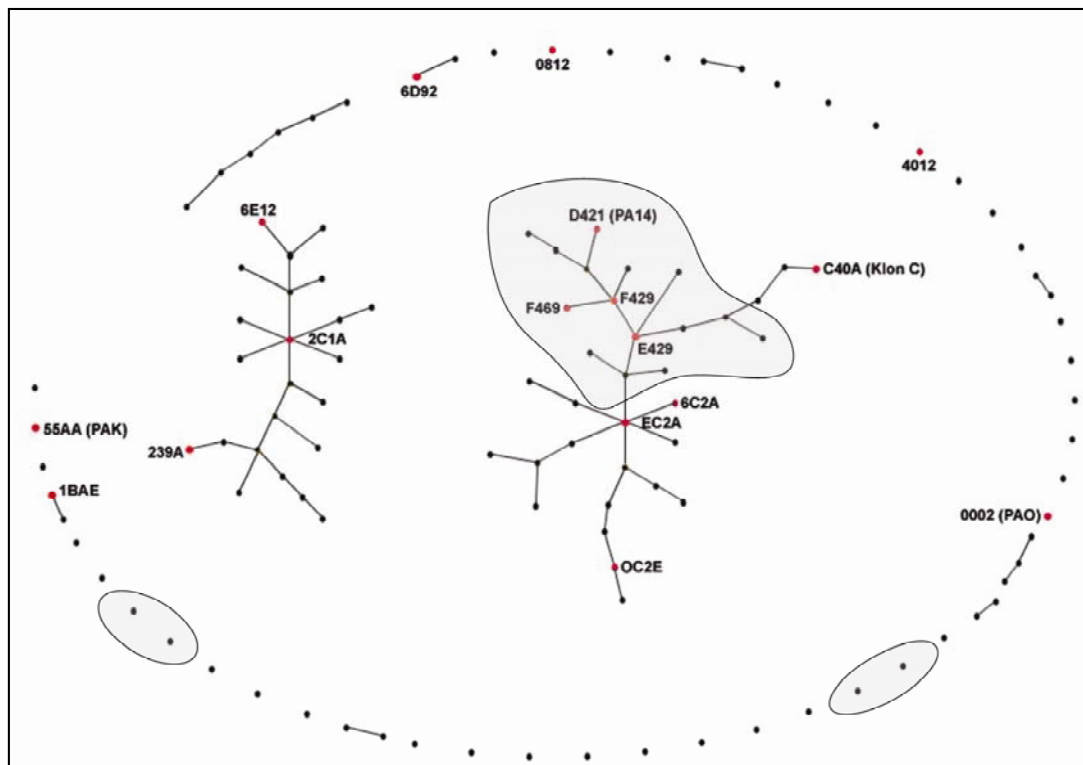


Abb. 4.1.9: Populationsstruktur der Referenzstammsammlung mit Darstellung der *exoU*-Stämme (eingerahmt); mit Hexadezimalcode zusätzlich gekennzeichnet sind die 15 häufigsten Klone sowie der Klon PAK und der Referenzstamm PAO

Die Assoziation verschiedener Gene über eine große genomische Distanz hinweg, wie z.B. zwischen den variablen Genen und den *ampC*-Genen oder *exoS*, ist wahrscheinlich auf eine Anordnung von vielen konservierten Blöcken zurückzuführen, die an einigen Stellen für Rekombinationen unterbrochen worden sind. Das *P. aeruginosa* Genom besitzt demnach eine Mosaikstruktur. Teile des Kerngenoms sowie des akzessorischen Genoms sind nicht zufällig im klonalen Rahmen verteilt. Jeder Klon bevorzugt ein spezifisches Repertoire an akzessorischen Segmenten. Darüber hinaus tolerieren einige Teile des Kerngenoms nur eine kleine Auswahl an möglichen Kombinationen von Sequenzvarianten. Diese stehen miteinander in einem Kopplungsungleichgewicht, während andere Teile frei rekombinierbar sind (Wiehlmann et al., 2007).

Mit dem Programm eBurst wurden in einer abschließenden Analyse die Verknüpfungen aller detektierten Klone untereinander untersucht. Hierbei wurden Ähnlichkeiten und Unterschiede

zwischen den einzelnen Klonen sichtbar und somit ein Rückschluss auf die Struktur der *P. aeruginosa* Population möglich. Es gibt Bakterien mit einer sehr einheitlichen Struktur, die keine bzw. nur geringe Abweichungen untereinander aufweisen, aber auch Bakterien, deren Population sich durch eine sehr hohe Variabilität auszeichnet. Aus der Literatur sind zwei verschiedene MLST Studien (Analyse der Haushaltsgene) bekannt, die anhand verschiedener Stämme die Populationsstruktur von *P. aeruginosa* untersucht haben. Beide wiesen unabhängig voneinander nach, dass verschiedene Stämme nur eine sehr geringe Assoziation zueinander aufweisen (Kiewitz et al., 2000; Curran et al., 2004). Bezogen auf MLST Analysen kamen beide Veröffentlichungen unabhängig voneinander zu dem Ergebnis, dass es sich bei *P. aeruginosa* um eine nicht-klonale epidemische (panmikrotische) Population mit einer netzartigen Struktur handelt. Dagegen gelangten die Autoren in der Veröffentlichung von Vernez et al. (2005) zu der Aussage, dass sich *P. aeruginosa* durch eine klonale Populationsstruktur charakterisieren lässt.

Die Analyse der 282 unabhängigen Isolate verschiedener geographischer und habitatspezifischer Herkunft ermöglichte aufgrund der signifikant größeren Anzahl an zur Verfügung stehenden Markern eine genauere Betrachtung und Analyse der Populationsstruktur von *P. aeruginosa*. Die eBurst Analyse wies auf eine stärker differenzierte Populationsstruktur hin als zuvor angenommen wurde. Es ließen sich zwei große klonale Komplexe nachweisen, in denen auch die Mehrzahl der dominanten Klone wiederzufinden war (11 von 15). Die Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse sowie der eBurst Analyse weisen darauf hin, dass es sich bei *P. aeruginosa* um ein Bakterium handelt, welches eine Populationsstruktur zwischen einer klonalen und einer panmikrotischen Struktur aufweist. Das Genom besteht aus klon-spezifischen Segmenten des Kern- und des akzessorischen Genoms (charakteristisch für eine klonale Struktur) sowie aus Blöcken, die sich durch uneingeschränkten Gentransfer charakterisieren lassen (bei panmikrotischen Populationen).

## **4.2 Klonales Spektrum zweier getrennter Populationen**

Der Hauptverursacher chronischer Lungenentzündungen bei Patienten mit zystischer Fibrose ist *P. aeruginosa*. Aufgrund der bedeutenden Relevanz dieses Bakteriums für den klinischen Verlauf einer CF-Erkrankung, wurde nach der Analyse der Referenzstammsammlung das klonale Spektrum von verschiedenen CF-Patienten mit dem aus anderen Habitaten

detaillierter verglichen. Hierzu wurden 85 *P. aeruginosa* Isolate der Geschwister- und Zwillingsstudie (ZW; siehe Kapitel 3.2.1.2) mit 174 Isolaten, die nicht aus einer CF-Infektion stammen, (NCF) verglichen. Die NCF-Kohorte setzte sich dabei zusammen aus den 80 europäischen nicht-CF-Isolaten der Referenzstammsammlung und 94 *P. aeruginosa* Isolaten aus akuten Infektionen wie z.B. intubierte Patienten oder Patienten mit Harnwegsinfekten (Daten von Christian van Delden, Schweiz, Liste integriert in die Gesamtliste dieser Studie, auf beigefügter CD). Die CF-Isolate stammten von 55 an CF erkrankten Geschwistern und Zwillingen und wurden in 35 verschiedenen CF-Zentren aus 11 verschiedenen europäischen Ländern gesammelt. Die Vergleichsstudie beinhaltete *P. aeruginosa* Isolate aus den Habitaten Mensch (Brandwunden, Harnwege, Lunge, Darm und Ohr), der Umwelt (Wasser, Boden und Gemüse) und dem Tier (Nerz). Diese Isolate stammen aus 15 unterschiedlichen europäischen Ländern. Die Probenentnahme beider Isolatgruppen erfolgte in den 90-iger Jahren.

Die 259 *P. aeruginosa* Isolate wurden mit dem AT-Chip genotypisiert und anschließend untereinander verglichen. Die Ergebnisse der Genotypisierung befinden sich auf der beigefügten CD (Datei Genotypisierung.xls, Tabellenblatt „ZW- nicht CF“).

Die Population der Geschwister- und Zwillingsstudie wies in den 85 Isolaten insgesamt 40 verschiedene Klone auf. Zu den 8 häufigsten Klonen (ca. 50 % in den ZW-Isolaten) gehörten unter anderem auch der Referenzstamm PA14 (5-mal detektiert). In den Isolaten der NCF-Kohorte konnten insgesamt 81 verschiedene Klone detektiert werden. Unter den häufigsten Klonen waren hier sowohl der Referenzstamm PA14 als auch der weitverbreitete und schon in der Literatur beschriebene Klon C (Schmidt et al., 1996) anzutreffen. In Tab. 4.2.1 werden die jeweils 8 häufigsten Klone beider Kohorten dargestellt.

Tab. 4.2.1: Klonverteilung in den nicht CF-Isolaten (NCF) und der Geschwister- und Zwillingsstudie (ZW); angegeben sind die 8 häufigsten Klone in %, bei der Angabe in Klammern handelt es sich um die absolute Anzahl ; farblich markiert sind die in beiden Kohorten übereinstimmenden Klone

Klon	NCF-Isolate [%]	Klon	ZW-Isolate [%]
F469	10,3 (18)	E429	9,4 (8)
C40A	5,7 (10)	6E12	7,1 (6)
239A	4,6 (8)	239A	5,9 (5)
D421	4,0 (7)	4012	5,9 (5)
0C2E	4,0 (7)	6C2A	5,9 (5)
6D92	3,4 (6)	D421	5,9 (5)
F429	2,9 (5)	E419	4,7 (4)
E429	2,9 (5)	0192	3,5 (3)

Während 44 % der Isolate aus der Geschwister- und Zwillingsstudie auch in der NCF-Kohorte detektiert werden konnten, stimmten 35 % der NCF-Isolate auch mit den detektierten Klonen

der ZW-Isolate überein. Die Abb. 4.2.1 dient zur Veranschaulichung der Übereinstimmungen zwischen beiden Kohorten. Hier wurden auf der linken Seite die acht häufigsten Klone der Geschwister- und Zwillingsstudie (50 % der Klone aus der ZW-Kohorte) geographisch in eine Europakarte eingeordnet. Auf den rechten Seiten befinden sich äquivalent dazu die 8 häufigsten Klone der zweiten Kohorte.

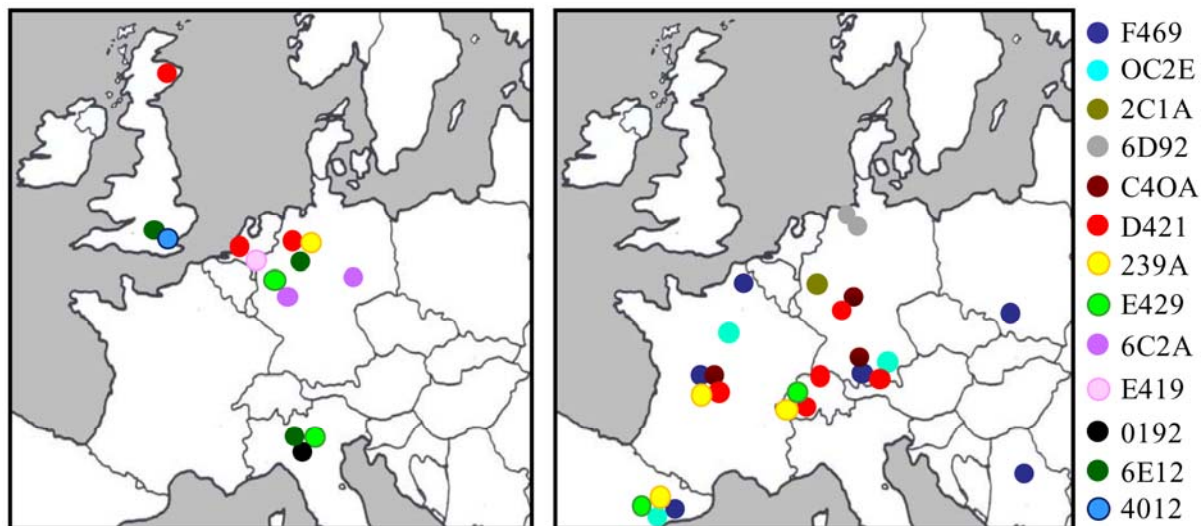


Abb. 4.2.1: Geographische Verteilung der 8 häufigsten Klone; links: Geschwister- und Zwillingsstudie; rechts: nicht CF-Patienten

Beim Vergleich beider Gruppen wurde erkennbar, dass nur 3 der 8 häufigsten Klone übereinstimmten. Hierbei handelte es sich um die Klone D421 (orange), 239A (gelb) und E429 (hellgrün). Die geographischen Unterschiede der detektierten Klone lassen sich durch die nicht überlappenden Einzugsbereichen beider Isolatsammlungen erklären.

#### Diskussion:

Die Isolate der europäischen Geschwister- und Zwillingsstudie wurden vor Beginn der Dissertation von P. Gudowius mit der SpeI-Makrorestriktionsanalyse analysiert. Hierbei ergab sich, dass 22 der 28 ko-kolonisierten Geschwisterpaare den gleichen Klon trugen. Einige der Klone wurden schon damals in verschiedenen Kliniken nachgewiesen. An CF erkrankte Zwillinge und Geschwister zeigten in den meisten Fällen die gleichen oder stark verwandte Klone innerhalb einer Familie. Das Phänomen der Kreuzinfektion in Familien wurde auch in der Veröffentlichung von Grothues et al. (1988) beschrieben. Eine Übertragung von *P. aeruginosa* von einem Patienten auf einen zweiten ist somit zumindest bei sehr engem Kontakt, wie es innerhalb der Familie der Fall ist, möglich.



Die Ergebnisse der ZW-Studie ließen den Rückschluss zu, dass es einige dominante Klone gibt, die innerhalb der CF-Population weit verbreitet sind. Auch innerhalb der NCF-Isolate gibt es diese dominanten Klone, die ebenfalls weder geographisch begrenzt noch habitatspezifisch nachgewiesen werden konnten. Somit stimmten die Ergebnisse mit der Referenzstammsammlung überein. Es konnte des Weiteren keine krankheitsassoziierte Häufung an spezifischen Klonen nachgewiesen werden.

### **4.3 Klonspezifität an der Medizinischen Hochschule Hannover**

In Anlehnung an die Arbeiten von Römling et al. (1994) und Scott et al. (2004) wurde die Klondiversität von *P. aeruginosa* in verschiedenen CF-Patienten an einem Ort, in diesem Fall der Medizinischen Hochschule, untersucht. Mit dieser Sammlung sollte geklärt werden, ob eine regionale Häufung einiger Klone durch nosokomiale Übertragung an der MHH stattgefunden hat (Hygienestudie) oder eine krankheitsassoziierte Häufung spezifischer Klone zu verzeichnen war. Zum anderen konnte mit dieser Sammlung auch überprüft werden, ob die MHH (eine lokal gebundene Population) sowohl eine vergleichbare Spezifität als auch Diversität an Klonen wie die globale (siehe Kapitel 4.1; Referenzstammsammlung) bzw. europaweite Verteilung (siehe Kapitel 4.2; Geschwister- und Zwillingstudie) aufwies.

Hierzu wurden 418 *P. aeruginosa* Isolate von insgesamt 61 verschiedenen Patienten, die alle an der Medizinischen Hochschule in Behandlung stehen, mit dem AT-Chip genotypisiert. Der Isolationszeitraum der verschiedenen Isolate umfasste insgesamt 8 Jahre (1998-2006). Die Ergebnisse dieser Typisierung befinden sich auf der beigefügten CD (Datei Genotypisierungen.xls, Tabellenblatt „MHH 1998-2006“).

Die Genotypisierung ergab 65 unterschiedliche Klone. Diese Klone sind zusammen mit der Häufigkeit ihres Vorkommens in der Tab. 4.3.1 dargestellt.

Tab. 4.3.1: Klonale Verteilung in *P. aeruginosa* Isolaten von CF-Patienten der Medizinischen Hochschule; Angaben in Prozent, in Klammern die jeweilige absolute Anzahl

Klon	Anzahl [%]	Klon	Anzahl [%]	Klon	Anzahl [%]	Klon	Anzahl [%]
0C2E	11 (46)	6C22	1,7 (7)	F429	0,7 (3)	859A	0,2 (1)
D421	8,6 (36)	D429	1,7 (7)	6D92	0,5 (2)	8A89	0,2 (1)
C40A	8,1 (34)	4022	1,4 (6)	741E	0,5 (2)	A429	0,2 (1)
8ABE	5,3 (22)	6E12	1,4 (6)	7C2E	0,5 (2)	ABBA	0,2 (1)
3C2A	5,0 (21)	C81A	1,4 (6)	842A	0,5 (2)	AF9A	0,2 (1)
2C22	4,3 (18)	E429	1,4 (6)	AC9A	0,5 (2)	B421	0,2 (1)
249A	3,8 (16)	6C0A	1,2 (5)	AD9E	0,5 (2)	C409	0,2 (1)
0F9E	3,1 (13)	481E	1,0 (4)	AE1A	0,5 (2)	C82E	0,2 (1)
2F82	3,1 (13)	6C02	1,0 (4)	0BA2	0,2 (1)	CA9A	0,2 (1)
F421	3,1 (13)	AE9A	1,0 (4)	149A	0,2 (1)	E022	0,2 (1)
0002	2,9 (12)	059A	0,7 (3)	1989	0,2 (1)	E40A	0,2 (1)
239A	2,6 (11)	269A	0,7 (3)	201A	0,2 (1)	E479	0,2 (1)
F469	2,6 (11)	4C12	0,7 (3)	299A	0,2 (1)	EC2A	0,2 (1)
6C2A	2,4 (10)	E019	0,7 (3)	2C2A	0,2 (1)	F601	0,2 (1)
0812	2,2 (9)	E661	0,7 (3)	359E	0,2 (1)		
1BAE	2,2 (9)	EA0A	0,7 (3)	4F8A	0,2 (1)		
0C2A	1,9 (8)	EC29	0,7 (3)	6C1A	0,2 (1)		

Tab. 4.3.1 zeigt, dass der Klon 0C2E am häufigsten vorkommt. Dieser ließ sich in 11 % der Isolate (insgesamt 46-mal) detektieren. Der zweithäufigste Klon ist der Referenzstamm PA14 (8,6 %), und beim dritthäufigsten Klon handelt es sich um den bekannten Klon C (8,1 %). Bei Betrachtung der Tabelle im Ganzen lässt sich erkennen, dass es auch hier eine große Klondiversität gab. Allerdings fällt auch auf, dass es sich nicht um eine Gleichverteilung der Klone handelte. Wie in den anderen Studien zuvor beobachtet gab es auch hier wenige stark dominierende Klone und viele Einzelklone bzw. Klone, die nur sehr selten nachzuweisen waren. In etwa 50 % der gesamten Isolate wurde einer der ersten acht Klone gefunden. In Abb. 4.3.1 wird dieses Ergebnis graphisch veranschaulicht.

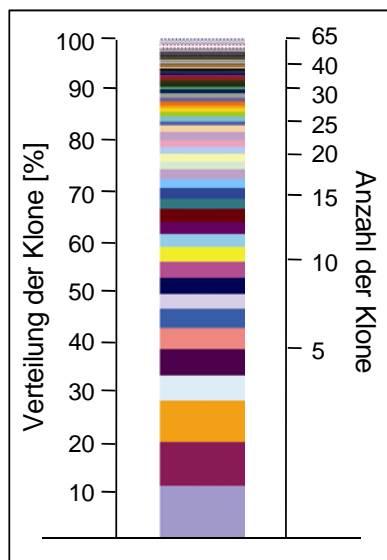


Abb. 4.3.1: Verteilung der Klone innerhalb der CF-Patienten der Medizinischen Hochschule

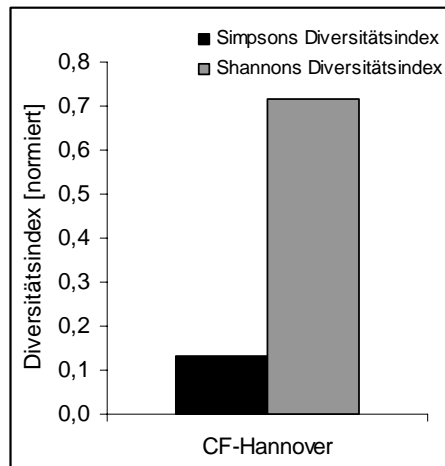


Abb. 4.3.2 Biodiversität der *P. aeruginosa* Population in CF-Patienten der MHH

Der geringe Simpson-Index (siehe Abb. 4.3.2) charakterisierte eine niedrige Klondiversität. Im Zusammenhang mit dem Shannon-Index, der bei 0,7 lag, wurde eine Ungleichverteilung der Klone analysiert und somit vorherige Aussagen bestätigt.

Diskussion:

Die Genotypisierung der insgesamt 418 Isolate von 61 verschiedenen CF-Patienten aus dem Zeitraum 1998-2006 kann als Fortführung der Arbeit von Römling et al. (1994) angesehen werden. Bereits damals wurden insgesamt 481 Isolate von 44 verschiedenen CF-Patienten durch eine DraI/SpeI Makrorestriktionsanalyse genotypisiert. Es konnten insgesamt 48 verschiedene Genotypen detektiert werden, wobei 58 % der Isolate einen der 6 häufigsten Klone aufwiesen. Die heutige (neuere) Studie zeigte in 418 genotypisierten Isolaten 65 verschiedene Genotypen, wobei die 8 häufigsten Klone in ca. 50 % der Isolate detektiert werden konnten. Die klonale Diversität ist somit in den letzten 10 Jahren etwas angestiegen. Trotzdem ließen sich sowohl damals als auch heute einige wenige dominierende Klone und viele Einzelklone nachweisen. Im Vergleich dieser Population mit der Geschwister- und Zwillingsstudie sowie der Referenzsammlung, also im Vergleich einer örtlich gebundenen Population mit einer europäischen bzw. globalen Verteilung der *P. aeruginosa* Population, ließen sich die gleichen Klone detektieren. In der Referenzstudie wurde mit insgesamt 116 voneinander unabhängigen Klonen eine Populationsstruktur entwickelt, der die globale Diversität von *P. aeruginosa* darstellen sollte. Hier waren neben der Klondiversität auch klonale Komplexe zu erkennen. Die *P. aeruginosa* Population in CF-Patienten, die an der MHH in Behandlung stehen, zeigte das gleiche klonale Spektrum. Die eBurst Analyse dieser Kohorte (nicht dargestellt) entsprach somit der der Referenzsammlung. Lediglich die Verteilung der einzelnen Klone unterschied sich. Eine mögliche Erklärung für die

Unterschiede in der Häufigkeit wäre, dass es Klone gibt, die sich besser an spezifische Orte adaptiert haben, vielleicht dadurch Wachstums- und Überlebensvorteile haben und somit häufiger in diesem Habitat oder an diesem Ort zu detektieren sind (zentrumspezifische Klone). Es kam durch diese Spezialisierung allerdings nicht zu einer Verdrängung der anderen Klone.

Nachdem im ersten Kapitel die allgemeine Populationsstruktur von *P. aeruginosa* untersucht worden ist, wurde in dem nachfolgenden Kapitel auf die Unterschiede zwischen der *P. aeruginosa* Population in CF-Patienten und anderen Habitaten eingegangen. Anschließend wurde eine ortsgebundene *P. aeruginosa* Gemeinschaft (Isolate aus CF-Patienten der MHH) mit der globalen Population und dessen Struktur verglichen. Das Ergebnis dieser Studien war, dass *P. aeruginosa* entgegen früherer Veröffentlichungen bei denen weniger Marker für die Analyse verwendet worden waren (Kiewitz et al., 2000; Curran et al., 2004; Vernez et al., 2005) eine Populationsstruktur aufweist, die sowohl von einer klonalen als auch einer panmiktischen Population geprägt ist. Das Genom von *P. aeruginosa* weist nach den Ergebnissen dieser Arbeit eine Mosaikstruktur auf, bestehend aus klon-spezifischen Segmenten des Kern- und des akzessorischen Genoms sowie aus Blöcken, die sich durch uneingeschränkten Gentransfer charakterisieren lassen.

Die Diversität der Population ist sowohl global als auch in einer ortsgebundenen Population sehr hoch und die Spezifität beider Kohorten vergleichbar. Neben der Ortsungebundenheit konnte auch eine Habitatsunspezifität nachgewiesen und somit frühere Veröffentlichungen (Pirnay et al., 2005) bestätigt werden.

In den nachfolgenden Kapiteln wird detaillierter auf das Habitat CF-Lunge eingegangen:

- Wie kommt es zu einer Besiedelung mit *P. aeruginosa* innerhalb einer CF-Infektion und wie verhält sich das Bakterium nach der Kolonisation in der CF-Lunge?
- Wie viele verschiedene Klone können im Laufe einer CF-Infektion in einem Patienten nachgewiesen werden?
- Gibt es Ko-Kolonisationen und wie lange persistiert der initiale Klon?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem Klon und dem klinischen Verlauf der Infektion?
- Haben Unterschiede in der Therapie einen Einfluss auf die Klonspezifität und –diversität?

#### 4.4 Klonspezifität im CF-Patienten

Die oberen Atemwege sind bei Patienten mit cystischer Fibrose genauso betroffen wie die unteren Atemwege. Dies lässt sich durch Schleimbildung, chronische Entzündungen und Kolonisation mit pathogenen Krankheitserregern wie *P. aeruginosa* oder *Staphylococcus aureus* (Shapiro et al., 1982) nachweisen. Das Auftreten von chronischen Nasennebenhöhlenentzündungen und Polypen sind die Folge (Ramsey et al., 1992; Gysin et al., 1992; Coste et al., 1995). Die Beteiligung der oberen Atemwege hat sich als größte Quelle für chronische bronchiale Infekte herausgestellt (Gysin et al., 1992). Die Hypothese, dass die oberen Atemwege eine Pforte und das Reservoir für chronische Infektionen bilden, sollte mit Hilfe einer breit angelegten Studie analysiert werden (Mainz et al., 2009). Im Rahmen dieser Studie wurden 65 *P. aeruginosa* Isolate aus den oberen und unteren Atemwegen von 29 CF-Patienten aus 5 verschiedenen CF-Zentren Deutschlands mit dem AT-Chip typisiert. Von 24 Patienten standen sowohl Proben aus den unteren als auch aus den oberen Atemwegen zur Verfügung. Die Ergebnisse der Genotypisierungen sind in Abb. 4.4.1 dargestellt, nähere Informationen befinden sich auf der beigefügten CD in der Datei Genotypisierungen.xls, Tabellenblatt „obere-untere Atemwege“.

In den insgesamt 65 *P. aeruginosa* Isolaten wurden 21 verschiedene Klone nachgewiesen. Zu den 3 dominanten Klonen gehörten C40A (=Klon C; 13), F46A (6) und B421 (5). Jeder der 8 häufigsten Klone repräsentierte mehr als 1 % der gesamten *P. aeruginosa* Population (Wiehlmann et al., 2007). 7 Genotypen konnten bis zum heutigen Zeitpunkt nur in dieser Patientengruppe nachgewiesen werden.

Patient	Habitat	Klon	orfC	orfL	akB2	dB-1	dB-2	orf1	ampC-1	ampC-3	ampC-4	ampC-5	ampC-6	ampC-7	flCa	flCa-SNP	flCb	flCs	flCu
1	Nase	C40A	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
	Sputum	C40A	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
2	Nase	C40A	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
	Nase	C40A	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
	Rachenstrich	C40A	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
3	Sputum	C40A	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
	Nase	C40A	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
4	Rachenstrich	C40A	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
	Rachenstrich	C40A	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
	Nase	C40A	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
	Nase	C40A	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
5	Sputum	F46A	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0
	Nase	F46A	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0
	Nase	F46A	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0
	Sputum	F46A	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0
6	Sputum	B421	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
	Nase	B421	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
	Nase	B421	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
13	Sputum	0F9E	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0
	Nase	0F9E	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0
14	sputum	1BAE	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0
	Nase	1BAE	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0
15	Sputum	239A	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0
	Nase	239A	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0
16	sputum	649A	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1
	Nase	649A	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1
17	Sputum	6E12	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
	Nase	6E12	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
18	Sputum	741A	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
	Nase	741A	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
19	Sputum	882A	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1
	Nase	882A	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1
20	Rachenstrich	8992	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1
	Nase	8992	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1
7	Nase	B421	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
	Sputum	B421	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
8	Sputum	200A	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
	Sputum	200A	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
	Nase	200A	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
9	Sputum	0C4A	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
	Sputum	0C4A	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
	Nase	0C4A	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
10	Nase	4F9A	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0
	Sputum	4F9A	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0
	Sputum	4F9A	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0
11	Sputum	6412	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
	Sputum	6412	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
	Nase	6412	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
12	Sputum	0892	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1
	Nase	0892	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1
21	Sputum	AF9A	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0
	Nase	AF9A	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0
22	Sputum	E992	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1
	Nase	E992	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1
23	Nase	EA0A	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1
	Sputum	EC2A	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
24	Sputum	F421	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
	Nase	F421	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
25	Nase	F421	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
	Nase	F421	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
26	Nase	C40A	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
	Sputum	C40A	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
28	Nase	F46A	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0
	Sputum	EA0A	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1

Abb. 4.4.1: Genotypisierung der 64 *P. aeruginosa* Isolate aus den oberen und unteren Atemwegen von 26 CF-Patienten

Abb. 4.4.1 zeigt, dass 23 der untersuchten Patienten den identischen Klon sowohl in den oberen Atemwegen (Nasenabstriche) als auch in den unteren Atemwegen (Sputum oder Rachenabstrich) trugen. Dies entspricht etwa 96 %. Dargestellt werden die Ergebnisse jeweils sowohl durch den Hexadezimalcode als auch durch das detailliertere Ergebnis der SNP-Typisierung. Nur in Patient 23 wurde in den oberen Atemwegen ein anderer Klon detektiert als in den unteren Atemwegen. Hier ergab der Nasenabstrich den Klon EA0A, während im Sputum der Klon EC2A nachgewiesen werden konnte.

In der Veröffentlichung von Mainz et al (2009) wurde ebenfalls untersucht, in wie vielen Proben sich unter anderem *P. aeruginosa* nachweisen ließ. In 29 (46 %) der 63 rekrutierten Patienten mit einer chronischen *P. aeruginosa* Besiedelung der unteren Atemwege konnte die Anwesenheit von *P. aeruginosa* nachgewiesen werden. Zum gleichen Zeitpunkt wurde das Bakterium auch in 96 % der Fälle in den oberen Atemwegen detektiert. Diese Ergebnisse bestätigten vorherige Veröffentlichungen von Taylor et al. (1992) und Muhlebach et al. (2006). Auch hier wurden die gleichen Genotypen in oberen und unteren Atemwegen nachgewiesen. In der Literatur wurde zusätzlich beschrieben, dass die Wahrscheinlichkeit, in beiden Kompartimenten einen *P. aeruginosa* positiven Befund zu erhalten, mit dem Alter

ansteigt (Hogardt et al., 2006). Dabei ist die Wahrscheinlichkeit, einen *P. aeruginosa* in einer Probe der oberen Atemwege zu finden, 88-mal höher, wenn auch die Probe der unteren Atemwege positiv ausfällt (Mainz et al., 2009).

Ein Kompartiment übergreifender Befall mit pathogenen Keimen wurde nicht nur anhand von *P. aeruginosa* nachgewiesen. In derselben Veröffentlichung wurden auch weitere Keime wie *S. aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* untersucht. *S. aureus* und *H. influenzae* wurden wie der *Pseudomonas* in beiden Kompartimenten gefunden, während sowohl *A. fumigatus* als auch *C. albicans* nur in den unteren Atemwegen nachgewiesen werden konnten.

Bereits in der Veröffentlichung von Walter et al. (1997) wurde gezeigt, dass lungentransplantierte CF-Patienten innerhalb kürzester Zeit (wenige Monate) den gleichen *P. aeruginosa* Klon in der neuen Lunge aufwies, der in der Lunge vor der Transplantation bereits nachgewiesen werden konnte. Die oberen Atemwege bieten demnach dem Pathogen ein Kompartiment zum Überleben und sind wahrscheinlich sogar die Pforte für weitere Pathogene und somit mitverantwortlich für eine Neubesiedelung. Dieses wurde bereits in einigen Veröffentlichungen beschrieben (Taylor et al., 1992; Lewiston et al., 1991; Nunley et al., 1998) und mit den Ergebnissen innerhalb dieser Studie zusätzlich bestätigt. Andere Veröffentlichungen (Tsang et al., 1994; Batsakis et al., 1996), in denen den oberen Atemwegen kein Reservoir für nachfolgende Infektionen zugeschrieben wurde, konnten somit widerlegt werden.

Bereits in vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass durch eine gezielte Therapie im Stadium der frühen Kolonisation der *P. aeruginosa* Keim zu 80 % eliminiert werden konnte, so dass es zu keiner Adaptation an die unteren Atemwege des Patienten kommen konnte (Smith et al., 2006).

Beginnt die Besiedelung mit verschiedenen Pathogenen in den oberen Atemwegen, wäre hier eine regelmäßige Analyse auf eventuell vorhandene Krankheitserreger sinnvoll. So könnte bei einem positiven Befund schon zu Beginn einer Kolonisation der Erreger eliminiert und somit eine chronische Besiedelung verhindert werden. Es würde im Weiteren zu keiner Adaptation des Pathogens an die Lunge des CF-Patienten kommen.

## 4.5 Klonale Vielfalt von *P. aeruginosa* im CF-Patienten über den gesamten Zeitraum der Infektion

Aus der Literatur ist bekannt, dass Patienten mit cystischer Fibrose, die von *P. aeruginosa* kolonisiert sind, in der Regel den initial erworbenen Klon für viele Jahre im Respirationstrakt tragen. Während dieser langen Zeit entwickeln sich aus vielen dieser initialen Klone unterschiedliche klonale Varianten, die häufig einen Defekt im DNA-Reparatursystem aufweisen (Oliver et al., 2000; Ciofu et al., 2005). Nimmt die Anzahl der Hypermutationen über die Zeit zu, kommt es zu einer Akkumulation von Punktmutationen während des späten Infektionsstadiums. Durch die Hybridisierung von klinischen *P. aeruginosa* Isolaten auf das gesamte PAO1 Genom mit Hilfe von Microarrays und/oder physikalische Kartierung konnten Rekombinationen, Deletionen und Inversionen in CF-Isolaten identifiziert werden (Ernst et al., 2003; Römling et al., 1997; Kiewitz et al., 2000; Kresse et al., 2003). Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten diese Abläufe nur an einzelnen CF-Isolaten untersucht werden. Die Medizinische Hochschule Hannover und die CF-Ambulanz in Kopenhagen sind die einzigen Kliniken, die über eine Stammsammlung verfügen, die sequentielle *P. aeruginosa* Isolate von verschiedenen CF-Patienten über einen sehr langen Zeitraum der Infektion umfasst (20-30 Jahre). Dadurch bestand hier die Möglichkeit, die Besiedelung der CF-Lunge mit *P. aeruginosa* und den weiteren Verlauf zu analysieren:

- Wie verhalten sich die initial erworbenen Klone, wie lange persistieren diese in der Lunge?
- Gibt es Ko-Kolonisationen? Mit wie vielen verschiedenen Klonen ist ein CF-Patient über den gesamten Krankheitsverlauf kolonisiert?
- Wie wirkt sich die Therapie auf die Klondiversität und Spezifität aus?
- Gibt es eine Assoziation zwischen Klon und Krankheitsverlauf des Patienten?

Um diese Fragen zu beantworten, wurden insgesamt 519 sequentielle *P. aeruginosa* Isolate, die von Beginn der chronischen Infektion über einen Zeitraum von 25-30 Jahren gesammelt worden sind, genotypisiert. Dabei handelte es sich um die Isolate 47 verschiedener Patienten aus den beiden CF-Kliniken Medizinische Hochschule Hannover und das Rigshospitalet Kopenhagen.

Aus der CF-Klinik der MHH wurden insgesamt 377 sequentielle Isolate von 35 Patienten aus dem Zeitraum 1980-2006 analysiert, aus der Kopenhagener Klinik stammten 142 sequentielle Isolate von 12 verschiedenen CF-Patienten aus dem Zeitraum 1970-2000. Mit Hilfe dieser



beiden Stammsammlungen konnte die Kolonisation mit *P. aeruginosa* über einen sehr langen Zeitraum der CF-Infektion dokumentiert werden.

Zu Beginn der Untersuchungen wurden die Hannoveraner Patienten zur Einschätzung des Schweregrads der Erkrankung in 5 Gruppen eingeordnet (siehe Tab. 4.5.1; verstorbene Patienten wurden mit fetten Buchstaben gekennzeichnet). Zur Eingliederung in die verschiedenen Kategorien wurde der Verlust der Lungenfunktion herangezogen.

Tab. 4.5.1: Krankheitsverläufe der Hannoveraner Patienten; verstorbene Patienten mit fetten Buchstaben gekennzeichnet

Krankheitsverlauf	Patient
<b>sehr mild</b>	H25, H32, H30, H27, H33, H34, H35, H16, H8
<b>mild</b>	H5, H7, H9, H10, H17, H21, H22, H23, H26
<b>moderat</b>	H2, H6, H12, <b>H13</b> , H18, <b>H19</b> , H20, <b>H29</b> , H24
<b>schwer</b>	<b>H3</b> , <b>H11</b> , <b>H14</b> , <b>H15</b> , <b>H28</b> , H31
<b>sehr schwer</b>	<b>H1</b> , <b>H4</b>

Von den Kopenhagener Patienten lag lediglich die Information vor, dass 2 Patienten während des Beobachtungszeitraums verstarben und 5 Patienten in diesem Zeitraum lungentransplantiert wurden und somit aus der Studie ausschieden.

Die Ergebnisse der Genotypisierung werden in den Abb. 4.5.1- 4.5.5 dargestellt. Eine detaillierte Darstellung der einzelnen Isolate ist in der Datei Genotypisierungen.xls auf der beigefügten CD zu finden (Tabellenblatt „sequentielle Isolate“).

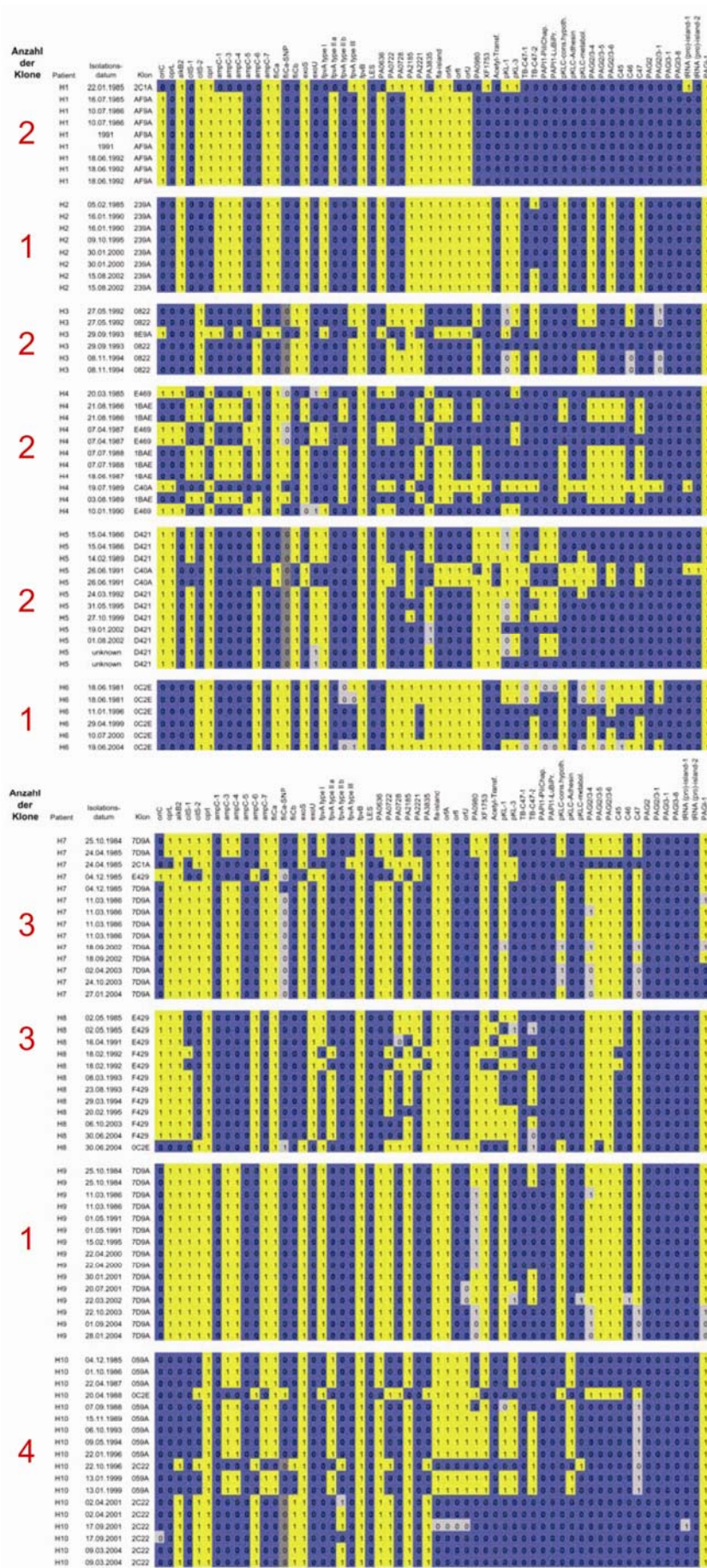


Abb. 4.5.1: Genotypisierung der Isolate von den Patienten H1-H10

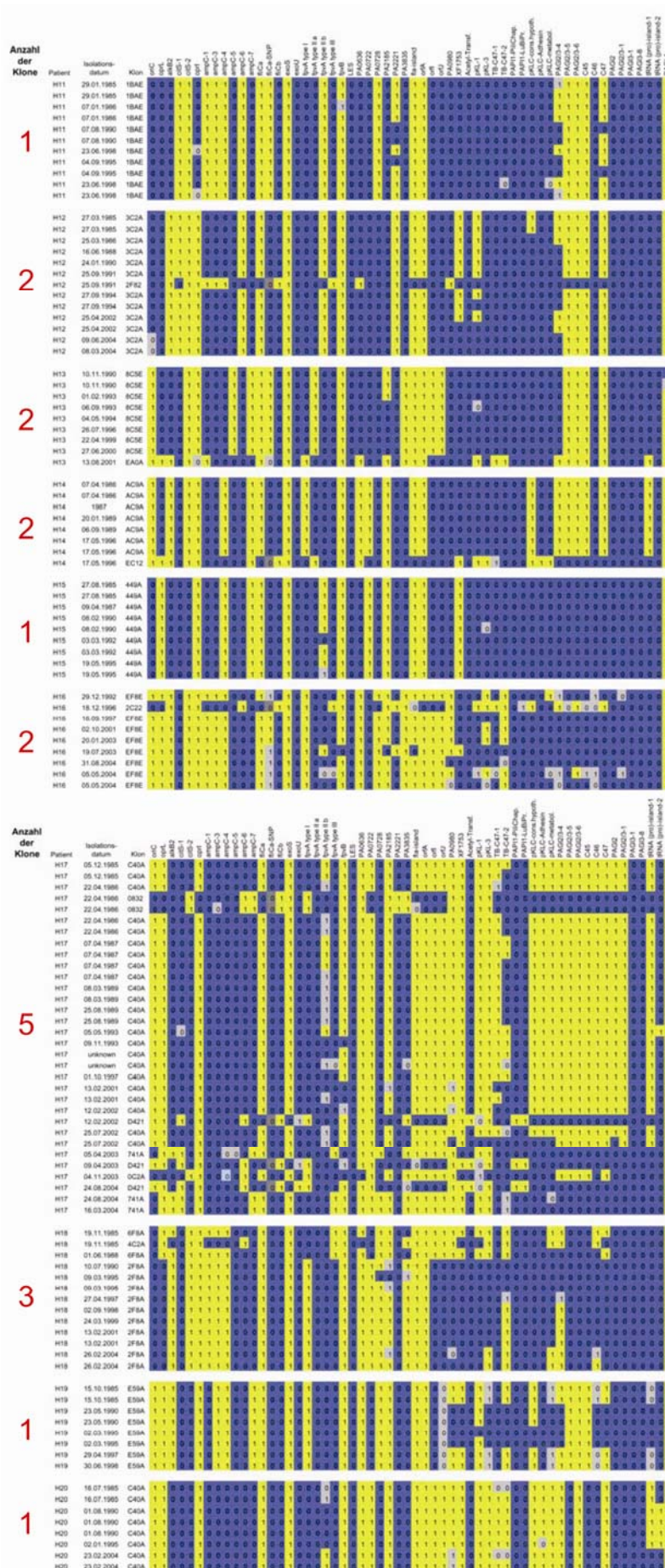


Abb. 4.5.2: Genotypisierung der Isolate von den Patienten H11-H20

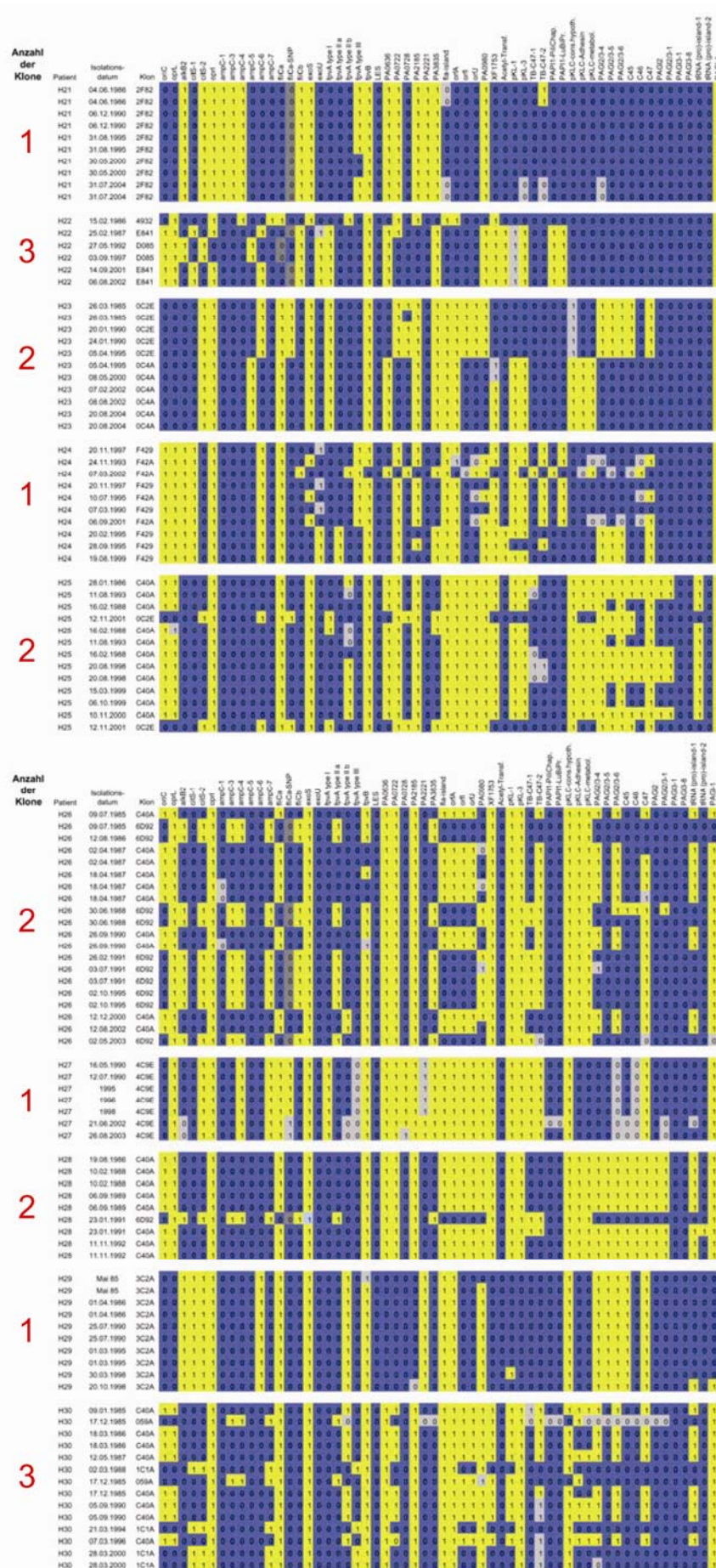


Abb. 4.5.3: Genotypisierung der Isolate von den Patienten H21-H30

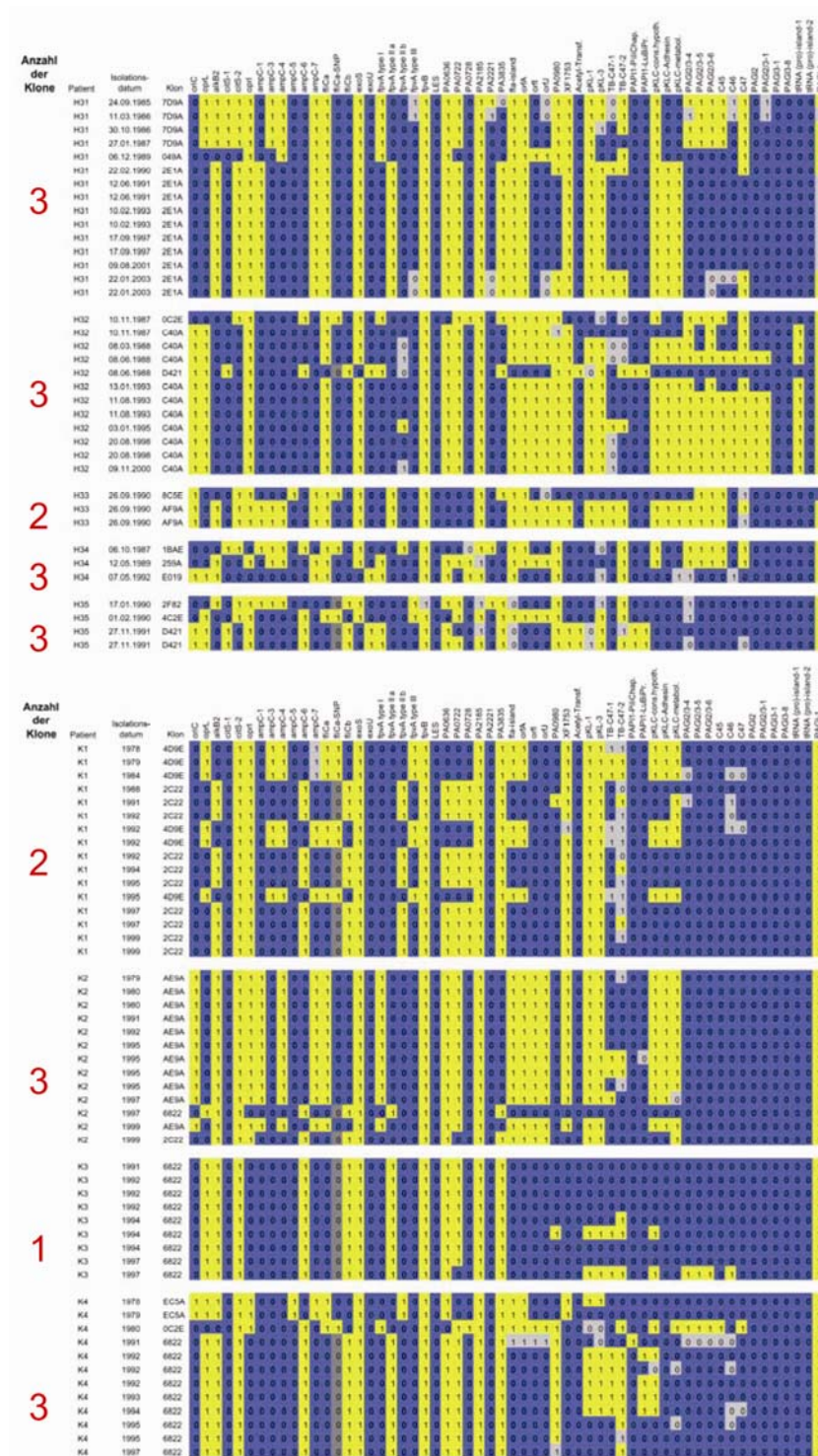


Abb. 4.5.4: Genotypisierung der Isolate von den Patienten H31-H35 und K1-K4



**4.5.1 Klondiversität in sequentiellen Isolaten**

Die genotypische Analyse der 519 *P. aeruginosa* Isolate ergab insgesamt 49 verschiedene Klone. Die Häufigkeit der gefundenen Klone wird in Tab. 4.5.2 gezeigt.

Dabei wurde jeder detektierte Klon pro Patient nur einmal berücksichtigt.

Tab. 4.5.2: Klonverteilung in den sequentiellen Isolaten aus Hannover und Kopenhagen; Angegeben ist die Anzahl der detektierten Klone in %, in Klammern die absolute Anzahl

Klon	Anzahl [%]	Klon	Anzahl [%]	Klon	Anzahl [%]	Klon	Anzahl [%]	Klon	Anzahl [%]
6822	10,0 (11)	2C1A	1,8 (2)	F429	1,8 (2)	8E9A	0,9 (1)	E019	0,9 (1)
C40A	8,2 (9)	3C2A	1,8 (2)	049A	0,9 (1)	AC9A	0,9 (1)	E469	0,9 (1)
0C2E	6,4 (7)	449A	1,8 (2)	0822	0,9 (1)	2F92	0,9 (1)	E59A	0,9 (1)
2C22	6,4 (7)	4D9E	1,8 (2)	0832	0,9 (1)	4932	0,9 (1)	E841	0,9 (1)
4022	6,4 (7)	6D92	1,8 (2)	0C2A	0,9 (1)	4C2A	0,9 (1)	EA0A	0,9 (1)
D421	3,6 (4)	8C5E	1,8 (2)	0C4A	0,9 (1)	4C2E	0,9 (1)	EC12	0,9 (1)
059A	2,7 (3)	AE9A	1,8 (2)	1C1A	0,9 (1)	4C9E	0,9 (1)	EF8E	0,9 (1)
1BAE	2,7 (3)	AF9A	1,8 (2)	259A	0,9 (1)	6F8A	0,9 (1)	F421	0,9 (1)
2F82	2,7 (3)	E429	1,8 (2)	2C2A	0,9 (1)	741A	0,9 (1)		
7D9A	2,7 (3)	EC5A	1,8 (2)	2E1A	0,9 (1)	841E	0,9 (1)		
239A	1,8 (2)	F429	1,8 (2)	2F8A	0,9 (1)	D085	0,9 (1)		

Bei Betrachtung der Tab. 4.5.2 lassen sich 5 dominierende Klone feststellen, die insgesamt fast 40 % der detektierten Klone repräsentieren: der Klon 6822 (10 %), C40A (8,2 %), 0C2E, 2C22 und 4022 (mit jeweils 6,4 %). 41 der insgesamt 49 detektierten Klone konnten nur 1-2-mal nachgewiesen werden. Das Bild von wenigen dominanten Klonen ließ sich somit auch in dieser Kohorte bestätigen.

Werden beide Patientenkohorten abhängig von ihrer Herkunft getrennt voneinander betrachtet, konnten in Hannover 42 verschiedene Klone, in Kopenhagen 14 verschiedene Klone detektiert werden. Unter Berücksichtigung der Patientenzahl ergab sich in beiden Kohorten eine vergleichbar große Klondiversität. Bei der Betrachtung des klonalen Spektrums in beiden Kohorten ließen sich aber große Unterschiede erkennen. Diese werden in Tab. 4.5.3 dargestellt.

Tab. 4.5.3: die 10 häufigsten Klone aus den sequentiellen Isolaten der Kliniken Hannover und Kopenhagen

	6822	C40A	0C2E	2C22	4022	D421	059A	1BAE	2F82	7D9A
<b>Hannover</b>	1	9	6	3	0	4	2	3	3	3
<b>Kopenhagen</b>	11	0	1	4	7	0	1	0	0	0

Die Tab. 4.5.3 zeigt die Anzahl der Patienten, in denen die 10 häufigsten Klone mindestens einmal detektiert wurden. Der am häufigsten detektierte Klon 6882 konnte, bis auf eine Ausnahme, nur in Kopenhagen detektiert werden. Dort wurde dieser Klon in ca. 92 % der Patienten nachgewiesen (11 von 12 Patienten). Auch der zweithäufigste Klon 4022 konnte nur in Kopenhagen nachgewiesen werden.

Die Klone C40A und 0C2E dagegen, die in Hannover am häufigsten detektiert werden konnten, wurden in Kopenhagen nur in einem bzw. keinem der untersuchten Patienten gefunden.

Bei Betrachtung der Klonhäufigkeit konnte gezeigt werden, dass der dominierende Klon in Hannover (C40A) in ca. 25 % der Patienten detektiert wurde, während der dominierende Klon in Kopenhagen (0688) in 66 % der Patienten nachgewiesen werden konnte. Zur weiteren Bestätigung dieser Ergebnisse wurde errechnet, dass in Hannover durchschnittlich nur 6 % der Patienten von einem gleichen Klon besiedelt wurden, während ein gleicher Klon in Kopenhagen 25 % der Patienten infizierte.

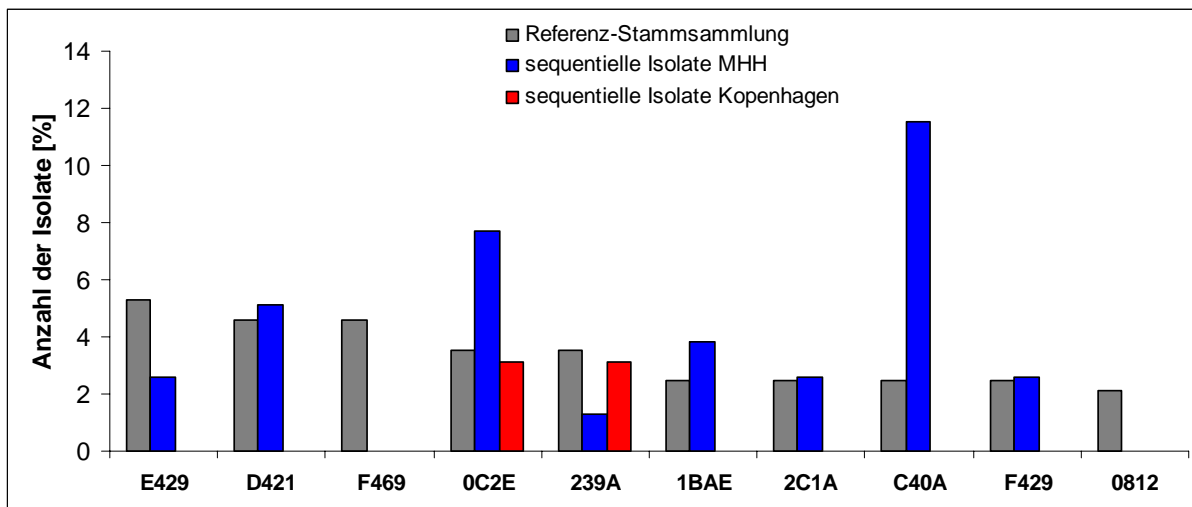


Abb. 4.5.6: Verteilung der Klone bei den sequentiellen Isolaten beider Kliniken im Vergleich mit den 10 häufigsten Klonen der Referenz-Stammsammlung

Beim Vergleich der beiden Langzeitstudien mit der Referenzstammsammlung (siehe Abb. 4.5.6) lässt sich erkennen, dass 8 der 10 global häufigsten Klone auch bei den sequentiellen Isolaten der MHH nachgewiesen werden konnten. Die Klone C40A, 0C2E, 1BAE und der Referenzstamm PA14 (D421) wurden in der Kohorte der MHH überdurchschnittlich oft detektiert. Im Gegensatz zu den Isolaten der MHH wurden bei den sequentiellen Isolaten der Kopenhagener Klinik nur 2 der häufigsten globalen Klone jeweils 1-mal detektiert. Die zwei



an dieser Klinik dominierenden Klone 6822 und 4022 (siehe Tab. 4.5.3) gehörten nicht zu den global häufigsten Klonen.

Diskussion:

Der entscheidende Aspekt des Krankheitsverlaufes bei CF-Patienten ist, dass die meisten Infektionen klonal verlaufen und einzelne CF-Patienten unabhängig voneinander einmalige *P. aeruginosa* Klone aus verschiedenen Quellen der Umwelt erwerben (Jensen et al., 1997; Mahenthiralingam et al. 1996; Pederson et al., 1992; Römling et al., 1994). In einigen früheren Veröffentlichungen wurden bereits verschiedene aggressive und übertragbare *P. aeruginosa* Stämme in Patienten aus verschiedenen CF-Zentren in Europa und Australien nachgewiesen (Anthony et al., 2002; Armstrong et al., 2002; Denton et al., 2002; Fluge et al., 2001; Jones et al., 2001; Ojeniyi et al., 2000; Pedersen et al., 1986, Scott et al., 2004). Einige dieser detektierten Klone wiesen dabei eine höhere Virulenz auf als andere, welches mit einer schlechteren Prognose für den CF-Patienten einherging (Al-Aloul et al., 2004; Armstrong et al., 2002; Nixon et al., 2001; Salunkhe et al., 2005).

Beim Vergleich beider Langzeitstudien mit der global gefächerten Referenzstammsammlung wurde erkennbar, dass die sequentiellen Isolate der MHH ein vergleichbares Spektrum an Klonen aufwiesen wie die Referenzstammsammlung. Global häufige Klone wie der Referenzstamm PA14 (D421) oder der Klon C (C40A) konnten in keiner der analysierten Kopenhagener Sputumproben nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden die zwei dort stark dominierenden Klone 6822 und 0422 weder in der Langzeitstudie der MHH noch der Referenzstammsammlung häufig gefunden. Eine örtlich begrenzte *P. aeruginosa* Gemeinschaft sollte nach der Feldstudie von Pirnay (2002) der einer globalen Population entsprechen. Dies wurde in den vorherigen Analysen, sowohl in der Geschwister- und Zwillingsstudie als auch bei den CF-Patienten aus der Kinderklinik der MHH im Zeitraum um das Jahr 2000, gezeigt. Die Resultate der Langzeitstudie an der MHH spiegelten ebenfalls dieses Bild wider.

Die klonale Diversität innerhalb einer *P. aeruginosa* Population wurde ebenfalls von der Arbeitsgruppe Molin und Kollegen in Kopenhagen untersucht. Einige der dafür zugrunde liegenden Isolate wurden auch für die in dieser Arbeit beschriebenen Analysen verwendet. Bereits während dieser Studie zur molekularen Epidemiologie und Dynamik der *P. aeruginosa* Population in CF-Patienten wurde eine geringere Klondiversität bei Patienten mit einer langzeit-chronischen CF-Infektion beobachtet (Jelsbak et al., 2007). Während von Beginn der CF-Infektion (akute Phase) bis zum Beginn der chronischen Kolonisation eine

hohe Klondiversität nachgewiesen werden konnte, kam es bei langzeit-chronisch besiedelten CF-Patienten zu einer starken Reduzierung der klonalen Vielfalt. In der Kohorte der langzeit-chronisch besiedelten Patienten dominierten die gleichen beiden Klone (6822 und 0422) wie in der hier beschriebenen Untersuchung. Eine Verarmung der klonalen Vielfalt, so wie es die Ergebnisse der Veröffentlichung von Jelsbak et al. (2007) und auch die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, deuten auf einen starken selektiven Vorteil für die dominierenden Klone im Vergleich zu den anderen detektierten klonalen Linien hin. Der genaue Grund für diesen Fitnessvorteil der beiden dominierenden Klone ist bis zum heutigen Zeitpunkt nicht nachgewiesen. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um eine Verknüpfung mehrerer Fähigkeiten, die zusammengenommen einen Wachstumsvorteil bringen. Besitzt ein Klon z.B. die Fähigkeit sich verschiedene Nährstoffquellen nutzbar zu machen, bietet dies einen Vorteil gegenüber solchen Klonen, die diese Fähigkeiten nicht besitzen. Die Toleranz zu verschiedenen Antibiotika spielt ebenfalls eine entscheidende, wenn nicht sogar noch entscheidendere Rolle. Kann sich ein Bakterium schnell an eine neue Therapieform bzw. an ein sich änderndes Antibiotikaspektrum anpassen, bietet auch diese Fähigkeit einen großen Wachstumsvorteil gegenüber anderen Klonen, die diese Fähigkeit nicht besitzen. Ebenfalls beeinflusst natürlich das Immunsystem des Patienten selber, sowie die unterschiedliche Reaktion auf Stressfaktoren das Überleben eines Bakteriums.

Der Einfluss der Antibiotikatherapie auf die klonale Diversität und die daraus resultierenden Unterschiede zwischen der MHH und der Kopenhagener CF-Ambulanz werden in Kapitel 4.5.4 näher analysiert und erläutert.

#### **4.5.2 Klondiversität innerhalb eines Patienten über einen langen Zeitraum der Infektion betrachtet**

Im Folgenden wird veranschaulicht, wie viele verschiedene *P. aeruginosa* Klone in einem Patienten über einen langen Zeitraum der Infektion detektiert werden konnten. Wiederum wurde ebenfalls ein Vergleich beider Kliniken miteinander durchgeführt (siehe Abb. 4.5.7).

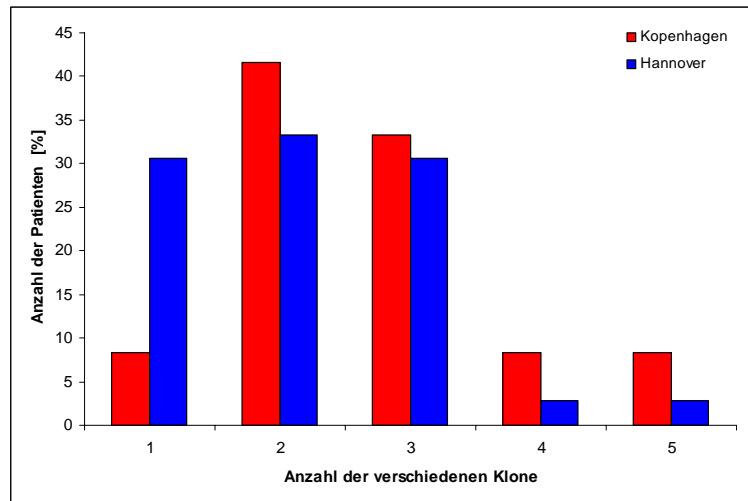


Abb. 4.5.7: Anzahl der detektierten Klone pro Patient im Verlauf der CF-Erkrankung; Vergleich zwischen den beiden Stammsammlungen der Klinik MHH und dem Kopenhagener CF-Zentrum

Beim Vergleich beider Patientenkohorten fällt auf, dass es in beiden Gruppen viele Patienten gab, die mit 2 oder 3 verschiedenen Klonen kolonisiert waren. Nur sehr wenige Patienten trugen dagegen mehr als 4 verschiedene Klone über den Beobachtungszeitraum betrachtet. Die größten Unterschiede ergaben sich in der Gruppe von Patienten, in denen der initial erworbene Klon über den gesamten Zeitraum detektiert werden konnte. Während etwa ein Drittel der Hannoveraner Patienten nur einen Klon aufwiesen, war es in der Kopenhagener Kohorte nur ein Patient. In Hannover gab es zudem drei Patienten (H33, H34 und H35), die nach einer kurzen Kolonisation der Lunge mit *P. aeruginosa* eine vollständige und andauernde Eliminierung des Keims zeigten.

Diese Auswertung lässt allerdings noch keinen Rückschluss darüber zu, ob es sich bei den verschiedenen Klonen, die im Laufe einer Infektion in einem Patienten detektiert wurden, um Koexistenzen oder um Verdrängungsprozesse untereinander handelte. Es stellte sich die Frage, ob die verschiedenen Klone nur nacheinander oder zur gleichen Zeit im Patienten detektiert werden konnten. Hierzu wurde in einem ersten Schritt die Persistenz des initial erworbenen Klons ermittelt und in einem nachfolgenden Schritt die sequentiellen Isolate jedes Patienten auf Ko-Kolonisationen hin überprüft.

### 4.5.3 Untersuchung der Stammsammlungen auf Persistenz des initialen Klon und auf Ko-Kolonisationen

Zur Bestimmung der Persistenz des initialen Klon wurde in allen Langzeitverläufen die Zeitspanne bestimmt, in der der erste erworbene Klon detektiert werden konnte (entweder alleine oder als Ko-Kolonisation mit einem oder mehreren anderen Klonen (Koexistenz)). Wenn der initiale Klon eliminiert wurde, zählte der Zeitpunkt der letzten Detektion.

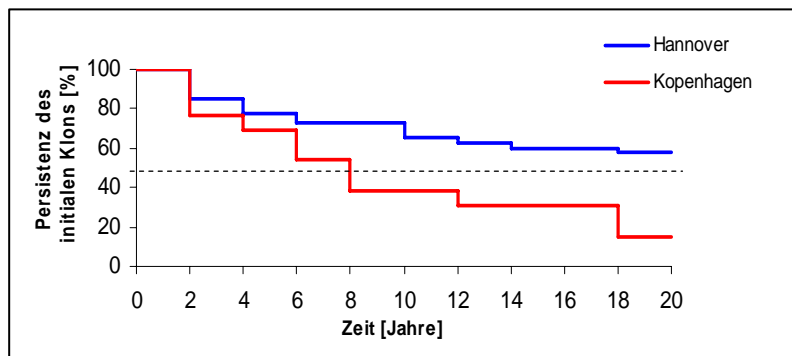


Abb. 4.5.8: Persistenz des initial erworbenen Klon; Vergleich der Kliniken MHH und Kopenhagen

Aus Abb. 4.5.8 lässt sich erkennen, dass in den Isolaten der Patienten aus Hannover die initial erworbenen Klone sehr lange detektiert werden konnten. In den Isolaten aus Kopenhagen dagegen, war die Persistenz des erst erworbenen Klon stark verkürzt. Nach ca. 8 Jahren Kolonisation konnten nur noch 50 % dieser Klone detektiert werden. Im direkten Vergleich dazu, wurden nach dieser Kolonisationszeit in Hannover noch ca. 70 % der initialen Klone nachgewiesen. Am Ende des beobachteten Zeitraums kolonisierte in Kopenhagen nur noch ein initialer Klon die Lunge eines CF-Patienten, während in Hannover noch etwa 60 % der initialen Klone detektiert werden konnten.

Zur Beurteilung der möglichen Ko-Kolonisationen wurde der gesamte Beobachtungszeitraum in Abschnitte von 2 Jahren untergliedert und die Anzahl gleichzeitig vorkommender Klone im jeweiligen Zeitabschnitt pro Patient bestimmt.

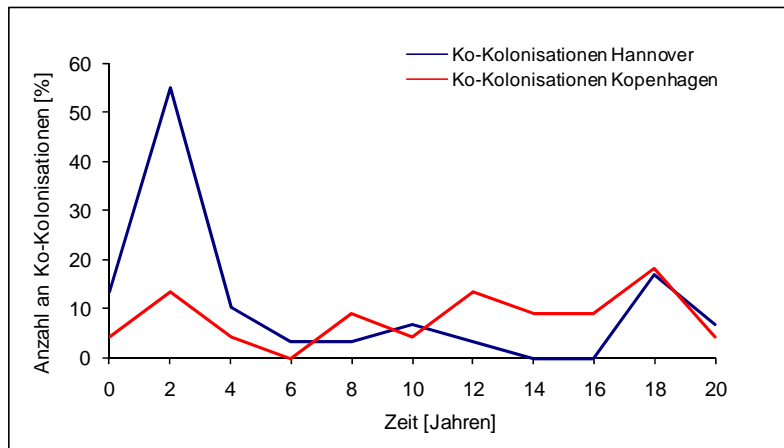


Abb. 4.5.9: Anzahl und Dauer von *P. aeruginosa* Ko-Kolonisationen in den sequentiellen Isolaten der MHH und des CF-Zentrums in Kopenhagen

Bei Betrachtung der Abb. 4.5.9 wurden weitere Unterschiede zwischen den Isolaten aus der MHH und der Kopenhagener Klinik sichtbar. Neben den schon beschriebenen Unterschieden in der Klonvielfalt und der Persistenz ergaben sich auch in der Häufigkeit detektierter Ko-Kolonisationen große Unterschiede zwischen beiden Patientenkohorten. Während Ko-Kolonisationen in den Kopenhagener Isolaten über den gesamten Zeitraum mehr oder weniger gleichmäßig verteilt detektiert werden konnten, wurde bei den Isolaten aus der MHH ein Ko-Kolonisationsmaximum festgestellt. Im zweiten Jahr der Infektion der CF-Patienten mit *P. aeruginosa* wurden mit etwa 57 % die meisten Ko-Besiedlungen während des gesamten Zeitraums detektiert. Danach nahm die Anzahl der Ko-Kolonisationen bis auf 5-8 % ab. Ein Anstieg nach 16 Jahren Besiedelung ließ sich alleine bei einem Patienten feststellen. Die Lunge dieses Patienten war über einen sehr langen Zeitraum mit dem Klon C besiedelt, nur zu einem Zeitpunkt konnte ein weiterer Klon (0832) nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.5.10). Nach etwa 16-17 Jahren Kolonisation kam es dann zu einer Ko-Kolonisation mit 3 weiteren Klonen.

Klon	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	
C40A	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
0832		x																			
D421																			x	x	x
741A																				x	x
0C2A																				x	

Abb. 4.5.10: Genotypisierungsergebnisse der sequentiellen Isolate eines Patienten

Diskussion:

Da in den Hannoveraner Isolaten das Maximum der Ko-Kolonisationen zu einem sehr frühen Zeitpunkt innerhalb der Besiedelung detektiert wurde und gleichzeitig auch stark zeitlich eingegrenzt werden konnte, könnte es sein, dass der initiale Klon von einem neuen Klon verdrängt wird. Dieser neue Klon müsste dafür die gleiche Nische besetzen wie der initiale Klon und gleichzeitig einen selektiven Vorteil ihm gegenüber aufweisen. Diese Erklärung widerspricht aber dem Ergebnis aus der Persistenzbestimmung. Hier konnte gezeigt werden, dass die initialen Klone in der Hannoveraner Klinik sehr lange in der Lunge des jeweiligen CF-Patienten persistierten. Über 60 % der Patienten wiesen auch zum Ende des Beobachtungszeitraums von 20 Jahren noch den initialen Klon auf. Aufgrund dieses Ergebnisses war es wahrscheinlicher, dass sich der neue Klon nicht gegen den initialen Klon durchsetzen konnte. Ein neuer Klon gelangte in die CF-Lunge und besiedelte die gleiche Nische wie der initiale Klon. Dieser war allerdings durch die längere Kolonisationszeit schon besser angepasst und besaß somit einen selektiven Wachstumsvorteil. Ein Verdrängungsvorgang, bei dem in den meisten Fällen der initiale, besser adaptierte Klon in der Lunge zurückblieb, war die Folge.

In den Isolaten von Kopenhagen dagegen konnten mehrere Klone nebeneinander über den gesamten Beobachtungszeitraum detektiert werden. Somit war die Dauer der Ko-Kolonisation nicht, wie bei den Isolaten aus Hannover, nur auf einen kurzen Zeitraum beschränkt. Bei der Persistenzbestimmung allerdings ergab sich, dass sich hier die initialen Klone nicht so gut durchgesetzt haben wie es in Hannover der Fall war. Nach etwa 8 Jahren wurden nur noch 50 % der ursprünglich erstbesiedelnden Klone detektiert. Es scheint, dass die initialen Klone durch andere, besser adaptierende Klone verdrängt wurden und dass diese wiederum sehr lange die Lunge der CF-Patienten kolonisierten.

Zur besseren Veranschaulichung dieser Ergebnisse wurde eine Abbildung erstellt, in der die *P. aeruginosa* Besiedelung mit den unterschiedlichen Klonen in den zeitlichen Verlauf der Infektion eingeordnet wurde. Aus der Abb. 4.5.11 wird erkennbar, wann welche Klone detektiert wurden, wo es zu Ko-Kolonisationen kam und welche Klone sich letztendlich in der CF-Lunge durchsetzten.

Die einzelnen detektierten Klone wurden in die Spalte des Jahres eingetragen, in dem sie detektiert worden waren. Dabei bekamen die gleichen Klone auch identische Farben. Konnten mehrere Klone zur gleichen Zeit detektiert werden, wurden beide eingetragen. Farblich differenziert dargestellt wurden für die Hannoveraner Isolate die acht häufigsten Klone, alle anderen wurden in Grau dargestellt. Für Kopenhagen wurden aufgrund der reduzierten

Klonvielfalt nur die vier häufigsten Klone farblich markiert, bei allen anderen handelte es sich um sehr selten oder sogar einmalig vorkommende Klone, die in der nachfolgenden Abbildung in Grau dargestellt wurden.

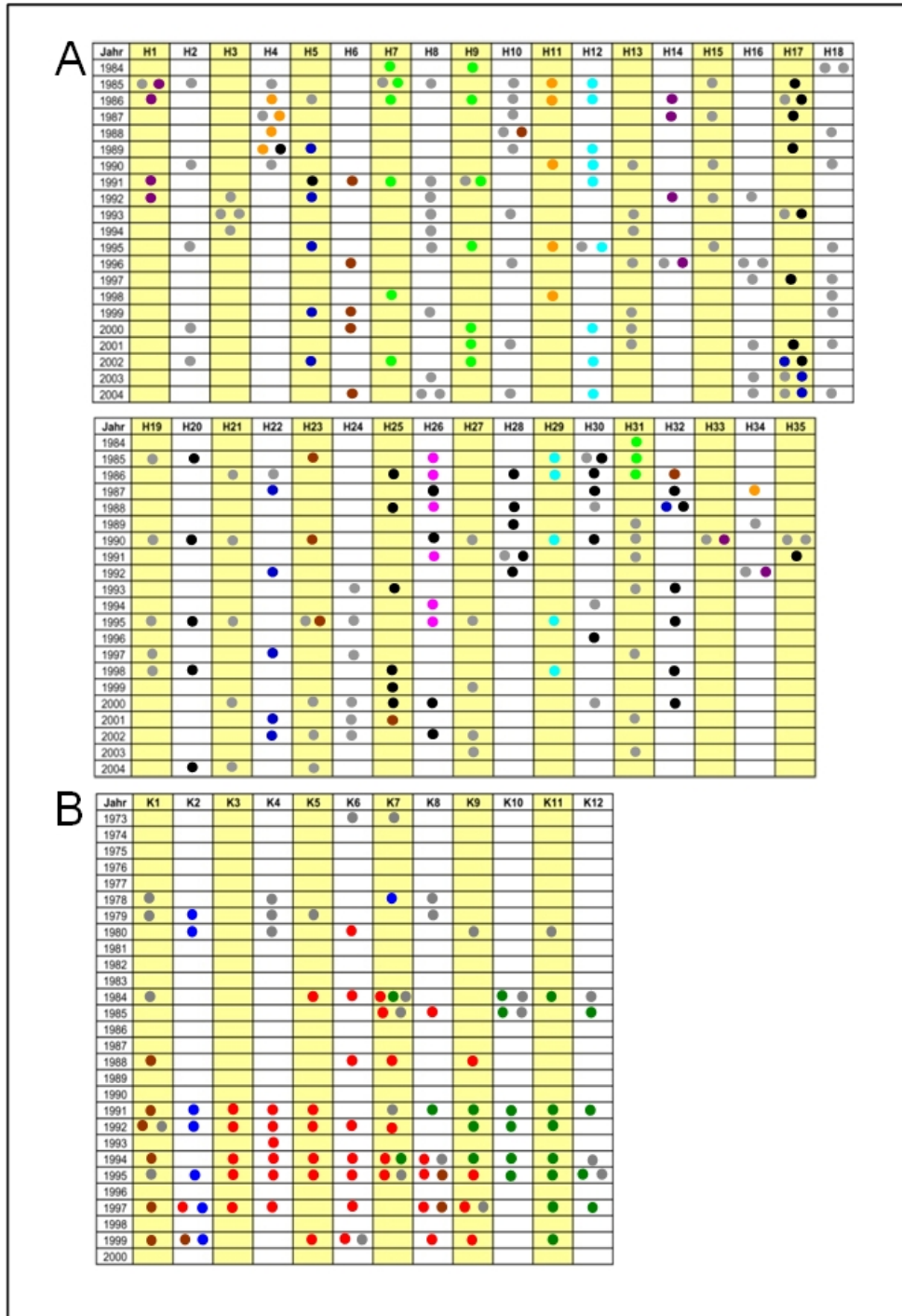


Abb. 4.5.11: Zeitliche Darstellung der *P. aeruginosa* Besiedelung in den CF-Patienten aus Hannover und Kopenhagen; A u. B: Isolate aus den Patienten der MHH, farblich dargestellt werden die 8 häufigsten Klone, andere in Grau; C: Isolate aus den Patienten des CF-Zentrums Kopenhagen, farblich dargestellt werden die 4 häufigsten Klone, alle anderen in Grau

Durch die graphische Darstellung der klonalen Diversität, der Persistenz und den eventuell vorhandenen Ko-Kolonisationen wurden die zuvor beschriebenen Hypothesen bestätigt. Es lässt sich erkennen, dass die überwiegende Zahl der initialen Klone in den Hannoveraner Isolaten über den gesamten Zeitraum persistierten und zwischenzeitlich neu besiedelnde Klone verdrängten, so dass die Ko-Kolonisationszeit in den meisten Fällen recht kurz war.

Mit Hilfe der graphischen Betrachtung des Infektionsverlaufes der Kopenhagener CF-Patienten lassen sich die dort stattgefundenen Vorgänge sehr gut verdeutlichen.

Es lässt sich erkennen, dass zu Beginn der Kolonisation mit *P. aeruginosa* die meisten CF-Patienten der Kopenhagener CF-Klinik sehr seltene oder sogar einmalige Klone aufwiesen. Seit Beginn der 80-iger Jahre wurden im CF-Zentrum Kopenhagen die CF-Patienten einer sehr frühen und aggressiven Antibiotikatherapie unterzogen, um eine chronische Besiedelung und die damit einhergehende Adaptation des Bakteriums an die CF-Lunge zu verhindern. Es gab schon damals Veröffentlichungen, die auf eine mögliche Kreuzinfektion zwischen verschiedenen Patienten hinwiesen (Pedersen et al., 1986). In Folge dessen, kam es in den 80-iger Jahren zu einer Isolation während der stationären iv-Therapie (Hoiby et al., 1995), um mögliche Kreuzinfektionen zu minimieren. Die in dieser Arbeit untersuchte Patientenkohorte aus Kopenhagen, gehörte zu einer solchen isolierten Patientengruppe. Zu diesem Zeitpunkt wurde der in dieser Kohorte insgesamt stark dominierende Klon 0822 (rot) das erste Mal im Patienten K6 detektiert, breitete sich von dort auf sieben weitere Patienten aus und führte schließlich in vielen der CF-Patienten zu einer Verdrängung der initialen Klone. Ende der 90-iger Jahre, waren schließlich die meisten der untersuchten Kopenhagener CF-Patienten mit diesem Klon kolonisiert. Der neue Klon schien im Vergleich zu den initialen Klonen und auch zu den später detektierten Klonen einen starken selektiven Vorteil aufzuweisen. Dieser Vorteil könnte darauf beruhen, dass sie sich besser und schneller an starken Antibiotikastress anpassen können. Diese Hypothese wird im nachfolgenden Kapitel durch das Einbeziehen der unterschiedlichen Therapieformen näher analysiert und überprüft. Ähnliches war auch mit dem zweithäufigsten Klon 0422 (grün) erkennbar. Auch hier kam es zu einer Übertragung des Klons auf andere CF-Patienten.

Vergleicht man insgesamt die Sterblichkeit der Patienten bzw. die Zahl an Lungentransplantationen zwischen Hannover und Kopenhagen, traten hier große Unterschiede auf. In Hannover verstarben 10 der 35 untersuchten Patienten (ca. 30 %) entweder vor bzw. nach einer Lungentransplantation oder an einem bösartigen Tumor. In Kopenhagen dagegen verstarb zwar nur ein Patient, es wurden aber 6 weitere Patienten lungentransplantiert. Geht man davon aus, dass die Patienten aufgrund ihres schlechten Gesundheitszustands



transplantiert wurden, zeigten somit insgesamt 7 der 12 Patienten einen sehr schweren Verlauf der Infektion (ca. 60 %). Die beiden dominanten Klone in Kopenhagen scheinen demnach mit einem schweren Krankheitsverlauf assoziiert zu sein.

Bereits in der Veröffentlichung von Jelsbak et al. (2007) wurde die Übertragbarkeit dieser beiden dominanten Klone von Patient zu Patient gezeigt. Auch in Hannover konnte bereits ein Fall einer eindeutigen Kreuzinfektion, also einer Übertragung von einem CF-Patienten auf einen anderen, mit Hilfe der Genotypisierung durch den AT-Chip bewiesen werden. In Abb. 4.5.12 lässt sich erkennen, dass Patient 1 schon seit einiger Zeit mit einem spezifischen seltenen Klon besiedelt war. Patient 2 war zu Beginn der Beobachtung frei von *Pseudomonas*. Am 05.08.02 kam es zu einem Treffen der beiden Patienten in der CF-Ambulanz. Nur 4 Tage später konnte in der MHH bei einer Kontrolle der gleiche Klon, der den Patienten 1 kolonisierte, auch bei Patient 2 detektiert werden. Es hatte also innerhalb einer sehr kurzen Infektionszeit eine Kreuzinfektion stattgefunden. Die nachfolgende Antibiotikatherapie brachte bei Patient 2 eine Elimination des Klons, so dass dieser anschließend wieder frei von *P. aeruginosa* war. Etwas später wurde auch der Klon aus der Lunge des Patienten 1 eliminiert.

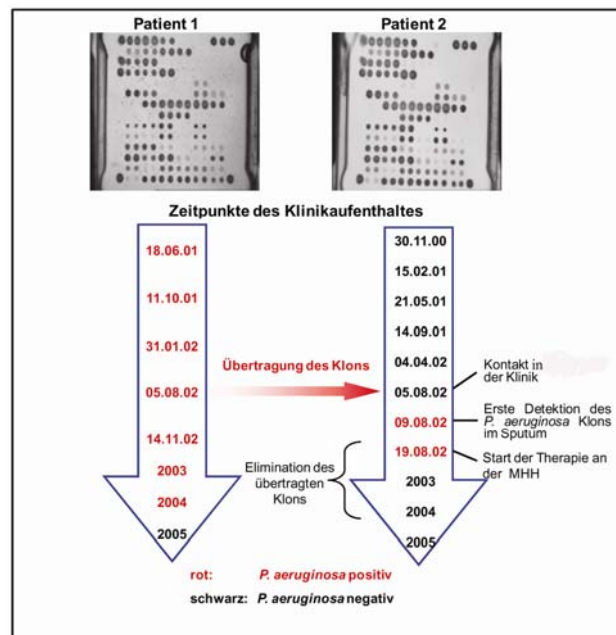


Abb. 4.5.12: Übertragung eines *P. aeruginosa* Klons von einem auf einen anderen CF-Patienten

Durch die Verbreitung der beiden dominanten Klone in der CF-Patienten Kohorte aus Kopenhagen und durch den hier beschriebenen Fall von zwei CF-Patienten, die an der MHH in Behandlung standen, wurde eindeutig die Übertragbarkeit von *P. aeruginosa* auf andere Patienten gezeigt und damit einige Veröffentlichungen bestätigt (Pedersen et al., 1986;

Tümmler et al., 1991; Goldmann et al., 1997; Farrell et al., 1997; Jones et al., 2001) sowie einige andere widerlegt (Speert et al., 1982,87; Tubbs et al., 2001).

#### **4.5.4 Auswertung der verschiedenen Therapieformen im Zusammenhang mit der Detektion von verschiedenen *P. aeruginosa* Klonen**

Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede in der Klondiversität, der Persistenz oder auch der Art und Dauer von Ko-Kolonisationen könnte in den unterschiedlichen Therapieformen beider Patientenkohorten liegen. Aus diesem Grund wurden die Art und die Häufigkeit der einzelnen Antibiotikatherapien jedes Patienten analysiert und anschließend die Therapieform beider Kliniken miteinander verglichen. Dazu wurden die verwendeten Antibiotika in verschiedene Gruppen eingeordnet und anschließend bestimmt, wie häufig ein Patient im Jahr mit den verschiedenen Antibiotika therapiert worden war. Die detaillierte Auflistung der verschiedenen Antibiotikatherapien beider Patientenkohorten befindet sich auf der beigefügten CD (Datei Antibiotikatherapie Hannover-Kopenhagen.xls).

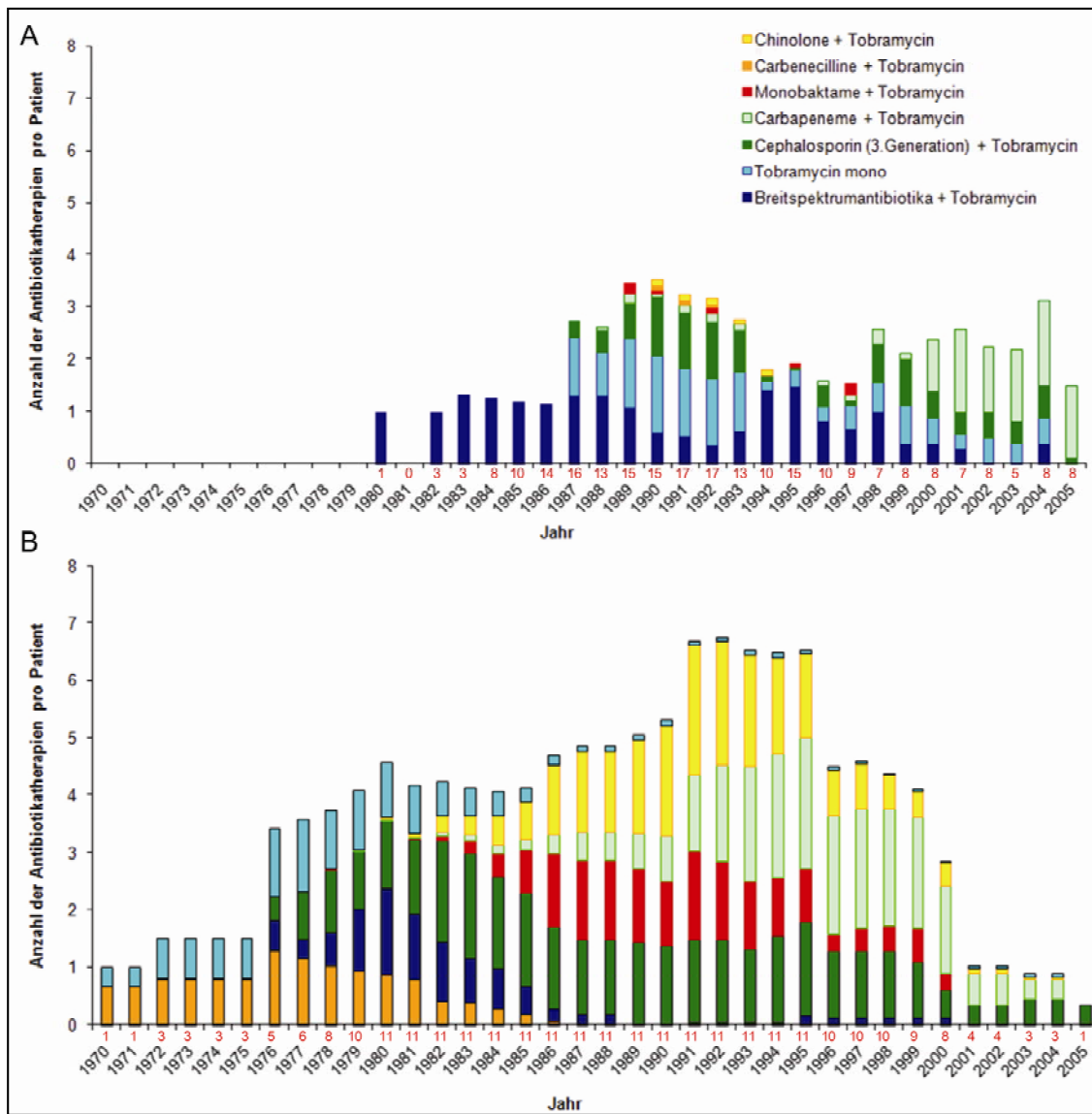


Abb. 4.5.13: Art und Verteilung der Antibiotikatherapie der einzelnen CF-Patienten beider Kohorten; A: Therapie der Patienten aus Hannover; B: Therapie der Patienten aus Kopenhagen; in Rot über den Jahreszahlen die Anzahl der Patienten, die in dem jeweiligen Jahr eine iv-Therapie erhielten

Im Vergleich beider Kliniken lassen sich bezogen auf die Art und die Häufigkeit der Therapie mit Antibiotika schon bei der ersten Betrachtung große Unterschiede erkennen (siehe Abb. 4.5.13).

In der MHH wurden die meisten Therapien bis zum Ende der 80-iger Jahre mit einem Breitspektrumantibiotikum in Kombination mit Tobramycin durchgeführt. Von 1987-1993 wurden die Patienten auch mit einer Monotherapie Tobramycin behandelt. Zur gleichen Zeit wurde auch vermehrt Cephalosporin als Therapeutikum zusammen mit Tobramycin eingesetzt. Die Therapie mit Carbapenemen begann im Jahr 1989 und wurde ab dem Jahr 2000 als hauptsächliches Antibiotikum in Kombination mit Tobramycin verabreicht. Andere Antibiotikakombinationen sowie Monobactame, Carbenecilline oder Chinolone jeweils

zusammen mit Tobramycin kamen kaum zum Einsatz. Es konnten nur sehr wenige Therapien mit diesen Antibiotika in den 90-iger Jahren nachgewiesen werden.

In Kopenhagen dagegen wurden alle bekannten Antibiotikatherapien angewendet. Es lassen sich sehr deutlich die Wellenbewegungen in der Therapieform erkennen. Die Maxima der verschiedenen Antibiotikatherapien wurden zeitversetzt detektiert. Bis zur Mitte der 90-iger Jahre konnte ein Anstieg der Therapiehäufigkeit festgestellt werden. Danach kam es zu einer starken Reduzierung der Therapiezahl pro Patient und Jahr. Während jeder Patient 1995 noch etwa 6-7 Therapien erhielt, war es im Jahr 2000 nur noch eine.

Die Therapie der CF-Patienten Kohorte in Kopenhagen begann zu Beginn der 70-iger Jahre mit dem Antibiotikum Carbenecillin in Kombination mit Tobramycin oder Tobramycin alleine. Diese Therapieform erreichte Mitte der 70-iger Jahre ihr Maximum und nahm im Verlauf der nachfolgenden 10 Jahre ab. 1986 wurde die letzte Therapie dieser Form durchgeführt. Die Monotherapie mit Tobramycin wurde ab 1985 nur noch in sehr seltenen Fällen eingesetzt. Ab Mitte der 70-iger Jahre begann dagegen verstärkt die Therapie mit Breitspektrumantibiotika und Cephalosporinen. Während die meisten Therapien mit einem Breitspektrumantibiotikum 1980 durchgeführt wurden und danach nur noch bis etwa 1988 als Therapien eingesetzt wurden, gewann die Therapie mit Cephalosporinen weiter an Bedeutung. Erst zu Beginn des Jahres 2000 wurde die Anzahl dieser Therapieform minimiert. 1982 begannen auch Therapien mit den Antibiotika Monobaktame, Carbapeneme und Chinolone jeweils in Kombination mit Tobramycin. Monobaktame und auch Chinolone wurden allerdings nur bis zum Jahr 2000 eingesetzt, während Therapien mit Carbapeneme bis zum Ende des Beobachtungszeitraums immer noch verwendet wurden.

Bei der Betrachtung der absoluten Anzahl der Antibiotikatherapien pro Patient und Jahr wird deutlich, dass die Klinik in Kopenhagen viel mehr Therapien durchführte als die MHH. Die Klinik in Hannover wies das Maximum Ende der 80-iger, Anfang der 90-iger Jahre mit etwa 4 Therapien pro Patient und Jahr auf. In Kopenhagen dagegen wurden Mitte der 90-iger Jahre etwa 7, somit etwa fast doppelt so viele Therapien pro Jahr und Patient durchgeführt.

#### Diskussion:

Während in Hannover in den meisten Fällen ein Antibiotikum bzw. eine Kombinationstherapie aus zwei verschiedenen Antibiotika zur gleichen Zeit verabreicht wurde, fand in Kopenhagen eine sehr intensive Antibiotikatherapie mit mehreren verschiedenen Antibiotika zur gleichen Zeit statt. Vergleicht man die Entwicklung neuer Antibiotika für die CF-Behandlung mit der Einführung dieser neuen Therapieform, lässt sich

erkennen, dass die Klinik in Kopenhagen schon kurz nach Markteinführung des neuen Medikaments die Therapie auf dieses neue Antibiotikum ein- bzw. umstellte. In der CF-Ambulanz Hannover wurden einige neue Medikamente zeitverzögert und andere gar nicht für die Therapie herangezogen. In der Literatur wurde beschrieben, dass eine frühe aggressive Antibiotikatherapie eine chronische Besiedelung der CF-Patienten mit *P. aeruginosa* verhindert und somit keine Anpassung des Bakteriums an die Lunge mehr stattfinden kann (Smith et al., 2006). Die Kopenhagener Klinik reagierte auf diese Ergebnisse, wie in den Analysen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, mit einer äußerst aggressiven Antibiotikatherapie. Dabei wurden neue Medikamente als Chance betrachtet, noch effektiver gegen eine Besiedelung mit *Pseudomonas* vorzugehen. Schon vor der chronischen Besiedelung der CF-Lunge mit *Pseudomonas* wurde eine tägliche inhalative Antibiotikatherapie durchgeführt. In Hannover fand eine solche Behandlung erst nach chronischer Besiedelung mit *P. aeruginosa* statt.

Weitere Nachforschungen, die in den gleichen Zusammenhang eingeordnet werden konnten, ergaben, dass in Kopenhagen in der Regel keine ambulanten Therapien durchgeführt wurden, während in Hannover gerade bei Kindern die Therapie im häuslichen Umfeld bevorzugt wurde und auch noch wird.

Die äußerst aggressive Antibiotikatherapie führte wahrscheinlich letztendlich auch zu der stark reduzierten Klonvielfalt. Die beiden dominierenden Klone haben sich besser auf die Variabilität der Antibiotika und den daraus hervorgehenden starken Antibiotikastress angepasst als die anderen detektierten Klone. In einigen Veröffentlichungen wurde ein Zusammenhang zwischen der Adaptation der *Pseudomonas* an eine heterogene, sich ändernde Umwelt und dem Auftreten von Hypermutatoren hergestellt (Taddei et al., 1997; Sniegowski et al., 1997; Tenaillon et al., 1999). Hypermutatoren haben laut Foweraker (2009) durch die Eigenschaft der schnellen Anpassung an sich ändernde Umgebungen den Vorteil, in einer ökologischen Nische (in diesem Fall der CF-Lunge) unter Antibiotikastress zu überleben. Die Überprüfung der Isolate auf Hypermutatoren ergab allerdings keinen direkten Zusammenhang zwischen starkem Antibiotikastress und dem Auftreten von Hypermutatoren. Diese konnten sowohl in einigen frühen Isolaten als auch in Isolaten der chronischen Besiedelung nachgewiesen werden (vergleiche auch Kenna et al., 2007). Nicht alle Isolate, in denen einer der beiden dominanten Klone nachgewiesen wurde, zeigten Hypermutatoren. Die dominanten Klone benötigen in diesem Fall dementsprechend keine Hypermutation, um sich an die Umgebung anzupassen.

### 4.5.5 Populationsstruktur der sequentiellen Isolate beider Kliniken unter Berücksichtigung des klinischen Verlaufs

In der nachfolgenden Auswertung wurde eine Populationsstruktur entwickelt, in der die verschiedenen Klone der einzelnen Patienten unter Berücksichtigung des klinischen Verlaufs eingetragen wurden. Als Datengrundlage dienten hier die Genotypisierung der Referenzstammsammlung und der sequentiellen Isolate beider Stammsammlungen.

In Grün wurden die Patienten der MHH dargestellt, die auch am Ende des Beobachtungszeitraums noch lebten, in Rot, die Patienten der MHH, die während des Beobachtungszeitraums verstorben sind (vor oder nach einer Lungentransplantation). In Blau wurden die noch lebenden Kopenhagener Patienten gekennzeichnet und in Pink, die Patienten aus Kopenhagen, die während des Beobachtungszeitraums verstorben waren oder lungentransplantiert wurden. In fetter Schrift dargestellt werden Klone, die länger als ein Jahr in der Lunge persistierten, während intermittierende Klone (< 1 Jahr) kursiv geschrieben wurden.

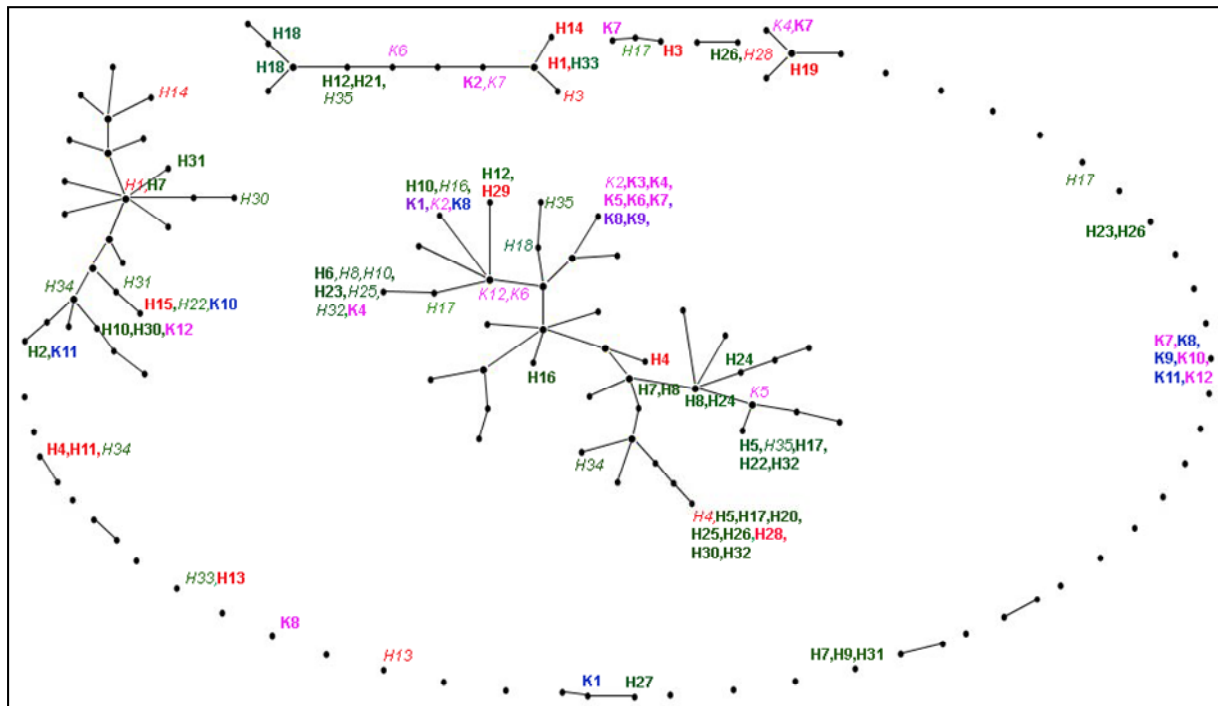


Abb. 4.5.14: Populationsstruktur der Referenzstammsammlung und der Langzeitverläufe beider Patientenkohorten (MHH und Kopenhagen); grün = Hannoveraner Patienten, die am Ende des Beobachtungszeitraums noch lebten, rot = verstorbene (vor oder nach einer Lungentransplantation) Patienten aus Hannover, blau = noch lebende Kopenhagener Patienten, pink = verstorbene oder lungentransplantierte Patienten aus Kopenhagen, fette Schrift = Klone, die länger als ein Jahr in der Lunge persistierten, kursiv = intermittierende Klone (< 1 Jahr)

Bei Betrachtung der Klone in Hannover in Abb. 4.5.14 wird erkennbar, dass sich die verschiedenen Klone der überlebenden Patienten über den gesamten Baum verteilten. Es gab einige dominante Klone und viele Einzelklone. Nur wenige der detektierten Klone konnten nicht mit den anderen Klonen verknüpft werden. Die Klone, die die Lungen der später verstorbenen Patienten besiedelten, konnten dagegen überwiegend bei den nichtverbundenen Klonen nachgewiesen werden, nur wenige ließen sich in einen der beiden größeren klonalen Komplexe einordnen. Die Verteilung der persistierenden und intermittierenden Klone dieser Patientenkohorte war vergleichbar.

Die zwei dominanten Klone aus dem CF-Zentrum Kopenhagen wurden sowohl bei den später verstorbenen als auch bei den überlebenden Patienten nachgewiesen. Zwischen diesen beiden Patientengruppen konnten keine Unterschiede in der Verteilung der Klone entdeckt werden. Es fiel auf, dass der kleinere der beiden großen klonalen Komplexe kaum durch die Kopenhagener Klone abgedeckt wurde.

#### Diskussion:

Aus dem Stammbaum lässt sich erkennen, dass die Klone aus Hannover, die sich auf einen der beiden größeren klonalen Komplexen befanden (häufig dominierende Klone) statistisch signifikant mit einem milderem Krankheitsverlauf assoziiert waren (nach Fisher-Test  $p = 0,015$  für alle Hannoveraner Klone und  $p = 0,047$  für die persistierenden Klone). Die Klone in Hannover, die mit einem schweren Verlauf assoziiert waren, wurden überwiegend bei den Einzelklonen, die nicht untereinander verbunden waren, nachgewiesen. In den meisten Fällen, in denen der persistierende Klon eines Patienten mit einem schweren Krankheitsverlauf auch in einem Patienten mit mildem Verlauf detektiert wurde, war dieser dort nur intermittierend detektierbar. Dieser eventuell mit schwererem Verlauf assoziierte Klon wurde im Weiteren durch einen anderen Klon verdrängt. Da in Kopenhagen durch die intensive und aggressive Antibiotikatherapie eine Selektion auf zwei stark dominierende Klone stattgefunden hat, konnte hier keine Assoziation zwischen Klon und Krankheitsverlauf des CF-Patienten nachgewiesen werden.

Weiterführende Auswertungen der klinischen Daten aus Hannover, in denen die Lungenfunktionswerte der einzelnen Patienten über den Verlauf der Erkrankung mit einem eventuellem Klonwechsel abgeglichen wurden, zeigten allerdings keine Assoziation zwischen einem Klonwechsel und einer Veränderung im klinischen Verlauf einer CF-Erkrankung (Abfall oder Anstieg in der Lungenfunktion).

Es besteht somit eine Korrelation zwischen dem klinischen Verlauf eines Patienten und der ständigen Weiterentwicklung der *Pseudomonas* sensitiven Chemotherapie sowie der weiteren Optimierung vorhandener Therapieprogramme, dem individuellen Immunsystem und natürlich dem sozialen Umfeld. Es scheint aber auch eine Assoziation zwischen dem Klon selbst und dem Krankheitsverlauf eines CF-Patienten zu geben.

#### **4.5.6 Adaptive Radiation in sequentiellen Isolaten aus Patienten mit cystischer Fibrose**

Der Begriff adaptive Radiation beinhaltet die schnelle evolutionäre Auffächerung (Radiation) einer wenig spezialisierten Art durch die Bildung einer hohen morphologischen und ökologischen Diversität, bedingt durch die herrschenden Umweltbedingungen. Es kommt dabei durch die Ausbildung neuer, nützlicher Fähigkeiten zu einer Anpassung (Adaptation) der Phänotypen an verschiedene ökologische Nischen. Die Triebkraft dieses Vorgangs ist die natürliche Selektion.

Eine solche Adaptation lässt sich auch im Laufe der CF-Erkrankung bei *P. aeruginosa* nachweisen. Bereits aus der Literatur ist bekannt, dass es während einer chronischen Infektion der CF-Patienten durch die Entstehung vieler genetischer Variationen zu einer Selektion unterschiedlicher *P. aeruginosa* Phänotypen kommt (Luzar et al., 1985; Deretic et al 1995; Barth & Pitt, 1996; Oliver et al., 2000). Diese Veränderungen werden zum einen durch das angeborene Immunsystem des jeweiligen Patienten, zum anderen durch den herrschenden Antibiotikastress während der Therapie und durch das Wachstum in einer mikroaerophilen/anaeroben Umgebung ausgelöst (Worlitzsch et al., 2002; Ratjen & Döring, 2003).

Durch die Langzeitstudien war es zum ersten Mal möglich, die fortlaufende Besiedelung mit *P. aeruginosa* über die gesamte Infektionszeit zu verfolgen und genetische Veränderungen im akzessorischen Genom zu dokumentieren.

Bei solchen evolutionären Vorgängen handelt es sich um eine Anpassung an das Habitat Lunge eines CF-Erkrankten. Der Vorgang einer solchen Mikroevolution wird in diesem Zusammenhang Radiation genannt. Adaptive Radiation ist immer dann möglich, wenn eine Population die Gelegenheit hat, neue Nischen zu besiedeln, d.h. wenn in einem Areal, in diesem Fall der Lunge, noch Nischen frei sind, welche eine Art aufgrund ihrer genetischen Variabilität ausfüllen könnte. Somit entstehen verschiedene klonale Varianten.



Zur Beurteilung der adaptiven Radiation in den detektierten Klonen wurde die Anzahl der veränderten Gene im akzessorischen Genom eines Klons ermittelt. Patienten, deren Klone keine Radiation bzw. nur Veränderungen in einem Gen aufwiesen, wurden in die Kategorie „keine Radiation“, die mit weniger als 7 veränderten Genen in die Kategorie „geringe Radiation“ und die Klone mit mehr Änderungen in die Gruppe der „hohen Radiation“ eingeordnet (siehe Tab. 4.5.4).

Abb. 4.5.15 zeigt zur besseren Veranschaulichung jeweils ein Beispiel für die 3 verschiedenen Kategorien.

Patient	Datum	ipvA type I	ipvA type II a	ipvA type II b	ipvA type III	iprB	LES	PA0636	PA0722	PA0728	PA2185	PA2221	PA3835	file-stand	orfA	orfJ	PA0980	XF1753	Acetyl-Transf.	ipKL-1	ipKL-3	TB-C47-1	TB-C47-2	PAP11-PHIC-hsp.	PAP11-LUBPt.	ipKL-C-cons.typosh.	ipKL-C-Adhesin	ipKL-C-metabol.	PAG3/3-4	PAG3/3-5	PAG3/3-6	C45	C46	C47	PAG3/2-1	PAG3/3-1	PAG3/3-8	(IRNA (pro)-Island-1	(IRNA (pro)-Island-2	PAG3-1							
<b>Keine Radiation</b>	H14	1986	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1			
	H14	1986	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	
	H14	1987	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	
	H14	1989	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	
	H14	1989	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	
	H14	1996	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	
	H14	1996	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	
<b>Geringe Radiation</b>	H10	1985	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
	H10	1986	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	H10	1987	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	H10	1988	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	H10	1989	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	H10	1993	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	H10	1994	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	H10	1996	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	H10	1999	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H10	1999	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>Hohe Radiation</b>	H6	1991	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	H6	1991	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	H6	1996	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	H6	1999	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	H6	2000	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	H6	2004	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	H6	2004	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Abb. 4.5.15: Beispiel für keine, geringe und hohe Radiation

Die Anzahl genetischer Veränderungen wurde zudem mit dem klinischen Verlauf des jeweiligen Patienten verglichen.

Tab. 4.5.4: Einteilung der Patientenisolat in die Kategorien „keine“, „geringe“ und „hohe Radiation“; in klammern hinter den Patientenabkürzungen steht die Anzahl der Änderungen; A: Hannoveraner Patienten; B: Kopenhagener Patienten

<b>A</b>	überlebende Patienten	verstorbene Patienten	<b>B</b>	überlebende Patienten	lungentransplantierte/ verstorbene Patienten
keine Radiation	H2, H22, H23, H27, H30, H33, H34, H35	H1, H4, H14, H15	keine Radiation	K1, K10	K7
„geringe“ Radiation	H5 (7), H7 (2), H8 (6), H9 (2), H10 (4), H12 (4), H20 (3), H21 (2), H26 (5), H31 (2)	H3 (6), H11 (3), H13 (2), H19 (6), H28 (3) H29 (3)	„geringe“ Radiation	K11 (3)	K2 (2), K6 (5)
„hohe“ Radiation	H5 (7), H6 (11), H16 (9), H17 (12), H18 (7), H24 (14), H25 (9)		„hohe“ Radiation	K8 (9), K9 (10)	K3 (11), K4 (7), K5 (7), K6 (5)

Bei Betrachtung der Auswertung (siehe Tab. 4.5.4 und Abb. 4.5.16) lässt sich erkennen, dass die Hannoveraner Klone mit „geringer“ oder „keiner Radiation“ sowohl in den Patienten, die während des Beobachtungszeitraums verstarben, als auch in den Patienten, die am Ende des Beobachtungszeitraums noch lebten, detektiert wurden. Dagegen konnten Klone mit einer „hohen Radiation“, demnach mit einer größeren Veränderung im Geninselnbereich, nur in den noch lebenden Patienten nachgewiesen werden. Keiner der später verstorbenen Patienten war mit einem Klon, der eine „hohe Radiation“ aufwies, kolonisiert.

In Kopenhagen dagegen ließen sich Klone mit „keiner/geringer“ und „hoher Radiation“ in beiden Patientengruppen, den Lebenden und den Verstorbenen, detektieren.

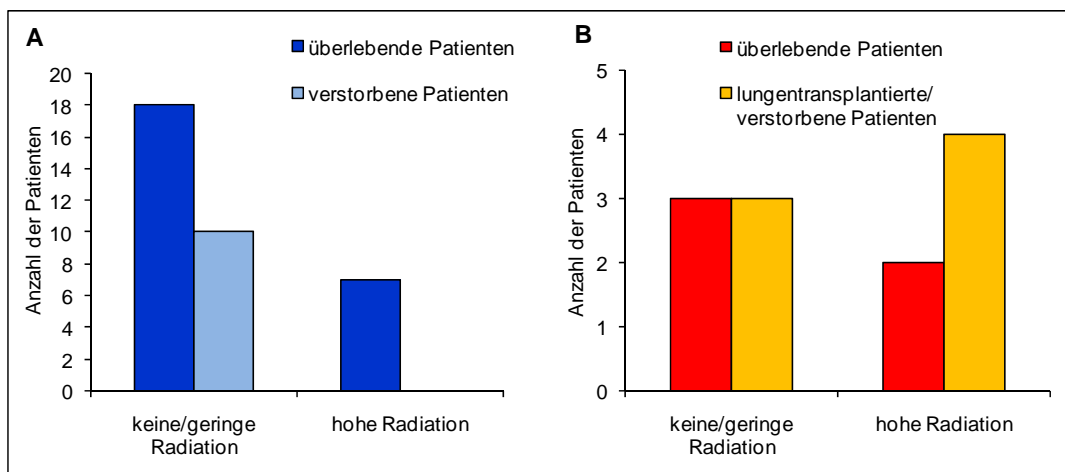


Abb. 4.5.16: Darstellung der adaptiven Radiation in verstorbenen und noch lebenden Patienten; A: Hannoveraner Patienten; B: Kopenhagener Patienten

Diskussion:

In der Langzeitstudie aus Hannover lässt sich nach Überprüfung der genetischen Veränderungen im Verlaufe einer Infektion ein Zusammenhang zwischen dieser und dem Krankheitsverlauf des jeweiligen Patienten erkennen. Klone, die eine hohe adaptive Radiation aufweisen, scheinen zu einem milderen Krankheitsverlauf zu führen. Eine mögliche Erklärung dieser Hypothese wäre folgende: Passt sich ein Klon optimal an die erkrankte Lunge an, wird das Immunsystem des Patienten wahrscheinlich nicht so stark reagieren wie auf einen Klon, der nicht oder nur sehr unzureichend an die speziellen Gegebenheiten der Lunge angepasst wäre. Bei einer reduzierten Immunantwort, wäre die Expression bestimmter Mediatoren, wie z.B. die Ausschüttung von verschiedenen Interleukinen, erniedrigt und als Folge dessen die Entzündungsreaktionen ebenfalls reduziert. Dies könnte sich wiederum positiv auf den Krankheitsverlauf des Patienten auswirken.

Die Betrachtung der Klone der Kopenhagener Patientenkohorte bestätigte diese Hypothese dagegen nicht. Hier konnte auf den ersten Blick keine Korrelation zwischen adaptiver Radiation und dem Krankheitsverlauf der Patienten entdeckt werden. Im Gegenteil, die Klone mit hoher Radiation wurden sogar vermehrt in den Patienten detektiert, die während des Beobachtungszeitraums verstorben waren. Bei näherer Betrachtung fiel auf, dass alle Patientenisolate, bei denen eine starke genetische Veränderung vorlag, den Klon 6822 trugen. Dieser ist, wie schon mehrmals erwähnt wurde, der häufigste Klon in Kopenhagen. Es wurde ebenfalls bereits beschrieben, dass es sich bei den 12 Patienten, die untersucht wurden, um eine besondere Patientenkohorte handelte. Im Gegensatz zu Hannover, wo ein Kontakt zwischen den verschiedenen Patienten in der Regel möglichst vermieden wurde, hielten sich die Patienten der Kopenhagener-Kohorte während der Therapie in den selben Räumen auf. Es gab z.B. einen gemeinsamen Raum, in dem sich die Patienten zur Inhalationstherapie trafen. Es scheint, dass dieser enge Kontakt zwischen den CF-Patienten dazu führte, dass der dominante Klon 6822 ständig zwischen den Patienten ausgetauscht wurde. Dieser passte sich daraufhin wieder an die Umgebung der neuen Lunge an und wurde währenddessen erneut auf einen der anderen Patienten übertragen. Somit bestand ein reger Austausch des gleichen Klons, aber verschiedener klonaler Varianten. Diese zeigten sich durch die hohe Radiation, die im Geninselbereich in den verschiedenen Isolaten detektiert werden konnte. Der unterschiedliche Krankheitsverlauf (einige der Patienten verstarben bzw. waren schwer krank, andere zeigten einen milden Krankheitsverlauf), lässt sich wahrscheinlich auf die verschiedenen genetischen Komponenten der einzelnen Patienten sowie auf deren individuelles Immunsystem zurückführen. Da zwischen den Patienten in Hannover ein enger

Kontakt während den Therapien vermieden wurde, konnte es hier nicht zu einer zeitlich langandauernden Kreuzinfektionen kommen. Die Gründe für die auftretenden hohen Radiationsraten sind demnach verschiedene, die separat nebeneinander bestehen können.

#### **4.6 Adaptationsprozesse von *P. aeruginosa* an die Lunge eines CF-Patienten während des Infektionsverlaufs**

Unabhängig von der Evolution der genomischen Organisation kommt es im Laufe der Infektion auch zu einer Änderung mehrerer phänotypischer Eigenschaften. Diese phänotypischen Veränderungen sind dabei charakteristisch für das Habitat Lunge und gelten als irreversibel. Stämme werden z.B. unbeweglich (Mahentiralingam et al., 1994), LPS und Pyocin defizient und weniger empfänglich für Phagen (Römling et al., 1994). Zusätzlich kommt es während der chronischen Besiedelung zu einer Abnahme der Cytotoxizität (Lee et al., 2005) und es bilden sich sogenannte „small colony variants“ (Häussler et al., 1999) und mukoide Kolonien (Govan et al., 1996).

Da bis zum heutigen Zeitpunkt nur phänotypische Veränderungen von *P. aeruginosa* anhand einzelner unabhängiger Isolate im Verlauf der CF-Erkrankung nachgewiesen worden sind, wurden durch eine genaue Phänotypisierung einiger ausgewählter sequentieller Isolate, die einen langen Zeitraum der Infektion abdecken, die bereits beschriebenen phänotypischen Veränderungen überprüft und der detaillierte Anpassungsprozess von *P. aeruginosa* an die CF-Lunge untersucht. Des Weiteren wurde das Wachstumsverhalten von Früh- und Spätisolaten in verschiedenen Medien verglichen. Abschließend wurde durch kompetitive Fitnessexperimente die Auswirkung der Adaptation von *P. aeruginosa* an die CF-Lunge auf die Überlebensfähigkeit in verschiedenen Habitaten analysiert.

##### **4.6.1 Auswahl der Patientenisolate**

Um den Adaptationsprozess von *P. aeruginosa* an die CF-Lunge detaillierter zu untersuchen, wurden in einem ersten Schritt solche Patienten ausgewählt, die untereinander verglichen sowohl einen unterschiedlichen Krankheitsstatus aufwiesen als auch mit einem unterschiedlichen persistierenden Klon besiedelt waren. Um nicht nur verschiedene Isolate von unterschiedlichen Patienten eines Isolationszeitraums miteinander vergleichen zu können,

mussten die sequentiellen Isolate eines Patienten zum gleichen Klon gehören. Die Patienten waren demnach über den gesamten Zeitraum nur mit einem Klon kolonisiert oder aber der initiale Klon persistierte über den gesamten Beobachtungszeitraum neben anderen Klonen, die zwischenzeitlich detektiert werden konnten. Ein weiterer wichtiger Aspekt, der bei der Auswahl der Isolate bzw. der Patienten berücksichtigt werden musste, war das Auftreten von Hypermutatoren. Es ist bekannt, dass Hypermutatoren im Verlauf der CF-Infektion auftreten (Mena et al., 2008, Montanari et al., 2007). Da *in vivo* Experimente ergaben, dass Hypermutatoren eine geringere Fitness aufweisen (Mena et al., 2007) wurden alle Isolate, die die zuvor beschriebenen Kriterien erfüllten, auf eine vorhandene Hypermutation überprüft. Hierzu wurde das Protokoll von Oliver verwendet (Oliver et al., 2000). Als Hypermutator werden Stämme bezeichnet, die eine hohe Mutationsfrequenz im DNA-Reparatursystem aufweisen (Miller et al., 1996; Oliver et al., 2000). Die Mutationen, die im Laufe der Transkription natürlicherweise entstehen, können aufgrund des beeinträchtigten Reparatursystems nicht mehr vollständig repariert werden. Es kommt somit zu einer Anhäufung von genetischen Änderungen im Genom.

Alle Stämme, die eine Mutationsfrequenz von  $> 10^{-6}$  aufwiesen, wurden als Hypermutatorstämme gekennzeichnet und für weitere Experimente ausgeschlossen. Klone mit einer Mutationsfrequenz von  $< 10^{-6}$  wurden dagegen, nach Definition von Oliver et al. (2000), als Nichthypermutatoren bezeichnet und konnten daher für weiterführende Analysen verwendet werden. Die Ergebnisse der Hypermutator-Analyse werden in Abb. 4.6.1 dargestellt. Die Grenze für Hypermutation wird als Linie dargestellt. Alle Hypermutatorstämme wurden durch farblose Punkte mit schwarzem Rand gekennzeichnet, während Nichthypermutatoren mit Schwarz dargestellt wurden.

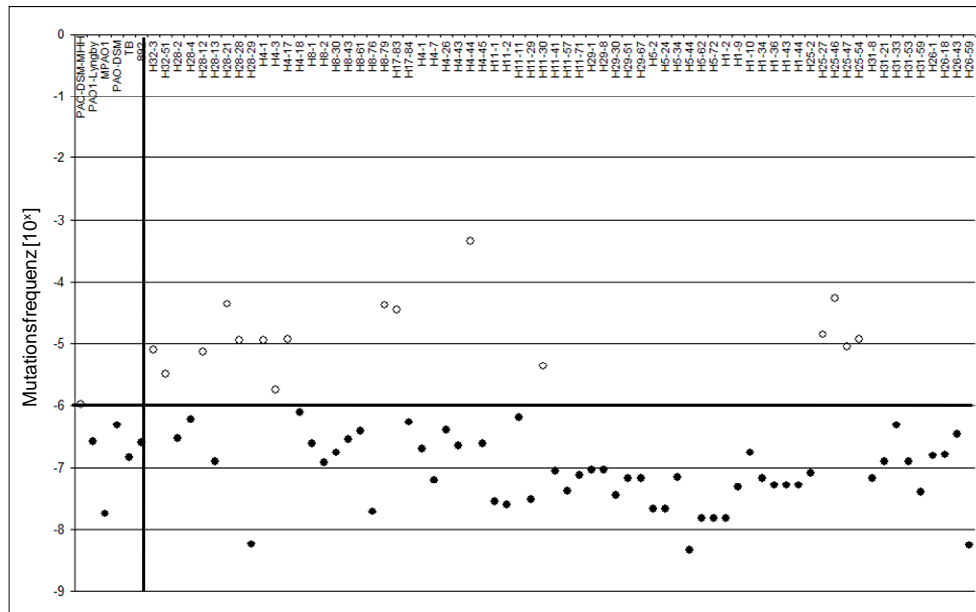


Abb. 4.6.1: Ergebnisse der Überprüfung auf Hypermutatorstämme; in Schwarz dargestellt Nichthypermutatoren, Hypermutatoren sind farblos mit schwarzem Rand gekennzeichnet; die Gerade bei  $10^{-6}$  veranschaulicht den Übergang zwischen einem Hypermutator- und einem Nichthypermutator-Stamm; Referenzstämme: PAO-DSM-MHH = PAO-DSM aus dem Labor von B. Iglewski, an der MHH mehrmals subkultiviert; PAO1-Lyngby = PAO-Stamm von der DTU, Kopenhagen; MPAO1 = PAO1 aus der Mutantenbank der Universität Washington, Seattle, 2003 erhalten (Jacobs et al., 2003); PAO-DSM = Originalkultur aus dem Labor von B. Iglewski (New York, USA); TB = CF-Isolat von der MHH, 1983 isoliert; 892 = CF-Isolat von der MHH, 1983 isoliert

Zur Kontrolle wurden 4 verschiedene PAO-Stämme (PAO-DSM-MHH Subkultivierung eines PAO-Stamm aus dem Labor von B. Iglewski, PAO-Lyngby aus einem Labor der DTU in Kopenhagen, MPAO aus der Mutantenbank der Universität Washington und PAO-DSM aus dem Labor von B. Iglewski;) sowie der Stamm TB und 892 (CF-Isolate der MHH, 1983 isoliert) untersucht. Sowohl der PAO als auch TB und 892 sollten Nichthypermutatoren sein. Die Analyse ergab allerdings, dass es sich bei einem der getesteten PAO-Stämme um einen Hypermutator handelte. Für alle weiteren Experimente wurde ein PAO-Stamm als Referenz verwendet, der als Nichthypermutator eingestuft werden konnte.

Neben den Referenzen wurden insgesamt 72 Isolate von 13 verschiedenen Patienten untersucht. Bei 17 Isolaten handelte es sich um Hypermutatoren, während 55 als Nichthypermutatoren identifiziert wurden. Zur Untersuchung der Adaptation von *P. aeruginosa* an die CF Lunge wurden nachfolgend 6 Patienten ausgewählt, von denen Nichthypermutator-Stämme aus verschiedenen Stadien der Infektion zur Verfügung standen. Bei diesen sechs Patienten handelte es sich um H1, H5, H8, H11, H29 und H31. Die Ergebnisse der Genotypisierung sind in Abb. 4.6.2 dargestellt. In Orange gekennzeichnet wurden die ausgewählten Isolate. Die Isolate wurden so gewählt, dass jeweils ein Isolat den

Beginn der Infektion und ein Isolat den späten Verlauf der Infektion repräsentiert. Die zwei mittleren Isolate sollen dabei die Adaptationsphase an die CF-Lunge verdeutlichen.

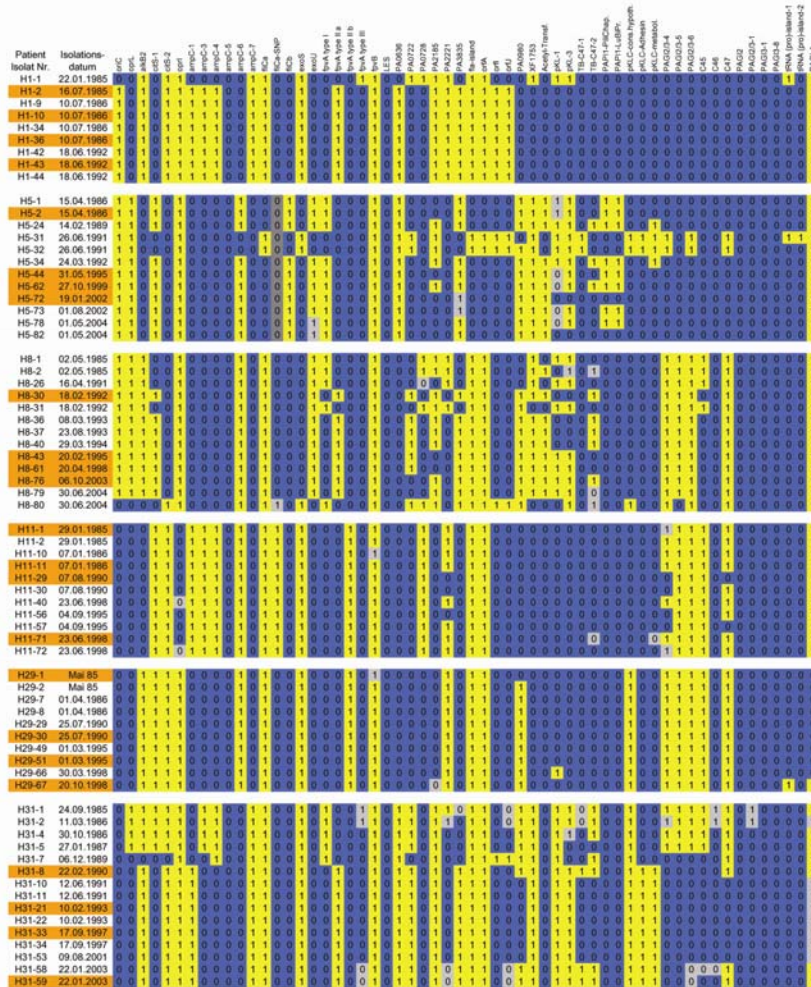


Abb. 4.6.2: Genotypisierung der sequentiellen Isolate von 6 ausgewählten Patienten; orange gekennzeichnet die ausgewählten Isolate

Tab. 4.6.1: Informationen zum klinischen Verlauf und der Radiation in den Isolaten der 6 ausgewählten Patienten

Patient	Klon	klinischer Status	Radiation
H1	2C1A	schwerer Verlauf	keine Radiation
H5	D421	milder Verlauf	geringe Radiation
H8	E429	sehr milder Verlauf	keine Radiation
H11	1BAE	schwerer Verlauf	keine Radiation
H29	3C2A	mittelschwerer Verlauf	keine Radiation
H31	2E1A	schwerer Verlauf	hohe Radiation

In Tab. 4.6.1 werden zusätzliche Informationen zu den ausgewählten Isolaten dargestellt: der Klon, der in den Isolaten detektiert werden konnte, das Ausmaß an adaptiver Radiation (siehe Kapitel 4.5.6) sowie der Krankheitsverlauf des jeweiligen Patienten.

Die 6 ausgewählten Patienten ließen sich durch die Kolonisation mit unterschiedlichen Klonen, einem variierenden Ausmaß an Radiation und teilweise sehr großen Unterschieden im klinischen Verlauf charakterisieren.

#### 4.6.2 Phänotypisierung der ausgewählten sequentiellen Isolate

*P. aeruginosa* weist unabhängig von der Evolution der genomischen Organisation im Laufe der Infektion auch eine Veränderung mehrerer phänotypischer Eigenschaften auf. In dieser Arbeit wurden die ausgewählten sequentiellen Isolate mit verschiedenen phänotypischen Assays charakterisiert, um die Veränderungen im Laufe der Infektion zu dokumentieren.

Es wurden insgesamt 10 verschiedene phänotypische Tests durchgeführt:

1. Koloniemorphologie (Kongorot-Agar)
2. Hämolyse und Autolyse (Blutagarplatten)
3. Proteasesekretion (Casein-Agar)
4. Sekretion von Siderophoren (CAS-Agar)
5. Sezernierung von Pyocyanin (KingB-Medium)
6. Hitzestabile und -labile Rhamnolipide (Lyse von Erythrocyten)
7. Elastaseaktivität (Elastin-Kongorot-Lösung)
8. Schwimmen (Bewegung im Agar: 0,3 % LB-Agar)
9. Schwärmen (Bewegung auf dem Agar: 0,5 % LB-Agar)
10. Twitchen (Bewegung auf dem Boden der Petrischale; 1 % LB-Agar)

Die Ergebnisse dieser Assays werden in den Abbildungen 4.6.3-4.6.9 dargestellt. Die Ergebnisse zur Untersuchung der Koloniemorphologie, der Hämolyse/Autolyse, der Protease-Sekretion und der Bewegungsform „Twitchen“ wurden bildlich dargestellt, während bei den anderen Untersuchungen die optische Dichte bzw. der Durchmesser der Kolonie angegeben wurde.

Die Abb. 4.6.3 zeigt die phänotypische Charakterisierung des Referenzstamms PAO.




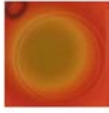


Referenzstamm PAO		
Eigenschaft		
<b>Morphologie</b>	Koloniemorphologie	
	Autolyse/ Hämolyse [nach 12 h]	
	Autolyse [nach 36 h]	-
	Hämolyse [nach 36 h]	+
<b>Sekretion von Virulenzfaktoren</b>	Protease	
	Siderophore [Durchmesser in cm]	1,6
	Pyocyanin [OD695 nm; Faktor 10 <sup>-2</sup> ]	18,7
	Elastase [OD 495 nm; Faktor 10 <sup>-2</sup> ]	7,5
	hitzestabiles Glycopeptid [OD550 nm; Faktor 10 <sup>-2</sup> ]	1,9
	hitzeinstabile Phospholipase [OD550 nm; Faktor 10 <sup>-2</sup> ]	0,2
<b>Bewegung</b>	Schwimmen [Durchmesser in cm]	2,3
	Schwärmen [Durchmesser in cm]	3,8
	Twitchen	

Abb. 4.6.3: Phänotypische Charakterisierung des Referenzstamms PAO

Der verwendete Referenzstamm PAO zeigte in allen durchgeführten phänotypischen Experimenten ein positives Ergebnis. Der Stamm zeigte sowohl eine hohe Hämolyseeigenschaft als auch eine hohe Protease- und Pyocyaninsekretion. In der Bewegungsfähigkeit des Stamms konnten alle drei Fortbewegungsmöglichkeiten nachgewiesen werden.

Die Abb. 4.6.4 zeigt die Ergebnisse der Phänotypisierung des Patienten H1. Mit den vier ausgewählten Isolaten wurden die Veränderungen über einen Infektionszeitraum von 7 Jahren dokumentiert.

















Patient H1		Isolatnummer			
Eigenschaft		2 [1985]	10 [1986]	36 [1991]	43 [1992]
<b>Morphologie</b>	Koloniemorphologie				
	Autolyse/ Hämolyse [nach 12 h]				
	Autolyse [nach 36 h]	+	-	-	-
	Hämolyse [nach 36 h]	+	+	(+)	-
<b>Sekretion von Virulenzfaktoren</b>	Protease				
	Siderophore [Durchmesser in cm]	1,8	1,9	1,7	1,8
	Pyocyanin [OD695 nm; Faktor 10 <sup>-2</sup> ]	8,7	12,5	12,8	10,5
	Elastase [OD 495 nm; Faktor 10 <sup>-2</sup> ]	11,6	8,9	6,9	4,3
	hitzestabiles Glycopeptid [OD550 nm; Faktor 10 <sup>-2</sup> ]	-	18,2	5,4	2,2
	hitzeinstabile Phospholipase [OD550 nm; Faktor 10 <sup>-2</sup> ]	0,7	0,1	-	-
<b>Bewegung</b>	Schwimmen [Durchmesser in cm]	1,4	1,3	2,2	1,1
	Schwärmen [Durchmesser in cm]	3,9	3,1	3,3	3,8
	Twitchen				

Abb. 4.6.4: Phänotypische Charakterisierung der Isolate des Patienten H1

---

Die Koloniemorphologie zeigte zwischen den verschiedenen Isolaten große Unterschiede, nur die Kolonie des dritten und vierten Isolats sahen morphologisch vergleichbar aus. Im Laufe der Erkrankung konnte in den Isolaten ein Verlust der Hämolyse- und Autolyseeigenschaft sowie der Proteasesekretion beobachtet werden. Auch die Elastaseaktivität sowie die der hitzeinstabilen Phospholipase fiel im Laufe des Beobachtungszeitraums ab. Das hitzestabile Glycolipid zeigte erst eine ansteigende und danach eine fallende Aktivität. Alle anderen analysierten Parameter, sowohl Siderophore und Pyocyanin als auch alle drei Formen der Bewegung konnten in allen 4 Isolaten detektiert werden.

In Abb. 4.6.5 werden die Phänotypisierungsergebnisse des Patienten H5 dargestellt. Die Isolate 2, 44, 62 und 72 umfassen dabei einen Zeitraum von 18 Jahren.





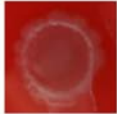
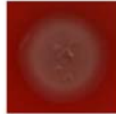
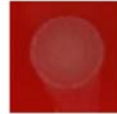






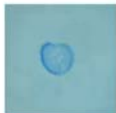
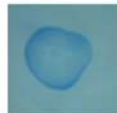
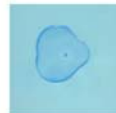
Patient H5		Isolatnummer			
Eigenschaft		2 [1986]	44 [1995]	62 [1999]	72 [2002]
<b>Morphologie</b>	Koloniemorphologie				
	Autolyse/ Hämolyse [nach 12 h]				
	Autolyse [nach 36 h]	-	-	(+)	(+)
	Hämolyse [nach 36 h]	(+)	+	+	+
<b>Sekretion von Virulenzfaktoren</b>	Protease				
	Siderophore [Durchmesser in cm]	1,4	1,9	1,0	1,8
	Pyocyanin [OD695 nm; Faktor 10 <sup>-2</sup> ]	28,7	31,0	14,1	2,5
	Elastase [OD 495 nm; Faktor 10 <sup>-2</sup> ]	3,2	4,8	1,0	0,7
	hitze stabiles Glycopeptid [OD550 nm; Faktor 10 <sup>-2</sup> ]	0,5	0,4	0,9	1,0
	hitze instabile Phospholipase [OD550 nm; Faktor 10 <sup>-2</sup> ]	1,6	0,2	0,9	0,1
<b>Bewegung</b>	Schwimmen [Durchmesser in cm]	1,1	1,1	1,1	0,9
	Schwärmen [Durchmesser in cm]	1,1	1,1	2,7	2,4
	Twitchen				

Abb. 4.6.5: Phänotypische Charakterisierung der Isolate des Patienten H5

Auch hier zeigten sich in der Koloniemorphologie große Unterschiede zwischen den einzelnen Isolaten. Sowohl in der Oberflächenbeschaffenheit als auch in der Farbe konnten

---

Variationen beobachtet werden. Während Hämolyse in allen Isolaten nachgewiesen werden konnte, wurde die Autolyse erst in den letzten beiden Isolaten detektiert. Des Weiteren konnte ein Verlust der Proteasesekretion verzeichnet werden. Die Pyocyaninsezernierung und die Elastaseaktivität zeigten im Verlauf der Erkrankung einen Abfall, während bei dem hitzestabilen Glycolipid ein Anstieg verzeichnet werden konnte. Bei der Analyse der Bewegungsfähigkeit der einzelnen Isolate konnte beim Schwärmen und Twitchen eine leichte Zunahme detektiert werden.

Die Phänotypisierungsergebnisse des Patienten H8 werden in Abb. 4.6.6 dargestellt. Die vier Isolate wurden so gewählt, dass 19 Jahre des Infektionsverlaufs auf phänotypische Veränderungen hin untersucht werden konnten.





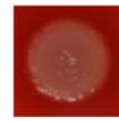

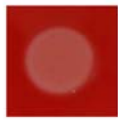







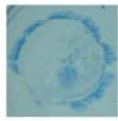

Patient H8		Isolatnummer			
Eigenschaft		30 [1992]	43 [1995]	61 [1999]	76 [2003]
<b>Morphologie</b>	Koloniemorphologie				
	Autolyse/ Hämolyse [nach 12 h]				
	Autolyse [nach 36 h]	+	(+)	-	-
	Hämolyse [nach 36 h]	(+)	(+)	(+)	(+)
<b>Sekretion von Virulenzfaktoren</b>	Protease				
	Siderophore [Durchmesser in cm]	0,9	1,8	1,2	1,9
	Pyocyanin [OD695 nm; Faktor 10 <sup>-2</sup> ]	2,0	1,2	1,3	5,8
	Elastase [OD 495 nm; Faktor 10 <sup>-2</sup> ]	0,6	0,4	0,9	0,6
	hitzestabiles Glycopeptid [OD550 nm; Faktor 10 <sup>-2</sup> ]	0,1	0,2	1,3	1,8
	hitzeinstabile Phospholipase [OD550 nm; Faktor 10 <sup>-2</sup> ]	0,01	0	0,3	0,3
<b>Bewegung</b>	Schwimmen [Durchmesser in cm]	1,1	1	-	0,7
	Schwärmen [Durchmesser in cm]	2,1	2	6,1	3,4
	Twitchen				

Abb. 4.6.6: Phänotypische Charakterisierung der Isolate des Patienten H8

Bei der Betrachtung der Koloniemorphologie wurde beobachtet, dass besonders die Kolonie des dritten Isolats (H8-62) ein differierendes Aussehen zeigte. Während bei der Autolyse ein Verlust im Laufe der Infektion nachgewiesen werden konnte, wurde sowohl bei der Pyocyaninbildung als auch bei der Aktivität beider Rhamnolipide ein Anstieg verzeichnet. Auch in diesem Patienten kam es zu einem Verlust der Proteasesekretion. Bei der Analyse der Bewegung konnte ein Unterschied zwischen den Bewegungsformen festgestellt werden. Die Isolate des Patienten H8 zeigten nur ein geringes Schwimmen, aber ein erhöhtes Schwärmen und Twitchen. Das Isolat H8-62, welches sich durch eine stark abweichende Morphologie charakterisieren ließ, zeigte sogar ein besonders hohes Vermögen zu Schwärmen und Twitchen.

In Abb. 4.6.7 werden die Phänotypisierungsergebnisse des Patienten H11 dargestellt. Hier umfasste der Beobachtungszeitraum mit Hilfe der Isolate 13 Jahre.






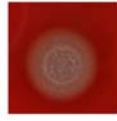

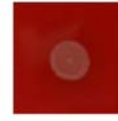








Patient H11		Isolatnummer			
Eigenschaft		1 [1985]	11 [1986]	29 [1990]	71 [1998]
<b>Morphologie</b>	Koloniemorphologie				
	Autolyse/ Hämolyse [nach 12 h]				
	Autolyse [nach 36 h]	+	+	-	-
	Hämolyse [nach 36 h]	-	+	+	-
<b>Sekretion von Virulenzfaktoren</b>	Protease				
	Siderophore [Durchmesser in cm]	1,5	1,7	1,4	1,5
	Pyocyanin [OD695 nm; Faktor 10 <sup>-2</sup> ]	10,1	17,3	13,6	2,9
	Elastase [OD 495 nm; Faktor 10 <sup>-2</sup> ]	0,5	0,4	0,9	0,6
	hitzestabiles Glycopeptid [OD550 nm; Faktor 10 <sup>-2</sup> ]	0,01	2,8	2,7	0,7
	hitzeinstabile Phospholipase [OD550 nm; Faktor 10 <sup>-2</sup> ]	0	0	0,2	0
<b>Bewegung</b>	Schwimmen [Durchmesser in cm]	2,2	1,7	1,5	-
	Schwärmen [Durchmesser in cm]	1,5	2,0	1,5	2,3
	Twitchen				

Abb. 4.6.7: Phänotypische Charakterisierung der Isolate des Patienten H11

Während die beiden mittleren Isolate eine sehr vergleichbare Koloniemorphologie aufweisen, unterscheiden sich Früh- und Spätisolat vor allem in der Oberflächenbeschaffenheit. Die



---

Vergleichbarkeit der Morphologie der beiden mittleren Isolate spiegelte sich auch in anderen Eigenschaften wider. Beide Isolate zeigten im Gegensatz zum Früh- und Spätisolat eine Protease- und Hämolyseaktivität sowie eine erhöhte Pyocyaninproduktion und Rhamnolipidaktivität. Alle vier Isolate zeigten allerdings eine ähnliche Bewegungsfähigkeit.

Die Abb. 4.6.8 zeigt die Ergebnisse der Phänotypisierung des Patienten H29. Die ausgewählten Isolate umfassen bei diesem Patienten einen Zeitraum von ebenfalls 13 Jahren.






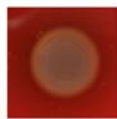

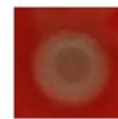







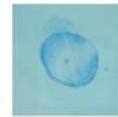
Patient H29		Isolatnummer			
Eigenschaft		1 [1985]	30 [1990]	51 [1995]	67 [1998]
<b>Morphologie</b>	Koloniemorphologie				
	Autolyse/ Hämolyse [nach 12 h]				
	Autolyse [nach 36 h]	(+)	(+)	+	-
	Hämolyse [nach 36 h]	+	++	+	+
<b>Sekretion von Virulenzfaktoren</b>	Protease				
	Siderophore [Durchmesser in cm]	1,0	0,9	1,0	0,9
	Pyocyanin [OD695 nm; Faktor 10 <sup>-2</sup> ]	9,1	21,6	11,8	14,4
	Elastase [OD 495 nm; Faktor 10 <sup>-2</sup> ]	2,5	10,4	13,3	7,0
	hitzestabiles Glycopeptid [OD550 nm; Faktor 10 <sup>-2</sup> ]	1,5	5,4	0,3	16,6
	hitzeinstabile Phospholipase [OD550 nm; Faktor 10 <sup>-2</sup> ]	0	2,9	0	16,5
<b>Bewegung</b>	Schwimmen [Durchmesser in cm]	2,1	2,4	2,1	0,9
	Schwärmen [Durchmesser in cm]	3,1	3,2	2,2	2,6
	Twitchen				

Abb. 4.6.8: Phänotypische Charakterisierung der Isolate des Patienten H29

In der Koloniemorphologie der 4 sequentiellen Isolate ließen sich erneut sehr große Unterschiede erkennen. Während das dritte Isolat eine sehr hohe Autolysefähigkeit aufwies,

---

zeigte das zweite sequentielle Isolat des Patienten H29 eine stark erhöhte Hämolyse und Pyocyaninproduktion. Das Spätisolat hob sich durch eine sehr starke Sezernierung beider Rhamnolipide von den anderen Isolaten ab. Zusätzlich konnte im Verlauf der Infektion eine Verminderung der Bewegungsfähigkeit in allen 3 untersuchten Bewegungsformen detektiert werden.

Abb. 4.6.9 stellt die verschiedenen Phänotypen der 4 Isolate des Patienten H31 da. Die Isolate decken in diesem Fall einen Infektionszeitraum von 18 Jahren ab.





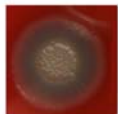










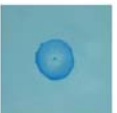
Patient H31		Isolatnummer			
Eigenschaft		8 [1990]	21 [1993]	33 [1997]	59 [2003]
<b>Morphologie</b>	Koloniemorphologie				
	Autolyse/ Hämolyse [nach 12 h]				
	Autolyse [nach 36 h]	+	-	(+)	(+)
	Hämolyse [nach 36 h]	+	+	+	(+)
<b>Sekretion von Virulenzfaktoren</b>	Protease				
	Siderophore [Durchmesser in cm]	1,7	1,8	1,7	1,7
	Pyocyanin [OD695 nm; Faktor 10 <sup>-2</sup> ]	11,2	12,1	1,3	11,5
	Elastase [OD 495 nm; Faktor 10 <sup>-2</sup> ]	2,0	11,1	7,6	3,1
	hitzestabiles Glycopeptid [OD550 nm; Faktor 10 <sup>-2</sup> ]	2,2	1,9	1,6	3,9
	hitzeinstabile Phospholipase [OD550 nm; Faktor 10 <sup>-2</sup> ]	0	0	0	0
<b>Bewegung</b>	Schwimmen [Durchmesser in cm]	1,9	1,6	2,1	2
	Schwärmen [Durchmesser in cm]	1,4	5,4	1,4	1,7
	Twitchen				

Abb. 4.6.9: Phänotypische Charakterisierung der Isolate des Patienten H31

Bei Betrachtung der Koloniemorphologie war im Laufe der Infektion ein gesteigertes Wachstum zu erkennen. Das Frühisolat zeigte die stärkste Autolyse, während das zweite

Isolat die höchste Proteaseaktivität aufwies. Die Isolate 3 und 4 zeigten dagegen einen vollständigen Verlust der Proteaseaktivität. In der Pyocyaninproduktion wurde bei dem dritten Isolat eine signifikant verringerte Sezernierung beobachtet, die anderen drei Isolate zeigten dagegen vergleichbare Produktionsraten. Bei Betrachtung der Elastase konnte zuerst ein starker Anstieg in der Aktivität und danach ein langsamerer Abfall der Aktivität beobachtet werden. Des Weiteren ließ sich unter allen Isolaten eine vergleichbare Bewegungsfähigkeit erkennen, nur das zweite Isolat zeigte ein stark verstärktes Twitchen.

Zur besseren Veranschaulichung der Analyse der Sekretion von Pyocyanin und Rhamnolipiden sowie der Elastaseaktivität wurden die Ergebnisse dieser phänotypischen Assays in den Abb. 4.6.10-4.6.12 nochmals gesondert graphisch dargestellt. Das Frühisolat wurde in Rot, das nachfolgende Isolat in Gelb, das dritte Isolate in Grün und das Spätisolat jeweils in Blau dargestellt.

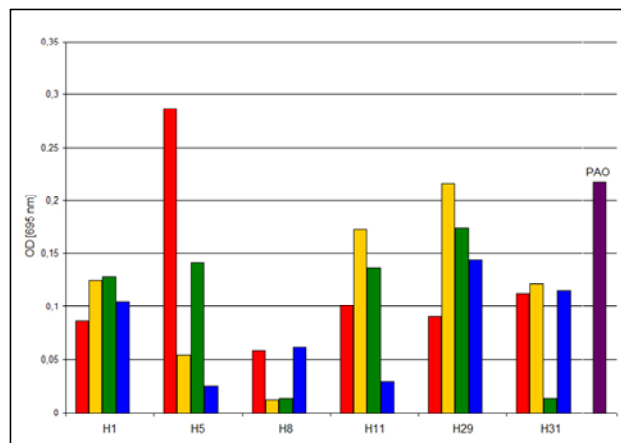


Abb. 4.6.10: Ergebnisse der Pyocyanin-Messung, gemessen bei 695 nm nach 24 h; Frühisolat = rot; 2. Isolat = gelb; 3. Isolat = grün; Spätisolat = blau

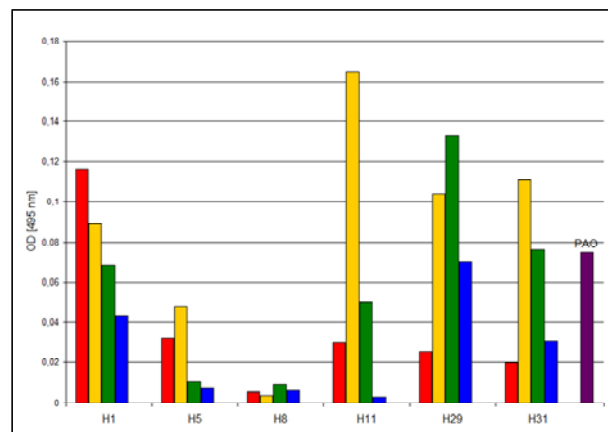


Abb. 4.6.11: Ergebnisse zur Bestimmung der Elastase-Aktivität; gemessen nach 360 min bei 495 nm; Frühisolat = rot; 2. Isolat = gelb; 3. Isolat = grün; Spätisolat = blau

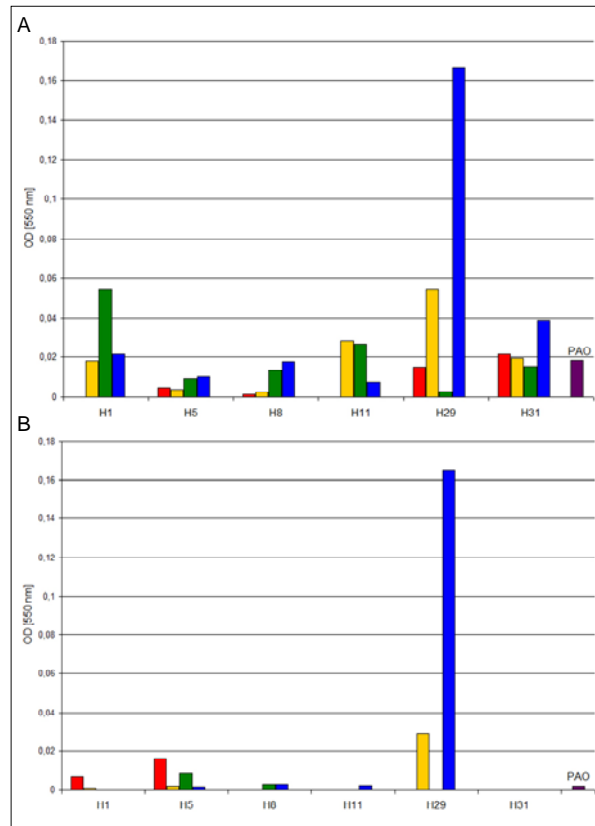


Abb. 4.6.12: Ergebnisse der Hämolyse-messung; A: Messung des hitzestabilen Glycolipid; B: Messung der hitzeinstabilen Phospholipase; Frühisolat = rot; 2. Isolat = gelb; 3. Isolat = grün; Spätisolat = blau

Da die phänotypische Charakterisierung der ausgewählten Isolate neben den schon bekannten Veränderungen im Laufe einer CF-Infektion keine weiteren stringenten Veränderungen (Verlust oder Erwerb von Fähigkeiten) erbrachten, wurde in einem nachfolgenden Schritt überprüft, ob die gezielte Auswahl von wenigen sequentiellen Isolaten den vollständigen Anpassungsprozess von *P. aeruginosa* an die CF-Lunge darstellen können. Hierzu wurden von einem der ausgewählten Patienten (H29) alle zur Verfügung stehenden Isolate (insgesamt 52) umfangreich phänotypisch charakterisiert:

1. Koloniemorphologie auf Kongorot-Agarplatten
2. Hämolyse/Autolyse auf Blutagarplatten
3. Proteasesekretion in KingB-Medium
4. Sezernierung von Siderophoren auf CAS-Agar
5. Überprüfung der Bewegungsformen Schwimmen und Twitchen

Zur Beurteilung dieser phänotypischen Eigenschaften wurde dem Stamm bei Vorhandensein einer Fähigkeit eine 1 und für das Fehlen eine 0 gegeben (beim Twitchen wurde aufgrund des breiten Spektrums Zahlenwerte von 0-3 vergeben). Des Weiteren wurden sowohl die

Koloniemorphologie als auch das Aussehen der Kolonie auf einer Blutplatte analysiert und die Unterschiede ebenfalls in einen Zahlencode translatiert (0-3). Bei der Koloniemorphologie wurde zum einen das Aussehen der Kolonie (matt oder glänzend) und zum anderen die Koloniform (Oberflächenbeschaffenheit und Kolonieabschluss) berücksichtigt. Die Kolonien auf der Blutagarplatte wurden auf Mukoidität, Phagen, metallischem Schimmer und der Art des Abschlusses zum Medium untersucht. Die Ergebnisse der verschiedenen phänotypischen und morphologischen Beurteilungen werden in Tab. 4.6.2 veranschaulicht.

Tab. 4.6.2: Ergebnisse der Phänotypisierung von 52 sequentiellen Isolaten des Patienten H29

Isolat-Nr.	Datum	Blutagarplatten				Kongorot-Platten				Sidero-phore	Prote-ase	Auto-lyse	Hämo-lyse	Twitchen	Schwim-men
		mukoid/nicht-mukoid	runder Abschluß	Metallischer Schimmer	Phagen	runder Abschluß	Oberfläche (glatt/uneben)	Matt/Glanz							
1	Mai 85	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1
2	04.12.1985	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
3	04.12.1985	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1
4	04.12.1985	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	3	1	1
5	04.12.1985	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	3	1	1
6	01.04.1986	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	3	1	1
7	25.11.1986	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1
8	10.03.1987	0	1	0	0	2	0	1	1	0	0	1	2	1	1
9	10.03.1987	0	2	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1
10	10.11.1987	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
11	06.07.1988	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2	1	1
12	06.07.1988	0	2	0	1	2	0	1	1	0	0	1	1	1	1
13	06.07.1988	0	2	0	1	2	0	0	1	0	0	1	1	1	1
14	18.11.1988	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	2	1	1
15	18.11.1988	0	2	0	0	2	0	1	1	1	0	1	1	1	1
16	10.05.1989	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1
17	10.05.1989	0	1	0	0	2	0	0	1	1	0	1	1	1	1
18	30.08.1989	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	1	1
19	30.08.1989	0	2	0	0	2	0	0	1	1	0	1	2	1	1
20	21.03.1990	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
21-28	21.03.1990	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1
22-23	21.03.1990	0	2	0	0	2	0	0	1	1	0	1	1	1	1
24	25.07.1990	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1
25	06.02.1991	0	1	0	1	2	0	0	1	0	1	0	1	1	1
26-30	06.02.1991	0	2	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1
27	09.10.1991	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1
29	03.03.1992	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1
31	23.10.1992	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	2	1	1
32-40	23.03.1992	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	2	1	1
33	23.03.1992	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
34	10.03.1993	1	2	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
35	03.11.1993	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	2	1	1
36	03.11.1993	0	0	0	1	2	0	0	0	0	1	0	1	1	1
37	03.11.1993	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	3	1	1
38	25.03.1994	0	1	0	0	2	0	0	1	0	0	1	1	1	0
39	25.03.1994	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1
41	14.09.1994	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1
42	10.10.1995	0	1	0	1	2	0	1	1	0	0	1	0	0	0
43	09.02.1996	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	3	1	1
44	23.09.1996	0	2	0	1	0	1	0	1	0	0	1	2	1	1
45	23.09.1996	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	2	1	1
46	23.09.1996	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	2	1	1
47	26.03.1997	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0
48	15.09.1997	1	1	0	0	2	0	1	1	1	0	1	1	1	0
49	15.09.1997	0	2	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1
50	30.03.1998	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
51	20.10.1998	1	2	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass es sich bei allen sequentiellen Isolaten dieses Patienten um einen einzigen Klon handelt (Genotypisierung mit dem AT-Chip), zeigte die

phänotypische und morphologische Charakterisierung eine sehr hohe Diversität (siehe Tab. 4.6.2).

Insgesamt konnten nur 4 Muster zweimal detektiert werden, während alle anderen singular vorkamen. Isolate eines Isolationszeitpunkts wiesen ebenfalls Unterschiede in den phänotypischen und morphologischen Merkmalen auf.

Bei der Zusammenfassung einiger Isolate zu einer Gruppe mit frühen Isolaten (die ersten drei Jahre Besiedelung) und einer Gruppe mit späten Isolaten (die letzten drei Jahre), konnten dagegen eindeutige Unterschiede aufgezeigt werden. Die Spätisolate zeigten im Vergleich zu den Frühisolaten sowohl mehr mukoide Kolonien, weniger runde Kolonieabschlüsse und mehr Phagen als auch einen Verlust der Proteasesekretion eine verstärkte Autolyse und eine verminderte Hämolyseaktivität. Des Weiteren konnte eine Verminderung in der Bewegungsfähigkeit beobachtet werden.

Zur Verdeutlichung der breiten Diversität der untersuchten Phänotypen wurden die verschiedenen sequentiellen Isolate mit Hilfe des binären Codes phylogenetisch dargestellt. Der linke Stammbaum (A) in Abb. 4.6.13 basiert dabei auf den phänotypischen Eigenschaften Siderophoreproduktion, Proteasesekretion, Hämolyse, Autolyse sowie Schwimmen und Twitchen. Bei diesen Markern handelt es sich um einfache, objektiv charakterisierbare Marker. Der rechte Stammbaum in der Abb. 4.6.13 wiederum beinhaltet neben den schon 6 dargestellten Markern weitere 7 zusätzliche Marker. Bei diesen Markern handelt es sich um verschiedene morphologische Merkmale der Kolonien auf Blutagar- und Kongorotplatten. Die Beurteilung dieser Marker fand im Vergleich zu den ersten 6 Markern subjektiv statt. Wie bei einer Kolonie z.B. die Oberflächenbeschaffenheit eingeschätzt wird, ist von Betrachter zu Betrachter verschieden. Mit Hilfe des Vergleichs beider Stammbäume konnte beurteilt werden, ob diese subjektiven Marker eine reale Darstellung der verschiedenen Isolate ermöglichen.



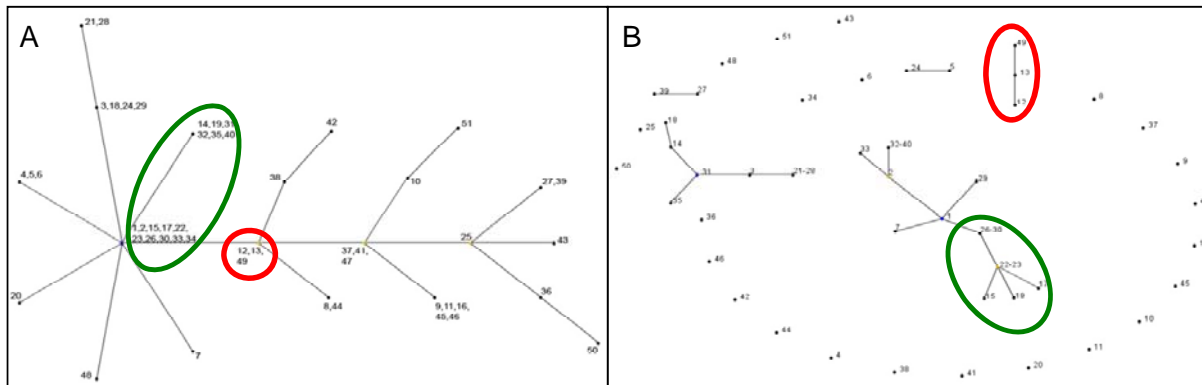


Abb. 4.6.13: A. phänotypischer Baum der Isolate des Patienten H29, basierend auf 6 phänotypischen Markern; B. phänotypischer Baum der Isolate des Patienten H29 basierend auf 6 phänotypischen und 7 morphologischen Markern; in Grün und Rot gekennzeichnet sind Beispiele für Cluster, die sich in beiden Bäumen zusammenhängend finden lassen

In Teil A der Abb. 4.6.13 lässt sich erkennen, dass die sequentiellen Isolate eine Vielzahl an unterschiedlichen phänotypischen Mustern aufweisen. Einige der Isolate wiesen das gleiche Muster auf, so dass sie an einem Punkt angeordnet wurden. Insgesamt wurden 8 von 21 detektierten Mustern mehrmals nachgewiesen. Der größte Cluster enthielt 10 verschiedene Isolate, der zweitgrößte noch 6 der sequentiellen Isolate. In beiden Bereiche ließen sich verschiedene Isolate aus dem gesamten Beobachtungszeitraum einordnen.

Unter Berücksichtigung der 7 zusätzlichen morphologischen Marker ergibt sich ein phänotypischer Baum, wie er in Teil B der Abb. 4.6.13 dargestellt wird. Hier wird die Diversität in den phänotypischen Markern durch die der morphologischen Charakteristiken weiter verstärkt. Wie in Tab. 4.6.2, in der alle Marker dargestellt wurden, stimmten auch in dem phänotypischen Baum nur vier Isolate mit jeweils einem anderen Isolat überein. Alle anderen sequentiellen Proben wiesen ein einzigartiges Muster auf. Beim Vergleich beider Bäume miteinander ließ sich bei den Isolaten, die nach der phänotypischen Charakterisierung das gleiche Muster aufwiesen, auch nach zusätzlicher Betrachtung der morphologischen Merkmale eine Verwandtschaft nachweisen (siehe grün und rot hervorgehobene Gruppen in der Abb. 4.6.13). Die Addition aus objektiven phänotypischen Merkmalen und subjektiven morphologischen Eigenschaften bietet somit eine detailliertere Untergliederung der einzelnen Isolate und ermöglicht eine bildliche Darstellung der Diversität auftretender Merkmale und der Verwandtschaft untereinander.

Diskussion:

*P. aeruginosa* weist in den Isolaten von CF-Patienten, wie bereits in einigen Veröffentlichungen nachgewiesen, eine signifikant hohe phänotypische Variationsbreite mit

einem ebenfalls breiten Spektrum an morphologischen Kolonievarianten auf (Martin et al., 1995; Oliver et al., 2000). Diese breite Vielfalt konnte innerhalb dieser Arbeit durch die phänotypische Charakterisierung von Isolaten verschiedener Patienten bestätigt werden. Zusätzlich wurde diese Variationsbreite aber auch in verschiedenen sequentiellen Isolaten desselben Patienten detektiert. Obwohl die genotypisierten Isolate den gleichen Klon aufwiesen, wurde hier trotz des Anpassungsprozesses an die Lunge des Patienten eine Vielzahl verschiedener phänotypischer Muster detektiert.

In der Literatur wurden bereits phänotypische Veränderungen im Laufe der Infektion beschrieben. *P. aeruginosa* Stämme werden z.B. einerseits LPS und Pyocin-defizient und andererseits weniger empfänglich für Phagen (Römling et al., 1994). Zusätzlich kommt es während der chronischen Besiedelung zu einer Abnahme der Cytotoxizität (Lee et al., 2005) und es bilden sich sogenannte „small colony variants“ (Häussler et al., 1999) und mukoide Kolonien (Govan et al., 1996). Durch die Entstehung von *mutS*-defizienten Mutanten, sogenannten Hypermutatoren, während des Anpassungsprozesses von *P. aeruginosa* an die CF-Lunge entsteht eine Diversifikation der Koloniemorphologie sowie der phänotypischen Variationen (Smania et al., 2004; Lujan et al., 2007). Die Existenz von Hypermutatoren wurde im Rahmen dieser Arbeit vor Beginn der Experimente durch Überprüfung ausgeschlossen. Während der Adaptation von *P. aeruginosa* wurde außerdem die Entstehung von *lasR*-Mutanten beschrieben (D'Argenio et al., 2007). Diese führen nach Lujan et al. (2007) genau wie die Entstehung von *mutS*-defizienten Stämmen zu einem Vorteil während des Anpassungsprozesses von *Pseudomonas* an die CF-Lunge. Eine andere Veröffentlichung beschreibt allerdings konträr zu Lujan (2007) einen selektiven Vorteil für einen Stamm mit einem intakten Quorum Sensing System (Heurlier et al., 2006).

Im Rahmen dieser Dissertation sollten die phänotypischen Veränderungen, die auf die Adaptation des Bakteriums an das Habitat Lunge zurückzuführen sind, weitergehend analysiert werden. Dazu wurden zum einen ausgewählte sequentielle Isolate verschiedener Patienten, die den Anpassungsprozess dokumentieren sollten, und zum anderen alle vorhandenen sequentiellen Isolate eines Patienten durch verschiedenste phänotypische Analysen charakterisiert. Bereits erwähnte stringente Veränderungen im Laufe der Infektion sollten bestätigt und weiter dokumentiert werden.

Beim Vergleich mehrerer früher Isolate mit mehreren späten (in dieser Untersuchung die Isolate des Patienten H29 aus den ersten drei und den letzten drei Jahren) konnten einige der phänotypischen Veränderungen aus der Literatur bestätigt werden. In den Isolaten des Patienten H29 wurden sowohl eine ansteigende Mukoidität, ein metallischer Schimmer sowie

eine Verminderung der Bewegung im Laufe der Infektion detektiert. Des Weiteren konnte der Verlust der Proteasesekretion, der wie der metallische Schimmer mit einer Mutation im Quorum Sensing-System assoziiert sein muss, beobachtet werden. Auch ließ sich eine Erhöhung der Hämolyse- und Autolysefähigkeit sowie der Phagenproduktion nachweisen. Bei der Betrachtung des einzelnen Isolats für sich sind diese Veränderungen nur in sehr abgeschwächter Form erkennbar.

Die Ergebnisse der repräsentativen Auswahl an Isolaten von den 6 verschiedenen Patienten zeigten nur wenige stringente Veränderungen. Bei der Aktivität der Protease konnte in den Isolaten von 4 der 6 untersuchten Patienten ein Verlust der Aktivität nachgewiesen werden. Die Proteasesekretion wird über das Quorum Sensing System kontrolliert. Treten im Verlauf der Infektion Mutationen in diesem Bereich auf, ist auch die Aktivität der Protease betroffen. Der bereits in der Literatur beschriebene Bewegungsverlust (Mahentiralingam et al., 1994) konnte nicht in allen Fällen bestätigt werden. Im Patienten H29 konnte eine Verminderung aller drei verschiedenen Bewegungsformen nachgewiesen werden. Die Spätisolate der Patienten H5, H8 und H11 zeigten auch eine Einschränkung bzw. einen Verlust in der Bewegungsform des Schwimmens. In den meisten anderen Fällen aber war vor allem das Schwärmen und das Twitchen über den Verlauf der Erkrankung zwischen den verschiedenen Isolaten vergleichbar. Des Weiteren ließ sich erkennen, dass die Beweglichkeit, die durch das Twitchen ermöglicht wurde äquivalent auch beim Schwärmen detektiert werden konnte. Wenn es zu einem Anstieg beim Twitchen kam, wurde dieser auch beim Schwärmen nachgewiesen.

Sowohl bei der Hämolyse als auch bei der Überprüfung der Autolyse gab es Beispiele, in denen ein Verlust oder auch ein Erwerb dieser spezifischen Eigenschaft verzeichnet werden konnte.

Durch den Vergleich aller Isolate aus den ersten drei und den letzten drei Jahren der Besiedelung wurden die meisten Veränderungen, die bereits in der Literatur beschrieben wurden, bestätigt und weitere aufgezeigt. Dennoch ergab sich bei der Betrachtung jedes einzelnen Isolats über den Verlauf der Infektion ein anderes Bild. Es scheint, dass es im Verlauf der CF-Infektion zwar zu einer Adaptation der Klone an das Habitat Lunge kommt, es sich dabei allerdings nicht nur um einen Stamm handelt, sondern um eine Vielzahl an klonalen Varianten, die jeweils kleine spezifische Nischen der CF-Lunge besiedeln und sich danach optimal an diese eine Region anpassen. Durch die Vielzahl an verschiedenen Stämmen wurde bei der Probeentnahme nicht immer der gleiche Stamm zeitlich verfolgt und

somit die Anpassung dokumentiert. Vielmehr wurde zu jedem Isolationszeitpunkt eine andere klonale Variante isoliert, die durch die Besiedelung einer anderen Nische auch einem anderen Selektionsdruck unterlag und somit anders adaptiert war. Infolgedessen war die Dokumentation eines vollständigen Adaptationsprozesses von *P. aeruginosa* an die CF-Lunge schwierig. Diese Hypothese steht mit der bereits beschriebenen Vorgehensweise von *S. aureus* im Einklang. Hier wurde gezeigt, dass eine Diversifikation des Bakteriums während der chronischen Besiedelung einer CF-Lunge favorisiert ist. Eine hohe Diversität innerhalb eines CF-Patienten kann dabei von adaptivem Vorteil sein und die Fitness einer bakteriellen Gemeinschaft erhöhen (Goerke et al., 2007).

#### 4.6.3 Adhärenz von *P. aeruginosa* an Lungenepithelzellen

*P. aeruginosa* bindet über verschiedene Adhäsionsfaktoren an die Oberfläche des Lungenepithels und ermöglicht somit die Anlagerung (Adhäsion) an das Wirtsgewebe. Adhäsionsfaktoren sind bakterielle Oberflächenstrukturen mit eingelagerten Adhäsinen (Liganden), die durch spezifische Interaktion mit Wirtszellrezeptoren die Kolonisation im Wirt vermitteln und letztendlich eine chronische Besiedelung des Gewebes erst ermöglichen. Der Adaptationsprozess, der im Laufe der Infektion stattfindet, sollte sich auch im Bereich der Adhäsion erkennen lassen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb die Anheftung eines unadaptierten Bakteriums an das Lungenepithel mit der eines adaptierten verglichen.

Hierzu wurde jeweils das erste und das letzte sequentielle Isolat des Beobachtungszeitraums von jedem der 6 ausgewählten Patienten auf die Adhärenz an eine karzinogene, humane Lungenepithelzelllinie (A549-Zellen) überprüft. Die einzelnen Ansätze wurden jeweils 3-fach durchgeführt. Die Suspensionen wurden in den Verdünnungen  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  und  $10^{-3}$  ausplattiert. Die Verdünnung  $10^0$  wies in den meisten Isolaten mehr als 1000 Kolonien pro Platte auf. Da eine Auszählung der Kolonien hier nicht möglich war, wurde diese Verdünnung nicht mit in die Berechnung zur Adhärenz einbezogen. Zur besseren Veranschaulichung wurde der Quotient zwischen Früh- und Spätisolat gebildet und in Abb. 4.6.14 dargestellt.

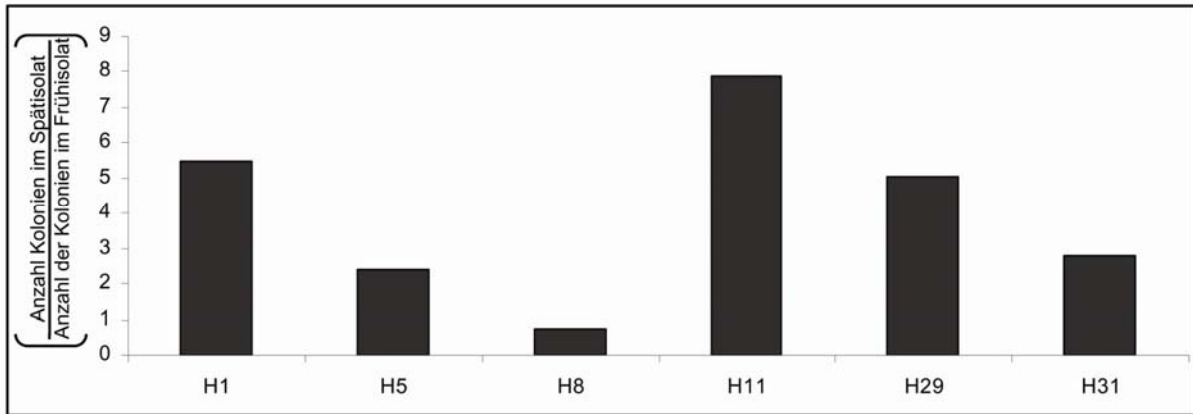


Abb. 4.6.14: graphische Darstellung der Adhärenzüberprüfung

In der graphischen Veranschaulichung (Abb. 4.6.14) lässt sich erkennen, dass in 5 von 6 Patienten das späte Isolat eine höhere Adhärenz zu den A549 Zellen zeigte als das frühe Isolat ( $p < 0,05$ ). Nur der Patient H8 zeigt zwischen Früh- und Spätisolat eine vergleichbare Adhärenz.

Der Patient H11 zeigt den größten Unterschied zwischen Früh- und Spätisolat. Das späte Isolat zeigte in diesem Versuch eine 8-fach erhöhte Adhärenz an das Lungenepithel im Vergleich zum frühen Isolat. Die Spätisolate der Patienten H1 und H29 wiesen eine etwa 5-fache Erhöhung in der Adhärenz auf und sowohl in H5 als auch in H31 wurde etwa eine 2-3 fache Erhöhung der Adhärenz zum Ende des Beobachtungszeitraums beobachtet.

Diskussion:

Bei den A549 Zellen handelt es sich um humane Lungenadenokarzinom-Zellen. Diese Zellen wachsen in 3-D Aggregaten und stellen somit ein relevantes physiologisches Modell zur Untersuchung von Interaktionen zwischen *P. aeruginosa* und dem Lungenepithel während einer CF-Infektion dar (Carterson et al., 2005). Die Adhärenz wird dabei über sogenannte Adhäsine vermittelt und bildet den initialen Schritt zur Kolonisation. In der Literatur wurden bereits eine Reihe von möglichen Adhäsinen diskutiert, die in der Pathogenese von Lungeninfektionserkrankungen eine Rolle spielen könnten (Saiman et al., 1992). Es konnte gezeigt werden, dass sialylierte Rezeptoren, die sowohl auf der Oberfläche von Lungenepithelzellen als auch auf Muzin vorzufinden sind, von *P. aeruginosa* erkannt werden (Baker et al., 1990; Vishvanath et al., 1985; Doig et al., 1989). Bakterielle Interaktionen mit dem menschlichen Muzin spielen bei der Eliminierung des Bakteriums durch das Immunsystem eine entscheidende Rolle. Die Besonderheit bei *P. aeruginosa* besteht darin, dass bei dieser Abwehrreaktion des CF-Patienten der größte Teil der Bakterien in den

Atemwegen verbleibt (Baltimore et al., 1998). Allerdings kommt es bei der Adhärenz eines Bakteriums nicht nur darauf an, initial zu binden, sondern es muss auch die Fähigkeit besitzen, in der CF-Lunge zu persistieren. Daher ist es für *P. aeruginosa* wichtig, an verschiedene Zuckerstrukturen, wie z.B. Epithelzellen und an Muzin, binden zu können. In der Regel tritt *P. aeruginosa* während der fortschreitenden CF-Erkrankung nicht in das Bronchialgewebe über, sondern bildet einen Biofilm mit assoziierten Mikrokolonien (Baltimore et al., 1989; Watnick & Kolter, 2000).

Es konnte nachgewiesen werden, dass durch die genetischen und phänotypischen Veränderungen des Bakteriums eine Adaptation an das Wirtsepithel stattfindet. Durch die Bestimmung der Adhärenz von Früh- und Spätisolaten wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob auch die Bindungsfähigkeit ein Charakteristikum ist, welches dem Anpassungsprozess des Bakteriums unterliegt. Da in diesem Versuch allerdings dem Medium kein Muzin zugesetzt worden war, konnte die Bindung nur an die anderen vorhandenen Zuckerstrukturen, in diesem Fall an die Epithelzellen, stattfinden. Da eine allgemeine Aussage über die Änderung der Bindungsfähigkeit getroffen werden sollte, reichte dieser Ansatz aus.

In 5 von 6 Patienten wies das späte Isolat im Vergleich zum Frühisolat eine stark erhöhte Adhärenz zum Lungenepithel auf ( $p < 0,05$ ). Da ein frühes Isolat unangepasst und ein spätes Isolat in der Regel gut adaptiert ist, ließ sich aus der Analyse schließen, dass adaptierte Stämme besser an das Lungenepithel binden konnten als unadaptierte. Demnach ist es für das Bakterium ein Vorteil, besser an die Wirtszellen binden zu können. Wenn ein *P. aeruginosa* in die Lunge eines CF-Patienten gelangt, bindet es an das Epithel und eine Kolonisation beginnt. Im Laufe der Infektion adaptiert sich dieser Klon immer besser an die Nische, die er besiedelt. Um über einen längeren Zeitraum diese Nische erfolgreich zu kolonisieren und sich gegen eventuelle Konkurrenten durchsetzen zu können, ist eine starke Adhärenz an vorhandene Zuckerstrukturen von großem Vorteil.

In einem der ausgewählten Patienten konnte dieser signifikante Anstieg in der Adhärenz während des Infektionsverlaufes nicht beobachtet werden. In diesem Fall zeigten das frühe und späte Isolat eine nahezu vergleichbare Bindungsfähigkeit. Der Wilcoxon-Rangsummentest ergab für diesen Patienten den niedrigsten Rang, und verdeutlichte somit den geringen Unterschied zwischen beiden Isolaten. Um diese Abweichung vom Gesamtergebnis erklären zu können, wurde ein definiertes Aliquot einer Übernachtskultur von beiden Isolaten ausplattiert und die Kolonienzahl mit der erwarteten verglichen. Es könnte z.B. sein, dass die einzelnen Bakterien eines Isolats stärker zusammenkleben, als die des

anderen und somit trotz vergleichbarer OD eine unterschiedliche Bakterienzahl für den Test eingesetzt wurde. Eine andere Möglichkeit wäre, dass ein Isolat eher die stationäre Phase des Wachstums erreicht als das andere und somit neben den wachsenden Zellen auch ein Teil der abgestorbenen Zellen auf die A459 Zellen gegeben wurden.

Bei der Betrachtung der Platten ließ sich erkennen, dass das Wachstum der Kolonien des Spätisolats im Vergleich zum Frühisolat stark eingeschränkt war. Die Anzahl der Kolonien beider Isolate war zwar vergleichbar, allerdings konnten auf der Platte des Spätisolats nur sehr kleine Kolonien gezählt werden. Nach längerer Inkubationszeit wuchsen auch diese kleinen Kolonien zu normal großen heran (siehe Abb. 4.6.15).

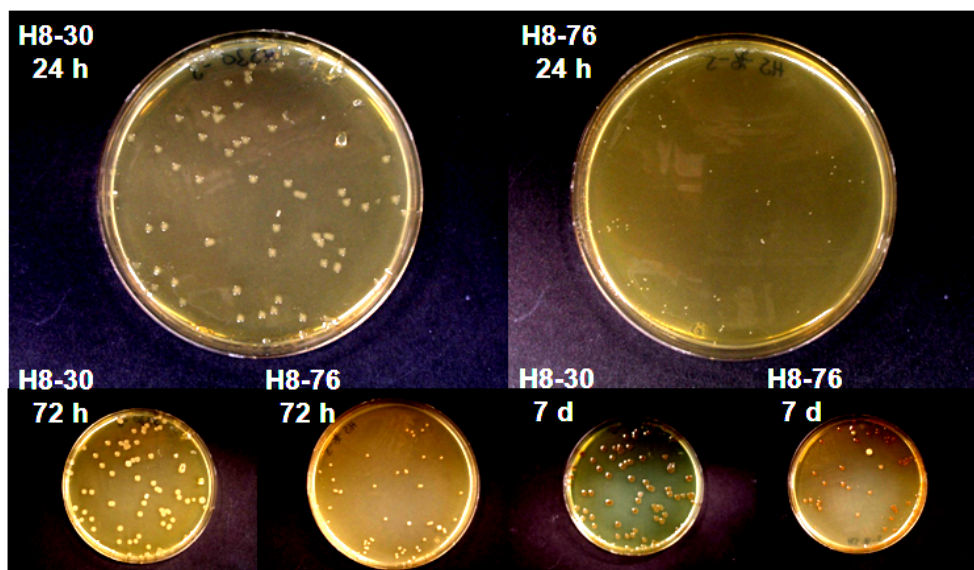


Abb. 4.6.15: Wachstum der Isolate H8-30 und H8-76 auf LB-Agar nach 24 h, 72 h und 7 d Inkubation

Aus der Literatur ist bekannt, dass sich im Laufe der CF-Infektion sogenannte „Small colony variants“ bilden. Ihr Auftreten wird durch selektiven Antibiotikadruck erhöht. Charakteristisch für SCVs sind die verringerte Wachstumsgeschwindigkeit im Vergleich zu normalen Kolonien sowie die erhöhte Resistenz gegenüber Antibiotika (Häussler et al., 1999). Während in einer Flüssigkultur das Wachstum der SCVs uneingeschränkt war, ergaben sowohl Wachstumsversuche auf Agarplatten als auch Kokultivierungsversuche in LB in der exponentiellen Phase ein deutlich geringeres Wachstum (Häussler et al., 2003). Im Bewegungsverhalten ergaben sich ebenfalls Unterschiede. Während bei den SCVs eine Verminderung der Flagellen assoziierten Bewegungsform (Schwimmen) beobachtet werden konnte, war die Bewegung, die durch Pili vollzogen wird, erhöht (Häußler et al., 2003). Wehmhohner et al. konnte 2002 nachweisen, dass SCVs eine verstärkte TypI Sekretion aufweisen und Deziel et al. (2001) detektierte eine erhöhte Pyocyaninproduktion in SCVs. Im

phänotypischen Vergleich des H8-Frühisolates mit dem H8-Spätisolat konnten einige dieser Befunde nachgewiesen werden. Neben dem verlangsamten Wachstum der Kolonien wies das Spätisolat auch eine erhöhte Pyocyaninproduktion, ein vermindertes Schwimmen und ein erhöhtes Twitching auf. Demzufolge handelt es sich bei dem Spätisolat des Patienten H8 wahrscheinlich um SCVs.

Diese Tatsache konnte allerdings nicht der Grund für das Ergebnis im Adhärenz-Assay sein, denn die Bakterien wurden zu Beginn in einer Flüssigkultur angeimpft und von dort auf die Epithelzellen gegeben. Aus der Literatur ist bekannt, dass SCVs in Flüssigkultur ein normales Wachstum zeigen (Häussler et al., 2003). Da aber auch die anderen beiden Gründe ausgeschlossen werden konnten, scheint es vielmehr der Fall gewesen zu sein, dass die Mikrokolonien im Spätisolat durch ihre geringe Größe auf der Platte nicht ausgezählt wurden. Wahrscheinlich war die Inkubationszeit der Platten für die Detektion dieser kleinen, langsamer wachsenden SCVs zu kurz. Um diese Aussage zu bestätigen, könnte das Experiment mit einer längeren Inkubationszeit der Agarplatten wiederholt werden.

#### **4.6.4 Virulenz- und Persistenzüberprüfung einiger sequentieller Isolate im Agarbead-Lungeninfektionsmodell**

In einer Kooperation mit Alessandra Bragonzi (European Institute for Cystic Fibrosis Research, Milano, Italien) wurden einige der ausgewählten sequentiellen Isolate nach der hier durchgeführten Phänotypisierung in Italien zur Überprüfung der Virulenz im Agarbead-Lungeninfektionsmodell getestet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in der Veröffentlichung von Bragonzi et al. (2009, akzeptiert beim *AJRCC*) dargestellt.

Für die in vivo Experimente wurden drei verschiedene Mauslinien verwendet:

- 6-8 Wochen alte C57Bl/6NCrIBR (Charles River) Mäuse (Tam et al., 1999; van Heeckeren et al., 2002)
- 8-10 Wochen alte C57Bl/6J (Jackson) männliche Mäuse
- 8-12 Wochen alte B6.129S6-Cftr<sup>tm1kth</sup> (Cftr<sup>ΔF508del/ΔF508del</sup> und Cftr<sup>+/+</sup>) männliche und weibliche Mäuse (Zeiber et al., 1995; van Heeckeren et al., 2004)

Es wurden jeweils  $1-2 \times 10^6$  CFU der sequentiellen Isolate von den Patienten H1, H5, H11 und H29 in Agarbeads eingebettet (Van Heeckeren et al., 2002; Cash et al., 1979; Bragonzi et



al., 2005) und die C57Bl/6NCrIBR Mäuse damit infiziert. Zum einen wurde die akute Mortalität anhand der Mäuse, die in den ersten 14 Tagen nach der Infektion mit *P. aeruginosa* verstarben, bestimmt. Zur Einschätzung des Infektionsgrads wurden von diesen Mäusen nach deren Tod die Lunge, die Bauchspeicheldrüse und die Leber entnommen, homogenisiert und ausplattiert.

Zum anderen wurde die chronische Persistenz/Infektion anhand der überlebenden Mäuse bestimmt. Hierfür wurden nach 14 Tagen Inkubationszeit die Lungen entnommen, ebenfalls homogenisiert und ausplattiert. Hier wurde eine CFU von > 1000 als chronische Persistenz/Infektion eingestuft.

Des Weiteren wurde die Lokalisation von *P. aeruginosa* in einzelnen Lungensektionen durch Immunofluoreszenz analysiert. Die Bakterien wurden hierbei indirekt durch ein Kaninchen Antiserum, welches spezifisch an *P. aeruginosa* bindet, markiert (Pier et al., 1982).

Die Ergebnisse der Infektionsversuche werden in Abb. 4.6.16 dargestellt.

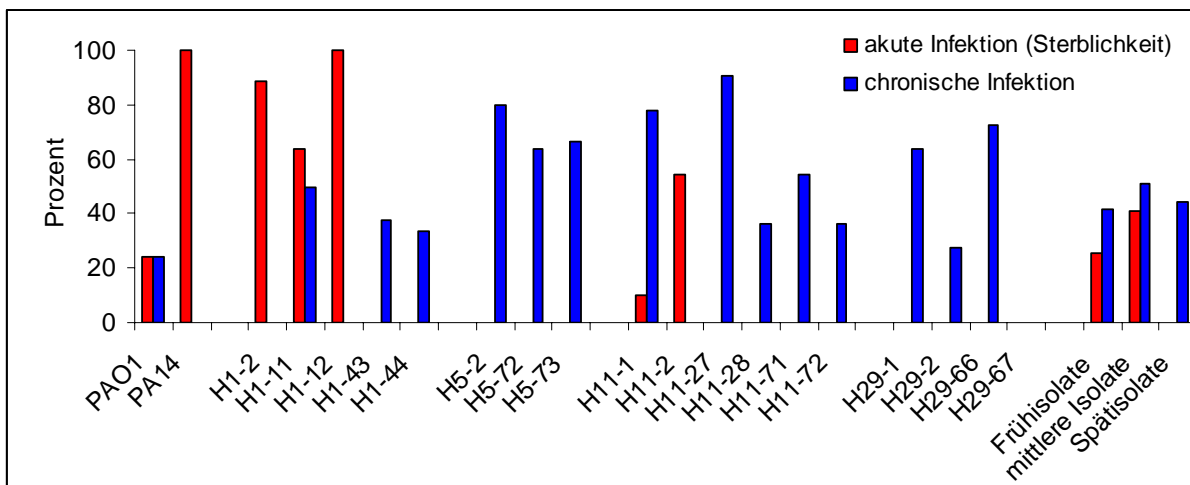


Abb. 4.6.16: Virulenz- und Persistenzüberprüfung einiger sequentieller Isolate im Agarbead-Lungeninfektionsmodell; rot dargestellt die Sterblichkeit der Mäuse; blau dargestellt die chronische Infektion

Im direkten Vergleich zwischen den beiden Referenzstämmen PAO und PA14 lässt sich erkennen, dass PA14 eine viel höhere akute Mortalität aufweist als PAO1. Ca. 25 % der mit PAO infizierten Mäuse wiesen nach 14 Tagen eine chronische Infektion mit *P. aeruginosa* auf. Bei PA14 verstarben alle infizierten Mäuse innerhalb der ersten 5 Tage nach Infektion.

Besonders die Früh- und Spätisolate des Patienten H1 zeigten in der akuten Mortalität große Unterschiede. Während die frühen und das mittlere Isolat eine hohe Sterblichkeit zeigten, fehlte diese bei den Spätisolaten vollständig. Dagegen konnte in einem der mittleren Isolate

und in beiden Spätisolaten eine chronische Infektion nachgewiesen werden. Der Patient H5 war mit dem Klon PA14 kolonisiert. Konträr zu den Ergebnissen des Referenzstamms PA14 ging von den PA14 Isolaten des Patienten H5 keine akute Mortalität aus, dafür zeichneten sich diese Isolate aber durch eine hohe chronische Persistenz aus. Ein vergleichbares Ergebnis konnte auch für die Isolate des Patienten H29 nachgewiesen werden. Bei einem Frühisolat des Patienten H11 wurde eine hohe akute Mortalität nachgewiesen, während das erste Frühisolat sowie die nachfolgenden Isolate die Fähigkeit zur chronischen Persistenz zeigten.

In das Diagramm wurden zusätzlich die durchschnittliche akute Mortalität sowie die chronische Persistenz, die von allen frühen, allen mittleren und allen späten Isolaten ausging, dargestellt. Während die Fähigkeit zur chronischen Persistenz in allen Isolaten in etwa vergleichbar war, konnte eine akute Mortalität nur in den frühen und mittleren Isolaten beobachtet werden. Es fiel auf, dass die mittleren Isolate mit einer höheren akuten Mortalität assoziiert waren als die frühen Isolate.

In einem nächsten Schritt wurde die Virulenz im Früh- und im Spätisolat des Patienten H1 in verschiedenen Mauslinien analysiert. Die Ergebnisse lassen sich aus Tab. 4.6.4 ablesen.

Es konnte zwischen dem Früh- und dem Spätisolat des Patienten H1 in der Mortalität ein signifikanter Unterschied vermessen werden. In allen vier Mausstämmen wurde mit dem Frühisolat eine hohe Mortalität detektiert (50 % - ca. 90 %). Keine Maus, die das Spätisolat in ihrer Lunge trug, verstarb während des Versuches.

Die Betrachtung der Infektionswahrscheinlichkeit ergab, dass keine Maus mit einem Frühisolat eine chronische Infektion entwickelte. Auch bei den Mäusen, die mit dem Spätisolat infiziert worden waren, erkrankten nur 3 C57Bl/6NCrIBR-Mäuse an einer chronischen Infektion mit *P. aeruginosa*.

Tab. 4.6.4: Virulenz von Früh- und Spätisolat des Patienten H1 in B6.129S6-*Cfr*<sup>tm1kth</sup> und in C57Bl/6 mit NCrIBR und J genetischem Hintergrund; n = Anzahl der gepoolten Mäuse für jedes Experiment; die statistische Signifikanz wurde nach Mann und Whitney berechnet: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001

Maus-Stamm	Mortalität [%] (n)		Chronische Infektion [%] (n)	
	H1-2	H1-43	H1-2	H1-43
<b>C57Bl/6NCrIBR</b>	88,9 (8/9)	0 (0/8)**	0 (0/1)	37,5 (3/8)
<b>C57Bl/6J</b>	80 (8/10)	0 (0/10)**	0 (0/2)	0 (0/10)
<i>Cfr</i> <sup>+/+</sup>	71,4 (10/14)	0 (0/19)***	0 (0/4)	0 (0/19)
<i>Cfr</i> <sup>-ΔF508/ΔF508</sup>	50,0 (4/8)	0 (0/12)*	0 (0/4)	0 (0/12)

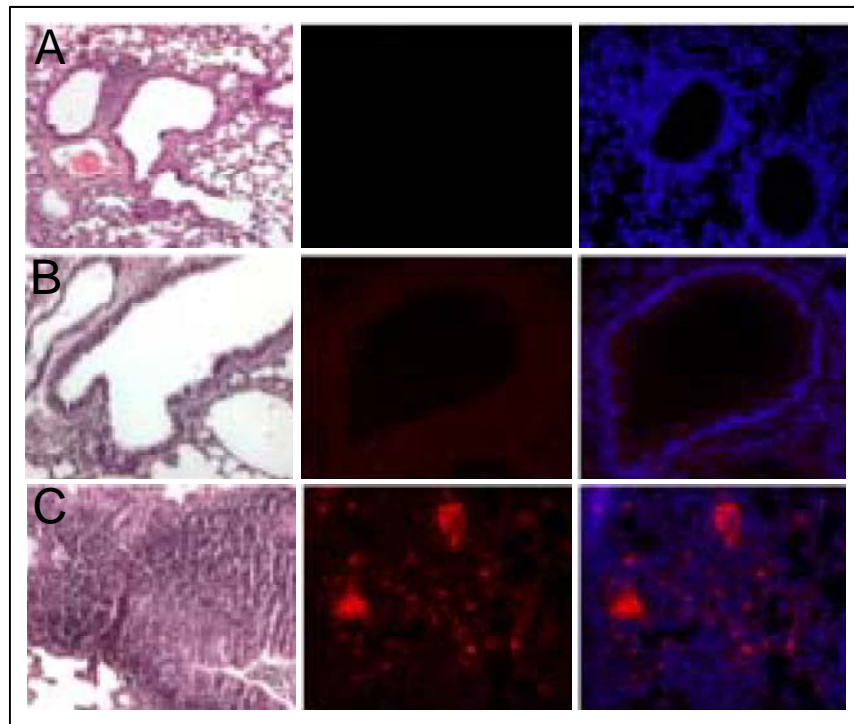


Abb. 4.6.17: Immunofluoreszenzaufnahme einer Infektion mit *P. aeruginosa*; A: Umweltisolat; B: Isolat H1-2 (Frühisolat); C: Isolat H1-43 (Spätisolat); (Teildarstellung aus Bragonzi et al., 2009)

Abb. 4.6.17 zeigt die Infektion mit *P. aeruginosa* dokumentiert durch eine Immunofluoreszenzaufnahme. In Teil A ist Lungengewebe dargestellt, welches mit einem *P. aeruginosa* Umweltisolat infiziert worden ist. Es ließen sich keine Inflammationsanzeichen im Lungengewebe feststellen. Dagegen konnte eine leichte Entzündung in der Infektion einer Maus mit dem Frühisolat des Patienten H1 dokumentiert werden (Teil B). Die deutlichste Entzündung zeigte das *in vivo* Experiment mit dem Spätisolat von H1 (Teil C).

#### Diskussion:

In der Literatur konnte bereits gezeigt werden, dass sich zu Beginn einer CF-Infektion aus einem Klon eine Vielzahl an genetischen klonalen Varianten bildet, die im weiteren Verlauf der Infektion nebeneinander in der CF-Lunge existieren (Smith et al., 2006). Durch die in diesem Kapitel beschriebenen *in vivo* Experimente konnte zum ersten Mal die hochvariable Pathogenese verschiedener klonaler Varianten dokumentiert werden. Die Überprüfung von CF-Isolaten mit der gleichen klonalen Variante zeigte zu Beginn und nach einigen Jahren Besiedelung eine unterschiedliche Virulenz. Der Referenzstamm PA14 wurde ursprünglich aus einer Brandwunde isoliert und entspricht somit einem Isolat aus einer akuten Infektion, welches mit einer starken Mortalität assoziiert ist. Der PA14-Klon aus dem Patienten H5

dagegen zeigte in keinem der untersuchten Isolate eine akute Infektion. Die Herkunft eines Isolats ist somit entscheidend für das Virulenzpotential.

Es wurde beobachtet, dass Isolate eines Entnahmezeitpunkts teilweise ein variierendes pathogenes Potential aufwiesen. Diese Ergebnisse führen zu der Hypothese, dass eine Mikroevolution zur Existenz von verschiedenen Varianten mit unterschiedlicher Virulenz führt. Eine hohe Diversität führt zu einem Vorteil für die Gemeinschaft und führt zu einer besseren und schnelleren Anpassung an die verschiedenen Nischen der Lunge. Weiter konnten die *in vivo* Experimente zeigen, dass sich *P. aeruginosa* in der CF-Lunge zu einem Persistor entwickelt, der mit einer chronischen Infektion verbunden ist. Durch die Anpassung an das Habitat kommt es zu einer Selektion der weniger virulenten Stämme. Daher waren Spätisolate im Agarbead-Mausmodell mit einer geringeren Mortalität assoziiert als Frühisolate.

Die vergleichbare Fähigkeit zur chronischen Infektion von Umwelt- und frühen CF-Isolaten unterstützt die Tatsache, dass es sich bei frühen CF-Isolaten um „normale“ Klone aus der Umwelt handelt. Beide besitzen ein ähnliches Repertoire an Virulenzmechanismen, erst durch die Adaptation an die CF-Lunge verändert sich das Genom so, dass der Selektionsdruck möglichst minimal wird.

#### **4.6.5 Wachstumsverhalten sequentieller Isolate unter verschiedenen Nährstoffbedingungen**

Das Wachstumsverhalten der insgesamt 24 verschiedenen sequentiellen Isolate wurde in unterschiedlichen Wachstumsexperimenten miteinander verglichen.

Hierzu wurde das Wachstum jedes Isolats einzeln sowohl in zwei verschiedenen Vollmedien als auch in einem Minimalmedium überprüft.

Als Vollmedien wurde zum einen LB und zum anderen das „Artificial Sputum Medium“, ASM (Sriramulu et al., 2005), verwendet. Beim Minimalmedium handelte es sich um ein M9-Medium, dem als Kohlenstoffquelle 1 % Glycerin zugegeben worden war.

Die Isolate wurden für das Wachstumsexperiment am Abend vor dem Versuchsstart in LB-Medium angeimpft und bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die OD der einzelnen Übernachtskulturen photometrisch bestimmt und eine neue 50 ml Kultur mit einer OD von 0,1 inokuliert. Für jedes Medium wurde ein Doppelerperiment durchgeführt.

Die Probeentnahme zur kontinuierlichen OD-Messung erfolgte in den drei Medien nach folgenden Inkubationszeiten:

1. LB-Medium: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 30, 55 und 78 h
2. ASM: 4, 8, 10, 26, 33, 54 und 70 h
3. Minimalmedium: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 26, 35, 50, 79 und 124 h

Die ermittelten OD-Werte wurden anschließend graphisch ausgewertet und sind in den Abb. 4.6.18, 4.6.19 und 4.6.21 dargestellt.

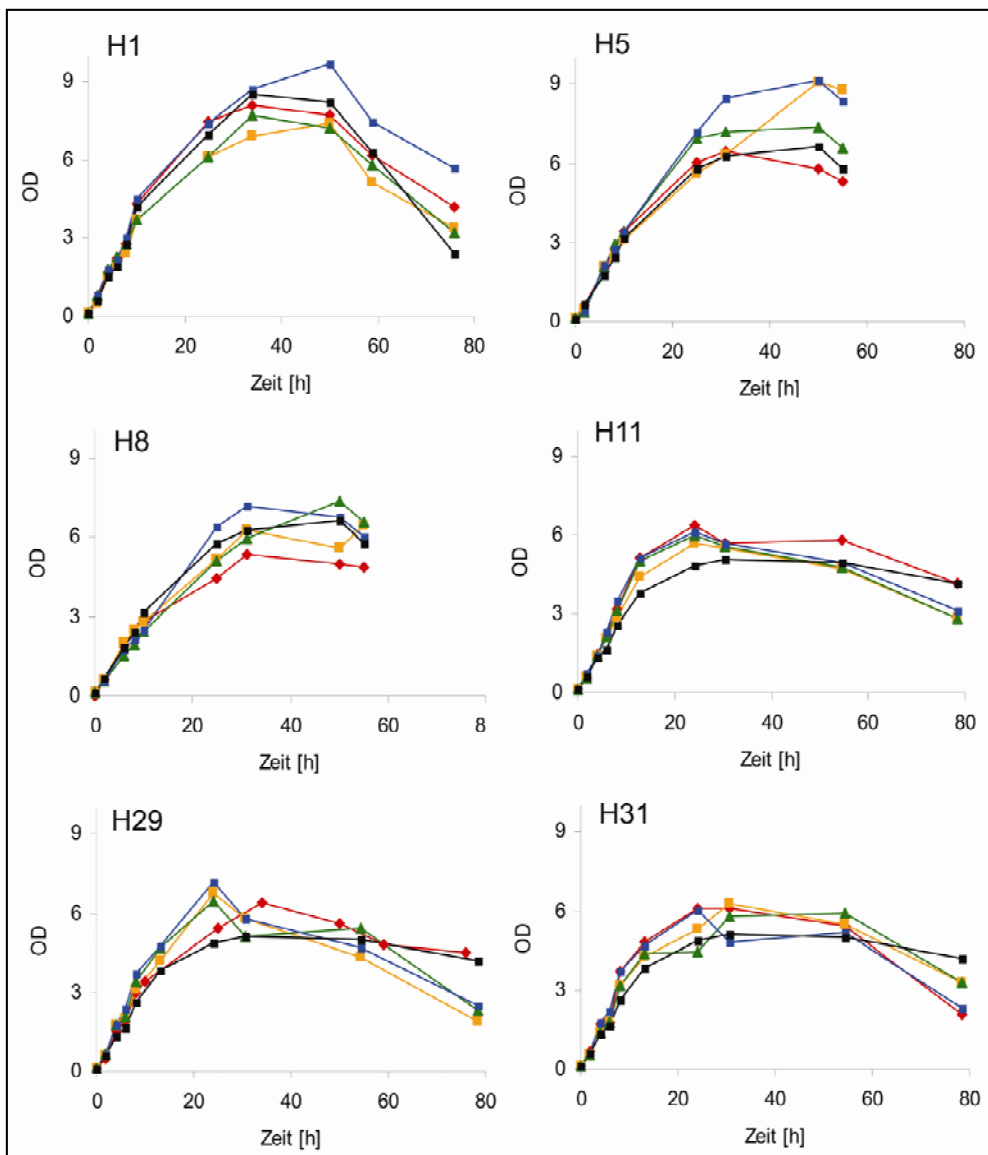


Abb. 4.6.18: Wachstumsexperimente der sequentiellen Isolate in LB; rot = 1. Isolat (früh), gelb = 2. Isolat; grün = 3. Isolat; blau = 4. Isolat (spät); schwarz = Referenzstamm PAO

Aus der Abb. 4.6.18 lässt sich das Wachstumsverhalten der sequentiellen Isolate in Vollmedium LB erkennen. Bei Betrachtung aller Kurven wird deutlich, dass das Wachstum der verschiedenen Isolate innerhalb eines Patienten sehr vergleichbar ablief.

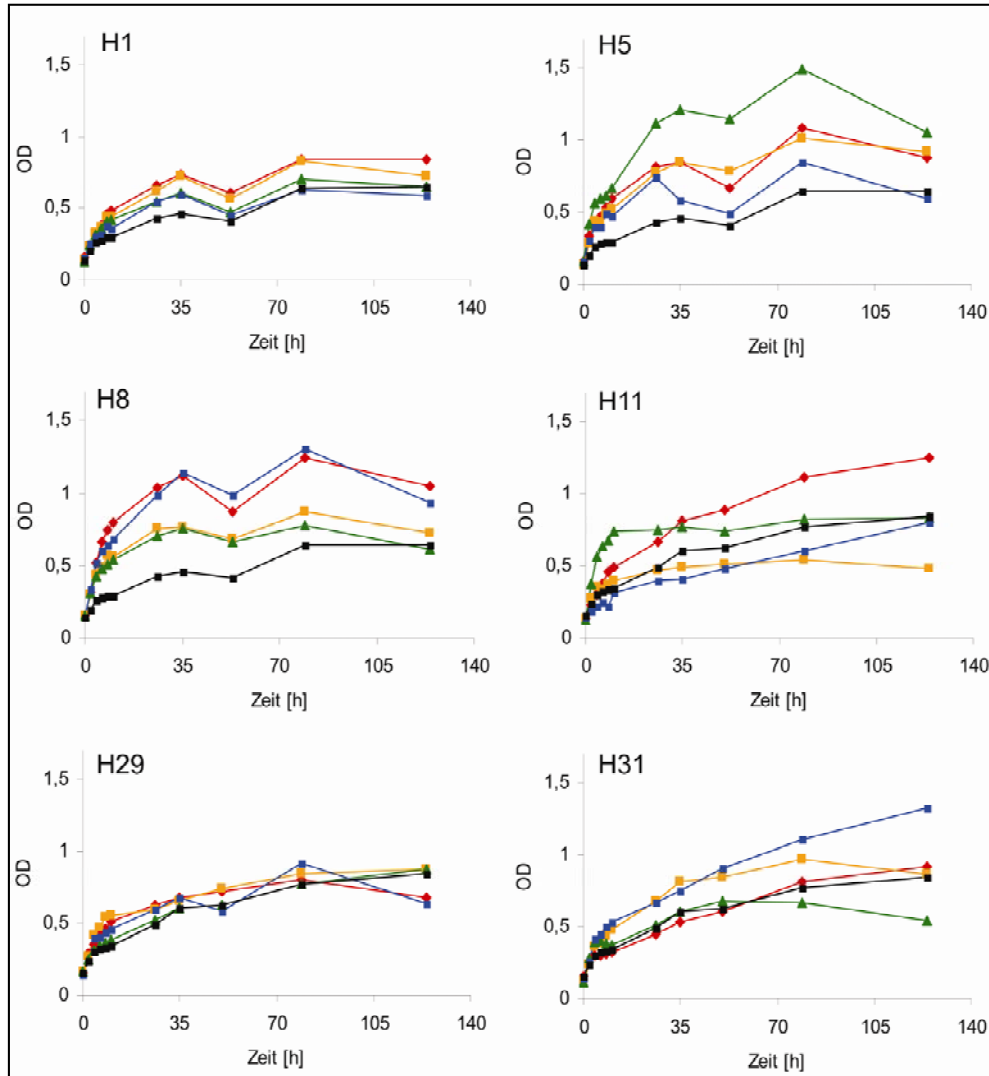


Abb. 4.6.19: Wachstumsexperimente der sequentiellen Isolate in Minimalmedium; rot = 1. Isolat (früh), gelb = 2. Isolat; grün = 3. Isolat; blau = 4. Isolat (spät); schwarz = Referenzstamm PAO

In der Abb. 4.6.19 sind die Ergebnisse der Wachstumsexperimente in Minimalmedium dargestellt. Es ließ sich nach erster Betrachtung im Vergleich zum Wachstum in LB-Medium ein verlangsamtes Wachstum über einen längeren Zeitraum hinweg beobachten.

Die sequentiellen Isolate der Patienten H1 und H29 zeigten innerhalb eines Patienten einen vergleichbaren Wachstumsverlauf. Bei den anderen Patienten konnten bei einzelnen Isolaten innerhalb eines Patienten leichte Abweichungen vom Wachstumsverlauf der anderen Isolate beobachtet werden. Z.B. zeigte beim Patienten H11 das Frühisolat oder beim Patienten H31 das Spätisolat ein erhöhtes Wachstum.

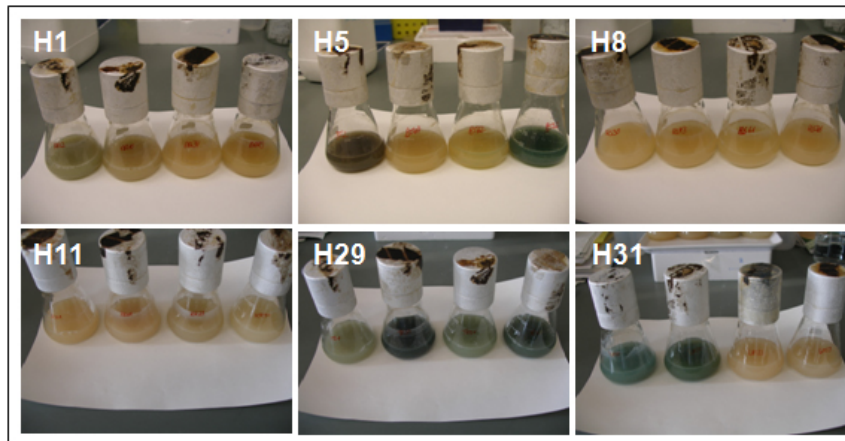


Abb. 4.6.20: Aussehen der verschiedenen ASM-Kulturen nach 70 h Inkubationszeit

In Abb. 4.6.20 werden die verschiedenen ASM-Kulturen nach dem Ende des Wachstumsexperiments dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass sich einige der Kulturen über den Verlauf des Versuchs grün verfärbt haben, während andere ihre von Beginn an gelbe Farbe beibehielten. Im Vergleich mit der Pyocyanin-Messung, die in KingB-Medium vorgenommen wurde, ließen sich aber keine Ähnlichkeiten entdecken.

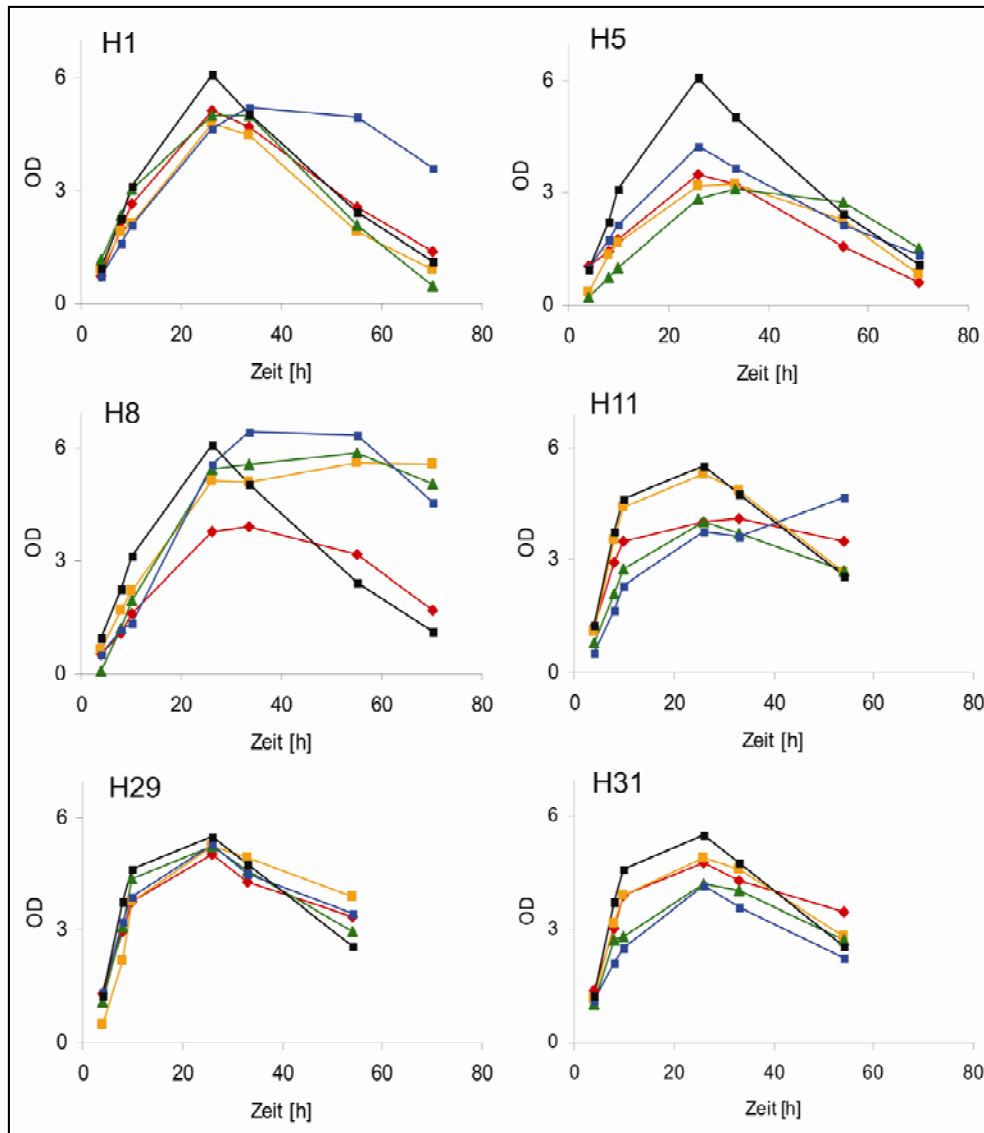


Abb. 4.6.21: Wachstumsexperimente der sequentiellen Isolate in ASM; rot = 1. Isolat (früh), gelb = 2. Isolat; grün = 3. Isolat; blau = 4. Isolat (spät); schwarz = Referenzstamm PAO

Weiter werden in Abb. 4.6.21 die Ergebnisse des Wachstums in ASM graphisch veranschaulicht. Es konnte beobachtet werden, dass der zeitliche Wachstumsverlauf in ASM mit dem in LB vergleichbar war. Zwischen den sequentiellen Isolaten des jeweiligen Patienten wurden allerdings etwas mehr Abweichungen entdeckt. Während vier der Patienten in allen sequentiellen Isolaten ein vergleichbares Wachstum aufwiesen, gab es bei den Patienten H1 und H8 Unterschiede in den Verläufen. Bei dem Patienten H1 konnte ein stärkeres Wachstum für das Spätisolat verzeichnet werden, während das Frühisolat des Patienten H8 im Vergleich zu den anderen Isolaten des Patienten ein stark reduziertes Wachstum aufwies.



Zur besseren Veranschaulichung und Übersicht dieser Wachstumsdaten wurden die Ergebnisse in einem Rangtest dargestellt. Für diesen Test wurde für alle drei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen der Quotient aus der OD von Früh- zu Spätisolat gebildet, der Größe nach sortiert und Ränge vergeben (siehe auch Kapitel 3.1.8.4). Das Vorzeichen der Differenz blieb dabei auch als Vorzeichen des Rangs.

In Abb. 4.6.22 werden die Ergebnisse des Rangtests dargestellt. Blau markierte Felder bedeuten, dass zu diesem Zeitpunkt das Wachstum des Spätisolats überwog, während gelb markierte Felder das stärkere Wachstum des Frühisolats verdeutlichen.



Abb. 4.6.22: Darstellung der Wachstumsergebnisse aller drei Wachstumsbedingungen durch Rangzahlen; gelb = Frühisolat wächst besser als Spätisolat; blau = Spätisolat wächst besser als Frühisolat

Sowohl in LB-Medium als auch in ASM zeigen die meisten Spätisolate ein besseres Wachstum als die Frühisolate. In Minimalmedium dagegen überwog das Wachstum in den Frühisolaten anstatt in den späteren Isolaten.

Diskussion:

Um den Einfluss der Adaptation eines Klons an die CF-Lunge in Bezug auf die Wachstumsfähigkeit zu prüfen, wurden mit den sequentiellen Isolaten Wachstumsversuche unter variierenden Nährstoffbedingungen durchgeführt. Das LB-Medium, welches eines der Vollmedien darstellte, sollte bei diesen Versuchen die Laborbedingungen repräsentieren. Bei dem anderen Vollmedium handelte es sich um das „Artificial Sputum Medium“ (ASM) von

Sriramulu et al. (2005), welches die Umgebung einer Lunge imitieren sollte. Um das Medium den Bedingungen in der Lunge anzupassen, wurde z.B. Eigelb, DNA und Muzin zugefügt. Das Minimalmedium, dem als einzige Kohlenstoffquelle 1 % Glycerin zugefügt wurde, imitiert die Umwelt. In der Umwelt herrscht zwar ein breites Nährstoffangebot, allerdings besteht hier die Frage nach der Verfügbarkeit der einzelnen Quellen. Die meisten Bakterien in der Umwelt können sich nur einen Nährstoff als Nahrungsquelle nutzbar machen, denn aus der Literatur ist bekannt, dass viele Bakterien (auch *P. aeruginosa*) eine sogenannte „*Catabolite repression control*“ („Katabolische Repressionskontrolle“) aufweisen (Collier et al., 1996). Die Expression eines Cis-aktivierenden katabolischen-Repressionselements (CRE) bewirkt eine Repression von Enzymen und Transportern des Kohlenhydratstoffwechsels. Diese Kontrolle gewährleistet, dass die Bakterien erst nur eine Nährstoffquelle verbrauchen, bevor der Stoffwechsel auf den Abbau einer zweiten Nährstoffquelle umgeschaltet wird.

Im direkten Vergleich der Ergebnisse aller drei Wachstumsbedingungen ließ sich erkennen, dass die beiden Vollmedien LB und ASM vergleichbare Ergebnisse lieferten. In der Veröffentlichung von Palmer et al. (2005) wurde ein Medium zur Imitation der CF-Lunge verwendet, welches 2 % Casaminosäuren enthielt. Da auch LB caseinhydrolysierte Aminosäuren enthält, könnten so die ähnlichen Wachstumsverläufe erklärt werden.

Durch die Auswertung mit Hilfe eines Rangtests konnte eine wertende Analyse zwischen Früh- und Spätisolat eines Patienten erfolgen. Somit war es möglich, einen direkten Vergleich zwischen dem unadaptierten, aus der Umwelt stammendem Frühisolat und dem adaptierten Spätisolat anzustreben. Die Ergebnisse der Wachstumsversuche bestätigten die bisherigen Vermutungen, dass ein Frühisolat, welches zu einem Umweltstamm eine hohe Analogie aufweist, in einem Medium mit begrenzter Nährstoffquelle (dargestellt durch das Minimalmedium) gegenüber einem Spätisolat, das genetisch durch die Adaptation weit von einem Umweltstamm entfernt ist, einen Wachstumsvorteil aufzeigt. Im Gegensatz dazu zeigen besser adaptierte Stämme (Spätisolate) ein höheres Wachstum in Medien mit einem breiten Nährstoffangebot als die unadaptierten Frühisolate. Durch die Anpassung weisen Spätisolate aus der CF-Lunge häufig Mutationen in der katabolischen Repressionskontrolle auf (Silo-Suh et al., 2005). Somit ist diese ausgeschaltet und die *P. aeruginosa* können mehrere Nährstoffquellen zur gleichen Zeit verwerten. Dadurch wird die Wachstumsfähigkeit dieser Isolate erhöht und daraus resultierend zeigten die Spätisolate in den durchgeführten Experimenten ein erhöhtes Wachstumsverhalten gegenüber den Frühisolaten.

#### 4.6.6 Fitnessexperimente mit Früh- und Spätisolaten

Nach den Wachstumsversuchen in getrennten Experimenten wurden Konkurrenzexperimente zwischen Früh- und Spätisolaten zur Beurteilung ihrer Fitness durchgeführt. Dazu wurden Früh- und Spätisolate in einer Wachstumskultur vereinigt und das Wachstum dieser Mischkultur über einen definierten Zeitraum beobachtet. In einer anschließenden Analyse wurde betrachtet, ob es zu einer gegenseitigen Beeinträchtigung der Isolate im Wachstum kommt. Kann sich vielleicht nur ein Stamm durchsetzen und den anderen verdrängen oder wachsen beide Stämme ohne gegenseitige Beeinflussung uneingeschränkt nebeneinander?

Mit diesen Versuchen sollte die Auswirkung der Adaptation von *P. aeruginosa* an die CF-Lunge auf die Überlebensfähigkeit in verschiedenen Habitaten analysiert werden. Dabei stellte sich die Frage, ob die Akkumulation der pathoadaptiven Mutationen zu einem Fitnessvorteil in anderen Habitaten oder gegenüber den nicht-adaptierten Frühisolaten führt. Können Stämme, die an die CF-Lunge adaptiert sind, an die Umwelt freigesetzt werden und dort weiter persistieren? Resultiert aus der Anpassung an die CF-Lunge eine erhöhte Ansteckungsgefahr für andere CF-Patienten?

Bevor die Fitnessexperimente gestartet werden konnten, mussten in einem ersten Schritt geeignete Marker gesucht werden, um die beiden Isolate während des Wachstumsexperiments voneinander unterscheiden zu können.

##### 4.6.6.1 Markersuche und Optimierung

Zur Differenzierung von Früh- und Spätisolaten eignen sich folgende Marker:

- die An- bzw. vollständige Abwesenheit eines Gens/Genabschnitts
- SNPs

Eine Markierung der Stämme zur Differenzierung zwischen den Isolaten wurde nicht verwendet, da dadurch in der Regel das Verhalten der Bakterien beeinflusst worden wäre.

In einem ersten Schritt der Markersuche wurden die bereits durchgeführten Genotypisierungen der ausgewählten Isolate auf evt. verlässliche Marker überprüft. Hieraus ergaben sich allerdings keine verwendbaren Marker.

Analyse des Pyoverdinclusters:

Aus der Literatur ist bekannt, dass es sich beim Pyoverdincluster um einen der hochvariabelsten Abschnitte des gesamten *P. aeruginosa* Genoms handelt (de Chail et al., 2003; Lamont & Martin, 2003; Ravel & Cornelis, 2003). Dieser Gencluster schien daher geeignet, SNPs als potentielle Marker zu identifizieren. Zur Überprüfung des Pyoverdinclusters auf vorhandene SNPs wurden für einzelne Abschnitte des *fpvA*-Typs 1 und 2 an den Stellen mit höchster Variabilität (nach de Chail et al., 2003) insgesamt fünf verschiedene PCR-Produkte amplifiziert. Die Sequenzen für die Primer sind im Anhang in Tab. 10.2.2 aufgelistet.

Nach der Optimierung der PCR-Bedingungen wurden für alle 24 sequentiellen Isolate die fünf verschiedenen Genabschnitte per PCR amplifiziert und anschließend je zwei der PCR-Produkte für alle 4 Isolate der 6 Patienten sequenziert.

In Abb. 4.6.23 wird am Beispiel des Patienten H11 die Sequenzierung eines der PCR-Produkte dargestellt.

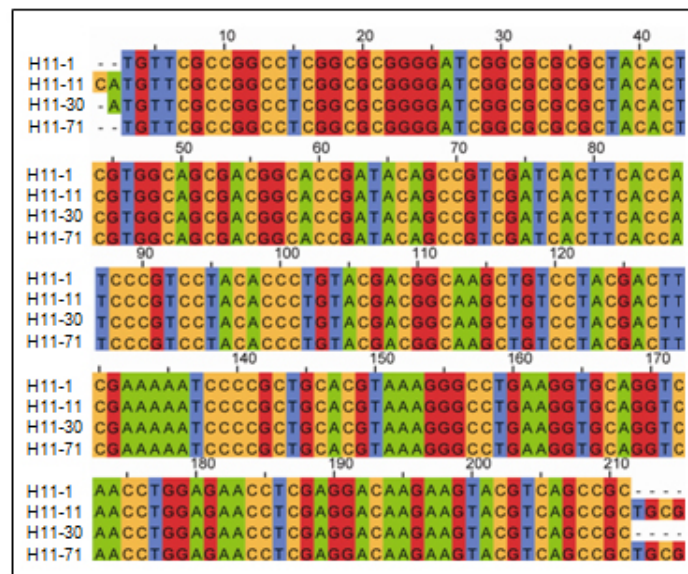


Abb. 4.6.23: Sequenzierergebnisse eines PCR-Produkts des Gens *fpvA*; Dargestellt sind die Sequenzen der vier Isolate des Patienten H11

Es lässt sich in dem in Abb. 4.6.23 gezeigten Beispiel eine 100%ige Sequenzübereinstimmung erkennen. Alle anderen Sequenzierungen erbrachten ein analoges Ergebnis. Es konnte keine Sequenzabweichung innerhalb der sequentiellen Isolate eines Patienten gefunden werden. Auch der Vergleich zu PAO1, der schon in den vorigen Experimenten als Referenzstamm diente, wies maximal eine Sequenzvariation auf. Die gesamte restliche Sequenz stimmte auch hier überein. Die Sequenz des PAO Pyoverdin-Gens

wies ebenfalls nur kleine Variationen zur Pyoverdin-Sequenz des veröffentlichten PAO-Stamms (Stintzi et al., 1996) auf. Im direkten Vergleich der Sequenzierung fanden sich auch unter den Isolaten von den verschiedenen Patienten keine Sequenzvarianten.

Somit konnten bisherige Veröffentlichungen, in denen *FpvA* (PA2389) als Gen mit der größten Variabilität (über 50 % Sequenzvielfalt) dargestellt wurde (de Chail et al., 2003; Lamont & Martin, 2003; Ravel & Cornelis, 2003) nicht bestätigt werden. Darausfolgernd wurde in der Literatur beschrieben, dass diese auftretenden Variationen innerhalb eines Typs als starker Beweis für positive Selektion angesehen werden können (Ghysels et al., 2004; Smith et al., 2005). Auch diese Aussage konnte nicht bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung für die von der Literatur abweichenden Ergebnisse könnte sein, dass es entweder eine negative oder keine Selektion auf das *fpv*-Gen in den hier untersuchten Isolaten gegeben hat.

Durch die fehlenden Sequenzvarianten in den untersuchten Isolaten ließen sich keine potentiellen Marker für die Auswertungen der Fitnessexperimente identifizieren.

#### Analyse von *mucA*:

Ein Kennzeichen für eine Adaptation von *P. aeruginosa* an eine Nische innerhalb der CF-Lunge ist mit dem Auftreten von mukoiden, alginat-überproduzierenden Morphotypen assoziiert. Dieses Phänomen ist in den meisten Fällen mit einer Stopmutation im *mucA* Gen verbunden (Martin et al., 1993a, b).

In der Veröffentlichung von Bragonzi et al (2006) wurden *mucA*, *mucB* und *mucD* aus verschiedenen Umweltisolaten und Isolaten von CF-Patienten sequenziert und auf eventuell vorhandene Mutationen analysiert. Zu den sequenzierten Proben gehörten auch verschiedene Isolate der Patienten H1, H5, H11 und H29. Im Patienten H1 wurde im Frühisolat keine Mutation nachgewiesen, aber im Spätisolat H1-43 konnte eine Mutation in *mucA* detektiert werden. Hierbei handelte es sich um die Deletion eines Adenosins an der Position 358 (siehe Abb. 4.6.24). Dieser SNP konnte als Marker für das Konkurrenzexperiment herangezogen werden.

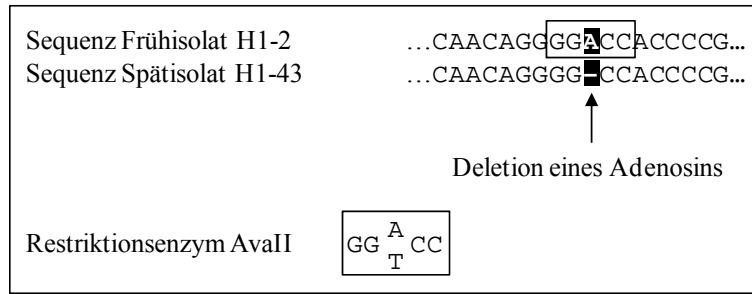


Abb. 4.6.24: Veranschaulichung der Mutation im Spätisolat des Patienten H1

In nachfolgenden Experimenten wurde der SNP im Spätisolat des Patienten H1 verifiziert und als verwendbarer Marker zur Unterscheidung zwischen Früh- und Spätisolat optimiert.

In Abb. 4.6.25 lässt sich der SNP anhand eines spezifischen Bandenmusters von *mucA* ohne Mutation unterscheiden. Hierzu wurde von den Isolaten H1-2 und H1-43 *mucA* in einer PCR amplifiziert (Sequenzen der beiden Primer in Tab. 10.2.2 des Anhangs) und mit einem spezifischen Restriktionsenzym (AvaII) verdaut. Die Erkennungssequenz dieses Enzyms lautet  $GG \frac{A}{T} CC$  (siehe Abb. 4.6.24). Im Frühisolat ohne Mutation kann das Enzym demnach an dieser Stelle schneiden, während das Adenosin an der Stelle im Spätisolat deletiert war und somit das Enzym an dieser Position nicht schneiden konnte. Das *mucA* des frühen Isolats ergab nach dem Verdau somit 4 Fragmente, das Spätisolat dagegen nur 3 (siehe Abb. 4.6.25). Zusätzlich wurde PAO als Kontrolle verwendet, da hier keine *mucA*-Mutationen bekannt sind.

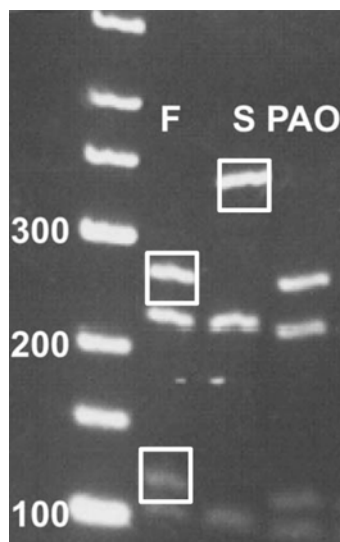


Abb. 4.6.25: spezifischer Restriktionsverdau in *mucA* der Isolate H1-2 und H1-43; Auftragung: 100 bp DNA-Ladder (Fermentas), F = Frühisolat H1-2; S = Spätisolat H2-43; PAO = Referenz (ohne *mucA* bekannte Mutation); gekennzeichnet sind die charakteristischen Banden für das jeweilige Isolat

Es lässt sich erkennen, dass die Bandenmuster gut differenzierbar sind. In einer Mischkultur beider Isolate sind die Banden bei ca. 280 bp und 120 bp charakteristisch für das Frühisolat. Die charakteristische Bande für das Spätisolat liegt bei ca. 380 bp.

Dieser SNP in *mucA* wurde in den Konkurrenzexperimenten zur Unterscheidung zwischen Früh- und Spätisolat verwendet.

Analyse des *lasR*-Gens:

Genetische Analysen von *P. aeruginosa* aus den Atemwegen verschiedener CF-Patienten haben außerdem ergeben, dass zu den häufigsten mutierten Genen in CF-Isolaten auch *lasR* gehört (Smith et al., 2006). In dieser Veröffentlichung wurde in 19 von 30 CF-Patienten eine Mutation in diesem Gen detektiert. Die meisten der *lasR*-Mutanten trugen eine Mutation, die zu einem Verlust der Genfunktion führte, in vier Fällen wurden in *lasR* gleich zwei Mutationen nachgewiesen. Diese Daten weisen auf einen starken Selektionsdruck in den Atemwegen von CF-Patienten hin, der mit einem Verlust der LasR-Funktion assoziiert ist.

Da *lasR* demnach auch zu den Regionen gehört, die sich im Laufe der CF-Infektion verändern, lassen sich hier mit großer Wahrscheinlichkeit potentielle SNPs als Marker für die Fitnessexperimente detektieren.

In einem ersten Schritt wurden die sequentiellen Isolate nach dem Protokoll von D'Argenio et al. (2007) auf eine Mutation im *lasR* überprüft. Hierzu wurden die Isolate auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei den Isolaten mit einer *lasR* Mutation bildete sich ein metallischer Schimmer der Oberfläche. Dieser wurde bereits 1899 das erste Mal beschrieben und mehrmals bestätigt (Zierdt et al., 1971). Der sichtbare metallische Schimmer ist dabei mit der Lyse der Zellen assoziiert (Zierdt et al., 1971; D'Argenio et al., 2002). In Tab. 4.6.5 sind die Ergebnisse dieser Überprüfung dargestellt.

Tab. 4.6.5: Darstellung des metallischen Schimmers der Kolonieoberfläche auf LB-Platten; + kennzeichnet eine metallisch-schimmernde Oberfläche; - bedeutet keine metallische Oberfläche; F = Frühisolat; S = Spätisolat

	1. Isolat (F)	2. Isolat	3. Isolat	4. Isolat (S)
H1	-	-	-	-
H5	-	-	+	+
H8	-	-	-	-
H11	+	-	(+)	-
H29	+	-	-	-
H31	-	-	+	+

Die Isolate, die einen metallischen Schimmer zeigten, sind in der Tab. X mit einem „+“ gekennzeichnet. Alle Isolate, die keinen Schimmer aufwiesen, bekamen ein „-“. Nach der

Veröffentlichung von Smith et al. (2006) und D'Argenio et al. (2007) sollte es in den meisten Patientenisolaten im Laufe der Infektion zu einer Mutation im *lasR* Gen gekommen sein. Bei Betrachtung der Ergebnisse dieser Untersuchung lässt sich erkennen, dass nur in den Isolaten von 2 Patienten (H5 und H31) über den Verlauf der Infektion ein metallischer Schimmer und somit eine Mutation im *lasR* dokumentiert werden konnte. In den Patienten H1 und H8 wies keines der Isolate einen metallischen Schimmer auf und in den Patienten H11 und H29 zeigten zwar die Frühisolate eine schimmernde Oberfläche, diese ließ sich aber im Laufe der Infektion nicht mehr nachweisen.

Trotz dieser Ergebnisse wurden von allen Früh- und Spätisolaten das PCR-Produkt des *lasR* in 2 überlappenden Teilen generiert (Sequenzen der Primer im Anhang in Tab 10.2.2 dargestellt), aufgereinigt und anschließend von der Firma Qiagen sequenziert.

Nach dem Plattentest (metallischer Schimmer) sollten sowohl das Spätisolat des Patienten H5 als auch das des Patienten H31 eine Mutation im *lasR* Gen aufweisen. Die Sequenzierung bestätigte dieses Ergebnis. Während in den anderen Patienten das Spätisolat eine 100 %ige Sequenzübereinstimmung zum Frühisolat aufwies, zeigte sich in den Patienten H5 und H31 eine Mutation im *lasR* Gen des Spätisolats.

Im Patienten H5 ließ sich im Spätisolat ein SNP detektieren. Das Spätisolat des Patienten H31 zeigte eine größere Insertion (1186 bp) im ersten Teil des *lasR* Gens.

Markeroptimierung bei den Isolaten des Patienten H5:

Das Spätisolat des Patienten H5 wies laut Sequenzierung in *lasR* eine Änderung von einem Cytosin zu einem Thymidin auf (siehe Abb. 4.6.26).

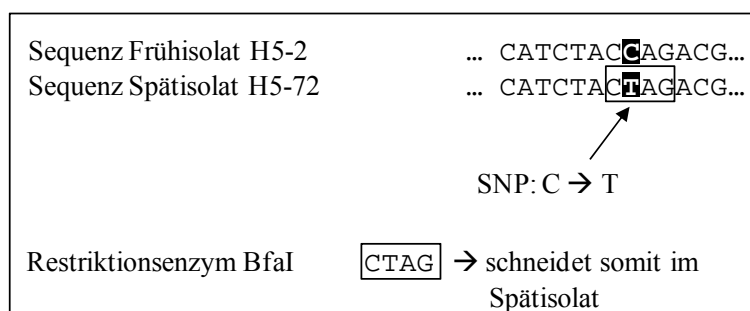


Abb. 4.6.26: Veranschaulichung der Mutation im Spätisolat des Patienten H5

Das Restriktionsenzym BfaI besitzt als Erkennungssequenz CTAG und schnitt somit genau an der Position des SNPs im Spätisolat, während die Sequenz im Frühisolat an dieser Stelle aufgrund der fehlenden Restriktionsschnittstelle nicht geschnitten werden konnte.



In nachfolgenden Experimenten wurde der SNP im Früh- und Spätisolat des Patienten H5 verifiziert und als verwendbarer Marker für die Unterscheidung zwischen beiden Isolaten optimiert (siehe Abb. 4.6.27).

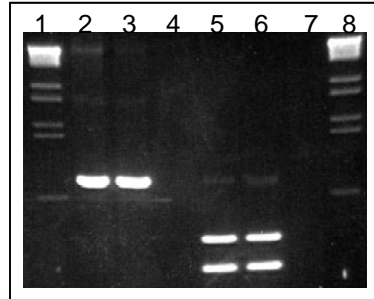


Abb. 4.6.27: spezifischer Restriktionsverdau von *lasR* der Isolate H5-2 und H5-72; aufgetragen wurden die PCR-Produkte nach Verdau mit BfaI; dargestellt sind für beide Isolate jeweils drei verschiedene MgCl<sub>2</sub>-Konz.; Spur 1 und 8: λ-Bst DNA-Größenstandard; Spur 2-4: H5-2 mit jeweils 3, 2 und 1mM MgCl<sub>2</sub>; Spur 5-7: H5-72 mit jeweils 3, 2 und 1 mM MgCl<sub>2</sub>

Markeroptimierung bei den Isolaten des Patienten H31:

Die Sequenzierung der beiden sequentiellen Isolate des Patienten H31 ergaben für das Spätisolat eine größere Insertion im ersten Abschnitt von *lasR* in einer Größe von 1186 bp. Das Frühisolat wies eine 100 % identische Sequenz zum PAO auf. Die Insertionschnittstelle in *lasR* konnte durch eine Verdopplung einer 8 bp langen Sequenz charakterisiert werden (siehe Abb. 4.6.28).

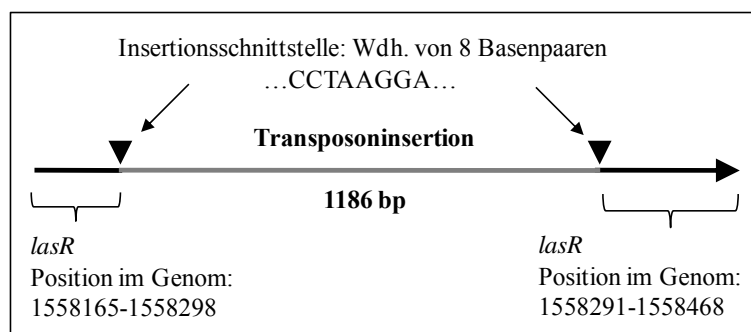


Abb. 4.6.28: Veranschaulichung der Transposoninsertion in *lasR* des Spätisolats von Patient H31

Eine Blast-Suche ergab, dass es sich bei der Insertionssequenz um eine Transposase der IS4 Familie handelte. Diese wurde mit einer 100 %igen Übereinstimmung auch in *Thioalkalivibrio* gefunden. Des Weiteren konnten große Teile der Sequenz auch in anderen *P. aeruginosa* Isolaten sowie in den Bakterien *P. syringae*, *P. putida*, *Bordetella*, *Azetobacter*, *Xanthomonas* und *Ralstonia* wiedergefunden werden.

Auf dem Gel in Abb. 4.6.29 lässt sich erkennen, dass im Spätisolat das *lasR* PCR-Produkt das Transposon enthielt (größeres Produkt als beim Frühisolat; Größe ca. 1600 bp). Das Frühisolat zeigte ein *lasR* PCR-Produkt ohne IS4-Sequenz bei ca. 400 bp. Allerdings konnte auch hier eine Bande der Größe 1600 bp (*lasR* inkl. Transposon) mit schwacher Bandenintensität detektiert werden. Es handelte sich beim Frühisolat demnach um eine Mischkultur. Ein Teil der Bakterien trug das Transposon in *lasR*, ein anderer Teil nicht.

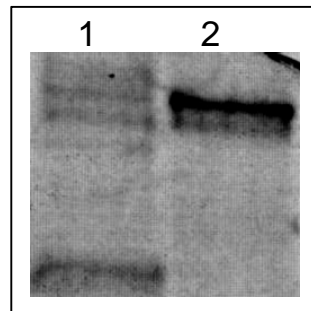


Abb. 4.6.29: PCR-Produkt mit *lasR*-Primern auf der DNA von H31-8 und H31-59; Auftragung: Spur 1= Frühisolat H31-8 (*lasR*-Bande + leichte Transposonbande), Spur 2 = Spätisolat H31-59 (Transposonbande)

Ziel nachfolgender Versuche war es, einen transposondefizienten Klon des Frühisolats zu detektieren. Dazu wurde das Frühisolat fraktioniert ausgestrichen und verschiedene Einzelklone mit Hilfe einer Kolonie-PCR auf die Anwesenheit des Transposons überprüft. Beim Nachweis eines transposondefizienten Klons (siehe Abb. 4.6.30), wurde dieser erneut fraktioniert ausgestrichen und zur Bestätigung durch eine PCR verifiziert. Somit wurde die IS4-Insertion im Spätisolat als Marker zur Differenzierung in dem Wettbewerbsexperiment verwendet.

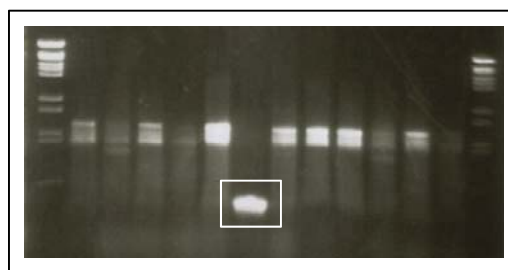


Abb. 4.6.30: Überprüfung von Einzelklonen auf die Insertion des Transposons in *lasR*; gekennzeichnet ein transposondefizienter Klon; Spur 1 und 14:  $\lambda$ -Bst DNA-Größenstandard

Als Nachweis für das Frühisolat wurde der vordere Teil von *lasR* amplifiziert. Dies lag ohne Transposon bei ca. 400 bp. Für das Spätisolat wurde ein PCR-Produkt verwendet, welches einen Teil von *lasR* und einen Teil des Transposon umfasste. Der linke Primer war derselbe

wie für das Frühisolat, der rechte Primer lag im vorderen Drittel der Transposonsequenz, so dass für das Spätisolat eine charakteristische Bande von ca. 500 bp Größe entstand.

Da während einer PCR kleinere Produkte bevorzugt gebildet werden als größere Produkte, war es für diesen Marker nicht möglich, sowohl das Spätisolat als auch das Frühisolat innerhalb einer PCR quantitativ nachzuweisen. Aus diesem Grund wurde die PCR für den Nachweis von Früh- und Spätisolats getrennt optimiert. Mit einer Reinkultur des entsprechenden Isolats wurden in der PCR die Parameter DNA-Template und Zyklenzahl optimiert. Abb. 4.6.31 zeigt die unterschiedlichen Ergebnisse.

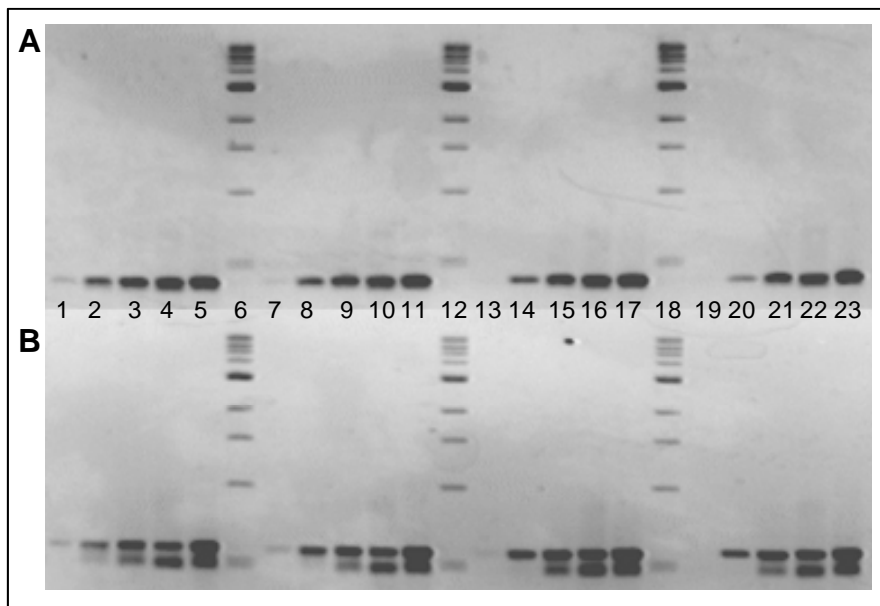


Abb. 4.6.31: Optimierung der PCR für *lasR* mit und ohne Transposon; Teil A: PCR-Produkte mit *lasR* Primern und H31-8 DNA; Teil B: PCR-Produkte mit Primern spezifisch zur Detektion des Transposons im *lasR* und H31-59 DNA; Auftragung: Spur 6, 12, 18:  $\lambda$ -Bst DNA-Größenstandard; Spur 1-5: 100 ng DNA nach 15, 20, 25, 30 und 35 Zyklen; Spur 7-11: 50 ng DNA nach 15, 20, 25, 30 und 35 Zyklen; Spur 13-17: 20 ng DNA nach 15, 20, 25, 30 und 35 Zyklen; Spur 19-23: 10 ng DNA nach 15, 20, 25, 30 und 35 Zyklen

#### Markersuche mit dem Tiling Array:

Nachdem durch die Sequenzierung von *mucA* und *lasR* Marker zur Differenzierung von Früh- und Spätisolat der Patienten H1, H5 und H31 verifiziert werden konnten, fehlten noch Marker für die Isolate der Patienten H8, H11 und H29. Eine weitere Methode, schnell und kostengünstig kleine Deletionen, Insertionen oder eventuell auch SNPs zur Differenzierung zu konstatieren, ist nach der Veröffentlichung von Dötsch et al (2009) der *P. aeruginosa*-Tiling-Array 1 (PATA1). Dieser wurde in Kapitel 3.4.11 beschrieben.

Hierzu wurde mit dem DNeasy Kit der Firma Qiagen jeweils von dem Früh- und dem Spätisolat der drei verbliebenen Patienten hochreine DNA gewonnen, in Fragmente der Größe

von 50-200 bp fragmentiert, markiert und auf den Tiling-Array hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte am Affymetrix Servicecenter des HZI in Braunschweig. Für die anschließende Auswertung wurde das Programm „Integrated Genome Browser“ verwendet. Für Isolate aller drei Patienten wurden jeweils 10 Gene ausgewählt, die laut Tiling-Array entweder kleine Deletionen oder SNPs beim Vergleich zwischen Früh- und Spätisolat aufweisen (siehe Tab. 4.6.5).

Tab. 4.6.5: Gene, die nach Tiling-Array Analyse Veränderungen zwischen Früh- und Spätisolaten aufweisen; dargestellt jeweils 10 Gene für die Isolate der Patienten H8, H11 und H29

Nr.	Patient H8		Patient H11		Patient H29	
	1	PA0905.1	SNPs	PA0426 <i>mexB</i>	SNPs	PA0884
2	PA1414	30 bp Deletion	PA2475	SNPs	PA0911	Deletion
3	PA1430	SNPs	PA2509 <i>catB</i>	SNPs	PA2812	SNPs
4	PA1431	SNPs	PA2512 <i>antA</i>	Deletion	PA3211	Deletion
5	PA1489- PA1490	Deletion	PA2592	SNPs	PA2879	kleine Deletion
6	PA3133.3	50 bp Deletion	PA2656	SNPs	PA3280 <i>orpO</i>	SNPs und Deletion
7	PA3285	Deletion oder SNPs	PA2842	SNPs	PA4329	kleine Deletion
8	PA1778 <i>cobB</i>	SNP oder kl. Deletion	PA2986	viele SNPs oder kleine Deletion	PA5443	SNPs
9	PA4243 <i>secY</i>	SNP, vielleicht Deletion	PA3474	zwei kleine Deletionen	PA1865	SNPs
10	PA4301 <i>tadB</i>	SNP oder Deletion	PA4692	Deletion	PA3115 <i>fimV</i>	SNPs

Diese Gene bzw. Genabschnitte wurden amplifiziert (Primersequenzen siehe Anhang Tab. 10.2.2). In Abb. 4.6.32 werden die PCR-Produkte nach Optimierung der PCR-Bedingungen dargestellt. Für den Patienten H8 wurden die Produkte der Gene 2-10 sequenziert. Von den Isolaten des Patienten H11 wurden die Produkte der Gene 1-5, 7 und 10 durch die Firma Qiagen sequenziert. Bei den Isolaten des Patienten H29 waren es die Produkte der Gene 1-10.

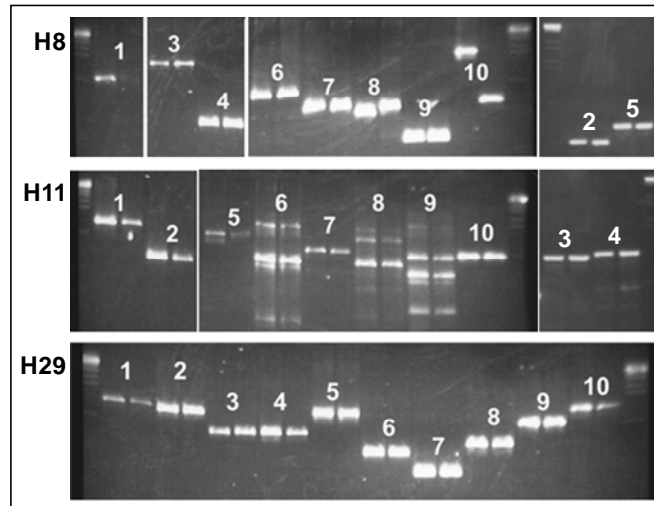


Abb. 4.6.32: PCR-Produkte der 10 jeweils ausgewählten Gene mit Abweichungen in der Sequenz zwischen Früh- und Spätisolat der Patienten H8, H11 und H29; oberes Gel: PCR-Produkte der ausgewählten Gene für die Isolate von Patient H8; mittleres Gel: Produkte für die Isolate von Patient H11; unteres Gel: Produkte für die Isolate des Patienten H29; die verschiedenen Gene sind von 1-10, entsprechend der Tab. X, durchnummeriert

Einen Eindruck der Daten aus der Tiling-Array Analyse lässt sich aus Abb. 4.6.33 gewinnen. Aufgetragen ist das Verhältnis der Signalintensitäten zwischen Spät- und Frühisolat eines Patienten. Normiert wurden die Werte auf das PAO-Genom, auf welchem der Array basiert. Es lässt sich erkennen, dass die drei verschiedenen Patienten ein unterschiedlich hohes Maß an Abweichungen bzw. Übereinstimmungen zwischen Früh- und Spätisolat aufwiesen. Während die beiden Isolate des Patienten H29 große Unterschiede zeigten, wurden in den Isolaten des Patienten H11 weniger Abweichungen gefunden. In den Isolaten des Patienten H8 wurden die geringsten Abweichungen detektiert.

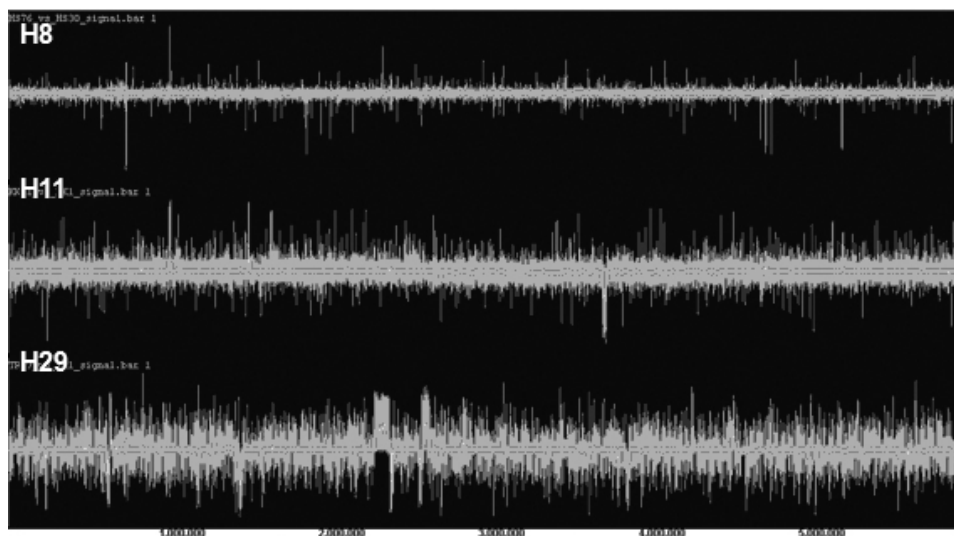


Abb. 4.6.33: Darstellung eines kleinen Ausschnitts aus der Tiling-Array Analyse; aufgetragen wurde das Verhältnis der Signalintensitäten zwischen Spät- und Frühisolat des jeweiligen Patienten

Durch die Sequenzierung konnten im Vergleich von Früh- mit Spätisolat im Falle des Patienten H8 4 potentielle SNPs (jeweils 1 SNP im Gen PA0905.1, PA1431, PA1489-PA1490 und PA3285) verifiziert werden. In den Isolaten des Patienten H11 fanden sich 3 potentielle SNPs in PA2512 *antA*. Im Vergleich zwischen frühem und spätem Isolat des Patienten H29 wurden insgesamt 77 potentielle SNPs nachgewiesen (PA0884 (9), PA0911 (11), PA2812 (16), PA3211 (3), PA2879 (7), PA3280 (4), PA4329 (4), PA5443 (8), PA1865 (8), PA3115 (7)).

#### Diskussion:

In der Veröffentlichung von Dötsch et al. (2009) wurde der PATA1 zur Analyse von Sequenzunterschieden zwischen verschiedenen Isolaten beschrieben. Nach Aussage des Autors ist es möglich, neben verlässlichen Vorhersagen von kleinen Deletionen und Insertionen, auch 50 % der theoretischen SNPs mit Hilfe des Tiling-Arrays zu detektieren. Nach der Analyse der Array-Daten, die zusammen mit dem Autor der Veröffentlichung durchgeführt wurde, wurden kleine Deletionen sowie Insertionen nur in einem der vorhergesagten Fälle nachgewiesen. Auch bei der Bestätigung der angenommenen SNPs gab es gerade bei den Isolaten der Patienten H8 und H11 nur wenige Übereinstimmungen. Die Vorhersage potentieller genomischer Unterschiede durch den Tiling-Array stellte sich bei den vier Isolaten dieser beiden Patienten als sehr ungenau heraus.

Die Sequenzierung der Gene, die bei den Isolaten des Patienten H29 ausgewählt worden waren, konnte zwar keine Deletionen bestätigen, aber viele der angenommenen SNPs verifizieren. Im Falle der Isolate dieses Patienten zeigten die Ergebnisse des Tiling-Arrays zu den Sequenzierungen eine hohe Übereinstimmung.

Eine mögliche Erklärung für eine so hohe Diskrepanz zwischen dem Ergebnis der Tiling-Array Analyse und den Sequenzierungen ist eventuell die Datengrundlage des Arrays. Die Sonden wurden aus dem PAO Genom ausgewählt und repräsentieren somit oft nicht zu 100 % die Sequenzen der klinischen Isolate. Es könnte sein, dass die Isolate des Patienten H29, die ein relativ übereinstimmendes Ergebnis zwischen Array und Sequenzierung aufwiesen, dem PAO Genom relativ homolog sind, während die anderen Isolate eine hohe Diskrepanz zum PAO Genom aufweisen.

Auf der anderen Seite zeigen gerade die Ergebnisse der Sequenzierung des Pyoverdinclusters (gleiches Kapitel) zwischen PAO und den klinischen Isolaten eine nahezu 100 %ige Sequenzkonformität. Diese Ergebnisse sprechen gegen die Möglichkeit der Divergenz zwischen PAO und den klinischen Isolaten. Gerade Deletionen oder Insertionen sollten

verlässlich auf dem Array erkennbar sein. Hierbei handelt es sich nicht um Einzelnukleotidaustausche, sondern um größere Regionen. Diese sollten zwischen klinischen Isolaten und dem PAO nicht soweit voneinander abweichen, dass sie nicht als Deletionen/Insertionen gekennzeichnet werden können. Die Deletionen, die durch den Array detektiert wurden, müssten sowohl eindeutig auf dem Gel als auch 100 %im in der Sequenzierung nachweisbar sein. Dies war, bis auf die Ausnahme einer Deletion von ca. 600 bp, nicht der Fall.

Die hohe Verlässlichkeit dieser Methode konnte somit nach diesen Experimenten nicht bestätigt werden.

Markeroptimierung für die Isolate des Patienten H8:

Die Analyse durch den Tiling-Array ergab vier potentielle SNPs. In einem ersten Experiment wurde versucht den potentiellen SNP im Genbereich um PA1489-PA1490 zu verifizieren. Hierzu wurde zum einen das Restriktionsenzym ApoI und zum anderen das Enzym HpyCH4V verwendet (siehe Abb. 4.6.34).

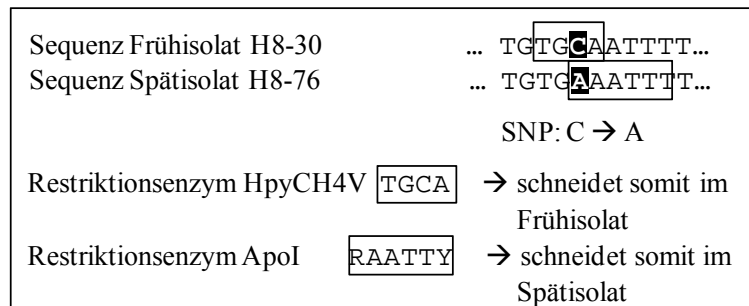


Abb. 4.6.34: Veranschaulichung der potentiellen Mutation im Spätisolat des Patienten H8

In beiden Fällen wurde trotz Optimierung des Restriktionsverdaus kein Unterschied zwischen Früh- und Spätisolat des Patienten H8 detektiert.

Bei der Suche nach geeigneten Enzymen für die anderen 3 potentiellen SNPs ließen sich keine spezifischen herausfinden. Aus diesem Grund wurden für alle drei Sequenzvariationen Primer entwickelt, durch die an der Stelle der Variation eine Restriktionsschnittstelle entstand (Primersequenzen siehe Anhang Tab. 10.2.2). Das abzuspaltende Fragment hatte bei einer Gesamtproduktlänge von 150-200 bp eine ungefähre Länge von 18-25 bp. Somit konnte eine Vergleichbarkeit der Signalstärken sowie eine Auftrennung zwischen beiden Fragmenten gewährleistet werden.

Für den SNP im Gen PA0905.1 wurden vier verschiedene Primerpaare entwickelt, für die beiden SNPs im Gen PA1431 und PA3285 jeweils ein Primerpaar (siehe Abb. 4.6.35).

**Gen PA0905.1:**  
 Sequenz Frühisolat H8-30 ... GCCAAATCAAGT...  
 Sequenz Spätisolat H8-76 ... GCCAAATCAAGT...

durch Primer entwickelte Restriktionsschnittstellen:

1. Primerpaar: AATT 25 bp Abspaltung; Produktgröße 161 bp  
 → Tsp509I (schneidet somit im Spätisolat)
2. Primerpaar: ATCGAT 25 bp Abspaltung; Produktgröße 160 bp  
 → BspDI, ClaI (schneiden somit im Frühisolat)
3. Primerpaar: TTAA 25 bp Abspaltung; Produktgröße 152 bp  
 → MseI (schneidet somit im Spätisolat)
4. Primerpaar: ATTAAT 25 bp Abspaltung; Produktgröße 161 bp  
 → AseI (schneidet somit im Frühisolat)

**Gen PA1431:**  
 Sequenz Frühisolat H8-30 ... GCCTTCTTCGCC...  
 Sequenz Spätisolat H8-76 ... GCCTTCTTCGCC...

durch Primer entwickelte Restriktionsschnittstelle:

1. Primerpaar: TTCGAA 19 bp Abspaltung; Produktgröße 200 bp  
 → Sall (schneidet somit im Spätisolat)

**Gen PA3285:**  
 Sequenz Frühisolat H8-30 ... CCCTGGGTTTCGC...  
 Sequenz Spätisolat H8-76 ... CCCTGGGTTTCGC...

durch Primer entwickelte Restriktionsschnittstelle:

1. Primerpaar: CTCGCG 18 bp Abspaltung; Produktgröße 197 bp  
 → XhoI (schneidet somit im Spätisolat)

Abb. 4.6.35: Primerentwicklung zur Verifizierung potentieller SNPs in den Isolaten des Patienten H8

Nach der Optimierung der verschiedenen Primerpaare wurden die potentiellen SNPs einzeln mit Hilfe verschiedener Restriktionsenzyme untersucht.

Die Untersuchung des SNPs im Gen PA0905.1 ergab mit allen verwendeten Restriktionsenzymen, dass es sich um keinen SNP handelt. In allen Fällen stimmte das Restriktionsmuster von Früh- und Spätisolat überein (siehe Abb. 4.6.36).

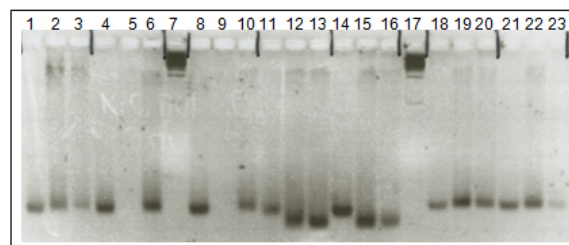


Abb. 4.6.36: Überprüfung des SNPs im Gen PA0905.1 durch verschiedene Restriktionsenzyme; Auftragung jeweils PCR-Produkt mit spezifischem Primerpaar, Restriktionsverdau Frühisolat, Restriktionsverdau Spätisolat; Spur 1-3: Primerpaar 1 (Pr. 1) und Tsp509I; Spur 4-6: Pr. 2 und BspDI; Spur 8-10: Pr. 2 und ClaI; Spur 11-13: Pr. 3, 58°C, 2 µl MgCl<sub>2</sub> und MseI; Spur 14-16: Pr. 3, 60°C, 3 µl MgCl<sub>2</sub> und MseI; Spur 18-20: Pr. 4, 60°C, 3 µl MgCl<sub>2</sub> und AseI; Spur 21-23: Pr. 4, 58°C, 2 µl MgCl<sub>2</sub> und AseI



Sowohl im Gen PA1431 als auch PA3285 konnte der SNP erfolgreich verifiziert werden. Für den Verdau wurde beim Gen PA1431 SallI und beim Gen PA3285 XhoI verwendet. Das Frühisolat wies in beiden Genen ein anderes Restriktionsmuster auf als im Spätisolat. Da im Fall des Gens PA3285 einige Nebenbanden aus dem Verdau hervorgingen, der SNP im Gen PA1431 dagegen ein deutliches Restriktionsmuster aufzeigte (siehe Abb. 4.6.37), wurde der SNP im Gen PA1431 als Marker für die Differenzierung zwischen Früh- und Spätisolat des Patienten H8 verwendet.

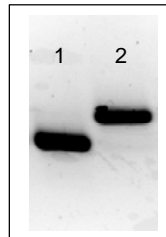


Abb. 4.6.37: Überprüfung des SNPs im Gen PA1431 durch das Restriktionsenzym SallI; Auftragung Restriktionsverdau: Spur 1: Frühisolat (wird einmal geschnitten, 19 bp Fragment nicht zu sehen); Spur 2: Spätisolat (wird nicht geschnitten)

Markeroptimierung für die Isolate des Patienten H11:

Die Tiling-Array Analyse der Isolate des Patienten H11 ergab 3 potentielle SNPs. Alle drei wurden im Gen PA2512*antA* detektiert. In Abb. 4.6.38 werden die SNPs und die zur Verifizierung verwendeten Restriktionsenzyme dargestellt.

Gen PA2512 <i>antA</i> :	
1. SNP	
Sequenz Frühisolat H11-1	... GGTTCGAG <b>G</b> CCCGAG...
Sequenz Spätisolat H11-71	... GGTTCGAG <b>C</b> CCCGAG...
Restriktionsenzym HaeIII	<b>GGCC</b> → schneidet somit im Frühisolat
2. SNP	
Sequenz Frühisolat H11-1	... GCTGGCC <b>T</b> GGAAC...
Sequenz Spätisolat H11-71	... GCTGG <b>C</b> CGGAAC...
Restriktionsenzyme MspI, HpaII	<b>CCGG</b> → schneiden somit im Spätisolat
3. SNP	
Sequenz Frühisolat H11-1	... GGCTGG <b>T</b> GGCGGA...
Sequenz Spätisolat H11-71	... GGCTGG <b>C</b> GGCGGA...
Restriktionsenzym Fnu4HI	<b>GCGGC</b> → schneidet somit im Spätisolat

Abb. 4.6.38: Veranschaulichung der potentiellen Mutationen im Spätisolat des Patienten H11

In drei voneinander unabhängigen Versuchen wurden alle potentiellen SNPs mit verschiedenen Enzymen getestet. Für den ersten SNP wurde das Enzym HaeIII verwendet, die Existenz des zweiten SNPs wurde mit Hilfe der Enzyme MspI und HpaII untersucht und der dritte SNP wurde durch einen Restriktionsverdau mit dem Enzym Fnu4HI überprüft. Die Ergebnisse aller Ansätze lassen sich in Abb. 4.6.39 erkennen. In Teil A wird der Restriktionsverdau der ersten beiden potentiellen SNPs dargestellt. Teil B zeigt den Verdau mit dem spezifischen Enzym des dritten potentiellen SNPs.

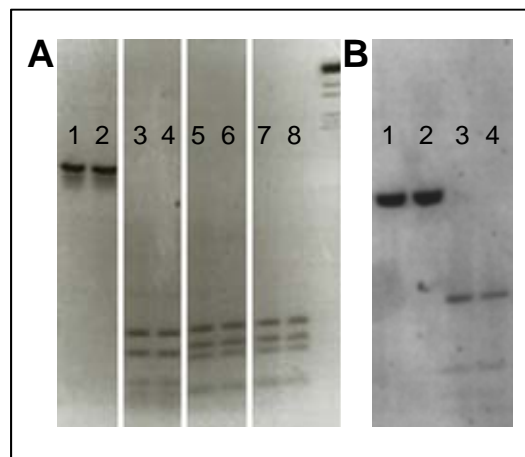


Abb. 4.6.39: Überprüfung von drei potentiellen SNPs im Gen PA2512*antA* durch die Restriktionsenzyme HaeIII, MspI, HpaII und Fnu4HI; Auftragung jeweils PCR-Produkt mit spezifischem Primerpaar, Restriktionsverdau Frühisolat, Restriktionsverdau Spätisolat; Teil A: Spur 1-2: PCR-Produkt für Früh- und Spätisolat; Spur 3-4: Restriktionsverdau mit HaeIII; Spur 5-6: Restriktionsverdau mit MspI; Spur 7-8: Restriktionsverdau mit HpaII; Teil B: Spur 1-2: PCR-Produkt für Früh- und Spätisolat; Spur 3-4: Restriktionsverdau mit Fnu4HI

Es lässt sich erkennen, dass keiner der drei potentiellen SNPs durch einen Verdau mit einem spezifisch ausgewählten Enzym verifiziert werden konnte. Somit steht für die Isolate dieses Patienten bis zum jetzigen Zeitpunkt kein Marker zur Differenzierung zwischen Früh- und Spätisolat zur Verfügung. Da sowohl die Tiling-Array Untersuchung als auch die phänotypische Charakterisierung dieser beiden Isolate große Unterschiede zeigten, sollte es durch weitere Sequenzierungen möglich sein, einen geeigneten Marker zu finden. In den phänotypischen Untersuchungen der beiden Isolate wurden signifikante Unterschiede in der Autolyse, der Proteasesekretion oder z.B. der Siderophoreproduktion gefunden. Auch in der Bewegung gab es Unterschiede zwischen beiden Isolaten. Die Untersuchung zur Ausbildung einer chronischen Infektion *in vivo* ergab ebenfalls einen Unterschied zwischen dem Früh- und Spätisolat. Diese Ergebnisse können für weitere Sequenzierungen herangezogen werden. So könnte z.B. die nähere genetische Analyse der Protease assoziierten Gene zu einem verwendbaren Marker führen.

Markeroptimierung für die Isolate des Patienten H29:

In den beiden Isolaten des Patienten H29 wurden nach der Tiling-Array Analyse die meisten Abweichungen detektiert. Insgesamt konnten 77 SNPs nachgewiesen werden. Aus diesen 77 potentiellen SNPs wurden 6 ausgewählt und anhand eines spezifischen Restriktionsverdau verifiziert. In Abb. 4.6.40 sind die entsprechenden Gene mit den genetischen Varianten sowie die dort schneidenden Enzyme dargestellt.

<b>Gen PA0911:</b>	
Sequenz Frühisolat H29-1	...ACGAGT <b>C</b> CCGTGTGCG...
Sequenz Spätisolat H29-67	...ACGAGT <b>A</b> CCGTGTGCG...
Restriktionsenzym RsaI	<b>GTAC</b> → schneidet somit im Spätisolat
<b>Gen PA3211:</b>	
Sequenz Frühisolat H29-1	...TGAGCCA <b>A</b> CTGGGCGCC...
Sequenz Spätisolat H29-67	...TGAGCCA <b>T</b> CTGGGCGCC...
Restriktionsenzym HpyCH4V	<b>ACTG</b> → schneidet somit im Frühisolat
<b>Gen PA4329:</b>	
Sequenz Frühisolat H29-1	...ACTGGGT <b>C</b> ATCCTGA...
Sequenz Spätisolat H29-67	...ACTGGGT <b>T</b> ATCCTGA...
Restriktionsenzym DpnII	<b>GATC</b> → schneidet somit im Frühisolat
<b>Gen PA5443:</b>	
Sequenz Frühisolat H29-1	...CGCAG <b>CCG</b> TGGAGA...
Sequenz Spätisolat H29-67	...CGCAG <b>C</b> TGGAGA...
Restriktionsenzym HpaII	<b>CCGG</b> → schneidet somit im Frühisolat
<b>Gen PA1865:</b>	
1. SNP	
Sequenz Frühisolat H29-1	...AGGATGCG <b>T</b> TGCTGG...
Sequenz Spätisolat H29-67	...AGGATGCG <b>C</b> TGCTGG...
Restriktionsenzym HincII	<b>GCGC</b> → schneidet somit im Spätisolat
2. SNP	
Sequenz Frühisolat H29-1	...GCCGCC <b>GTAC</b> AACCGC...
Sequenz Spätisolat H29-67	...GCCGCC <b>G</b> CAACCGC...
Restriktionsenzym RsaI	<b>GTAC</b> → schneidet somit im Frühisolat

Abb. 4.6.40: Veranschaulichung der potentiellen Mutationen im Spätisolat des Patienten H29

Die Analyse dieser 6 verschiedenen SNPs ergab, dass es sich bei 3 der potentiellen SNPs nicht um einen SNP handelte. Die Existenz der anderen drei SNPs konnte mit Hilfe eines spezifisch differenzierbaren Restriktionsschnittmusters verifiziert werden.

Der SNP im Gen PA0911 ermöglichte mit Hilfe eines Restriktionsverdau (RsaI) die Differenzierung von Früh- und Spätisolat. Während das PCR-Produkt des Frühisolats durch das Enzym RsaI nur einmal geschnitten wurde (kleines Fragment nicht zu sehen), ergab der Verdau des PCR-Produkts vom Spätisolat aufgrund des vorhandenen SNPs ein weiteres Fragment (siehe Abb. 4.6.41). Daher wurde dieser SNP zur Differenzierung verwendet.

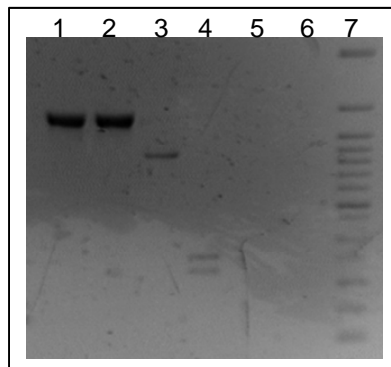


Abb. 4.6.41: Überprüfung eines potentiellen SNPs im Gen PA0911 durch das Restriktionsenzym RsaI; Spur 1: PCR-Produkt Frühisolat; Spur 2: PCR-Produkt Spätisolat; Spur 3: Restriktionsverdau des Frühisolats mit RsaI; Spur 4: Restriktionsverdau des Spätisolats mit RsaI; Spur 5-6: leer; Spur 7: 50 bp DNA-Ladder

#### 4.6.6.2 Durchführung und Ergebnisse der Kompetitions-/Fitnessexperimente

Um die Fitness von Früh- und Spätisolaten kompetitiv zu überprüfen, wurde aus der Übernachtskultur beider Isolate eine neue 50 ml Mischkultur mit einer OD von jeweils 0,1 angeimpft und diese bei 37°C über einen definierten Zeitraum inkubiert. Die Fitnessexperimente wurden sowohl in einem Vollmedium (LB) als auch in einem Minimalmedium (M9 mit 1% Glycerin) durchgeführt und jeweils in einem Doppelerperiment getestet. Aus den Kulturen im Vollmedium LB wurden nach 0, 2, 4, 6, 8, 10, 25, 30, 50 und 76h Proben entnommen, aus den Minimalmedium-Kulturen zusätzlich noch nach 92 und 148 h. Aus diesen Proben wurde nach einer photometrischen OD-Bestimmung die genomische DNA der Bakterien präpariert. Anschließend wurde per PCR ein Produkt amplifiziert, welches den SNP, der zur Differenzierung verwendet werden sollte, umspannt und anschließend mit dem jeweils spezifisch schneidenden Restriktionsenzym verdaut (siehe Kapitel 4.6.6 Markeroptimierung). Anhand der Fragmentintensitäten konnte Rückschluss auf

die Mengenverhältnisse von Früh- und Spätisolat in der jeweiligen Probe gezogen und somit Aussagen über die jeweilige Fitness der beiden Isolate getroffen werden.

Isolate des Patienten H1

Zur Differenzierung des Früh- und Spätisolats vom Patienten H1 wurde in Kapitel 4.6.6.1 ein SNP in *muca* verifiziert. Dieser SNP führte nach der PCR auf dem Gen und dem nachfolgenden Verdau bei den beiden Isolaten zu einem voneinander differenzierbaren Fragmentbandenmuster. So konnten die Anteile der verschiedenen Isolate pro Zeitwert an der Gesamtmenge bestimmt werden. Neben der optischen Auswertung anhand des Agarosegelbilds wurde auch eine quantitative Auswertung mit Hilfe des Programms PCBAS Version 2.09f durchgeführt.

In Abb. 4.6.42 wird das Ergebnis des Konkurrenzexperimentes anhand eines Agarosegelbilds dargestellt.

Im Teil A der Abb. 4.6.42 ist das Fitnessexperiment von Früh- und Spätisolat im Vollmedium LB dargestellt. Der Teil B der Abb. 4.6.42 veranschaulicht die Ergebnisse, die sich aus dem Experiment im Minimalmedium ergaben. Zuerst wurde der Verdau des PCR-Produkts vom Früh- und vom Spätisolat jeweils als Reinkultur aufgetragen. Die jeweils charakteristische Bande, die für die Auswertung des Experiments herangezogen wurde, wurde mit einem roten Kasten umrahmt. In den nachfolgenden Reihen wurde jeweils der Verdau der verschiedenen Zeitwerte aufgetragen (LB von 0h-76h und MM von 0h-148h).

Aus dem Fitnessexperiment im Vollmedium LB lässt sich erkennen, dass der Anteil des Frühisolats über den gesamten Zeitraum des Experiments stark zunimmt, während der des Spätisolats ab dem 4h-Wert kontinuierlich an Intensität abnimmt. Bei der Betrachtung des Experimentes in Minimalmedium war dieser Trend in abgeschwächter Form ebenfalls zu beobachten.

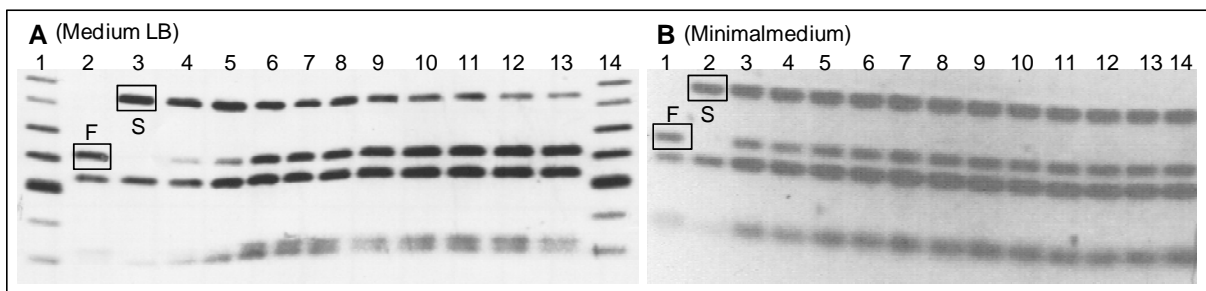


Abb. 4.6.42: Ergebnisse des Konkurrenzexperimentes (H1) in LB und in Minimalmedium; Auftragung jeweils der Restriktionsverdau; Teil A: Spur 1 u. 14: λ-Bst DNA-Größenstandard; Spur 2: Frühisolat; Spur 3: DNA Spätisolat; Spur 4-13: LB-Mischkultur nach 0h-76h; Teil B: Spur 1: Frühisolat; Spur 2: Spätisolat; Spur 3-14: Minimalmedium-Mischkultur nach 0h-148h

Die quantitative Auswertung der Intensitäten der charakteristischen Banden beider Isolate ermöglichte eine detailliertere Analyse des Experiments. Die Ergebnisse dieser Auswertungsmethode sind in Abb. 4.6.43 dargestellt (A: Ergebnisse aus dem LB-Medium; B: Ergebnisse aus dem Minimalmedium). Der linke Teil zeigt den Verlauf der Signalintensitäten beider Isolate. Da beide Isolate jeweils in einem Verhältnis von 1:1 gemischt wurden, wurde eine Normierung der Werte auf den Nullstundenwert durchgeführt. Diese Normierung ermöglichte den direkten Vergleich zwischen beiden Isolaten. Der rechte Teil repräsentiert den Verlauf des Wachstums beider Isolate im Verhältnis zueinander. Hierzu wurde der Quotient aus der Signalintensität des Spätisolats und des Frühisolats berechnet. Ist dieser größer als 1, ist das Wachstum des Spätisolats zu dem Zeitpunkt stärker als das des Frühisolats. Bei einem Quotienten kleiner als 1 überwiegt das Frühisolat im Wachstum.

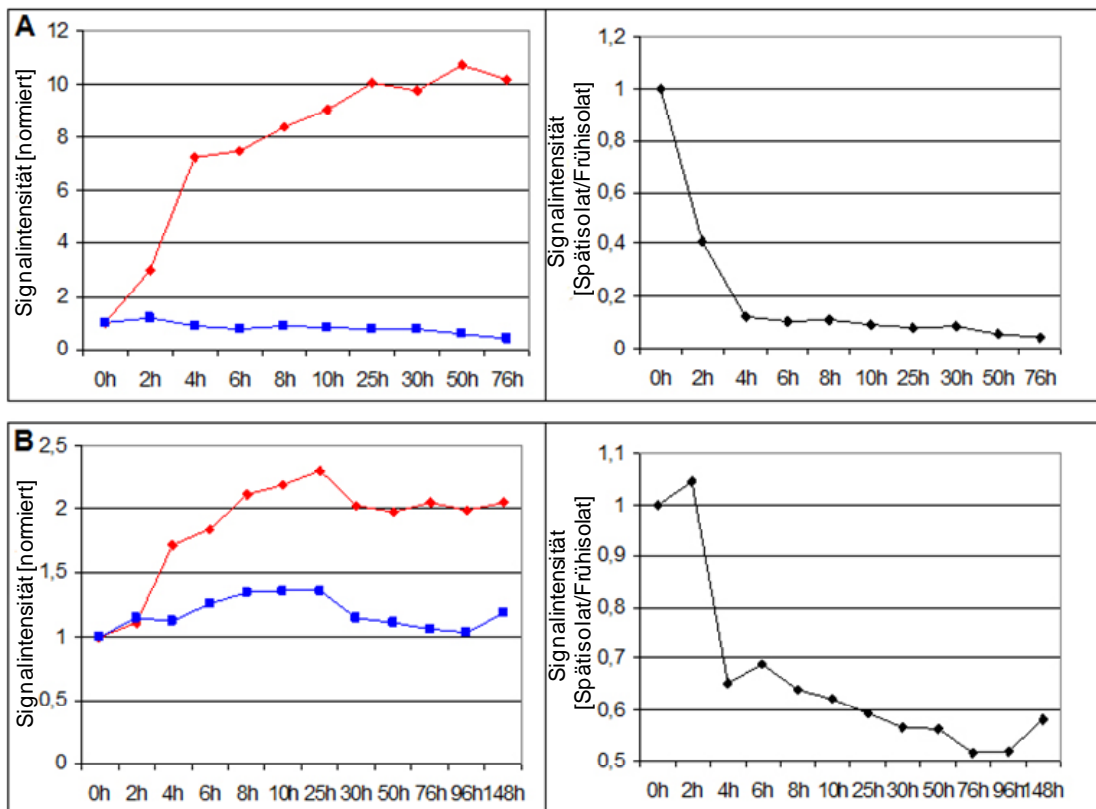


Abb. 4.6.43: Quantitative Auswertung des Konkurrenzexperimentes von Früh- und Spätisolat des Patienten H1; Teil A: Ergebnisse aus dem Vollmedium LB; Teil B: Ergebnisse aus dem Minimalmedium; links sind jeweils die Signalintensitäten des Früh-(rot) und Spätisolats (blau) über den Verlauf des Experiments dargestellt, der rechte Teil gibt den Quotienten der Bandenintensität zwischen Spät- und Frühisolat über den Versuchszeitraum an

Die quantitative Auswertung des Fitnessexperimentes bestätigte die Aussagen, die aufgrund des Agarosegelbilds optisch zum Vorschein kamen. Das Frühisolat zeigte in der LB-Wachstumskultur im Vergleich zum Spätisolat ein deutlich stärkeres Wachstum. Dies wurde

vor allem durch den Quotienten aus Spät- zu Frühisolat deutlich. Das Frühisolat konnte sich gegenüber dem Spätisolat durchsetzen. Auch in Minimalmedium war ein höheres Wachstum des Frühisolats zu erkennen. Obwohl aus der optischen Betrachtung und aus der getrennten quantitativen Auswertung beider Isolate keine Aussage über die Durchsetzungsfähigkeit getroffen werden konnte, zeigte der Quotient beider Isolate über den gesamten Versuchsverlauf einen kontinuierlichen, mit dem in LB vergleichbaren Abfall. Somit setzte sich auch in Minimalmedium das Frühisolat gegenüber dem Spätisolat durch.

### Isolate des Patienten H5

Durch die Sequenzierung von *lasR* konnte ein SNP im Spätisolat des Patienten H5 verifiziert werden, mit dem eine Differenzierung zwischen dem Früh- und dem Spätisolat erfolgen konnte (siehe Kapitel 4.6.6.1).

Die Darstellung der Ergebnisse des Fitnessexperiments in beiden Medien erfolgt optisch in Abb. 4.6.44 und graphisch in Abb. 4.6.45.

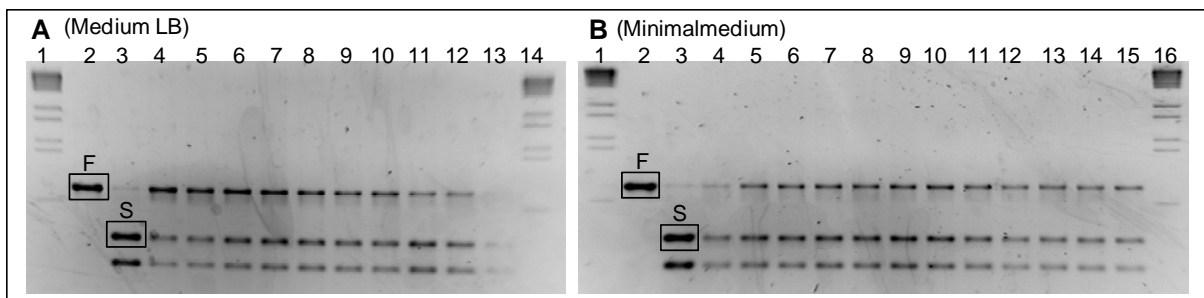


Abb. 4.6.44: Ergebnisse des Konkurrenzexperimentes (H5) in LB und in Minimalmedium; Auftragung jeweils der Restriktionsverdau; Teil A: Spur 1 u. 14:  $\lambda$ -Bst DNA-Größenstandard; Spur 2: Frühisolat; Spur 3: Spätisolat; Spur 4-13: LB-Mischkultur nach 0h-76h; Teil B: Spur 1 u. 16:  $\lambda$ -Bst DNA-Größenstandard; Spur 2: Frühisolat; Spur 3: Spätisolat; Spur 4-15: Minimalmedium-Mischkultur nach 0h-148h

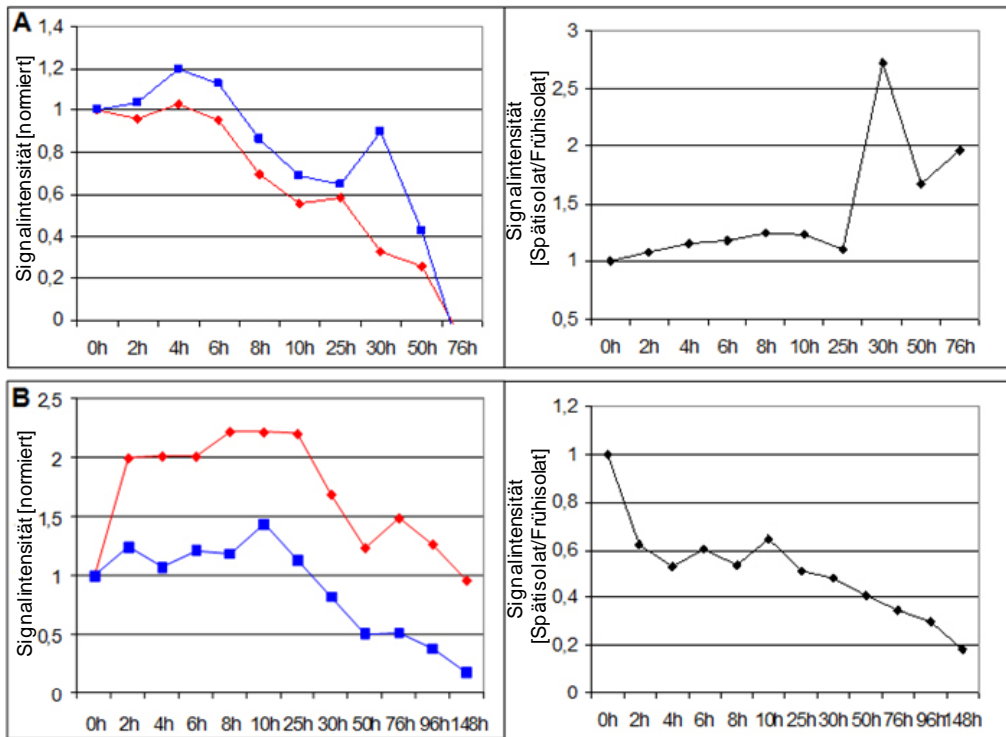


Abb. 4.6.45: Quantitative Auswertung des Konkurrenzexperimentes von Früh- und Spätisolat des Patienten H5; Teil A: Ergebnisse aus dem Vollmedium LB; Teil B: Ergebnisse aus dem Minimalmedium; links sind jeweils die Signalintensitäten des Früh-(Rot) und Spätisolats (Blau) über den Verlauf des Experiments dargestellt, der rechte Teil gibt den Quotienten der Bandenintensität zwischen Spät- und Frühisolat über den Versuchszeitraum an

Sowohl aus der optischen Beurteilung als auch aus der quantitativen Auswertung ergab sich für das Vollmedium, dass der Verlauf der Signalintensitäten beider Isolate vergleichbar war. Bei der Betrachtung beider charakteristischer Banden konnte zuerst für das Spätisolat ein leichter Anstieg verzeichnet werden. Nach 6 h Inkubationszeit wurde für beide Isolate ein Abfall der Bandenintensität detektiert (Absterben der Bakterien). Beim direkten Vergleich beider Isolate, repräsentiert durch den Quotienten, ergab sich über den gesamten Verlauf, dass das Spätisolat einen immer stärkeren Anteil an der Gesamtmenge der DNA einnahm, sich also durchsetzte (ein höheres Wachstum zeigte als das Frühisolat). Im Minimalmedium konnte für beide Isolate bis zu einem Zeitwert von 10 h ein Anstieg im Wachstum, danach aber nur noch ein Abfall der Signalintensität nachgewiesen werden. Der Anstieg im Wachstum war allerdings für das Frühisolat stärker, als für das Spätisolat. Im direkten Vergleich beider Isolate konnte ein sich durchsetzendes Frühisolat dokumentiert werden.

Im Vollmedium wurde demnach ein stärkeres Wachstum des Spätisolats, im Minimalmedium des Frühisolats beobachtet.



Isolate des Patienten H8

Die Differenzierung des Früh- und Spätisolats vom Patienten H8 erfolgte mit Hilfe des in Kapitel 4.6.6.1 beschriebenen SNPs im Gen PA1431.

Die Ergebnisse des Konkurrenzexperimentes sind in Abb. 4.6.46 und 4.6.48 dargestellt. Da die 0h-Probe der Mischkultur in LB und in Minimalmedium in diesem Experiment kein Ergebnis erbrachten, wurden dieser Zeitwert für beide Medien erneut auf einem separaten Agarosegel aufgetragen (siehe Abb. 4.6.47). Da die Bandenintensitäten von unterschiedlichen Gelen miteinander nicht vergleichbar sind, konnte die 0h-Probe quantitativ nicht mit den anderen Zeitproben verglichen werden. Zur Normierung wurden daher die Zeitwerte nach 2 h Inkubation verwendet.

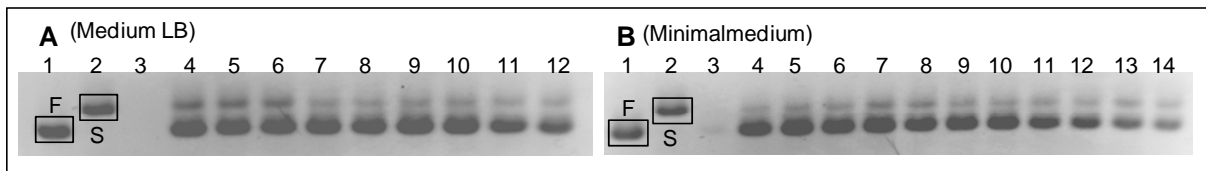


Abb. 4.6.46: Ergebnisse des Konkurrenzexperimentes (H8) in LB und in Minimalmedium; Auftragung jeweils der Restriktionsverdau; Teil A: Spur 1: Frühisolat; Spur 2: Spätisolat; Spur 3-12: LB-Mischkultur nach 0h-76h; Teil B: Spur 1: Frühisolat; Spur 2: Spätisolat; Spur 3-14: Minimalmedium-Mischkultur nach 0h-148h

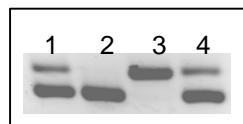


Abb. 4.6.47: Darstellung der 0h-Probe aus dem Konkurrenzexperimentes der Isolate von Patient H8; Auftragung: Restriktionsverdau; Spur 1: LB-Mischkultur nach 0h; Spur 2: Frühisolat; Spur 3: Spätisolat; Spur 4: Minimalmedium-Mischkultur nach 0h

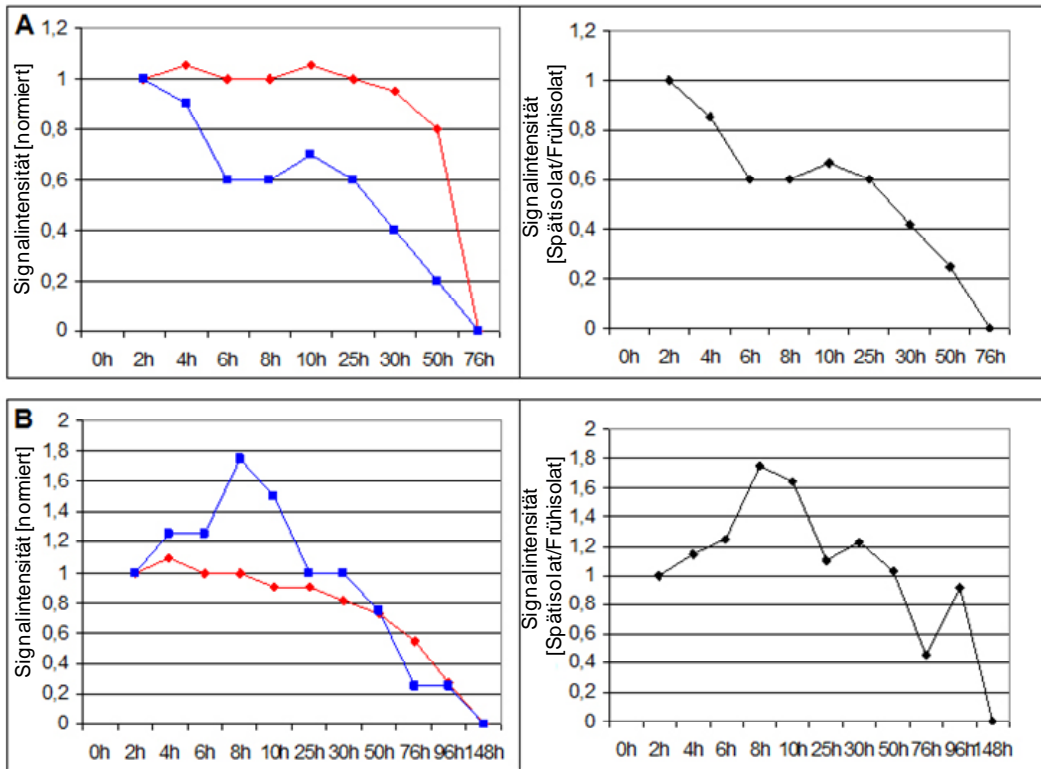


Abb. 4.6.48: Quantitative Auswertung des Konkurrenzexperimentes von Früh- und Spätisolat des Patienten H8; Teil A: Ergebnisse aus dem Vollmedium LB; Teil B: Ergebnisse aus dem Minimalmedium; links sind jeweils die Signalintensitäten des Früh-(Rot) und Spätisolats (Blau) über den Verlauf des Experiments dargestellt, der rechte Teil gibt den Quotienten der Bandenintensität zwischen Spät- und Frühisolat über den Versuchszeitraum an

Die Auswertung des Fitnessexperimentes ergab für das LB-Medium, dass das Frühisolat bis zu einer Inkubationszeit von 25 h im Wachstum stagnierte und danach ein Abfall beobachtet werden konnte. Das Spätisolat dagegen zeigte über den gesamten Verlauf einen relativ kontinuierlichen Abfall im Wachstum. Im direkten Vergleich beider Isolate konnte dokumentiert werden, dass das Frühisolat im Verlauf des Experiments einen steigenden Anteil an der Gesamt-DNA ausmachte.

Im Fitnessexperiment in Minimalmedium wurde für das Spätisolat in den ersten 8h Inkubation Wachstum dokumentiert, im weiteren Verlauf aber ein starker Abfall des Wachstums beobachtet. Für das Frühisolat dagegen konnte über den gesamten Zeitraum ein fortschreitender Wachstumsabfall detektiert werden. Bei der direkten Betrachtung beider Isolate im Vergleich zueinander konnte gezeigt werden, dass das Spätisolat in den ersten Stunden der Inkubation einen Wachstumsvorteil zeigte, der sich im weiteren Verlauf dann aber umkehrte. Nach 8h wurde ein Wachstumsvorteil für das Frühisolat nachgewiesen.

Beim Vergleich der Signalintensitäten zwischen den charakteristischen Banden des Früh- und dem des Spätisolats wird erkennbar, dass das Verhältnis zu Beginn nicht 1:1 war. Die Bande

des Frühisolats erscheint viel stärker als die Bande des Spätisolats. Dieses lässt sich wahrscheinlich mit der Existenz von SCVs im Spätisolat erklären (siehe auch Kapitel 4.6.3).

### Isolate des Patienten H29

Die Tiling-Array Analyse ergab eine Reihe von potentiellen SNPs zwischen dem Früh- und Spätisolat des Patienten H29. Einer der SNPs aus dem Gen PA0911 wurde durch weitergehende Experimente bestätigt, optimiert und zur Differenzierung des Fitnessexperiments verwendet.

Die Auswertung des Experiments erbrachten die Ergebnisse, die in Abb. 4.6.49 und 4.6.50 dargestellt werden.

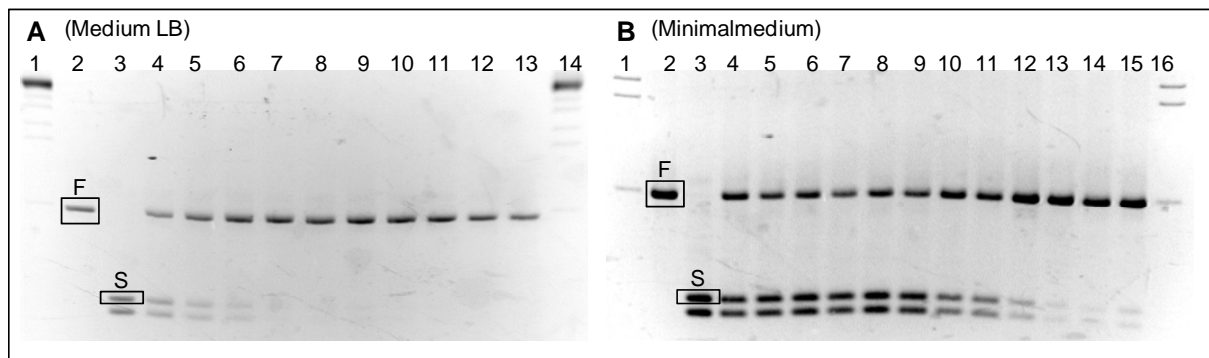


Abb. 4.6.49: Ergebnisse des Konkurrenzexperiments (H29) in LB und in Minimalmedium; Auftragung jeweils der Restriktionsverdau; Teil A: Spur 1 u. 14:  $\lambda$ -Bst DNA-Größenstandard; Spur 2: Frühisolat; Spur 3: Spätisolat; Spur 4-13: LB-Mischkultur nach 0h-76h; Teil B: Spur 1 u. 16:  $\lambda$ -Bst DNA-Größenstandard; Spur 2: Frühisolat; Spur 3: Spätisolat; Spur 4-15: Minimalmedium-Mischkultur nach 0h-148h

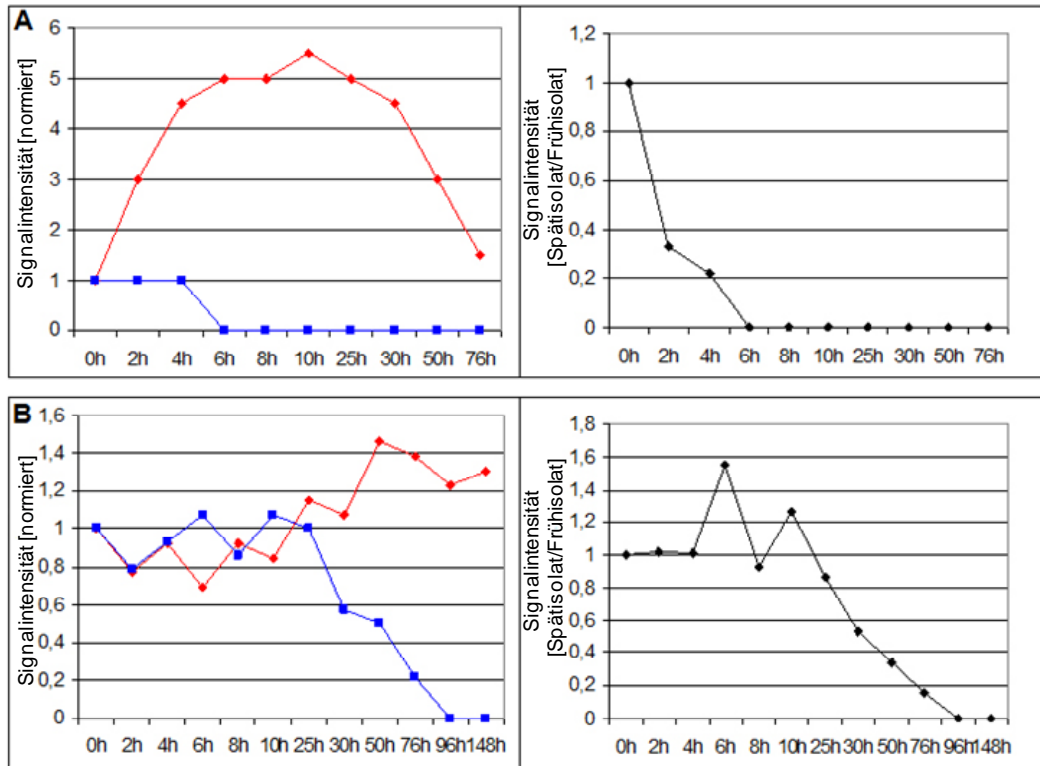


Abb. 4.6.50: Quantitative Auswertung des Konkurrenzexperimentes von Früh- und Spätisolat des Patienten H29; Teil A: Ergebnisse aus dem Vollmedium LB; Teil B: Ergebnisse aus dem Minimalmedium; links sind jeweils die Signalintensitäten des Früh-(Rot) und Spätisolats (Blau) über den Verlauf des Experiments dargestellt, der rechte Teil gibt den Quotienten der Bandenintensität zwischen Spät- und Frühisolat über den Versuchszeitraum an

Bei den Auswertungen dieser Isolate konnte sowohl in LB als in Minimalmedium ein eindeutiger Fitnessvorteil für das Frühisolat des Patienten nachgewiesen werden. In LB ließ sich für das Frühisolat zunächst ein Anstieg, danach ein Rückgang in der Signalintensität detektieren. Das Spätisolat dagegen zeigte von Beginn des Experiments an einen rapiden Rückgang des Wachstums. Bereits nach 6h konnte dieses nicht mehr detektiert werden. In Minimalmedium war ein ähnlicher Verlauf erkennbar. Der Abfall im Wachstum des Spätisolats war hier allerdings langsamer, es war noch bis fast zum Ende des Versuchs nachzuweisen. Erst in den letzten beiden Proben konnte das Spätisolat nicht mehr detektiert werden. Das Frühisolat zeigte über den gesamten Versuchsverlauf ein kontinuierliches Wachstum. Für beide Medien zeigten die Experimente einen eindeutigen Vorteil für das Frühisolat. Der einzige Unterschied zwischen beiden Medien war der zeitliche Faktor. Der Rückgang des Spätisolats erfolgt in LB im Vergleich zum Minimalmedium schneller. So konnte das Spätisolat in LB bereits nach 6h nicht mehr detektiert werden, im Minimalmedium dagegen erst nach 96h nicht mehr.

Isolate des Patienten H31

Für die Isolate des Patienten H31 erfolgte die Differenzierung zwischen dem Früh- und Spätisolat anhand einer Insertion in *lasR*, die nur im Spätisolat nachgewiesen worden war. Da es schwierig ist, eine PCR mit zwei verschiedenen Primerpaaren zu optimieren, wurde der Nachweis des Früh- und des Spätisolats getrennt voneinander in zwei verschiedenen PCR durchgeführt. Ein direkter quantitativer Vergleich zwischen beiden Isolaten ist somit schwierig, wurde aber dennoch durchgeführt, um einen evt. vorhandenen Trend darzustellen.

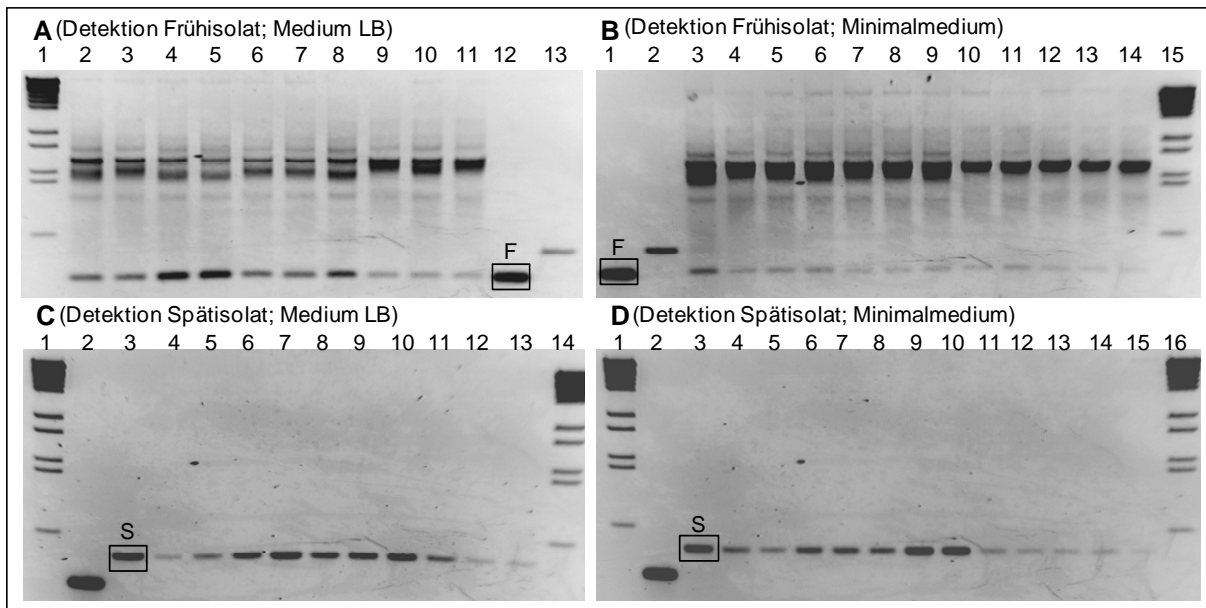


Abb. 4.6.51: Ergebnisse des Konkurrenzexperimentes (H31) in LB und in Minimalmedium; Auftragung jeweils das PCR-Produkt; Teil A: alle Zeitproben mit Primern für *lasR* (Detektion Frühisolat); Spur 1:  $\lambda$ -Bst DNA-Größenstandard; Spur 2-11: LB-Mischkultur nach 0h-76h; Spur 12: Frühisolat; Spur 13: Spätisolat mit Primern für das Transposon; Teil B: alle Zeitproben mit Primern für *lasR* (Detektion Frühisolat); Spur 1: Frühisolat; Spur 2: Spätisolat mit Primern für das Transposon; Spur 3-14: Minimalmedium-Mischkultur nach 0h-148h; Spur 15:  $\lambda$ -Bst DNA-Größenstandard; Teil C: alle Zeitproben mit Primern für das Transposon (Detektion Spätisolat); Spur 1 u. 14:  $\lambda$ -Bst DNA-Größenstandard; Spur 2: Frühisolat mit Primern für *lasR*; Spur 3: Spätisolat; Spur 4-13: LB-Mischkultur nach 0h-76h; Teil D: alle Zeitproben mit Primern für das Transposon (Detektion Spätisolat); Spur 1 u. 16:  $\lambda$ -Bst DNA-Größenstandard; Spur 2: Frühisolat mit Primern für *lasR*; Spur 3: Spätisolat; Spur 4-15: Minimalmedium-Mischkultur nach 0h-148h

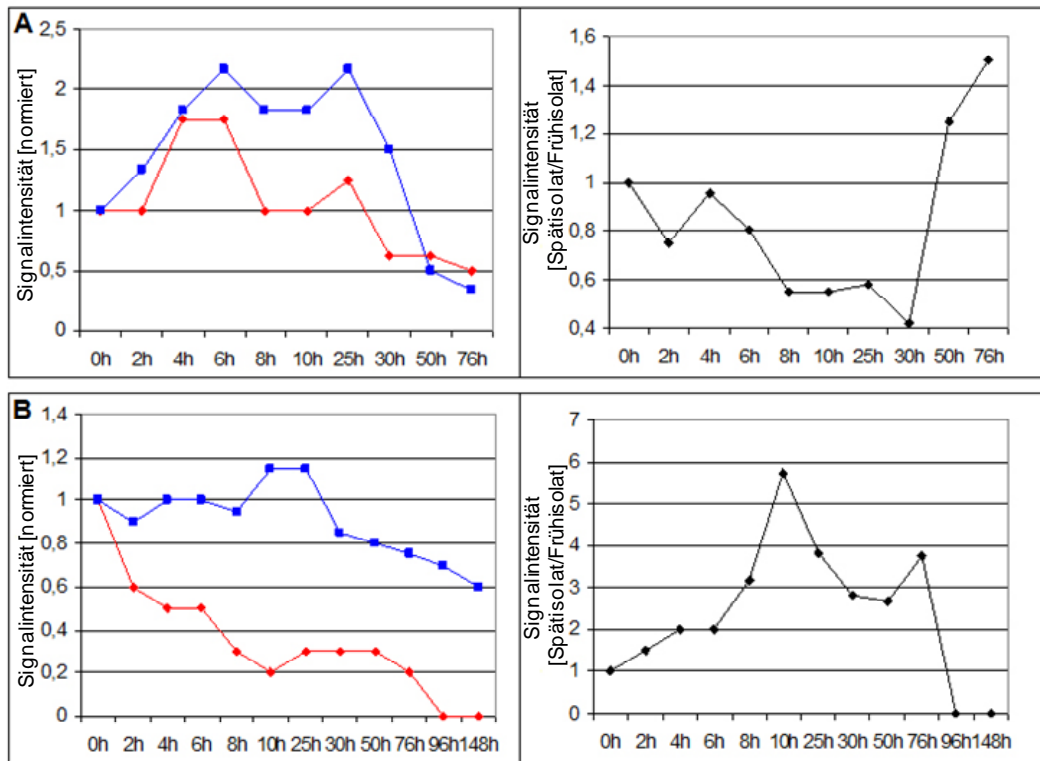


Abb. 4.6.52: Quantitative Auswertung des Konkurrenzexperimentes von Früh- und Spätisolat des Patienten H31; Teil A: Ergebnisse aus dem Vollmedium LB; Teil B: Ergebnisse aus dem Minimalmedium; links sind jeweils die Signalintensitäten des Früh-(Rot) und Spätisolats (Blau) über den Verlauf des Experiments dargestellt, der rechte Teil gibt den Quotienten der Bandenintensität zwischen Spät- und Frühisolat über den Versuchszeitraum an

Die Abb. 4.6.51 und 4.6.52 zeigen, dass das Frühisolat in LB während der ersten 6 h Inkubation wächst, dessen Zellzahl dann aber rückläufig ist. Im Minimalmedium dagegen wurde über den gesamten Beobachtungszeitraum für die charakteristische Bande im Gel ein Abfall der Signalintensität gemessen. Für das Spätisolat konnte sowohl in LB als auch in Minimalmedium erst ein Anstieg und danach ein Abfall der Bandenintensität nachgewiesen werden. Beim direkten Vergleich beider Isolate zeigen sich gegensätzliche Ergebnisse in LB und Minimalmedium. Während das Frühisolat in LB erst überwog, kehrte sich im Verlauf des Experiments diese Situation um. Nach 30h Inkubation wurde das Spätisolat stärker als das Frühisolat. In Minimalmedium dagegen war die Abfolge entgegengesetzt. Erst wurde mehr Spätisolat, später mehr Frühisolat detektiert. Da die Überprüfung beider Isolate aber auf getrennten PCR-Reaktionen beruht, ist die Verlässlichkeit des direkten Vergleichs beider Isolate fraglich.

Ein weiterer Punkt, der bei der Betrachtung der Gele mit der Detektion des Frühisolats beobachtet werden kann, ist die starke Bandenintensität des Nebenprodukts. Dieses ist auf das

PCR-Produkt zurückzuführen, welches sich im Spätisolat mit den Primern für *lasR* bildet (*lasR* + Transposoninsertion). Allerdings werden bei einer PCR generell kleinere Produkte bevorzugt amplifiziert. Daher dürfte maximal eine schwache Bande der Größe von *lasR* inklusive Transposon auf dem Gel zu sehen sein. Eine so starke Bandenintensität lässt darauf schließen, dass das Mischungsverhältnis zwischen Früh- und Spätisolat nicht 1:1 gewesen ist, oder nicht alle Bakterien des Frühisolats transposondefizient waren. Eine Wiederholung des Experiments führte allerdings zu einem vergleichbaren Ergebnis. Somit konnte ein falsches Mischungsverhältnis ausgeschlossen werden. Eine erneute Überprüfung des transposondefizienten Frühisolats ergab Inkonsistenzen. Beim Ausplattieren der Einfrierkultur konnten transposondefiziente Klone verifiziert werden. Ein wiederholtes Ausplattieren dieser überprüften Klone führte aber zur Detektion von transposonpositiven Klonen. Dieses Ergebnis führte zu der Hypothese, dass es einen selektiven Vorteil für das Überleben des Bakteriums gab, wenn das Transposon im *lasR* inseriert vorliegt. Diese Hypothese lässt sich durch die Veröffentlichung von D'Argenio et al. (2007) bestätigen. Hier wird beschrieben, dass eine Mutation in *lasR* zu einem selektiven Vorteil im Laufe der CF-Erkrankung führt. Das Bakterium mit einer Mutation in diesem Gen, setzte sich gegen andere nicht mutierte Bakterien durch. Es könnte also sein, dass das Transposon während des Konkurrenzexperimentes vom Spätisolat auf das Frühisolat übertragen und von dort in *lasR* inseriert wurde. Wahrscheinlicher ist aber, dass das Transposon bereits im Genom an einer anderen Stelle inseriert vorlag, während des Wachstums mobilisiert und in das *lasR* integriert wurde. Diese Insertion führte zu einem selektiven Vorteil, welches das Phänomen erklären würde, dass eine Kolonie zuerst transposondefizient getestet wurde und nach erneutem Ausplattieren oder Kultivieren das Transposon in *lasR* nachzuweisen war. Um diese Hypothese experimentell zu bestätigen, wurde mit transposonspezifischen Primern (Primer, die nur die Insertion abdecken; Sequenzen dazu sind im Anhang in Tab. 10.2.2 aufgelistet) eine PCR durchgeführt. Hierbei sollte analysiert werden, ob die Transposonsequenz bereits im Frühisolat (einem transposondefizienten *lasR* Klon) im Genom inseriert vorliegt. Die Abb. 4.6.53 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung.

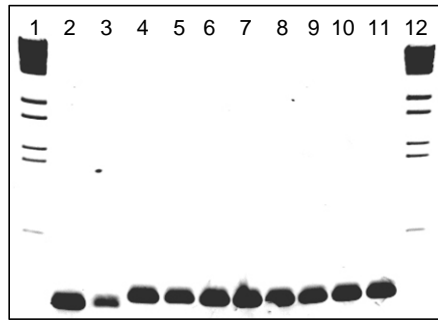


Abb. 4.6.53: Detektion der transposonspezifischen Sequenz im Früh- und Spätisolat des Patienten H31, sowie in Einzelklonen des Frühisolats, nach der PCR-Reaktion; Auftragung: Spur 1 und 12:  $\lambda$ -Bst DNA-Größenstandard; Spur 2-3: Früh- und Spätisolat mit Primern für *lasR*; Spur 4-5: Früh- und Spätisolat mit transposonspezifischen Primern; Spur 6-11: Einzelklone des Frühisolats mit transposonspezifischen Primern

Da eine PCR, die einen Teil des *lasR* und des Transposons umspannte, für das Frühisolat kein Produkt ergab, konnte daraus geschlossen werden, dass die Transposonsequenz bereits im Frühisolat (außerhalb von *lasR*) inseriert vorlag. Neben dem Frühisolat, wurden auch Einzelklone, die in der ersten Selektion im *lasR* transposondefizient und in der zweiten Selektionsrunde dann transposonpositiv beurteilt wurden, mit der PCR getestet. Hier lässt sich das gleiche Ergebnis erkennen. Als Positivkontrolle wurde das Spätisolat mitgetestet. Dieses weist sowohl die transposonspezifische Sequenz, als auch das Transposon in *lasR* auf. Demnach konnte die Hypothese durch dieses Experiment bewiesen werden. Die Transposonsequenz liegt bereits im Frühisolat im Genom vor und wird aufgrund des selektiven Vorteils während des Wachstums in *lasR* inseriert. Für die Auswertung des Konkurrenzexperimentes bedeutet dieses Ergebnis allerdings, dass der Marker keine verlässlichen Aussagen über die Fitness eines Isolats zulässt.

Eine Southern-Blot Analyse zeigte, dass die Transposonsequenz mehrmals im Genom inseriert vorliegt. Um die genauen Positionen des Transposons im Genom zu verifizieren, könnte im Anschluss an diese Arbeit die Y-Linker Methode angewendet werden (Kwon et al., 2000).

Diskussion:

In der Literatur wurde bereits mehrmals beschrieben, dass es im Laufe der CF-Erkrankung zu einer Adaptation von *P. aeruginosa* an die spezifischen Bedingungen in der Lunge des Patienten kommt. Diese geht einher mit einer Reihe von genetischen Veränderungen. (Mena et al., 2008; Montanari et al., 2007; D'Argenio et al., 2007 und Smith et al., 2006). Bisher sind aber keine Veröffentlichungen erschienen, in denen die Fitness von frühen und späten *P. aeruginosa* Isolatzen während einer CF-Erkrankung direkt untereinander verglichen wurde.



In dieser Arbeit wurden somit das erste Mal ein Früh- und ein Spätisolat eines Patienten in einem kompetitiven Fitnessexperiment zusammen analysiert und gegenseitige Beeinflussungen detektiert.

Die Fitnessexperimente wurden zum einen in Vollmedium (LB) und zum anderen in einem Minimalmedium (M9 mit 1% Glycerin als Kohlenstoffquelle) durchgeführt. Das Vollmedium sollte dabei den Nährstoffreichtum in der CF-Lunge simulieren und das Minimalmedium die Umwelt darstellen, in der die Bakterien nur begrenzt Nährstoffquellen nutzen können.

Bei den Patienten H1, H29 und eingeschränkt auch bei dem Patienten H31 konnte sich unter beiden Bedingungen (LB und Minimalmedium) das Frühisolat durchsetzen. Im Patienten H5 zeigte sich in LB ein leichter Wachstumsvorteil für das Spätisolat und in Minimalmedium wiederum einen Vorteil für das Frühisolat. Die Auswertung der Isolate des Patienten H8 zeigten vergleichbare Ergebnisse zum Patienten H5.

Im gemeinsamen Vergleich der verschiedenen Patienten ist zu erkennen, dass sich aus allen Patienten das Frühisolat in Minimalmedium gegen das Spätisolat durchsetzt. Im Patienten H29 wurde dabei die stärkste Konkurrenzreaktion beobachtet. Hier konnte sich das Frühisolat vollständig durchsetzen und verdrängte das Spätisolat, so dass dieses zu den späteren Zeitpunkten nicht mehr detektiert wurde. Die Ergebnisse der Fitnessexperimente in Minimalmedium bestätigten die Ergebnisse aus den Einzelwachstumsversuchen (siehe Kapitel 4.6.5). Auch hier wurde für das Frühisolat ein Wachstumsvorteil in Minimalmedium gegenüber dem Spätisolat beobachtet. Frühisolate, die direkt aus der Umwelt stammen und somit noch nicht an das Lungenmilieu angepasst sind, können sich demnach in Medien, die der Umwelt ähneln, gegenüber einem an die CF-Lunge adaptierten Klon durchsetzen bzw. einen Wachstumsvorteil aufweisen.

Bei der Betrachtung der Competitionsexperimente in LB ließen sich die Ergebnisse in zwei Kategorien einteilen. In den Patienten H1, H29 und H31 zeigte das Frühisolat auch in LB einen Wachstumsvorteil gegenüber dem Spätisolat, während sich bei den Patienten H5 und H8 das Spätisolat in LB durchsetzen konnte. Diese Diskrepanzen konnten mit dem klinischen Verlaufs der verschiedenen Patienten in Einklang gebracht werden. Die Patienten, deren Frühisolat auch in LB einen Wachstumsvorteil aufwies, zeigten einen sehr schweren klinischen Verlauf der Erkrankung. Die Patienten H1 und H29 verstarben bereits vor einigen Jahren. Die beiden Patienten H5 und H8 zeigten einen Vorteil für das Spätisolat und konnten durch einen milden, bzw. sogar sehr milden Krankheitsverlauf charakterisiert werden. Bei diesen beiden Patienten scheint der Klon gut an die Lunge adaptiert zu sein, was mit einem mildereren Krankheitsverlauf einhergeht. Diese gut adaptierten Klone zeigten gegenüber dem

unangepassten, umweltähnlichen Frühisolat einen selektiven Wachstumsvorteil im nährstoffreichen Medium. Bei diesen Spätisolaten war, wie bereits in Kapitel 4.6.5 diskutiert wurde, die katabolische Repressionskontrolle unterdrückt. Die Bakterien konnten demnach mehrere Nährstoffquellen gleichzeitig verstoffwechseln und wiesen daher in einem Medium mit vielen Nährstoffquellen einen Wachstumsvorteil gegenüber den Frühisolaten auf. Bei den Patienten mit einem schweren Krankheitsverlauf war der Klon wahrscheinlich nur schlecht, bzw. mäßig an die CF-Lunge angepasst. Hier fehlten entweder Mutationen, die zu einer Unterdrückung der katabolischen Repressionskontrolle führten oder die Stämme waren auxotroph und somit konnte der daraus resultierende Wachstumsvorteil nicht beobachtet werden. In diesem Fall zeigte das Frühisolat mit allen Virulenzfaktoren, die ein aus der Umwelt stammender Klon aufweist, eine höhere Fitness und konnte sich deshalb gegenüber dem Spätisolat durchsetzen.

Mit diesen Fitnessexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass adaptierte Spätisolate aus der CF-Lunge zwar in Vollmedien gegenüber einem unadaptierten Frühisolat einen Wachstumsvorteil aufwiesen, in einem Minimalmedium allerdings nicht. Mit dieser Erkenntnis konnte ein Rückschluss auf die Verbreitungsfähigkeit von *P. aeruginosa* gezogen werden.

*P. aeruginosa*, die erst seit kurzer Zeit die Lunge eines CF-Patienten kolonisieren, exprimieren ebenso wie Umweltisolate noch viele Virulenzfaktoren. Dadurch ist eine erneute Besiedlung der Umwelt mit diesen Klonen sehr wahrscheinlich. Dort kann der Klon entweder weiter persistieren oder auch andere Habitate (Tier und/oder Mensch) besiedeln. Die Wahrscheinlichkeit für eine Übertragung von Mensch zu Mensch ist in diesem Fall sehr viel geringer. Kommt es dennoch zu einer direkten Übertragung, ist dies, aufgrund des genetischen Repertoires eines umweltähnlichen Stamms, meist mit einer akuten Infektion verbunden. Dagegen sind Spätisolate an die CF-Lunge angepasst und zeigen geringere Überlebensfähigkeit in einem umweltähnlichen Milieu. Aus diesem Grund ist die Übertragbarkeit von *P. aeruginosa* aus späten CF-Isolaten auf die Umwelt sehr gering. Klone, die dennoch in die Umwelt freigesetzt werden, zeigen nur eine geringe bzw. eingeschränkte Überlebensfähigkeit. Normalerweise finden Übertragungen von CF-Patient zu CF-Patient aber über die Umwelt statt. Demnach ist die Gefahr für Kreuzinfektionen bei Spätisolaten geringer als bei Frühisolaten. Nur ein sehr intensiver Kontakt zwischen den Patienten würde zu einer Übertragung führen.

## 5. SYNOPSIS UND AUSBLICK

Die Experimente dieser Arbeit brachten sowohl für die Populationsstruktur als auch für den Adaptationsprozess von *P. aeruginosa* an die CF-Lunge einige wichtige, neue Erkenntnisse.

*P. aeruginosa* weist entgegen früherer Veröffentlichungen weder eine klare panmiktische (Kiewitz et al., 2000; Curran et al., 2004) noch eine rein klonale (Vernez et al., 2005) Populationsstruktur auf. Vielmehr zeigt das Genom von *P. aeruginosa* eine Mosaikstruktur. Teile des Kerngenoms sowie des akzessorischen Genoms sind nicht zufällig im klonalen Rahmen verteilt. Jeder Klon bevorzugt ein spezifisches Repertoire an akzessorischen Segmenten. Darüber hinaus tolerieren einige Teile des Kerngenoms nur eine kleine Auswahl an möglichen Kombinationen von Sequenzvarianten. Diese stehen miteinander in einem Kopplungsungleichgewicht, während andere Teile frei rekombinierbar sind. Demnach weist die Populationsstruktur sowohl panmiktische als auch klonale Strukturen auf. Das Genom besteht aus klon-spezifischen Segmenten des Kern- und des akzessorischen Genoms (charakteristisch für eine klonale Struktur) sowie aus Blöcken, die sich durch uneingeschränkten Gentransfer charakterisieren lassen (wie bei panmiktischen Populationen). Des Weiteren wird in der Population von *P. aeruginosa* eine hohe Klondiversität beobachtet, die sich nicht in einer Gleichverteilung der Klone untergliedern lässt, sondern auf wenige dominante Klone und viele Einzelklone zurückzuführen ist. Das klonale Spektrum einer lokalen Gemeinschaft ist dabei mit dem der globalen Population vergleichbar. Unterschiede lassen sich nur in der Häufigkeit der detektierten Klone nachweisen. Diese sind wahrscheinlich auf Klone zurückzuführen, die sich in einer Klinik bevorzugt verbreitet haben (zentrumspezifische Klone). Durch eine eBurst Darstellung des Verwandtschaftsverhältnisses der detektierten Genotypen konnte gezeigt werden, dass die in der Population dominierenden Klone eine höhere Assoziation zu den anderen dominierenden Klonen zeigen (einem Cluster zugeordnet werden konnten) als zu vielen der Einzelklone. Klone, die den beiden größeren klonalen Komplexen zugeordnet wurden (dominante Klone), sind dabei mit einem milderen Krankheitsverlauf assoziiert. Somit scheint es eine Korrelation zwischen dem Klon selbst und dem Krankheitsverlauf eines CF-Patienten zu geben. Auch ein hohes Maß an genetischen Änderungen im Geninselbereich (adaptive Radiation) konnte mit einem milden Krankheitsverlauf des Patienten in Zusammenhang gebracht werden.

Die Experimente dieser Arbeit ergaben weiterhin, dass die Adaptation von *P. aeruginosa* an die CF-Lunge im Vergleich zu anderen Anpassungen während einer Infektion ein sehr langsam verlaufender Prozess ist, der über viele Jahre stattfindet. Die Besiedlung mit

*P. aeruginosa* beginnt wahrscheinlich über die oberen Atemwege, die als Eintrittspforten dienen und somit eine spätere chronische Besiedlung der unteren Atemwege ermöglichen. Im Gegensatz zu anderen Pathogenen (z.B. *A. fumigatus* und *C. albicans*) wurde in beiden Kompartimenten der gleiche Klon nachgewiesen. Es kommt im Laufe der Infektion zu einer Entwicklung von Persistoren, die mit einer chronischen Infektion verbunden sind. Dabei entsteht nicht ein dominanter, adaptierter Klon, sondern eine Vielzahl von klonalen Varianten, die jeweils an eine spezifische Nische der Lunge angepasst sind. Durch diese Gemeinschaft an verschiedenen adaptierten Varianten besitzt das *P. aeruginosa* Bakterium einen selektiven Vorteil, sich vor anderen Bakterien zu behaupten.

Neben den bereits bekannten genetischen und phänotypischen Veränderungen, die zu einer Adaptation des Bakteriums an das Habitat führen, kommt es aber auch zu einer Adaptation im Stoffwechsel, die eine direkte Auswirkung auf die Fitness des Bakteriums hat. Die kompetitiven Fitnessexperimente dieser Arbeit konnten erstmals zeigen, dass Frühisolate in aquatischen, nährstoffarmen Nährmedium gegenüber Spätisolaten einen Wachstumsvorteil zeigen. Im Gegensatz dazu zeigen die Spätisolats in nährstoffreichen (d.h. lungenähnlichen) Medien aufgrund eines Defekts der katabolischen Repressionskontrolle einen eindeutigen Fitnessvorteil gegenüber den Frühisolaten. Demgegenüber lassen sich Frühisolate, weil sie mit einem geringen Nahrungsangebot zurechtkommen, wieder leicht in die Umwelt freisetzen, während Spätisolats in der Umwelt häufig nicht mehr überlebensfähig sind.

Akute Infektionen mit *P. aeruginosa* lassen sich heutzutage bei den immunokompetenten CF-Patienten dank der großen Auswahl an Antibiotika mit hoher Erfolgsquote behandeln. Chronische Infektionen dagegen sind bis heute aufgrund ständig auftretender neuer Antibiotikaresistenzen nur sehr schwer zu behandeln. Eine dauerhafte Eliminierung der *P. aeruginosa* in diesem Stadium der CF-Erkrankung gelingt demnach nur sehr selten. Letztendlich könnte das Wissen, dass eine hohe Variabilität im akzessorischen Genom mit einem milderem Krankheitsverlauf assoziiert ist, zu einer alternativen Behandlungsmethode oder Behandlungsstrategie führen. Es ist bekannt, dass CF-Patienten während der überwiegenden Zeit der Erkrankung mit einem oder mehreren *P. aeruginosa* Klonen kolonisiert sind. Es stellt sich daher die Frage, ob es von Vorteil ist, einen Patienten, der einen Klon mit einer hohen adaptiven Radiation trägt, keiner aggressiven Antibiotikatherapie zu unterziehen, wenn der Patient einen milden Krankheitsverlauf aufweist? Auch wenn die Therapie zu einer vollständigen Eliminierung des Klons führen würde, wird der Patient

innerhalb kürzester Zeit von einem neuen Klon besiedelt werden, der vielleicht durch fehlende genetische Variationen einen schwereren Verlauf mit sich bringen würde.

Auch das Wissen, dass sich Spätisolate nur sehr schwer von einem Patienten auf die Umwelt übertragen lassen, während Frühisolate leicht übertragbar sind, könnte in die krankenhaushygienischen Richtlinien zum Umgang mit Pseudomonasinfektionen bei CF einfließen.

Da beide angeführten Punkte einen direkten Einfluss auf die Hygiene und die Therapie haben, wäre es sinnvoll, die Datenbreite zu erweitern, um so die Ergebnisse dieser Arbeit statistisch signifikant belegen zu können. Außerdem wäre es interessant, andere chronische Infektionen mit *P. aeruginosa* wie z.B. die *chronische obstruktive Lungenerkrankung* (COPD) auf diese Ergebnisse hin zu untersuchen.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

### *P. aeruginosa*

#### 4.1 Populationsstruktur von *P.aeruginosa*

Die Populationsstruktur von *P. aeruginosa* zeichnet sich durch eine hohe Klondiversität auf. Die Klone sind allerdings nicht gleichverteilt vertreten, sondern gliedern sich in wenige stark dominierende Klone und viele Einzelklone auf. Die dominanten Klone lassen sich dabei ubiquitär in verschiedenen Habitaten und Orten wiederfinden

### *P. aeruginosa* in CF / nicht CF

#### 4.2 Klonales Spektrum im Vergleich zweier Populationen

In beiden Populationen konnten dominante, ubiquitäre Klone nachgewiesen werden.

#### 4.3 Klonales Spektrum an der Medizinischen Hochschule Hannover

Die MHH repräsentiert die gleiche klonale Diversität wie die globale Population von *P. aeruginosa*, nur die Häufigkeit der dominanten Klone variierte.

### *P. aeruginosa* im CF-Patienten

#### 4.4 Klonales Spektrum im Patienten

Das klonale Spektrum zwischen oberen und unteren Atemwegen stimmte zu 96 % überein.

Die oberen Atemwege sind die Eintrittspforte für *P. aeruginosa* und ermöglichen somit den Beginn einer späteren chronischen Besiedlung der unteren Atemwege.

#### 4.5 Klonale Vielzahl innerhalb eines Patienten (aus der MHH und der CF-Ambulanz Kopenhagen) über den gesamten Krankheitsverlauf der Cystischen Fibrose

In den CF-Patienten wurden über den Infektionsverlauf 1-5 Klone detektiert. Es konnten lange persistierende Klone mit zwischenzeitlicher Ko-Kolonisation nachgewiesen werden.

Das klonale Spektrum beider Kliniken (MHH und Kopenhagen) wies große Unterschiede auf. In Hannover wurde ein Spektrum detektiert, welches der globalen Verteilung sehr ähnelte, während in Kopenhagen überwiegend zwei Klone detektiert wurden, die global nur sehr selten vorkamen.

Es scheint, dass adaptive Radiation mit einem mildereren klinischen Verlauf assoziiert ist.

### Adaptationsprozesse

#### 4.6 Adaptationsprozesse von *P. aeruginosa* in der CF-Lunge über den Zeitraum der Infektion

Phänotypische Untersuchungen der *P. aeruginosa* aus den ersten drei Jahren der Infektion und den letzten drei Jahren ergaben einen nachweisbaren Adaptationsprozess an die CF-Lunge.

Die singuläre phänotypische Analyse führte zum Ergebnis, dass es viele klonale Varianten gibt, die sich an unterschiedliche Nischen anpassen und sich in variierenden Adaptationsprozessen befinden.

Kompetitive Fitnessexperimente ergaben, dass Frühisolate in nährstoffarmen Medien eine höhere Fitness zeigten als Spätisolate. In nährstoffreichen Medien dagegen wiesen Spätisolate eine höhere Fitness auf als Frühisolate.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in einem ersten Schritt die Populationsstruktur von *P. aeruginosa* analysiert.

Hierzu wurden 282 *P. aeruginosa* Isolate aus den Habitaten Mensch, Tier und Umwelt verschiedenster geographischer Herkunft mit einem SNP-Chip genotypisiert. Dieser Chip erlaubt die Identifizierung des *P. aeruginosa* Genotyps durch SNP-Typisierung und die Detektion von Unterschieden des akzessorischen Genoms. Neben 17 Markern des Kerngenoms befinden sich auf dem Chip auch 41 Marker des akzessorischen Genoms.

Die Typisierung dieser Referenzstammsammlung ergab eine hohe Klondiversität innerhalb der Population, die sich aber nicht in eine Gleichverteilung der Klone charakterisieren ließ. Die Population setzte sich vielmehr aus einerseits wenigen, dominierenden Klone und andererseits sehr vielen Einzelklonen zusammen. Dieses Ergebnis konnte durch die Bestimmung zweier Diversitätsindizes unabhängig voneinander bestätigt werden. Die Differenzierung des klonalen Spektrums in Bezug auf das Habitat und die geographische Herkunft führte zu dem Ergebnis, dass die dominanten Klone ubiquitär nachzuweisen waren, demnach in verschiedenen Habitaten und unterschiedlichen geographischen Orten gefunden wurden. Des Weiteren wurden im Habitat Tier in 80 % der Fälle Klone detektiert, die in keinen anderen Habitaten nachgewiesen werden konnten. Es scheint demnach tierspezifische Klone zu geben. Daraus kann gefolgert werden, dass wahrscheinlich auch humanspezifische Klone existieren. Die meisten Isolate aus akuten Infektionen des Menschen konnten dem Klon F429 zugeordnet werden. Dieser Klon konnte zudem häufig in der Umwelt oder frühen CF-Isolaten detektiert werden und scheint noch viele Virulenzfaktoren aus der Umwelt zu besitzen, die im Patienten eine akute Infektion auslösen. Innerhalb der *P. aeruginosa* Population wurde mit Hilfe einer Hauptkomponentenanalyse die Assoziation zwischen verschiedenen Genabschnitten nachgewiesen. Es bestehen zum einen große Korrelationen zwischen Genen des Kerngenoms, wie z.B. *oriC* und *exoS* oder *ampC*. Andererseits konnten aber auch Assoziationen zwischen dem Kerngenom und einigen davon genomisch weit entfernten akzessorischen Genen bzw. unter den akzessorischen Genen selber beobachtet werden. Die Assoziation verschiedener Gene über eine große genomische Distanz hinweg, wie z.B. zwischen den variablen Genen und *ampC* oder *exoS*, ist wahrscheinlich auf eine Mosaikstruktur des Genoms zurückzuführen. Das Genom besteht zum einen aus klon-spezifischen Segmenten des Kern- und des akzessorischen Genoms, die im Kopplungsungleichgewicht stehen. Zum anderen ist das Kerngenom durch Rekombinationen von Blöcken unterbrochen, die sich durch uneingeschränkten Gentransfer charakterisieren lassen. Somit weist *P. aeruginosa* sowohl Charakteristika einer panmiktischen als auch einer

klonalen Populationsstruktur auf. Ältere Veröffentlichungen, die die Struktur als nicht-klonal (Kiewitz et al., 2000; Curran et al., 2004) oder panmiktisch (Vernez et al., 2005) bezeichneten, konnten somit widerlegt werden.

Der direkte Vergleich einer *P. aeruginosa* Population aus dem Habitat CF-Lunge mit Isolaten aus anderen Habitaten ergab in beiden Fällen vergleichbare Ergebnisse wie die der Referenzsammlung. Auch hier wurden wenige ubiquitäre, dominierende Klone und viele Einzelklone detektiert. Die Überlappung beider klonalen Spektren war dabei vergleichbar, allerdings gab es große Unterschiede in der Häufigkeit der detektierten Klone.

In Anlehnung an die Veröffentlichungen von Römling et al. (1994) und Scott et al. (2004) wurden 418 *P. aeruginosa* Isolate von 61 verschiedenen CF-Patienten der MHH genotypisiert, um eventuelle regionale Häufungen einiger Klone durch nosokomiale Übertragung oder eine krankheitsassoziierte Häufung spezifischer Klone zu detektieren. Die Genotypisierung erbrachte ein mit der europäischen und globalen *P. aeruginosa* Population vergleichbares klonales Spektrum. Allerdings bestanden Unterschiede in der Häufigkeit der detektierten Klone. Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede in der Häufigkeit wäre, dass es Klone gibt, die sich besser an spezifische Orte adaptiert haben, dadurch Wachstums- und Überlebensvorteile haben und somit häufiger in diesem Habitat oder an diesem Ort zu detektieren sind (zentrumsspezifische Klone). Es kam durch diese Spezialisierung allerdings nicht zu einer Verdrängung der anderen Klone.

Der nachfolgende Teil der Arbeit beschäftigte sich nach der Analyse der allgemeinen Populationsstruktur von *P. aeruginosa* spezifisch mit dem Habitat CF-Lunge und seiner Besiedlung mit *P. aeruginosa*.

In einem ersten Schritt wurden *P. aeruginosa* Isolate aus den oberen und unteren Atemwegen von CF-Patienten miteinander verglichen. Die Genotypisierung mit dem Chip ergab in 96 % eine Übereinstimmung des Klons in den oberen und unteren Atemwegen. Ein kompartimentübergreifender Befall mit pathogenen Keimen wurde nicht nur anhand von *P. aeruginosa* nachgewiesen. In der Veröffentlichung dieser Daten wurden auch weitere Keime wie *S. aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* untersucht (Mainz et al., 2009). *S. aureus* und *H. influenzae* wurden, wie *P. aeruginosa*, in beiden Kompartimenten gefunden, während sowohl *A. fumigatus* als auch *C. albicans* nur in den unteren Atemwegen nachgewiesen werden konnten. Bereits in der Veröffentlichung von Walter et al. (1997) wurde gezeigt, dass lungentransplantierte CF-Patienten innerhalb kürzester Zeit (wenige Monate) den gleichen *P. aeruginosa* Klon in der neuen Lungen zeigten, der bereits vor der Transplantation in der Lunge nachgewiesen werden konnte. Die



oberen Atemwege bieten demnach dem Pathogen ein Kompartiment zum Überleben und sind wahrscheinlich sogar die Eintrittspforte für weitere Pathogene und somit mitverantwortlich für eine Neubesiedelung. Dieses wurde bereits in einigen Veröffentlichungen beschrieben (Taylor et al., 1992; Lewiston et al., 1991; Nunley et al., 1998) und mit den Ergebnissen dieser Studie zusätzlich bestätigt.

In der Regel tragen CF-Patienten den initial erworbenen Klon für viele Jahre im Respirationstrakt. Während dieser langen Zeit entwickeln sich aus vielen dieser initialen Klone unterschiedliche klonale Varianten, die häufig einen Defekt im DNA-Reparatursystem aufweisen (Oliver et al., 2000; Ciofu et al., 2005). Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten diese Abläufe nur an einzelnen CF-Isolaten untersucht werden. Die Medizinische Hochschule Hannover und die CF-Ambulanz in Kopenhagen sind die einzigen Kliniken, die über eine Stammsammlung verfügen, die sequentielle *P. aeruginosa* Isolate von verschiedenen CF-Patienten über einen sehr langen Zeitraum der Infektion umfasst (20-30 Jahre). Mit einer Genotypisierung von insgesamt 519 sequentiellen Isolaten aus 47 verschiedenen CF-Patienten (35 aus der MHH und 12 aus der CF-Ambulanz Kopenhagen) wurde analysiert, wie viele Klone im Laufe einer CF-Infektion in der Lunge vorkamen, wie lange initiale Klone in der Lunge persistierten, ob es Ko-Kolonisationen gab und ob eine Assoziation zwischen Klon und klinischen Verlauf existierte.

Der Vergleich beider Stammsammlungen ergab dabei große Unterschiede. Das klonale Spektrum der Isolate aus der MHH entsprach der globalen Verteilung. In Kopenhagen dagegen wurden zwei stark dominierende Klone detektiert, die in der globalen *P. aeruginosa* Population zu den selteneren Klonen gehörten. Die Beobachtung des zeitlichen Verlaufs einer *P. aeruginosa* Infektion zeigte, dass in Kopenhagen nur ein Patient über den gesamten Beobachtungszeitraum mit einem Klon kolonisiert war. Währenddessen konnten in Hannover bei etwa einem Drittel der Patienten nur ein Klon detektiert werden. Auch in der Persistenz der initialen Klone ergaben sich große Unterschiede. In Hannover konnten noch etwa 60 % der initialen Klone in den CF-Patienten am Ende des Beobachtungszeitraums detektiert werden, in Kopenhagen dagegen persistierten zum Ende nur noch etwa 20 % der initialen Klone. Eine detaillierte Auswertung der Genotypisierung in Bezug auf Ko-Kolonisationen zeigte für Kopenhagen eine relativ gleichmäßige Verteilung nachweisbarer Ko-Kolonisationen über den gesamten Beobachtungszeitraum, dagegen wurde in Hannover ein Maximum an Ko-Kolonisationen nach etwa 2 Jahren dokumentiert. In den nachfolgenden Jahren wurden in Hannover nur noch wenige Ko-Kolonisationen gefunden. Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass sich die initialen Klone in Hannover in kurzer

Zeit optimal an die CF-Lunge adaptiert haben und sich gegen die Mehrheit der nachfolgenden Klone durchsetzen konnten. In Kopenhagen dagegen wiesen die meisten CF-Patienten zu Beginn der Kolonisation sehr seltene oder sogar einmalige Klone auf. Seit Beginn der 80-iger Jahre wurden hier die CF-Patienten einer sehr frühen und aggressiven Antibiotikatherapie unterzogen, um eine chronische Besiedlung und die damit einhergehende Adaptation des Bakteriums an die CF-Lunge zu verhindern. Es gab schon damals Veröffentlichungen, die auf eine mögliche Kreuzinfektion zwischen verschiedenen Patienten hinwiesen (Pedersen et al., 1986). Infolgedessen kam es in den 80-iger Jahren zu einer Isolation während der stationären iv-Therapie (Hoiby et al., 1995), um mögliche Kreuzinfektionen zu minimieren. Die in dieser Arbeit untersuchte Patientenkohorte aus Kopenhagen gehörte zu einer solchen isolierten Patientengruppe. Zu diesem Zeitpunkt wurde der in dieser Kohorte insgesamt stark dominierende Klon 0822 das erste Mal detektiert, breitete sich auf sieben weitere Patienten aus und führte schließlich in vielen der CF-Patienten zu einer Verdrängung der initialen Klone (daher die nur geringe nachweisbare Persistenz der initialen Klone). Die Analyse der Therapiemethoden in beiden CF-Zentren zeigte ebenfalls große Unterschiede, durch die sich das stark voneinander abweichende klonale Spektrum erklärte. In Hannover fand eine iv-Therapie mit einem bzw. zwei Antibiotika (Kombinationstherapie) nach Beginn der chronischen Besiedlung statt. Das CF-Zentrum in Kopenhagen dagegen zeichnete sich durch eine sehr frühe (schon nach der ersten *P. aeruginosa* positiven Sputumprobe), aggressive iv-Therapie aus, bei der viele verschiedene Antibiotika zur gleichen Zeit verabreicht wurden. Des Weiteren wurde in Hannover eine ambulante Therapie bevorzugt, während in Kopenhagen die iv-Therapie ausschließlich in der Klinik stattfand. Auch die Anzahl der Therapien variierte stark, in Kopenhagen wurden zum Teil doppelt so viele Therapien durchgeführt wie in Hannover. Die beiden stark dominierenden Klone in Dänemark haben sich demnach am besten an das stark variierende Behandlungsspektrum angepasst und wiesen einen selektiven Vorteil gegenüber anderen Klonen auf.

Eine eBurst-Analyse konnte zeigen, dass in Hannover die Klone, die Teil der zwei großen klonalen Komplexe waren, mit einem mildereren Krankheitsverlauf assoziiert waren als die Klone, die keine Verwandtschaft zu anderen Klonen aufwiesen. Diese kolonisierten wiederum eher die Patienten, die im späteren Verlauf verstorben waren. Da in Kopenhagen durch die intensive und aggressive Antibiotikatherapie eine Selektion zweier stark dominierender Klone stattfand, konnte hier keine Assoziation zwischen Klon und Krankheitsverlauf des CF-Patienten nachgewiesen werden.

Die Auswertung der adaptiven Radiation, die sich auf die genetischen Änderungen im Geninselbereich bezog, zeigte ebenfalls eine Korrelation zum klinischen Verlauf der Patienten. In Hannover wies keiner der Patienten, die während des Beobachtungszeitraums verstorben waren, eine hohe Radiation auf. Dagegen zeigten die Patienten, bei denen ein hohes Maß an adaptiver Radiation auftrat, einen milderen Verlauf. Es scheint, dass ein Klon, der optimal an die erkrankte Lunge angepasst ist, zu einer abgeschwächten Immunreaktion des Patienten führt. Bei einer reduzierten Immunantwort, wäre die Expression bestimmter Mediatoren, wie z.B. die Ausschüttung von verschiedenen Interleukinen, erniedrigt und als Folge wären die Entzündungsreaktionen ebenfalls reduziert. Dies könnte sich wiederum positiv auf den Krankheitsverlauf des Patienten auswirken. In Kopenhagen wurde diese Assoziation zwischen Radiation und klinischem Verlauf allerdings nicht gefunden. Hier konnte vielmehr ein anderer Prozess beobachtet werden. Die Klone mit hoher Radiation wurden hier vermehrt in den Patienten detektiert, die während des Beobachtungszeitraums verstorben waren. Bei näherer Betrachtung konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei dem Klon mit hoher Radiation um den dominierenden Klon innerhalb dieser Population handelte. Es scheint, dass der enge Kontakt zwischen den CF-Patienten (isolierte Patientengruppe, die stationär in einem Raum zusammen behandelt wurden) dazu führte, dass der dominante Klon ständig zwischen den Patienten ausgetauscht wurde. Dieser passte sich daraufhin wieder an die Umgebung der neuen Lunge an und wurde währenddessen erneut auf einen der anderen Patienten übertragen. Es kam somit zu einem dauernden Austausch eines unadaptierten Klons. Dies zeigte sich durch die hohe Radiation, die im Geninselbereich in den verschiedenen Isolaten detektiert werden konnte. Der unterschiedliche Krankheitsverlauf (einige der Patienten verstarben bzw. waren schwer krank, andere zeigten einen milden Krankheitsverlauf) lässt sich wahrscheinlich auf die verschiedenen genetischen Komponenten der einzelnen Patienten sowie auf deren individuelles Immunsystem zurückführen.

Durch die Genotypisierung der sequentiellen Isolate vieler verschiedener Patienten wurde gezeigt, dass es im Laufe der CF-Erkrankung zu einer Adaptation von *P. aeruginosa* an die CF-Lunge kommt. Diese Anpassung an das Habitat Lunge wurde mit Hilfe ausgewählter Isolate detaillierter untersucht. Hierzu wurden 24 sequentielle Isolate 6 verschiedener Patienten mit unterschiedlichem Krankheitsverlauf und einem unterschiedlichen Ausmaß an genetischen Änderungen im Geninselbereich ausgewählt. Ein wichtiges Auswahlkriterium war zudem, dass die sequentiellen Isolate eines Patienten denselben Klon detektierten und es sich bei den ausgewählten Isolaten um Nichthypermutatoren handelte, denn nach der Veröffentlichung von Mena et al. (2007) zeigen Hypermutatoren eine geringere Fitness.

Da aus Veröffentlichungen bekannt ist, dass die Adaptation an die CF-Lunge sowohl mit genetischen Umorganisationen (Ernst et al., 2003; Römling et al., 1997; Kiewitz et al., 2000; Kresse et al., 2003) als auch mit phänotypischen Veränderungen einhergeht (Smith et al., 2006), wurden die sequentiellen Isolate in einem ersten Schritt phänotypisch charakterisiert. Aus der Literatur ist ebenfalls bekannt, dass es beim Übergang von einer akuten zu einer chronischen Infektion zu einem Verlust von Virulenzfaktoren kommt. Stämme werden z.B. unbeweglich (Mahentiralingam et al., 1994), LPS- und Pyocin-defizient. Zusätzlich kommt es während der chronischen Besiedlung zu einer Abnahme der Cytotoxizität (Lee et al., 2005) und es bilden sich sogenannte „small colony variants“ (Häussler et al., 1999) sowie mukoide Kolonien (Govan et al., 1996). Die Phänotypisierung der sequentiellen Isolate ergab zwar einige wenige nachweisbare Verluste von Eigenschaften wie z.B. die Proteasesekretion oder die Elastaseproduktion. In den meisten Fällen konnte allerdings keine Tendenz eines Verlustes oder eines Erwerbs nachgewiesen werden. Um eine Adaptation an die Lunge nachzuweisen war es demnach notwendig, so viele Isolate wie möglich über den gesamten Infektionsverlauf zu analysieren. Dies wurde anhand eines Patienten exemplarisch durchgeführt. Alle verfügbaren Isolate des Patienten H29 wurden dazu phänotypisch charakterisiert. Das Ergebnis der Isolate einzeln betrachtet war mit dem der ausgewählten sequentiellen Ergebnisse vergleichbar. Erst die zusammenhängende Betrachtung von mehreren frühen Isolaten (die ersten drei Jahre der Kolonisation) im Vergleich zu den Isolaten der letzten drei Jahre des Beobachtungszeitraums führte zur Beobachtung eines fortwährenden Adaptationsprozesses an die CF-Lunge. Es wurden die Entstehung von mukoiden Kolonien, die Existenz von Phagen, eine Erhöhung der Hämolyse- und Autolyseaktivität sowie der Verlust der Proteaseaktivität und der Bewegung nachgewiesen und somit bisherige Veröffentlichungen bestätigt. Da aber die Auswertung der einzelnen Isolate diese Entwicklung nicht erkennen ließen, scheint es vielmehr, dass es im Verlauf der CF-Infektion zwar zu einer Adaptation der Klone an das Habitat Lunge kommt, es sich dabei allerdings nicht nur um einen adaptierten Klon handelt, sondern um eine Vielzahl an klonalen Varianten, die jeweils kleine spezifische Nischen der CF-Lunge besiedeln und sich danach optimal an diese eine Region anpassen. Durch die Vielzahl an verschiedenen Stämmen wurde bei der Probeentnahme nicht immer der gleiche Stamm zeitlich verfolgt. Vielmehr wurde zu jedem Isolationszeitpunkt eine andere klonale Variante isoliert, die durch die Besiedlung einer anderen Nische auch einem anderen Selektionsdruck unterlag, somit anders adaptiert war und infolgedessen die Dokumentation eines vollständigen Adaptationsprozesses von *P. aeruginosa* an die CF-Lunge schwierig machte. Die Diversifikation, die während der

chronischen Besiedlung beobachtet werden konnte, führte zu einem adaptiven Vorteil und erhöhte die Fitness einer Gemeinschaft (Goerke et al., 2007).

Des Weiteren wurde die Adhärenz an Lungenepithelzellen zwischen frühen und späten Isolaten verglichen. Durch die Anpassung an die Lunge verändert sich wahrscheinlich auch die Bindungsfähigkeit an die Epithelzellen in der Lunge. Dieses wurde mit Hilfe eines Bindungsassays an A549 Zellen, einer humanen Lungenepithelzelllinie, analysiert. Die Analyse erbrachte, dass die Spätisolate im Vergleich zu den Frühisolaten eine erhöhte Bindungsfähigkeit an Lungenepithelzellen aufwiesen. Da es bei der Adhärenz nicht nur auf die initiale Bindung an das Lungenepithel ankommt, muss auch die Fähigkeit, in der Lunge zu persistieren, vorhanden sein. In der Regel tritt *P. aeruginosa* während der fortschreitenden CF-Erkrankung nicht in das Bronchialgewebe über, sondern bildet einen Biofilm mit assoziierten Mikrokolonien (Baltimore et al., 1989; Watnick & Kolter, 2000). Demnach ist es für das kolonisierende Bakterium von selektivem Vorteil, eine hohe Bindungsfähigkeit an Zuckerstrukturen aufzuweisen. Dies konnte durch die erhöhte Adhärenz in den Experimenten nachgewiesen werden.

In einer Kooperation mit dem Raffaele Institut in Mailand wurde die Virulenz einiger der sequentiellen Isolate im Agarbead-Mausmodell überprüft. Dazu wurden verschiedene Mausstämme mit jeweils einem sequentiellen Isolat infiziert. Es wurde zum einen die akute Infektionsrate anhand der verstorbenen Mäuse bestimmt und zum anderen die Rate der chronischen Infektion bzw. die Eliminierung der *P. aeruginosa* in den überlebenden Mäusen. Die Experimente ergaben eine variierende Virulenz bei den sequentiellen Isolaten des jeweiligen Patienten über den Verlauf der Infektion. Die Überprüfung von CF-Isolaten mit der gleichen klonalen Variante zeigte zu Beginn und nach einigen Jahren der Besiedlung eine unterschiedliche Virulenz. Die Klone entwickelten sich in der CF-Lunge zu Persistoren, die mit chronischen Infektionen verbunden waren. Durch die Anpassung an das Habitat kam es zu einer Selektion der weniger virulenten Stämme. Daher waren Spätisolate im Agarbead-Mausmodell mit einer geringeren Mortalität assoziiert als Frühisolate. Das unterschiedliche pathogene Potential, welches von Isolaten eines Entnahmezeitpunkts ausging, bestätigte die parallele Existenz vieler verschiedener Varianten, durch die verschiedene Nischen der Lunge besser und schneller besiedelt werden können und die somit der Gemeinschaft einen Vorteil verschaffen.

Abschließend wurden durch Einzelwachstumsversuche sowie kompetitive Fitnessexperimente die Auswirkung der Adaptation von *P. aeruginosa* an die CF-Lunge und auf die Überlebensfähigkeit in verschiedenen Habitaten analysiert. Luria-Bertani-Medium und

„Artificial Sputum Medium“ wurden dabei als Vollmedium verwendet, um sowohl Laborbedingungen als auch die Lunge zu simulieren. Ergänzend dazu wurde ein Minimalmedium mit 1 % Glycerin als Umweltstandard verwendet. Für die kompetitiven Fitnessexperimente wurden das Früh- und das Spätisolat des jeweiligen Patienten in einer Kultur zusammen inokuliert und nach definierten Zeitpunkten durch Entnahme von Aliquots das Wachstumsverhalten überprüft. Geeignete Marker ermöglichten die Differenzierung zwischen Früh- und Spätisolat, um den Anteil des jeweiligen Isolats an der Gesamtmenge für jeden Zeitpunkt zu bestimmen. Die Ergebnisse aus den kompetitiven Fitnessexperimenten bestätigten dabei die Wachstumsexperimente der getrennt voneinander wachsenden Isolate. Es konnte nachgewiesen werden, dass von allen Patienten das Frühisolat in Minimalmedium besser überleben konnte als das Spätisolat. Dieses Medium ist umweltähnlich und bietet gerade den Frühisolaten, die durch die vorhandene katabolische Repressionskontrolle nur eine Kohlenstoffquelle verstoffwechseln, einen Wachstumsvorteil.

Im Vollmedium zeigte sich ein konträres Bild. In den Patienten, die einen milden Krankheitsverlauf zeigten, wiesen die Spätisolate im Vollmedium gegenüber den Frühisolaten einen starken Wachstumsvorteil auf. Die Klone waren wahrscheinlich gut an die Lunge adaptiert und wiesen durch eine hohe Mutationsrate einen Defekt der katabolischen Repressionskontrolle auf. Durch die Fähigkeit zur simultanen Verstoffwechslung unterschiedlicher Nährstoffquellen konnte ein Wachstumsvorteil beobachtet werden. In den Patienten, die einen sehr schweren Krankheitsverlauf aufwiesen bzw. während des Beobachtungszeitraums verstarben, wurde dieser Wachstumsvorteil für das Spätisolat im Vollmedium nicht beobachtet. Bei diesen Klonen handelte es sich daher mit großer Wahrscheinlichkeit um Klone, die nur eingeschränkt an die Lunge des Patienten angepasst waren und eine intakte katabolische Repressionskontrolle oder eine Auxotrophie aufwiesen. Aus diesem Grund konnte für das Spätisolat kein Wachstumsvorteil verzeichnet werden.

Das Ergebnis der Fitnessexperimente führt zu dem Schluss, dass die Akkumulation der pathoadaptiven Mutationen zu einem Fitnessvorteil in der CF-Lunge führt, andererseits aber mit einem Fitnessnachteil in der Umwelt einhergeht.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

- Al-Aloul, M., Crawley, J., Winstanley, C., Hart, C. A., Ledson, M. J. and Walshaw, M. J. (2004) Increased morbidity associated with chronic infection by an epidemic *Pseudomonas aeruginosa* strain in CF patients, *Thorax*, **59**, 334-6.
- Albert, T. J., Dailidienė, D., Dailidė, G., Norton, J. E., Kalia, A., Richmond, T. A., Molla, M., Singh, J., Green, R. D. and Berg, D. E. (2005) Mutation discovery in bacterial genomes: metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*, *Nat Methods*, **2**, 951-3.
- Allison, C. and Hughes, C. (1991) Bacterial swarming: an example of prokaryotic differentiation and multicellular behaviour, *Sci Prog*, **75**, 403-22.
- Alm, R. A. and Mattick, J. S. (1995) Identification of a gene, pilV, required for type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*, whose product possesses a pre-pilin-like leader sequence, *Mol Microbiol*, **16**, 485-96.
- Alonso, A., Rojo, F. and Martinez, J. L. (1999) Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin, *Environ Microbiol*, **1**, 421-30.
- Altschul, M. S. (1990) The circumcision controversy, *Am Fam Physician*, **41**, 817-8, 820.
- Anthony, M., Rose, B., Pegler, M. B., Elkins, M., Service, H., Thamotharampillai, K., Watson, J., Robinson, M., Bye, P., Merlino, J. and Harbour, C. (2002) Genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the sputa of Australian adult cystic fibrosis patients, *J Clin Microbiol*, **40**, 2772-8.
- Armstrong, D. S., Nixon, G. M., Carzino, R., Bigham, A., Carlin, J. B., Robins-Browne, R. M. and Grimwood, K. (2002a) Detection of a widespread clone of *Pseudomonas aeruginosa* in a pediatric cystic fibrosis clinic, *Am J Respir Crit Care Med*, **166**, 983-7.
- Armstrong, S., Yates, S. P. and Merrill, A. R. (2002b) Insight into the catalytic mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. Studies of toxin interaction with eukaryotic elongation factor-2, *J Biol Chem*, **277**, 46669-75.
- Arora, S. K., Wolfgang, M. C., Lory, S. and Ramphal, R. (2004) Sequence polymorphism in the glycosylation island and flagellins of *Pseudomonas aeruginosa*, *J Bacteriol*, **186**, 2115-22.
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. und Struhl K. (1989) Current Protocols in Molecular Biology, *John Wiley & Sons, Inc.*, New York.
- Azghani, A. O., Baker, J. W., Shetty, S., Miller, E. J. and Bhat, G. J. (2002a) *Pseudomonas aeruginosa* elastase stimulates ERK signaling pathway and enhances IL-8 production by alveolar epithelial cells in culture, *Inflamm Res*, **51**, 506-10.
- Azghani, A. O., Idell, S., Bains, M. and Hancock, R. E. (2002b) *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture, *Microb Pathog*, **33**, 109-14.
- Baker, N., Hansson, G. C., Leffler, H., Riise, G. and Svanborg-Eden, C. (1990) Glycosphingolipid receptors for *Pseudomonas aeruginosa*, *Infect Immun*, **58**, 2361-6.

- Baker, N. R. (1982) Role of exotoxin A and proteases of *Pseudomonas aeruginosa* in respiratory tract infections, *Can J Microbiol*, **28**, 248-55.
- Baltimore, R. S., Christie, C. D. and Smith, G. J. (1989) Immunohistopathologic localization of *Pseudomonas aeruginosa* in lungs from patients with cystic fibrosis. Implications for the pathogenesis of progressive lung deterioration, *Am Rev Respir Dis*, **140**, 1650-61.
- Barbieri, J. T. (2000) *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S, a bifunctional type-III secreted cytotoxin, *Int J Med Microbiol*, **290**, 381-7.
- Barrett, E. L., Solanes, R. E., Tang, J. S. and Palleroni, N. J. (1986) *Pseudomonas fluorescens* biovar V: its resolution into distinct component groups and the relationship of these groups to other *P. fluorescens* biovars, to *P. putida*, and to psychrotrophic pseudomonads associated with food spoilage, *J Gen Microbiol*, **132**, 2709-21.
- Barth, A. L. and Pitt, T. L. (1996) The high amino-acid content of sputum from cystic fibrosis patients promotes growth of auxotrophic *Pseudomonas aeruginosa*, *J Med Microbiol*, **45**, 110-9.
- Batsakis, J. G. and El-Naggar, A. K. (1996) Cystic fibrosis and the sinonasal tract, *Ann Otol Rhinol Laryngol*, **105**, 329-30.
- Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J. and Wheeler, D. L. (2007) GenBank, *Nucleic Acids Res*, **35**, D21-5.
- Bjorn, M. J., Sokol, P. A. and Iglewski, B. H. (1979) Influence of iron on yields of extracellular products in *Pseudomonas aeruginosa* cultures, *J Bacteriol*, **138**, 193-200.
- Boucher, J. C., Martinez-Salazar, J., Schurr, M. J., Mudd, M. H., Yu, H. and Deretic, V. (1996) Two distinct loci affecting conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis encode homologs of the serine protease HtrA, *J Bacteriol*, **178**, 511-23.
- Bragonzi, A., Copreni, E., de Bentzmann, S., Ulrich, M. and Conese, M. (2004) Airway epithelial cell-pathogen interactions, *J Cyst Fibros*, **3 Suppl 2**, 197-201.
- Bragonzi, A., Wiehlmann, L., Klockgether, J., Cramer, N., Worlitzsch, D., Doring, G. and Tümmler, B. (2006) Sequence diversity of the mucABD locus in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis, *Microbiology*, **152**, 3261-9.
- Bragonzi, A., Worlitzsch, D., Pier, G. B., Timpert, P., Ulrich, M., Hentzer, M., Andersen, J. B., Givskov, M., Conese, M. and Doring, G. (2005) Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* expresses alginate in the lungs of patients with cystic fibrosis and in a mouse model, *J Infect Dis*, **192**, 410-9.
- Bragonzi, A., Paroni, M., Nonis, A., Cramer, N., Montanari, S., Rejman, J., Serio, C.D., Döring, G., Tümmler, B. (2009) Lung pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* clonal variants from patients with cystic fibrosis, *AJRCCM*.
- Botzenhardt, F., Döring, G. (1993) Ecology and Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*, In: *Pseudomonas aeruginosa* as a opportunistic pathogen (eds) Campa, M., Bendinelli, M., Friedmann, H., Plenum Press New York, 1-18.
- Braveny, I., Krump-Schmidt, W. (1985) *Pseudomonas aeruginosa*, W. Zuckschwerdt Verlag, München.



- Brimer, C. D. and Montie, T. C. (1998) Cloning and comparison of *fliC* genes and identification of glycosylation in the flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* a-type strains, *J Bacteriol*, **180**, 3209-17.
- Bronsveld, I., Mekus, F., Bijman, J., Ballmann, M., de Jonge, H. R., Laabs, U., Halley, D. J., Ellemunter, H., Mastella, G., Thomas, S., Veeze, H. J. and Tummeler, B. (2001) Chloride conductance and genetic background modulate the cystic fibrosis phenotype of Delta F508 homozygous twins and siblings, *J Clin Invest*, **108**, 1705-15.
- Carterson, A. J., Honer zu Bentrup, K., Ott, C. M., Clarke, M. S., Pierson, D. L., Vanderburg, C. R., Buchanan, K. L., Nickerson, C. A. and Schurr, M. J. (2005) A549 lung epithelial cells grown as three-dimensional aggregates: alternative tissue culture model for *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis, *Infect Immun*, **73**, 1129-40.
- Cash, H. A., Woods, D. E., McCullough, B., Johanson, W. G., Jr. and Bass, J. A. (1979) A rat model of chronic respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa*, *Am Rev Respir Dis*, **119**, 453-9.
- Cho, J.J., Schroth, M.N., Kominos, S.D., Green, SK. (1975) Ornamental plants as carriers of *Pseudomonas aeruginosa*, *Phytopathology*, **65**, 425-431.
- Ciofu, O., Riis, B., Pressler, T., Poulsen, H. E. and Hoiby, N. (2005) Occurrence of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress caused by chronic lung inflammation, *Antimicrob Agents Chemother*, **49**, 2276-82.
- Clamp, M., Cuff, J., Searle, S. M. and Barton, G. J. (2004) The Jalview Java alignment editor, *Bioinformatics*, **20**, 426-7.
- Collier, D. N., Hager, P. W. and Phibbs, P. V., Jr. (1996) Catabolite repression control in the *Pseudomonads*, *Res Microbiol*, **147**, 551-61.
- Coste, A., Gilain, L., Roger, G., Sebbagh, G., Lenoir, G., Manach, Y. and Peynegre, R. (1995) Endoscopic and CT-scan evaluation of rhinosinusitis in cystic fibrosis, *Rhinology*, **33**, 152-6.
- Costerton J.W. (1980) *Pseudomonas aeruginosa* in nature and disease, In: *Pseudomonas aeruginosa: the organism, disease it causes and their treatment* (ed) Sabath C.D., *Hans Huber Publishers Bern*, 15-24.
- Curran, B., Jonas, D., Grundmann, H., Pitt, T. and Dowson, C. G. (2004) Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*, *J Clin Microbiol*, **42**, 5644-9.
- D'Argenio, D. A., Calfee, M. W., Rainey, P. B. and Pesci, E. C. (2002) Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants, *J Bacteriol*, **184**, 6481-9.
- D'Argenio, D. A., Wu, M., Hoffman, L. R., Kulasekara, H. D., Deziel, E., Smith, E. E., Nguyen, H., Ernst, R. K., Larson Freeman, T. J., Spencer, D. H., Brittnacher, M., Hayden, H. S., Selgrade, S., Klausen, M., Goodlett, D. R., Burns, J. L., Ramsey, B. W. and Miller, S. I. (2007) Growth phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutants adapted to the airways of cystic fibrosis patients, *Mol Microbiol*, **64**, 512-33.
- de Chial, M., Ghysels, B., Beatson, S. A., Geoffroy, V., Meyer, J. M., Pattery, T., Baysse, C., Chablain, P., Parsons, Y. N., Winstanley, C., Cordwell, S. J. and Cornelis, P. (2003) Identification of type II and type III pyoverdine receptors from *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology*, **149**, 821-31.

- Denton, M., Kerr, K., Mooney, L., Keer, V., Rajgopal, A., Brownlee, K., Arundel, P. and Conway, S. (2002) Transmission of colistin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* between patients attending a pediatric
- Deretic, V., Schurr, M. J. and Yu, H. (1995) *Pseudomonas aeruginosa*, mucoidy and the chronic infection phenotype in cystic fibrosis, *Trends Microbiol*, **3**, 351-6.
- Deziel, E., Comeau, Y. and Villemur, R. (2001) Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpilated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities, *J Bacteriol*, **183**, 1195-204.
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U. and Hacker, J. (2004) Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms, *Nat Rev Microbiol*, **2**, 414-24.
- Doig, P., Paranchych, W., Sastry, P. A. and Irvin, R. T. (1989) Human buccal epithelial cell receptors of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of glycoproteins with pilus binding activity, *Can J Microbiol*, **35**, 1141-5.
- Dotsch, A., Pommerenke, C., Bredenbruch, F., Geffers, R. and Haussler, S. (2009) Evaluation of a microarray-hybridization based method applicable for discovery of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *Pseudomonas aeruginosa* genome, *BMC Genomics*, **10**, 29.
- Ernst, R. K., D'Argenio, D. A., Ichikawa, J. K., Bangera, M. G., Selgrade, S., Burns, J. L., Hiatt, P., McCoy, K., Brittnacher, M., Kas, A., Spencer, D. H., Olson, M. V., Ramsey, B. W., Lory, S. and Miller, S. I. (2003) Genome mosaicism is conserved but not unique in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the airways of young children with cystic fibrosis, *Environ Microbiol*, **5**, 1341-9.
- Farrell, P. M., Shen, G., Splaingard, M., Colby, C. E., Laxova, A., Kosorok, M. R., Rock, M. J. and Mischler, E. H. (1997) Acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis, *Pediatrics*, **100**, E2.
- Feil, E. J., Li, B. C., Aanensen, D. M., Hanage, W. P. and Spratt, B. G. (2004) eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data, *J Bacteriol*, **186**, 1518-30.
- Feil, E. J. and Spratt, B. G. (2001) Recombination and the population structures of bacterial pathogens, *Annu Rev Microbiol*, **55**, 561-90.
- Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H. and Prince, A. (1998) Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection, *Infect Immun*, **66**, 43-51.
- Feltman, H., Schulert, G., Khan, S., Jain, M., Peterson, L. and Hauser, A. R. (2001) Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology*, **147**, 2659-69.
- Fluge, G., Ojeniyi, B., Hoiby, N., Digranes, A., Ciofu, O., Hunstad, E., Haanaes, O. C. and Storrosten, O. T. (2001) Typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains in Norwegian cystic fibrosis patients, *Clin Micro*
- Foght, J. M., Westlake, D. W., Johnson, W. M. and Ridgway, H. F. (1996) Environmental gasoline-utilizing isolates and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* are taxonomically indistinguishable by chemotaxonomic and molecular techniques, *Microbiology*, **142 ( Pt 9)**, 2333-40.

- Foweraker, J. (2009) Recent advances in the microbiology of respiratory tract infection in cystic fibrosis, *Br Med Bull*, **89**, 93-110.
- Fujita, K., Akino, T. and Yoshioka, H. (1988) Characteristics of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*, *Infect Immun*, **56**, 1385-7.
- Gardner, A. F. and Jack, W. E. (2002) Acyclic and dideoxy terminator preferences denote divergent sugar recognition by archaeon and Taq DNA polymerases, *Nucleic Acids Res*, **30**, 605-13.
- Garrity-Ryan, L., Shafikhani, S., Balachandran, P., Nguyen, L., Oza, J., Jakobsen, T., Sargent, J., Fang, X., Cordwell, S., Matthay, M. A. and Engel, J. N. (2004) The ADP ribosyltransferase domain of *Pseudomonas aeruginosa* ExoT contributes to its biological activities, *Infect Immun*, **72**, 546-58.
- Gelfand D.H. (1988) In: PRC Technology (ed) Erlich, H. A., *Stockton Press*, New York, 17.
- Ghysels, B., Dieu, B. T., Beatson, S. A., Pirnay, J. P., Ochsner, U. A., Vasil, M. L. and Cornelis, P. (2004) *FpvB*, an alternative type I ferripyoverdine receptor of *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology*, **150**, 1671-80.
- Goehring, U. M., Schmidt, G., Pederson, K. J., Aktories, K. and Barbieri, J. T. (1999) The N-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases, *J Biol Chem*, **274**, 36369-72.
- Goerke, C., Gressinger, M., Endler, K., Breitkopf, C., Wardecki, K., Stern, M., Wolz, C. and Kahl, B. C. (2007) High phenotypic diversity in infecting but not in colonizing *Staphylococcus aureus* populations, *Environ Microbiol*, **9**, 3134-42.
- Goldmann, D. A. and Huskins, W. C. (1997) Control of nosocomial antimicrobial-resistant bacteria: a strategic priority for hospitals worldwide, *Clin Infect Dis*, **24 Suppl 1**, S139-45.
- Gordon, S. M., Serkey, J. M., Keys, T. F., Ryan, T., Fatica, C. A., Schmitt, S. K., Borsh, J. A., Cosgrove, D. M., 3rd and Yared, J. P. (1998) Secular trends in nosocomial bloodstream infections in a 55-bed cardiothoracic intensive care unit, *Ann Thorac Surg*, **65**, 95-100.
- Govan, J. R. and Deretic, V. (1996) Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*, *Microbiol Rev*, **60**, 539-74.
- Govan, J. R. and Harris, G. S. (1986) *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis: unusual bacterial adaptation and pathogenesis, *Microbiol Sci*, **3**, 302-8.
- Grothues, D., Koopmann, U., von der Hardt, H. and Tummler, B. (1988) Genome fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* indicates colonization of cystic fibrosis siblings with closely related strains, *J Clin Microbiol*, **26**, 1973-7.
- Guiliano, D., Ganatra, M., Ware, J., Parrot, J., Daub, J., Moran, L., Brennecke, H., Foster, J. M., Supali, T., Blaxter, M., Scott, A. L., Williams, S. A. and Slatko, B. E. (1999) Chemiluminescent detection of sequential DNA hybridizations to high-density, filter-arrayed cDNA libraries: a subtraction method for novel gene discovery, *Biotechniques*, **27**, 146-52.
- Gutierrez, O., Juan, C., Perez, J. L. and Oliver, A. (2004) Lack of association between hypermutation and antibiotic resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from intensive care unit patients, *Antimicrob Agents Chemother*, **48**, 3573-5.
- Gysin, C., Alothman, G. A. and Papsin, B. C. (2000) Sinonasal disease in cystic fibrosis: clinical characteristics, diagnosis, and management, *Pediatr Pulmonol*, **30**, 481-9.

- Hacker J. and Kaper J.B. (2002) Pathogenicity Islands and the evolution of pathogenic Microbes, *Springer Verlag*.
- Hardalo, C. and Edberg, S. C. (1997) *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water, *Crit Rev Microbiol*, **23**, 47-75.
- Harshey, R. M. (1994) Bees aren't the only ones: swarming in gram-negative bacteria, *Mol Microbiol*, **13**, 389-94.
- Haussler, S., Tummler, B., Weissbrodt, H., Rohde, M. and Steinmetz, I. (1999) Small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis, *Clin Infect Dis*, **29**, 621-5.
- Haussler, S., Ziegler, I., Lottel, A., von Gotz, F., Rohde, M., Wehmhohner, D., Saravanamuthu, S., Tummler, B. and Steinmetz, I. (2003) Highly adherent small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection, *J Med Microbiol*, **52**, 295-301.
- He, J., Baldini, R. L., Deziel, E., Saucier, M., Zhang, Q., Liberati, N. T., Lee, D., Urbach, J., Goodman, H. M. and Rahme, L. G. (2004) The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 2530-5.
- Henrichsen, J. (1972) Bacterial surface translocation: a survey and a classification, *Bacteriol Rev*, **36**, 478-503.
- Henrichsen, J. (1983) Twitching motility, *Annu Rev Microbiol*, **37**, 81-93.
- Heurlier, K., Denervaud, V. and Haas, D. (2006) Impact of quorum sensing on fitness of *Pseudomonas aeruginosa*, *Int J Med Microbiol*, **296**, 93-102.
- Hogardt M., Häußler S., Balke B. (2006) Atemwegsinfektionen bei Mukoviszidose. Mikrobiologisch infektologische Qualitätsstandards (MiQ) 24 München, *Urban & Fischer*.
- Hoiby, N. (1995) Isolation and treatment of cystic fibrosis patients with lung infections caused by *Pseudomonas (Burkholderia) cepacia* and multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*, *Neth J Med*, **46**, 280-7.
- Hoiby, N., Doring, G. and Schiøtz, P. O. (1986) The role of immune complexes in the pathogenesis of bacterial infections, *Annu Rev Microbiol*, **40**, 29-53.
- Holloway, B. W. (1955) Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*, *J Gen Microbiol*, **13**, 572-81.
- Horan, T.C. (1984) Nosocomial infection surveillance, *Morbid. Mortal. Wkl.Rep.*, **39**, 1-15.
- Ibrahim, E. H., Tracy, L., Hill, C., Fraser, V. J. and Kollef, M. H. (2001) The occurrence of ventilator-associated pneumonia in a community hospital: risk factors and clinical outcomes, *Chest*, **120**, 555-61.
- Iyobe, S., Hirai, K. and Hashimoto, H. (1991) Drug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* with special reference to new quinolones, *Antibiot Chemother*, **44**, 209-14.
- Jacobs, M. A., Alwood, A., Thaipisuttikul, I., Spencer, D., Haugen, E., Ernst, S., Will, O., Kaul, R., Raymond, C., Levy, R., Chun-Rong, L., Guenther, D., Bovee, D., Olson, M. V. and Manoil, C. (2003) Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 14339-44.

- Jelsbak, L., Johansen, H. K., Frost, A. L., Thogersen, R., Thomsen, L. E., Ciofu, O., Yang, L., Haagensen, J. A., Hoiby, N. and Molin, S. (2007) Molecular epidemiology and dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* populations in lungs of cystic fibrosis patients, *Infect Immun*, **75**, 2214-24.
- Jensen, E. T., Giwerzman, B., Ojeniyi, B., Bangsborg, J. M., Hansen, A., Koch, C., Fiehn, N. E. and Hoiby, N. (1997) Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis and the possible role of contamination by dental equipment, *J Hosp Infect*, **36**, 117-22.
- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S. and Madden, T. L. (2008) NCBI BLAST: a better web interface, *Nucleic Acids Res*, **36**, W5-9.
- Johnson, M. K. and Allen, J. H. (1978) The role of hemolysin in corneal infections with *Pseudomonas aeruginosa*, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **17**, 480-3.
- Jones, A. M., Govan, J. R., Doherty, C. J., Dodd, M. E., Isalska, B. J., Stanbridge, T. N. and Webb, A. K. (2001) Spread of a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* in an adult cystic fibrosis clinic, *Lancet*, **358**, 557-8.
- Juhas, M., Crook, D. W., Dimopoulou, I. D., Lunter, G., Harding, R. M., Ferguson, D. J. and Hood, D. W. (2007) Novel type IV secretion system involved in propagation of genomic islands, *J Bacteriol*, **189**, 761-71.
- Juhas, M., Eberl, L. and Tummmler, B. (2005) Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*, *Environ Microbiol*, **7**, 459-71.
- Kenna, D. T., Doherty, C. J., Foweraker, J., Macaskill, L., Barcus, V. A. and Govan, J. R. (2007) Hypermutability in environmental *Pseudomonas aeruginosa* and in populations causing pulmonary infection in individuals with cystic fibrosis, *Microbiology*, **153**, 1852-9.
- Kessler, E., Safrin, M., Gustin, J. K. and Ohman, D. E. (1998) Elastase and the LasA protease of *Pseudomonas aeruginosa* are secreted with their propeptides, *J Biol Chem*, **273**, 30225-31.
- Kiewitz, C., Larbig, K., Klockgether, J., Weinel, C. and Tummmler, B. (2000) Monitoring genome evolution ex vivo: reversible chromosomal integration of a 106 kb plasmid at two tRNA(Lys) gene loci in sequential *Pseudomonas aeruginosa* airway isolates, *Microbiology*, **146 ( Pt 10)**, 2365-73.
- Kiewitz, C. and Tummmler, B. (2000) Sequence diversity of *Pseudomonas aeruginosa*: impact on population structure and genome evolution, *J Bacteriol*, **182**, 3125-35.
- King, E. O., Ward, M. K. and Raney, D. E. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin, *J Lab Clin Med*, **44**, 301-7.
- Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I. and Khorana, H. G. (1971) Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases, *J Mol Biol*, **56**, 341-61.
- Klockgether, J., Reva, O., Larbig, K. and Tummmler, B. (2004) Sequence analysis of the mobile genome island pKLC102 of *Pseudomonas aeruginosa* C, *J Bacteriol*, **186**, 518-34.
- Klockgether, J., Wurdemann, D., Reva, O., Wiehlmann, L. and Tummmler, B. (2007) Diversity of the abundant pKLC102/PAGI-2 family of genomic islands in *Pseudomonas aeruginosa*, *J Bacteriol*, **189**, 2443-59.

- Klockgether, J., Wurdemann, D., Wiehlmann, L. and Tummler, B. (2008) Transcript profiling of the *Pseudomonas aeruginosa* genomic islands PAGI-2 and pKLC102, *Microbiology*, **154**, 1599-604.
- Kluytmans J. (1997) Surgical infections including burns, In: Prevention and control of nosocomial infections (ed) Wenzel R.P., *Williams and Wilkins Baltimore*, 841-865.
- Kohler, T., Buckling, A. and van Delden, C. (2009) Cooperation and virulence of clinical *Pseudomonas aeruginosa* populations, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 6339-44.
- Krebs C.J. (1989) *Ecological Methodology*, *Harper Collins*, New York.
- Kresse, A. U., Dinesh, S. D., Larbig, K. and Romling, U. (2003) Impact of large chromosomal inversions on the adaptation and evolution of *Pseudomonas aeruginosa* chronically colonizing cystic fibrosis lungs, *Mol Microbiol*, **47**, 145-58.
- Kulasekara, B. R., Kulasekara, H. D., Wolfgang, M. C., Stevens, L., Frank, D. W. and Lory, S. (2006) Acquisition and evolution of the *exoU* locus in *Pseudomonas aeruginosa*, *J Bacteriol*, **188**, 4037-50.
- Kwon, Y. M. and Ricke, S. C. (2000) Efficient amplification of multiple transposon-flanking sequences, *J Microbiol Methods*, **41**, 195-9.
- Lamont, I. L. and Martin, L. W. (2003) Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology*, **149**, 833-42.
- Larbig, K. D., Christmann, A., Johann, A., Klockgether, J., Hartsch, T., Merkl, R., Wiehlmann, L., Fritz, H. J. and Tummler, B. (2002) Gene islands integrated into tRNA(Gly) genes confer genome diversity on a *Pseudomonas aeruginosa* clone, *J Bacteriol*, **184**, 6665-80.
- Laster, L. (1967) Statistical background of methods of principal component analysis, *J Periodontol*, **38**, Suppl:649-66.
- Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H. and Kong, F. (2004a) The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection, *Trends Mol Med*, **10**, 599-606.
- Lau, G. W., Ran, H., Kong, F., Hassett, D. J. and Mavrodi, D. (2004b) *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice, *Infect Immun*, **72**, 4275-8.
- Lee, V. T., Smith, R. S., Tummler, B. and Lory, S. (2005) Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the Type III secretion system in vitro and during infection, *Infect Immun*, **73**, 1695-705.
- Lee, D. G., Urbach, J. M., Wu, G., Liberati, N. T., Feinbaum, R. L., Miyata, S., Diggins, L. T., He, J., Saucier, M., Deziel, E., Friedman, L., Li, L., Grills, G., Montgomery, K., Kucherlapati, R., Rahme, L. G. and Ausubel, F. M. (2006) Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial, *Genome Biol*, **7**, R90.
- Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Humangenetik e.V., 2009.
- Lewiston, N., King, V., Umetsu, D., Starnes, V., Marshall, S., Kramer, M. and Theodore, J. (1991) Cystic fibrosis patients who have undergone heart-lung transplantation benefit from maxillary sinus antrostomy and repeated sinus lavage, *Transplant Proc*, **23**, 1207-8.
- Li, Z., Wang, X., Guo, Y. and Zhao, J. (1995) Inhibitory action of metabolites of *Pseudomonas aeruginosa* against gram-negative bacteria, *Kansenshogaku Zasshi*, **69**, 924-7.

- Lindemann, H., Tümmler, B., Dockter, G. (2004) Mukoviszidose-Zystische Fibrose, *Thieme-Verlag*, **4. Auflage**, 1-10.
- Liu, P. V. (1957) Survey of hemolysin production among species of pseudomonads, *J Bacteriol*, **74**, 718-27.
- Liu P.V. (1979) Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*, In: *Pseudomonas aeruginosa* (ed) Doggett R.G., *Academic Press, Inc.*, New York, 63-88.
- Lottspeich F., Zorbas H. (1998) Bioanalytik, *Spektrum Akademischer Verlag*, **1. Auflage**, 686.
- Lujan, A. M., Moyano, A. J., Segura, I., Argarana, C. E. and Smania, A. M. (2007) Quorum-sensing-deficient (lasR) mutants emerge at high frequency from a *Pseudomonas aeruginosa* mutS strain, *Microbiology*, **15**
- Luzar, M. A. and Montie, T. C. (1985) Avirulence and altered physiological properties of cystic fibrosis strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Infect Immun*, **50**, 572-6.
- Macia, M. D., Blanquer, D., Togores, B., Sauleda, J., Perez, J. L. and Oliver, A. (2005) Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections, *Antimicrob Agents Chemother*, **49**, 3382-6.
- Mah, T. F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G. C., Stewart, P. S. and O'Toole, G. A. (2003) A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance, *Nature*, **426**, 306-10.
- Mahenthalingam, E., Campbell, M. E., Foster, J., Lam, J. S. and Speert, D. P. (1996) Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis, *J Clin Microbiol*, **34**, 1129-35.
- Mahenthalingam, E., Campbell, M. E. and Speert, D. P. (1994) Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis, *Infect Immun*, **62**, 596-605.
- Maiden, M. C. (2006) Multilocus sequence typing of bacteria, *Annu Rev Microbiol*, **60**, 561-88.
- Mainz, J. G., Naehrlich, L., Schien, M., Kading, M., Schiller, I., Mayr, S., Schneider, G., Wiehlmann, L., Cramer, N., Pfister, W., Kahl, B. C., Beck, J. F. and Tümmler, B. (2009) Concordant genotype of upper and lower airways *P. aeruginosa* and *S. aureus* isolates in cystic fibrosis, *Thorax*.
- Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. (1989) Molecular Cloning, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, a laboratory manual 2<sup>nd</sup> edition.
- Mann H., Whitney D. (1947) On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other, *Annals of mathematical Statistics*, **18**, 50-60.
- Marmur, J. and Doty, P. (1962) Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature, *J Mol Biol*, **5**, 109-18.
- Martin, D. W., Schurr, M. J., Mudd, M. H. and Deretic, V. (1993a) Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* into the alginate-producing form: inactivation of mucB causes conversion to mucoidy, *Mol Microbiol*, **9**, 497-506.
- Martin, D. W., Schurr, M. J., Mudd, M. H., Govan, J. R., Holloway, B. W. and Deretic, V. (1993b) Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 8377-81.

- Martin, C., Ichou, M. A., Massicot, P., Goudeau, A. and Quentin, R. (1995) Genetic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis revealed by restriction fragment length polymorphism of the rRNA gene region, *J Clin Microbiol*, **33**, 1461-6.
- Mattick, J. S. (2002) Type IV pili and twitching motility, *Annu Rev Microbiol*, **56**, 289-314.
- Mena, A., Smith, E. E., Burns, J. L., Speert, D. P., Moskowitz, S. M., Perez, J. L. and Oliver, A. (2008) Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation, *J Bacteriol*, **190**, 7910-7.
- Miller, J. H. (1996) Spontaneous mutators in bacteria: insights into pathways of mutagenesis and repair, *Annu Rev Microbiol*, **50**, 625-43.
- Montanari, S., Oliver, A., Salerno, P., Mena, A., Bertoni, G., Tummler, B., Cariani, L., Conese, M., Doring, G. and Bragonzi, A. (2007) Biological cost of hypermutation in *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis, *Microbiology*, **153**, 1445-54.
- Morales, G., Wiehlmann, L., Gudowius, P., van Delden, C., Tummler, B., Martinez, J. L. and Rojo, F. (2004) Structure of *Pseudomonas aeruginosa* populations analyzed by single nucleotide polymorphism and pulsed-field gel electrophoresis genotyping, *J Bacteriol*, **186**, 4228-37.
- Muhlebach, M. S., Miller, M. B., Moore, C., Wedd, J. P., Drake, A. F. and Leigh, M. W. (2006) Are lower airway or throat cultures predictive of sinus bacteriology in cystic fibrosis?, *Pediatr Pulmonol*, **41**, 445-51.
- Mulgrave, L. (1991) The changing ecology of hospital bacteria and the selective role of cephalosporins, *Epidemiol Infect*, **106**, 121-32.
- Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V. A., Fouts, D. E., Gill, S. R., Pop, M., Holmes, M., Brinkac, L., Beanan, M., DeBoy, R. T., Daugherty, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., White, O., Peterson, J., Khouri, H., Hance, I., Chris Lee, P., Holtzapple, E., Scanlan, D., Tran, K., Moazzez, A., Utterback, T., Rizzo, M., Lee, K., Kosack, D., Moestl, D., Wedler, H., Lauber, J., Stjepandic, D., Hoheisel, J., Straetz, M., Heim, S., Kiewitz, C., Eisen, J. A., Timmis, K. N., Dusterhoft, A., Tummler, B. and Fraser, C. M. (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440, *Environ Microbiol*, **4**, 799-808.
- Nguyen, D. and Singh, P. K. (2006) Evolving stealth: genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis infections, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 8305-6.
- Nicas, T. I. and Iglewski, B. H. (1985) The contribution of exoproducts to virulence of *Pseudomonas aeruginosa*, *Can J Microbiol*, **31**, 387-92.
- Nixon, G. M., Armstrong, D. S., Carzino, R., Carlin, J. B., Olinsky, A., Robertson, C. F. and Grimwood, K. (2001) Clinical outcome after early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis, *J Pediatr*, **138**, 699-704.
- Nunley, D. R., Grgurich, W., Iacono, A. T., Yousem, S., Ohori, N. P., Keenan, R. J. and Dauber, J. H. (1998) Allograft colonization and infections with *Pseudomonas* in cystic fibrosis lung transplant recipients, *Chest*, **113**, 1235-43.
- Oliver, A., Canton, R., Campo, P., Baquero, F. and Blazquez, J. (2000) High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection, *Science*, **288**, 1251-4.



- Oliver, A., Levin, B. R., Juan, C., Baquero, F. and Blazquez, J. (2004) Hypermutation and the preexistence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants: implications for susceptibility testing and treatment of chronic infections, *Antimicrob Agents Chemother*, **48**, 4226-33.
- Olsen, G.J, Woese, C.R., Overbreek, R. (1994) The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology, *J Bacteriol*, 176, 1-6.
- Olson, B., Weinstein, R. A., Nathan, C., Chamberlin, W. and Kabins, S. A. (1985) Occult aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and implications for therapy and control, *J Infect Dis*, **152**, 769-74.
- Ojeniyi, B., Frederiksen, B. and Hoiby, N. (2000) *Pseudomonas aeruginosa* cross-infection among patients with cystic fibrosis during a winter camp, *Pediatr Pulmonol*, **29**, 177-81.
- Palleroni, N. J. (1993) *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of gram-negative bacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek*, **64**, 231-51.
- Palmer, K. L., Mashburn, L. M., Singh, P. K. and Whiteley, M. (2005) Cystic fibrosis sputum supports growth and cues key aspects of *Pseudomonas aeruginosa* physiology, *J Bacteriol*, **187**, 5267-77.
- Pedersen, S. S., Koch, C., Hoiby, N. and Rosendal, K. (1986) An epidemic spread of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis centre, *J Antimicrob Chemother*, **17**, 505-16.
- Pellett, S., Bigley, D. V. and Grimes, D. J. (1983) Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* in a riverine ecosystem, *Appl Environ Microbiol*, **45**, 328-32.
- Peters, J. E. and Galloway, D. R. (1990) Purification and characterization of an active fragment of the LasA protein from *Pseudomonas aeruginosa*: enhancement of elastase activity, *J Bacteriol*, **172**, 2236-40.
- Pier, G. B. and Thomas, D. M. (1982) Lipopolysaccharide and high-molecular-weight polysaccharide serotypes of *Pseudomonas aeruginosa*, *J Infect Dis*, **145**, 217-23.
- Pier, G. B. (1985) Pulmonary disease associated with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: current status of the host-bacterium interaction, *J Infect Dis*, **151**, 575-80.
- Pier, G. B., Coleman, F., Grout, M., Franklin, M. and Ohman, D. E. (2001) Role of alginate O acetylation in resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to opsonic phagocytosis, *Infect Immun*, **69**, 1895-901.
- Pirnay, J. P., De Vos, D., Mossialos, D., Vanderkelen, A., Cornelis, P. and Zizi, M. (2002) Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* oprD gene from clinical and environmental isolates, *Environ Microbiol*, **4**, 872-82.
- Pirnay, J. P., Matthijs, S., Colak, H., Chablain, P., Bilocq, F., Van Eldere, J., De Vos, D., Zizi, M., Triest, L. and Cornelis, P. (2005) Global *Pseudomonas aeruginosa* biodiversity as reflected in a Belgian river, *Environ Microbiol*, **7**, 969-80.
- Pitt, T. L. (1986) Biology of *Pseudomonas aeruginosa* in relation to pulmonary infection in cystic fibrosis, *J R Soc Med*, **79 Suppl 12**, 13-8.
- Pollack M. (1995) Principles and practice of infectious diseases (eds) Mandell G.L., Benett J.E. and Dolin R., *Churchill Livingstone*, 1980-2003.

- Quinn, J.P. (1998) Clinical problems posed by multiresistant nonfermenting gram-negative pathogens, *Clin. Infect. Dis.*, **27**, 117-124.
- Quinn, G.P. and Keough M.J. (2002) Experimental Design and Data analysis for Biologists, *Cambridge University Press*, Cambridge, UK.
- Qiu, X., Gurkar, A. U. and Lory, S. (2006) Interstrain transfer of the large pathogenicity island (*PAPI-1*) of *Pseudomonas aeruginosa*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 19830-5.
- Rainey, P. B. and Bailey, M. J. (1996) Physical and genetic map of the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 chromosome, *Mol Microbiol*, **19**, 521-33.
- Ramsey, B. and Richardson, M. A. (1992) Impact of sinusitis in cystic fibrosis, *J Allergy Clin Immunol*, **90**, 547-52.
- Rashid, M. H. and Kornberg, A. (2000) Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4885-90.
- Ratjen, F. and Doring, G. (2003) Cystic fibrosis, *Lancet*, **361**, 681-9.
- Ravel, J. and Cornelis, P. (2003) Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in *Pseudomonads*, *Trends Microbiol*, **11**, 195-200.
- Reva, O. N. and Tummler, B. (2005) Differentiation of regions with atypical oligonucleotide composition in bacterial genomes, *BMC Bioinformatics*, **6**, 251.
- Rhame, F.S. (1980) The ecology and epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*, In: *Pseudomonas aeruginosa*, the organism, diseases, it causes and their treatment (eds) Sabath, L.D. et al., *Hans Huber Publishers*, Bern.
- Richard, P., Le Floch, R., Chamoux, C., Pannier, M., Espaze, E. and Richet, H. (1994) *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a burn unit: role of antimicrobials in the emergence of multiply resistant strains, *J Infect Dis*, **170**, 377-83.
- Rickwood D. and Harms B.D. (1990) Gel electrophoresis of Nucleid Acids, *IRL Press Oxford*, 2<sup>nd</sup> edition.
- Ridgway, H. F., Safarik, J., Phipps, D., Carl, P. and Clark, D. (1990) Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer, *Appl Environ Microbiol*, **56**, 3565-75.
- Romling, U., Fiedler, B., Bosshammer, J., Grothues, D., Greipel, J., von der Hardt, H. and Tummler, B. (1994) Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis, *J Infect Dis*, **170**, 1616-21.
- Romling, U., Schmidt, K. D. and Tummler, B. (1997) Large genome rearrangements discovered by the detailed analysis of 21 *Pseudomonas aeruginosa* clone C isolates found in environment and disease habitats, *J Mol Biol*, **271**, 386-404.
- Romling, U., Sierralta, W. D., Eriksson, K. and Normark, S. (1998) Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter, *Mol Microbiol*, **28**, 249-64.
- Rouvier, R. (1966) [Principal component analysis: its use in genetics and its relationship with discriminatory analysis], *Biometrics*, **22**, 343-57.

- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science*, **239**, 487-91.
- Saiman L., Cacalano G., Gruenert D., Prince A. (1992) Comparison of adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelial cells from cystic fibrosis patients and healthy subjects, *Infect Immun.*, **60** (7), 2808-14.
- Salunkhe, P., Smart, C. H., Morgan, J. A., Panagea, S., Walshaw, M. J., Hart, C. A., Geffers, R., Tummler, B. and Winstanley, C. (2005) A cystic fibrosis epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa* displays enhanced virulence and antimicrobial resistance, *J Bacteriol*, **187**, 4908-20.
- Sandoz, K. M., Mitzimberg, S. M. and Schuster, M. (2007) Social cheating in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 15876-81.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-7.
- SantaLucia, J., Jr. (1998) A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 1460-5.
- Sato, H., Frank, D. W., Hillard, C. J., Feix, J. B., Pankhaniya, R. R., Moriyama, K., Finck-Barbancon, V., Buchaklian, A., Lei, M., Long, R. M., Wiener-Kronish, J. and Sawa, T. (2003) The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU, *EMBO J*, **22**, 2959-69.
- Schad, P. A., Bever, R. A., Nicas, T. I., Leduc, F., Hanne, L. F. and Iglewski, B. H. (1987) Cloning and characterization of elastase genes from *Pseudomonas aeruginosa*, *J Bacteriol*, **169**, 2691-6.
- Schaal, K.P. (1994) Die Gattung *Pseudomonas*, Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie, *Gustav Fischer- Verlag, Stuttgart*.
- Schlegel H.G. (1992) Allgemeine Mikrobiologie, *Thieme-Verlag*, **7. Auflage**, 111.
- Schmidt, K. D., Tummler, B. and Romling, U. (1996) Comparative genome mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO with *P. aeruginosa* C, which belongs to a major clone in cystic fibrosis patients and aquatic habitats, *J Bacteriol*, **178**, 85-93.
- Schroeder, T. H., Lee, M. M., Yacono, P. W., Cannon, C. L., Gerceker, A. A., Golan, D. E. and Pier, G. B. (2002) CFTR is a pattern recognition molecule that extracts *Pseudomonas aeruginosa* LPS from the outer membrane into epithelial cells and activates NF-kappa B translocation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 6907-12.
- Schwyn, B. and Neilands, J. B. (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores, *Anal Biochem*, **160**, 47-56.
- Scott, F. W. and Pitt, T. L. (2004) Identification and characterization of transmissible *Pseudomonas aeruginosa* strains in cystic fibrosis patients in England and Wales, *J Med Microbiol*, **53**, 609-15.
- Sham, P. C. and Curtis, D. (1995) Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci, *Ann Hum Genet*, **59**, 97-105.

- Shapiro, E. D., Wald, E. R., Doyle, W. and Rohn, D. (1982) Bacteriology of the maxillary sinus of rhesus monkeys, *Ann Otol Rhinol Laryngol*, **91**, 150-1.
- Silo-Suh, L., Suh, S. J., Phibbs, P. V. and Ohman, D. E. (2005) Adaptations of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis lung environment can include deregulation of *zwf*, encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase, *J Bacteriol*, **187**, 7561-8.
- Simpson E.H. (1949) Measurement of diversity, *Nature*, **163**, 688.
- Singh, P. K., Schaefer, A. L., Parsek, M. R., Moninger, T. O., Welsh, M. J. and Greenberg, E. P. (2000) Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms, *Nature*, **407**, 762-4.
- Smania, A. M., Segura, I., Pezza, R. J., Becerra, C., Albesa, I. and Argarana, C. E. (2004) Emergence of phenotypic variants upon mismatch repair disruption in *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology*, **15**
- Smith, E. E., Buckley, D. G., Wu, Z., Saenphimmachak, C., Hoffman, L. R., D'Argenio, D. A., Miller, S. I., Ramsey, B. W., Speert, D. P., Moskowitz, S. M., Burns, J. L., Kaul, R. and Olson, M. V. (2006) Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 8487-92.
- Smith, E. E., Sims, E. H., Spencer, D. H., Kaul, R. and Olson, M. V. (2005) Evidence for diversifying selection at the pyoverdine locus of *Pseudomonas aeruginosa*, *J Bacteriol*, **187**, 2138-47.
- Sniegowski, P. D., Gerrish, P. J. and Lenski, R. E. (1997) Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E. coli*, *Nature*, **387**, 703-5.
- Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J Mol Biol*, **98**, 503-17.
- Spangenberg, C., Heuer, T., Burger, C. and Tummeler, B. (1996) Genetic diversity of flagellins of *Pseudomonas aeruginosa*, *FEBS Lett*, **396**, 213-7.
- Speert, D. P. and Campbell, M. E. (1987) Hospital epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis, *J Hosp Infect*, **9**, 11-21.
- Speert, D. P., Campbell, M. E., Henry, D. A., Milner, R., Taha, F., Gravelle, A., Davidson, A. G., Wong, L. T. and Mahenthiralingam, E. (2002) Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis in British Columbia, Canada, *Am J Respir Crit Care Med*, **166**, 988-93.
- Speert, D. P., Lawton, D. and Damm, S. (1982) Communicability of *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis summer camp, *J Pediatr*, **101**, 227-8.
- Spencer, D. H., Kas, A., Smith, E. E., Raymond, C. K., Sims, E. H., Hastings, M., Burns, J. L., Kaul, R. and Olson, M. V. (2003) Whole-genome sequence variation among multiple isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *J Bacteriol*, **185**, 1316-25.
- Spiers, A. J., Buckling, A. and Rainey, P. B. (2000) The causes of *Pseudomonas* diversity, *Microbiology*, **146** ( Pt 10), 2345-50.
- Sriramulu, D. D., Lunsdorf, H., Lam, J. S. and Romling, U. (2005) Microcolony formation: a novel biofilm model of *Pseudomonas aeruginosa* for the cystic fibrosis lung, *J Med Microbiol*, **54**, 667-76.

- Stintzi, A., Cornelis, P., Hohnadel, D., Meyer, J. M., Dean, C., Poole, K., Kourambas, S. and Krishnapillai, V. (1996) Novel pyoverdine biosynthesis gene(s) of *Pseudomonas aeruginosa* PAO, *Microbiology*, **142** ( Pt 5), 1181-90.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E., Lory, S. and Olson, M. V. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen, *Nature*, **406**, 959-64.
- Suter, S. (1994) The role of bacterial proteases in the pathogenesis of cystic fibrosis, *Am J Respir Crit Care Med*, **150**, S118-22.
- Taddei, F., Radman, M., Maynard-Smith, J., Toupance, B., Gouyon, P. H. and Godelle, B. (1997) Role of mutator alleles in adaptive evolution, *Nature*, **387**, 700-2.
- Tam, M., Snipes, G. J. and Stevenson, M. M. (1999) Characterization of chronic bronchopulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection in resistant and susceptible inbred mouse strains, *Am J Respir Cell Mol Biol*, **20**, 710-9.
- Taylor, R. F., Morgan, D. W., Nicholson, P. S., Mackay, I. S., Hodson, M. E. and Pitt, T. L. (1992) Extrapulmonary sites of *Pseudomonas aeruginosa* in adults with cystic fibrosis, *Thorax*, **47**, 426-8.
- Teich, N., Ockenga, J., Keim, V. and Mossner, J. (2002) Genetic risk factors in chronic pancreatitis, *J Gastroenterol*, **37**, 1-9.
- Tenaillon, O., Toupance, B., Le Nagard, H., Taddei, F. and Godelle, B. (1999) Mutators, population size, adaptive landscape and the adaptation of asexual populations of bacteria, *Genetics*, **152**, 485-93.
- Terada, L. S., Johansen, K. A., Nowbar, S., Vasil, A. I. and Vasil, M. L. (1999) *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity, *Infect Immun*, **67**, 2371-6.
- Tsang, V., Pitt, T. L., Kaufmann, M. E., Gaya, H., Hodson, M. E. and Yacoub, M. (1994) Colonisation of lung allografts with *Pseudomonas aeruginosa* in heart-lung transplant recipients with cystic fibrosis, *Thorax*, **49**, 721-2.
- Tubbs, D., Lenney, W., Alcock, P., Campbell, C. A., Gray, J. and Pantin, C. (2001) *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: cross-infection and the need for segregation, *Respir Med*, **95**, 147-52.
- Tummler, B., Koopmann, U., Grothues, D., Weissbrodt, H., Steinkamp, G. and von der Hardt, H. (1991) Nosocomial acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* by cystic fibrosis patients, *J Clin Microbiol*, **29**, 1265-7.
- Tummler B. (2006) In: *Pseudomonas* (eds) Ramos J.L., Levesque R.C., Springer Verlag Heidelberg, **4**, 35-68.
- Vallis, A. J., Finck-Barbancon, V., Yahr, T. L. and Frank, D. W. (1999) Biological effects of *Pseudomonas aeruginosa* type III-secreted proteins on CHO cells, *Infect Immun*, **67**, 2040-4.
- van Heeckeren, A. M. and Schluchter, M. D. (2002) Murine models of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection, *Lab Anim*, **36**, 291-312.

- van Heeckeren, A. M., Schluchter, M. D., Drumm, M. L. and Davis, P. B. (2004) Role of Cfr genotype in the response to chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **287**, L944-52.
- Vernez, I., Hauser, P., Bernasconi, M. V. and Blanc, D. S. (2005) Population genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* using multilocus sequence typing, *FEMS Immunol Med Microbiol*, **43**, 29-35.
- Vishwanath, S. and Ramphal, R. (1985) Tracheobronchial mucin receptor for *Pseudomonas aeruginosa*: predominance of amino sugars in binding sites, *Infect Immun*, **48**, 331-5.
- Walter, S., Gudowius, P., Bosshammer, J., Romling, U., Weissbrodt, H., Schurmann, W., von der Hardt, H. and Tummmler, B. (1997) Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in the airways of lung transplant recipients with cystic fibrosis, *Thorax*, **52**, 318-21.
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M., Clamp, M. and Barton, G. J. (2009) Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench, *Bioinformatics*.
- Watnick, P. and Kolter, R. (2000) Biofilm, city of microbes, *J Bacteriol*, **182**, 2675-9.
- Weber E. (1986) Grundriss der biologischen Statistik, *VEB Gustav Fischer Verlag Jena*, **9. Auflage**, 184-188.
- Wedekind, J. E., Trame, C. B., Dorywalska, M., Koehl, P., Raschke, T. M., McKee, M., FitzGerald, D., Collier, R. J. and McKay, D. B. (2001) Refined crystallographic structure of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and its implications for the molecular mechanism of toxicity, *J Mol Biol*, **314**, 823-37.
- Wehmhoner, D., Haussler, S., Tummmler, B., Jansch, L., Bredenbruch, F., Wehland, J. and Steinmetz, I. (2003) Inter- and intracolon diversity of the *Pseudomonas aeruginosa* proteome manifests within the secretome, *J Bacteriol*, **185**, 5807-14.
- Whitchurch, C. B., Beatson, S. A., Comolli, J. C., Jakobsen, T., Sargent, J. L., Bertrand, J. J., West, J., Klausen, M., Waite, L. L., Kang, P. J., Tolker-Nielsen, T., Mattick, J. S. and Engel, J. N. (2005) *Pseudomonas aeruginosa* fimL regulates multiple virulence functions by intersecting with Vfr-modulated pathways, *Mol Microbiol*, **55**, 1357-78.
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C. and Mattick, J. S. (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation, *Science*, **295**, 1487.
- Wiblin, R. T. and Wenzel, R. P. (1996) Hospital-acquired pneumonia, *Curr Clin Top Infect Dis*, **16**, 194-214.
- Wiehlmann, L., Wagner, G., Cramer, N., Siebert, B., Gudowius, P., Morales, G., Kohler, T., van Delden, C., Weinel, C., Slickers, P. and Tummmler, B. (2007) Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 8101-6.
- Wilcoxon F. (1945) Individual Comparisons by Ranking Methods, *Biometrics Bulletin*, **1**, 8083.
- Wolfgang, M. C., Kulasekara, B. R., Liang, X., Boyd, D., Wu, K., Yang, Q., Miyada, C. G. and Lory, S. (2003) Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 8484-9.
- Worlitzsch, D., Tarran, R., Ulrich, M., Schwab, U., Cekici, A., Meyer, K. C., Birrer, P., Bellon, G., Berger, J., Weiss, T., Botzenhart, K., Yankaskas, J. R., Randell, S., Boucher, R. C. and Doring, G. (2002) Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients, *J Clin Invest*, **109**, 317-25.

- Wretling, B. and Pavlovskis, O. R. (1984) Genetic mapping and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* mutants defective in the formation of extracellular proteins, *J Bacteriol*, **158**, 801-8.
- Wurdemann, D. and Tumbler, B. (2007) In silico comparison of pKLC102-like genomic islands of *Pseudomonas aeruginosa*, *FEMS Microbiol Lett*, **275**, 244-9.
- Xiao, R. and Kisaalita, W. S. (1997) Iron acquisition from transferrin and lactoferrin by *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdinin, *Microbiology*, **143 ( Pt 7)**, 2509-15.
- Yahr, T. L., Vallis, A. J., Hancock, M. K., Barbieri, J. T. and Frank, D. W. (1998) ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13899-904.
- Yates, S. P. and Merrill, A. R. (2001) A catalytic loop within *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A modulates its transferase activity, *J Biol Chem*, **276**, 35029-36.
- Yates, S. P. and Merrill, A. R. (2004) Elucidation of eukaryotic elongation factor-2 contact sites within the catalytic domain of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A, *Biochem J*, **379**, 563-72.
- Yoon, S. S., Hennigan, R. F., Hilliard, G. M., Ochsner, U. A., Parvatiyar, K., Kamani, M. C., Allen, H. L., DeKievit, T. R., Gardner, P. R., Schwab, U., Rowe, J. J., Iglewski, B. H., McDermott, T. R., Mason, R. P., Wozniak, D. J., Hancock, R. E., Parsek, M. R., Noah, T. L., Boucher, R. C. and Hassett, D. J. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis, *Dev Cell*, **3**, 593-603.
- Zeiger, B. G., Eichwald, E., Zabner, J., Smith, J. J., Puga, A. P., McCray, P. B., Jr., Capecchi, M. R., Welsh, M. J. and Thomas, K. R. (1995) A mouse model for the delta F508 allele of cystic fibrosis, *J Clin Invest*, **96**, 2051-64.
- Zierdt, C. H. (1971) Autolytic nature of iridescent lysis in *Pseudomonas aeruginosa*, *Antonie Van Leeuwenhoek*, **37**, 319-37.

**verwendete Internetseiten:**

- [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) (NCBI Literaturdatenbank)
- [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com) (*Pseudomonas* Homepage)
- [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html) (NCBI, Blast-Programm)
- [www.jalview.org](http://www.jalview.org) (Alignment-Programm)
- [www.eBurst.mlst.net](http://www.eBurst.mlst.net) (eBurst-Analyse)
- [www.affymetrix.com/support/developer/tools/igbsource\\_terms.affx](http://www.affymetrix.com/support/developer/tools/igbsource_terms.affx) (Tiling-Array)

## 8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung	M	molar (mol/l)
bidest.	doppelt destilliert	mM	milli-molar
bp	Basenpaare	MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
BSA	Rinderserumalbumin	min	Minute
bzw.	beziehungsweise	mind.	mindestens
ca.	circa	mut	Mutante
CF	cystische Fibrose	NaCl	Natriumchlorid
CFU	Koloniebildene Einheiten	nm	Nanometer
cm	Zentimeter	OD	Optische Dichte
dest.	destilliert	PBS	Phosphat- gepufferte NaCl-Lösung
d.h.	das heißt	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
dATP	Desoxyadenosin-Triphosphat	pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen
dCTP	Desoxycytidin-Triphosphat		
ddUTP	Didesoxyuridin-Triphosphat	rpm	Umdrehungen pro Minute
dGTP	Desoxyguanidin-Triphosphat	RT	Raumtemperatur
DIG	Digoxigenin	s	Sekunde
DMSO	Dimethylsulfoxid	SCV	small colony variant
DNA	Desoxyribonukleinsäure	Tab.	Tabelle
dNTP	Desoxynucleosid-Triphosphat	usw.	und so weiter
dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat	V	Volt
et al.	und andere	vgl.	vergleiche
EtOH	Ethanol	v/v	Volumen pro Gesamtvolumen
evtl.	eventuell	wt	Wildtyp
g	Erdbeschleunigung	w/v	Gewichtsanteil pro Gesamtvolumen
GC	Guanosin u. Cytosin	µm	Mikrometer
h	Stunde	z.B.	zum Beispiel
kbp	Kilobasenpaare		



## 9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1.1	Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>P. aeruginosa</i>	1
Abb. 1.2.1	Gensequenz mit einem „ <i>single nucleotide polymorphism</i> “	5
Abb. 1.3.1	Klassifikation der Mutationen im CFTR Gen nach deren funktionellen Bedeutung	9
Abb. 1.4.1	Unterschiede in den Faktoren für eine akute und chronische Infektion	11
Abb. 1.4.2	Quorum sensing in <i>P. aeruginosa</i>	13
Abb. 1.4.3	Hypothetischer phylogenetischer Baum einer bakteriellen Evolution während einer chronischen Infektion	14
Abb. 3.1.1	Veranschaulichung des Aufbaus eines phylogenetischen Baums mit Hilfe des Programms eBurst	23
Abb. 3.1.2	Darstellung einer Hauptkomponentenanalyse	25
Abb. 3.4.1	Lokalisation der 58 Marker und der entsprechenden Gene auf dem AT-Chip	42
Abb. 3.4.2	Arbeitsschritte der Genotypisierung im Überblick	42
Abb. 3.4.3	Chip-Detektionsbild nach 0, 5 und 10 min	44
Abb. 3.4.4	Tabellenblatt zur Auswertung der Chipanalysen	44
Abb. 3.4.5	Bewertung des SNP-Musters	45
Abb. 3.4.6	Hexadezimalkode	46
Abb. 3.4.7	Strukturformel des Rifampicins und Streptomycins	47
Abb. 3.4.8	Aufbau des „ <i>P. aeruginosa</i> Tiling Array 1“	54
Abb. 4.1.1	Charakterisierung des Begriffs Klon und klonale Variante	61
Abb. 4.1.2	PCR-Überprüfung von Einzelkolonien auf die Anwesenheit des Gens PA2221	62
Abb. 4.1.3	Nachweis des Gens PA2221 in einem sequentiellen Patienten Isolat durch eine PCR-Kinetik	63
Abb. 4.1.4	globale Verteilung der 15 häufigsten Klone der analysierten 282 Isolate (Referenzstammsammlung)	65
Abb. 4.1.5	Klonverteilung der 282 typisierten Isolate in den verschiedenen Habitaten	66
Abb. 4.1.6	Verteilung der 15 häufigsten Klone im Habitat Mensch	68
Abb. 4.1.7	Bestimmung der Biodiversitätsindizes nach Shannon und Simpson	69
Abb. 4.1.8	Populationsstruktur der Referenzstammsammlung	71
Abb. 4.1.9	Populationsstruktur der Referenzstammsammlung mit Darstellung der <i>exoU</i> -Stämme	73
Abb. 4.2.1	Geographische Verteilung der 8 häufigsten Klone aus der Geschwister- und Zwillingsstudie und den nicht CF-Patienten	76
Abb. 4.3.1	Verteilung der Klone innerhalb der CF-Patienten der Medizinischen Hochschule	78
Abb. 4.3.2	Biodiversität der <i>P. aeruginosa</i> Population in CF-Patienten der MHH	79
Abb. 4.4.1	Genotypisierung der 64 <i>P. aeruginosa</i> Isolate aus den oberen und unteren Atemwegen von 26 CF-Patienten	82
Abb. 4.5.1	Genotypisierung der Isolate von den Patienten H1-H10	86
Abb. 4.5.2	Genotypisierung der Isolate von den Patienten H11-H20	87
Abb. 4.5.3	Genotypisierung der Isolate von den Patienten H21-H30	88

Abb. 4.5.4	Genotypisierung der Isolate von den Patienten H31-H35 und K1-K4	89
Abb. 4.5.5	Genotypisierung der Isolate von den Patienten K5-K12	90
Abb. 4.5.6	Verteilung der Klone bei den sequentiellen Isolaten beider Kliniken im Vergleich mit den 10 häufigsten Klonen der Referenz-Stammsammlung	92
Abb. 4.5.7	Anzahl der detektierten Klone pro Patient im Verlauf der CF-Erkrankung	95
Abb. 4.5.8	Persistenz des initial erworbenen Klons	96
Abb. 4.5.9	Anzahl und Dauer von <i>P. aeruginosa</i> Ko-Kolonisationen in den sequentiellen Isolaten der MHH und des CF-Zentrums in Kopenhagen	97
Abb. 4.5.10	Genotypisierungsergebnisse der sequentiellen Isolate eines Patienten	97
Abb. 4.5.11	Zeitliche Darstellung der <i>P. aeruginosa</i> Besiedelung in den CF-Patienten aus Hannover und Kopenhagen	99
Abb. 4.5.12	Übertragung eines <i>P. aeruginosa</i> Klons von einem auf einen anderen CF-Patienten	101
Abb. 4.5.13	Art und Verteilung der Antibiotikatherapie der einzelnen CF-Patienten beider Kohorten	103
Abb. 4.5.14	Populationsstruktur der Referenzstammsammlung und der Langzeitverläufe beider Patientenkohorten (MHH und Kopenhagen)	106
Abb. 4.5.15	Beispiel für keine, geringe und hohe Radiation	109
Abb. 4.5.16	Darstellung der adaptiven Radiation in verstorbenen und noch lebenden Patienten	110
Abb. 4.6.1	Ergebnisse der Überprüfung auf Hypermutatorstämme	114
Abb. 4.6.2	Genotypisierung der sequentiellen Isolate von 6 ausgewählten Patienten	115
Abb. 4.6.3	Phänotypische Charakterisierung des Referenzstamms PAO	117
Abb. 4.6.4	Phänotypische Charakterisierung der Isolate des Patienten H1	118
Abb. 4.6.5	Phänotypische Charakterisierung der Isolate des Patienten H5	120
Abb. 4.6.6	Phänotypische Charakterisierung der Isolate des Patienten H8	122
Abb. 4.6.7	Phänotypische Charakterisierung der Isolate des Patienten H11	124
Abb. 4.6.8	Phänotypische Charakterisierung der Isolate des Patienten H29	126
Abb. 4.6.9	Phänotypische Charakterisierung der Isolate des Patienten H31	128
Abb. 4.6.10	Ergebnisse der Pyocyanin-Messung, gemessen bei 695 nm nach 24 h	129
Abb. 4.6.11	Ergebnisse zur Bestimmung der Elastase-Aktivität	129
Abb. 4.6.12	Ergebnisse der Hämolysemessung	130
Abb. 4.6.13	A. phänotypischer Baum der Isolate des Patienten H29, basierend auf 6 phänotypischen Markern; B. phänotypischer Baum der Isolate des Patienten H29 basierend auf 6 phänotypischen und 7 morphologischen Markern	133
Abb. 4.6.14	graphische Darstellung der Adhärenzüberprüfung	137
Abb. 4.6.15	Wachstum der Isolate H8-30 und H8-76 auf LB-Agar nach 24 h, 72 h und 7 d Inkubation	139
Abb. 4.6.16	Virulenz- und Persistenzüberprüfung einiger sequentieller Isolate im Agarbead-Lungeninfektionsmodell	141
Abb. 4.6.17	Immunofluoreszenzaufnahme einer Infektion mit <i>P. aeruginosa</i>	143
Abb. 4.6.18	Wachstumsexperimente der sequentiellen Isolate in LB	145

Abb. 4.6.19	Wachstumsexperimente der sequentiellen Isolate in MM	146
Abb. 4.6.20	Aussehen der verschiedenen ASM-Kulturen nach 70 h Inkubationszeit	147
Abb. 4.6.21	Wachstumsexperimente der sequentiellen Isolate in ASM	148
Abb. 4.6.22	Darstellung der Wachstumsergebnisse aller drei Wachstumsbedingungen durch Rangzahlen	149
Abb. 4.6.23	Sequenziererergebnisse eines PCR-Produkts des Gens <i>fpvA</i>	152
Abb. 4.6.24	Veranschaulichung der Mutation im Spätisolat des Patienten H1	154
Abb. 4.6.25	spezifischer Restriktionsverdau in <i>mucA</i> der Isolate H1-2 und H1-43	154
Abb. 4.6.26	Veranschaulichung der Mutation im Spätisolat des Patienten H5	156
Abb. 4.6.27	spezifischer Restriktionsverdau von <i>lasR</i> der Isolate H5-2 und H5-72	157
Abb. 4.6.28	Veranschaulichung der Transposoninsertion in <i>lasR</i> des Spätisolats von Patient H31	157
Abb. 4.6.29	PCR-Produkt mit <i>lasR</i> -Primern auf der DNA von H31-8 und H31-59	158
Abb. 4.6.30	Überprüfung von Einzelklonen auf die Insertion des Transposons in <i>lasR</i>	158
Abb. 4.6.31	Optimierung der PCR für <i>lasR</i> mit und ohne Transposon	159
Abb. 4.6.32	PCR-Produkte der 10 jeweils ausgewählten Gene mit Abweichungen in der Sequenz zwischen Früh- und Spätisolat der Patienten H8, H11 und H29	161
Abb. 4.6.33	Darstellung eines kleinen Ausschnitts aus der Tiling-Array Analyse	161
Abb. 4.6.34	Veranschaulichung der potentiellen Mutation im Spätisolat des Patienten H8	163
Abb. 4.6.35	Primerentwicklung zur Verifizierung potentieller SNPs in den Isolaten des Patienten H8	164
Abb. 4.6.36	Überprüfung des SNPs im Gen PA0905.1 durch verschiedene Restriktionsenzyme	164
Abb. 4.6.37	Überprüfung des SNPs im Gen PA1431 durch das Restriktionsenzym <i>SalI</i>	165
Abb. 4.6.38	Veranschaulichung der potentiellen Mutationen im Spätisolat des Patienten H11	165
Abb. 4.6.39	Überprüfung von drei potentiellen SNPs im Gen PA2512 <i>antA</i> durch die Restriktionsenzyme <i>HaeIII</i> , <i>MspI</i> , <i>HpaII</i> und <i>Fnu4HI</i>	166
Abb. 4.6.40	Veranschaulichung der potentiellen Mutationen im Spätisolat des Patienten H29	167
Abb. 4.6.41	Überprüfung eines potentiellen SNPs im Gen PA0911 durch das Restriktionsenzym <i>RsaI</i>	168
Abb. 4.6.42	Ergebnisse des Konkurrenzexperimentes (H1) in LB und in Minimalmedium	169
Abb. 4.6.43	Quantitative Auswertung des Konkurrenzexperimentes von Früh- und Spätisolat des Patienten H1	170
Abb. 4.6.44	Ergebnisse des Konkurrenzexperimentes (H5) in LB und in Minimalmedium	171
Abb. 4.6.45	Quantitative Auswertung des Konkurrenzexperimentes von Früh- und Spätisolat des Patienten H5	172
Abb. 4.6.46	Ergebnisse des Konkurrenzexperimentes (H8) in LB und in Minimalmedium	173

---

Abb. 4.6.47	Darstellung der Oh-Probe aus dem Konkurrenzexperiment der Isolate von Patient H8	173
Abb. 4.6.48	Quantitative Auswertung des Konkurrenzexperimentes von Früh- und Spätisolat des Patienten H8	174
Abb. 4.6.49	Ergebnisse des Konkurrenzexperimentes (H29) in LB und in Minimalmedium	175
Abb. 4.6.50	Quantitative Auswertung des Konkurrenzexperimentes von Früh- und Spätisolat des Patienten H29	176
Abb. 4.6.51	Ergebnisse des Konkurrenzexperimentes (H31) in LB und in Minimalmedium	177
Abb. 4.6.52	Quantitative Auswertung des Konkurrenzexperimentes von Früh- und Spätisolat des Patienten H31	178
Abb. 4.6.53	Detektion der transposonspezifischen Sequenz im Früh- und Spätisolat des Patienten H31	179

## 10. ANHANG

### 10.1 Informationen zur Patientenkohorte aus Hannover und Kopenhagen

Tab. 10.1.1: Mutationsgenotypen der Patientenkohorten aus Hannover und Kopenhagen

Patient	Geburtsdatum	Geschlecht	CFTR Mutationsgenotyp	Alter der ersten <i>P. aeruginosa</i> Besiedlung [Jahren]
K1	17.11.1969	m	delF508/delF508	8
K2	03.11.1960	f	delF508/delF508	10
K3	10.02.1969	m	delF508/delF508	8
K4	30.08.1970	f	delF508/delF508	6
K5	11.11.1964	m	delF508/delF508	7
K6	21.08.1966	f	delta F508/3128del4	6
K7	08.01.1967	f	deltaF508/712-"a ->G	11
K8	30.10.1966	f	delF508/delF508	12
K9	12.05.1967	m	delF508/delF508	12
K10	09.07.1968	f	delF508/delF508	12
K11	23.06.1968	m	deltaF508/T388X	11
K12	19.02.1964	m	delF508/delF508	6
H1	04.02.1981	m	delF508/delF508	4
H2	14.03.1978	m	delF508/G542X	7
H3	06.02.1975	f	delF508/N1303K	17
H4	22.02.1977	f	delF508/delF508	8
H5	24.07.1972	m	delF508/delF508	14
H6	04.01.1987	f	21kb del EX2,3/1078delT	4
H7	27.09.1977	f	delF508/delF508	7
H8	05.12.1968	f	delF508/R347P	17
H9	06.04.1979	m	delF508/delF508	5
H10	17.06.1966	f	delF508/delF508	19
H11	14.11.1968	m	delF508/delF508	17
H12	07.05.1974	m	delF508/delF508	11
H13	15.03.1977	f	delF508/G551D	13
H14	25.02.1973	m	delF508/R553X	13
H15	18.01.1971	f	N1303K/3659delC	14
H16	03.11.1982	f	delF508/delF508	10
H17	12.05.1975	f	delF508/del EX2,3	10
H18	15.04.1978	f	del tx2,3/EX 2,3	7
H19	02.06.1975	f	delF508/delF508	10
H20	28.03.1981	m	delF508/delF508	4
H21	03.05.1978	m	delF508/N1303K	8
H22	01.12.1975	f	delF508/delF508	11
H23	29.11.1977	f	delF508/R1162X	8
H24	13.12.1975	m	delF508/2143delT	18
H25	02.08.1973	f	delF508/delF508	13
H26	30.07.1968	m	delF508/delF508	17
H27	14.11.1980	f	delF508/delF508	10
H28	13.04.1970	f	delF508/delF508	16
H29	18.03.1978	m	delF508/delF508	7
H30	21.09.1980	m	4374+16 -> T unknown	10
H31	11.04.1975	m	delF508/delF508	5
H32	01.08.1973	f	delF508/delF508	14
H33	28.06.1964	m	delF508/2184del	26
H34	16.11.1977	m	delF508/delF508	10
H35	17.10.1975	m	delF508/delF508	15

## 10.2 Verwendete Primersequenzen

Tab. 10.2.1: Primersequenzen für die AT-Chip PCR

Gen	5'- 3' Primersequenz 1	5'- 3' Primersequenz 2
<i>oriC</i> PAO	AGCCTCGACACCGGTTCTCG	ACCATCTCGTTCATCCCCAGG
<i>oprL</i> (1) PAO	TTCTGAGCCCAGGACTGCTCG	TCGACGCGACGGTTCTGAGCC
<i>fliCa</i> (1) PAK	AGCTGATGGTATCGCCGTCGC	CTAGTGATCGCACCGGAGCC
<i>alkB2</i> PAO	TTCTCGCCGGCATAGTAGGC	doppelte Menge vom ersten Primer
<i>citS-1</i> PAO	GCAGGTAGCAGGTTCCAGG	AACTGTTCCCTCTGCGCGGCG
<i>citS-2</i> PAO	TGATCGGCTTGGTCTCGCAGG	GCTGATCGGCTTGGTCTCGC
<i>oprI</i> (1) PAO	GCTGGCTTTTTCCAGCATGCG	TTGCGGCTGGCTTTTTCCAGC
<i>ampC-1</i> PAO	CGCATCTTGTCTGGGTGAGG	TCGTCGAGGCGCATCTTGTCC
<i>ampC-3</i> PAO	GGCGAGATAGCCGAACAGGC	CACTTGCTGCTCCATGAGCC
<i>ampC-4</i> PAO	ACGTCGAGGTGGGTCTGTTCG	GTAGCCTTCGGCATCCAGCG
<i>ampC-5</i> PAO	amplifiziert mit Primern von <i>ampC-4</i>	
<i>ampC-6</i> PAO	TCGGCATTGGGATAGTTGCGG	doppelte Menge vom ersten Primer
<i>ampC-7</i> PAO	TTGGGATAGTTGCGGTTGGC	TGGCGTAGGCGATCTTCACCC
<i>fliC a</i>	CGATCGCGATGTCAGCGGTGC	TGCCGATCGCGATGTCGAGC
<i>fliC b</i>	TGACGTTCTCGCCGTTAGCG	CAGTAGCGGTACCGGCTCTGC
<i>exoS</i>	CAGGGTCGCCAGCTCGCTCGCC	AGGGTCGCCAGCTCGCTCGC
<i>exoU</i>	AGTGATCTGCCGCGGCCCTGCC	GTGATCTGCCGCGGCCCTGC
<i>fpvA</i> type I	CGTTCAGGTCGTAGACCGCGC	GCGATAACCACTGTCTGCGGC
<i>fpvA</i> type IIa	TGCCGAAGGTGAATGGCTTGGC	CCTGATGGTCCGATCCCAGC
<i>fpvA</i> type IIb	GCCGAGGGTCAAGAACCACTGG	TCTTGGCCAGTCATAGCGGC
<i>fpvA</i> type III	TAACCCCAAGGCCATTGGAGG	GCCACCGCCTTGAATAACCC
<i>fpvB</i>	AATTGCTCGAGGGATGCGGC	GGTCGAAACGGATGCGCAGG
<i>LES</i>	GCCCCGCGTCATTTTCACGTCG	AATGCTCTGGGCAACGAGCC
PA0636	ATGCCATCGTTGAAGGCACCGC	TGCCATCGTTGAAGGCACCG
PA0722	TCTGGCGGAATCAGGTAGGCC	CTCCGGGGAGAAACACCG
PA0728	AGCCAAGACGTTGTTGCGCG	TCAATGACGCCGAGTTGGCGC
PA2185	CTCGGACAGGTTACGCTGG	GCCATTCGCTGCAACACCTCC
PA2221	TTCTGGGCCAGAGTTGGACC	AGCTTAAGGCCGTGGCACTCG
PA3835	CCGGAGAATTCGCGTCCACC	TGCTGACGATGAAGCCCCAGC
<i>fla-island</i>	CCCGTGTTCCTGACCTTGC	doppelte Menge vom ersten Primer
<i>orfA</i>	GTCCACAGGCGCTGCGGCGC	GTCCACAGGCGCTGCGGCG
<i>orfI</i>	AAACTGCCCCGCCCCCATCC	GGAAAACTGCCCGCCCCC
<i>orfJ</i>	ACGCTCGCAGCGCTCACGCG	GGCCTGGCTGCGAACGCTCGC
PA0980	ACCTCCAGCACCGACACACC	ATCCGATCCACCTCCAGCAC
<i>XF1753</i>	CGCGCGTTCGAGAAACAGG	CGGAGGTTGAAAAGCTGGCC
acetyltransferase	ACGACGTCACCGTCGAGACCG	ACCGCCTTCTGGTGAGCTGG
<i>pKL-1</i>	ATCTGAACCGAGGGGATCCGC	CCCGGGAGTCATTGGTCTGG
<i>pKL-3</i>	GACCTACACTCCAACCGCTGG	TTCCCTTGCTGCCGAGAAGC
<i>TB-C47-1</i>	GCCTGTTGGACCCCTTTGACC	TACTCTGCTGTTGGACCCC
<i>TB-C47-2</i>	TCTGTCAATCCCCTTTGGGG	AGCCCCCTTCTGTCAATCCCC
<i>PAPI-1</i> pili chaperone	CGCTCAAGCGCTATCCCACC	CGCCATCGGCCTGTACAACG
<i>PAPI-1</i> luminal binding protein	CGGTAGAGAGCTGGGTTGGC	AACCTGGAGCTAGGGCAGAGC
<i>pKLC</i> conserved hypothetical	CTACCCAGCTTGGGCGTAGC	AAGCGATAGCCGTGCTCCTGC
<i>pKLC</i> adhesin	CCGGCTATATCCGCGGTACC	ATTGGCGTGTGTTTACGCC
<i>pKLC</i> fatty acid synthase	GGTGGCGTCGGGTTTTCTGC	AGGTGCTAGCGGAAGGTGGTG
<i>PAGI-2/3-4</i>	TGTCCCGGCTCAGTTCAACG	GCAACACCTTGGCGTTGTCC
<i>PAGI-2/3-5</i>	TCAAGCTCGTTGTGGACCGC	GTTACGACGGCGTGTGTCCG
<i>PAGI-2/3-6</i>	CAACACGCGACTGGCGATCC	TACATCATCCGCAACGGCGGC
<i>C-45</i>	TCATCCAGCAAGCCATTGCGC	TGGAGTCGCTTTCGCCATCG
<i>C-46</i>	CGCGGTGCTGGTTGCGCTGC	CGCTGGCAGTTCGCTGGCC
<i>C-47</i>	TATTGACGACCTACCGCGCGCC	CACCAAGAACCCGCTGCTCG
<i>PAGI-2</i>	ACGCAACGTATTGCGCGACCC	CGCAACGTATTGCGCGACCC
<i>PAGI-2/3-1</i>	GGTGCTCGACCCAAGCATCG	TCCTTGAGTTCCTTGGCGCGG
<i>PAGI-3-1</i>	GACGAATACCCAGTCCGTGG	GCAGACGAATACCCAGTCCG
<i>PAGI-3-8</i>	ATGTTGGCAGGATGTCCACCG	TAGGCGGGCCTTTTGAAGGTGC
<i>tRNA(Pro)- island 1</i>	TCCACGCCGAGGGACGTGCC	GCTCCACGCCGAGGGACGTGCC
<i>tRNA(Pro)- island 2</i>	AGGAGGCCGATGACAACACCC	TGCCGATTCCATGCTCACGCC
<i>PAGI-1</i>	GCATTCGCCACGGAAGGAAGG	GAAGGCATCATGGCATTGCGC

Tab. 10.2.2: andere Primersequenzen

Beschreibung	Gen	5'- 3' Primersequenz	3'- 5' Primersequenz
Marker für H1	<i>mucA</i>	CTCGTGAAGCAATCGACAAA	AAAAGCAACAGGGAGGTGGT
Marker für H1 und H31-8	<i>lasR</i> -Teil 1	ACAACGTGCCGGATATCGGG	GCATGGTCAGCCATACACC
Marker für H1 und H31-8	<i>lasR</i> Teil 2	GTTCTTCGAGGAAGCCTCGG	AGGGCAAATTACCGATCGCC
allgemeine Markersuche	<i>fpvA</i> 1	GGGTGGAAGTACTCAAGGGG	GTGCTTATCCTGGTAGGCGG
allgemeine Markersuche	<i>fpvA</i> 2	CTCCCGCTCCTCAACAACG	GGTCCAGTAGCTCTTGCC
allgemeine Markersuche	<i>fpvA</i> 3	CGCAGGACAGTTGGTATCGC	GACCATCTGCCAGCTCTTGC
allgemeine Markersuche	<i>fpvA</i> 4	CCGGGTGAAGATCTTCGACG	GGTATAGCGTGGTCGTTGG
allgemeine Markersuche	<i>fpvA</i> 5	CCGTCTGGCTGGACTACACC	CCTGGCCGTAGTAGCAGTCC
Marker für H31-59	H31-59 <i>lasR</i> +Teil Transposon	ACAACGTGCCGGATATCGGG	CAAGCGCAAGATTGAAAAGGCC
Marker für H31-59	H31-59 Transposon spezifische Primer	ATCCACAGGTTTCGACAGAGC	AATGCACAGACCAAGAAGG
Tiling-Array	H8-PA0905li	GAAGGAAGTCGCCGTACACC	TCTGGTACTCGGTGCTGGTC
Tiling-Array	H8-PA1414li	CCGGGGCGGGAGT	CGTTTTCCACCGGGATG
Tiling-Array	H8-PA1430li	ATGGCCGTTAATTTGGGTCT	ACTCGCTTACAGCGGATTC
Tiling-Array	H8-PA1469li	GGATCAAAGCCTGCTGTAC	CCGTCATGACTATCCAGGATTT
Tiling-Array	H8-PA1489li	GAGAGGATGTCGGTGCTTTT	TATCGCCGACTCCTCGAA
Tiling-Array	H8-PA3133li	CGCCGGCCGCTGT	AGCGGTACTTTGGGGCTAT
Tiling-Array	H8-PA3285li	AGTTGTCCACGGAAGTCCAG	ACCTGGCTGCTGACCATTAC
Tiling-Array	H8-PA1778li	ATGAAGCAGTACCCGTCCAC	AATGCCGAGCAACCTC
Tiling-Array	H8-PA4243li	GATGTAGCGAGCGGACTGTT	GATTTTCGCCAGCAGTATCC
Tiling-Array	H8-PA4301li	CCTCGCTGTCCATCAGTTG	GGACAGCATCGTCAAGCTC
Tiling-Array	H11-PA0426li	GGATGTTCAACCCGATTC	GCAATTGCTTGACGATCTCC
Tiling-Array	H11-PA2475li	CATCGGGCGATCAATCC	CGCAGCTCGGTGTTCC
Tiling-Array	H11-PA2509li	GAGGGCCGCTTGAT	AGCATTTCTCGAGTTGCTG
Tiling-Array	H11-PA2512li	CGGCTGTTGAAGGTCAAG	GCAGCGCGCGATA
Tiling-Array	H11-PA2592li	CGAAAGGAAATCCAATGAA	GTAGTCGATCAGCGCATAACC
Tiling-Array	H11-PA2656li	CCGCTGACCTGCTCGT	ACTGGAGCCGCTGGTG
Tiling-Array	H11-PA2842li	CGCGCCCTGGCTACT	ATCGAGTCCGGCGACTATC
Tiling-Array	H11-PA2986li	CTCGGTTCCGGTGGTGTG	CGATGCCGGCCAGTT
Tiling-Array	H11-PA3474li	GGGTACCGGCGTCCAC	CTCGCCGGCCAGGT
Tiling-Array	H11-PA4692li	GACCTGCGGATTGACGTT	CCGAAAAGTACCCGAGAC
Tiling-Array	H29-PA0884li	TGTTCAAGCAGATGGTACGG	ATTGCCGGGAATTTCT
Tiling-Array (Marker für H29)	H29-PA0911li	CTGGGGCAGGCTCGTT	AGAAGGAACGCCCAAG
Tiling-Array	H29-PA2812li	AACTTGCTGCCGAAGAAGC	AAGGCATCAGCATCATCCTC
Tiling-Array	H29-PA3211li	TAAGCTTCTGCACCATGACG	CACCAGGTTGACCGGTGAGA
Tiling-Array	H29-PA2879li	CCGGTCTCGCTATAGGTGTT	GGTCGAAGAGGCTGTTGAAG
Tiling-Array	H29-PA3280li	CTTGACGGAGTCAACTTGG	CCGCCGGCGTATCC
Tiling-Array	H29-PA4329li	ATGTACACGGCCAACCACTT	CGACGTGCGCTTATACCAG
Tiling-Array	H29-PA5443li	CCTGACCTACGCGGAGAC	CAGGACCGCAGGATG
Tiling-Array	H29-PA1865li	GGATCGGCGAACGCTAT	GGCTGGATTGGCGATAGA
Tiling-Array	H29-PA3115li	GAAACTGTCCTCGCCCTTC	ATGCGCAGAAAGAGAAGGAA
durch Primer eingeführte Restriktionsstellen	H8-PA0905-Tsp509I	CTTTGCAAACGGGGTAAAGA	GCCTGAATCAACCTCTAACACTTAA
durch Primer eingeführte Restriktionsstellen	H8-PA0905-BspDI, ClaI	CTTTGCAAACGGGGTAAAGATG	CCTGAATCAACCTCTAACACTCGA
durch Primer eingeführte Restriktionsstellen	H8-PA0905-MseI	CGGGGTAAGATGGGTATCAT	GCCTGAATCAACCTCTAACACTTTA
durch Primer eingeführte Restriktionsstellen	H8-PA0905-Asel	CTTTGCAAACGGGGTAAAGA	GCCTGAATCAACCTCTAACACTTAA
durch Primer eingeführte Restriktionsstellen (Marker für H8)	H8-PA1431-SalI	GCTGCTACGAGGTGAGTGC	GGCCTGGAACAACCTGTCGA
durch Primer eingeführte Restriktionsstellen	H8-PA3285-XhoI	TCCAGTCCAAGCCCTCG	ATGGTACGGTGGATGACCAGC

### 10.3 Primärdaten

Auf der CD abgelegte Daten:

- Ergebnisse aller durchgeführten Genotypisierungen mit Informationen zu den einzelnen Isolaten (Datei: Genotypisierungen.xls)
  1. Referenzstammsammlung
  2. Isolate der Geschwister- und Zwillingsstudie sowie der nicht-CF Kohorte
  3. CF-Isolate der MHH aus dem Zeitraum 1998-2006
  4. CF-Isolate aus den oberen und unteren Atemwegen
  5. sequentielle CF-Isolate der Patienten aus Hannover und Kopenhagen
- Detaillierte Liste der durchgeführten Antibiotikatherapien an der Medizinischen Hochschule Hannover und der CF-Ambulanz Kopenhagen (Datei: Antibiotikatherapie Hannover-Kopenhagen.xls)



## WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATIONEN

[1] Sequence diversity of the mucABC locus in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis

Bragonzi, A., Wiehlmann, L., Klockgether, J., **Cramer, N.**, Worlitzsch, D., Döring, G., Tümmler, B. (2006) *Microbiology*, **152(Pt11)**, 3261-9.

[2] Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*

Wiehlmann, L., Wagner, G., **Cramer, N.**, Siebert, B., Gudowius, P., Morales, G., Köhler, T., van Delden, C., Weinel, C., Slickers, P., Tümmler, B. (2007) *Proc Natl Acad Sci USA*, **104(19)**, 8101-6.

[3] Chip-Genotypisierung von Bakterien

Wiehlmann, L., **Cramer, N.**, Tümmler, B. (2007) *Biospektrum*, Spektrum Akademischer Verlag, **(6)**, 640-642.

[4] Concordant genotype of upper and lower airways isolates of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis

Mainz, J., Naehrlich, L., Schien, M., Kaeding, M., Mayr, S., Schneider, G., Wiehlmann, L., **Cramer, N.**, Pfister, W., Kahl, B.C., Beck, J.F., Tümmler, B. (2009) *Thorax*, [accepted].

[5] Lung pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* clonal variants from patients with cystic fibrosis

Bragonzi, A., Paroni, M., Nonis, A., **Cramer, N.**, Montanari, S., Rejman, J., Serio, C.D., Döring, G., Tümmler, B. (2009) *AJRCCM*, [accepted].

## LEBENS LAUF

### PERSÖNLICHE DATEN:

Name: Cramer  
Vorname: Nina  
Geburtsdatum: 20.04.1978  
Geburtsort: Leer  
Familienstand: verheiratet, ein Kind (\*20.10.2007)  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### SCHULISCHER WERDEGANG:

1984-1988 Konke-Oltmanns-Schule, Rhauferhn  
1988-1994 Mariengymnasium, Papenburg  
1994-1997 Ubbo-Emmius Gymnasium, Leer  
1997 Abitur

### BERUFSAUSBILDUNG:

08/1997-07/2000 Milchwirtschaftliche Laborantin in der MLUA Oldenburg,  
Landwirtschaftskammer Weser-Ems

### AKADEMISCHER WERDEGANG:

2000-2005 Studium an der Universität Hannover  
Studiengang: Diplom Biochemie  
2002 Diplom-Vorprüfung im Fachbereich Biochemie  
2005 Diplomprüfung  
02/2005-07/2005 Diplomarbeit bei Prof. Dr. B. Tümmler,  
Medizinische Hochschule Hannover  
Thema der Diplomarbeit: „Molekulare Epidemiologie von  
*Pseudomonas aeruginosa* Isolaten von Patienten mit cystischer  
Fibrose“  
08/2005- 07/2009 Doktorandin im Institut für Pädiatrische Pneumologie und  
Neonatologie der Medizinischen Hochschule Hannover in der  
klinischen Forschergruppe von Prof. Dr. B. Tümmler  
Thema der Dissertation: „Mikroevolution in *Pseudomonas*  
*aeruginosa* Isolaten von Patienten mit cystischer Fibrose“





Isolate	Source	Source (additional information)	Place	Date	Country	SNP-Pattern																																										
							gpc	gpl	gms2	gms1	gms2	gms1	gms2	gms1	gms2	gms1	gms2	gms1	gms2	gms1	gms2	gms1	gms2	gms1	gms2	gms1	gms2	gms1	gms2	gms1	gms2	gms1	gms2	gms1	gms2	gms1	gms2	gms1	gms2	gms1	gms2	gms1	gms2	gms1	gms2			
Zw70	CF-patient		Cologne	1997	Germany	AC4A	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
MF6	CF-patient		Bremen	1987	Germany	AC9A	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
4524	Animal	mink	Nordvach/Hägersten	05.10.2004	Denmark	AE9A	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
3	acute infection	burnwound	Krakau		Poland	AF92	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
6104	Clinic	ICU	Paris	2004	France	AF9A	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
1D4	Clinic	Bacteremia	Geneva	1997	Switzerland	AF9A	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
3F9	Clinic	Bacteremia	Geneva	1994	Switzerland	B01A	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
Zw30	CF-patient		Innsbruck	1997	Austria	B420	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
13110	Clinic	ICU	Limoges	2004	France	C40A	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
C5	CF-patient		Hanover	1987	Germany	C40A	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
CSGB8	CF-patient		Bueckeburg	1986	Germany	C40A	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
SG1	CF-patient		Bueckeburg	1986	Germany	C40A	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
SG17M	Water	River Ruhr	Muelheim	1993	Germany	C40A	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
SG31	Water	River Ruhr	Muelheim	1993	Germany	C40A	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
Zw28	CF-patient		Innsbruck	1997	Austria	C40A	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
3C8	Clinic	Bacteremia	Geneva	1993	Switzerland	C41A	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
1303	environmental	open ocean	Open Ocean, S4,	2003	Japan	CC29	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
6103	Clinic	ICU	Paris	2004	France	CC2A	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
ATCC3356	Clinic	Serotype 9	Heidelberg	1965	Germany	CD9E	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
MB5837	Animal	mink	unknown		Norway	CDAA	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
13105	Clinic	ICU	Limoges	2003	France	D421	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
30101	ICU	ICU	Lausanne	2005	Switzerland	D421	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
1E8	CF-patient		Liverpool	unknown	Great Britain	D421	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
39	Clinic	Bacteremia	Geneva	unknown	Switzerland	D421	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
PA14	Clinic	Burn wound (sequenced strain)	Boston (Ma)	unknown	USA	D421	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
PT2	Water	River Ruhr	Muelheim	1992	Germany	D421	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
RN3	CF-patient		Oelberburg	1987	Germany	D421	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
Zw61	CF-patient		Hanover	1997	Germany	D421	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
Zw85	CF-patient		Aberdeen	1997	Great Britain	D421	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
Zw85-2	CF-patient		Aberdeen	1997	Great Britain	D421	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
Zw86	CF-patient		Aberdeen	1997	Great Britain	D421	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
Zw98-2	CF-patient		The Hague	1997	The Netherlands	D421	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
AT5946	Water	Wound	Heidelberg	1992	Germany	D429	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
PT36	Water	River Ruhr	Muelheim	1992	Germany	D429	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
Zw81	CF-patient		London	1997	Great Britain	D429	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
Zw82	CF-patient		London	1997	Great Britain	D429	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
ZH1	Clinic	Bacteremia	Geneva	1992	Switzerland	D439	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1
Zw98a	CF-patient		The Hague	1997	The Netherlands	E419	1	1	0	0	1	1	0																																			

















Isolate	Source	Source (additional information)	Date	Country	SNP- Pattern
109-5792	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	18.12.2000	Germany	OC2E
107-5347	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	01.11.2000	Germany	OC2E
106-5819	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	19.12.2000	Germany	OC2E
105-5770	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	14.12.2000	Germany	OC2E
94-5794	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	18.12.2000	Germany	OC2E
189-5064	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	20.03.2002	Germany	OC2E
187-5141	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	13.08.2002	Germany	OC2E
186-5041	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	31.07.2002	Germany	OC2E
311-5608	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	28.01.2003	Germany	OC2E
320-5260	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	01.04.2003	Germany	OC2E
418-5206	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	22.06.2004	Germany	OC2E
138-5693	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	02.05.2001	Germany	OC2E
188-5064	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	20.03.2002	Germany	OC2E
189-5004	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	19.03.2002	Germany	OC2E
251-5875	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	05.11.2002	Germany	OC2E
309-5608	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	25.01.2003	Germany	OC2E
310-5608	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	25.01.2003	Germany	OC2E
321-5260	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	01.04.2003	Germany	OC2E
356-5086	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	21.10.2003	Germany	OC2E
381-5378	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	13.07.2004	Germany	OC2E
382-5378	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	12.07.2004	Germany	OC2E
407-5522	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	02.08.2004	Germany	OC2E
409-5338	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	12.03.2004	Germany	OC2E
423-5414	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	22.03.2004	Germany	OC2E
91-5793	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	18.12.2000	Germany	OC2E
92-5793	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	18.12.2000	Germany	OC2E
138-5693	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	02.05.2001	Germany	OC2E
251-5875	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	05.11.2002	Germany	OC2E
408-5338	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	12.03.2004	Germany	OC2E
460-5211	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	16.10.2004	Germany	OC2E
462-5211	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	16.10.2004	Germany	OC2E
463-5450	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	20.08.2005	Germany	OC2E
464-5450	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	20.09.2005	Germany	OC2E
5587	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	19.12.2006	Germany	OC2E
5587	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	19.12.2006	Germany	OC2E
422-5757	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	03.05.2004	Germany	F469
4	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	1998	Germany	F469
443	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	16.03.2004	Germany	F469
23	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	1998	Germany	F469
24	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	1998	Germany	F469
442	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	20.03.2004	Germany	F469
54	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	1999	Germany	F469
51	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	1999	Germany	F469
54	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	1999	Germany	F469
18-69789-98	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	1998	Germany	F469
400-5075	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	08.06.2004	Germany	F469
343	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	22.01.2003	Germany	1BAE
342	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	22.01.2003	Germany	1BAE
200-5444	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	17.09.2002	Germany	1BAE
201-5359	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	03.09.2002	Germany	1BAE
254-5587	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	11.12.2003	Germany	1BAE
255-5803	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	19.09.2003	Germany	1BAE
402-5090	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	08.06.2004	Germany	1BAE
449-5266	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	02.03.2004	Germany	1BAE
450-5266	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	02.03.2004	Germany	1BAE
196	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	21.06.2002	Germany	239A
12	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	1998	Germany	239A
374	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	11.05.2004	Germany	239A
375	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	11.05.2004	Germany	239A
197-5232	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	21.08.2002	Germany	239A
232-5960	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	01.03.2002	Germany	239A
375-5853	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	11.05.2004	Germany	239A
376-5372	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	16.03.2004	Germany	239A
377-5649	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	05.04.2004	Germany	239A
417-5644	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	07.06.2004	Germany	239A
452-5119	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	09.10.2004	Germany	239A
323	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	10.06.2003	Germany	E429
366	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	25.06.2003	Germany	E429
7-56482-98	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	1998	Germany	E429
13-62302-98	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	1998	Germany	E429
6-56482-98	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	1998	Germany	E429
472-5692	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	17.12.2004	Germany	E429
72	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	22.12.2000	Germany	F429
126	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	30.01.2001	Germany	F429
461-5211	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	16.10.2004	Germany	F429
56	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	1999	Germany	2C22
57	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	1999	Germany	2C22
283	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	23.08.2003	Germany	2C22
365	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	18.06.2003	Germany	2C22
433	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	07.05.2004	Germany	2C22
432	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	07.05.2004	Germany	2C22
326	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	18.06.2003	Germany	2C22
327	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	18.06.2003	Germany	2C22
156-5522	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	06.09.2001	Germany	2C22
434-5773	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	16.10.2004	Germany	2C22
435-5773	strain collection CF-patients (MHH)	throat swab	22.10.2004	Germany	2C22























Patientennummer	Geb. am	Datum	Alt	cm	kg	FEV1s	Form_n	Kode	MedNameDB	Medikation	TagDos	Beginn	Dauerth.	Therapie	Jahr	Anzahl Art	Jahr Anzahl	
H1	04.02.1981	06.02.1982	1,021					iv-Th.	PAW Pseudomonaswirks. Th.			05.02.82	0	Breit+Tohra	1982	1	1	
H1	06.02.1981	18.05.1983	2,2806	89	10,8			iv-Th.	PAW Pseudomonaswirks. Th.			18.05.83	0	Breit+Tohra	1983	1	1	
H1	07.02.1981	05.12.1983	2,8309	94	12,3			iv-Th.	PAW Pseudomonaswirks. Th.			05.12.83	0	Breit+Tohra	1983	0	0	
H1	08.02.1981	15.05.1984	3,2745	97	14			iv-Th.	PAW Pseudomonaswirks. Th.			15.05.84	0	Breit+Tohra	1984	1	1	
H1	09.02.1981	28.08.1984	3,5619	102	13,5			iv-Th.	PAW Pseudomonaswirks. Th.			28.08.84	0	Breit+Tohra	1984	0	0	
H1	10.02.1981	09.09.1985	4,5941	104	12			iv-Th.	PAW Pseudomonaswirks. Th.			09.09.85	0	Breit+Tohra	1985	1	1	
H1	11.02.1981	17.12.1985	4,8652	113	15			iv-Th.	PAW Pseudomonaswirks. Th.			17.12.85	0	Breit+Tohra	1985	0	0	
H1	12.02.1981	09.02.1987	6,0123	113	15			iv-Th.	ALC Azilocilin	Securopen				0	Breit+Tohra	1987	1	1
H1	14.02.1981	09.02.1987	6,0123	113	15			iv-Th.	PAW Pseudomonaswirks. Th.			09.02.87	0	Breit+Tohra	1987	0	0	
H1	15.02.1981	14.07.1987	6,4367	116	17,1			iv-Th.	ALC Azilocilin	Securopen	400			0	Breit+Tohra	1987	0	0
H1	17.02.1981	09.09.1987	6,5927	117	17			iv-Th.	ALC Azilocilin					0	Breit+Tohra	1987	0	0
H1	19.02.1981	28.12.1987	6,8939	118	20,5			iv-Th.	ALC Azilocilin					0	Breit+Tohra	1987	0	0
H1	13.02.1981	03.02.1987	6,0123	113	15			iv-Th.	TOB Tobramycin	Gernebcin				0	Tohra mono	1987	1	0
H1	16.02.1981	14.07.1987	6,4367	116	17,1			iv-Th.	TOB Tobramycin	Gernebcin	14			0	Tohra mono	1987	0	0
H1	18.02.1981	09.09.1987	6,5927	117	17			iv-Th.	TOB Tobramycin					0	Tohra mono	1987	0	0
H1	20.02.1981	28.12.1987	6,8939	118	20,5			iv-Th.	TOB Tobramycin					0	Tohra mono	1987	0	0
H1	21.02.1981	31.05.1988	7,3183	120	21,8			iv-Th.	ALC Azilocilin	Securopen	8,1			0	Breit+Tohra	1988	1	1
H1	23.02.1981	01.10.1988	7,6550	123	21			iv-Th.	CSU Cefsulodin					0	Cephalo III + Tohra	1988	1	0
H1	22.02.1981	31.05.1988	7,3183	120	21,8			iv-Th.	TOB Tobramycin	Gernebcin	240			0	Tohra mono	1988	1	0
H1	24.02.1981	01.10.1988	7,6550	123	21			iv-Th.	TOB Tobramycin		15			0	Tohra mono	1988	0	0
H1	25.02.1981	10.01.1989	7,9316	124	18,8			iv-Th.	ALC Azilocilin	Securopen				0	Breit+Tohra	1989	1	1
H1	27.02.1981	02.05.1989	8,2382	126	19,5			iv-Th.	CAZ Ceftazidim: Fortum			250	23.09.91	0	Cephalo III + Tohra	1989	1	1
H1	03.03.1981	24.10.1989	8,7173	127	21,1	1,51		iv-Th.	CAZ Ceftazidim: Fortum		200	24.10.89	0	Cephalo III + Tohra	1989	0	0	
H1	05.03.1981	24.10.1989	8,7173	127	21,1	1,51		iv-Th.	CSU Cefsulodin	Gernebcin				0	Tohra mono	1989	1	0
H1	21.03.1981	31.10.1990	9,7358	130	21,1	1,6		iv-Th.	TOB Tobramycin					0	Tohra mono	1989	1	0
H1	28.02.1981	02.05.1989	8,2382	126	19,5			iv-Th.	TOB Tobramycin					0	Tohra mono	1989	0	0
H1	04.03.1981	24.10.1989	8,7173	127	21,1	1,51		iv-Th.	TOB Tobramycin	s:13:3:2:2:231	12	24.10.89	0	Tohra mono	1989	0	0	
H1	18.03.1981	15.08.1990	9,5250					iv-Th.	PAW Pseudomonaswirks. Th.			15.08.90	0	Breit+Tohra	1990	1	1	
H1	09.03.1981	06.02.1990	9,0048	127	20			iv-Th.	CAZ Ceftazidim: Fortum		180			0	Cephalo III + Tohra	1990	1	0
H1	15.03.1981	26.06.1990	9,3881	130	21			iv-Th.	CAZ Ceftazidim: Fortum		150			0	Cephalo III + Tohra	1990	0	0
H1	13.03.1981	06.02.1990	9,7358	130	21,1	1,6		iv-Th.	CAZ Ceftazidim: Fortum	Fortum	14			0	Cephalo III + Tohra	1990	1	0
H1	10.03.1981	06.02.1990	9,0048	127	20			iv-Th.	TOB Tobramycin		20			0	Tohra mono	1990	1	0
H1	16.03.1981	26.06.1990	9,3881	130	21			iv-Th.	TOB Tobramycin		12			0	Tohra mono	1990	0	0
H1	22.03.1981	31.10.1990	9,7358	130	21,1	1,6		iv-Th.	TOB Tobramycin	Gernebcin	0			0	Tohra mono	1990	0	0
H1	24.03.1981	18.01.1991	9,9521					iv-Th.	CAZ Ceftazidim: Fortum		360	17.01.90		0	Cephalo III + Tohra	1991	1	1
H1	31.03.1981	18.06.1991	10,3655	134	24,2			iv-Th.	CAZ Ceftazidim: Fortum		150	18.02.91		0	Cephalo III + Tohra	1991	0	0
H1	04.04.1981	26.07.1991	10,4695	135	22,6			iv-Th.	CAZ Ceftazidim: Fortum		13	28.11.91		0	Cephalo III + Tohra	1991	0	0
H1	09.04.1981	28.11.1991	10,8118	134	24,5			iv-Th.	CAZ Ceftazidim: Fortum		240	28.11.91		0	Cephalo III + Tohra	1991	0	0
H1	25.03.1981	18.01.1991	9,9521					iv-Th.	TOB Tobramycin		14	17.01.90		0	Tohra mono	1991	1	0
H1	28.03.1981	19.02.1991	10,0397	132	22			iv-Th.	TOB Tobramycin			19.02.91		0	Tohra mono	1991	0	0
H1	01.04.1981	18.06.1991	10,3655	134	24,2			iv-Th.	TOB Tobramycin		14	18.02.91		0	Tohra mono	1991	0	0
H1	05.04.1981	26.07.1991	10,4695	135	22,6			iv-Th.	TOB Tobramycin		12	26.07.91		0	Tohra mono	1991	0	0
H1	10.04.1981	28.11.1991	10,8118	134	24,5			iv-Th.	TOB Tobramycin					0	Tohra mono	1991	0	0
H1	18.04.1981	27.01.1992	10,9762	134	23,5			iv-Th.	CAZ Ceftazidim: Fortum		250	27.01.92		0	Cephalo III + Tohra	1992	1	1
H1	22.04.1981	12.03.1992	11,0992	134	25,1			iv-Th.	CAZ Ceftazidim: Fortum		230	12.03.92		0	Cephalo III + Tohra	1992	0	0
H1	28.04.1981	11.04.1992	11,1814	134	26			iv-Th.	CAZ Ceftazidim: Fortum		310	14.04.92		0	Cephalo III + Tohra	1992	0	0
H1	04.05.1981	16.06.1992	11,3621					iv-Th.	CAZ Ceftazidim: Fortum		200	27.05.92		0	Cephalo III + Tohra	1992	0	0
H1	06.05.1981	16.06.1992	11,3621					iv-Th.	CIP Ciprofloxacin: Ciprobay		12	28.06.92		0	Chinolone + Tohra	1992	1	0
H1	17.04.1981	27.01.1992	10,9762	134	23,5			iv-Th.	TOB Tobramycin		14	27.01.92		0	Tohra mono	1992	1	0
H1	23.04.1981	12.03.1992	11,0992	134	25,1			iv-Th.	TOB Tobramycin					0	Tohra mono	1992	0	0
H1	29.04.1981	11.04.1992	11,1814	134	26			iv-Th.	TOB Tobramycin		15	14.04.92		0	Tohra mono	1992	0	0
H1	05.05.1981	16.06.1992	11,3621					iv-Th.	TOB Tobramycin		10	27.05.92		0	Tohra mono	1992	0	0
H10	17.06.66	27.11.1984	18,4476	160	55			iv-Th.	PAW Pseudomonaswirks. Th.			27.11.84	0	Breit+Tohra	1984	1	1	
H10	17.06.66	15.09.1986	20,2464	160	53,6			iv-Th.	PAW Pseudomonaswirks. Th.			15.09.86	0	Breit+Tohra	1986	1	1	
H10	17.06.66	04.02.1992	25,6345	160	53,2			iv-Th.	CEB Cefadroxil: Bidocel, Grü		218	04.02.92		0	Cephalo III + Tohra	1992	1	1
H10	17.06.66	07.12.1994	28,4736	160	53,2			iv-Th.	TOB Tobramycin		12	04.02.92		0	Tohra mono	1992	0	0
H10	17.06.66	16.03.1995	28,7447	160	53,8	3,02		iv-Th.	TOB Tobramycin			07.12.94	0	Tohra mono	1995	1	1	
H10	17.06.66	09.06.1997							PAW udomonaswirksame Therapie		3			0	Breit+Tohra	1997	1	1
H10	17.06.66	18.08.1998							PAW udomonaswirksame Therapie		3			0	Breit+Tohra	1998	1	1
H10	17.06.66	02.08.1999							PAW udomonaswirksame Therapie		2			0	Breit+Tohra	1999	1	1
H10	01.08.2000								PAW udomonaswirksame Therapie					0	Breit+Tohra	2000	1	1
H11	14.11.68	29.10.1984	15,9562					iv-Th.	PAW Pseudomonaswirks. Th.			29.10.84	0	Breit+Tohra	1984	1	1	
H11	14.11.68	21.10.1985	16,9336	167	52,7			iv-Th.	PAW Pseudomonaswirks. Th.			21.10.85	0	Breit+Tohra	1985	1	1	
H11	14.11.68	09.06.1987	18,5654					iv-Th.	ALC Azilocilin					0	Breit+Tohra	1987	1	1
H11	14.11.68	09.06.1987	18,5654					iv-Th.	TOB Tobramycin					0	Tohra mono	1987	1	0
H11	14.11.68	21.11.1988	20,0192	169	58,7	4,15		iv-Th.	ALC Azilocilin					0	Breit+Tohra	1988	1	1
H11	14.11.68	21.11.1988	20,0192	169	58,7	4,15		iv-Th.	TOB Tobramycin	Gernebcin				0	Tohra mono	1988	1	0
H11	14.11.68	06.08.1990	21,8097	168	59			iv-Th.	CAZ Ceftazidim: Fortum		200	21.08.90		0	Cephalo III + Tohra	1990	1	1
H11	14.11.68	03.12.1991	23,0500	168	58,3	4,07		iv-Th.	IMP Imipenem: Zienam			19.11.91		0	Carbapeneme + Tohra	1991	1	1
H11	14.11.68	16.04.1991	22,4175	168	59,1	4,1		iv-Th.	CAZ Ceftazidim: Fortum		250	24.03.91		0	Cephalo III + Tohra	1991	1	0
H11	14.11.68	03.12.1991	23,0500	168	58,3	4,07		iv-Th.	CAZ Ceftazidim: Fortum		2068	19.11.91		0	Cephalo III + Tohra	1991	0	0
H11	14.11.68	03.12.1991	23,0500	168	58,3	4,07		iv-Th.	TOB Tobramycin		12	19.11.91		0	Tohra mono	1991	1	0
H11	14.11.68	24.10.1992	25,6345	168	58,1	4,07		iv-Th.	ALC Azilocilin					0	Breit+Tohra	1992	1	1
H11	14.11.68	20.10.1992	23,9316	168	58,1	4,07		iv-Th.	CAZ Ceftazidim: Fortum		210	25.09.92		0	Cephalo III + Tohra	1992	1	1
H11	14.11.68	09.03.1993	24,3149	168	56	4,04		iv-Th.	CAZ Ceftazidim: Fortum		222	09.03.93		0	Cephalo III + Tohra	1993	1	1
H11	14.11.68	09.03.1993	24,3149	168	56	4,04		iv-Th.	TOB Tobramycin		11,6	09.03.93		0	Tohra mono	1993	1	1
H11	14.11.68	16.03.1994						iv-Th.	PAW Pseudomonaswirks. Th.			16.03.94	0	Breit+Tohra	1994	1	1	
H11	14.11.68	31.01.1994	25,2129	168	52,7	4,05		iv-Th.	CAZ Ceftazidim: Fortum	Fortum 3x	4	03.01.94	0	Cephalo III + Tohra	1994	1	0	
H11	14.11.68	31.01.1994	25,2129	168	52,7	4,05		iv-Th.	TOB Tob									



Patientennummer	Geb. am	Datum	Alt	cm	kg	FEV1s	Form_n	Kode	MedNameDB	Medikation	TagDos	Beginn	Dauerth.	Therapie	Jahr	Anzahl Art	Jahr	Anzahl
H15	18.01.1971	02.06.1989	18,164	167	39,8	3,55	iv-Th.	TOB	Tobramycin	Gernebcin			0	Tobra mono	1989	1	0	0
H15	19.01.1971	01.06.1989	18,3655	168	39,9		iv-Th.	TOB	Tobramycin	Gernebcin			0	Tobra mono	1989	0	0	0
H15	19.01.1971	19.10.1989	18,7488	166	40,5		iv-Th.	TOB	Tobramycin		12	19.10.89	0	Tobra mono	1989	0	0	0
H15	18.01.1971	28.03.1990	19,1869	169			iv-Th.	CAZ	Ceftazidim; Fortum		235	27.03.90	0	Cephalo III + Tobra	1990	1	1	0
H15	19.01.1971	18.03.1990	19,6632	168	37,7		iv-Th.	CAZ	Ceftazidim; Fortum	Fortum	6		0	Cephalo III + Tobra	1990	0	0	0
H15	18.01.1971	28.03.1990	19,1869	168	37,7		iv-Th.	TOB	Tobramycin		14	27.03.90	0	Tobra mono	1990	1	1	0
H15	19.01.1971	18.09.1990	19,6632	168	47,5		iv-Th.	TOB	Tobramycin	Gernebcin	490		0	Tobra mono	1990	0	0	0
H15	18.01.1971	30.07.1991	20,5257	168	47,5		iv-Th.	IMP	Impipenem; Zienam		64	30.07.91	0	Carbapenem + Tobra	1991	1	1	0
H15	19.01.1971	04.04.1991	20,2053	170	48,5		iv-Th.	CAZ	Ceftazidim; Fortum		400	04.04.91	0	Cephalo III + Tobra	1991	1	1	0
H15	19.01.1971	04.04.1991	20,2053	170	48,5		iv-Th.	TOB	Tobramycin		12	04.04.91	0	Tobra mono	1991	1	1	0
H15	18.01.1971	30.07.1991	20,5257	168	47,5		iv-Th.	TOB	Tobramycin		11	30.07.91	0	Tobra mono	1991	0	0	0
H15	19.01.1971	12.08.1992	21,5633	168	46,1		iv-Th.	IMP	Impipenem; Zienam		65	14.08.92	0	Carbapenem + Tobra	1992	1	1	0
H15	18.01.1971	03.06.1992	21,3717	168	46,3	3,55	iv-Th.	GED	Cefadroxil; Bidocof, Grü		200	02.03.92	0	Cephalo III + Tobra	1992	1	1	0
H15	18.01.1971	12.08.1992	21,5633	168	46,1		iv-Th.	CAZ	Ceftazidim; Fortum		260	12.08.92	0	Cephalo III + Tobra	1992	0	0	0
H15	18.01.1971	03.06.1992	21,3717	168	46,3	3,55	iv-Th.	TOB	Tobramycin		12	02.03.92	0	Tobra mono	1992	1	1	0
H15	19.01.1971	12.08.1992	21,5633	168	46,1		iv-Th.	TOB	Tobramycin		12	12.08.92	0	Tobra mono	1992	0	0	0
H15	18.01.1971	09.02.1993	22,0589	168	46,1		iv-Th.	IMP	Impipenem; Zienam		64,5	09.02.93	0	Carbapenem + Tobra	1993	1	1	0
H15	19.01.1971	26.05.1993	22,3463	168	44,2		iv-Th.	CAZ	Ceftazidim; Fortum		219	25.05.93	0	Cephalo III + Tobra	1993	1	1	0
H15	18.01.1971	30.11.1993	22,8638	169	44,6	3,53	iv-Th.	CAZ	Ceftazidim; Fortum	Fortum 3x	11,5	27.10.93	0	Cephalo III + Tobra	1993	0	0	0
H15	18.01.1971	09.02.1993	22,0589	168	46,1		iv-Th.	TOB	Tobramycin		11,7	08.02.93	0	Tobra mono	1993	1	1	0
H15	19.01.1971	25.05.1993	22,3463	168	44,2		iv-Th.	TOB	Tobramycin		11,7	25.05.93	0	Tobra mono	1993	0	0	0
H15	18.01.1971	30.11.1993	22,8638	169	44,6	3,53	iv-Th.	TOB	Tobramycin	Gernebcin 3x	160	27.10.93	0	Tobra mono	1993	0	0	0
H15	18.01.1971	08.04.1994	23,2170	169	43,8	3,5	iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			08.08.94	0	Breit+Tobra	1994	1	1	0
H15	19.01.1971	23.09.1994	23,6769	169	43,5	3,5	iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			13.09.94	0	Breit+Tobra	1994	0	0	0
H15	18.01.1971	03.01.1995	23,9562	169	44,6	3,53	iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			03.01.95	0	Breit+Tobra	1995	1	1	0
H15	18.01.1971	15.03.1995	24,1506	169	44,6	3,53	iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			15.03.95	0	Breit+Tobra	1995	0	0	0
H15	18.01.1971	15.04.1995	24,2355	169	44,6	3,53	iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			15.04.95	0	Breit+Tobra	1995	0	0	0
H16	03.11.82	26.08.1986	3,8111	102	14		iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			26.08.86	0	Breit+Tobra	1986	1	1	0
H16	03.11.82	12.01.1988	5,1910	114	16		iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			12.01.88	0	Breit+Tobra	1988	1	1	0
H16	03.11.82	23.02.2001		167	54,5	2,54		TOB	Tobramycin,Meronom				2	Carbapenem + Tobra	2001	1	1	0
H16	03.11.82	06.03.2001						TOB	Tobramycin,Meronom				2	Carbapenem + Tobra	2001	0	0	0
H16	03.11.82	03.12.2001		167	54,5	3,37		TOB	Tobramycin,Meronom				2	Carbapenem + Tobra	2001	0	0	0
H16	03.11.82	23.05.2002		167	56	3,33		TOB	Tobramycin,Meronom				2	Carbapenem + Tobra	2002	1	1	0
H16	03.11.82	04.11.2002						TOB	Tobramycin,Meronom				2	Carbapenem + Tobra	2002	0	0	0
H17	12.05.1975	08.08.1989	14,2396	157	43		iv-Th.	ALC	Azlocillin	Securopen	15		0	Breit+Tobra	1989	1	1	0
H17	13.05.1975	26.06.1990	15,1211	159	47,8		iv-Th.	ALC	Azlocillin	Securopen	15		0	Breit+Tobra	1990	1	1	0
H17	13.05.1975	26.06.1990	15,1211	159	47,8		iv-Th.	ALC	Azlocillin		390	26.06.90	0	Breit+Tobra	1990	0	0	0
H17	13.05.1975	26.06.1990	15,1211	159	47,8		iv-Th.	TOB	Tobramycin		12	26.06.90	0	Tobra mono	1990	0	0	0
H17	13.05.1975	06.06.1991	16,0657	160	51,7		iv-Th.	ALC	Azlocillin		235	06.06.91	0	Breit+Tobra	1991	1	1	0
H17	13.05.1975	06.06.1991	16,0657	160	51,7		iv-Th.	TOB	Tobramycin		12	06.06.91	0	Tobra mono	1991	1	1	0
H17	10.03.2004	10.03.2004						Gernebcin,Meropenem					1	Carbapenem + Tobra	2004	1	1	0
H17	20.05.2004	20.05.2004						Tobramycin,Meropenem					1	Carbapenem + Tobra	2004	0	0	0
H17	07.09.2004	07.09.2004						Tobramycin,Meropenem					1	Carbapenem + Tobra	2004	0	0	0
H17	20.01.2005	20.01.2005						Tobramycin 1x540mg,Meropenem3x1g					3	Carbapenem + Tobra	2005	0	0	0
H17	08.10.2005	08.10.2005						Tobramycin 1x540mg,Meropenem3x1g					2	Carbapenem + Tobra	2005	0	0	0
H18	15.04.78	20.02.1985	6,8528	122	19,5		iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			20.02.85	0	Breit+Tobra	1985	1	1	0
H18	15.04.78	04.11.1986	8,5558	134	23,1		iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			04.11.86	0	Breit+Tobra	1986	1	1	0
H18	15.04.78	11.01.1988	9,7413	138	24,5	1,82	iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			11.01.88	0	Breit+Tobra	1988	1	1	0
H18	15.04.78	08.06.1988	10,1492	139	25,1		iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			08.06.88	0	Breit+Tobra	1988	0	0	0
H18	15.04.78	11.08.1989	11,2964	144	29,5		iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			11.08.89	0	Breit+Tobra	1989	1	1	0
H18	15.04.78	19.12.1991	13,6783	151	29,4		iv-Th.	CAZ	Ceftazidim; Fortum		300	20.12.91	0	Cephalo III + Tobra	1991	1	1	0
H18	15.04.78	15.08.1992	14,3354	153	30		iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			15.08.92	0	Breit+Tobra	1992	1	1	0
H18	15.04.78	28.08.1992	14,3710	153	30		iv-Th.	CAZ	Ceftazidim; Fortum		220	28.08.92	0	Cephalo III + Tobra	1992	1	1	0
H18	15.04.78	24.09.1993	15,4442	153	30		iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			24.09.93	0	Breit+Tobra	1993	1	1	0
H18	15.04.78	31.05.1994	16,1259	159	30,8		iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			31.05.94	0	Breit+Tobra	1994	1	1	0
H18	15.04.78	09.03.1995	16,8980	152	41,6	2,37	iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			09.03.95	0	Breit+Tobra	1995	1	1	0
H18	15.04.78	19.03.1996	17,9274	153	40,7	2,42	iv-Th.	IMP	Impipenem; Zienam	Zienam		02.96	0	Carbapenem + Tobra	1996	1	1	0
H18	15.04.78	19.03.1996	17,9274	153	40,7	2,42	iv-Th.	CAZ	Ceftazidim; Fortum	Fortum		14.11.95	0	Cephalo III + Tobra	1996	1	1	0
H18	15.04.78	03.07.2003						Tobramycin,Meronom					2	Carbapenem + Tobra	2003	1	1	0
H18	15.04.78	01.10.2003						Tobramycin,Meronom					2	Carbapenem + Tobra	2003	0	0	0
H18	15.04.78	15.01.2004		153	40,5	0,95		Tobramycin,Meronom					2	Carbapenem + Tobra	2004	1	1	0
H18	15.04.78	15.03.2004						Tobramycin,Meronom					2	Carbapenem + Tobra	2004	1	1	0
H18	15.04.78	20.07.2004						Tobramycin,Meronom					2	Carbapenem + Tobra	2004	0	0	0
H18	15.04.78	11.10.2004		153	39	0,86		Tobramycin,Meronom					2	Carbapenem + Tobra	2004	0	0	0
H18	15.04.78	27.01.2005						Tobramycin,Meronom					2	Carbapenem + Tobra	2005	1	1	0
H18	15.04.78	01.04.2005		153	41	0,91		Tobramycin,Meronom					2	Carbapenem + Tobra	2005	0	0	0
H18	15.04.78	01.11.2005						Tobramycin,Meronom					2	Carbapenem + Tobra	2005	0	0	0
H18	15.04.78	01.04.2006						Tobramycin,Meronom					2	Carbapenem + Tobra	2006	1	1	0
H19	02.06.1975	04.11.19																

Patientennummer	Geb. am	Datum	Alt	cm	kg	FEV1s	Form_n	Kode	MedNameDB	Medikation	TagDos	Beginn	Dauerth.	Therapie	Jahr	Anzahl Art	Jahr Anzahl
H21	03.05.78	25.06.1990	12,1451	147	50,8	2,31	iv-Th.	TOB	Tobramycin		12	25.06.90		Tobra mono	1990	1	0
H21	03.05.78	06.05.1991	13,0075	150	54,2	2,43	iv-Th.	CAZ	Ceftazidim: Fortum		150	06.05.91		Cephalo III + Tobra	1991	1	0
H21	03.05.78	28.10.1991	13,4867	152	61	2,53	iv-Th.	CAZ	Ceftazidim: Fortum	Fortum	12			Cephalo III + Tobra	1991	0	0
H21	03.05.78	06.05.1991	13,0075	150	54,2	2,43	iv-Th.	TOB	Tobramycin		150	06.05.91		Tobra mono	1991	1	0
H21	03.05.78	24.01.1992	13,7276	152	65		iv-Th.	CAZ	Ceftazidim: Fortum		150	24.01.92		Cephalo III + Tobra	1992	1	0
H21	03.05.78	19.08.1992	14,2971	160	70		iv-Th.	CAZ	Ceftazidim: Fortum		170	19.08.92		Cephalo III + Tobra	1992	0	0
H21	03.05.78	24.01.1992	13,7276	152	65		iv-Th.	TOB	Tobramycin		130	24.01.92		Tobra mono	1992	1	0
H21	03.05.78	19.08.1992	14,2971	160	70		iv-Th.	TOB	Tobramycin		12	19.08.92		Tobra mono	1992	0	0
H21	03.05.78	16.11.1993	15,5400	162	76,2	3,04	iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			23.09.93	0	Breit+Tobra	1993	1	0
H21	03.05.78	24.02.1993	14,8145	160	72		iv-Th.	CAZ	Ceftazidim: Fortum		210	24.02.93		Cephalo III + Tobra	1993	1	0
H21	03.05.78	24.02.1993	14,8145	160	72		iv-Th.	TOB	Tobramycin		12	24.02.93		Tobra mono	1993	1	0
H21	03.05.78	11.10.1994	16,4408	165	82	3,24	iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			10.06.93	0	Breit+Tobra	1994	1	1
H21	03.05.78	11.04.1995	16,9391	171	82	3,55	iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			22.02.95	0	Breit+Tobra	1995	1	1
H22	01.12.75	01.04.2002							Tobramycin/Meropenem					Carbapeneme + Tobra	2002	1	1
H22	01.12.75	24.05.2004		162	58,6	1,54			Tazobactam,Tobramycin				2	Breit+Tobra	2004	1	1
H22	01.12.75	13.09.2004		162	58	1,63			Tazobactam,Tobramycin				2	Breit+Tobra	2004	0	0
H22	01.12.75	01.12.2004							Tazobactam,Tobramycin				2	Breit+Tobra	2004	0	0
H23	29.11.77	12.11.1984	6,9541	122	20		iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			12.11.84	0	Breit+Tobra	1984	1	1
H23	29.11.77	02.04.1986	8,3395	130	25,4		iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			02.04.86	0	Breit+Tobra	1986	1	1
H23	29.11.77	13.10.1988	10,8720	143	30,3		iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			13.10.88	0	Breit+Tobra	1988	0	0
H23	29.11.77	28.06.1994	16,5777	162	55	2,83	iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			19.04.94	0	Breit+Tobra	1994	1	1
H23	29.11.77	19.06.1995	17,5524	163	53,5		iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			19.06.95	0	Breit+Tobra	1995	1	1
H23	29.11.77	04.12.1995	18,0123	162	56,5	3,35	iv-Th.	CAZ	Ceftazidim: Fortum			25.09.95	0	Cephalo III + Tobra	1995	1	0
H23	29.11.77	04.12.1995	18,0123	162	56,5	3,35	iv-Th.	TOB	Tobramycin			25.09.95	0	Tobra mono	1995	1	0
H23	29.11.77	01.04.1996	18,3381	163	53	3,39	iv-Th.	CAZ	Ceftazidim: Fortum	3x 5 g	15	22.01.96	0	Cephalo III + Tobra	1996	1	1
H23	29.11.77	01.04.1996	18,3381	163	53	3,39	iv-Th.	TOB	Tobramycin	3x 180 mg	540	22.01.96	0	Tobra mono	1996	1	0
H23	29.11.77	01.03.2004		164	49	1,35			Gernebcin,Meropenem					Carbapeneme + Tobra	2004	1	1
H23	29.11.77	01.09.2004		164	48	2,12			Tobramycin,Meropenem				18d	Carbapeneme + Tobra	2004	0	0
H23	29.11.77	13.12.2004		164	47,1	1,75			Tobramycin, Meropenem				16d	Carbapeneme + Tobra	2004	0	0
H23	29.11.77	01.07.2005		163	48	2,09			Tobramycin, Meropenem				2	Carbapeneme + Tobra	2005	1	1
H23	29.11.77	01.04.2005		163	49	1,76			Tobramycin,Ceftazidim				2	Cephalo III + Tobra	2005	1	0
H24	13.12.75	31.07.1995	19,6304	170	41,4	4,27	iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			31.07.95	0	Breit+Tobra	1995	1	0
H24	13.12.75	21.11.1995							Pseudomonaswirks. Th.					Breit+Tobra	1995	0	0
H24	13.12.75	26.04.1996							Pseudomonaswirks. Th.					Breit+Tobra	1996	1	1
H24	13.12.75	30.06.1996							Pseudomonaswirks. Th.					Breit+Tobra	1996	0	0
H24	13.12.75	30.06.1997							ALZ 3x7g,Tobramycin 3x180 mg					Breit+Tobra	1997	1	1
H24	13.12.75	05.11.1997							ALZ 3x7g, TOB 3x 180 mg,gernebcin 80 mg			1.12.1997		Breit+Tobra	1997	0	0
H24	13.12.75	22.02.1998							Pseudomonaswirks. Th.					Breit+Tobra	1998	0	0
H24	13.12.75	03.05.1998							Pseudomonaswirks. Th.					Breit+Tobra	1998	0	0
H24	13.12.75	13.10.1998							Ceftazidim 3x4g,Tobramycin 3x160mg					Cephalo III + Tobra	1998	1	1
H24	13.12.75	01.11.1999							Pseudomonaswirks. Th.					Cephalo III + Tobra	1999	1	1
H24	13.12.75	01.02.2000							Meropenem, Tobramycin, Colistin 2x1Mio IE			28.2.2000		Carbapeneme + Tobra	2000	1	1
H24	13.12.75	01.06.2000							Meropenem, Tobramycin,Colistin 2x1Mio IE			31.6.2000		Carbapeneme + Tobra	2000	0	0
H24	13.12.75	06.10.2000							Tobramycin, Fat,Colistin 2x1Mio IE			20.10.2000		Carbapeneme + Tobra	2000	0	0
H24	13.12.75	19.01.2001		170	50	0,74			Gernebcin, Meropenem,Colistin 2x1Mio IE			22.2.2001		Carbapeneme + Tobra	2001	0	0
H24	13.12.75	20.04.2001							Meropenem, Tobramycin,Colistin 2x1Mio IE	3-160mg		4.5.2001		Carbapeneme + Tobra	2001	0	0
H24	13.12.75	01.12.2001		170	50	0,79			Gernebcin, Meropenem,Colistin 2x1Mio IE					Carbapeneme + Tobra	2001	0	0
H25	02.08.73	30.07.1987	13,9904	152	35		iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			15.07.87	0	Breit+Tobra	1987	1	1
H25	02.08.73	14.08.1995	22,0315	159	48,5	3,13	iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			07.02.95	0	Breit+Tobra	1995	1	1
H26	30.07.68	22.10.1986	17,2293	159			iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			22.10.86	0	Breit+Tobra	1986	1	1
H26	30.07.68	01.04.1987	18,6894	176	68,4		iv-Th.	ALC	Azlocillin	Securopen	215			Breit+Tobra	1987	1	1
H26	30.07.68	01.04.1987	18,6894	176	68,4		iv-Th.	TOB	Tobramycin	Gernebcin	12			Tobra mono	1987	1	1
H26	30.07.68	02.07.1991	22,9213	176	74,7	4,44	iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			15.02.91	0	Breit+Tobra	1991	1	1
H28	13.04.1970	29.04.1983	13,0431	137	21		iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			29.04.83	0	Breit+Tobra	1983	1	1
H28	13.04.1970	16.04.1984	14,0096	141	25		iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			16.04.84	0	Breit+Tobra	1984	1	1
H28	13.04.1970	17.02.1988	17,8480	156	35,5		iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			17.02.88	0	Breit+Tobra	1988	1	1
H28	13.04.1970	22.05.1988	18,1383	157	37,5		iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			15.05.88	0	Breit+Tobra	1988	0	0
H28	13.04.1970	14.11.1988	18,5000	157	40,9		iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			14.11.88	0	Breit+Tobra	1988	0	0
H28	13.04.1970	05.09.1989	19,3977	157	43		iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			05.09.89	0	Breit+Tobra	1989	1	1
H28	13.04.1970	20.03.1990	19,9343	158	42,3		iv-Th.	ALC	Azlocillin		400	20.03.90		Breit+Tobra	1990	1	1
H28	13.04.1970	07.09.1990	20,4025	158	40		iv-Th.	CSU	Cefsulodin					Cephalo III + Tobra	1990	1	0
H28	13.04.1970	20.03.1990	19,9343	158	42,3		iv-Th.	AMN	Amikacin: Biklin		30	20.03.90		Tobra mono	1990	1	0
H28	13.04.1970	22.03.1991	20,9391	158	41,1		iv-Th.	ALC	Azlocillin		40	22.03.91		Breit+Tobra	1991	1	0
H28	13.04.1970	10.10.1991	21,4921	158	38,6		iv-Th.	PIP	Piperacillin			25.09.91		Breit+Tobra	1991	0	0
H28	13.04.1970	19.11.1991	21,6016	158	38,6		iv-Th.	ALC	Azlocillin		450	19.11.91		Breit+Tobra	1991	0	0
H28	13.04.1970	10.10.1991	21,4921	158	38,6		iv-Th.	IMP	Impipenem: Zienam		78	03.10.91		Carbapeneme + Tobra	1991	1	0
H28	13.04.1970	20.06.1991	21,1855	157	40		iv-Th.	CAZ	Ceftazidim: Fortum		195	20.06.91		Cephalo III + Tobra	1991	1	0
H28	13.04.1970	22.03.1991	20,9391	158	41,1		iv-Th.	AMN	Amikacin: Biklin		30	22.03.91		Tobra mono	1991	1	0
H28	13.04.1970	22.03.1991	20,9391	157	40		iv-Th.	AMN	Amikacin: Biklin		18	20.06.91		Tobra mono	1991	0	0
H28	13.04.1970	10.10.1991	21,4921	158	38,6		iv-Th.	TOB	Tobramycin		12	25.09.91		Tobra mono	1991	0	0
H28	13.04.1970	19.11.1991	21,6016	158	38,6		iv-Th.	AMN	Amikacin: Biklin		20	19.11.91		Tobra mono	1991	0	0
H28	13.04.1970	06.05.1992	22,0643				iv-Th.	IMP	Impipenem: Zienam		50	02.04.92					

Patientennummer	Geb. am	Datum	Alt	cm	kg	FEV1s	Form_n	Kode	MedNameDB	Medikation	TagDos	Beginn	Dauerth.	Therapie	Jahr	Anzahl	Art	Jahr	Anzahl	
H31	21.09.80	07.06.1989							Tobramycin 3x140mg, CAZ 3x3g			21.06.1989		Cephalo III + Tobra	1989	1			0	
H31	21.09.80	03.01.2000							Tobramycin 3x160 mg, Meropenem 3x1g			17.01.2000		Carbapeneme + Tobra	2000	1			1	
H31	21.09.80	29.04.2000							Tobramycin 3x160 mg, Meropenem 3x1g			13.05.2000		Carbapeneme + Tobra	2000	0			0	
H31	21.09.80	25.07.2000							Tobramycin 3x160 mg, Meropenem 3x1g					Carbapeneme + Tobra	2000	0			0	
H31	21.09.80	20.10.2000							Tobramycin 3x140mg, CAZ 3x3g			03.11.2000		Cephalo III + Tobra	2000	1			0	
H31	21.09.80	01.02.2001							HIT:Tobramycin, Meropenem					Carbapeneme + Tobra	2001	1			1	
H31	21.09.80	01.07.2001							HIT:Tobramycin, Meropenem					Carbapeneme + Tobra	2001	0			0	
H31	21.09.80	01.10.2001	174	50	0,72				HIT:Tobramycin, Meropenem					Carbapeneme + Tobra	2001	0			0	
H31	21.09.80	01.01.2002							HIT:Tobramycin, Meropenem					Carbapeneme + Tobra	2002	1			1	
H31	21.09.80	04.04.2002							HIT:Tobramycin, Meropenem			18.04.2002		Carbapeneme + Tobra	2002	0			0	
H31	21.09.80	30.07.2002							HIT:Tobramycin, Meropenem			30.07.2002		Carbapeneme + Tobra	2002	0			0	
H32	01.08.1973	06.04.1987	13,6756	153	37			iv-Th.	PAW Pseudomonaswirks. Th.			06.04.88	0	Breit+Tobra	1987	1			1	
H34	16.11.77	28.10.1987	9,9466					iv-Th.	PAW Pseudomonaswirks. Th.			28.10.87	0	Breit+Tobra	1987	1			1	
H34	16.11.77	11.06.1989	11,4825	142	34			iv-Th.	PAW Pseudomonaswirks. Th.			11.06.89	0	Breit+Tobra	1989	1			1	
H35	17.10.75	05.12.1995							Pseudomonaswirksame Therapie					Breit+Tobra	1995	1			1	
H35	17.10.75	21.06.1995							HIT:Pseudomonaswirksame Therapie					Breit+Tobra	1995	0			0	
H35	17.10.75	01.02.1996							Pseudomonaswirksame Therapie					Breit+Tobra	1996	1			1	
H36	18.06.1965	28.03.1987	21,7741	168	40			iv-Th.	CSU Cefsulodin	Pseudocef	100		0	Cephalo III + Tobra	1987	1			1	
H36	17.06.1965	11.08.1987	22,1465	169	42			iv-Th.	CSU Cefsulodin	Pseudocef			0	Cephalo III + Tobra	1987	0			0	
H36	17.06.1965	21.10.1987	22,3409					iv-Th.	CAZ Ceftazidim: Fortum	Fortum			0	Tobra mono	1987	0			0	
H36	18.06.1965	28.03.1987	21,7741	168	40			iv-Th.	Tobramycin	Gernebcin	10		0	Tobra mono	1987	1			1	
H36	17.06.1965	11.08.1987	22,1465	169	42			iv-Th.	Tobramycin		510		0	Tobra mono	1987	0			0	
H36	17.06.1965	21.10.1987	22,3409					iv-Th.	Tobramycin	Gernebcin			0	Tobra mono	1987	0			0	
H36	18.06.1965	16.05.1988	22,9103	165	41,9			iv-Th.	IMP Imipenem: Zienam				0	Carbapeneme + Tobra	1988	1			1	
H36	18.06.1965	27.10.1988	23,3593	168	42,3			iv-Th.	CAZ Ceftazidim: Fortum	Fortum			0	Cephalo III + Tobra	1988	1			1	
H36	18.06.1965	15.05.1989	23,8385	169	43			iv-Th.	Tobramycin	Gernebcin			600	06.06.90	Tobra mono	1990	0			0
H36	18.06.1965	27.10.1988	23,3593	168	42,3			iv-Th.	Tobramycin	Gernebcin			0	Tobra mono	1988	0			0	
H36	17.06.1965	20.04.1989	23,8385	169	43			iv-Th.	ALC Azlocilin	Securopen	15		0	Breit+Tobra	1989	1			1	
H36	18.06.1965	07.10.1989	24,3039	169	45,8			iv-Th.	ALC Azlocilin	Securopen	350	07.10.89	0	Breit+Tobra	1989	0			0	
H36	18.06.1965	03.01.1989	23,5455	168	42			iv-Th.	CAZ Ceftazidim: Fortum	Fortum			0	Cephalo III + Tobra	1989	1			1	
H36	18.06.1965	03.01.1989	23,5455	168	42			iv-Th.	Tobramycin	Gernebcin			0	Tobra mono	1989	1			1	
H36	18.06.1965	20.04.1989	23,8385	169	43			iv-Th.	Tobramycin	Gernebcin	510		0	Tobra mono	1989	0			0	
H36	18.06.1965	07.10.1989	24,3039	169	45,8			iv-Th.	Tobramycin	Gernebcin	12	07.10.89	0	Tobra mono	1989	0			0	
H36	18.06.1965	16.11.1990	25,4127	168	45			iv-Th.	ALC Azlocilin		300	16.11.90	0	Breit+Tobra	1990	1			1	
H36	18.06.1965	11.01.1990	24,5667	169	44,8			iv-Th.	CAZ Ceftazidim: Fortum	Fortum	9		0	Cephalo III + Tobra	1990	1			1	
H36	17.06.1965	06.06.1990	24,9665	169	44			iv-Th.	CAZ Ceftazidim: Fortum	Fortum	9	06.06.90	0	Cephalo III + Tobra	1990	0			0	
H36	18.06.1965	11.01.1990	24,5667	169	44,8			iv-Th.	Tobramycin	Gernebcin	690		0	Tobra mono	1990	1			1	
H36	17.06.1965	06.06.1990	24,9665	169	44			iv-Th.	Tobramycin	Gernebcin	600	06.06.90	0	Tobra mono	1990	0			0	
H36	18.06.1965	16.11.1990	25,4127	168	45			iv-Th.	Tobramycin		12	16.11.90	0	Tobra mono	1990	0			0	
H36	17.06.1965	07.04.1991	25,8289	169	43,4			iv-Th.	CAZ Ceftazidim: Fortum	Fortum	300	17.04.91	0	Cephalo III + Tobra	1991	1			1	
H36	18.06.1965	03.09.1991	26,2094	169	43,4			iv-Th.	CAZ Ceftazidim: Fortum	Fortum	150	04.09.91	0	Cephalo III + Tobra	1991	0			0	
H36	17.06.1965	17.04.1991	25,8289	169	43,4			iv-Th.	Tobramycin		12	17.04.91	0	Tobra mono	1991	1			1	
H36	18.06.1965	03.09.1991	26,2094	169	43,4			iv-Th.	Tobramycin		12	04.09.91	0	Tobra mono	1991	0			0	
H36	17.06.1965	28.08.1992	27,1951	168	45			iv-Th.	CAZ Ceftazidim: Fortum	Fortum	180	28.08.92	0	Cephalo III + Tobra	1992	1			1	
H36	17.06.1965	28.08.1992	27,1951	168	45			iv-Th.	Tobramycin		10	28.08.92	0	Tobra mono	1992	0			0	
H36	18.06.1965	18.08.1993	28,1670	168	47,3	3,92		iv-Th.	CAZ Ceftazidim: Fortum		15	15.06.93	0	Cephalo III + Tobra	1993	1			1	
H36	17.06.1965	20.01.1993	27,5921	167	45,8			iv-Th.	CIP Ciprofloxacin: Ciprobay		12,6	20.01.93	0	Chinolone + Tobra	1993	1			1	
H36	17.06.1965	20.01.1993	27,5921	167	45,8			iv-Th.	Tobramycin		11,4	20.01.93	0	Tobra mono	1993	1			1	
H36	18.06.1965	18.08.1993	28,1670	168	47,3	3,92		iv-Th.	Tobramycin			15,06.93	0	Tobra mono	1993	0			0	
H36	18.06.1965	18.08.1993	28,1670	168	47,3	3,92		iv-Th.	Tobramycin	Tob		26,07.93	0	Tobra mono	1993	0			0	
H4	21.02.1977	07.04.1987	9,1472	186	61	4,87		iv-Th.	PAW Pseudomonaswirks. Th.					Breit+Tobra	1987	1			1	
H4	22.02.1977	07.06.1983	6,2861	112	16			iv-Th.	PAW Pseudomonaswirks. Th.					Breit+Tobra	1983	1			1	
H4	21.02.1977	07.05.1984	7,2033	119	17,7			iv-Th.	PAW Pseudomonaswirks. Th.					Breit+Tobra	1984	1			1	
H4	21.02.1977	20.03.1985	8,0712	124	20,2			iv-Th.	PAW Pseudomonaswirks. Th.					Breit+Tobra	1985	1			1	
H4	21.02.1977	25.08.1986	9,5031	132	21,3			iv-Th.	PAW Pseudomonaswirks. Th.					Breit+Tobra	1986	1			1	
H4	22.02.1977	10.12.1986	9,7980	132	21,9			iv-Th.	PAW Pseudomonaswirks. Th.					Breit+Tobra	1986	0			0	
H4	22.02.1977	02.04.1987	10,2724	135	22			iv-Th.	ALC Azlocilin		9	10.12.86	0	Breit+Tobra	1986	1			1	
H4	22.02.1977	29.09.1987	10,5982	135	22,3			iv-Th.	ALC Azlocilin		250		0	Breit+Tobra	1987	0			0	
H4	22.02.1977	02.06.1987	10,2724	135	22			iv-Th.	Tobramycin		240		0	Tobra mono	1987	1			1	
H4	22.02.1977	29.09.1987	10,5982	135	22,3			iv-Th.	Tobramycin		12		0	Tobra mono	1987	0			0	
H4	22.02.1977	11.02.1988	10,9678	136	22,9			iv-Th.	PAW Pseudomonaswirks. Th.			11.02.88	0	Breit+Tobra	1988	1			1	
H4	22.02.1977	18.04.1988	11,1513	137	23	1,79		iv-Th.	PAW Pseudomonaswirks. Th.			18.04.88	0	Breit+Tobra	1988	0			0	
H4	22.02.1977	25.03.1988	11,5044	137	23,1			iv-Th.	PAW Pseudomonaswirks. Th.			25.08.88	0	Breit+Tobra	1988	0			0	
H4	22.02.1977	22.08.1988	11,5811	137	24,1	1,82		iv-Th.	ALC Azlocilin					Breit+Tobra	1988	0			0	
H4	22.02.1977	22.09.1988	11,5811	137	24,1	1,82		iv-Th.	CSU Cefsulodin					Cephalo III + Tobra	1988	1			1	
H4	22.02.1977	22.09.1988	11,5811	137	24,1	1,82		iv-Th.	Tobramycin					Tobra mono	1988	1			1	
H4	21.02.1977	18.11.1989	12,7365					iv-Th.	PAW Pseudomonaswirks. Th.			18.11.89	0	Breit+Tobra	1989	1			1	
H4	22.02.1977	18.07.1989	12,3997	138	23,9			iv-Th.	IMP Imipenem: Zienam				0	Carbapeneme + Tobra	1989	1			1	
H4	22.02.1977	25.09.1989																		

Patientennummer	Geb. am	Datum	Alt	cm	kg	FEV1s	Form_n	Kode	MedNameDB	Medikation	TagDos	Beginn	Dauerth.	Therapie	Jahr	Anzahl Art	Jahr Anzahl	
H6	04.01.87	02.10.2003	16,7420	166	50,7	3,02	iv-Th.	CAZ	Ceftazidim: Fortum	Ceftazidim		04.08.03	0	Cephalo III + Tobra	2003	0	0	
H6	04.01.87	24.03.2003	16,2163	166	46,4	3,01	iv-Th.	TOB	Tobramycin	Tobramycin		29.01.03	0	Tobra mono	2003	1	0	
H6	04.01.87	02.10.2003	16,7420	166	50,7	3,02	iv-Th.	TOB	Tobramycin	Tobramycin		04.08.03	0	Tobra mono	2003	0	0	
H6	04.01.87	15.01.2004	17,0294	166	52,8	3,02	iv-Th.	CAZ	Ceftazidim: Fortum	Ceftazidim		14.11.03	0	Cephalo III + Tobra	2004	1	1	
H6	04.01.87	22.04.2004	17,2977	167	52,4	3,07	iv-Th.	CAZ	Ceftazidim: Fortum	Ceftazidim		23.02.04	0	Cephalo III + Tobra	2004	0	0	
H6	04.01.87	23.08.2004	17,6345	167	55,4		iv-Th.	CAZ	Ceftazidim: Fortum	Ceftazidim		21.06.04	0	Cephalo III + Tobra	2004	0	0	
H6	04.01.87	13.12.2004	17,9411	167	52		iv-Th.	CAZ	Ceftazidim: Fortum	Fortum		20.10.04	0	Cephalo III + Tobra	2004	0	0	
H6	04.01.87	15.01.2004	17,0294	166	52,8	3,02	iv-Th.	TOB	Tobramycin	Tobramycin		14.11.03	0	Tobra mono	2004	1	0	
H6	04.01.87	22.04.2004	17,2977	167	52,4	3,07	iv-Th.	TOB	Tobramycin	Tobramycin		23.02.04	0	Tobra mono	2004	0	0	
H6	04.01.87	23.08.2004	17,6345	167	55,4		iv-Th.	TOB	Tobramycin	Tobramycin		21.06.04	0	Tobra mono	2004	0	0	
H6	04.01.87	13.12.2004	17,9411	167	52		iv-Th.	TOB	Tobramycin	Tobramycin		20.10.04	0	Tobra mono	2004	0	0	
H7	27.09.77	09.07.1985	7,7810	130	24,9		iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			09.07.85	0	Breit+Tobra	1985	1	1	
H7	27.09.77	24.06.1986	8,7392	133	27		iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			24.06.86	0	Breit+Tobra	1986	1	1	
H7	27.09.77	21.04.1997							Gernebcin, Fortum			2	Tobra mono	1997	1	1		
H7	27.09.77	24.03.1999							Gernebcin, Fortum			2	Tobra mono	1999	1	1		
H7	27.09.77	24.07.2000							Gernebcin, Fortum			2	Tobra mono	2000	1	1		
H7	27.09.77	04.08.2005							Meronein, Tobramycin			10 d	Carbapeneme + Tobra	2005	1	1		
H8	05.12.68	15.07.1985	16,6078	162	54		iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			15.07.85	0	Breit+Tobra	1985	1	1	
H8	05.12.68	28.09.1987	18,8118	163	60,7		iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			28.09.87	0	Breit+Tobra	1987	1	1	
H8	05.12.68	28.05.1989	20,4709	162	61		iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			28.05.89	0	Breit+Tobra	1989	1	1	
H8	05.12.68	23.05.1991	22,4613	162	62,5	3,25	iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			01.04.91	0	Breit+Tobra	1991	1	1	
H8	05.12.68	28.09.1992	23,8138	162	64		iv-Th.	FLU	Flucloxacilin: Staphylex		55	29.09.92		Carbencilline + Tobra	1992	1	1	
H8	05.12.68	28.09.1992	23,8138	162	64		iv-Th.	CAZ	Ceftazidim: Fortum		218	29.09.92		Cephalo III + Tobra	1992	1	0	
H8	05.12.68	28.09.1992	23,8138	162	64		iv-Th.	TOB	Tobramycin		12	29.09.92		Tobra mono	1992	1	0	
H8	05.12.68	15.11.1993	24,9446	162	56		iv-Th.	CAZ	Ceftazidim: Fortum		3x	4	25.10.93	0	Cephalo III + Tobra	1993	1	1
H8	05.12.68	15.11.1993	24,9446	162	56		iv-Th.	TOB	Tobramycin		3x	180	25.10.93	0	Tobra mono	1993	1	0
H8	05.12.68	15.09.1995	26,7762				iv-Th.	PAW	Pseudomonaswirks. Th.			15.09.95	0	Breit+Tobra	1995	1	1	
H8	05.12.68	26.09.1995							Pseudomonaswirks. Th.			2	Breit+Tobra	1995	0	0		
H8	05.12.68	20.02.1997							Pseudomonaswirks. Th.			2	Breit+Tobra	1997	1	1		
H8	05.12.68	23.10.1997							Pseudomonaswirks. Th.			2	Breit+Tobra	1997	0	0		
H8	05.12.68	01.03.1999							Gernebcin, Fortum			2	Breit+Tobra	1999	1	1		
H8	05.12.68	03.04.2000							Gernebcin, Fortum			2	Breit+Tobra	2000	1	1		
H8	05.12.68	15.03.2001							Gernebcin, Fortum			10d	Breit+Tobra	2001	1	1		
H8	05.12.68	01.04.2002							Meronein 3x 1g, Gernebcin 3x160 mg			2	Carbapeneme + Tobra	2002	1	1		
H8	05.12.68	01.03.2003		163	60,5	1,18			Tobramycin, Meronein			2	Carbapeneme + Tobra	2003	1	1		
H8	05.12.68	11.03.2004							Meropenem, Tobramycin			2	Carbapeneme + Tobra	2004	1	1		
H8	05.12.68	01.10.2004		163	60	1,22			Meropenem, Tobramycin			2	Carbapeneme + Tobra	2004	0	0		
H8	05.12.68	14.01.2005							Meropenem, Tobramycin			7d	Carbapeneme + Tobra	2005	1	1		
H9	06.04.79	08.02.1991	11,8439	142	32		iv-Th.	ALC	Aztiollin		500	08.02.91		Breit+Tobra	1991	1	1	
H9	06.04.79	21.04.1997		51	179	2,81			HIT: Fortum, Tobramycin			2	Tobra mono	1997	1	1		
H9	06.04.79	22.03.1999							HIT: Fortum, Tobramycin			2	Tobra mono	1999	1	1		
H9	06.04.79	10.08.2004		60	179	1,69			Meronein, Tobramycin			2	Carbapeneme + Tobra	2004	1	1		
H9	06.04.79	16.02.2005		64	179	1,9			Meropenem, Tobramycin			2	Carbapeneme + Tobra	2005	1	1		
H9	06.04.79	01.02.2006							Tobramycin, Fortum			2	Tobra mono	2006	1	1		

## Anzahl der Therapien pro Patient nur in 5 Jahresintervallen verfügbar

Patientennummer	Jahr	Carbencilline +		Cephalosporine III.		Monobactame +	Carbapeneme +	Chinoline +	Tobramycin
		Tobra	Breitspektrantibiotika + Tobra	Generation + Tobra	Tobra	Tobra	Tobra	mono	
K1	1977	0,33	0,17	1,83					1,50
K1	1978	0,33	0,17	1,83					1,50
K1	1979	0,33	0,17	1,83					1,50
K1	1980	0,33	0,17	1,83					1,50
K1	1981	0,33	0,17	1,83					1,50
K1	1982	0,33	0,17	1,83					1,50
K1	1983		0,17	2,67		1,33	0,50	0,67	
K1	1984		0,17	2,67		1,33	0,50	0,67	
K1	1985		0,17	2,67		1,33	0,50	0,67	
K1	1986		0,17	2,67		1,33	0,50	0,67	
K1	1987		0,17	2,67		1,33	0,50	0,67	
K1	1988		0,17	2,67		1,33	0,50	0,67	
K1	1989			3,20			1,20	1,20	
K1	1990			3,20			1,20	1,20	
K1	1991			3,20			1,20	1,20	
K1	1992			3,20			1,20	1,20	
K1	1993			3,20			1,20	1,20	
K1	1994			4,00			2,20		
K1	1995			4,00			2,20		
K1	1996			4,00			2,20		
K1	1997			4,00			2,20		
K1	1998			4,00			2,20		
K1	1999			4,00			2,20		
K1	2000			0,33					
K1	2001			0,33					
K1	2002			0,33					
K1	2003			0,33					
K1	2004			0,33					
K1	2005			0,33					
K10	1980	0,33	1,00	0,83					0,67
K10	1981	0,33	1,00	0,83					0,67
K10	1982	0,33	1,00	0,83					0,67
K10	1983	0,33	1,00	0,83					0,67
K10	1984	0,33	1,00	0,83					0,67
K10	1985	0,33	1,00	0,83					0,67
K10	1986		0,20	0,80		0,80	1,00	1,80	0,60
K10	1987		0,20	0,80		0,80	1,00	1,80	0,60
K10	1988		0,20	0,80		0,80	1,00	1,80	0,60
K10	1989		0,20	0,80		0,80	1,00	1,80	0,60
K10	1990		0,20	0,80		0,80	1,00	1,80	0,60
K10	1991		0,40	1,20		1,20	0,40	1,80	0,20
K10	1992		0,40	1,20		1,20	0,40	1,80	0,20
K10	1993		0,40	1,20		1,20	0,40	1,80	0,20
K10	1994		0,40	1,20		1,20	0,40	1,80	0,20
K10	1995		0,40	1,20		1,20	0,40	1,80	0,20
K11	1979	0,50	0,67	0,67					1,17
K11	1980	0,50	0,67	0,67					1,17
K11	1981	0,50	0,67	0,67					1,17
K11	1982	0,50	0,67	0,67					1,17
K11	1983	0,50	0,67	0,67					1,17
K11	1984	0,50	0,67	0,67					1,17
K11	1985			1,00		1,80	0,40	1,00	
K11	1986			1,00		1,80	0,40	1,00	
K11	1987			1,00		1,80	0,40	1,00	
K11	1988			1,00		1,80	0,40	1,00	
K11	1989			1,00		1,80	0,40	1,00	
K11	1990			0,60		1,00	0,60	2,20	0,40
K11	1991			0,60		1,00	0,60	2,20	0,40
K11	1992			0,60		1,00	0,60	2,20	0,40
K11	1993			0,60		1,00	0,60	2,20	0,40
K11	1994			0,60		1,00	0,60	2,20	0,40
K11	1995		1,33	2,00			1,83		
K11	1996		1,33	2,00			1,83		
K11	1997		1,33	2,00			1,83		
K11	1998		1,33	2,00			1,83		
K11	1999		1,33	2,00			1,83		
K11	2000		1,33	2,00			1,83		
K12	1970	0,67							0,33
K12	1971	0,67							0,33
K12	1972	0,67							0,33
K12	1973	0,67							0,33
K12	1974	0,67							0,33
K12	1975	0,67							0,33
K12	1976	1,80	0,20	0,40					1,20
K12	1977	1,80	0,20	0,40					1,20
K12	1978	1,80	0,20	0,40					1,20
K12	1979	1,80	0,20	0,40					1,20
K12	1980	1,80	0,20	0,40					1,20
K12	1981	1,00	1,40	1,60				0,40	
K12	1982	1,00	1,40	1,60				0,40	
K12	1983	1,00	1,40	1,60				0,40	
K12	1984	1,00	1,40	1,60				0,40	
K12	1985	1,00	1,40	1,60				0,40	
K12	1986			1,80		1,20	0,60	2,20	
K12	1987			1,80		1,20	0,60	2,20	
K12	1988			1,80		1,20	0,60	2,20	
K12	1989			1,80		1,20	0,60	2,20	
K12	1990			1,80		1,20	0,60	2,20	
K12	1991			3,20		2,00	1,67	2,60	
K12	1992			3,20		2,00	1,67	2,60	
K12	1993			3,20		2,00	1,67	2,60	
K12	1994			3,20		2,00	1,67	2,60	
K12	1995			3,20		2,00	1,67	2,60	
K12	1996			0,17		0,20	0,40	1,60	
K12	1997			0,17		0,20	0,40	1,60	
K12	1998			0,17		0,20	0,40	1,60	
K12	1999			0,17		0,20	0,40	1,60	
K12	2000			0,17		0,20	0,40	1,60	
K2	1972	1,40							0,40
K2	1973	1,40							0,40

Anzahl der Therapien pro Patient nur in 5 Jahresintervallen verfügbar

Patientennummer	Jahr	Carbencilline +		Breitspektrumentibiotika + Tobra	Cephalosporine III.	Monobactame +	Carbapeneme +	Chinoline +	Tobramycin
		Tobra			Generation + Tobra	Tobra	Tobra	Tobra	mono
K2	1974	1,40							0,40
K2	1975	1,40							0,40
K2	1976	1,40							0,40
K2	1977	1,50	0,33		1,17				0,50
K2	1978	1,50	0,33		1,17				0,50
K2	1979	1,50	0,33		1,17				0,50
K2	1980	1,50	0,33		1,17				0,50
K2	1981	1,50	0,33		1,17				0,50
K2	1982	0,40	0,20		1,60	0,20	0,20	1,60	1,00
K2	1983	0,40	0,20		1,60	0,20	0,20	1,60	1,00
K2	1984	0,40	0,20		1,60	0,20	0,20	1,60	1,00
K2	1985	0,40	0,20		1,60	0,20	0,20	1,60	1,00
K2	1986	0,40	0,20		1,60	0,20	0,20	1,60	1,00
K2	1987				1,17	1,17	0,17	3,00	
K2	1988				1,17	1,17	0,17	3,00	
K2	1989				1,17	1,17	0,17	3,00	
K2	1990				1,17	1,17	0,17	3,00	
K2	1991				1,17	1,17	0,17	3,00	
K2	1992				1,17	1,17	0,17	3,00	
K2	1993					0,20	2,80	1,60	
K2	1994					0,20	2,80	1,60	
K2	1995					0,20	2,80	1,60	
K2	1996					0,20	2,80	1,60	
K2	1997					0,20	2,80	1,60	
K2	1998						1,20	0,20	
K2	1999						1,20	0,20	
K2	2000						1,20	0,20	
K2	2001						1,20	0,20	
K2	2002						1,20	0,20	
K4	1976	0,67	0,17		0,50				2,17
K4	1977	0,67	0,17		0,50				2,17
K4	1978	0,67	0,17		0,50				2,17
K4	1979	0,67	0,17		0,50				2,17
K4	1980	0,67	0,17		0,50				2,17
K4	1981	0,67	0,17		0,50				2,17
K4	1982		0,50		3,75				
K4	1983		0,50		3,75				
K4	1984		0,50		3,75				
K4	1985		0,50		3,75				
K4	1986				3,00	1,80		1,40	
K4	1987				3,00	1,80		1,40	
K4	1988				3,00	1,80		1,40	
K4	1989				3,00	1,80		1,40	
K4	1990				3,00	1,80		1,40	
K4	1991				2,20	5,20	5,40	4,80	
K4	1992				2,20	5,20	5,40	4,80	
K4	1993				2,20	5,20	5,40	4,80	
K4	1994				2,20	5,20	5,40	4,80	
K4	1995				2,20	5,20	5,40	4,80	
K4	1996					2,20	2,60	1,40	
K4	1997					3,20	2,60	1,40	
K4	1998					4,20	2,60	1,40	
K4	1999					5,20	2,60	1,40	
K4	2000					2,20	2,60	1,40	
K5	1976	2,33	0,17		1,00				0,83
K5	1977	2,33	0,17		1,00				0,83
K5	1978	2,33	0,17		1,00				0,83
K5	1979	2,33	0,17		1,00				0,83
K5	1980	2,33	0,17		1,00				0,83
K5	1981	2,33	0,17		1,00				0,83
K5	1982		0,40		2,40	0,60	0,40	0,60	
K5	1983		0,40		2,40	0,60	0,40	0,60	
K5	1984		0,40		2,40	0,60	0,40	0,60	
K5	1985		0,40		2,40	0,60	0,40	0,60	
K5	1986		0,40		2,40	0,60	0,40	0,60	
K5	1987				1,50	0,83	2,00	1,33	
K5	1988				1,50	0,83	2,00	1,33	
K5	1989				1,50	0,83	2,00	1,33	
K5	1990				1,50	0,83	2,00	1,33	
K5	1991				1,50	0,83	2,00	1,33	
K5	1992				1,50	0,83	2,00	1,33	
K5	1993				0,67		3,00	0,33	
K5	1994				0,67		3,00	0,33	
K5	1995				0,67		3,00	0,33	
K5	1996				0,67		3,00	0,33	
K5	1997				0,67		3,00	0,33	
K5	1998				0,67		3,00	0,33	
K5	1999				1,00		0,83		
K5	2000				1,00		0,83		
K5	2001				1,00		0,83		
K5	2002				1,00		0,83		
K5	2003				1,00		0,83		
K5	2004				1,00		0,83		
K6	1972	0,25			0,13				1,38
K6	1973	0,25			0,13				1,38
K6	1974	0,25			0,13				1,38
K6	1975	0,25			0,13				1,38
K6	1976	0,25			0,13				1,38
K6	1977	0,25			0,13				1,38
K6	1978	0,25			0,13				1,38
K6	1979	0,25			0,13				1,38
K6	1980		0,33		2,17			0,50	0,83
K6	1981		0,33		2,17			0,50	0,83
K6	1982		0,33		2,17			0,50	0,83
K6	1983		0,33		2,17			0,50	0,83
K6	1984		0,33		2,17			0,50	0,83
K6	1985		0,33		2,17			0,50	0,83
K6	1986				0,50	2,00	0,17	1,67	0,17
K6	1987				0,50	2,00	0,17	1,67	0,17
K6	1988				0,50	2,00	0,17	1,67	0,17

Anzahl der Therapien pro Patient nur in 5 Jahresintervallen verfügbar

Patientennummer	Jahr	Carbencilline +		Cephalosporine III.	Monobactame +	Carbapeneme +	Chinoline +	Tobramycin
		Tobra	Breitspektrantibiotika + Tobra	Generation + Tobra	Tobra	Tobra	Tobra	mono
K6	1989			0,50	2,00	0,17	1,67	0,17
K6	1990			0,50	2,00	0,17	1,67	0,17
K6	1991			0,50	2,00	0,17	1,67	0,17
K6	1992			0,50		4,00	0,67	0,17
K6	1993			0,50		4,00	0,67	0,17
K6	1994			0,50		4,00	0,67	0,17
K6	1995			0,50		4,00	0,67	0,17
K6	1996			0,50		4,00	0,67	0,17
K6	1997			0,50		4,00	0,67	0,17
K6	1998			0,33		5,00		
K6	1999			0,33		5,00		
K6	2000			0,33		5,00		
K7	1978	0,50	0,50	2,17				
K7	1979	0,50	0,50	2,17				
K7	1980	0,50	0,50	2,17				
K7	1981	0,50	0,50	2,17				
K7	1982	0,50	0,50	2,17				
K7	1983	0,50	0,50	2,17				
K7	1984	0,20	1,40	0,80	1,00	0,20	1,20	
K7	1985	0,20	1,40	0,80	1,00	0,20	1,20	
K7	1986	0,20	1,40	0,80	1,00	0,20	1,20	
K7	1987	0,20	1,40	0,80	1,00	0,20	1,20	
K7	1988	0,20	1,40	0,80	1,00	0,20	1,20	
K7	1989			0,80	1,80		3,20	
K7	1990			0,80	1,80		3,20	
K7	1991			0,80	1,80		3,20	
K7	1992			0,80	1,80		3,20	
K7	1993			0,80	1,80		3,20	
K7	1994			3,20	0,20	0,60	1,60	
K7	1995			3,20	0,20	0,60	1,60	
K7	1996			3,20	0,20	0,60	1,60	
K7	1997			3,20	0,20	0,60	1,60	
K7	1998			3,20	0,20	0,60	1,60	
K8	1978	0,83	0,17	1,67	0,17			0,50
K8	1979	0,83	0,17	1,67	0,17			0,50
K8	1980	0,83	0,17	1,67	0,17			0,50
K8	1981	0,83	0,17	1,67	0,17			0,50
K8	1982	0,83	0,17	1,67	0,17			0,50
K8	1983	0,83	0,17	1,67	0,17			0,50
K8	1984			0,60	1,20	0,20	0,60	
K8	1985			0,60	1,20	0,20	0,60	
K8	1986			0,60	1,20	0,20	0,60	
K8	1987			0,60	1,20	0,20	0,60	
K8	1988			0,60	1,20	0,20	0,60	
K8	1989			1,40	0,40	1,33	0,40	
K8	1990			1,40	0,40	1,33	0,40	
K8	1991			1,40	0,40	1,33	0,40	
K8	1992			1,40	0,40	1,33	0,40	
K8	1993			1,40	0,40	1,33	0,40	
K8	1994			1,00		1,50		0,33
K8	1995			1,00		1,50		0,33
K8	1996			1,00		1,50		0,33
K8	1997			1,00		1,50		0,33
K8	1998			1,00		1,50		0,33
K8	1999			1,00		1,50		0,33
K8	2000					0,17	0,17	0,17
K8	2001					0,17	0,17	0,17
K8	2002					0,17	0,17	0,17
K8	2003					0,17	0,17	0,17
K8	2004					0,17	0,17	0,17
K9	1979	0,67	0,83	0,67		0,17		1,00
K9	1980	0,67	0,83	0,67		0,17		1,00
K9	1981	0,67	0,83	0,67		0,17		1,00
K9	1982	0,67	0,83	0,67		0,17		1,00
K9	1983	0,67	0,83	0,67		0,17		1,00
K9	1984	0,67	0,83	0,67		0,17		1,00
K9	1985			0,60	2,20		0,60	0,20
K9	1986			0,60	2,20		0,60	0,20
K9	1987			0,60	2,20		0,60	0,20
K9	1988			0,60	2,20		0,60	0,20
K9	1989			0,60	2,20		0,60	0,20
K9	1990			0,17	1,33	1,67	2,67	
K9	1991			0,17	1,33	1,67	2,67	
K9	1992			0,17	1,33	1,67	2,67	
K9	1993			0,17	1,33	1,67	2,67	
K9	1994			0,17	1,33	1,67	2,67	
K9	1995			0,17	1,33	1,67	2,67	
K9	1996			0,20		1,80	0,80	
K9	1997			0,20		1,80	0,80	
K9	1998			0,20		1,80	0,80	
K9	1999			0,20		1,80	0,80	