

Aus dem Institut für Medizinische
Mikrobiologie und Hygiene der Universität Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. I. B. Autenrieth

Einfluss von LPS-Modifikationen bei *Pseudomonas
aeruginosa* auf die Phagozytose und das intrazelluläre
Abtöten durch polymorphkernige neutrophile Granulozyten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Anne-Katrin Maier
aus
Freiburg i. Br.

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Döring

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Götz

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	CYSTISCHE FIBROSE.....	1
1.2	PSEUDOMONAS AERUGINOSA.....	3
1.3	DAS LIPOPOLYSACCHARID	4
1.4	FUNKTION VON POLYMORPHKERNIGEN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN (PMN) BEI CHRONISCH PULMONALER INFEKTION MIT P. AERUGINOSA.....	7
1.5	ZIELSETZUNG DER STUDIE.....	8
2.	MATERIAL UND METHODEN	10
2.1	CHEMIKALIEN	10
2.2	GERÄTE	10
2.3	MEDIEN UND STAMMLÖSUNGEN	11
2.4	BAKTERIENSTÄMME UND INKUBATION	12
2.4.1	<i>Beschreibung der P. aeruginosa-Isolate</i>	<i>12</i>
2.4.2	<i>Chemische Struktur der modifizierten Lipopolysaccharide... ..</i>	<i>13</i>
2.4.3	<i>Kultivierung von P. aeruginosa</i>	<i>14</i>
2.5	NACHWEIS VON ALGINAT MITTELS INDIREKTER IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG.....	15
2.6	ISOLIERUNG POLYMORPHKERNIGER NEUTROPHILER GRANULOZYTEN (PMN).....	17
2.7	PHAGOZYTSE-EXPERIMENTE UNTER AEROBEN UND ANAEROBEN BEDINGUNGEN.....	18
2.8	INKUBATION DER STÄMME CF1-4 UND CF6 UNTER ANAEROBEN BEDINGUNGEN NACH ZUGABE VON NITRAT	21
2.9	PHAGOZYTSE UNTER AEROBEN BEDINGUNGEN NACH ZUGABE VON DPI	21
2.10	CYTOCHROM C-TEST	22
3.	ERGEBNISSE	25
3.1	INDIREKTE IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG ZUM ALGINATNACHWEIS IN ÜBERNACHT- UND TAGKULTUREN VON P. AERUGINOSA.....	25
3.2	EINFLUSS VON LPS-MODIFIKATIONEN AUF DIE PHAGOZYTSE UND DAS AB- TÖTEN DURCH PMN UNTER AEROBEN UND ANAEROBEN BEDINGUNGEN ...	26

3.3	ALGINATPRODUKTION WÄHREND DER PHAGOZYTÖSE-EXPERIMENTE UNTER ANAEROBEN BEDINGUNGEN	28
3.4	ZUGABE VON NITRAT HAT KEINEN EINFLUSS AUF DIE PRODUKTION VON ALGINAT.....	29
3.5	EINFLUSS VON LPS-MODIFIKATIONEN AUF DIE PHAGOZYTÖSE UND DAS ABTÖTEN DURCH PMN NACH ZUGABE VON DPI UNTER AEROBEN BEDINGUNGEN.....	31
4.	DISKUSSION.....	33
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	41
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	43

1. EINLEITUNG

1.1 Cystische Fibrose

Mit einer Häufigkeit von 1:2500 gilt die cystische Fibrose (CF), auch Mukoviszidose genannt, als schwerwiegendste autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung in der kaukasischen Bevölkerung. Die Heterozygotenrate beträgt hierbei 1 auf 25. Das auf dem langen Arm von Chromosom 7 liegende betroffene Gen ist 250 kb groß und beinhaltet 27 Exons (*Riordan et al., 1989; Rommens et al., 1989*). Es codiert für ein Protein, welches die Bezeichnung cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) trägt. CFTR gehört zur Gruppe der ATP-bindenden Proteine (*Higgins, 1992*) und besteht aus zwei mal sechs transmembranösen Segmenten, die durch eine intrazelluläre Domäne verbunden sind (*Chang et al., 1994*). Es steuert als Ionen-Kanal (*Bear et al., 1992*) in der apikalen Membran von Epithelzellen den Chlorid-Transport durch die Zellmembran (*Davis et al., 1996*) und reguliert epitheliale Natrium-Kanäle (*Boucher, 2004*). Derzeit sind über 1000 Mutationen des CFTR-Gens bekannt, wobei das Krankheitsbild je nach Mutation unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann (*Davis et al., 1996*). Selbst Patienten, die für die gleiche Mutation homozygot sind, weisen unterschiedliche Schweregrade der Erkrankung auf (*Kerem et al., 1990*). CFTR-Mutationen werden in fünf verschiedene Klassen unterteilt (*Ratjen et Döring, 2003*). Die häufigste Mutation (sie wurde bei nahezu 70% der mutierten Allele identifiziert) ist eine Deletion von drei Basenpaaren an der Position 508 (F508del) in der Aminosäurekette des Proteins (*Kerem et al., 1989*) und gehört zur zweiten Klasse der CFTR-Mutationen, welche ein fehlerhaftes Verarbeiten der genetischen Information beschreibt. Die drei fehlenden Basenpaare codieren für die Aminosäure Phenylalanin, die in der ATP-bindenden Domäne des Transmembranproteins CFTR liegt. Fehlt Phenylalanin, wird das Protein falsch gefaltet, nicht mehr glykosyliert und proteolytisch gespalten (*Döring et Ratjen, 2004*). CF-Patienten mit dieser Mutation besitzen daher kein CFTR in der apikalen Membran der Epithelzellen. Dieser Ausfall hat eine vermehrte

Natriumresorption zur Folge und führt zu Chloridretention in den betroffenen Zellen (*Boucher, 2004*).

Ursache für das Krankheitsbild der zystischen Fibrose ist folglich ein gestörter Elektrolyttransport. Hiervon betroffen sind verschiedene Organe, vor allem der Respirations- und Gastrointestinaltrakt. Bei ca. 90% aller CF-Patienten liegt eine exokrine Pankreasinsuffizienz vor. Sie ist Folge einer verminderten Sekretion von HCO_3^- und pankreatischer Enzyme. Die Retention dieser für die Verdauung notwendigen Enzyme führt zur Andauung des Pankreasgewebes mit anschließender Fibrosierung und einhergehendem Funktionsverlust (*Döring et Ratjen, 2004*). Im Bronchialepithel der Lunge führen Chloridretention und gesteigerte Natriumresorption zu einem Salzverlust in der die Flimmerhärchen umgebenden Atemwegsoberflächenflüssigkeit. Um einen Ladungsausgleich wieder herstellen zu können, steigern die bronchialen Epithelzellen die Wasserresorption. Dadurch wird nicht nur die Viskosität der Atemwegsoberflächenflüssigkeit erhöht, sondern auch deren Volumen signifikant erniedrigt (*Boucher, 2004*). Dies hat zur Folge, dass die Funktion der Flimmerhärchen, die mukoziliäre Clearance, stark beeinträchtigt wird: bakterielle Infektionen mit Gefahr der Chronifizierung werden dadurch begünstigt (*Döring et al., 2000; Worlitzsch et al., 2002*). Folgen einer chronisch progressiven bronchopulmonalen Infektion sind meist Bronchiektasien mit anschließend respiratorischer Insuffizienz (*Balough et al., 1995*). Hierbei gilt zu beachten, dass pulmonale Komplikationen die häufigste Mortalitätsursache bei CF-Patienten darstellen.

Bei den häufigsten Erregern von Lungeninfektionen handelt es sich vor allem um *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylokokkus aureus* (*S. aureus*), *Hämophilus influenzae* und *Burkholderia cepacia*. Diese opportunistischen Pathogene bilden unter anaeroben Wachstumsbedingungen Mikrokolonien, welche unter anderem durch eine erhöhte Synthese von Exopolysacchariden charakterisiert sind (*Worlitzsch et al., 2002*). Anaerobe Verhältnisse in der Mukusschicht auf dem Lungenepithel können durch die oben beschriebene Viskositätserhöhung als Folge des Basisdefekts entstehen. Zusätzlich besitzen CF-Epithelzellen eine

signifikant erhöhte Sauerstoffabsorption (*Worlitzsch et al., 2002*). Nehmen Bakterien wie *P. aeruginosa* oder *S. aureus* den restlichen Sauerstoff des mikroaeroben Mukus auf, verändern sie unter anaeroben Bedingungen ihren Phäno- und Genotyp.

1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa gehört zu der Gruppe der gramnegativen Stäbchenbakterien. Da dieses Bakterium Glucose nur oxidativ verwerten kann, zählt es zu den Nonfermentern. Es ist sowohl Katalase- als auch Oxidase-positiv. Seine Größe bewegt sich zwischen 1,5-5,0 x 0,5-1,0 µm. Zu den unverwechselbaren Eigenschaften zählt unter anderem ein süßlich-aromatischer Geruch, der durch Bildung von Aminoacetophenon hervorgerufen wird. Für *P. aeruginosa* typische Krankheiten sind die Otitis externa, Infektionen von Brandwunden oder postoperative Wundinfektionen, rezidivierende Harnwegsinfekte, Infektionen der Atemwege durch kontaminierte Geräte und Infekte bei immunsupprimierten Patienten. Prädisponierend für chronische Lungeninfekte mit *P. aeruginosa* ist die CF. *P. aeruginosa* bildet zwei wasserlösliche Pigmente: das blaugrüne Pyozyanin und das gelbgrüne Pyoverdin, auch Fluoreszein genannt. Virulenzfaktor ist unter anderen das Exotoxin A, eine ADP-Ribosyltransferase, die durch Hemmung des Elongationsfaktors 2 die Proteinsynthese unterbindet. Weitere Pathogenitätsfaktoren sind Fimbrien, die der Adhäsion dienen, aber auch Hämolysin, Proteasen sowie Lipopolysaccharide und Alginat, ein komplexes Exopolysaccharid. Infektionen des Respirationstraktes mit mukoidem, d.h. Alginat-positivem *P. aeruginosa* korrelieren nachweislich mit dem Schweregrad der Erkrankung (*Fick, 1981*).

Unter Stressbedingungen wie etwa bei Hypoxie ist eine stark erhöhte Synthese des Exopolysaccharids Alginat ein spezifisches Merkmal von *P. aeruginosa* (*Worlitzsch et al., 2002*). Chemisch aufgebaut ist Alginat aus D-Mannuronsäure und L-Guluronsäure (*Linker et Jones, 1964; Linker et Jones, 1966*). Mutationen im Genom der *Pseudomonaden*, im speziellen Veränderungen im mucA-Gen,

sind zwar nicht allein für die Induktion der Alginatsynthese verantwortlich, konnten jedoch in 84% der Fälle bei Alginat-positiven Stämmen nachgewiesen werden (*Boucher et al., 1997*). Unter normalen Bedingungen binden die muc-ABD-Clusterproteine den Transkriptionsfaktor algU (algT), der dadurch algD nicht aktivieren kann. AlgD gilt als Schlüsselprotein der Alginatsynthese. Mutationen im mucA-Gen führen zu Freisetzung von algU mit nachfolgender Aktivierung von algD und damit zur Alginatsynthese (*Martin et al., 1993*). Zu den häufigsten Veränderungen im mucA-Gen zählen Verkürzungen des DNA-Stranges durch vorzeitiges Einfügen von Stop-Codons oder durch Strangbrüche (*Boucher et al., 1997*). Stark gesteigerte Alginat-Produktion verursacht mukoiden Stämme. Unter anaeroben Bedingungen kann *P. aeruginosa* diesen mukoiden Status mehrere Tage und länger aufrecht erhalten (*Hassett, 1996*). Bereits seit Beginn der siebziger Jahre wurde die Alginatsynthese durch Nachweis von Phagozytose-Inhibition (*Schwarzmann et al., 1971*), durch Nachweis verschiedener Antibiotika-Resistenzen (*Baltimore et al., 1987; Pina et al., 1997; Bolister et al., 1991*) sowie durch den Nachweis eines erhöhten Schutzes gegenüber radikalen Sauerstoffspezies (ROS) (*Learn et al., 1987; Simpson et al., 1989*) mit der Aufrechterhaltung chronischer Atemwegsinfektionen in Verbindung gebracht. CF-Patienten, bei denen eine Besiedelung mit mukoidem *Pseudomonas* nachgewiesen werden konnte, wiesen außerdem eine schnellere Verschlechterung der bronchopulmonalen Einsekundenkapazität (FEV₁) auf als Patienten mit Besiedelung nicht-mukoider *Pseudomonaden*. In der Regel finden sich bei CF-Patienten bei erstmaliger Kolonialisierung mit *P. aeruginosa* nicht-mukoiden Stämme. Diese wandeln sich erst bei persistierender Infektion in mukoiden Stämme um. Mukoide *Pseudomonas*-Stämme können in sogenannten Mikrokolonien vorliegen (*Lam et al., 1980*). Als synonym gilt die Beschreibung von Makrokolonien (*Worlitzsch et al., 2002*).

1.3 Das Lipopolysaccharid

Das Lipopolysaccharid (LPS) in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien ist verantwortlich für die proinflammatorische Immunantwort des Wirtes auf den

Erreger. LPS besteht aus drei Anteilen: dem Lipid A, dem Core-Protein und dem Oberflächen-Antigen (O-Antigen) (Guo et al., 1997). Die toxische Wirkung von LPS ist auf den Lipid A-Anteil zurückzuführen (Lien et al., 2000); LPS stellt somit ein Endotoxin dar. Das Lipid A setzt sich zusammen aus Fettsäuren und Phosphat, die an Glucosamin-Dimere gebunden sind (Abbildung 1). Es vermittelt über den membranständigen Toll-like-Rezeptor 4 (Tlr4) von Makrophagen und anderen Zellen die Ausschüttung von Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) und weiteren Zytokinen (Beutler, 2000). Durch die Zytokinausschüttung ist LPS somit Auslöser für die spezifische und unspezifische Immunantwort.

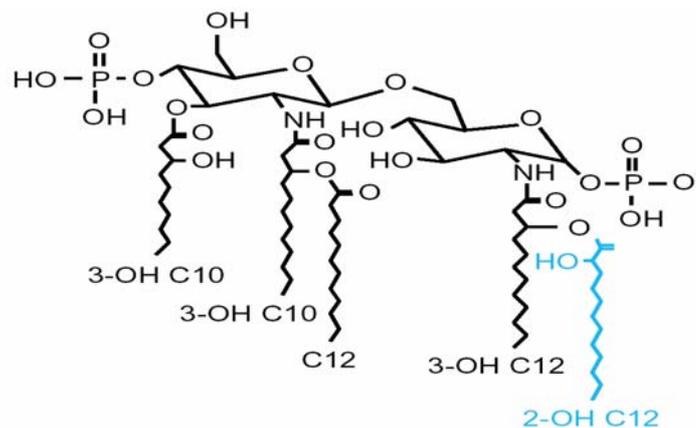


Abbildung 1: Chemische Struktur von penta-acetyliertem Lipid A beim Wildtyp PAK (Hajjar et al., 2002).

In diesem Zusammenhang kommt LPS-Modifikationen folgende Bedeutung zu: durch strukturelle Veränderungen werden Resistenzen gegenüber Mediatoren von Immunantworten erzeugt und Immunreaktionen modifiziert. So führt die Bindung von Aminoarabinose an das LPS (Abbildung 2) bei *Salmonella typhimurium* zu Resistenzen gegenüber Polymyxin, einem kationischen Peptid (CAMP), und zu veränderten Zytokinausschüttungen an humanen Endothelzellen (Guo et al., 1997). Eine weitere Bindung von Palmitat an das Lipid A führt zu dessen erhöhter Acetylierung und hat eine zunehmende

Resistenz von *Salmonella typhimurium* gegenüber synthetischem C18G, einem weiteren CAMP, zur Folge (Guo et al., 1998). Dieser Mechanismus konnte auch bei den Erregern *Escherichia coli* und *Yersinia enterocolica* nachgewiesen werden (Guo et al., 1998).

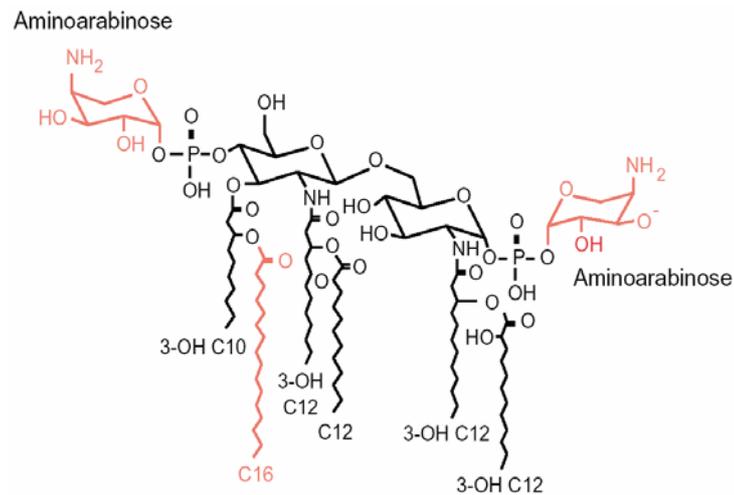


Abbildung 2: Chemische Struktur von modifiziertem hexa-acetyliertem Lipid A bei *P. aeruginosa*-Isolaten von CF-Patienten (Hajjar et al., 2002).

Veränderte Umweltbedingungen wie etwa Magnesium (Mg^{2+})-limitiertes Medium für in vitro wachsenden *P. aeruginosa* induzieren ebenfalls LPS-Modifikationen in Form zusätzlicher Bindung von Aminoarabinose und Palmitat an das Lipid A (Ernst et al., 1999). Verantwortlich hierfür sind die Sensorkinase PhoQ und der Transkriptionsaktivator PhoP, die als Zwei-Komponenten-Regulationssystem auch bei *S. typhimurium* vorliegen und auf veränderte Umweltbedingungen reagieren: PhoP/PhoQ-Aktivierung durch Anwachsen in Mg^{2+} -limitiertem Medium mit anschließender Lipid A-Modifikation erzeugt bei *P. aeruginosa* eine Resistenz gegenüber dem kationischen Peptid Polymyxin (Ernst et al., 1999). Ebenso konnte eine PhoP/PhoQ-unabhängige Resistenz gegenüber dem CAMP C18G nachgewiesen werden (Ernst et al., 1999).

1.4 Funktion von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) bei chronisch pulmonaler Infektion mit *P. aeruginosa*

Auf die Infektion der Bronchien mit *P. aeruginosa* folgt ein schnelles und massives Einwandern von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) in die Atemwege (Meyer et al., 1993). PMN sind ein wichtiger Bestandteil der akuten unspezifischen Immunabwehr und können sowohl auf oxidativem wie auch auf nicht-oxidativem Wege das Abtöten nach Phagozytose von Bakterien bewerkstelligen (Mandell, 1974).

Oxidatives Abtöten wird bestimmt durch den sogenannten *Respiratory Burst*, der in den PMN gekennzeichnet ist durch starken Anstieg der Sauerstoff-Aufnahme mit anschließender Synthese von Superoxidanionenradikalen (O_2^-) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (Babior, 1978). Wichtigster Bestandteil ist hierbei die membranständige NADPH-Oxidase, die O_2 in Superoxidanionenradikale umwandelt. Durch die Beteiligung weiterer Enzyme, aber auch spontan, kommt es zur Bildung von H_2O_2 und OH^- (Babior, 1978; Rosen et al., 1995), die nun gemeinsam mit den Sauerstoffradikalen zu Membranlipidperoxidationen und damit zum Abtöten von Bakterien führen.

Nicht-oxidatives Abtöten von Bakterien in den PMN erfolgt unter anderem durch kationische Peptide (CAMP), die sich in den Granula der PMN befinden. Nach Verschmelzen der primären Phagosomen mit diesen intrazellulären Granula erfolgt deren Degranulation, bei der in der Regel kationische CAMP freigesetzt werden (Babior, 1978). Eine Untergruppe der CAMP bilden die α -Defensine, welche in den azurophilen Granula der PMN enthalten sind (Ganz, 2002). Durch elektrostatische Wechselwirkung binden CAMP an die äußere Membran gramnegativer Bakterien und werden in die Lipidschicht eingelagert. Dabei kommt die hydrophobe Seite der Peptide in der Lipid A-Schicht zum Liegen (Guo et al., 1998). Ihre antimikrobielle Wirkung erzielen CAMP durch nachfolgende Porenbildung in der Phospholipidmembran, was eine Erhöhung der Membranpermeabilität und damit die Lyse von Erregern zur Folge hat

(Ganz, 1999). Dabei wirken sie nicht nur auf gramnegative sondern auch auf grampositive Bakterien sowie auf einige umhüllte Viren und Parasiten (Zasloff, 2002). Weitere Funktionen bestehen u.a. in der chemotaktischen Wirkung auf Monozyten, dendritische Zellen und T-Zellen (Zasloff, 2002) sowie in der proinflammatorischen Wirkung durch Histaminfreisetzung aus Mastzellen (Durr et al, 2002). Eine indirekte antimikrobielle Wirkung der α -Defensine erfolgt durch Induktion von Wasserstoffperoxidbildung in Lungengewebe; diese wurde bisher allerdings nur in vitro nachgewiesen (Porro et al., 2001).

1.5 Zielsetzung der Studie

Ernst et al. gelang der Nachweis, dass *P. aeruginosa* unter veränderten Umweltbedingungen sein LPS durch Addition von Palmitat und/oder Aminoarabinose modifiziert. Diese Modifikationen gingen einher mit Resistenzentwicklung der *Pseudomonaden* gegenüber einzelnen kationischen Peptiden wie C18G und Polymyxin (Ernst et al., 1999). CAMP sind unter anderem in humanen PMN enthalten und stellen einen wichtigen Bestandteil der nicht-oxidativen Immunabwehr dar. Umwandlungen der LPS-Struktur durch Addition von Palmitat und Aminoarabinose führen zu zusätzlicher Acetylierung der bakteriellen Oberfläche und verändern so deren elektrische Ladung. Dies könnte Ursache für eine verhinderte elektrostatische Wechselwirkung zwischen den kationisch geladenen CAMP und der äußeren Membran der modifizierten *Pseudomonaden* sein.

Aufgrund ihrer Ergebnisse formulierten Ernst et al. die These, dass modifizierte LPS-Strukturen einen positiven Einfluss auf die Persistenz von *P. aeruginosa* in der Lunge von CF-Patienten haben. Allerdings wurden während der Versuche nur zwei isolierte kationische Peptide verwendet, C18G und Polymyxin, wohingegen bei der unspezifischen Immunabwehr durch PMN in diesen auch andere zahlreiche CAMP enthalten sind. Ein weiterer wichtiger Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr unter aeroben Bedingungen sind ferner in den

PMN gebildete Sauerstoffradikale, deren Einfluss von Ernst et al. ebenfalls ausgeklammert wurde.

Es stellt sich nun die Frage, ob modifiziertes LPS aufgrund der oben genannten Resistenzentwicklungen einen Einfluss auf die Phagozytose und/oder das intrazelluläre Abtöten durch humane PMN haben kann. Es ist Ziel der vorliegenden Arbeit, dies durch in vitro Phagozytose-Experimente zu untersuchen.

Für die Durchführung der Phagozytose-Experimente wurden zunächst aerobe Bedingungen gewählt. So konnte untersucht werden, ob LPS-Modifikationen zu vermindertem Abtöten der *Pseudomonaden* durch humane PMN führen, in denen sowohl CAMP als auch Sauerstoffradikale vorliegen. Anschließend erfolgten die Experimente unter anaeroben Bedingungen. Auf diesem Wege konnte gewährleistet werden, dass das Abtöten von *P. aeruginosa* durch PMN nur mittels kationischer Peptide und nicht durch Sauerstoffradikale stattfinden konnte. Unter anaeroben Bedingungen besitzt *P. aeruginosa* jedoch die Eigenschaft, das Polysaccharid Alginat zu bilden. Da bei Alginat-positiven *Pseudomonaden* Resistenzen gegenüber Phagozytose durch Immunabwehrzellen gezeigt werden konnten (Schwarzmann et al., 1971; Oliver et Weir, 1985; Simpson et al., 1988), konnte ein Einfluss der Alginatbildung auf die Phagozytose unter anaeroben Bedingungen folglich nicht ausgeschlossen werden. Um jedoch unter gleichen Bedingungen eine Synthese von Alginat verhindern zu können, wurden die Phagozytose-Experimente ein weiteres Mal unter aeroben Bedingungen bei gleichzeitiger Inhibition der Sauerstoffradikalen-Bildung durch Diphenyleneiodonium chloride (DPI) durchgeführt.

Nach Durchführung der Experimente unter anaeroben Bedingungen wurde Alginat bei allen Stämmen nachgewiesen. Ein möglicher Einfluss von Alginat auf die Phagozytose und das intrazelluläre Abtöten der *Pseudomonaden* durch humane PMN konnte dabei ebenfalls untersucht werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien

Tryptone Soya Broth (TSB), Oxoid LTD, Basingstoke, England
NaCl , Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Na₂ HPO₄ *12 H₂O, Merck KGaA, Darmstadt, BRD
KH₂ PO₄, Merck KGaA, Darmstadt, BRD
D(+)-Glucose-Monohydrat, Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Dextran 500, Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden
Ficoll, Biocoll Separating Solution, Biochrom AG, Berlin, BRD
Heparin, Liquemin® N 25000, Hoffmann La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, BRD
AB⁺-Serum, Abteilung für Transfusionsmedizin Universitätsklinikum Tübingen,
Tübingen, BRD
DPI, Diphenyleiodonium chloride, SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen, BRD
DAPI , 4'6'-Diamino-2-Phenylindol, SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen, BRD
Tween 20, SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen, BRD
Fluorescent mounting medium, DAKO, Hamburg, BRD
DAKO Pen, Code No. 2002, DAKO, Hamburg, BRD
Schweineserum normal , DAKO, Hamburg, BRD
Kaninchen-Anti-Alginat-Antikörper, freundlicherweise überlassen von Gerry
Pier, Harvard Medical School, Boston, USA
Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper, Cy3-Antirabbit Antikörper, DAKO, Hamburg,
BRD

2.2 Geräte

Zentrifugen:

3K10, Sigma, Osterode, BRD

Multifuge 3 S-R, Kendro, Osterode, BRD

GR 412, Jouan, Saint Nazaire, Frankreich

Brutschränke:

Modell 700, Memmert GmbH+CoKG, Schwabach, BRD
Infors-HT, Schüttelbrutschrank, Infors GmbH, Stuttgart, BRD
Heraeus Instruments, Düsseldorf, BRD

Gefriertruhe –70°C, Kendro, Laboratory Products, Hanau, BRD
Kühlschrank –20°C, Super 707, Bosch, Stuttgart, BRD
Fluoreszenzmikroskop, Axioplan, Zeiss, Oberkochen, BRD
AxioCam, Zeiss, Oberkochen, BRD
Photometer, LKB Biochrom, Pharmacia, England
Neubauer-Zählkammer, Preciss, Frankreich
Lichtmikroskop, BX 300, Will, Wetzlar, BRD
Deckgläser, R. Langenbrink, Emmendingen, BRD
Objektträger, R. Langenbrink, Emmendingen, BRD
10 ml-Pipette, Corning Incorporated, New York, USA
1000er Eppendorf-Pipette, Eppendorf AG, Hamburg, BRD
Eppendorf-Cups, Eppendorf AG, Hamburg, BRD
Photometer-Messgefäß, Halbmikro-Küvette, Sarstedt, Nümbrecht, BRD
20 ml-Spritze, Injekt 20 ml, B. Braun, Melsungen, BRD
Injektionsnadel, Sterican, B. Braun, Melsungen, BRD
Filter, Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, USA
14 ml Plastikröhrchen, Greiner-Labortechnik GmbH, Frickenhausen, BRD
1,5 ml Plastikröhrchen, Polypropylene Tube, Micronic Systems, Lelystad,
Holland
Blutagarplatten, Columbia-Blutagar, heipha Dr. Müller GmbH, Heidelberg, BRD

2.3 Medien und Stammlösungen

TSB-Flüssigbouillon:

15 g TSB

500 ml PBS 1-fach

PBS 1-fach (Phosphat-gepufferte Saline):

170 g NaCl

28,46 g Na₂HPO₄ *12 H₂O

2,7 g KH₂PO₄

1000 ml destilliertes H₂O

anschließende Verdünnung dieser Lösung mit destilliertem H₂O 1:20

1%-Glucose-PBS-Lösung:

1 g Glucose-Monohydrat in 100 ml PBS 1-fach

2.4 Bakterienstämme und Inkubation

2.4.1 Beschreibung der P. aeruginosa-Isolate

Die für die Phagozytose-Experimente verwendeten Isolate wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Robert K. Ernst, Departments of Medicine and Microbiology, University of Seattle, USA. Alle Isolate stammten von CF-Patienten und wiesen innerhalb der LPS-Struktur verschiedene Lipid A-Modifikationen auf. Die von Robert K. Ernst ausgewählten Bezeichnungen für die einzelnen Stämme wurden wie folgt beibehalten: Die Stämme CF1-CF6 stammten von sechs verschiedenen Kindern im Alter von weniger als 6 bis 18 Monaten, die als MD1 und SV2 bezeichneten Isolate von einem 17- bzw. 16jährigen Patienten. Die Abkürzung MD bedeutet „mild“, SV steht hierbei für „severe“. Gemeint sind damit die jeweiligen Krankheitsverläufe nach Infektion mit diesen Bakterienkolonien. Für alle Phagozytose-Experimente wurden nicht nur die genannten Isolate verwendet, sondern auch der PAO1-Wildtyp.

2.4.2 Chemische Struktur der modifizierten Lipopolysaccharide

Die *P. aeruginosa*-Stämme CF1-CF6 und MD1 wiesen die gleichen LPS-Modifikationen auf. Dabei enthielten sowohl die innere als auch die äußere

bakterielle Membran penta-acetyliertes und hexa-acetyliertes LPS (*Abbildung 3*). Da penta-acetyliertes LPS regulärer Bestandteil des Wildtyps PAO1 ist, handelt es sich bei den genannten Stämmen folglich um sogenannte LPS-Mischformen und nicht um rein modifiziertes LPS.

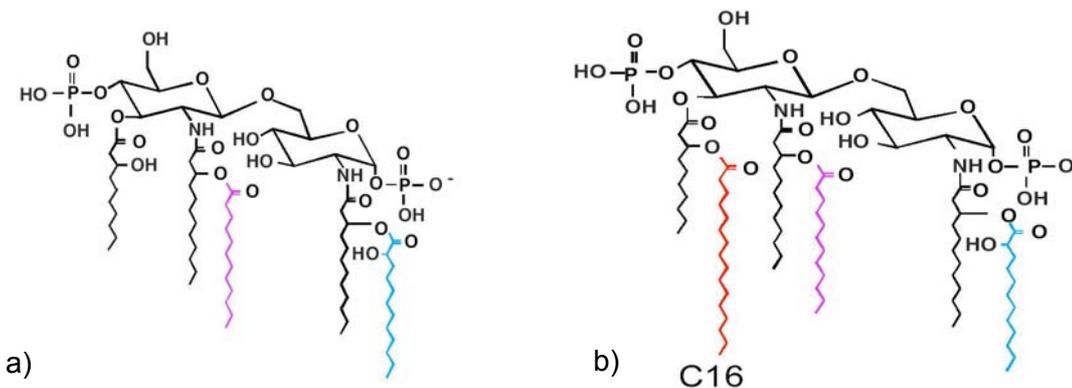


Abbildung 3: Chemische Strukturen von Lipid A der *P. aeruginosa*-Stämme CF1-CF6 und MD1, die sowohl in der äußeren als auch in der inneren bakteriellen Membran vorliegen (Robert K. Ernst, Departments of Medicine and Microbiology University of Seattle, USA).

- a) penta-acetyliertes Lipid A, wie es auch beim Wildtyp PAO1 zu finden ist
- b) modifiziertes hexa-acetyliertes Lipid A

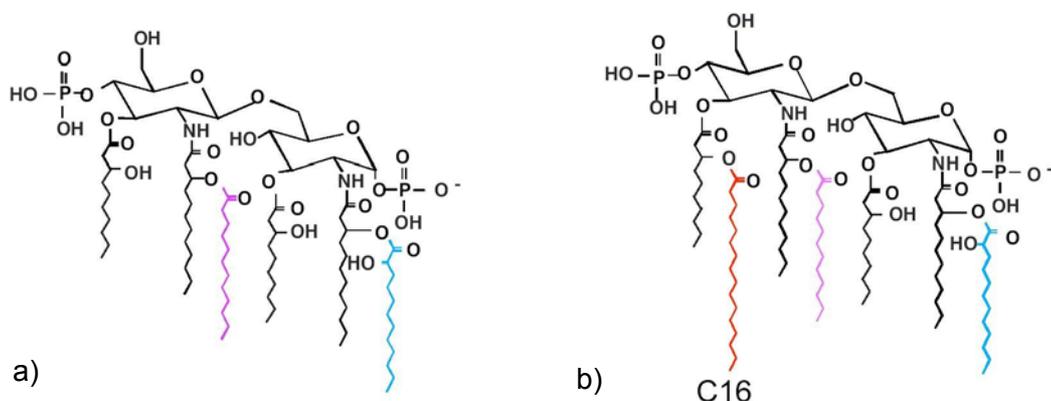


Abbildung 4: Chemische Strukturen von Lipid A, wie sie bei dem *P. aeruginosa*- Stamm SV2 in der inneren und in der äußeren bakteriellen Membran vorliegen (Robert K. Ernst, Departments of Medicine and Microbiology, University of Seattle, USA).

- a) modifiziertes hexa-acetyliertes Lipid A
- b) modifiziertes hepta-acetyliertes Lipid A

Der Stamm SV2 enthält kein penta-acetyliertes Lipid A, sondern setzte sich aus hexa- und hepta-acetyliertem modifiziertem LPS zusammen (*Abbildung 4*).

Diese LPS-Strukturen lagen ebenfalls sowohl in der inneren und als auch in der äußeren bakteriellen Membran der *Pseudomonaden* vor.

2.4.3 Kultivierung von *P. aeruginosa*

In sterile Glasröhrchen mit einem schließenden Papierstopfen wurden 5 ml Tryptone Soya Broth (TSB)–Flüssigbouillon mit einer sterilen 10 ml-Pipette gefüllt. Aus der bei -70°C aufbewahrten Einfrierkultur (in TSB mit 15% Glycerin aufgenommene Bakterienkolonien) wurde dann mit einer sterilen Impföse ein kleiner Teil des Inhalts aufgenommen und in die TSB-Bouillon überführt. Anschließend wurden die Glasröhrchen über Nacht bei 37°C und 200 Umdrehungen pro Minute (U/min) in einem Schüttelbrutschrank bebrütet. Die Kultivierung von *P. aeruginosa* auf diese Weise wird im folgenden als Übernachtkultur bezeichnet.

Zusätzlich wurden für alle Bakterienstämme sogenannte Tagkulturen hergestellt. Dafür wurden aus der Übernachtkultur entnommen Bakterien bei 600 nm auf eine optische Dichte (OD) von 0,05 eingestellt. Bei 37°C und 200 U/min wurden sie anschließend in 10 ml TSB/PBS so lange bebrütet, bis eine OD von 0,8-1,0 erreicht wurde. Die Bakterien befanden sich nun in der lag-Phase, der sogenannten Anlaufphase vor Beginn des exponentiellen Wachstums.

Sowohl aus der Übernacht- als auch aus der Tagkultur der Bakterien wurden 2 ml mit einer 1000er Eppendorf-Pipette entnommen und in sterile 2 ml Cups gefüllt. Anschließend wurde diese bei 5000 U/min, 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das übriggebliebene Pellet in 1%-Glucose-PBS-Lösung aufgenommen und homogenisiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Nach dem zweiten Waschgang wurde die OD der Bakterien bei 600 nm bestimmt. Dafür wurden aus dem 1000 μl enthaltenden Eppendorfcup mit den gewaschenen Bakterien 100 μl entnommen und in einem dem Photometer dienenden Messgefäß 1:10 mit PBS 1-fach verdünnt. Zur

Eichung dienten als Leerwert 1000 μ l PBS 1-fach. Um eine Konzentration der Bakterien von $1 \cdot 10^8$ Kolonie bildenden Einheiten (KBE) /ml zu erhalten, mussten diese auf eine $OD_{600nm}=0,08$ eingestellt werden.

2.5 Nachweis von Alginate mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung

Alginate ist ein Polysaccharid, welches von *Pseudomonas aeruginosa* gebildet wird. Bevor die einzelnen Isolate für die nachfolgenden Experimente verwendet wurden, wurde mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen, ob sie unter den oben beschriebenen Kulturbedingungen Alginate produzierten. Da Alginate-positiven *Pseudomonaden* unter bestimmten Bedingungen bereits ein erhöhter Schutz gegenüber Phagozyten nachgewiesen werden konnte (1.2), konnte eine durch Alginate hervorgerufene mögliche Veränderung der Phagozytose zu Beginn nicht ausgeschlossen werden. Um jedoch ausschließlich den Einfluss von LPS-Modifikationen auf die Phagozytose untersuchen zu können, durfte eine Alginate-Produktion folglich nicht stattfinden. Nur so konnte gewährleistet werden, dass mögliche Veränderungen hinsichtlich der Phagozytose einzig und allein auf LPS-Modifikationen zurückzuführen waren. Die Phagozytose-Experimente erfolgten deshalb lediglich unter Verwendung Alginate-negativer Isolate.

Für jeden der Stämme wurden sowohl aus einer Tag- als auch aus einer Übernachtskultur Präparate angefertigt. Aus beiden Kulturen wurden dabei je 2 ml in Eppendorfcups pipettiert. Bei 5000 U/min, 4°C und für 5 min wurden alle Eppendorfcups anschließend zentrifugiert, um dann mit PBS 1-fach (ohne Acid, ohne Tween) zweimal gewaschen zu werden. Nach dem zweiten Waschgang wurden die Pellets in 100 μ l PBS 1-fach (ohne Acid, ohne Tween) aufgenommen und homogenisiert. Auf Objektträger wurden nun $2 \cdot 10^4$ μ l einer jeden Suspension aufgetropft und luftgetrocknet. Diese Bereiche wurden mit einem Silikonstift umfahren; es wurde so ein hydrophober Randwall geschaffen. Der zweite Tropfen diente dabei als Kontrolle.

Um eine Alginateproduktion nach Inkubation der Stämme unter anaeroben Bedingungen während der Phagozytose-Experimente nachzuweisen, wurden sowohl aus dem Pellet als auch aus dem Überstand der Versuchsansätze der Stämme CF1-6, MD1 und SV2 $2 \times 10 \mu\text{l}$ mit der Pipette entnommen und auf einen Objektträger getropft. Ebenso wurden Präparate aus den dazugehörigen Kontrollwerten angefertigt.

Unter Verwendung von PBS 1-fach mit 0,1% Tween (PBS/Tween) wurde anschließend zur Abdeckung von unspezifischen bakteriellen Oberflächenantigenen und Bindungsstellen des Objektträgers Schweineserum 1:10 verdünnt. Pro Tropfen auf den Objektträgern wurden ca. $25 \mu\text{l}$ Serum zugegeben um für 30 min einzuwirken. Nach Absaugen der Präparate folgten für je 5 min zwei Waschgänge mit PBS/Tween. Die Zugabe des ersten Antikörpers, eines Kaninchen-Anti-Alginat-Antikörpers, erfolgte nach dessen 1:50 Verdünnung mit PBS/Tween. Die Einwirkzeit hierfür betrug 60 min. Nach wiederholtem zweifachen Waschen mit PBS/Tween wurde dann der zweite Antikörper, ein 1:800 verdünnter Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper, der mit rot leuchtendem lichtempfindlichem Fluorochrom Indocarbocyanin 3 konjugiert war, für 40 min aufgetropft. Um DNA in den Bakterien markieren zu können wurde DAPI verwendet. Es diente bei der Auswertung dazu festzustellen, ob fluoreszierende Partikel tatsächlich auf Bakterien zurückgeführt werden konnten. DAPI wurde dabei in einer Konzentration von $5 \mu\text{g/ml}$ aufgetragen und wirkte 5 min ein. Für die zwei nachfolgenden Waschgänge wurde nur H_2O dest. verwendet und die Präparate anschließend im Dunkeln luftgetrocknet. Deckgläser wurden mit einem querverlaufenden Streifen eines Antibleichmittels versehen und auf die Objektträger gelegt. Aufbewahrt wurden die Präparate im Kühlschrank bei -20°C . Unter einem Fluoreszenzmikroskop wurden die Präparate untersucht, einige davon wurden fotografiert.

2.6 Isolierung polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN)

Die Isolierung der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) erfolgte aus 10 ml Vollblut. Dieses wurde nach Entnahme in eine 20 ml-Spritze umgefüllt, in welcher zuvor mit einer Injektionsnadel wenige μl Heparin und 2 ml steril filtriertes Dextran 5% aufgenommen wurden. Die Verdünnung von Dextran erfolgte mit 0,9% NaCl. Die Spritze wurde für 45 min stehen gelassen. In dieser Zeit bildete sich ein Überstand, der zu gleichen Anteilen auf zwei sterile 14 ml fassende Plastikröhrchen verteilt wurde, die zuvor mit jeweils 4 ml Ficoll gefüllt wurden. Der sich am Grund der Spritze befindende Rest des Blutes (hauptsächlich aus Erythrozyten bestehend) wurde verworfen. Die beiden Röhrchen wurden nun bei 2000 U/min, 30 min und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach 30 Minuten Zentrifugieren bildete sich am Boden der Röhrchen jeweils ein Pellet. Der Überstand gliederte sich in zwei Phasen, wobei die obere Phase Serum enthielt und sich die untere aus verbliebenen Lymphozyten zusammensetzte. Beide Phasen wurden mit Hilfe einer 1000er Eppendorf-Pipette abgenommen und verworfen. Um die restlichen im Pellet verbliebenen Erythrozyten zu lysieren, wurden nun zuerst 2 ml H_2O dest. und nach genau 30 sec 2 ml 1,8% NaCl (18 g NaCl in 1 l H_2O dest.) zugegeben. Die Suspension wurde homogenisiert und bei 1200 U/min, 10 min und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Auslaufen der Zentrifuge wurde der Überstand dekantiert und der Lyseschritt wiederholt. Nachdem der Überstand erneut dekantiert wurde, wurden beide Pellets in 1 ml 1%-Glucose-PBS aufgenommen und vorsichtig homogenisiert.

Zur Quantifizierung der PMN wurde eine Neubauer-Zählkammer mit einer Tiefe von 0,1 mm und $0,0025 \text{ mm}^2$ Fläche zu Hilfe genommen. 10 μl der PMN-Lösung wurden mit 90 μl 1%-Glucose-PBS 1:10 verdünnt. Unter Verwendung des 10er-Objektivs eines Lichtmikroskopes wurden zwei Großfelder (jeweils bestehend aus 16 Kleinfeldern) der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und die Summe der gezählten PMN halbiert. Der so errechnete Mittelwert ging in die weitere Rechnung ein. Die Anzahl der PMN/ml entsprach der Anzahl der

gezählten PMN (Mittelwert)*10*10000. Da für das Phagozytose-Experiment eine Konzentration der PMN von $2 \cdot 10^6$ /ml benötigt wurde, wurde die PMN-Lösung mit 1%-Glucose-PBS entsprechend verdünnt.

2.7 Phagozytose-Experimente unter aeroben und anaeroben Bedingungen

Für die einzelnen Bakterienstämme wurden drei verschiedene Versuchsansätze zu je 1000 µl gewählt (*Tabelle 1*). Hierbei wurden wieder die bereits oben genannten 14 ml Plastikröhrchen als Gefäße verwendet.

Tabelle 1

Zusammensetzung der einzelnen Versuchsansätze für die Phagozytose-Experimente

	1%-Glucose- PBS	Bakterienlösung [$1 \cdot 10^8$ /ml]	PMN-Lösung [$2 \cdot 10^6$ /ml]	AB ⁺ -Serum
1. Ansatz	900 µl	100 µl		
2. Ansatz	300 µl	100 µl	500 µl	100 µl
3. Ansatz	800 µl	100 µl		100 µl

1.Ansatz: Kontrollwert (Bakterien)

Um feststellen zu können, dass die Bakterien auf die richtige Konzentration von $1 \cdot 10^7$ KBE/ml eingestellt waren, wurde bei jedem Experiment eine Kontrollwert (K) mitbestimmt.

2. Ansatz: Phagozytose-Experiment (PMN+Bakterien)

Das Zusammenführen von Bakterien und neutrophilen Granulozyten diente als Grundvoraussetzung für die Phagozytose und stellte das eigentliche Experiment dar. Die PMN wurden zusätzlich durch humanes AB⁺- Serum zur Phagozytose angeregt.

3. Ansatz: Leerwert (Bakterien)

Dieser Ansatz wurde verwendet um nachweisen zu können, dass das Überleben der Bakterien unter den für das Experiment gewählten Bedingungen gewährleistet war. Zudem diente der Leerwert zur Berechnung der im Phagozytose-Experiment abgetöteten Bakterien.

Sowohl die Leerwerte als auch die Versuchsansätze wurden nun für 90 min bei 37°C und 200 U/min inkubiert, wobei die Inkubation unter anaeroben Bedingungen in einem anaeroben Brutschrank erfolgte. Um eine Inkubation unter aeroben Bedingungen zu gewährleisten wurden die Deckel der Plastikröhrchen um eine halbe Umdrehung geöffnet und in einem aeroben Brutschrank bebrütet. Nach Ablauf der 90 min Inkubationszeit wurden nur die Versuchsansätze, nicht jedoch die Leerwerte, bei 1200 U/min und Raumtemperatur für 10 min zentrifugiert. Der dabei gebildete Überstand wurde dekantiert und auf Eis aufbewahrt; die in ihm enthaltene Konzentration an Bakterien entsprach der nicht phagozytierten Bakterienanzahl. Das Pellet wurde in 1000 µl 1%-Glucose-PBS aufgenommen, vorsichtig mit einer Pipette homogenisiert und nochmals bei 1200 U/min und Raumtemperatur für 10 min zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde dieser Schritt noch einmal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 1000 µl 1%-Glucose-PBS suspendiert. Die Anzahl der sich darin befindenden Bakterien entsprach den phagozytierten und adhärenen, aber nicht abgetöteten *Pseudomonaden*. Um die Anzahl überlebender Bakterien in den einzelnen Ansätzen berechnen zu können, wurde pro Ansatz eine Verdünnungsreihe angesetzt und anschließend ausplattiert. Eine Verdünnungsreihe bestand aus acht sterilen 1,5 ml fassenden Plastikröhrchen, in die mit einer Multipipette jeweils 900 µl 1%-Glucose-PBS

pipettiert wurden. Aus allen Ansätzen (Kontrolle, Versuchsansätze, Leerwerte) wurden nun 100 µl entnommen und dann in das jeweilige erste der acht Röhrrchen pipettiert. Mit Hilfe der Multipipette wurde der Inhalt homogenisiert, 100 µl davon aufgenommen und in das folgende Röhrrchen pipettiert. Dann wurden die Pipettenspitzen gewechselt, der Inhalt des zweiten Röhrrchens homogenisiert und wiederum 100 µl aufgenommen, um in das dritte Röhrrchen gefüllt zu werden. Analog wurde mit den Inhalten der restlichen Röhrrchen verfahren. In jedem Röhrrchen wurde die Bakterienlösung somit um den Faktor 1:10 weiter verdünnt.

Pro Verdünnungsreihe erfolgte eine Doppelbestimmung: dafür wurden zwei Blutagarplatten beschriftet und mit einem aus 16 Kleinfeldern bestehenden Gitternetz bemalt. Die ersten beiden Felder wurden mit 10^{-3} beschriftet, die folgenden beiden mit 10^{-4} , die übrigen Felder entsprechend bis zu 10^{-10} . Aus den Röhrrchen der Verdünnungsreihen wurden nun jeweils 10 µl mit einer Eppendorfpipette entnommen und auf die entsprechenden Felder aufgetropft. Die Entnahme dieser 10 µl entsprach einer weiteren Verdünnung von 1:100, so dass sich in den ersten beiden mit 10^{-3} ausgezeichneten Feldern eine Verdünnung der Bakterien von 1:1000 befand. Die Blutplatten wurden solange stehen gelassen bis die Tropfen eingetrocknet waren und dann über Nacht bei 37°C bebrütet.

Die Phagozytose in % errechnete sich aus dem Verhältnis Kolonie bildender Einheiten (KBE) im Überstand zu KBE im Leerwert. Sie entspricht dem Anteil aller intrazellulärer Bakterien nach Phagozytose an der Gesamtzahl der sich im Leerwert befindenden Bakterien:

$$\frac{\text{KBE (Überstand)}}{\text{KBE (Leerwert)}} \times 100 = \text{Phagozytose in \%}$$

Das relative Abtöten in % wurde aus dem Verhältnis KBE (Überstand) + KBE (Pellet) zu KBE (Leerwert) berechnet. Dies entspricht dem Anteil aller getöteten Bakterien an der Gesamtzahl der in dem Experiment vorhandenen Bakterien:

$$100 - \frac{\text{KBE (Überstand)} + \text{KBE (Pellet)}}{\text{KBE (Leerwert)}} \times 100 = \text{relatives Abtöten in \%}$$

Aus dem Verhältnis relatives Abtöten in % zu Phagozytose in % ließ sich anschließend das absolute Abtöten bestimmen. Es entspricht dem Anteil der in den PMN abgetöteten Bakterien an allen phagozytierten Bakterien:

$$\frac{\text{rel. Abtöten in \%}}{\text{Phagozytose in \%}} \times 100 = \text{absolutes Abtöten}$$

2.8 Inkubation der Stämme CF1-4 und CF6 unter anaeroben Bedingungen nach Zugabe von Nitrat

Nitrat (NO_3) dient *P. aeruginosa* unter anaeroben Bedingungen als terminaler Elektronenakzeptor, der die Abdeckung des Energiebedarfs und somit die Alginatsynthese gewährleistet. Um festzustellen, ob sich die Alginat-Synthese der verschiedenen Stämme unter anaeroben Bedingungen bei Zugabe von Nitrat verändern würde, wurden je 100 μl Bakterienlösung [$1 \cdot 10^8$ /ml] der Stämme CF1-4 und CF6 mit 890 μl 1%-Glc-PBS und 10 μl NO_3 [10 mM] für 90 Minuten anaerob inkubiert. Von allen Ansätzen wurden Präparate für die anschließende indirekte Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis von Alginat angefertigt (2.5).

2.9 Phagozytose unter aeroben Bedingungen nach Zugabe von DPI

Die membranständige NADPH-Oxidase der PMN bildet aus Sauerstoff (O_2) Superoxid-Anionen-Radikale (O_2^-). Diese reagieren entweder spontan oder mit

Hilfe der Superoxid-Dismutase (SOD) weiter zu H_2O_2 oder werden durch Einbau eines weiteren Elektrons in reaktive Sauerstoff-Spezies umgewandelt, die als starke Oxidationsmittel oder als freie Radikale auf zelluläre Strukturen und Moleküle toxisch wirken. Diphenyleneiodonium chloride (DPI), ein nicht-kompetitiver Inhibitor, führt durch Adduktionsbildung mit einem Redoxzentrum der NADPH-Oxidase zu deren irreversiblen Funktionsverlust (*O'Donnell et al., 1993*). Durch den Einsatz von DPI konnte die Bildung von Sauerstoffradikalen verhindert und das Ausschalten des oxidativen Abwehrmechanismus der PMN gewährleistet werden: das Abtöten der Bakterien durch Sauerstoffradikale konnte nicht mehr stattfinden. Aufgrund der aeroben Bedingungen während der Experimente konnte außerdem verhindert werden, dass Alginat während der Inkubationszeit gebildet wurde, wie es unter anaeroben Verhältnissen der Fall war (3.3). Alginat als möglicher Auslöser für eine veränderte Phagozytose konnte somit ausgeschlossen werden.

Die einzelnen Versuchsansätze für die Phagozytose-Experimente setzten sich, wie unter 2.7 beschrieben, aus den selben Komponenten zusammen. Das Röhrchen, in welchem sich PMN und Bakterien befanden, enthielt jedoch zusätzlich 20 μ l DPI [1mM] und nur 280 μ l 1%-Glucose-PBS. Dem Leerwert wurden 20 μ l DPI [1mM] und nur 780 μ l 1%-Glucose-PBS zugegeben. Das weitere Verfahren entsprach dem bereits oben aufgeführten Versuchsablauf unter aeroben Bedingungen (2.7).

2.10 Cytochrom c-Test

Der Cytochrom c-Test diente als Funktionsnachweis für DPI: seine Anwendung ermöglichte es, die in jedem Versuchsansatz vorhandenen Sauerstoffradikale zu quantifizieren. Als Kontrolle bzw. Vergleichswert für die Wirksamkeit des DPI und auch der Wirksamkeit von Cytochrom c wurden Versuchsansätze verwendet, denen statt DPI Superoxid-Dismutase (SOD) zugegeben wurde. Da die SOD Sauerstoffradikale zu H_2O_2 umwandelt, lassen sich in den SOD enthaltenden Versuchsansätzen keine Sauerstoffradikale mehr nachweisen. Bei

Funktion des DPI als NADPH-Oxidase-Hemmer durften die mit DPI versehenen Ansätze ebenfalls keine Sauerstoffradikale mehr enthalten. In den Versuchsansätzen, welche weder DPI noch SOD enthielten, konnte hingegen die maximale Sauerstoffradikalenproduktion gemessen werden. Die Zugabe von Cytochrom c erfolgte in einer Konzentration von 10 mg/ml. SOD wurde in einer Konzentration von 2000 units/ml verwendet (*Tabelle 2*).

Tabelle 2

Zusammensetzung der einzelnen Versuchsansätze für den Cytochrom c-Test

	1%Glc-PBS	Cytochrom c [10mg/ml]	SOD [2000units/ml]	Bakterien [2*10 ⁸ /ml]	AB ⁺ -Serum	DPI [1mM]	PMN [1*10 ⁷ /ml]
1.	300µl	80µl	-	100µl	100µl	20µl	200µl
2.	220µl	80µl	80µl	100µl	100µl	20µl	200µl
3.	320µl	80µl	-	100µl	100µl	-	200µl
4.	240µl	80µl	80µl	100µl	100µl	-	200µl

Diese Ansätze wurden für 60 min bei 200 U/min und 37°C im Schüttelbrutschrank inkubiert. Als Gefäße dienten sterile 14 ml Plastikröhrchen, deren Deckel während der Inkubation um eine halbe Umdrehung geöffnet waren. Nach einer Stunde wurden mit Hilfe einer 1000er Eppendorfpipette jeweils 1000 µl aus den einzelnen Ansätzen in die dem Photometer

zugehörigen Halbmikro-Küvetten pipettiert und die optische Dichte bzw. Absorption bei 550 nm gemessen.

Mit Hilfe der Absorptionsmessung konnte die Wirksamkeit des DPI bestimmt werden:

1. Δ Absorption (60min) = Absorption (Ansatz Nr.3) - Absorption (Ansatz Nr.4)

$$\Delta \text{ Absorption (60min)} \times 68 = x_1 \text{ nmol O}_2^- / 2 \cdot 10^6 / 60\text{min}$$

Dieser Wert entspricht dem Leerwert.

2. Δ Absorption (60min) = Absorption (Ansatz Nr.3) – Absorption (Ansatz Nr.1)

$$\Delta \text{ Absorption (60min)} \times 68 = x_2 \text{ nmol O}_2^- / 2 \cdot 10^6 / 60\text{min}$$

$$\frac{x_2 \text{ nmol O}_2^- / 2 \cdot 10^6 / 60\text{min}}{x_1 \text{ nmol O}_2^- / 2 \cdot 10^6 / 60\text{min}} \times 100 = \text{Wirksamkeit des DPI in \%}$$

$$x_1 \text{ nmol O}_2^- / 2 \cdot 10^6 / 60\text{min}$$

3. ERGEBNISSE

3.1 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung zum Alginatnachweis in Übernacht- und Tagkulturen von *P. aeruginosa*

Da die Stämme CF1, CF2, CF3, CF4, CF6, MD1 und SV2 sowohl in der Tag- als auch in der Nachtkultur unter aeroben Bedingungen Alginat-negativ waren, konnten deren Isolate über Nacht kultiviert und am darauffolgenden Tag für die Phagozytose-Experimente verwendet werden (Tabelle 3). Bei positivem Alginatnachweis in den Übernachtkulturen der Stämme CF5 und PAO1 (Abbildung 5) wurde von diesen zur Verwendung in den Versuchsreihen nur Tagkulturen eingesetzt. MD2 war der einzige Stamm, der sowohl in der Tag- als auch in der Nachtkultur Alginat aufwies und somit, wie bereits unter 2.5 erläutert, von den Phagozytose-Experimenten ausgeschlossen werden musste (Tabelle 3).

Tabelle 3

Ergebnis der indirekten Immunfluoreszenzfärbung zum Alginatnachweis bei *P. aeruginosa* in den Übernacht- und Tagkulturen unter aeroben Bedingungen.

<i>P. aeruginosa</i>	CF1	CF2	CF3	CF4	CF5	CF6	MD1	MD2	SV2	PAO1
Übernachtkultur	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
Tagkultur	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Positiver Alginatnachweis: +, negativer Alginatnachweis: -

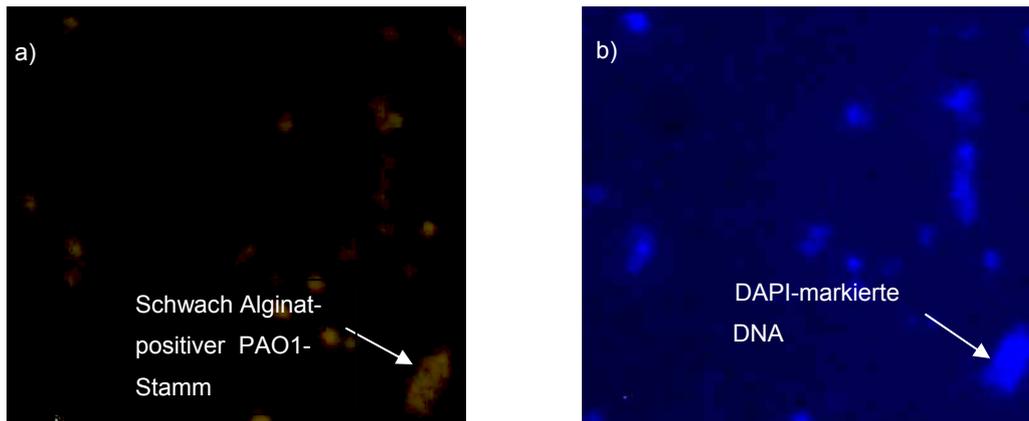


Abbildung 5: Ergebnis der indirekten Immunfluoreszenzfärbung eines schwach Alginat-positiven PAO1-Stammes. Zur DNA-Markierung der Bakterien wurde DAPI verwendet (2.5); so konnte nachgewiesen werden, dass fluoreszierende Partikel mit den Bakterien identisch waren.

- a) schwach Alginat-positiver PAO1-Stamm aus der Übernachtskultur
 b) wie a), aber unter Anwendung eines speziellen mikroskopischen Filters zur Darstellung der DAPI-markierten DNA des PAO1-Stammes

3.2 Einfluss von LPS-Modifikationen auf die Phagozytose und das Abtöten durch PMN unter aeroben und anaeroben Bedingungen

Bei den Phagozytose-Experimenten unter aeroben Bedingungen lag die niedrigste Phagozytoserate bei $86,4\% \pm 5,4$ (CF1), die höchste bei $97,1\% \pm 1,6$ (SV2) (*Abbildung 6*). Das absolute Abtöten (in den PMN abgetötete Bakterien im Verhältnis zu allen phagozytierten Bakterien) lag im Mittel zwischen $89,9\% \pm 0,8$ (CF3) und $98,4\% \pm 1,7$ (PAO1) (*Abbildung 7*). Daraus folgt, dass eine erfolgreiche Phagozytose bei allen *Pseudomonaden* stattfand, ebenso ein erfolgreiches intrazelluläres Abtöten aller phagozytierten Bakterien. Die jeweiligen LPS-Modifikationen der verschiedenen Bakterien-Stämme (2.4.2) hatten somit keinen Einfluss auf die Phagozytose und das intrazelluläre Abtöten durch PMN.

Unter anaeroben Bedingungen ergaben sich Phagozytoseraten zwischen $59,4\% \pm 4,9$ (CF2) und $94,0\% \pm 3,9$ (SV2) (*Abbildung 6*). Das absolute Abtöten

(s.o.) befand sich ebenfalls im Mittel zwischen $97,5\% \pm 1,2$ (CF6) und $99,0\% \pm 0,5$ (MD1) (Abbildung 7). Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass die *Pseudomonas*-Stämme unterschiedlich stark von den PMN phagozytiert wurden, am wenigsten phagozytiert wurde dabei der Stamm CF2.

Nach erfolgreicher Phagozytose wurden jedoch alle intrazellulären Bakterien zu über 95% abgetötet. Da unter anaeroben Bedingungen während der Inkubationszeit von allen Bakterien Alginate gebildet wurde (3.3), wäre die Produktion von Alginate eine mögliche Erklärung für die bei einigen Stämmen verminderte Phagozytose. Ein signifikanter Unterschied zur Phagozytose Alginate-negativer Bakterien unter aeroben Bedingungen ließ sich jedoch nur für den Stamm CF2 nachweisen ($t=5.89$, $df=3$, $p<0,01$).

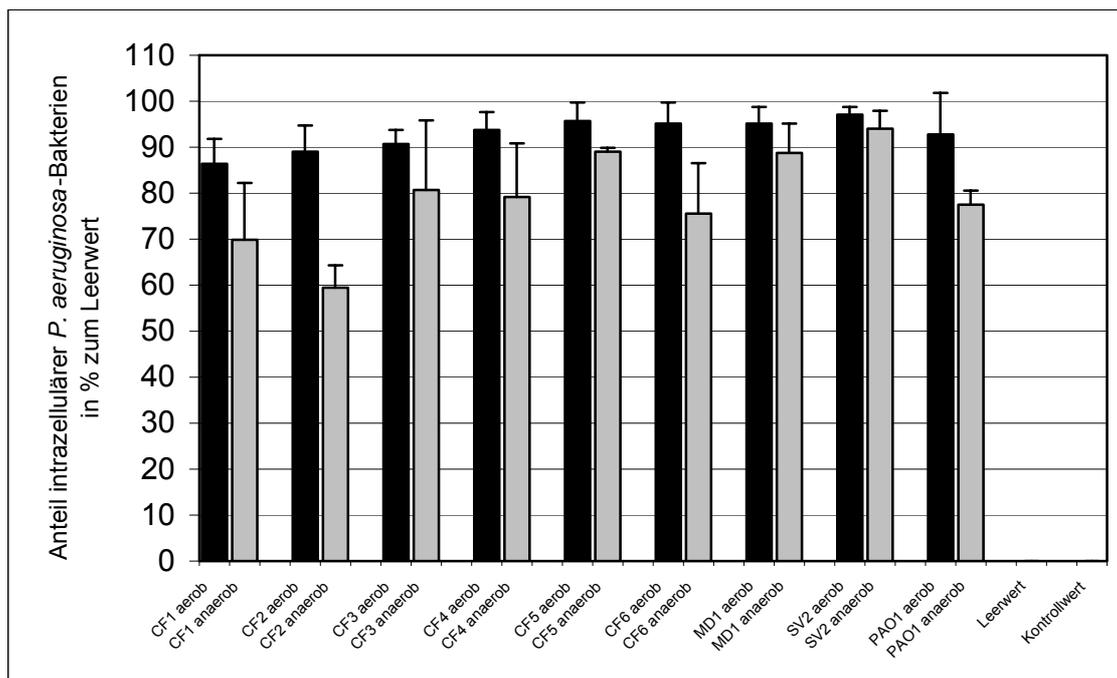


Abbildung 6: Anteil intrazellulärer Bakterien der *Pseudomonas*-Stämme CF1-CF6, MD1, SV2 und PAO1 nach Phagozytose unter aeroben (■) und anaeroben (□) Bedingungen in % des Leerwerts.

Jedes Phagozytose-Experiment wurde pro Bakterienstamm dreimal durchgeführt. Für die tabellarischen Abbildungen wurden jeweils der Mittelwert

und eine Standardabweichung gewählt. Bei den genannten Prozentzahlen handelt es sich ebenfalls um die Mittelwerte bei Dreifachbestimmungen.

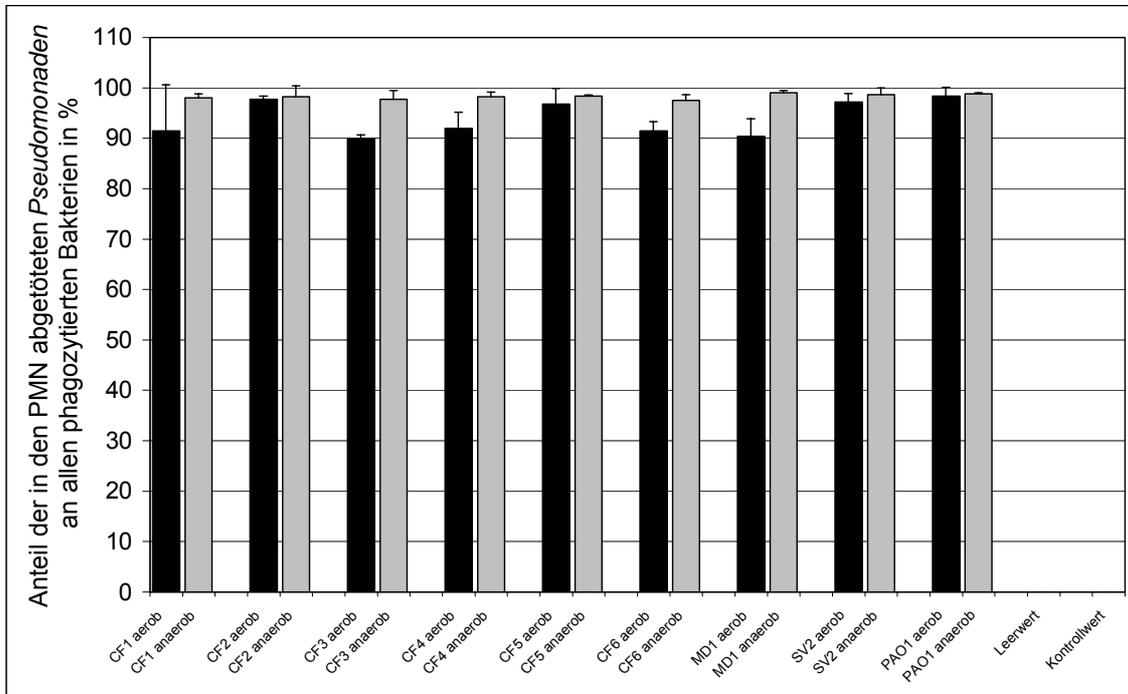


Abbildung 7: Anteil der in den PMN abgetöteten *Pseudomonaden* der Stämme CF1-CF6, MD1, SV2 und PAO1 an allen phagozytierten Bakterien in % nach Phagozytose unter aeroben (■) und anaeroben (□) Bedingungen

3.3 Alginateproduktion während der Phagozytose- Experimente unter anaeroben Bedingungen

Mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung konnte gezeigt werden, dass alle *Pseudomonaden*stämme sowohl im Pellet als auch im Überstand nach 90 min Inkubationszeit unter anaeroben Bedingungen Alginate-positiv waren. Ebenso konnten zahlreiche sich in den PMN befindende Alginate-positiv *Pseudomonaden* nachgewiesen und damit eine erfolgreich stattgefunden Phagozytose trotz Alginatsynthese bewiesen werden (Abbildung 8).

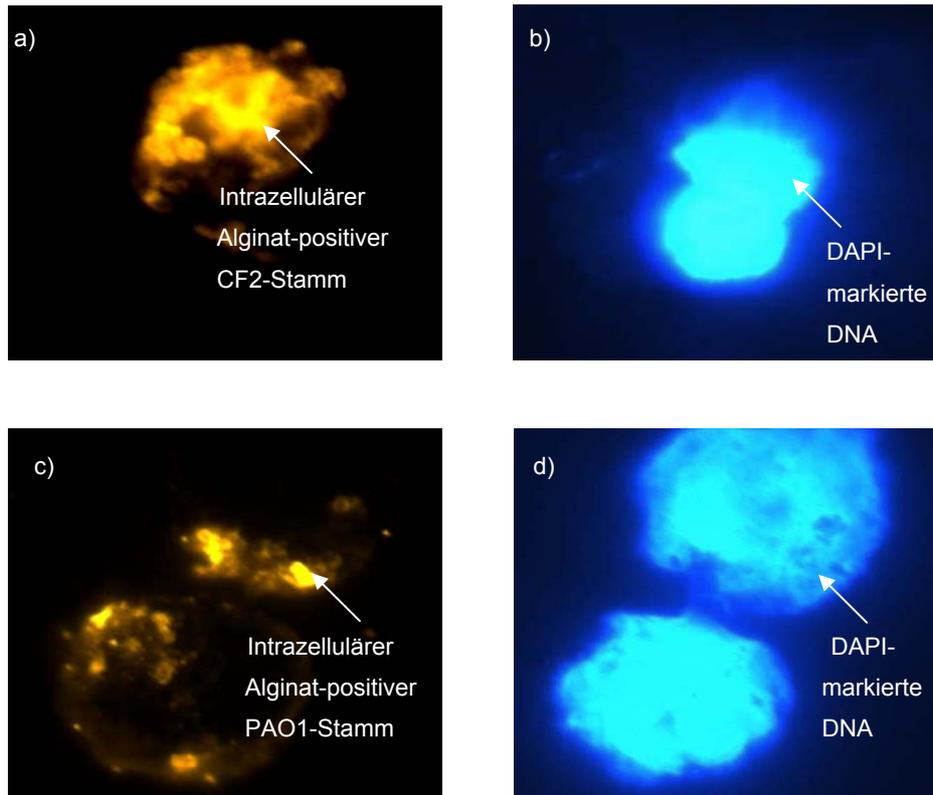


Abbildung 8: Ergebnis der indirekten Immunfluoreszenzfärbung zweier Versuchsansätze nach Durchführung der Phagozytose-Experimente unter anaeroben Bedingungen. Darstellung der stattgefundenen Phagozytose von mukoidem *P. aeruginosa* mittels PMN durch Nachweis sich intrazellulär befindender Alginat-positiver *Pseudomonaden*. Auch hier wurde DAPI zur Markierung von bakterieller und zellulärer DNA verwendet, um fluoreszierendes Material auf PMN und Bakterien zurückführen zu können (2.5).

a) stark Alginat-positiver, intrazellulärer CF2-Stamm nach 90 min Inkubationszeit unter anaeroben Bedingungen

b) wie a), aber unter Anwendung eines speziellen mikroskopischen Filters zur Darstellung der DAPI markierten DNA des CF2-Stammes und des PMN

c) stark Alginat-positiver, intrazellulärer PAO1-Stamm nach 90 min Inkubationszeit unter anaeroben Bedingungen

d) wie c), aber unter Anwendung eines speziellen mikroskopischen Filters zur Darstellung der DAPI-markierten DNA des PAO1-Stammes und der PMN

3.4 Zugabe von Nitrat hat keinen Einfluss auf die Alginatproduktion

Unter anaeroben Bedingungen dient Nitrat *P. aeruginosa* zur Abdeckung des Energiebedarfs (2.8). Deshalb galt es zu untersuchen, ob eine Nitratzugabe

während der Phagozytose-Experimente unter anaeroben Bedingungen einen Einfluss auf die Alginsynthese besitzen würde.

Bei allen mit und ohne Nitrat inkubierten Stämmen (CF1-4 und CF6) ergab die Auswertung der Ansätze mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung keinen Unterschied hinsichtlich der Alginsynthese, so dass Nitrat den Phagozytose-Experimenten unter anaeroben Bedingungen nicht extra zugegeben werden musste (*Abbildung 9*).

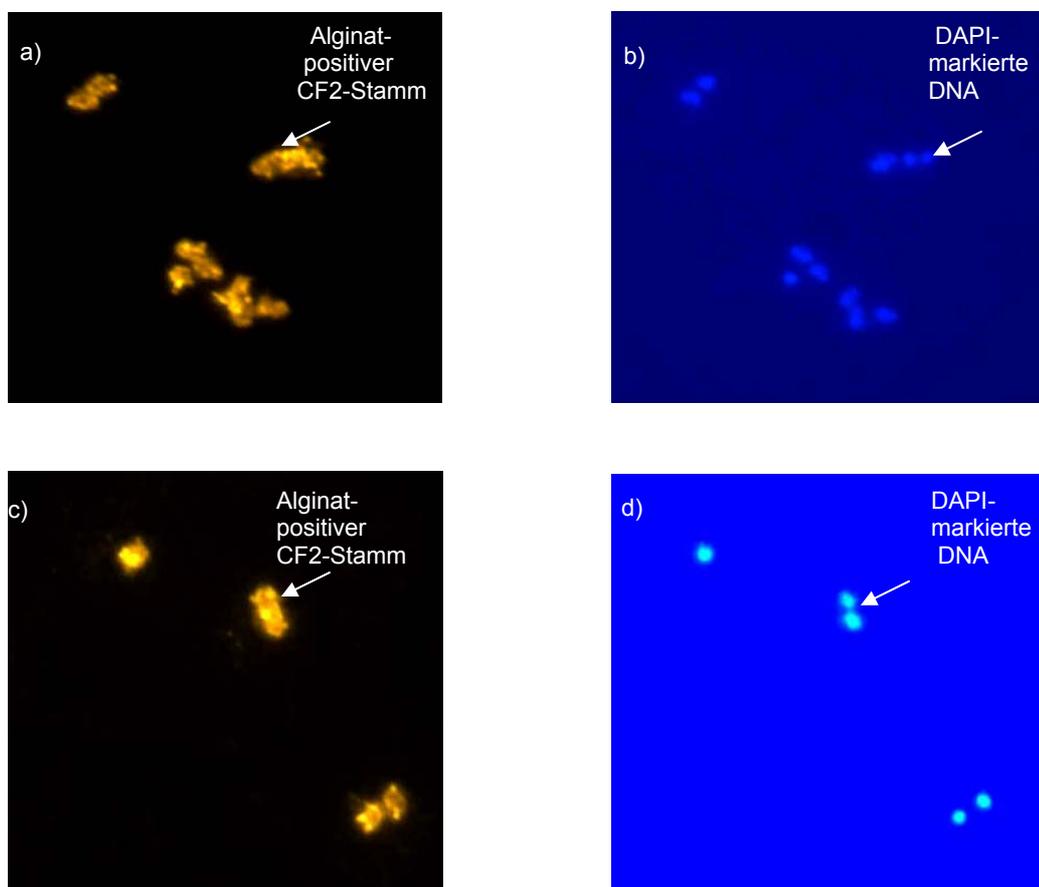


Abbildung 9: Ergebnis der indirekten Immunfluoreszenzfärbung zweier Versuchsansätze nach Durchführung der Phagozytose-Experimente unter anaeroben Bedingungen mit und ohne Nitratzugabe. Unter Verwendung von DAPI Darstellung bakterieller DNA zur Identifikation fluoreszierender Partikel mit den Bakterien (2.5).
a) Alginat-positiver CF2-Stamm nach 90 min Inkubationszeit unter anaeroben Bedingungen mit Zugabe von Nitrat
b) wie a), aber unter Anwendung eines speziellen mikroskopischen Filters zur Darstellung der DNA des CF2-Stammes
c) Alginat-positiver CF2-Stamm nach 90 min Inkubationszeit unter anaeroben Bedingungen ohne Zugabe von Nitrat

d) wie c), aber unter Anwendung eines speziellen mikroskopischen Filters zur Darstellung der DNA des CF2-Stammes

3.5 Einfluss von LPS-Modifikationen auf die Phagozytose und das Abtöten durch PMN nach Zugabe von DPI unter aeroben Bedingungen

Um unter aeroben Bedingungen eine Ausschaltung der Sauerstoffradikale gewährleisten zu können, wurde DPI eingesetzt (2.9). So konnte es bei Vermeidung der Alginat-Synthese ermöglicht werden, dass das Abtöten der *Pseudomonaden* ausschließlich auf CAMP zurückzuführen war.

Unter diesen Bedingungen hatte bei allen Stämmen eine erfolgreiche Phagozytose stattgefunden. Die Mittelwerte der Phagozytoseraten lagen hier zwischen $86,1\% \pm 8,3$ (CF3) und $96,8\% \pm 0,4$ (SV2) (Abbildung 10).

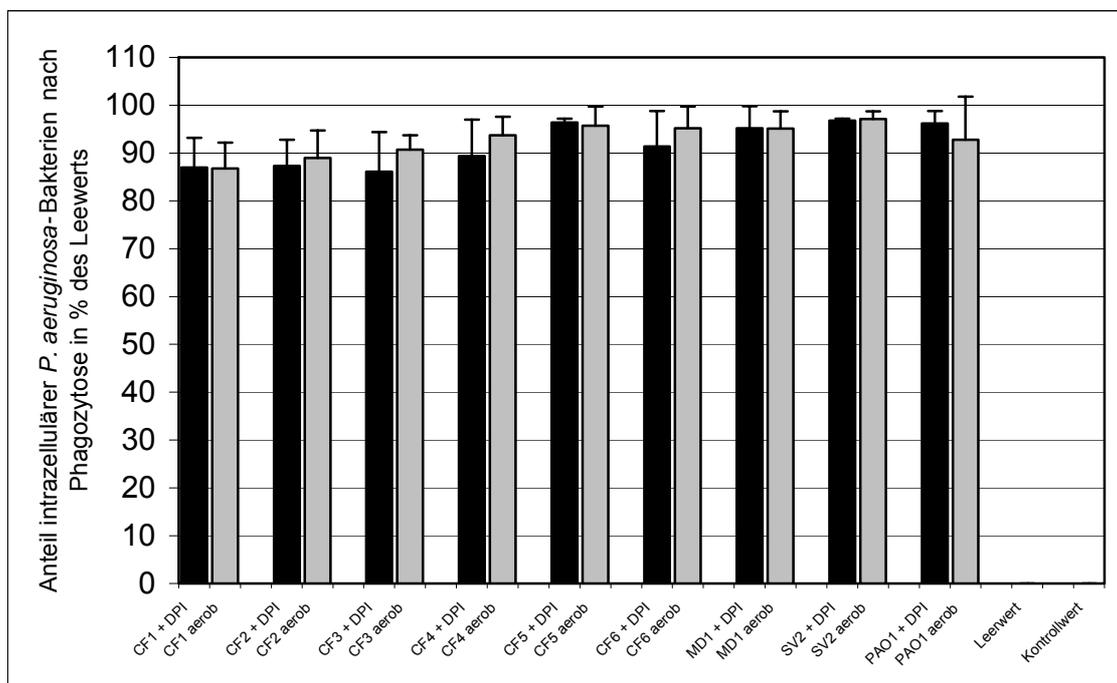


Abbildung 10: Anteil intrazellulärer Bakterien der *Pseudomonas*-Stämme CF1-CF6, MD1, SV2 und PAO1 nach Phagozytose unter aeroben Bedingungen mit (■) und ohne (□) Zugabe von DPI in % des Leewerts

Ebenso erfolgreich war das intrazelluläre Abtöten (absolute Abtöten) durch die PMN: dieses lag mit der niedrigsten Rate bei 87,8% ± 3,0 (CF3) und mit der höchsten Rate bei 93,8% ± 5,3 (PAO1) (Abbildung 11). Hier zeigte sich, dass trotz des DPI bedingten Ausschaltens der Sauerstoffradikale in den PMN ein nahezu vollständiges intrazelluläres Abtöten stattfand. Somit zeigten die LPS-modifizierten *Pseudomonas*-Stämme keine ausreichenden Resistenzen gegenüber dem CAMP-vermittelten Abtöten.

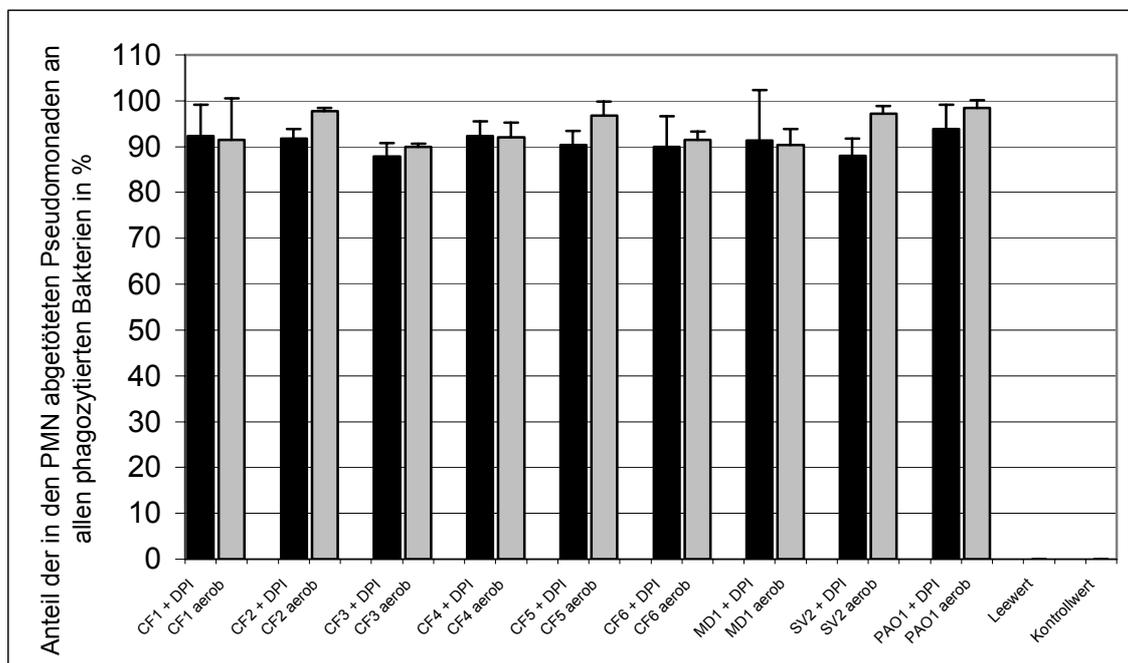


Abbildung 11: Anteil der in den PMN abgetöteten *Pseudomonaden* der Stämme CF1- CF6, MD1, SV2 und PAO1 an allen phagozytierten Bakterien in % nach Phagozytose unter aeroben Bedingungen mit (■) und ohne (□) Zugabe von DPI

4. DISKUSSION

Alginsynthese und Modifikation von LPS gelten bei *P. aeruginosa* als wesentliche Virulenzfaktoren, deren Auftreten mit dem Vorliegen veränderter Umweltbedingungen assoziiert werden (*Worlitzsch et al., 2002; Zielinski et al., 1992; Ernst et al., 1999*). Ernst et al. gelang es, durch modifizierte LPS-Strukturen induzierte Resistenzen gegenüber einzelnen in PMN enthaltenen CAMP nachzuweisen (*Ernst et al., 1999*). Dabei konnte gezeigt werden, dass die in Magnesium-limitiertem Medium kultivierten *P. aeruginosa* Wildtypen PAO1 und PAK eine veränderte Struktur ihres Lipopolysaccharids aufwiesen. Diese Modifikation entsprach einer Addition von Palmitat und Aminoarabinose an das Lipid A. Für den modifizierten Wildtyp PAK konnte anschließend nachgewiesen werden, dass er gegenüber zwei gereinigten kationischen Peptiden, C18G und Polymyxin, Resistenzen entwickelt hatte und von diesen nicht mehr vollständig abgetötet werden konnte. Ferner konnte gezeigt werden, dass eine Abnahme der Magnesiumkonzentration in dem zur Kultivierung von *Pseudomonas* verwendeten Medium mit einer zunehmenden Resistenz gegenüber den genannten kationischen Peptide einherging (*Abbildung 12*). Die Lipid A-Modifikationen, welche für die Wildtypen PAK und PAO1 nach Anwachsen unter veränderten Umweltbedingungen von Ernst et al. gezeigt werden konnten, ließen sich ebenso in von CF-Patienten isolierten *Pseudomonas*-Stämmen nachweisen (*Ernst et al., 1999*).

Basierend auf diesen Ergebnissen konzentrierte sich die vorliegende Studie darauf zu untersuchen, ob von CF-Patienten isolierte LPS-modifizierte *P. aeruginosa*-Stämme einen Einfluss auf die PMN vermittelte Phagozytose und/oder das intrazelluläre Abtöten haben. Bei nahezu vollständiger Phagozytose und vollständigem intrazellulärem Abtöten zeigten die Ergebnisse der Phagozytose-Experimente unter aeroben Bedingungen (*Abbildung 6, Abbildung 7*), dass Lipid A-Modifikationen keinen Einfluss auf diese von PMN vermittelten Immunreaktionen hatten. An dieser Stelle muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass unter aeroben Bedingungen das intrazelluläre

Abtöten sowohl durch CAMP als auch durch Sauerstoffradikale stattfinden konnte. Daraus folgernd ist also festzustellen, dass bei vorliegenden Resistenzen gegenüber einzelnen CAMP diese entweder nicht ausreichten, um ein intrazelluläres Abtöten zu verhindern oder dass die Resistenzen wegen der hohen Toxizität der Sauerstoffradikale keine Wirkung zeigten. Um zwischen jenen beiden Interpretationsmöglichkeiten differenzieren zu können, mussten Bedingungen geschaffen werden, welche die toxische Wirkung der Sauerstoffradikale verhinderten. Aus diesem Grund wurden die Phagozytose-Experimente unter anaeroben Bedingungen durchgeführt; dadurch konnte die Synthese der Sauerstoffradikale unterbunden werden.

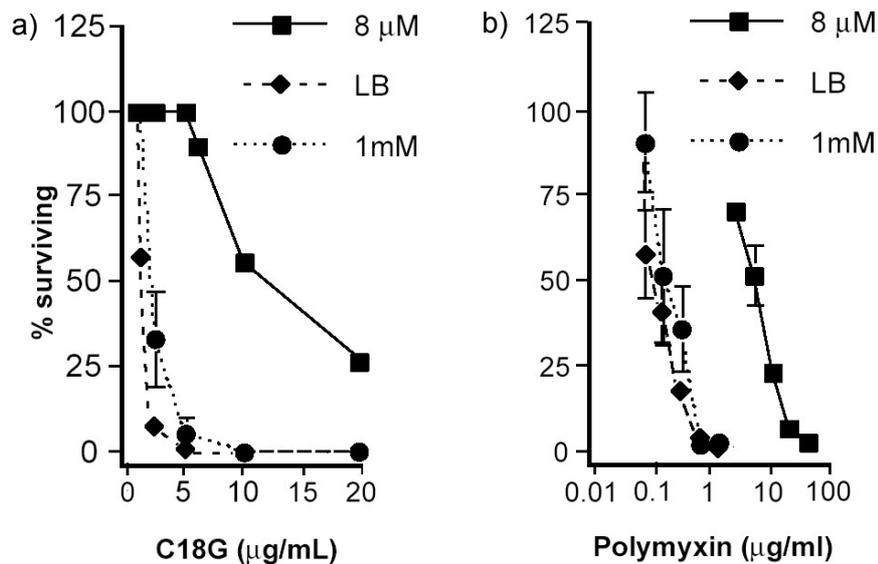


Abbildung 12: Wachstum des *P. aeruginosa*-Wildtyps PAK in Medien mit unterschiedlichem Magnesiumgehalt (8µM und 1mM) und Resistenzen gegenüber den kationischen Peptiden C18G und Polymyxin (Ernst et al., 1999).

a) erhöhte Resistenz von PAK gegenüber C18G nach Kultivierung in Medien mit unterschiedlicher Magnesium-Konzentration (8µM und 1mM) und nach Kultivierung in Medium ohne Magnesium (LB)

b) erhöhte Resistenz von PAK gegenüber Polymyxin nach Kultivierung in Medien mit unterschiedlicher Magnesium-Konzentration (8µM und 1mM) und nach Kultivierung in Medium ohne Magnesium (LB)

Hier zeigten die Ergebnisse im Vergleich zu den Experimenten unter aeroben Bedingungen eine bei allen Stämmen unterschiedlich starke Veränderung der Phagozytose (*Abbildung 6*). Für den Stamm CF2 konnte dabei eine signifikante Verminderung der Phagozytose nachgewiesen werden (3.2). Das absolute Abtöten in den PMN hatte hingegen immer zu mehr als 95% stattgefunden. Diese Beobachtungen lassen erkennen, dass die durch LPS-Modifikationen induzierten CAMP-Resistenzen auch bei Ausschalten der Sauerstoffradikale keine Auswirkung auf das Abtöten hatten. Die von Ernst et al. formulierte These, Lipid A-Modifikation könne durch Resistenzentwicklung gegenüber einzelnen CAMP Ursache für eine persistierende Kolonialisierung oder ein verlängertes Überleben der *Pseudomonaden* in der CF-Lunge sein, konnte folglich nicht bekräftigt werden (*Ernst et al., 1999*).

Wie aber ließen sich die Veränderungen der Phagozytose unter anaeroben Bedingungen erklären? Die Tatsache, dass *P. aeruginosa* unter anaeroben Bedingungen in der Lage ist, das Exopolysaccharid Alginat zu synthetisieren (*Hassett, 1996*) ließ annehmen, dass eine solche Synthese während der Experimente stattgefunden hatte. Diese Vermutung wurde mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung für alle Stämme bestätigt (3.3). Die Hypothese, Alginat habe einen Einfluss auf die Phagozytose durch PMN, konnte jedoch nicht bewiesen werden: obwohl bei allen Alginat-positiven Stämmen die Phagozytose im Unterschied zu Experimenten unter aeroben Bedingungen unterschiedlich stark vermindert war (*Abbildung 6*), konnte nur für einen Stamm (CF2) eine signifikante Veränderung der Phagozytose gezeigt werden (3.2).

Schwarzmann et al. hatten nachgewiesen, dass mukoider *P. aeruginosa* von PMN ebenso vollständig phagozytiert und abgetötet wird wie nicht-mukoider *P. aeruginosa* (*Schwarzmann et al., 1971*): aus Kaninchen gewonnene PMN wurden mit mukoidem *Pseudomonas* (von einem CF-Patienten isoliert) in den Verhältnissen 1:1, 2:1 und 9:1 für 2 h inkubiert. Um die PMN zur Phagozytose anzuregen, wurde Kaninchenserum zugegeben. Ein zweites Experiment zeigte allerdings eine nahezu vollständige Inhibition der Phagozytose: vor Beginn der

Inkubationszeit wurde ein stark mukoides *Pseudomonas*-Isolat für 3 h zentrifugiert und der dabei gewonnene Überstand den einzelnen Versuchsansätzen zusätzlich zugegeben. Schwarzmann et al. bezeichneten diesen Überstand als Schleim; es handelte sich dabei um Alginat. Ab einer Konzentration von 1% verhinderte dieser Schleim die Phagozytose mukoider *Pseudomonaden* durch PMN vollständig (Schwarzmann et al., 1971). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass Alginatproduktion ab einer bestimmten Konzentration durchaus mit einer Verminderung der Phagozytose assoziiert werden kann. Möglicherweise waren die Inkubationszeiten der vorliegenden Studie von nur 90 Minuten für die *Pseudomonas*-Stämme aber nicht ausreichend, um durch eine maximale Alginatproduktion eine Phagozytose-Inhibition zu erreichen.

Learn et al. konnten eine Alginat-induzierte Resistenz von *P. aeruginosa* gegenüber von PMN synthetisierten radikalen Sauerstoffspezies (ROS) zeigen (Learn et al., 1987). Da in der vorliegenden Arbeit eine Alginatsynthese nur unter anaeroben Bedingungen, welche eine Synthese von Sauerstoffradikalen in den PMN verhinderten, stattfand, konnten die Ergebnisse von Learn et al. nicht untersucht werden. Keine Übereinstimmung findet sich ferner mit dem Nachweis von Resistenzen Alginat-positiver *Pseudomonaden* gegenüber der Phagozytose durch andere Immunabwehrzellen (Oliver et Weir, 1985; Simpson et al., 1988). In diesen beiden genannten Studien wurden allerdings keine humanen PMN verwendet, sondern Alveolarmakrophagen von Schafen und Peritonealmakrophagen der Maus. Ein weiterer Unterschied bestand in der Zusammensetzung der Versuchsansätze: es wurde nicht-mukoider *P. aeruginosa* eingesetzt und von mukoiden Stämmen isoliertes Alginat zugegeben. Ähnlich wie bei der von Schwarzmann et al. durchgeführten Studie (Schwarzmann et al., 1971) könnte auch hier eine unterschiedlich hohe Alginatkonzentration in den jeweiligen Phagozytose-Experimenten die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der zitierten Studien und der vorliegenden Arbeit erklären.

Die Durchführung der Phagozytose-Experimente unter anaeroben Bedingungen hatte die Ausschaltung der Sauerstoffradikale ermöglicht, andererseits aber zu einer Synthese von Alginat geführt. Um belegen zu können, dass LPS-Modifikationen auch in Abwesenheit von Alginat keinen Einfluss auf die Phagozytose und das Abtöten hatten, mussten die Experimente folglich unter aeroben Bedingungen und bei gleichzeitiger Unwirksamkeit der Sauerstoffradikale stattfinden. Durch die Anwendung von DPI als NADPH-Oxidase-Hemmer konnten diese Konditionen geschaffen werden. Im Vergleich zu den Experimenten unter aeroben Bedingungen ohne Zugabe von DPI wiesen die Ergebnisse hierbei keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der Phagozytose und des absoluten Abtötens auf (*Abbildung 10 und Abbildung 11*): bei vollständiger Wirksamkeit von DPI hatten modifizierte LPS-Strukturen auch unter Ausschluss der Alginsynthese folglich keinen Einfluss auf beide Prozesse.

Um Alginat unter anaeroben Bedingungen synthetisieren zu können, benötigt *P. aeruginosa* zur ausreichenden Abdeckung des Energiebedarfs Nitrat (*Hassett, 1996*). Da PMN sowohl Nitrit als auch Nitrat produzieren (*Moilanen et Vepaatalo, 1995*), wurde den Ansätzen vorerst jedoch kein Nitrat zugegeben. Auch konnte gezeigt werden, dass unter anaeroben Bedingungen ab einer bestimmten Konzentration bereits vorhandenen Nitrats eine weitere Nitratzugabe nicht mit einer gesteigerten Alginatproduktion von *P. aeruginosa* einhergeht (*Worlitzsch et al., 2002*). Um trotzdem einen möglichen Nitratmangel auszuschließen, wurde Nitrat einigen Ansätzen beigefügt und die Alginatproduktionen anschließend mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenzfärbung verglichen. Bei der Auswertung (*Abbildung 9*) konnte zwar optisch kein Unterschied festgestellt werden. Eine tatsächliche Quantifizierung der Alginatproduktion konnte mit dieser Methode aber nicht stattfinden.

Welchen Einfluss auf die Ergebnisse der vorliegenden Studie hatte die Dauer der Inkubationszeit? Es stellt sich hier die Frage, ob 90 Minuten unter

anaeroben Bedingungen für *P. aeruginosa* ausreichend waren um die selbe Menge an Alginat synthetisieren zu können, welche bei Kolonialisierung in der CF-Lunge gebildet wird und dort eine Rolle spielt. Ein direkter Vergleich mit der Situation in vivo kann hier nur schwer gezogen werden; der Nachweis hypoxischer bzw. anaerober Aereale in der Lunge von CF-Patienten lässt vermuten, dass *P. aeruginosa* dieser Stresssituation wesentlich länger ausgesetzt ist.

Die beiden Alginat bildenden Säuren D-Mannuronsäure und L-Guluronsäure sind innerhalb des Alginat-Moleküls unterschiedlich angeordnet (*Russell et al., 1988*). Der Mannuronsäuregehalt beträgt dabei zwischen 26 und 91% (*Learn et al., 1987*) und ist zu 3-4% an einer OH-Gruppe acetyliert (O-acetyliert) (*Davidson et al., 1977*). Dabei korreliert der Grad der Acetylierung mit der Viskosität von *P. aeruginosa* (*Evans et Linker, 1973*). Ebenso konnte gezeigt werden, dass O-Acetylierung von Alginat die Resistenz von *P. aeruginosa* gegenüber Antikörper-unabhängigem Abtöten und gegenüber Alginat-spezifischen nicht-opsonisierenden Antikörpern erhöht (*Pier et al., 2001*). Mai et al. gelang es nachzuweisen, dass das Molekulargewicht und die Höhe der Viskosität von Alginat signifikant mit dessen Einfluss auf die Aktivität von Neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten korrelieren (*Mai et al., 1993*). Ob eine Inkubationszeit größer 90 Minuten gleichbedeutend mit erhöhter Alginatproduktion und einer vielleicht doch noch resultierenden Veränderung der Phagozytose gewesen wäre, muss unter diesem Gesichtspunkt unbeantwortet bleiben. In dieser Hinsicht konnte die Methode nicht modifiziert werden, da eine Verlängerung der Inkubationszeit während der Experimente mit einem Überleben der PMN in vitro nicht vereinbar gewesen wäre.

Es gilt auch zu bedenken, dass die Phagozytose-Experimente dieser Studie entweder unter strikt aeroben oder strikt anaeroben Bedingungen durchgeführt wurden. Dies bedeutet, dass alle diejenigen Konstellationen der mit *P. aeruginosa* kolonialiserten Lungenareale außer Acht gelassen wurden, die sich zwischen einer regelrechten Sauerstoffversorgung und dem Zustand der Anoxie

befinden. Ebenso wenig berücksichtigt wurde das Vorkommen der in der CF-Lunge vorhandenen Mukusmassen, deren hohe Viskosität die Beweglichkeit von *P. aeruginosa* ebenso hemmt wie die Diffusion von Sensor-Proteinen und L-Homoserin-Lacton (C12HSL), was wiederum die Bildung von Mikrokolonien anregt (unveröffentlichte Daten von Matsui et al., Chapel Hill, USA). Des Weiteren wird die Migration der PMN erschwert, so dass eine schnelle Phagozytose nicht mehr möglich ist und das Entstehen von Mikrokolonien weiter begünstigt wird (unveröffentlichte Daten von M. Ulrich). In der vorliegenden Studie fanden die Phagozytose-Experimente jedoch in Suspension statt, in welcher maximale Diffusion herrschte.

Wenn durch Lipid A-Modifikationen induzierte CAMP-Resistenzen keine hinreichende Erklärung für die hohe Persistenz bei Infektion mit *P. aeruginosa* bieten, welche Funktion könnten diese veränderten LPS-Strukturen dann haben? Während bei Umwelt-Isolaten von *P. aeruginosa* das LPS vor allem in penta-acetylierter Form vorliegt, ist bei Isolaten von CF-Patienten hauptsächlich eine hexa-acetylierte Form zu finden (Ernst et al., 1999). Diese Eigenschaft spielt bei der Interaktion mit dem Toll-like-Rezeptor 4 (Tlr4) eine wesentliche Rolle. Bei Tlr4 handelt es sich um einen trimolekularen Rezeptorkomplex, der aus den beiden Co-Rezeptoren CD14 und MD-2 besteht (Hajjar et al., 2002). Dieser Rezeptorkomplex befindet sich unter anderem auf Monozyten. Das hexa-acetylierte LPS wird von Tlr4 bereits in wesentlich niedrigerer Konzentration erkannt als das penta-acetylierte (Hajjar et al., 2002). Auch in Bezug auf die Produktion der (pro)inflammatorischen Zytokine Interleukin-8 (IL-8) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) gibt es zwischen beiden Formen erhebliche Unterschiede: das hexa-acetylierte LPS wirkt hier 100fach stimulierender als das penta-acetylierte LPS (Hajjar et al., 2002).

Das Nicht-Erkennen oder verschlechterte Erkennen von penta-acetyliertem LPS könnte für eine beginnende Kolonialisierung bzw. eine erleichterte Primärinfektion verantwortlich gemacht werden. Die durch fehlende pulmonale Clearance bedingte Persistenz der *Pseudomonaden* mit anschließender LPS-

Modifikation zur hexa-acetylierten Form wäre dann als Auslöser bzw. Stimulator für eine gesteigerte inflammatorische Reaktion verantwortlich, die wiederum eine Verschlechterung der pulmonalen Funktion durch direkte Schädigung des Lungengewebes zur Folge hätte. Bereits vor der Besiedlung mit Keimen lassen sich bei jungen CF-Patienten inflammatorische Reaktionen mit erhöhtem Gehalt an PMN, Elastase und Zytokinen in den Atemwegen nachweisen (*Balough et al., 1995*).

Letztendlich könnte dies zu der Annahme führen, dass LPS-Modifikationen bei Infektion mit *P. aeruginosa* nicht etwa durch Verhinderung von Phagozytose und intrazellulärem Abtöten durch PMN eine erhöhte Persistenz der Erreger zur Folge haben, sondern durch Hervorrufen einer verstärkt inflammatorischen Reaktion und der damit einhergehenden Zerstörung von Lungengewebe bei an CF-Erkrankten eine wesentliche Rolle spielen.

Abschließend lässt sich feststellen, dass unter den bei dieser Studie angewandten Bedingungen modifizierte LPS-Strukturen im Sinne von Lipid A-Veränderungen keinen Einfluss auf die Phagozytose und das intrazelluläre Abtöten von *P. aeruginosa* durch humane PMN hatten. Ebenso ließ sich kein Einfluss von Alginat auf das intrazelluläre Abtöten durch PMN feststellen. Eine Alginat-induzierte Veränderung der Phagozytose durch PMN konnte nicht bewiesen werden, da lediglich für einen der Bakterienstämme eine signifikante Verminderung der Phagozytose gezeigt werden konnte. Unter diesen Gesichtspunkten bieten beide Virulenzfaktoren keine hinreichende Erklärung für die bei CF-Patienten vorliegende hohe Persistenz von *P. aeruginosa* und die damit einhergehende chronisch pulmonale Infektion.

5. ZUSAMMENFASSUNG

CF-Patienten leiden gehäuft an chronischen *P. aeruginosa*-Infektionen der Atemwege, welche unterschiedlich schwere Krankheitsbilder nach sich ziehen. Diese werden mit unter veränderten Umweltbedingungen auftretenden Modifikationen im LPS-Molekül von *P. aeruginosa* korreliert. In vitro Untersuchungen von Ernst et al. legen nahe, dass durch Addition von Palmitat und Aminoarabinose modifiziertes LPS bei der nicht-oxidativen Immunabwehr durch kationische Peptide *Pseudomonas*-Stämme resistent machen und schwere Krankheitsverläufe zur Folge haben kann (Ernst et al, 1999).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, diese These zu untersuchen. Dafür wurden unterschiedliche von CF-Patienten isolierte modifizierte LPS-Stämme der oxidativen und nicht-oxidativen Phagozytose durch humane polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) ausgesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass LPS-Modifikationen bei *P. aeruginosa* unter keiner der gewählten experimentellen Bedingungen Einfluss auf die Phagozytose und das intrazelluläre Abtöten durch PMN hatten. Alle Bakterien-Stämme wurden nach erfolgreicher Phagozytose zu über 90% intrazellulär abgetötet.

In viskösem Mukus, der in der CF-Lunge auf deren Epithel zu finden ist, treten lokal anaerobe Umgebungsbedingungen auf. Unter diesen Bedingungen bildet *P. aeruginosa* verstärkt Alginate, ein Makropolysaccharid, das in der Literatur ebenfalls als Schutz gegenüber der Phagozytose durch PMN angesehen wird. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Alginate auf die Phagozytose und das intrazelluläre Abtöten durch PMN zu den selben experimentellen Bedingungen untersucht wie für die LPS-Modifikationen. Dabei konnte nur für einen Alginate-positiven Stamm eine signifikante Veränderung der Phagozytose gezeigt werden. Alle anderen Alginate-positiven *Pseudomonaden* wurden zu über 70% phagozytiert und anschließend intrazellulär zu über 90% abgetötet.

Während LPS-Modifikationen nach Ergebnis dieser Studie keine hinreichende Erklärung für die chronische Persistenz von *P. aeruginosa* bei CF-Patienten bieten, bleibt der Einfluss von Alginat weiter ungeklärt. Es gilt nun zu untersuchen, ob nicht vielmehr die Interaktion zwischen modifiziertem LPS und dem Toll-like-Rezeptor 4 auf verschiedenen Immunabwehrzellen durch gesteigerte inflammatorische Reaktion für die Schwere des Krankheitsbildes bei Infektion von CF-Patienten mit *P. aeruginosa* verantwortlich sein könnte. Ebenso gilt es, die Bedeutung anderer pulmonaler Umgebungsbedingungen wie Viskosität oder Makrokoloniebildung näher zu betrachten.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Babior BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *New. Engl. J. Med.* 1978; 298: 659-668
2. Balough K, McCubbin M, Weinberger M, Smits W, Ahrens R, Fick R. The relationship between infection and inflammation in the early stages of lung disease from cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 1995; 20: 63-70
3. Baltimore RS, Cross AS, Dobek AS. The inhibitory effect of sodium alginate on antibiotic activity against mucoid and non-mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1987; 20: 815-823
4. Bear CE, Li C, Kartner N, Bridges RJ, Jensen TJ, Ramjeesingh M, Riordan JR. Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell* 1992; 68: 809-818
5. Beutler B. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr. Opin. Immunol.* 2000; 12: 20-26
6. Bolister N, Basker M, Hodges NA, Marriott C. The diffusion of beta-lactam antibiotics through mixed gels of cystic fibrosis-derived mucin and *Pseudomonas aeruginosa* alginate. *J. Antimicrob. Chemoth.* 1991; 27: 285-291
7. Boucher JC, Yu H, Mudd MH, Deretic V. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: characterization of *muc* mutations in clinical isolates and analysis of clearance in a mouse model of respiratory infection. *Infect. Immun.* 1997; 65: 3838-3846
8. Boucher RC. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur. Respir. J.* 2004; 23: 146-158
9. Chang XB, Hou YX, Jensen TJ, Riordan JR. Mapping of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator membrane topology by glycosylation site insertion. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 18572-18575
10. Davidson IW, Southerland IW, Lawson CJ. Localization of O-acetyl groups of bacterial alginate. *J. Gen. Microbiol.* 1977; 98: 603-606
11. Davis PB, Drumm M, Konstan MW. Cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; 154: 1229-1256
12. Döring G, Knight R, Bellon G. Immunology of cystic fibrosis. *Cystic fibrosis* 2000; 109-140

13. Döring G, Ratjen F. Cystic fibrosis molecular cell biology. Meyers, R.A. (Ed.) Encyclopedia of molecular cell biology and molecular medicine 2004
14. Durr M, Peschel A. Chemokines meet defensins: the merging concepts of chemoattractants and antimicrobial peptides in host defense. *Infect. Immun.* 2002; 70: 6515-6517
15. Ernst RK, Yi EC, Guo L, Kheng BL, Burns JL, Hackett M, Miller SI. Specific Lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* 1999; 286: 1561-1565
16. Evans LR, Linker A. Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 1973; 116: 915-924
17. Fick RB. *Pseudomonas* in cystic fibrosis: sylph or sycophant? *Clin. Chest. Med.* 1981; 2: 91-102
18. Ganz T. Defensins and host defense. *Science* 1999; 286:420-442
19. Ganz T. Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. *J. Clin. Invest.* 2002; 109: 693-697
20. Guo L, Kheng BL, Gunn JS, Bainbridge B, Darveaus RP, Hackett M, Miller SI. Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes phoP-phoQ. *Science* 1997; 276: 250-253
21. Guo L, Lim KB, Poduje CM, Daniel M, Gunn JS, Hackett M, Miller SI. Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell* 1998; 95: 189-198
22. Hajjar AM, Ernst RK, Tsai JH, Wilson CB, Miller SI. Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nat. Immunol.* 2002 ; 3: 354-359
23. Hassett DJ. Anaerobic production of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*: Alginate restricts diffusion of oxygen. *J. Bacteriol.* 1996; 178: 7322-7325
24. Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol* 1992; 8: 67-113
25. Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245: 1073-1080

26. Kerem E, Corey M, Kerem BS, Rommens J, Markiewicz D, Levison H, Tsui LC, Durie P. The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis-analysis of the most common mutation (DF508). *N. Engl. J. Med.* 1990; 323: 1517-1522
27. Lam J, Chan R, Lam K, Costerton JW. Production of mucoid microcolonies by *P. aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect. Immun.* 1980; 28: 546-556
28. Learn DB, Brestel EP, Seetharama S. Hypochlorite scavenging by *P. aeruginosa* alginate. *Infect. Immun.* 1987; 55: 1813-1818
29. Lien E, Means TK, Heine H, Yoshimura A, Kusumoto S, Fukase K, Fenton MJ, Oikawa M, Qureshi N, Monks B, Finberg RW, Ingalls RR, Golenbock DT. Toll-like receptor 4 imparts ligand specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J. Clin. Invest.* 2000; 105: 497-504
30. Linker A, Jones RS. A polysaccharide resembling alginic acid from a *pseudomonas* microorganism. *Nature* 1964; 204: 187-188
31. Linker A, Jones RS. A new polysaccharide resembling alginic acid isolated from *pseudomonas*. *J. Biol. Chem.* 1966; 241: 3845-3851
32. Mai GT, Seow WK, Pier GB, McCormack JG, Thong YH. Suppression of Lymphocyte and Neutrophil Functions by *Pseudomonas aeruginosa* Mucoid Exopolysaccharide (Alginate): Reversal by Physiochemical, Alginase, and Specific Monoclonal Antibody Treatments. *Infect. Immun.* 1993; 61: 559-564
33. Mandell GL. Bactericidal Activity of Aerobic and Anaerobic Polymorphnuclear Neutrophils. *Infect. and Immun.* 1974; 9: 337-341
34. Martin DW, Schurr MJ, Mudd MH, Govan JRW, Holloway BW, Deretic V. Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. *Proc Natl. Acad. Sci.* 1993; 90: 8377-8381
35. Meyer KC, Zimmermann J. Neutrophil mediators, *Pseudomonas*, and pulmonary dysfunction in cystic fibrosis. *J. Lab. Clin. Med.* 1993; 121: 654-661
36. Moilanen E, Vepaatalo H. Nitric oxide in inflammation and immune response. *Ann. Med.* 1995; 27: 359-367
37. O'Donnell VB, Tew DG, Jones OTG, England PJ. Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. *Biochem. J.* 1993; 290: 41-49

38. Oliver AM, Weir DM. The effect of *Pseudomonas* alginate on rat alveolar macrophage phagocytosis and bacterial opsonization. Clin. Exp. Immunol. 1985; 59: 190-196
39. Pier GB, Coleman F, Grout M, Franklin M, Ohman DE. Role of Alginate O Acetylation in Resistance of Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to Opsonic Phagocytosis. Infect. Immun. 2001; 69: 1895-1901
40. Pina SE, Mattingly SJ. The role of fluoroquinolones in the promotion of alginate synthesis and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Curr. Microbiol. 1997; 35: 103-108
41. Porro GA, Lee JH, de Azavedo J, Crandall I, Whitehead T, Tullis E, Ganz T, Liu M, Slutsky AS, Zhang H. Direct and indirect bacterial killing functions of neutrophil defensins in lung explants. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2001; 281: 1240-1247
42. Ratjen F, Döring G. Cystic fibrosis. Lancet 2003; 361: 681-689
43. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science 1989; 245: 1066-1073
44. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem BS, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan JR, Tsui LC, Collins FS. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. Science 1989; 245: 1059-1065
45. Rosen GM, Pou S. Free radicals and phagocytig cells. FASEB J 1995; 9: 200-209
46. Russell NJ, Gacesa P. Chemistry and biology of the alginate of mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Mol. Aspects. Med. 1988; 10: 1-91
47. Schwarzmann S, Boring JR. Antiphagocytic effect of slime from a mucoid strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 1971; 3: 762-767
48. Simpson JA, Smith SE, Dean RT. Alginate inhibition of the uptake of *Pseudomonas aeruginosa* by macrophages. J. Gen. Microbiol. 1988; 134: 29-36
49. Simpson JA, Smith SE, Dean RT. Scavenging by alginate of free radicals released by macrophages. Free Radic. Biol. Med. 1989; 6: 347-353

50. Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Cekici A, Meyer KC, Birrer P, Bellon G, Berger J, Weiss T, Botzenhard K, Yankaskas JR, Randell S, Boucher RC, Döring G. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J. Clin. Invest.* 2002; 109: 317-325
51. Zassloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002; 415: 389-395
52. Zielinski NA, Maharaj R, Roychoudhury S, Danganan CE, Hendrickson W, Chakrabarty AM. Alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: environmental regulation of the algC Promoter. *J. Bacteriol.* 1992; 174: 7680-7688

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Gerd Döring für die Vergabe dieser Arbeit, für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Materialien, sowie für die Unterstützung und wertvolle Diskussionen.

Ferner möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Martina Ulrich und Herrn Dr. med. Dieter Worlitzsch für die engagierte Betreuung und Beratung herzlich bedanken.

In den Dank einschließen möchte ich auch alle Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, die mich bei der Ausführung dieser Arbeit unterstützt haben.

Herrn Robert K. Ernst, Departments of Medicine and Microbiology, University of Seattle, USA, möchte ich ebenfalls herzlich danken. Ohne seine freundliche Unterstützung durch Bereitstellung der Bakterienstämme wäre diese Arbeit gar nicht möglich gewesen.

Magnus Pagendarm ein großes Dankeschön für seine Hilfe bei der elektronischen Datenverarbeitung und für seine moralische Unterstützung.

LEBENS LAUF

Name Anne-Katrin Maier

Geburtsdatum 14. September 1979
Geburtsort Freiburg i. Br.

Staatsangehörigkeit deutsch

Familienstand ledig, keine Kinder

Ausbildung

1986-1990 Grundschule Glottertal

1990-1994 Markgräfler Gymnasium Müllheim

1994-1999 Albert-Schweitzer-Gymnasium Gundelfingen

April 2000 Studienbeginn an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

27.03.2002 Ärztliche Vorprüfung

25.03.2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

06.09.2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

14.11.2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung