

Aus dem Institut für Hygiene der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktorin: Prof. Dr. med. habil. Marianne Borneff-Lipp)

**Laktat als anaerobes Stoffwechselprodukt im Sputum von Patienten mit  
Cystischer Fibrose und *in vitro***

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Tobias Bense

geboren am 15.12.1980 in Husum

Gutachter:

## Kurzreferat

Bei Patienten mit Cystischer Fibrose (CF) liegen im Sputum aus der Lunge anaerobe Bedingungen vor. Sowohl die Bakterien, die das Sputum besiedeln, als auch menschliche Zellen können unter anaeroben Bedingungen metabolisieren und dabei Laktat produzieren. In der vorliegenden Arbeit wurde das Vorhandensein, die Quelle und die mögliche klinische Bedeutung von Laktat im CF-Sputum erstmals umfassend untersucht.

Es wurden in Sputen von 25 CF-Patienten Keimidentifikationen, Keimzahlbestimmungen und Laktatmessungen durchgeführt. In *in vitro*-Versuchen wurden Stämme von *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* und *Burkholderia cenocepacia* sowie polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) aus Leukozytenkonzentraten unter aeroben und anaeroben Bedingungen inkubiert, anschließend wurde die jeweilige Laktatkonzentration bestimmt. Es wurde die aerobe und anaerobe Genexpression von *P. aeruginosa* mittels Affymetrix®-microarrays untersucht. Die Lungenfunktionsparameter der Patienten wurden durch Plethysmographie ermittelt.

Laktat wurde in allen Sputen im Bereich von 0,2-14,1 mmol/L ( $2,9 \pm 3,1$  mmol/L Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) nachgewiesen. Unter *in vitro*-Bedingungen produzierte lediglich *S. aureus* Laktat ( $2,8 \pm 0,1$  mmol/L), nicht aber *P. aeruginosa* oder *B. cenocepacia*. PMN produzierten unter anaeroben Bedingungen  $4,8 \pm 3,1$  mmol/L Laktat. Die anaerobe Genexpression von Laktatdehydrogenasen durch *P. aeruginosa* war herunterregelt. Gene, die für Enzyme kodieren, welche für den Metabolismus vom Pyruvat zum Acetyl-CoA zuständig sind, wurden stark erhöht exprimiert (PA3416 275 fach, PA3417 78 fach). Die Lungenfunktion (FEV<sub>1</sub>) der Patienten korrelierte negativ mit der Laktatkonzentration der Sputen ( $r=-0,446$ ,  $p=0,043$ ).

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Laktat in allen CF-Sputen vorhanden ist, hauptsächlich von PMN gebildet wird, und fast nicht durch Bakterien. *P. aeruginosa* nutzt kein Laktat zur Energiegewinnung. Laktat im CF-Sputum könnte daher möglicherweise zukünftig als nichtinvasiver Inflammationsmarker bei CF verwendet werden.

**Bibliographische Angaben:** Bense, Tobias: Laktat als anaerobes Stoffwechselprodukt im Sputum von Patienten mit Cystischer Fibrose und *in vitro*. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 71 Seiten, 2009

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Cystische Fibrose (CF)	1
1.2	Atemwegsinfektion durch <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bei CF	2
1.3	Anaerobe Energiegewinnung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
1.3.1	Nitratatmung	7
1.3.2	Arginin-Fermentation	8
1.3.3	Pyruvatmetabolismus und Laktatproduktion	9
1.4	Anaerobe Genexpression von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
1.5	Bakterielle Laktatproduktion im Sputum von CF-Patienten	11
1.5.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
1.5.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	12
1.5.3	<i>Burkholderia cepacia</i> complex-Bakterien	12
1.6	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) und der Entzündungsprozess	13
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>16</b>
3.1	Patienten	16
3.1.1	Lungenfunktionsuntersuchungen	17
3.2	Laktatmessungen	17
3.3	Produktion und Verbrauch von Laktat durch <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
3.4	Untersuchung der Genexpression von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mit Hilfe von DNA-microarrays	20
3.4.1	Wachstum von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> unter aeroben und anaeroben Bedingungen	20
3.4.2	mRNA-Extraktion	21
3.4.3	Genanalysen	22
3.5	Produktion und Verbrauch von Laktat durch <i>Staphylococcus aureus</i> und <i>Burkholderia cepacia</i>	23
3.5.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	23

3.5.2	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	24
3.6	Sputum	24
3.6.1	Keimidentifikation und Keimzahlbestimmung	24
3.6.2	pH-Wert-Bestimmungen	26
3.7	Laktatproduktion durch polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN)	26
3.8	Statistische Auswertung	28
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>29</b>
4.1	Produktion und Verbrauch von Laktat durch <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
4.2	Untersuchungen der Genexpression von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mit Hilfe von DNA-microarrays	30
4.3	Produktion und Verbrauch von Laktat durch <i>Staphylococcus aureus</i>	34
4.4	Produktion und Verbrauch von Laktat durch <i>Burkholderia cenocepacia</i>	36
4.5	In vivo-Ergebnisse	37
4.5.1	L-Laktat, Keimidentifikation und Keimzahlbestimmung im Sputum	37
4.5.2	Lungenfunktionsuntersuchungen	39
4.5.3	pH-Wert-Bestimmungen	40
4.3	Laktatproduktion durch polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN)	40
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>43</b>
5.1	Laktat im Sputum von CF-Patienten	43
5.2	Bakterielle Laktatproduktion	43
5.2.1	Genexpression von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44
5.3	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) als Quelle des Laktats im Sputum von Patienten mit Cystischer Fibrose	45
5.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Laktatmetabolismus	46
5.5	Anaerobe Energiegewinnung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	46
5.6	Laktat als noninvasiver Entzündungsmarker für die Therapie der chronischen CF-Lungenentzündung	47

<b>6</b>	<b>Schlussfolgerungen</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>50</b>
<b>8</b>	<b>Literatur</b>	<b>54</b>
<b>9</b>	<b>Eigene Veröffentlichungen</b>	<b>64</b>
<b>10</b>	<b>Anhang</b>	<b>67</b>
10.1	Patientendaten	67
10.2	Sputumwerte	68
10.3	Sputumdaten der CF-Patienten	69
<b>11</b>	<b>Thesen</b>	<b>70</b>

**Lebenslauf**

**Selbständigkeitserklärung**

**Erklärung über frühere Promotionsversuche**

**Danksagung**

## Abkürzungsverzeichnis

±	plusminus
%	Prozent
µg	Milligramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ASL	Airway surface liquid
<i>B. cenocepacia</i>	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
°C	Grad Celsius
CF	cystic fibrosis, Cystische Fibrose
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
FEV <sub>1</sub>	forced expiratory volume in one second, Einsekundenkapazität
FVC	forced vital capacity, forcierte Vitalkapazität
g	Gramm
h	Stunde
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
KBE	Koloniebildende Einheiten
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kalium-Dihydrogenphosphat
L	Liter
m	männlich
min	Minute
ml	Milliliter
mM	molare Masse
mmol	Millimol
mRNA	messenger-RNA
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
Nr.	Nummer
OD	optische Dichte

## Abkürzungsverzeichnis

---

O <sub>2</sub>	Sauerstoff
p	Signifikanzwert nach Student's t-test
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
p.i.	per inhalationem
PBS	phosphate buffered saline, phosphat-gepufferte Saline
pH	potentia Hydrogenii
PMN	polymorphonuclear neutrophil, polymorphkernige neutrophile Granulozyten
p.o.	per os
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
r	Pearson'scher Korrelationskoeffizient
RNA	Ribonukleinsäure
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
s	Sekunde/n
SD	Standardabweichung
Tab	Tabelle
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor
U/min	Umdrehung pro Minute
w	weiblich

# 1 Einleitung

## 1.1 Cystische Fibrose (CF)

Die Cystische Fibrose (synonym: Mukoviszidose, cystic fibrosis, CF) ist die häufigste schwerwiegende autosomal rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung in den westlichen Industrieländern. Sie tritt dort mit einer Inzidenz von 1:2500 Lebendgeborenen auf [Ratjen und Döring 2003, Gibson et al. 2003]. CF bewirkt eine generalisierte Dysfunktion exokriner Drüsen. In diesen Drüsen, die in der Lunge, der Galle, dem Pankreas, der Leber, dem Magen-Darm-Trakt und dem Ductus deferens bei männlichen Individuen vorkommen, werden zähe, visköse Sekrete produziert, die die Ausführungsgänge der Organe verlegen und damit zu massiven Komplikationen führen. Die Ursache für CF ist ein Defekt in einem Gen auf dem Chromosom 7, welches für einen transepithelial gelegenen Chloridkanal kodiert [Kerem et al. 1989, Buchwald et al. 1989]. Es wurden bislang über 1500 Mutationen in diesem Gen beschrieben [The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Cystic Fibrosis Mutation Data base. <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>, Zugriff im Dezember 2008]. Der Chloridkanal wird als cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) bezeichnet. Die häufigste Todesursache dieser Erkrankung ist eine chronische Bronchopneumonie.

Es gibt eine begrenzte Anzahl an Keimen, welche die Lunge der CF-Patienten besiedeln. Die häufigsten Bakterien sind *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Stenotrophomonas maltophilia* und *Burkholderia cepacia complex*-Bakterien. Die Besiedelung durch die jeweiligen Keime hängt unter anderem von dem erreichten Lebensalter der Patienten ab. Je älter die Patienten sind, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass sie *P. aeruginosa* in ihren Lungen tragen [Koch und Høiby 1993, Valerius et al. 1991] (Abb. 1.1). Aufgrund der hohen Wahrscheinlichkeit einer *P. aeruginosa*-Besiedelung ist eine frühe und aggressive Behandlung des Keims [Valerius et al. 1991, Döring et al. 2000, Ratjen et al. 2001, Taccetti et al. 2005] indiziert. Eine Impfung gegen *P. aeruginosa* befindet sich zur Zeit noch in der Entwicklung [Döring et al. 2007].



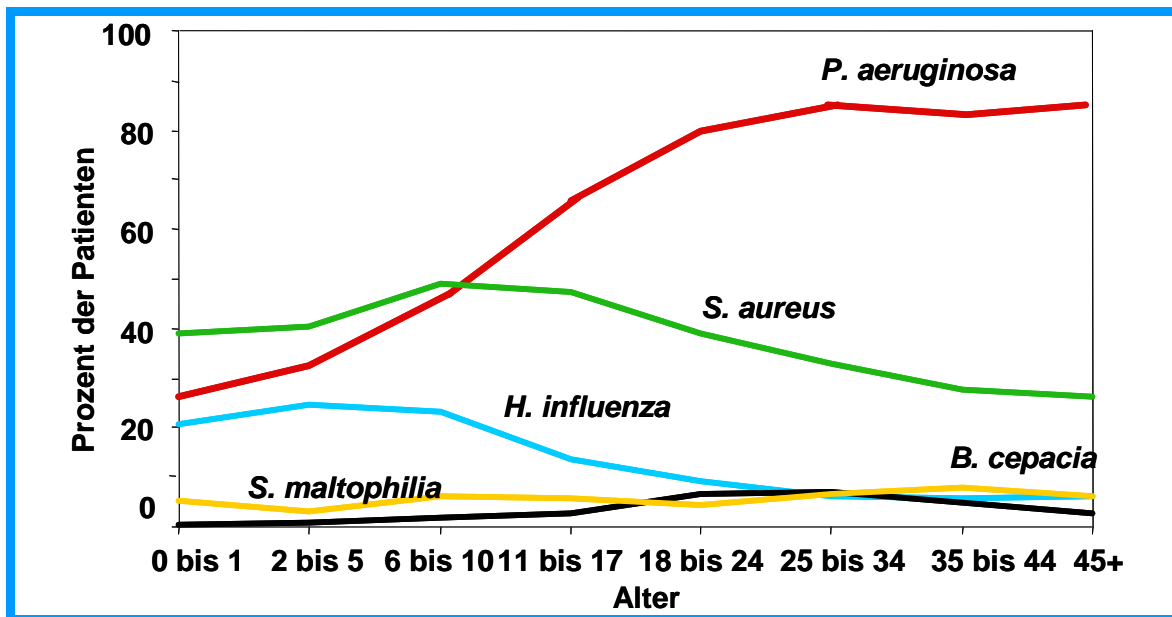


Abbildung 1.1: Altersverteilung der pulmonalen Besiedelung von CF-Patienten mit unterschiedlichen Keimarten (nach [Koch und Høiby 1993]).

## 1.2 Atemwegsinfektion durch *Pseudomonas aeruginosa* bei CF

*P. aeruginosa* ist das wichtigste Bakterium in der Pathogenese von CF [Ratjen und Döring 2003, Gibson et al. 2003, Koch und Høiby 1993]. Es ist ein gramnegatives Stäbchenbakterium und kommt in der Umwelt im Boden, Wasser, in Früchten sowie anderen Lebensmitteln und im Intestinaltrakt von Mensch und Tier vor. Die prägnantesten Manifestationen neben der CF sind Wundinfektionen einschließlich Brandwunden, Osteomyelitiden, Fälle von Sepsis, Endokarditiden und Infektionen des Urogenitaltraktes. *P. aeruginosa* ist ein fakultativ anaerober Erreger, d.h. er bevorzugt die Energiegewinnung unter aeroben Bedingungen, ist aber auch in der Lage, anaerob zu metabolisieren [Hassett 1996].

Die Bedrohlichkeit von *P. aeruginosa* besteht darin, dass dieser Mikroorganismus in der Lage ist, den Mukus, der sich in den Bronchien der CF-Patienten befindet, zu besiedeln [Worlitzsch et al. 2002] (Abb. 1.2, Abb. 1.3). Bei Menschen, welche nicht an CF erkrankt sind, ist die Lunge steril. Die Sterilität wird durch subepitheliale Drüsen erreicht, die permanent einen dünnen Schleim sezernieren. Dieser wird auch als airway surface liquid (ASL) bezeichnet.

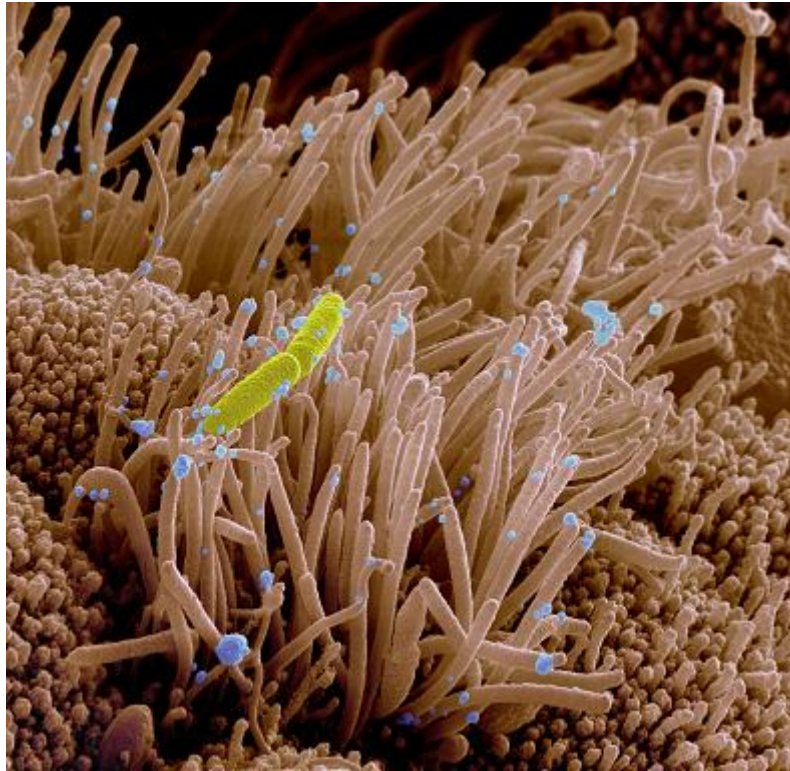


Abbildung 1.2: Kolorierte rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Lokalisation von *P. aeruginosa* (gelb) an dem sezernierten Mukus (blau) auf den Zilien des Lungenepithels. (Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Martina Ulrich, Eberhardt-Karls-Universität Tübingen.)

Durch die ASL und den Zilienschlag der Flimmerhärchen, die sich auf dem respiratorischen Epithel der Lunge befinden, werden infiltrierende Keime oder Staubpartikel ihrer Möglichkeit beraubt, sich in den Bronchien und Bronchiolen abzusetzen. Bei CF-Patienten ist der defekte Chloridkanal (CFTR) nicht mehr in der Lage, Chlorid aus der Epithelzelle heraus zu transportieren. Dadurch strömt Natrium aus dem Extrazellularraum in die Zelle. Dort kommt es zu einer Bildung von Natriumchlorid. Durch das nun intrazelluläre Natriumchlorid diffundiert Wasser aus der ASL passiv in die Zelle. Dadurch wird die ASL immer visköser, da sie immer weiter produziert wird. Deshalb nimmt nicht nur die Viskosität, sondern auch die Dicke des Mukus weiter zu. Nun können Bakterien wie *P. aeruginosa* den Mukus besiedeln. Der Sauerstoffpartialdruck nimmt mit steigender Dicke und Dichte des Mukus immer weiter ab.

Das Absinken des Sauerstoffpartialdruckes hat drei Ursachen. Zum einen verbraucht das Epithel in Bronchien und Bronchiolen Sauerstoff, zum anderen metabolisieren die Keime, welche die Lunge besiedeln, den Sauerstoff. Außerdem nutzen neutrophile Granulozyten Sauerstoffmoleküle zur Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen. Durch diese Mechanismen erhöht sich der Sauerstoffverbrauch in dem Mukus. Daher ändert sich in größeren Tiefen des Mukus das Milieu von aeroben zu anaeroben Bedingungen [Worlitzsch et al. 2002]. Zusätzlich wird die Diffusion der Sauerstoffmoleküle in dem sehr dichten Mukus vermindert (Abb. 1.3).

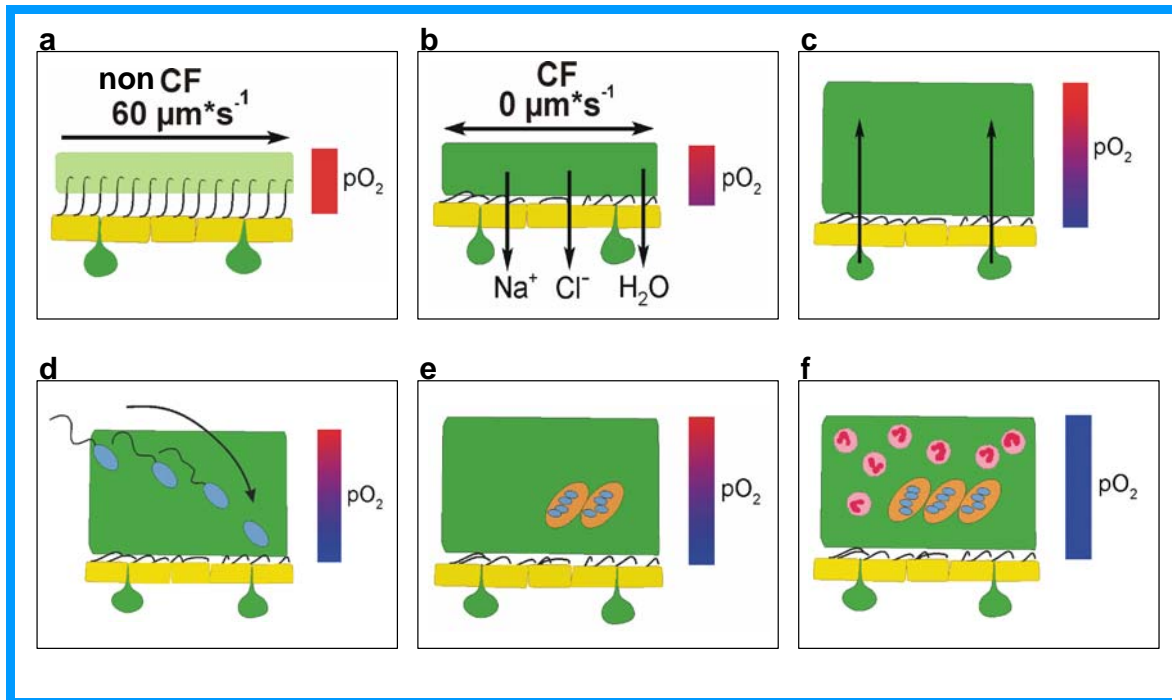


Abbildung 1.3: Schematisches Modell der pathologischen Prozesse der chronischen Besiedelung der Lunge von CF-Patienten durch *P. aeruginosa* [Worlitzsch et al. 2002].

(a) Situation in der Lunge eines Gesunden: Die ASL wird sezerniert (hellgrün) und durch den Zilienschlag der Flimmerhärchen oralwärts abtransportiert. Der Sauerstoffpartialdruck ist normal. (b-f) Lungenepithel von CF-Patienten. (b) Bildung des Mucus. Fließgeschwindigkeit des sezernierten Schleims wird auf  $0 \mu\text{m/s}$  reduziert. Einströmen der Elektrolyte aus dem Mucus und Transport von Wasser in die Epithelzellen. (c) Weitere Sekretion des Mucus; dadurch entsteht ein weitere Volumenzunahme und eine Abnahme des Sauerstoffpartialdruckes. (d) *P. aeruginosa* besiedelt die anaeroben Bereiche des Mucus. (e) *P. aeruginosa* adaptiert sich in den anaeroben Nischen des Mucus und stellt den Stoffwechsel auf anaerobe Verhältnisse um. Es werden Makrokolonien und der Alginatemantel gebildet. (f) Die Lungeninfektion der CF-Patienten ist nun chronisch. Neutrophile Granulozyten (rote Zellen) wandern in den Mucus ein, können aber im anaeroben Milieu nicht gegen *P. aeruginosa* wirksam werden, da sie nicht in der Lage sind, den Alginatemantel zu durchdringen und Sauerstoffradikale zu bilden.

*P. aeruginosa* ist in der Lage, durch Umstellung seines Stoffwechsels unter anaeroben Bedingungen zu überleben [Worlitzsch et al. 2002, Yoon et al. 2002]. Dabei ist der Keim gezwungen, sich dem stark gesunkenen Sauerstoffpartialdruck phänotypisch und genotypisch anzupassen. *P. aeruginosa* bildet unter anaeroben Bedingungen Makrokolonien mit einer Größe von bis zu 100 µm. Diese Makrokolonien werden durch von *P. aeruginosa* gebildetes Alginate umschlossen [Worlitzsch et al. 2002] (Abb. 1.4). Durch diese Barriere werden die menschlichen Abwehrzellen an einer Phagozytose der Bakterien gehindert. Weiterhin trägt der Alginatemantel nochmals zu einer Reduktion des Sauerstoffpartialdrucks bei. Dadurch können die Abwehrzellen keine reaktiven Sauerstoffverbindungen mehr bilden, und sind deshalb eines ihrer wichtigsten antibakteriellen Faktoren beraubt [Worlitzsch et al. 1998, Ratjen und Döring 2003]. Zusätzlich liegt das Wirkoptimum für die meisten Antibiotika im aeroben Bereich, so dass fast alle Antibiotika bei reduziertem Sauerstoffpartialdruck in ihrer Funktion stark eingeschränkt sind [Park et al. 1992, Borriello et al. 2004, Field et al. 2005].

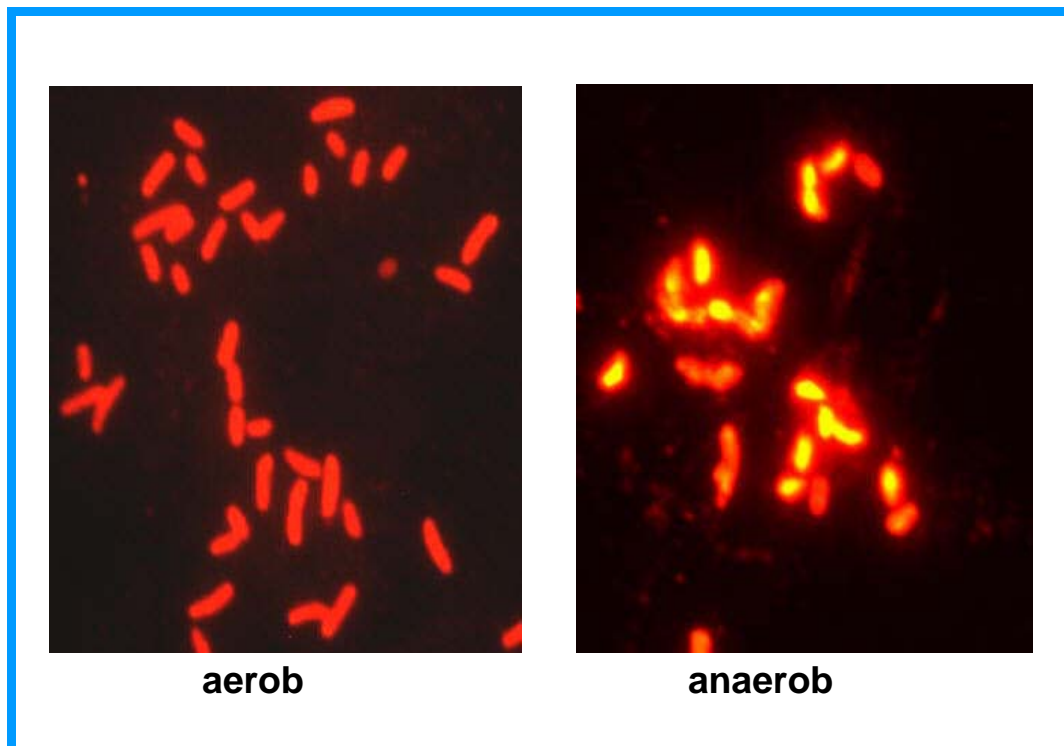


Abbildung 1.4: Alginate-Produktion von *P. aeruginosa* mittels Immunfluoreszenz [Worlitzsch et al. 2002].

## 1.3 Anaerobe Energiegewinnung von *Pseudomonas aeruginosa*

Natürlich hat der verminderte Sauerstoffpartialdruck Auswirkungen auf *P. aeruginosa*: *P. aeruginosa* ist es auf drei verschiedene Arten möglich, unter anaeroben Verhältnissen Energie zu gewinnen, um das Überleben zu sichern.

### 1.3.1 Nitratatmung

Der erste Weg ist die Verstoffwechslung von Nitrat [Comolli et al. 2002, Chen et al. 2003, Filiatrault et al. 2005]. Dieser Weg ist seit geraumer Zeit bekannt und für den Keim energetisch am günstigsten. Dabei profitiert *P. aeruginosa* von hohen Nitratkonzentrationen, die in den Sputen der CF-Patienten nachgewiesen wurden [Linnane et al. 1998, Yoon et al. 2006]. Hierbei werden Stickstoff-Oxide anstelle von Sauerstoffmolekülen von *P. aeruginosa* als terminale Elektronenakzeptoren genutzt. Bei der Denitrifikation werden Stickstoffoxide zu molekularem Stickstoff reduziert (Abb. 1.5).

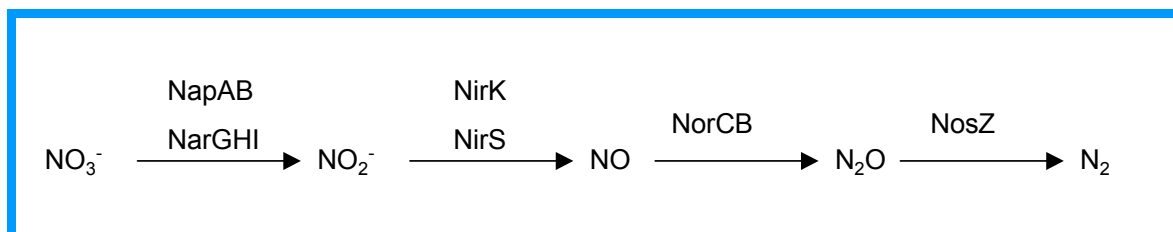


Abbildung.1.5: Die Reaktionen der Nitrat-Atmung (nach [Moreno-Vivian et al. 1999]):

NapAB, periplasmatische Nitratreduktase; NarGHI, zytoplasmatische Nitratreduktase; NirK, respiratorische Nitritreduktase; NirS, respiratorische Nitritreduktase; NorCB, NO-Reduktase; NosZ, N<sub>2</sub>O-Reduktase (Gene, die für die beteiligten Enzyme kodieren)

Die Bildung der für die Reaktion benötigten Enzyme wird durch einen niedrigen Sauerstoffpartialdruck und durch die Verfügbarkeit von Stickstoff-Oxiden aktiviert [Moreno-Vivian et al. 1999]. Nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) ist das erste Produkt, welches durch die Reaktion von dissimilatorischen Nitratreduktasen [Moreno-Vivian et al. 1999] mit

Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) entstehen kann. Es sind momentan zwei Enzymtypen bekannt, die für diese Reaktion benötigt werden; eine periplasmatische (NapAB) und eine membranständige zytoplasmatisch orientierte Nitratreduktase (NarGHI). Der zweite Schritt der Denitrifikation beinhaltet die Reduktion von Nitrit zu Stickstoffmonoxid (NO). NirK und NirS sind die beiden respiratorischen Nitritreduktasen, die in diesem Reaktionsschritt vorkommen. Das hierbei entstandene Stickstoffmonoxid ist für die Zelle hoch toxisch und wird daher sofort zu Distickstoffmonoxid ( $\text{N}_2\text{O}$ ) umgesetzt. Das Stickstoffmonoxid bindet dabei hochaffin an die membranständige NO-Reduktase NorCB [Braun und Zumft 1991]. Final wird  $\text{N}_2\text{O}$  zu Stickstoff ( $\text{N}_2$ ) reduziert. Dies erfolgt an der periplasmatisch lokalisierten  $\text{N}_2\text{O}$ -Reduktase NosZ. *P. aeruginosa* gewinnt durch den Nitratstoffwechsel zwischen 1932 kJ und 2657 kJ pro Mol metabolisierter Glukose [Eschbach et al. 2004].

### 1.3.2 Arginin-Fermentation

In Abwesenheit von Nitrat oder Nitrit kann *P. aeruginosa* durch die Aminosäure Arginin mittels der Substrat-Level-Phosphorylierung Energie gewinnen und für langsames Wachstum unter anaeroben Bedingungen nutzen [vander Wauven et al. 1984, Gamper et al. 1991]. Die Energiegewinnung findet ohne bevorzugte Elektronenakzeptoren wie  $\text{O}_2$  oder alternative Elektronenakzeptoren wie  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{N}_2^-$  und  $\text{N}_2\text{O}$  statt [vander Wauven et al. 1984]. Hierbei wird Arginin quantitativ zu Ornithin metabolisiert. Es wird ein Molekül ATP gewonnen (Abb. 1.6).

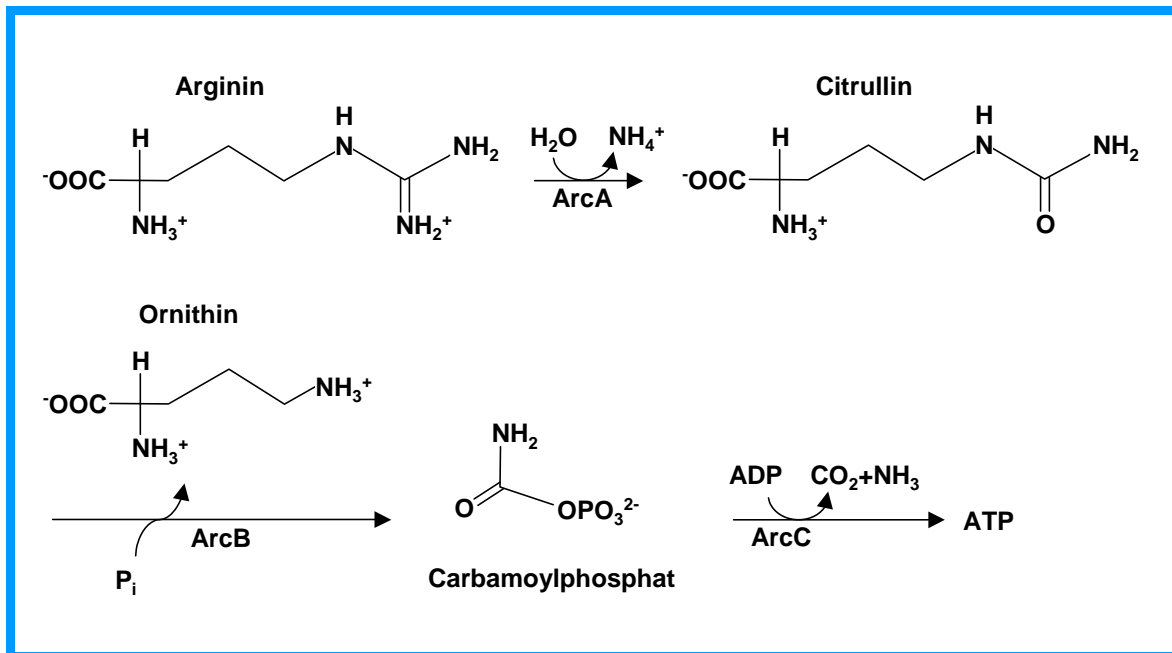


Abbildung 1.6: Arginin-Fermentation im anaeroben Milieu (nach [Winteler et al.1996]).

Pro Arginin-Molekül wird ein Molekül ATP gebildet. ArcA, Arginin Deiminase; ArcB, katabolische Ornithin-Carbamoyl-Transferase; ArcC, Carbamat-Kinase (Gene, die für die beteiligten Enzyme kodieren)

Arginin kann bei diesem Prozess nur zur Energiegewinnung und nicht als Kohlenstoffquelle genutzt werden. Zusätzlich wird Ornithin in den Extrazellularraum geschleust. Daher muss *P. aeruginosa* zum Wachstum eine alternative Kohlenstoffquelle nutzen, oder es muss dem Keim ein reiches Nährmedium angeboten werden [vander Wauven et al. 1984]. Die Energieausbeute ist zehn- bis dreißigfach niedriger als bei der aeroben Energiegewinnung, welche bei 2830 kJ/Mol umgesetzter Glukose liegt [Eschbach et al. 2004].

### 1.3.3 Pyruvatmetabolismus und Laktatproduktion

Zusätzlich kann *P. aeruginosa* auch durch eine Fermentation von Pyruvat unter anaeroben Bedingungen überleben [Eschbach et al. 2004]. Der Pyruvatstoffwechsel wird von dem Bakterium zum Langzeitüberleben in der Anaerobiosis genutzt, allerdings nur in Abwesenheit der energetisch günstiger zu metabolisierenden



Substrate Nitrat und Arginin.

Wenn *P. aeruginosa* in OS-Medium wächst, welches frei von Nitrat und Arginin ist [vander Wauven et al. 1984], wird Pyruvat zu Laktat oder über das Acetyl-CoenzymA zu Ethanol und Acetat oder über Oxalacetat zu Succinat verstoffwechselt [Eschbach et al. 2004]. Stöchiometrisch bildet *P. aeruginosa* aus einem Mol Pyruvat (16,2 mM) 0,56 Mol Laktat (9,0 mM), 0,39 Mol Azetat (6,3 mM) und 0,04 Mol Succinat (0,7 mM) (Abb. 1.7).

Ethanol wurde während der Untersuchungen nicht nachgewiesen [Eschbach et al. 2004]. Unter *in vitro* vorherrschenden Bedingungen ist Laktat damit das wichtigste Stoffwechselprodukt im anaeroben Pyruvatmetabolismus von *P. aeruginosa*.

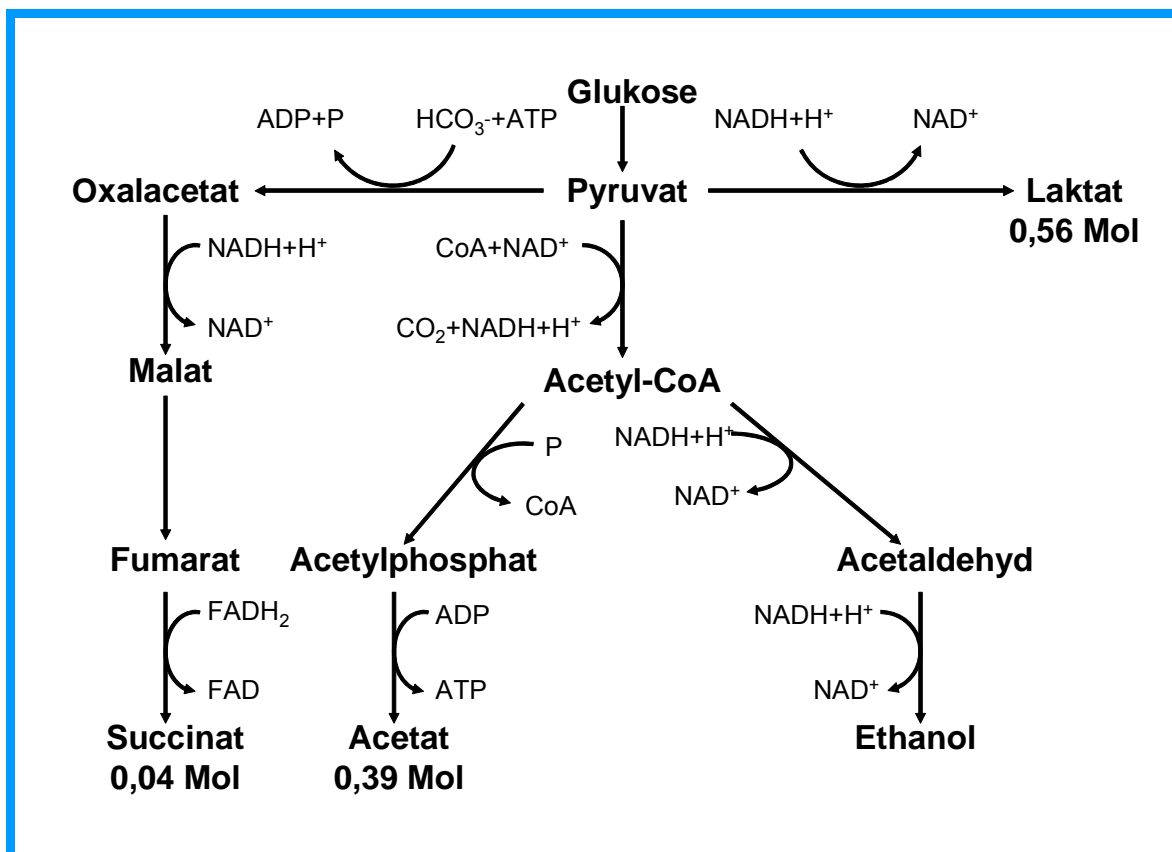


Abbildung 1.7: Diagramm des anaeroben Pyruvatstoffwechsels von *P. aeruginosa* mit der Umwandlung von 1 Mol Pyruvat in seine Metabolite. (modifiziert nach [Eschbach et al. 2004])

## 1.4 Anaerobe Genexpression von *Pseudomonas aeruginosa*

Um zu untersuchen, inwieweit der Pyruvatmetabolismus zur anaeroben Energiegewinnung von *P. aeruginosa* beiträgt, besteht die Möglichkeit, die Genexpression der beteiligten Gene zu quantifizieren. Unter anaeroben Wachstumsbedingungen müssen diejenigen Gene am meisten exprimiert werden, die in die anaerobe Energiegewinnung von *P. aeruginosa* einbezogen sind. Andererseits werden die Gene, die für den aeroben Metabolismus kodieren, heruntergeregelt.

Es ist jedoch nicht bekannt, inwieweit die Gene für den Pyruvat-Laktat-Metabolismus differentiell reguliert sind. Anhand der anaeroben Genexpression lässt sich messen, welche Gene von *P. aeruginosa* unter den *in vivo* herrschenden Bedingungen verstärkt exprimiert werden. Die Genexpression muss nicht immer mit einer quantitativen Veränderung der Genprodukte übereinstimmen. Darum bedeutet eine verminderte Expression eines Gens, das für ein bestimmtes Enzym kodiert, nicht automatisch auch eine verminderte Expression des Enzyms.

Wenn aber ganze Gruppen von zusammengehörigen Genen (Gen-Cluster) gleichsinnig und stark differentiell exprimiert werden, erlaubt dies zweifellos auch eine Aussage zur differentiellen Regulierung der Translation. Aufgrund der Wichtigkeit von *P. aeruginosa* in der Pathogenese der CF ist zu klären, inwieweit die genotypische mit der phänotypischen Laktatproduktion übereinstimmt, um einen weiteren anaeroben Metabolismus dieses Mikroorganismus genauer aufzuklären zu können.

## 1.5 Bakterielle Laktatproduktion im Sputum von CF-Patienten

### 1.5.1 *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* ist in der Pathogenese von CF ein sehr bedeutender Erreger. Das Bakterium tritt bei weit über 80% der erwachsenen CF-Patienten auf und ist somit der am häufigsten vorkommende Erreger bei den Patienten, die das 18. Lebensjahr überschritten haben [Koch und Høiby 1993]. *P. aeruginosa* ist ein Bakterium, welches sowohl unter aeroben, als auch unter anaeroben Bedingungen überleben

kann. Es zählt somit zu den fakultativ anaerob metabolisierenden Bakterien und ist unter bestimmten anaeroben Bedingungen in der Lage, Laktat als Stoffwechselprodukt zu produzieren [Eschbach et al. 2004]. Da die Bedingungen im Sputum von CF-Patienten anaerob sind [Worlitzsch et al. 2002], ist *P. aeruginosa* möglicherweise für eine eventuelle Laktatkonzentration im Sputum mitverantwortlich.

### 1.5.2 *Staphylococcus aureus*

Auch *S. aureus* ist ein fakultativ anaerob metabolisierendes Bakterium [Cramton et al. 2001, Ulrich et al. 2007], daher besteht auch für *S. aureus* die Möglichkeit der anaeroben Laktatproduktion. *S. aureus* ist neben *P. aeruginosa* einer der am häufigsten vorkommenden Keime in der CF-Lunge. In der Kindheit der CF-Patienten ist die Besiedelung der Lunge durch das Bakterium am stärksten, wird aber im Erwachsenenalter durch *P. aeruginosa* abgelöst [Koch und Høiby 1993, Valerius et al. 1991, vgl. Abb. 1.1]. Dennoch ist *S. aureus* sehr häufig in der Lunge von CF-Patienten nachzuweisen [Ratjen und Döring 2003].

### 1.5.3 *Burkholderia cepacia complex*-Bakterien

Auch *B. cepacia* ist für die Pathogenese der CF von Bedeutung. *B. cepacia* ist wie *S. aureus* und *P. aeruginosa* in der Lage, ohne das Vorhandensein von Sauerstoff zu überleben, er ist damit auch zu den fakultativ anaerob metabolisierenden Bakterien zu zählen [Sousa et al. 2007]. Der Erreger ist neben *P. aeruginosa* und *S. aureus* der häufigste Mikroorganismus, der in der Lunge von erwachsenen CF-Patienten nachgewiesen werden kann [Koch und Høiby 1993, Valerius et al. 1991, vgl. Abb. 1.1].

Vor diesem Hintergrund wird in der vorliegenden Arbeit die Bildung von Laktat durch die drei angeführten Bakterien näher untersucht.

## 1.6 Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) und der Entzündungsprozess

Der Entzündungsvorgang in der CF-Lunge ist sehr spezifisch. Neben einer chronischen bakteriellen Infektion kommt es auch zu einer chronischen Inflammationssituation [Ratjen und Döring 2003, Gibson et al. 2003, Downey et al. 2009]. Hierbei wirkt die Inflammation auf das pulmonale Gewebe destruierend. Es kommt durch den permanent anhaltenden Entzündungsreiz zu einem bindegewebigen Umbau des Lungengewebes, was letztlich zu dessen Funktionsuntüchtigkeit führt und für das Erscheinungsbild der CF typisch ist [Döring 1999]. Aufgrund des starken Rückgangs der Lungenfunktion muss die chronische Bronchopneumonie bekämpft werden. Weiterhin ist es notwendig, das Ausmaß der Lungenentzündung messen und den Erfolg der jeweils stattfindenden Therapie kontrollieren zu können. Um den Verlauf der Entzündung besser beschreiben zu können, sind einige Substanzen, die als Inflammationsmarker verwendet werden könnten, denkbar und auch untersucht worden. Weiterhin ist die Bedeutung des Laktats als Markersubstanz auch unter den Aspekten des Qualitätsmanagements vorstellbar [Stern et al. 2008].

Myeloperoxidase [Meyer 2004, Worlitzsch et al. 1998] und neutrophile Elastase [Döring 1999, Goldstein und Döring 1986] konnten als Entzündungsparameter identifiziert werden. Es handelt sich hierbei um Enzyme, die sich als stofflich instabil darstellen. Außerdem gestaltet sich die Messung als äußerst aufwendig, was dazu führt, dass Myeloperoxidase und neutrophile Elastase mit keiner Routinemethode nachgewiesen werden können und somit für den klinischen Alltag nicht als Marker zur Verfügung stehen.

CF-Epithelzellen sezernieren die proinflammatorischen Interleukine IL-1, IL-2, IL-6 und IL-8, wobei das antiinflammatorische Interleukin IL-10 vermindert gebildet wird [Chmiel et al. 1999]. In Bronchialepithelzellen von Gesunden wird hingegen IL-10 normal sezerniert, IL-6 und IL-8 sind reduziert [Bonfield et al. 1995]. Bei der chronischen Entzündungsreaktion in der CF-Lunge ist sowohl eine erhöhte Aktivierung von NF- $\kappa$ B als auch von TNF $\alpha$  zu beobachten, was mit einer erhöhten

Sekretion von IL-8 nach einer Stimulation von CF-Epithelzellen einhergeht [DiMango et al. 1995, DiMango et al. 1998, Strieter et al. 2002]. Da sich die Sekretion der Zytokine auf die chronische Inflammation bezieht und diese permanent in der CF-Lunge vorhanden ist, sind Interleukine als Markersubstanzen ungeeignet, da sie keine Indikatoren für kurzfristige Änderungen im Entzündungsgeschehen darstellen [Gibson et al. 2003, Strieter et al. 2002].

Eine weitere Möglichkeit, den Entzündungsverlauf in der CF-Lunge zu verfolgen, stellt die Messung von Markersubstanzen im Atemkondensat dar [Worlitzsch et al. 2002, Carpagnano et al. 2003, Hanazawa et al. 2000, Kharitonov et al. 2001]. Die Methode ist sowohl technisch sehr aufwendig, als auch oft nicht reproduzierbar und hat somit bislang keine Bedeutung im klinischen Alltag bei CF-Patienten. Bei non CF-Patienten, die unter einer entzündlichen Lungenerkrankung leiden, kann über den Nachweis von Sauerstoffradikalen, welche von PMN produziert werden, ein Rückschluss über den Grad der Entzündung gezogen werden [Weiss 1989, Dohlman et al. 1993, Worlitzsch et al. 1998, Banner et al. 2009]. Bei CF sind die Bedingungen in der Lunge dagegen anaerob [Worlitzsch et al. 2002], somit können von den PMN keine Sauerstoffradikale gebildet werden, dadurch ist ein Einsatz als Marker nicht möglich.

Die spezifischen Umstände in der CF-Lunge erklären somit, weshalb die beschriebenen Substanzen nicht als Marker verwendet werden können. Daher ist es dringend geboten, eine Substanz zu finden, die unter den in der CF-Lunge vorherrschenden Bedingungen als Marker genutzt werden kann. Der Marker muss stabil sein, unter anaeroben Bedingungen gebildet werden und relativ schnell auf Veränderungen, wie therapeutische Eingriffe reagieren können.

Vor diesem Hintergrund soll die Bedeutung des Laktats als mögliche Markersubstanz untersucht werden.

## 2 Zielsetzung

Vor dem in der Einleitung beschriebenen Hintergrund werden in der vorliegenden Arbeit folgende Punkte untersucht:

1. Produktion von Laktat durch *P. aeruginosa in vitro*.
2. Verbrauch von Laktat durch *P. aeruginosa in vitro*.
3. Anaerobe Genexpression von *P. aeruginosa* mit Hilfe von Affymetrix® DNA-microarrays
4. Produktion von Laktat durch *S. aureus in vitro*
5. Verbrauch von Laktat durch *S. aureus in vitro*
6. Produktion von Laktat durch *B. cepacia in vitro*
7. Verbrauch von Laktat durch *B. cepacia in vitro*
8. Quantifikation von Laktat im Sputum von CF-Patienten
9. Laktatproduktion von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN)
10. Korrelation von Laktat im Sputum mit den Lungenfunktionswerten der jeweiligen CF-Patienten

Ziel der Studie ist es somit, das Vorhandensein, den Ursprung, die Wechselwirkungen mit Bakterien sowie die klinische Relevanz von Laktat zu untersuchen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Patienten

An den Untersuchungen nahmen 25 Patienten teil, die durch das Zentrum für Innere Medizin, Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums Halle (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Bernd Osten, Leiterin der Ambulanz: Oberärztin Dr. med. Bettina Wollschläger) betreut wurden. Es waren 14 weibliche und 11 männliche Patienten im Alter von  $28 \pm 9,6$  Jahren (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung), zwischen 18 und 63 Jahren an den Untersuchungen beteiligt.

Es wurden alle Patienten in die Studie aufgenommen, die in der Lage waren, Sputum ( $\geq 1$ g) zu expektorieren. Nachdem die Patienten ihr Einverständnis zur Teilnahme an den Untersuchungen gegeben hatten, wurde von jedem Patienten eine Sputumprobe durch Expektoration abgegeben, um die Laktatwerte in den Sputen ermitteln zu können. Von den untersuchten 25 Patienten litten 14 an einer chronischen Lungeninfektion durch *P. aeruginosa*, bei 10 Patienten wurde eine chronische Besiedelung der Lunge mit *S. aureus* diagnostiziert, und bei einem Teilnehmer wurden Bakterien des *B. cepacia complex* nachgewiesen. Bei 6 der teilnehmenden 25 Patienten wurde eine Mischinfektion von zwei Keimen festgestellt.

Es wurde zum einen die forcierte expiratorische Einsekundenkapazität ( $FEV_1$ ) und zum anderen die forcierte Vitalkapazität (FVC) der Patienten ermittelt, um den Schweregrad der Lungeninfektion zu beschreiben. Sie befanden sich für  $FEV_1$  in einem Bereich von 18,0 bis 100,1% der altersentsprechenden Referenzwerte ( $57,8 \pm 23,0\%$ ), für FVC rangierten die Werte in einem Bereich von 43,0 bis 104,9% ( $76,6 \pm 19,7\%$ ).

Die Diagnose der CF erfolgte mittels des Schweißtestes in Kombination mit genotypischen Nachweismethoden. Alle teilnehmenden Patienten bekamen Azithromycin (p.o.), sowie Tobramyzin (p.i.) oder Colistin (p.i.), oder Tobramyzin (p.i.) und Colistin (p.i.) kombiniert verabreicht. Während einer Exazerbation wurden zusätzlich i.v. Piperacillin/Tazobactam, Ceftazidin, Moxifloxazin, Imipenem oder Cefepim appliziert.

### 3.1.1 Lungenfunktionsuntersuchungen

Bei jedem Patienten wurde routinemäßig bei den Ambulanzbesuchen eine Lungenfunktionstestung durchgeführt, bei der FEV<sub>1</sub> sowie FVC ermittelt wurde. Zu diesem Zweck wurde der MasterScreen Body (Jaeger, Hoechberg, Deutschland) verwendet. Die Werte für FEV<sub>1</sub> und FVC wurden in Prozent der altersentsprechenden Normalwerte ausgedrückt. Die Lungenfunktionswerte wurden mit den Laktatwerten im Sputum korreliert.

### 3.2 Laktatmessungen

Um den Laktatgehalt der Proben zu erhalten, wurden sie spektrophotometrisch und gaschromatographisch untersucht. Mit der spektrophotometrischen Methode wurde der L-Laktatgehalt ermittelt, mit der gaschromatographischen Methode wurde das Gesamtlaktat (L-Laktat und D-Laktat) bestimmt. Die spektrophotometrische L-Laktatmessung wurde mit einem automatischen Testsystem im Zentrallabor des Universitätsklinikums Halle durchgeführt (Synchron LX System, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland). In der Testreaktion wurde durch Laktatoxidase Laktat in Pyruvat umgewandelt, wobei gleichzeitig Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) erzeugt wurde. Das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reagierte mit der Dichlorobenzensulfonsäure (DCBSA) und 4-Aminoantipyrin (4-AAP) in einer durch Peroxidase katalysierten Reaktion zu einem Chromophor. Die Laktatkonzentration wurde durch Messen der Extinktion aufgrund des Chromophors mittels einer Endpunktmethode ermittelt (Abb 3.1). Das Synchron LX-System dosiert automatisch die entsprechenden Proben- und Reagenzvolumina in der Küvette. Das System überwacht die Absorbanzänderung bei 520 nm. Die Absorbanzänderung ist direkt proportional zur Laktatkonzentration in der Probe und dient zur Berechnung und Angabe der Laktatkonzentration durch das System.



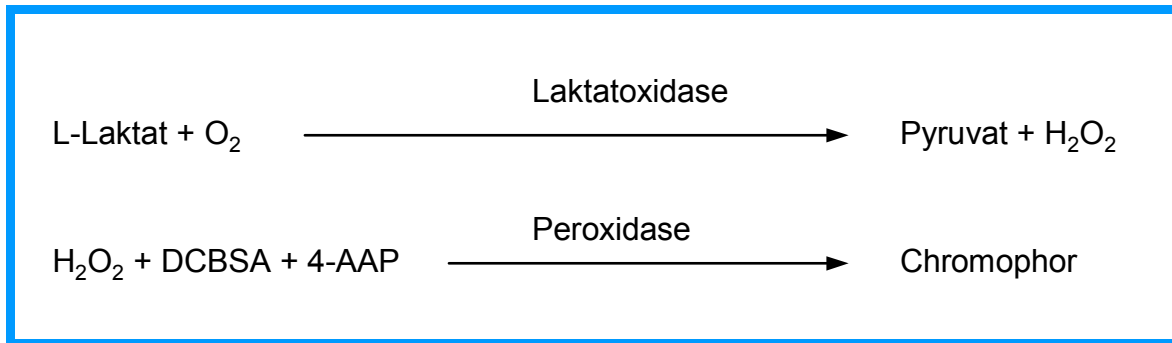


Abbildung 3.1: Reaktionsschema der spektrophotometrischen L-Laktat-Messung durch das Synchron LX System. Dichlorobenzensulfonsäure (DCBSA), Aminoantipyrin (4-AAP).

Die Gesamtlaktatmessung fand mit Hilfe eines Gaschromatographen (Shimadzu-GC 14A Gaschromatograph, Columbia, MD, U.S.A.) in der Naturwissenschaftlichen Fakultät I-Biowissenschaften (Institut für Biologie, Abteilung Mikrobiologie) der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg statt. Dabei bildet die Voraussetzung für die gaschromatographische Analyse von Fettsäuren und Alkoholen die Flüchtigkeit bei Temperaturen zwischen 100°C und 200°C. Die Detektion erfolgt durch einen Flammenionisationsdetektor (FID). Dabei werden die zu messenden Substanzen mit einem Trägergas wie Helium transportiert. In dem FID kommt es bei der Verbrennung des Gases zu einer Farbänderung. Die Farbänderung wird als Signal registriert. Moleküle wie Laktat,  $\beta$ -Hydroxybutyrat, Malonat, Fumarat und Succinat werden durch Methylierung zu den flüchtigen Methylestern derivatisiert und können als solche analysiert werden. Dadurch wird eine Quantifizierung anhand der Reaktionszeiten ermöglicht. Beide Methoden haben eine Messgenauigkeit von 0,1 mmol/L.

### 3.3 Produktion und Verbrauch von Laktat durch *Pseudomonas aeruginosa*

Um die Herkunft des Laktats im Sputum näher zu untersuchen, wurde Laktatproduktion und Verbrauch von *P. aeruginosa* unter aeroben und anaeroben Bedingungen untersucht. Für diese Versuche wurde der *P. aeruginosa*-Stamm PA01 (ATCC 15692)[Stover et al. 2000] verwendet. Der Erreger wurde auf Columbia-Agar (Art.-Nr. PB5008A, Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland) überimpft und in Casein-

pepton-Sojamehlpepton Lösung USP (Tryptone Soy Broth, Art.-Nr.: TV 5002 E, TSB, Oxoid, Basingstoke, Großbritannien) als Übernachtskultur bei 37°C und 400 U/min bebrütet. Am Folgetag wurden 15 Reagenzgläser mit *P. aeruginosa* und TSB (4 ml) beschickt. Die optische Dichte (OD) der Bakteriensuspension wurde bei 600 nm mittels UV-Vis-Spektralphotometer (Ultrospec III, Pharmacia, Amersham LKB, Freiburg, Deutschland) gemessen. Die Startkonzentration  $OD_{600}$  wurde auf 0,05 eingestellt. Die Bakterien wurden aerob bei 37°C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 400 U/min (HTMR-133, MS-Laborgeräte Schröder OHG, Wiesloch, Deutschland) inkubiert. Die Versuchsreihe erstreckte sich über 24 h. Alle 4 h wurden Laktatmessungen und Keimzahlbestimmungen durchgeführt. Bei der anaeroben Versuchsdurchführung wurden die Keime wiederum auf eine  $OD_{600}$  von 0,05 eingestellt und für 4 Tage in dem TSB-Nährmedium unter anaeroben Verhältnissen in einer Anaerobier-Bank (MAKS/MG, Meintrup DWS GmbH, Lähden-Holte, Deutschland) (Abb. 3.2) bei 37°C und 400 U/min mittels Schüttelrührer (Reagenzglasschüttler REAX Top, Heidolph-Instruments GmbH & Co.KG, Kehlheim, Deutschland) inkubiert. Alle 24 h wurde eine Keimzahlbestimmung sowie eine Laktatmessung durchgeführt.

Um den Verbrauch von extern zugeführtem Laktat zu messen, wurde *P. aeruginosa*, nachdem die Bakterien in einer Übernachtskultur inkubiert worden waren, auf eine  $OD_{600}$  von 0,05 eingestellt. Dieses geschah jeweils in TSB und in autoklavierter Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, Art.-Nr.: P-4417, PBS) als Medium. Die selbständig hergestellte 20-fache PBS-Stammlösung besteht aus: 85g NaCl, 14,23g  $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$  und 1,35g  $KH_2PO_4$  (alles MERCK, Darmstadt, Deutschland) in 500ml destilliertem Wasser (Art.-Nr. 1428, Braun, Melsungen, Deutschland) gelöst. Die Lösung wird auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Zusätzlich wurden die Proben mit D-Laktat (Art.-Nr.: 71716, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und mit L-Laktat (Art.-Nr.: 71718, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) (Startkonzentration von 10 mmol/L) beschickt. Eine Probengruppe (TSB/PBS) wurde aerob, die andere Probengruppe (TSB/PBS) wurde anaerob über 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Laktatkonzentrationen bestimmt.



Abbildung 3.2: Anaerobier-Bank (MAKS/MG, Meintrup DWS GmbH, Löhden-Holte, Deutschland).

### **3.4 Untersuchung der Genexpression von *Pseudomonas aeruginosa* mit Hilfe von DNA-microarrays**

#### **3.4.1 Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* unter aeroben und anaeroben Bedingungen**

*P. aeruginosa* (Stamm PA01) wurde in 5 ml TSB als Übernachtskultur angesetzt. Am Folgetag wurde die Kultur auf eine  $OD_{600}$  von 0,05 eingestellt, anschließend wurde die Lösung unter aeroben Bedingungen geschüttelt, bei 37°C bebrütet, bis eine  $OD_{600}$  von 0,8 erreicht wurde. Danach wurde die Lösung zentrifugiert (Heraeus Instruments Biofuge Primo, Kendro Laboratory Products). Die Erreger für den anaeroben Ansatz wurden in Anaerobiertöpfe überführt (Anaerocult, Merck, Darmstadt, Deutschland) und in diesen für ein bis vier Tage inkubiert. Die anaeroben Verhältnisse in den Anaerobiertöpfen wurden durch die Verwendung von Sauerstoff-Teststreifen (Anaerotest, Merck, Darmstadt, Deutschland) überprüft. *P. aeruginosa*-Bakterien, die für 2 h aerob bebrütet wurden, dienten als Referenz. Nachdem die Bakterien entweder unter aeroben oder unter anaeroben Wachstumskonditionen bebrütet wurden, wurden sie wie folgt identisch weiterbehandelt.

### 3.4.2 mRNA-Extraktion

Nach der Zentrifugation der Proben bei 4500 U/min für 10 min bei einer Temperatur von 4°C (minifuge GL, Heraeus, Osterode, Deutschland) wurden die Pellets in 1 ml Trizol-Reagenz (Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gelöst. Das Aufbrechen der Zellwände der Bakterien wurde mit vorgefertigten fastRNA-tube-Sets und unter der Nutzung von Fast-Prep-FP-120 (beides BIO101 Vista, CA., U.S.A.) bei 6500 U/min für 40 s durchgeführt. Nach dem Aufbrechen der Zellwände wurden 200 µl Chloroform hinzugefügt, dann wurde die Probe für 30 s geschüttelt und anschließend für 10 min bei 10.000 U/min und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Dabei fand eine Phasentrennung statt. Die obere transparente Phase wurde resuspendiert und in 500 µl Isopropanol gelöst. Nun wurde die Lösung für 10 min bei Zimmertemperatur inkubiert und im Anschluss für 10 min bei 12.000 U/min und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde verworfen und das gewonnene Pellet wurde in 1 ml 70% Ethanol resuspendiert. Dann wurde die Lösung für 5 min bei 7.500 U/min und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen, das erhaltene Pellet wurde für zirka 15 min getrocknet, bis das verbliebene Ethanol verdampft war. Schließlich wurde das Pellet in 50 µl RNase-freiem destillierten Wasser gelöst. Die Lösung wurde dann für 10 min bei 55°C erhitzt.

Die Qualitätskontrolle und die Mengenbestimmung der RNA wurde spektroskopisch mit 2 µl der Probe, welche in 398 µl destillierten Wasser gelöst wurde, gegen einen Leerwert von 400 µl destillierten Wasser gemessen. Die hierfür verwendeten Wellenlängen lagen bei 260, 280, und 320 nm (Utrospec III, Pharmacia). Für den Nachweis eines möglichen RNA-Abbaus wurden 2,5 µg von jeder RNA-Probe auf ein Agarose Gel mit einem niedrigen Schmelzpunkt (Agarose 1%, FMC Bioproducts, Rockland, ME, U.S.A.) und einer Formaldehydlösung [10%] aufgebracht. Anschließend wurde die Gelelektrophorese bei 65 Volt für 1,5 h durchgeführt.

### 3.4.3 Genanalysen

Für die genomanalytischen Experimente wurden jeweils 10 µg von jeder aufbereiteten RNA-Probe genutzt und nach dem Affymetrix GeneChip *P. aeruginosa* Genome Array Expression-Protokoll (Affymetrix UK Ltd., High Wycombe, Großbritannien) bearbeitet: komplementäre DNA (cDNA) wurde mit Hilfe von Random-RNA-Primern und SUPERase synthetisiert. Die cDNA wurde mittels des QIAquick PCR Reinigungssets aufbereitet und mit Hilfe von DNase I fragmentiert. Die 3'-end Termini der fragmentierten Produkte wurden mit dem Enzo BioArray Terminal Labeling Kit mit Biotin-ddUTP gekennzeichnet. Die Wirksamkeit der Prozedur wurde mit Hilfe einer gel-shift-Untersuchung kontrolliert. Zur Kontrolle wurde RNA von *Bacillus subtilis* in bekannter Konzentration auf dem Genchip aufgetragen, um die Wirkung der Markierung, Hybridisierung und die Anfärbungen zu überwachen.

Zur Hybridisierung des Arrays wurde die gekennzeichnete RNA bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde der Hybridisierungssofen (GeneChip Hybridization Oven 640, Affymetrix) mit dem Array bei 50°C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 60 U/min für genau 16 h beschickt. Für das Wasch- und Anfärbeverfahren wurde die GeneChip Fluidics Station 400 und die Affymetrix Microarray Suite Software genutzt. Anschließend wurden die Arrays durch einen Argonlaser mit einem Laserspot von 3 µm abgetastet (Gene Array Scanner Agilent, Böblingen, Deutschland). Die Ergebnisse wurden mit der Affymetrix Microarray Suite Software ausgewertet.

Um die Signalintensitäten zu standardisieren, wurden auf den Arrays biotinylierte Oligonukleotide in definierten Konzentrationen platziert. Der Schwankungsbereich zwischen zwei Arrays betrug maximal 20%. Die Untersuchungen wurden jeweils dreifach durchgeführt. Die Untersuchung der Genexpression von *P. aeruginosa* mit Hilfe von DNA-microarrays wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Morten Hentzer und dessen Laboratorium in der Molecular Microbial Ecology Group der Technischen Universität von Dänemark in Lyngby, Dänemark durchgeführt.

Zirka 20% der Gene konnten nicht in die Auswertung aufgenommen werden (Abb.3.3), da entweder die Signalintensitäten unter der Rauschschwelle von 500

lagen oder die Signifikanzwerte im Vergleich der Dreifachansätze aerob zu anaerob niedriger als  $p=0,05$  (t-Test) waren.

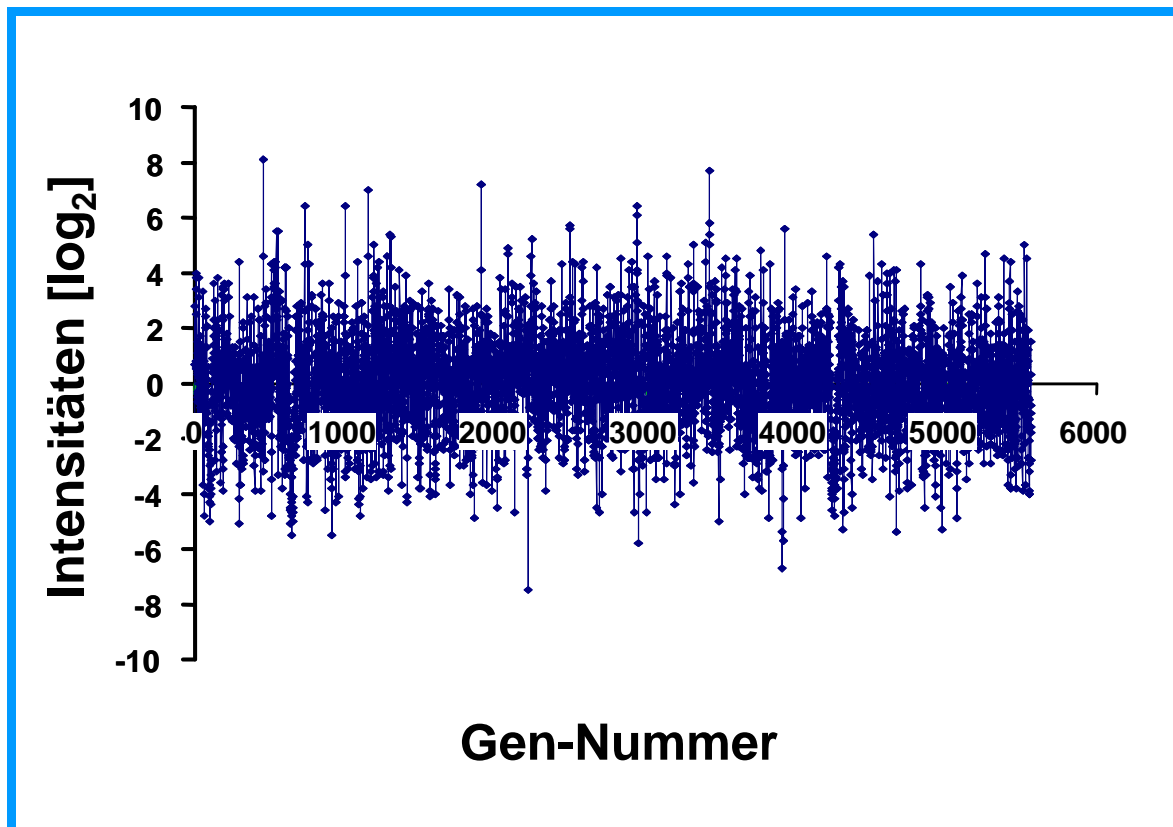


Abbildung 3.3: Differenzielle Genregulation von *P. aeruginosa* unter anaeroben Bedingungen.

### 3.5 Produktion und Verbrauch von Laktat durch *Staphylococcus aureus* und *Burkholderia cepacia*

#### 3.5.1 *Staphylococcus aureus*

Es wurde zusätzlich die Laktatproduktion und der Verbrauch durch *S. aureus* unter aeroben und anaeroben Bedingungen untersucht. Für diese Versuche wurde der *S. aureus*-Stamm SA113 (ATCC 35556) [Peschel et al. 2001] verwendet. Die Kolonien wurden auf Columbia-Agar überimpft und in TSB als Übernachtskultur bei 37°C und 400 U/min bebrütet. Am Folgetag wurden 15 Reagenzgläser (Art.-Nr. 55.476, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit *S. aureus* und TSB (4 ml) beschickt. Die optische Dichte der Bakteriensuspension wurde bei 600 nm mittels Ultrospec III gemessen. Die Startkonzentration OD<sub>600</sub> wurde auf 0,05 eingestellt. Die Bakterien

wurden aerob bei 37°C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 400 U/min inkubiert. Die Versuchsreihe erstreckte sich über 24 h. Alle 4 h wurden Laktatmessungen und Keimzahlbestimmungen durchgeführt. Bei der anaeroben Versuchsdurchführung wurden die Keime wiederum auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 eingestellt und für 4 Tage in dem TSB- Nährmedium unter anaeroben Verhältnissen in der Anaerobier-Bank bei 37°C und 400 U/min mittels Schüttelrührer inkubiert. Alle 24 h wurde eine Keimzahlbestimmung sowie eine Laktatmessung durchgeführt.

Um den Verbrauch von extern zugeführtem Laktat zu messen, wurde *S. aureus*, nachdem der Erreger in einer Übernachtskultur inkubiert worden war, auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 eingestellt. Dieses geschah jeweils in TSB und in PBS als Medium. Zusätzlich wurden die Proben mit D-Laktat und mit L-Laktat beschickt. Eine Proben-Gruppe (TSB/PBS) wurde aerob, die andere Proben-Gruppe (TSB/PBS) wurde anaerob über 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Laktatkonzentration bestimmt.

### **3.5.2 *Burkholderia cenocepacia***

Es wurde außerdem die Laktatproduktion und der Verbrauch durch *B. cenocepacia* unter aeroben und anaeroben Bedingungen untersucht. Dafür wurde der *B. cenocepacia*-Stamm J2315 (ET12 lineage, LMG 16656) verwendet [Vandamme et al. 2003]. Die Bestimmung der Produktion und des Verbrauchs von Laktat wurde analog zu dem Vorgehen bei *P. aeruginosa* (siehe 3.3) durchgeführt.

## **3.6 Sputum**

### **3.6.1 Keimidentifikation und Keimzahlbestimmung**

Bei jedem Sputum wurde eine Keimidentifikation, eine Keimzahlbestimmung und die Ermittlung der Laktatkonzentration durchgeführt. Die Keimidentifikation wurde mittels Dreiösenausstrich (Einwegimpfeschlinge, Art.-Nr. 731101, Greiner bio-one) der Sputumprobe auf Nährböden durchgeführt. Als Nährböden wurden Columbia-Agar mit 10% Schafblut, McConkey-Agar (Art.-Nr. PO 5002 A, Oxoid, Basingstoke, Großbritannien) und Cetrimid-Agar (Ps.-Cetrimid-Agar, Art.-Nr. PO 5076 A, Oxoid, Basingstoke, Großbritannien) bei jeder Sputumprobe benutzt. Zur Keimzahl-

bestimmung wurden Verdünnungsreihen hergestellt (Abb. 3.4). Um das hochvisköse Sputum besser verarbeiten zu können, wurde es 1:1 mit PBS verdünnt. Anschließend wurde die entstandene Suspension auf dem Schüttelrührer vermischt. Dann wurden Verdünnungsreihen [ $10^0$ - $10^{-9}$  KBE/ml] hergestellt, aus denen jeweils 10 µl auf die Nährböden aufgetragen wurden.

Die jeweiligen Nährböden wurden anschließend für 24 h bei 37° C im Brutschrank (Heraeus Typ B6420, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Keime ausgezählt. Die Bakterien, die auf den Nährböden zur Erregeridentifikation bebrütet worden waren, wurden auf Oxidase (BBL™ Dry Slide™ Oxidase, Art.-Nr. 231746, Becton Dickinson, Sparks, MD, U.S.A.), Katalase (ID Color Katalase (ID-Ase), Art.-Nr. 55561, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) und auf Protein A (Staphaurex Plus, Art.-Nr. ZL 33, remel, Lenexa, KS, U.S.A.) getestet. Zur weiteren Erregeridentifikation wurde das Vitek® Senior-System (Senior Modell 120, bioMérieux) als standardisiertes Enzymnachweissystem zur Identifizierung genutzt.

Alle Bestimmungen wurden dreifach und in unabhängigen Experimenten durchgeführt. Die mit PBS verdünnten Sputumproben wurden, nachdem eine Probe aus ihnen zur Bestimmung der Keimzahl entnommen worden war, für 20 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mittels Eppendorf-Pipetten (Art.-Nr. B007.1, Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland) abgenommen, aliquotiert (Gewindepräparategläser mit Schraubkappe, Art.-Nr. 391H6110, Scherf Europa GmbH, Meiningen, Deutschland) und bis zur Laktatbestimmung bei -18° C eingefroren. Die Bestimmung der Laktatkonzentration der CF-Sputen erfolgte wie in Punkt 3.2 beschrieben.



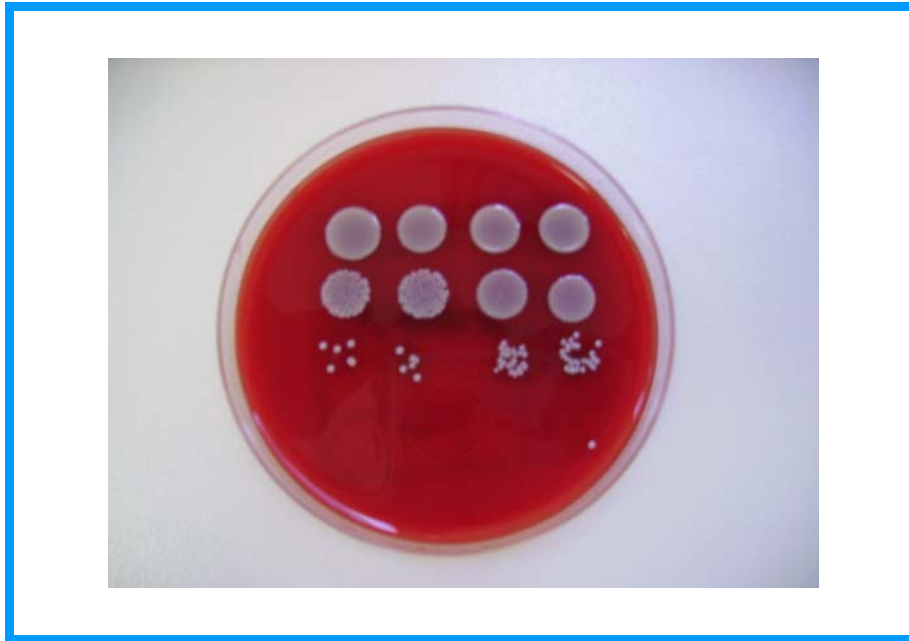


Abbildung 3.4: Keimzahlbestimmung mittels Verdünnungsreihe auf einer Columbia-Blut-Agar-Platte.

### 3.6.2 pH-Wert-Bestimmungen

Bei 23 Sputumproben wurde der pH-Wert mit dem pH-checker (Hanna Instruments, Kehl/Rhein, Deutschland) gemessen.

### 3.7 Laktatproduktion durch polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN)

Um die Herkunft des Laktats im Sputum näher zu untersuchen, wurde die Laktatproduktion von PMN *in vitro* unter aeroben und anaeroben Bedingungen untersucht. PMN wurden aus Buffy Coats (Leukozytenkonzentrate) aufbereitet. Die Buffy Coats wurden von drei verschiedenen anonymen Patienten des Blutspendedienstes der Einrichtung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Halle zur Verfügung gestellt.

Der jeweilige Buffy Coat wurde gleichmäßig auf vier Falconröhrchen (Art.-Nr. 17-1020, Zentrifugen-Röhrchen (PP) steril 50 ml, Becton Dickinson) verteilt. Die Röhrchen wurden bei 4000 U/min für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde

verworfen, dabei war darauf zu achten, dass das Pellet nicht trocken fiel. Anschließend wurde jedes Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. Im Anschluss wurde eine hypotone Lyse durchgeführt, um die Konzentration der Erythrozyten zu reduzieren. Dazu wurden in jedes Falconröhrchen 10 ml destilliertes Wasser gegeben und für genau 30 s in den Röhrchen belassen. Während dieser Zeitspanne wurde die Suspension mittels Schüttelrührer geschüttelt. Um die Lyse zu stoppen, wurde der Ansatz 1:1 mit 1,8% NaCl-Lösung verdünnt und geschüttelt. Anschließend wurden die Falconröhrchen für 20 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Nun wurde der Überstand verworfen und die hypotone Lyse bis zu 4 mal wiederholt, bis die Lösung frei von Erythrozyten war.

Im Weiteren wurde eine Stammlösung hergestellt. Zu diesem Zweck wurden die vier Pellets in einem Falconröhrchen vereinigt und das Gesamtvolumen wurde auf 10 ml mit PBS aufgefüllt. Ein kleines Aliquot wurde 1:10 verdünnt und die Anzahl der Leukozyten wurde mikroskopisch in der Neubauer Zählkammer (Neubauer Zählkammer, Vergrößerung 400x, Axiolab, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) bestimmt. Aus der Stammlösung wurden unverdünnte sowie 1:10 in PBS verdünnte Aliquots hergestellt und aerob sowie anaerob weiterbehandelt. Es wurden insgesamt 8 sterile Röhrchen (PP-Tube 14 ml steril, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) mit den Lösungen befüllt. 4 Röhrchen wurden mit jeweils 2 ml der Stammlösung (1:1) beschickt, die verbliebenen 4 Röhrchen wurden mit 2 ml der 1:10 Verdünnung befüllt. Aerob wurde jeweils 1 Röhrchen der beiden Lösungen (1:1/1:10) für 2 h bei  $-18^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Nach den 2 h wurden die Röhrchen aufgetaut, zentrifugiert (20 min, 4000U/min), der Überstand wurde abpipettiert und aliquotiert. Anschließend wurde eine Laktatbestimmung (Vierfachansätze) durchgeführt. Zwei weitere Röhrchen (1:1/1:10) wurden unmittelbar nach ihrer Herstellung zentrifugiert (20 min, 4000U/min). Nachdem der Überstand abpipettiert wurde und die Aliquotierung stattgefunden hatte, wurde beim Inhalt dieser zwei Röhrchen ohne weitere Behandlung eine Laktatbestimmung durchgeführt. Die verbleibenden vier Proben wurden anaerob bearbeitet. Dazu wurden die vier Proben (2 x 1:1/2 x 1:10) für 4 h in der Anaerobier Bank bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden zwei Röhrchen (1:1/1:10) sofort bearbeitet. Sie wurden zentrifugiert (20 min, 4000U/min), die Überstände

wurden abpipettiert, sie wurden aliquotiert und das enthaltene Laktat wurde bestimmt. Die verbliebenen zwei Proben wurden für 2 h bei  $-18^{\circ}\text{C}$  eingefroren und nach dem Auftauen analog zu den anderen Proben verarbeitet und zur Laktatmessung gebracht. Das beschriebene Vorgehen wurde bei allen erhaltenen Buffy Coats identisch durchgeführt.

### **3.8 Statistische Auswertung**

Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (Microsoft Excel 2002, Redmond, WA, U.S.A.). Die Korrelationen (r-Werte) und die Signifikanzberechnungen (p-Werte), Student's t-test wurden mit dem Statistical Package for Social Sciences (Version 15, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) berechnet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Produktion und Verbrauch von Laktat durch *Pseudomonas aeruginosa*

Nachdem *P. aeruginosa* (PA01) für die aeroben Versuche in einer Übernachtskultur bebrütet wurde, wurde nach der Herstellung einer Suspension mit  $1 \times 10^7$  KBE/ml eine Startkonzentration von 0,7 mmol/L Laktat gemessen. Das entspricht dem Laktatwert der TSB-Lösung ohne bakterielle Inokulation. Nach 4 h der aeroben Bebrütung fiel der Laktatwert der Versuchslösung auf 0,0 mmol/L ab (Abb. 4.1 A). Dieser Wert blieb über die gesamte Versuchsdauer von 24 h unverändert. Während der anaeroben Versuchsdurchführung über vier Tage wurde der Laktatwert von 0,0 mmol/L gleichfalls nicht überschritten (Abb. 4.1 B).

Es wurde kein Verbrauch von externem zugeführtem L-Laktat durch *P. aeruginosa* ermittelt. Die Versuche wurden unter aeroben und anaeroben Bedingungen in TSB für 24 h durchgeführt, dabei hatten die jeweiligen Bakterienlösungen eine L-Laktat-Startkonzentration von 10 mmol/l und eine Keimkonzentration von  $1 \times 10^7$  KBE/ml (Abb. 4.1 C, 4.1 D). Dies verdeutlicht, dass *P. aeruginosa* in einem nährstoffreichen Medium wie TSB kein Laktat verstoffwechselt.

Um die Laktatproduktion und den Laktatverbrauch von *P. aeruginosa* in einem nährstofflosen Medium zu untersuchen, wurde PBS benutzt. Dabei fiel der Laktatgehalt unter aeroben Verhältnissen während 24 h um 3,2 mmol/L ab (Abb. 4.1 E), unter anaeroben Verhältnissen dagegen um 5,4 mmol/L ab (Abb. 4.1 F). Diese Beobachtungen zeigen, dass *P. aeruginosa* extern zugeführtes Laktat verstoffwechselt, wenn kein anderer besser zu verstoffwechselnder Nährstoff in Frage kommt.

Zusammenfassend ist es augenscheinlich, dass *P. aeruginosa* kein externes L-Laktat aufnimmt und metabolisiert, wenn genügend andere zu verstoffwechselnde Nährstoffe zur Verfügung stehen, wie im TSB-Nährmedium. Im nährstofflosen Medium, wie PBS wird externes L-Laktat von *P. aeruginosa* unter aeroben und anaeroben Bedingungen verbraucht.

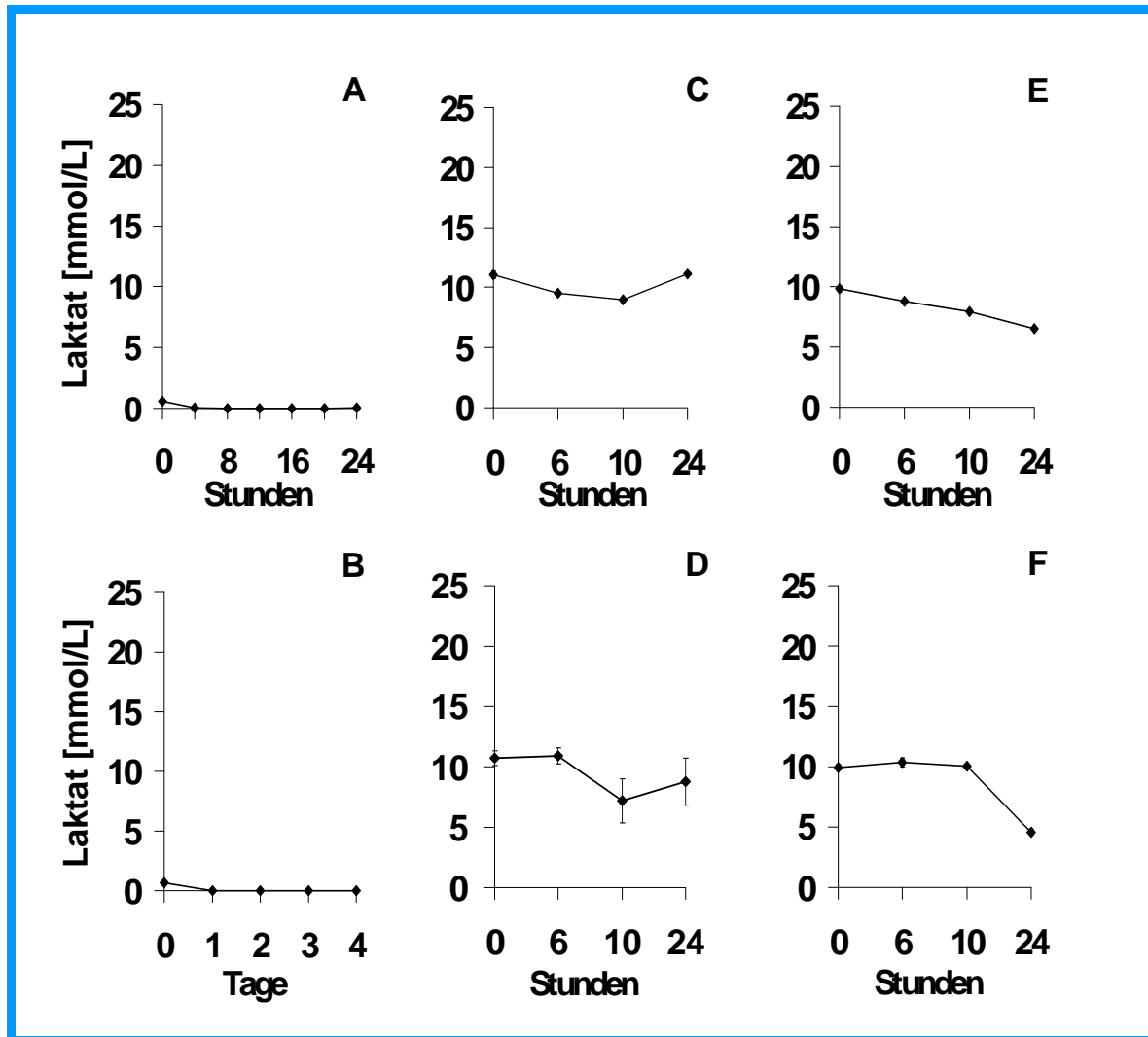


Abbildung 4.1: Laktatproduktion von *P. aeruginosa*: A, C, E: aerobe Wachstumsbedingungen; B, D, F: anaerobe Wachstumsbedingungen. A und B: ohne Laktatzusatz; C-F mit Laktatzusatz von 10 mmol/L. A, B, C, D: Nährmedium TSB; E, F: Nährmedium PBS. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

## 4.2 Untersuchungen der Genexpression von *Pseudomonas aeruginosa* mit Hilfe von DNA-microarrays

In den Genchip-Experimenten zur Untersuchung der anaeroben Genexpression von *P. aeruginosa* waren die Gene, die für den Nitrat- und Argininstoffwechsel kodieren, im Vergleich zu aeroben Bedingungen massiv hochreguliert (Tab. 4.1). Im Gegensatz dazu waren die Gene, die für die ATP-Synthese kodieren, stark herunterreguliert (Tab. 4.1). Diese Daten verdeutlichen, dass *P. aeruginosa* in den durchgeführten Experimenten unter anaeroben Bedingungen metabolisiert.

Tabelle 4.1: Anaerobe Genregulation von *P. aeruginosa* im TSB-Medium

		Veränderung der Genexpression**			
Gen*	Genprodukt	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4
	<b>Pyruvatabbau</b>				
PA3416	Pyruvatdehydrogenase	274,9	195,9	208,5	169,0
PA3417	Pyruvatdehydrogenase	77,8	52,0	47,4	34,2
PA0927 <i>ldhA</i>	D-Laktat-Dehydrogenase (fermentativ)	-3,9	-3,9	-10,8	-6,9
PA2382 <i>lldA</i>	L-Laktat-Dehydrogenase	-1,5	-2,3	-2,8	-2,6
PA4771 <i>lldD</i>	L-Laktat-Dehydrogenase	-2,7	1,4	1,2	1,3
PA1984	wahrscheinliche Acetaldehyd- Dehydrogenase	-2,7	-1,0	-1,4	-1,3
PA4073	Acetaldehyd-Dehydrogenase	1,2	2,5	1,5	1,9
PA5427 <i>adhA</i>	Alkohol-Dehydrogenase	6,0	4,9	2,2	2,7
PA0835 <i>pta</i>	Phosphotransacetylase	4,9	4,2	2,8	3,6
PA0836 <i>ackA</i>	Azetat-Kinase	5,6	4,0	2,8	4,1
PA0854 <i>fumC2</i>	Fumarat-Hydratase	2,0	1,5	1,8	2,3
PA4333	Fumarat-Hydratase	-5,4	-3,8	-4,5	-5,3
PA4470 <i>fumC1</i>	Fumarat-Hydratase	-1,2	2,0	1,6	2,4
PA3452 <i>mqaA</i>	Malat-Dehydrogenase	-5,1	-4,5	-2,2	-2,7
PA4640 <i>mqaB</i>	Malat-Dehydrogenase	-5,0	-4,8	-2,8	-3,3
PA1400	Pyruvat-Carboxylase	-1,1	1,8	2,4	1,2
PA3687 <i>ppc</i>	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase	1,8	1,0	1,1	-1,3

Anaerobe Genregulation von *P. aeruginosa* im TSB-Medium. \* Die Gennummer von *P. aeruginosa* wurde ausgewählt nach [Stover et al 2000], der Genname wurde - falls vorhanden - angegeben. \*\* Die Veränderung der Genexpression wurde nach einem bis vier Tagen Wachstum unter anaeroben Bedingungen im Vergleich zum aeroben Wachstum angegeben.

Tabelle 4.1: Anaerobe Genregulation von *P. aeruginosa* im TSB-Medium (Fortsetzung).

<b>Arginin-Stoffwechsel</b>					
PA5173 <i>arcC</i>	Carbamat-Kinase	6,1	5,0	4,2	5,7
PA5172 <i>arcB</i>	Ornithin-Carbamoyltransferase	5,5	4,2	4,4	5,6
PA5171 <i>arcA</i>	Arginin-Deiminase	5,4	4,2	4,6	4,9
PA5170 <i>arcD</i>	Arginin/Ornithin-Antiporter	5,5	4,3	3,0	3,7
<b>Nitrat-Stoffwechsel</b>					
PA1172 <i>napC</i>	Cytochrom-C-Typ-Protein	14,4	11,9	16,6	13,6
PA1173 <i>napB</i>	Cytochrom-C-Typ-Protein-Precursor	16,1	13,1	10,6	12,9
PA1174 <i>napA</i>	Periplasmatisches Nitrat-Reduktase-Protein	15,9	10,7	15,4	12,6
PA1175 <i>napD</i>	Protein der periplasmatischen Nitrat-Reduktase	10,9	4,4	7,9	3,8
PA1176 <i>napF</i>	Ferredoxin-Protein	22,2	8,5	11,5	8,2
PA1177 <i>napE</i>	Periplasmatisches Nitrat-Reduktase-Protein	39,3	5,7	7,9	5,2
<b>ATP-Synthese</b>					
PA5553 <i>atpC</i>	ATP-Synthase-Epsilon-Chain	-7,1	-5,0	-8,5	-5,0
PA5554 <i>atpD</i>	ATP-Synthase-Beta-Chain	-13,9	-8,2	-6,2	-6,7
PA5555 <i>atpG</i>	ATP-Synthase-Gamma-Chain	-14,7	-12,0	-10,8	-9,6
PA5556 <i>atpA</i>	ATP-Synthase-Alpha-Chain	-18,4	-11,2	-6,1	-6,5
PA5557 <i>atpH</i>	ATP-Synthase-delta-Chain	-12,5	-10,4	-6,6	-7,9
PA5558 <i>atpF</i>	ATP-Synthase-B-Chain	-7,7	-4,1	-3,7	-4,1
PA5559 <i>atpE</i>	ATP-Synthase-C-Chain	-8,3	-5,1	-4,3	-4,4
PA5560 <i>atpB</i>	ATP-Synthase-A-Chain	-5,4	-3,5	-3,0	-2,9
PA5561 <i>atpI</i>	ATP-Synthase-Protein-I	-1,7	-1,8	-2,2	-2,1

Anaerobe Genregulation von *P. aeruginosa* im TSB-Medium. \* Die Gennummer von *P. aeruginosa* wurde ausgewählt nach [Stover et al 2000], der Gennamen wurde - falls

vorhanden - angegeben. \*\* Die Veränderung der Genexpression wurde nach einem bis vier Tagen Wachstum unter anaeroben Bedingungen im Vergleich zum aeroben Wachstum angegeben.

Bei der Untersuchung der Genexpression der gesamten Wege des Pyruvatabbaus stellte sich heraus, dass die Gene, die für den Abbauweg zum Succinat kodieren, nicht differentiell reguliert oder herunter geregelt waren (Tab. 4.1, Abb. 4.2). Im Gegensatz dazu waren die Gene, die für den Pyruvatabbau über das Acetyl-CoenzymA kodieren, stark hochreguliert. Die Gene, die für die beiden Pyruvatdehydrogenasen (PA3416, PA3417) kodieren, waren 275 fach bzw. 78 fach hochreguliert. Diese vermehrte Expression hielt für alle vier Versuchstage an. Die Gene, die für den weiteren Pyruvatabbau über das Acetyl-CoenzymA zum einen zum Acetat und zum anderen zum Ethanol kodieren, waren ebenfalls hochreguliert (Tab. 4.1, Abb. 4.2). Dagegen waren die Gene, die für die drei Laktatdehydrogenasen kodieren, welche Pyruvat zu Laktat abbauen, während des anaeroben Wachstums nicht differentiell reguliert. Diese Daten sprechen dafür, dass Pyruvat im TSB-Medium eher über Acetyl-CoenzymA abgebaut wird, als zu Laktat und Succinat.



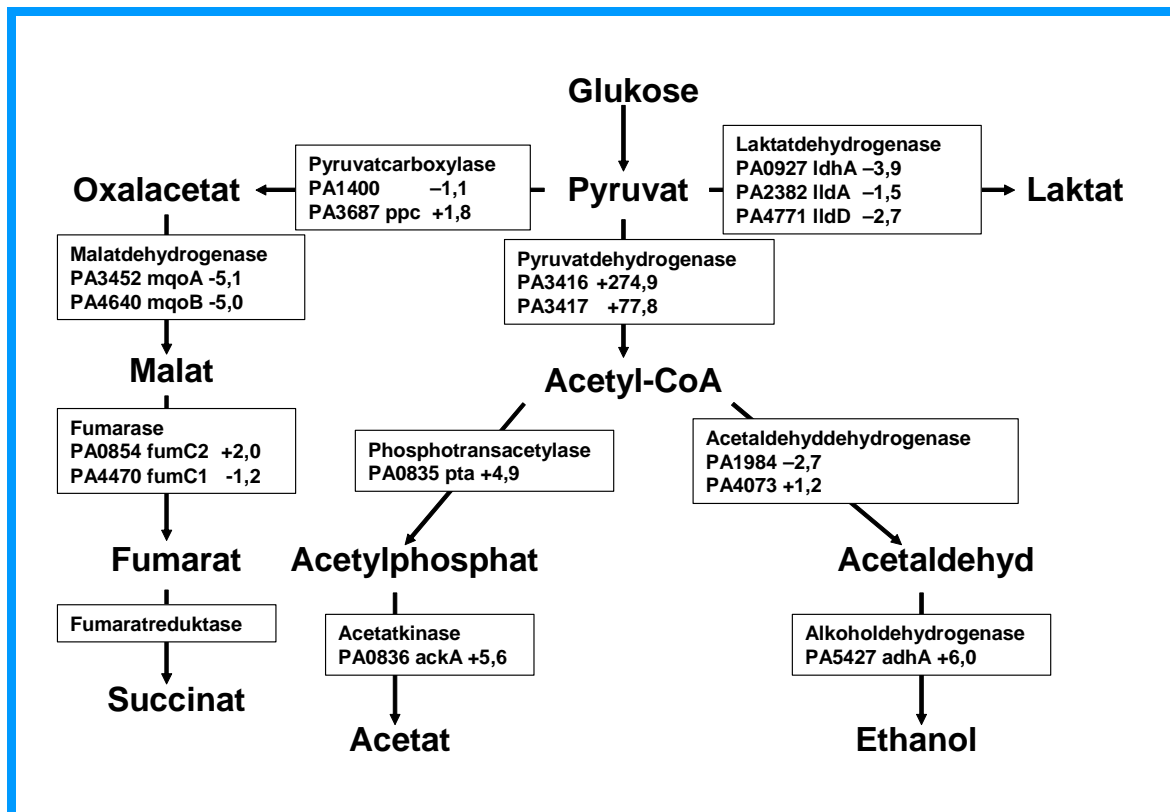


Abbildung 4.2: Anaerobe Genexpression von *P. aeruginosa* im DNA-microarray (Mittelwert aus drei unabhängigen Ansätzen aus Dreifachbestimmungen).

### 4.3 Produktion und Verbrauch von Laktat durch *Staphylococcus aureus*

Im Gegensatz zu *P. aeruginosa* produzierte *S. aureus* Laktat. Die Produktion betrug unter anaeroben Bedingungen am zweiten Versuchstag 2,8 mmol/L L-Laktat. Die Konzentration von 2,8 mmol/L hielt sich über den dritten Versuchstag, um dann am vierten auf die Startkonzentration von 0,8 mmol/L abzufallen (Abb. 4.3 B). Unter aeroben Wachstumsbedingungen war die Laktatproduktion dagegen ausgeprägter. Nach 4 h Wachstum in TSB stieg die Laktatproduktion auf 11,2 mmol/L an, fiel dann aber nach 24 h auf 1,9 mmol/L ab (Abb. 4.3 A).

Unter aeroben Bedingungen fiel die Laktatkonzentration der Versuchslösung (TSB), die auf 11,2 mmol/L und eine *S. aureus*-Konzentration von  $1 \times 10^7$  KBE/ml eingestellt wurde, nach 24 h auf 1,7 mmol/L ab (Abb. 4.3 C). Während der anaeroben Versuchsdurchführung mit TSB als Nährmedium stieg die Laktatkonzentration in der

Lösung auf 15,6 mmol/L an (Abb. 4.3 D). Als PBS als nährstoffloses Medium verwendet wurde, konnte nahezu kein Laktatumsatz gemessen werden, weder unter aeroben (Abb. 4.3 E) noch unter anaeroben (Abb. 4.3 F) Wachstumsbedingungen.

Es ist offensichtlich, dass *S. aureus* während der exponentiellen Wachstumsphase zu der Laktatbildung im CF-Sputum beitragen kann. Auch während anaerober Wachstumsphasen trägt *S. aureus* geringfügig zur Laktatbildung im CF-Sputum bei. Unter aeroben Bedingungen überwiegt dagegen nach wenigen Stunden des Wachstums der Laktatverbrauch.

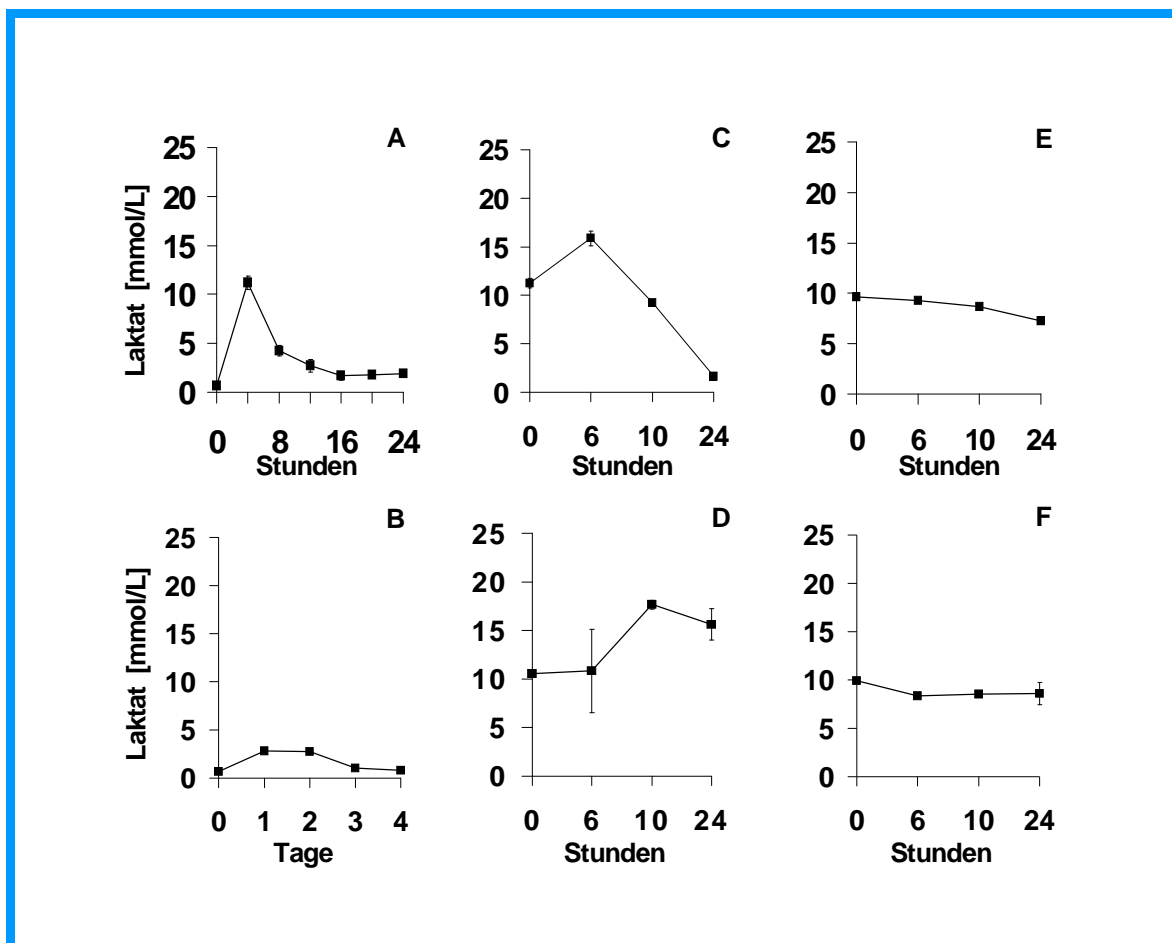


Abbildung 4.3: Laktatproduktion von *S. aureus*: A, C, E: aerobe Wachstumsbedingungen; B, D, F: anaerobe Wachstumsbedingungen. A und B: ohne Laktatzusatz; C-F mit Laktatzusatz von 10 mmol/L. A, B, C, D: Nährmedium TSB; E, F: Nährmedium PBS. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

#### 4.4 Produktion und Verbrauch von Laktat durch *Burkholderia cenocepacia*

Beim Vergleich der L-Laktat-Produktion von *B. cenocepacia* (J2315) mit der von *P. aeruginosa* ergaben sich ähnliche Werte. Weder unter aeroben, noch unter anaeroben Wachstumsbedingungen produziert *B. cenocepacia* Laktat (Abb. 4.4 A, 4.4 B).

Die Situation veränderte sich jedoch, wenn externes Laktat [10 mmol/L] zugegeben wurde. Während des aeroben Wachstums in TSB fiel die Laktatkonzentration auf 3,2 mmol/L am Versuchsende. Somit verbrauchte *B. cenocepacia* mit 8,0 mmol/L das meiste externe Laktat. Unter anaeroben Wachstumsbedingungen in TSB produzierte dagegen *B. cenocepacia* 11,4 mmol/L Laktat (Abb. 4.4 D). Dieses deutet auf eine Verstoffwechslung der Nährstoffe hin, die im TSB enthalten sind. Wenn PBS als nährstoffloses Medium für die *B. cenocepacia*-Bakterienlösung verwendet wurde, blieb die Laktatkonzentration sowohl unter aeroben, als auch unter anaeroben Bedingungen nahezu identisch (Abb. 4.4 E, 4.4 F).

Der Laktatmetabolismus der drei untersuchten Bakterien ist somit sehr inhomogen. Während *S. aureus* und *B. cenocepacia* zur Laktatproduktion beitragen können, metabolisiert *P. aeruginosa* keinerlei Laktat.

Bei den Versuchen, bei denen D-Laktat in die Bakterienlösungen zugegeben wurde, zeigte sich für alle 3 Bakterien keine Verminderung der Laktatkonzentration, weder unter aeroben, noch unter anaeroben Bedingungen.

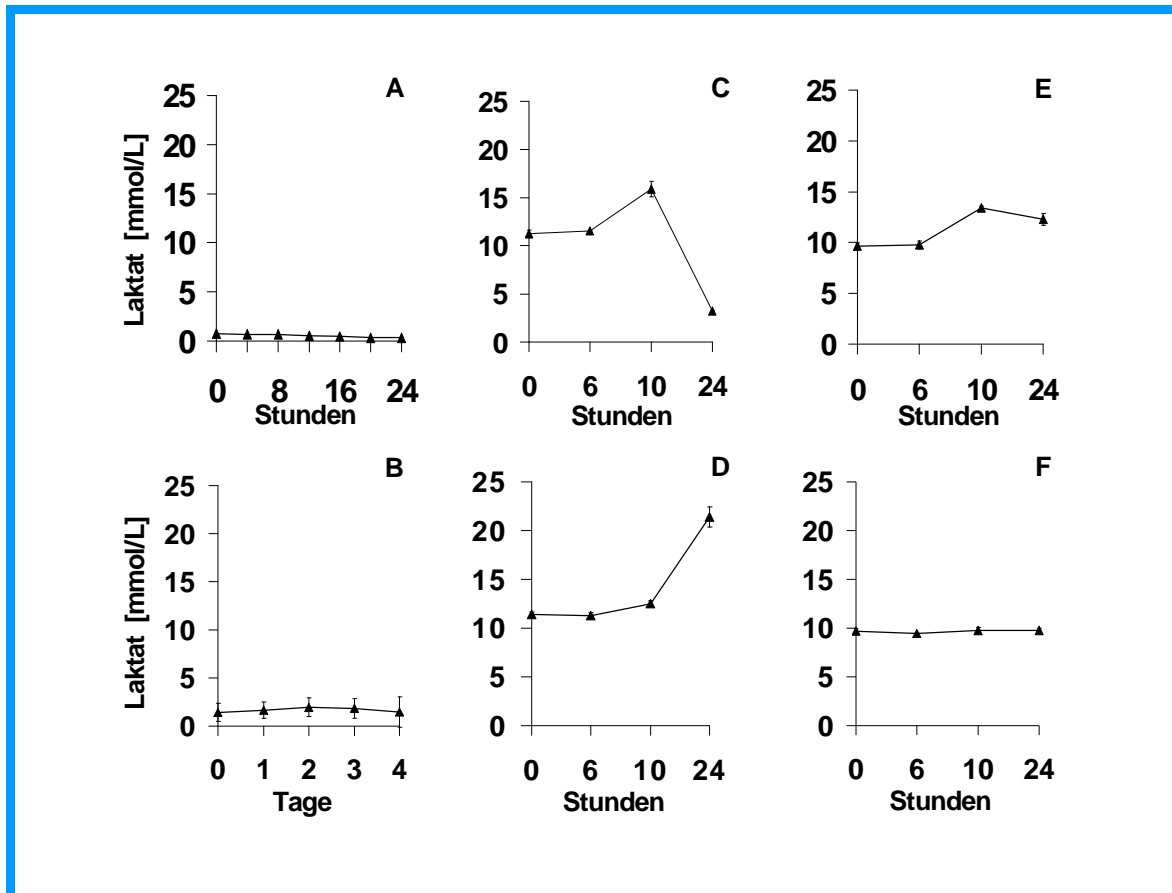


Abbildung 4.4: Laktatproduktion von *B. cenocepacia*: A, C, E: aerobe Wachstumsbedingungen; B, D, F: anaerobe Wachstumsbedingungen. A und B: ohne Laktatzusatz; C-F mit Laktatzusatz von 10 mmol/L. A, B, C, D: Nährmedium TSB; E, F: Nährmedium PBS. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

## 4.5 *In vivo*-Ergebnisse

### 4.5.1 L-Laktat, Keimidentifikation und Keimzahlbestimmung im Sputum

Die L-Laktat-Konzentration in den Sputen ( $n=25$ ) betrug  $3,0 \pm 3,1$  mmol/L, im Bereich von 0,3 bis 14,1 mmol/L (Abb. 4.5). In 14 Sputen wurde *P. aeruginosa* nachgewiesen, in 10 Sputen *S. aureus* und in einem Sputum *B. cepacia*. Die L-Laktat-Konzentrationen der 14 Sputen, die mit *P. aeruginosa* kontaminiert waren, lagen im Bereich wie die L-Laktat-Konzentrationen der 10 mit *S. aureus* kontaminierten Sputen ( $3,3 \pm 3,7$  mmol/L vs.  $2,8 \pm 2,3$  mmol/L,  $p=0,67$ ). Das Sputum, das mit *B. cepacia* kontaminiert war, hatte eine L-Laktat-Konzentration von 1,9 mmol/L. Die

Ergebnisse der Gesamtlaktatmessungen, welche gaschromatographisch erzielt wurden, unterschieden sich nicht von den spektrophotometrisch ermittelten L-Laktat-Werten.

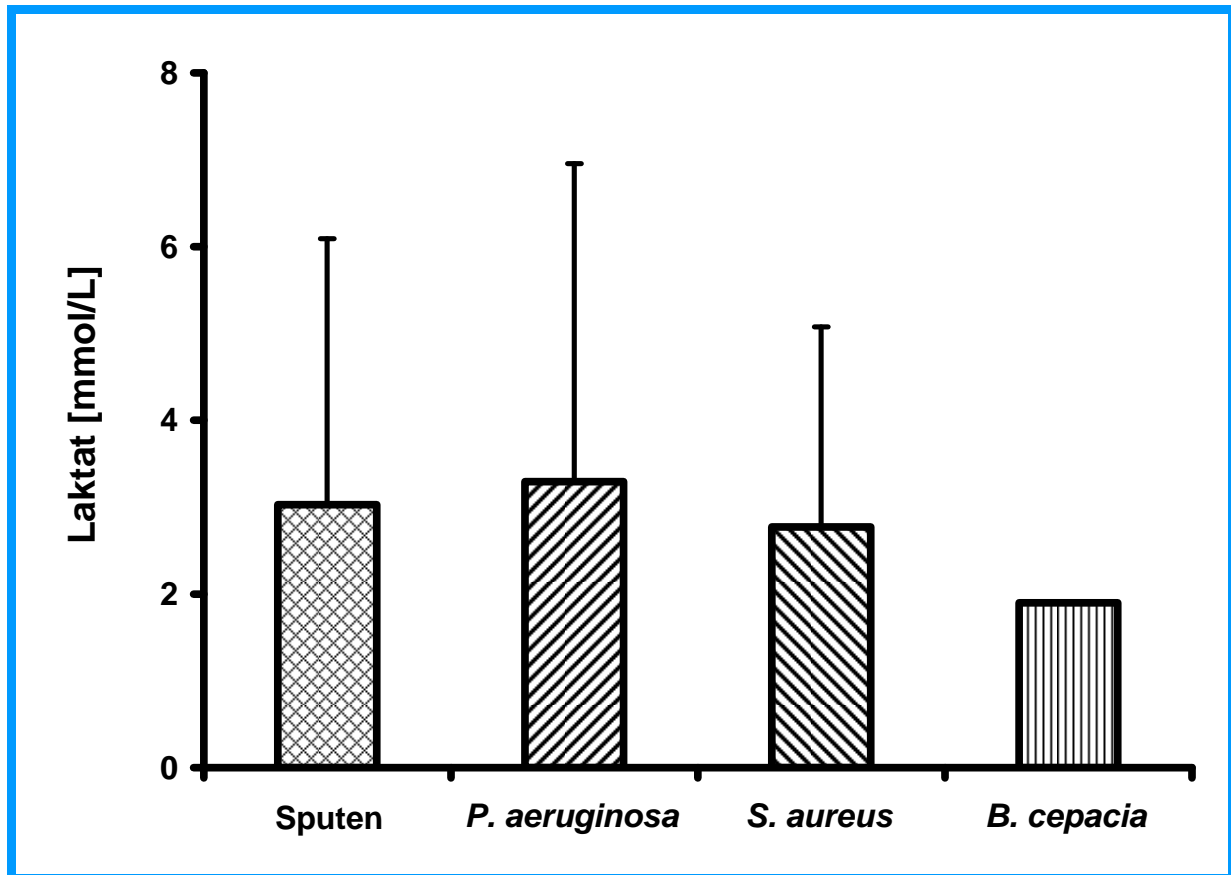


Abbildung 4.5: Laktatkonzentration von CF-Sputen. Sputen gesamt (n=25), *P. aeruginosa* (n=14), *S. aureus* (n=10), *B. cepacia* (n=1).

Die Keimzahlen in den Sputen bewegten sich zwischen  $9,2 \times 10^4$  bis  $1,5 \times 10^9$  KBE/ml, ( $8,3 \times 10^7 \pm 2,9 \times 10^8$  KBE/ml). In den 14 Sputen, die mit *P. aeruginosa* kontaminiert waren, betrug die Keimzahl  $1,3 \times 10^8 \pm 3,9 \times 10^8$  KBE/ml. Verglichen mit *P. aeruginosa* waren die Keimzahlen der 10 Sputen mit *S. aureus* nicht unterschiedlich  $1,2 \times 10^7 \pm 1,2 \times 10^7$  KBE/ml,  $p=0,26$ . Das Sputum, das mit *B. cepacia* kontaminiert war, wies eine Keimzahl von  $7,7 \times 10^7$  KBE/ml auf (Abb. 4.6).

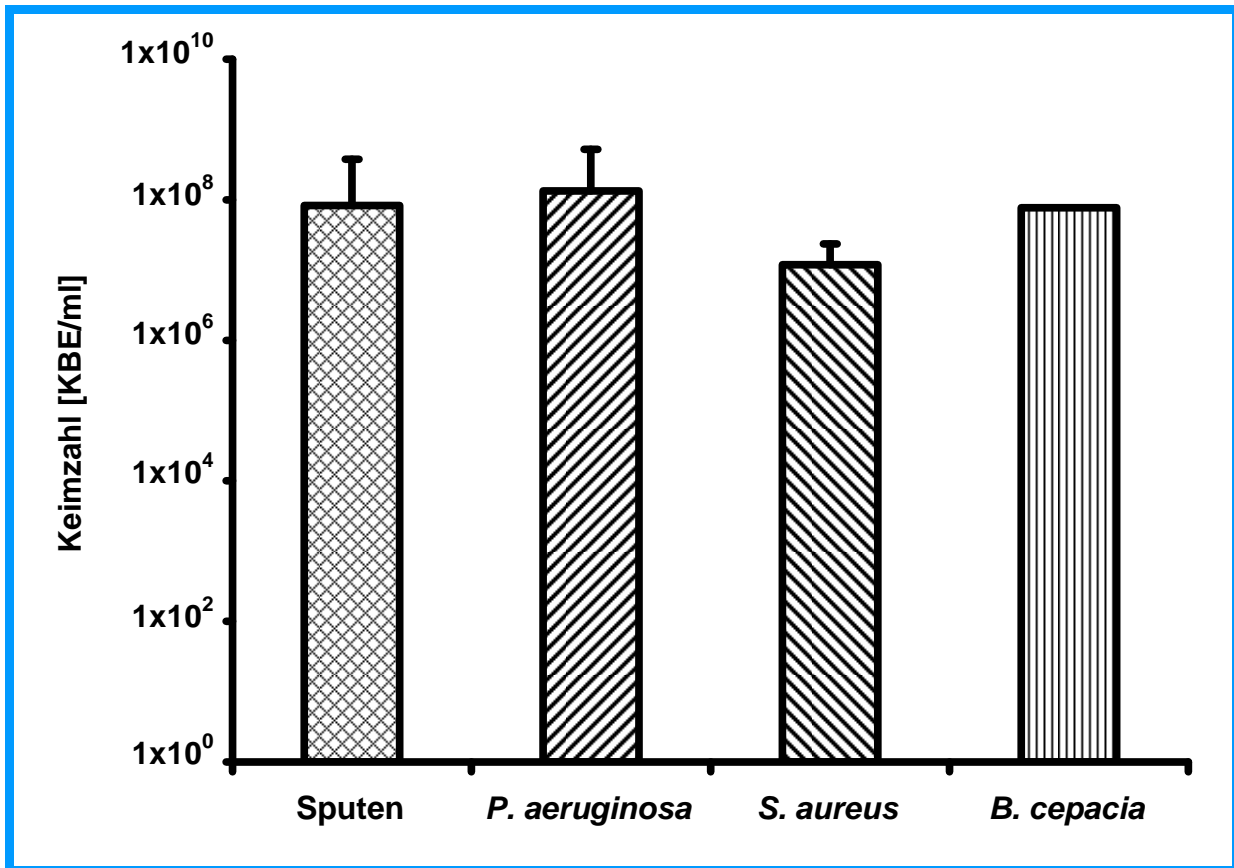


Abbildung 4.6: Keimzahlen in CF- Sputen. Sputen gesamt (n=25), *P. aeruginosa* (n=14), *S. aureus* (n=10), *B. cepacia* (n=1).

Es wurde keine Korrelation zwischen Keimzahlen und L-Laktat in den jeweiligen Sputen festgestellt ( $R^2=0,024$ ,  $r=0,155$ ). Auch bei der Betrachtung der Untergruppen, wurde keine Korrelation für *P. aeruginosa* ( $R^2=0,023$ ,  $r=0,152$ ) und *S. aureus* ( $R^2=0,030$ ,  $r=0,173$ ) mit den jeweiligen Keimzahlen gefunden.

#### 4.5.2 Lungenfunktionsuntersuchungen

Um zu bestimmen, ob eine erhöhte Laktatkonzentration im Sputum zu einer verschlechterten Lungenfunktion führt, wurden diese Daten miteinander korreliert. Es zeigte sich eine negative Korrelation zwischen  $FEV_1$  und L-Laktat in den Sputen aller Patienten ( $r=-0,446$ ,  $p=0,043$ ). Auch bei Betrachtung der Untergruppen zeigte sich eine negative Korrelation: für *P. aeruginosa*  $r=-0,527$  und für *S. aureus*  $r=-0,454$  (Abb. 4.7). Die Korrelationskoeffizienten von FVC mit Laktat waren bei der Betrachtung aller Patienten niedriger ( $r=-0,331$ ), für *P. aeruginosa* ( $r=-0,432$ ) und für *S. aureus* ( $r=-0,244$ ).

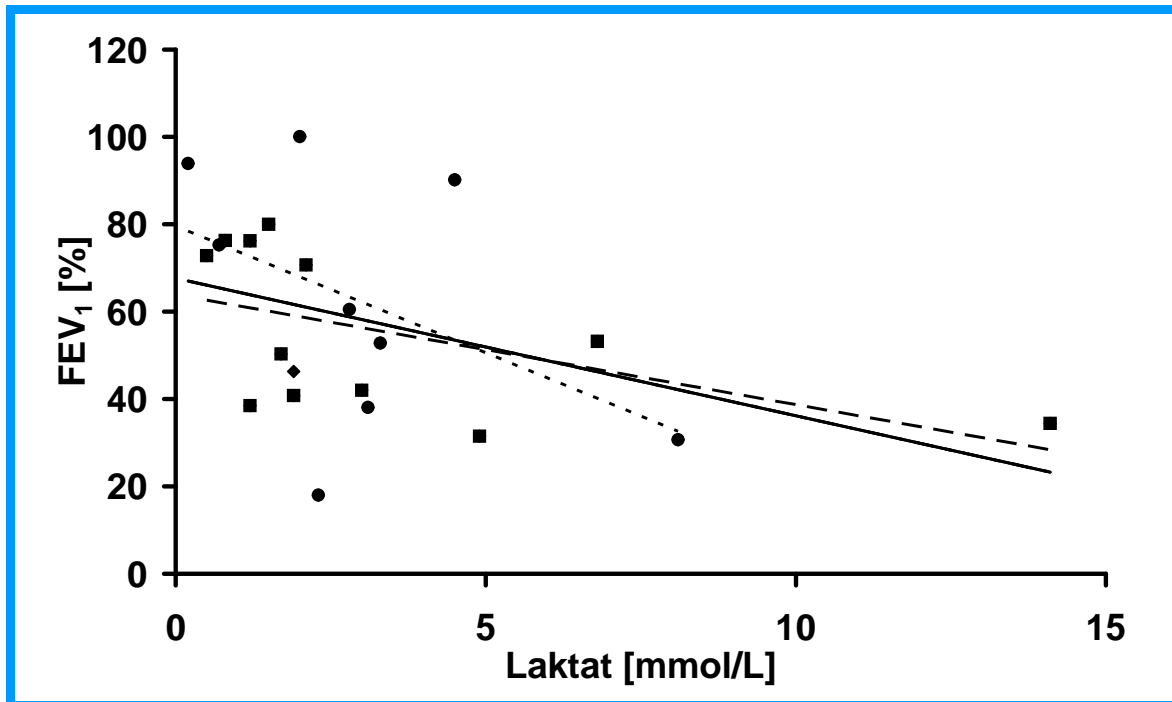


Abbildung 4.7: Korrelation von FEV<sub>1</sub> (forcierte expiratorische Einsekundenkapazität) und L-Laktat in den Sputen von CF-Patienten. — : Regressionsgerade der gesamten Sputen; - - - - : von Sputen mit *P. aeruginosa*-Kontamination; ..... von Sputen mit *S. aureus*-Kontamination; ◆: *B. cenocepacia*-Sputen; ■ *P. aeruginosa*-Sputen; ●: *S. aureus*-Sputen.

### 4.5.3 pH-Wert-Bestimmungen

In den Sputen von 23 Patienten wurde der pH-Wert gemessen. Der pH-Wert betrug  $7,23 \pm 0,43$ , die Ergebnisse befanden sich im Bereich von 5,99 bis 7,80. Die Laktatwerte der 23 untersuchten Sputen bildeten eine negative Korrelation mit dem pH-Wert ( $r=-0,51$ ,  $p=0,014$ ). Eine höhere Laktatkonzentration trug demzufolge zu einer Ansäuerung der untersuchten Sputen bei.

## 4.3 Laktatproduktion durch polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN)

Nachdem die PMN unter aeroben Bedingungen bearbeitet wurden, produzierten sie  $1,6 \pm 1,0$  mmol/L Laktat (Abb. 4.8). Die Laktatkonzentration erhöhte sich nicht signifikant, nachdem die PMN, die aerob bearbeitet wurde, für 2 h bei  $-18^{\circ}\text{C}$

eingefroren wurde ( $2,1 \pm 1,2$  mmol/L). Die Zellmembranen wurden durch die niedrigen Temperaturen aufgebrochen, damit wurde geprüft, ob die PMN unter aeroben Bedingungen noch zusätzlich intrazelluläres Laktat produzierten, welches nicht in den extrazellulären Raum transportiert wurde.

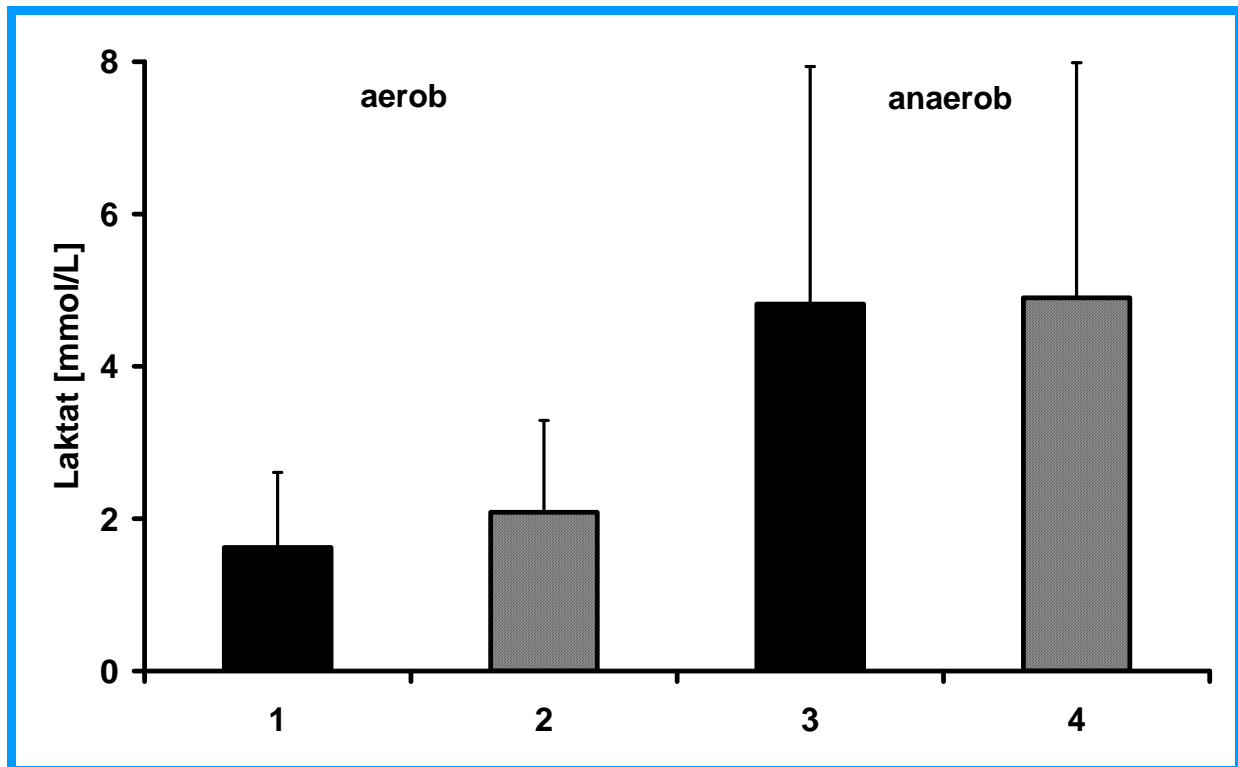


Abbildung 4.8: Laktatproduktion durch  $6 \times 10^8$  neutrophile Granulozyten. 1: unter aeroben Bedingungen, 2: unter aeroben Bedingungen und eingefroren, 3: unter anaeroben Bedingungen, 4: unter anaeroben Bedingungen und eingefroren (bei  $-18^\circ\text{C}$ ).

Im Gegensatz zu der aeroben Bearbeitung produzierten die PMN unter anaeroben Bedingungen mehr als doppelt soviel Laktat. Dabei wurden die PMN-Lösungen für 4 h bei  $37^\circ\text{C}$  in der Anaerobierbank inkubiert. Der Laktatgehalt der Lösungen, die sofort nach der Inkubationszeit gemessen wurden, betrug  $4,8 \pm 3,1$  mmol/L,  $p=0,16$ . Die PMN, die nach der anaeroben Inkubation für 2 h eingefroren wurden, produzierten  $4,9 \pm 3,1$  mmol/L,  $p=0,09$ .

Hierbei wurde deutlich, dass Laktat weder unter aeroben noch unter anaeroben Bedingungen im Intrazellularraum der PMN verbleibt. Die starke Laktatproduktion der PMN unter anaeroben Bedingungen ist möglicherweise ursächlich für die hohen



Laktatkonzentrationen in den CF-Sputen.

Hierfür spricht auch die negative Korrelation zwischen den Laktatkonzentrationen der CF-Sputen und der Lungenfunktion ( $r=-0,446$ ,  $p=0,043$  für  $FEV_1$ ) (Abb. 4.7). Diese Aussagen sind damit vereinbar, dass eine große Zahl von PMN eine starke Entzündung bewirkt, was mit einer schlechten Lungenfunktion korreliert.

## 5 Diskussion

### 5.1 Laktat im Sputum von CF-Patienten

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Laktat im Sputum von Patienten mit Cystischer Fibrose vorhanden ist, und welche biologischen Prozesse für die Laktatproduktion verantwortlich sind. Dabei konnte erstmalig gezeigt werden, dass Laktat in allen Sputen von CF-Patienten vorkommt (Abb. 4.5). Die in den untersuchten Sputumproben ermittelte Laktatkonzentration von  $3,0 \pm 3,1$  mmol/L liegt nach den vorgelegten Untersuchungen deutlich über dem Wert für Laktat im Blutplasma ( $1,27 \pm 0,42$  mmol/L [Nikolaizik et al. 1998]) von CF-Patienten. Damit kann es sich nicht um einen passiven Diffusionsprozess aus dem Plasma ins Sputum handeln, sondern es liegt ein aktiver Anreicherungsprozess für Laktat im Sputum der CF-Patienten vor. Das Laktat im CF-Sputum kann somit entweder nur bakteriellen Ursprungs sein oder von den reichlich im Sputum vorkommenden neutrophilen Granulozyten stammen.

### 5.2 Bakterielle Laktatproduktion

Um den genauen Ursprung des Laktats zu klären, wurden die möglichen Quellen näher untersucht. Bei der Analyse der bakteriellen Laktatproduktion konnte gezeigt werden, dass *S. aureus* (im Gegensatz zu *P. aeruginosa*) *in vitro* aerob und anaerob in der Lage ist, Laktat zu produzieren (Abb. 4.1, 4.3, jeweils A,B). Dieses Ergebnis deckt sich mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, in denen gezeigt wurde, dass anaerob die Produktion von Laktat durch *S. aureus* erhöht ist [Fuchs et al. 2007, Richardson et al. 2008] sowie dass *S. aureus* in Biofilmen vermehrt Laktat produziert [Zhu et al. 2007]. Im CF-Sputum wird *S. aureus* vermehrt von Exopolysacchariden umgeben [Cramton et al. 2001, McKenney et al. 1999]. Dies führt dazu, dass die Bakterien in Form von anaeroben Mikrokolonien oder dreidimensionalen Biofilmen vorliegen [Ulrich et al. 2007]. Damit sind beide Konditionen erfüllt, unter denen *S. aureus* auch *in vitro* vorliegt und somit die erhöhte Laktatproduktion verursacht.

Allerdings liegen die *S. aureus*-Keimzahlen bei den durchgeführten *in vitro*-Versuchen deutlich höher als die Keimzahlen für *S. aureus* in den CF-Sputen. Die maximale Laktatproduktion erfolgte *in vitro* nach 4 h aeroben Wachstums bei einer

Keimzahl von  $3,9 \pm 1,2 \times 10^8$  KBE/ml (Abb. 4.3 A) und anaerob nach einem Tag bei  $2,3 \pm 1,4 \times 10^8$  KBE/ml (Abb. 4.3 B). Die Keimzahlen in den Sputumproben, die ausschließlich mit *S. aureus* kontaminiert waren, lagen dagegen um eine Zehnerpotenz niedriger bei  $1,2 \pm 1,2 \times 10^7$  KBE/ml (Abb. 4.6). Demzufolge sollte der Beitrag von *S. aureus* zur Laktatproduktion in diesen Sputumproben entsprechend gering ausfallen. Dies erklärt auch, weshalb in Sputen, die nur mit *S. aureus* besiedelt waren, nicht mehr Laktat zu finden war, als in Sputen, die ausschließlich mit *P. aeruginosa* kontaminiert waren (Abb. 4.5).

Bei den durchgeführten Untersuchungen wurde deutlich, dass *P. aeruginosa* weder unter aeroben noch unter anaeroben Wachstumsbedingungen Laktat produziert (Abb. 4.1 A,B). Dies lässt sich dadurch erklären, dass *P. aeruginosa* nur in der Lage ist, unter anaeroben Bedingungen Pyruvat weiter zu Laktat zu metabolisieren, wenn Pyruvat als einzige Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht [Eschbach et al. 2004]. Bei der Verwendung eines reichen Nährmediums wie TSB für die *in vitro*-Versuche, welches den im Sputum von CF-Patienten vorkommenden Bedingungen ähnlich ist [Linnane et al. 1998, Yoon et al. 2006], wird bevorzugt Nitrat oder Arginin zur Energiegewinnung genutzt, so dass es nicht zu einer vermehrten Produktion von Laktat kommen kann.

### 5.2.1 Genexpression von *Pseudomonas aeruginosa*

Die Ergebnisse der untersuchten Expressionen von Genen des Pyruvatstoffwechsels von *P. aeruginosa* unter anaeroben und aeroben Bedingungen stehen in Übereinstimmung mit den *in vitro*-Versuchen zur Laktatproduktion durch das Bakterium. Unter anaeroben Bedingungen werden die Gene, die für den Laktatstoffwechsel kodieren, vermindert exprimiert (Abb. 4.2). Die Beobachtung, dass Laktat anaerob nicht durch Bakterien gebildet wird, trifft sowohl für *P. aeruginosa* für die *in vitro*-Laktatproduktion, wie auch für die Genexpression zu (Abb. 4.1). Dieses Ergebnis ist neu und nicht in der Literatur belegt.

### 5.3 Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) als Quelle des Laktats im Sputum von Patienten mit Cystischer Fibrose

Da Bakterien als Hauptursache für die hohen Laktatkonzentrationen in den CF-Sputen ausgeschlossen werden können, muss es eine weitere Quelle des Laktats geben. Als möglicher Ursprung kommt nur die vorherrschende Zellart im CF-Sputum in Frage: die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten [Meyer KC 2004]. Unter anaeroben Bedingungen wird von  $6 \times 10^8$  neutrophilen Granulozyten eine ähnliche Menge Laktat gebildet ( $4,8 \pm 3,1$  mmol/L, Abb. 4.8), wie die in den CF-Sputen gemessene Laktatkonzentration ( $3,0 \pm 3,1$  mmol/L, Abb. 4.5). Die Laktatproduktion der PMN unter aeroben Bedingungen ( $1,6 \pm 1,0$  mmol/L) ist deutlich geringer als unter anaeroben Konditionen ( $4,9 \pm 3,1$  mmol/L) (Abb. 4.8). Da im CF-Sputum anaerobe Bedingungen vorherrschen, ist von einer erhöhten Laktatproduktion der PMN auszugehen [Worlitzsch et al. 2002]. Auch eingefrorene PMN produzieren nach einer anaeroben Inkubationszeit von 2 h  $4,9 \pm 3,1$  mmol/L (Abb. 4.8). Die Laktatkonzentration ist damit bei den PMN nach Zerstörung der Zellmembran genauso hoch wie bei PMN mit intakter Zellmembran ( $4,8 \pm 3,1$  mmol/L, Abb. 4.8). Das spricht dafür, dass das gesamte Laktat, welches von PMN gebildet wird, in den Extrazellulärraum gegeben wird. Somit wird deutlich, dass Laktat weder unter aeroben noch unter anaeroben Bedingungen im Intrazellulärraum der PMN verbleibt.

Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten, die bei den Versuchen verwendet wurde, liegt in derselben Größenordnung, wie sie in CF-Sputen vorkommt [Ratjen und Döring 2003, Meyer 2004]. Die Bedingung, dass die Versuche unter anaeroben Verhältnissen (wie im CF-Sputum), durchgeführt wurden, sind erfüllt worden. Zudem spricht die Tatsache, dass kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Laktatkonzentrationen von sowohl mit *P. aeruginosa*, als auch mit *S. aureus* kontaminierten Sputen besteht, dafür, dass das im Sputum befindliche Laktat nicht von Bakterien, sondern von neutrophilen Granulozyten gebildet wird. Damit sind die neutrophilen Granulozyten als wahrscheinlichste Quelle für die hohen Laktatwerte im Sputum von CF-Patienten bewiesen.

## 5.4 *Pseudomonas aeruginosa*-Laktatmetabolismus

Auf die sich nun stellende Frage, ob Bakterien und im speziellen *P. aeruginosa* von extern vorkommendem, durch neutrophile Granulozyten gebildetem Laktat profitieren können, wurde der Metabolismus von *P. aeruginosa* näher untersucht. Da Laktat weder in den Nitratstoffwechsel [Comolli und Donohue 2002, Chen et al. 2003, Filiatrault et al. 2005], noch den Argininmetabolismus [vander Wauven et al. 1984, Gamper et al. 1991] eingebunden ist, könnte *P. aeruginosa* Laktat lediglich über den Pyruvatstoffwechsel anaerob metabolisieren. Daraufhin wurde die anaerobe Genexpression von *P. aeruginosa* in Hinsicht auf den Laktatmetabolismus näher untersucht (Abb. 4.2, Tab. 4.1).

## 5.5 Anaerobe Energiegewinnung von *Pseudomonas aeruginosa*

Die Gene, die für die drei Laktatdehydrogenasen kodieren, sind herunterreguliert (Abb. 4.2). Das Ergebnis deckt sich mit der *in-vitro* gemessenen Laktatproduktion durch *P. aeruginosa* (Abb. 4.1). Andererseits ist die Genexpression für die Gene, die für die Enzyme kodieren, welche für den Stoffwechselweg vom Pyruvat zum Acetyl-CoEnzymA und dessen Folgeprodukten zuständig sind, massiv hochreguliert.

Die wahrscheinlichste Erklärung für diese Regulierung der Stoffwechselwege besteht darin, dass es für *P. aeruginosa* unter anaeroben Bedingungen energetisch am günstigsten ist, wenn kein Laktat metabolisiert wird. Für diese Annahme spricht auch, dass der Stoffwechselschritt vom Pyruvat zum Acetyl-CoEnzymA irreversibel ist [Eschbach et al. 2004], womit einmal zum Acetyl-CoEnzymA umgesetztes Pyruvat nicht mehr in den Laktatstoffwechsel eingebracht werden kann. Somit ist es theoretisch denkbar, dass extern zugeführtes Laktat in einem nährstofflosen Medium als Energiequelle dienen kann.

Da diese Bedingungen im äußerst nährstoffreichen Sputum nicht vorherrschen, wird *P. aeruginosa* Laktat dort nicht als Energiequelle nutzen. Unter anaeroben

Bedingungen sind aber die Gene, die für die Pyruvatdehydrogenasen kodieren, massiv hochreguliert. Sie sind in die Aktivierung des *P. aeruginosa*-type-III-secretion-system eingebunden, welches für eine ansteigende Virulenz dieses Mikroorganismus verantwortlich ist [Dacheux et al. 2002]. Daher bieten diese Gene möglicherweise ein lohnendes Angriffsziel in der Therapie gegen *P. aeruginosa*.

## **5.6 Laktat als noninvasiver Entzündungsmarker für die Therapie der chronischen CF-Lungenentzündung**

Es bleibt die Frage bestehen, welche klinische Bedeutung die erhöhten Laktatkonzentrationen im Sputum der CF-Patienten haben. Da der Beitrag von Bakterien zur Laktatbildung gering ist, und die hohen Laktatkonzentrationen im Sputum durch die anaerobe Produktion von neutrophilen Granulozyten zu erklären sind, wurden die Lungenfunktionswerte ( $FEV_1$ ) mit den Laktatwerten in den Sputen der jeweiligen Patienten korreliert. Es zeigte sich eine negative Korrelation zwischen abfallenden  $FEV_1$ -Werten und ansteigenden Laktatkonzentrationen im Sputum der gleichen Patienten (Abb. 4.7).

Damit kann Laktat als ein Marker für die entzündungsabhängige Anzahl der neutrophilen Granulozyten angesehen werden. Je größer die Laktatkonzentration in den Sputen ist, desto höher ist die Anzahl der neutrophilen Granulozyten, desto stärker ist die Entzündung und desto schlechter ist die Lungenfunktion.

Diese Beobachtung geht mit der Tatsache einher, dass bisher Produkte von neutrophilen Granulozyten wie neutrophile Elastase [Goldstein und Döring 1986] oder Myeloperoxidase [Meyer KC 2004] als Entzündungsparameter identifiziert werden konnten, die auch negativ mit den Lungenfunktionswerten korrelieren [Döring et al. 2007, Castellani et al. 2008].

Laktat muß also nicht zwangsläufig als pathogenetisch bedeutsames Molekül (z.B. im Sinne einer pH-Wert-Absenkung [Fischer und Widdicombe 2006]) gesehen werden, sondern vielmehr als weiterer Marker für die durch neutrophile Granulozyten verursachte Entzündung.

Das Besondere bei diesem Marker ist aber, dass er nicht invasiv im Sputum und durch Routinemessmethoden erhoben werden kann. An einen Marker werden weitere Anforderungen gestellt.

Er muss strukturell stabil sein, womit Enzyme als Markersubstanzen weitgehend entfallen. Außerdem muss die Markersubstanz, auch unter den in der CF-Lunge vorherrschenden anaeroben Bedingungen, gebildet werden. Der Marker muss relativ schnell auf Veränderungen wie therapeutische Eingriffe reagieren können. Das Laktat verfügt über alle genannten Eigenschaften. Das zeigt auch die negative Korrelation zwischen den Laktatkonzentrationen in den CF-Sputen und der Lungenfunktion der Patienten ( $r=-0,446$ ,  $p=0,043$  für  $FEV_1$ ) (Abb. 4.7). Diese Aussagen sind damit vereinbar, dass eine große Zahl von PMN eine starke Entzündung bewirkt, was mit einer reduzierten Lungenfunktion korreliert. Somit ist Laktat als noninvasiver Inflammationsmarker bei CF denkbar.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die hohen Laktatkonzentrationen im Sputum der CF-Patienten in erster Linie durch neutrophile Granulozyten gebildet werden und bedeutend weniger durch Bakterien. *P. aeruginosa* benutzt offenbar kein externes Laktat zur Energiegewinnung. Laktat kann daher möglicherweise als nicht invasiver Entzündungsmarker für die Therapie der chronischen CF-Lungenentzündung genutzt werden.

## 6 Schlussfolgerungen

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse beinhalten grundsätzlich neue Erkenntnisse bezüglich der Pathogenese der chronischen CF-Lungeninfektion.

*P. aeruginosa* nutzt unter anaeroben Bedingungen im speziell angereichertem Nährmedium nicht den Pyruvatmetabolismus zur Energiegewinnung. Dies bedeutet, dass *P. aeruginosa* auch nicht zur Steigerung der Laktatkonzentration im Sputum beiträgt. Ein analoges Ergebnis zeigt sich bei der Untersuchung der anaeroben Genexpression von *P. aeruginosa*. Auch der Beitrag von *S. aureus* zur Laktatproduktion im CF-Sputum ist zu vernachlässigen.

Trotzdem ist in jedem Sputum von CF-Patienten Laktat zu finden. Das Laktat muss also zellulären Ursprungs sein. Die am häufigsten vorkommenden Entzündungszellen sind neutrophile Granulozyten. Diese produzieren unter anaeroben Bedingungen große Mengen an Laktat. Neutrophile Granulozyten sind damit der bei weitem wahrscheinlichste Ursprung des Laktats im Sputum. Das Laktat korreliert negativ mit der Lungenfunktion der CF-Patienten.

Laktat gilt im Gegensatz zu Enzymen als strukturell stabil und wird unter anaeroben Bedingungen, wie in der CF-Lunge vorherrschend, von PMN gebildet. Weiterhin kann Laktat als Routinewert bei jeder Untersuchung des Sputums erhoben werden.

Ein weiterer wesentlicher Vorteil von Laktat als Inflammationsmarker im Gegensatz zu den bekannten Markern liegt darin, dass dieser noninvasiv erhoben werden kann.

Damit stellt das Laktat einen vielversprechenden Marker für den Verlauf der chronischen, anaerob dominierten Entzündung dar.

Weiterführende Untersuchungen sollten sich mit der klinischen Umsetzbarkeit der Ergebnisse befassen.



## 7 Zusammenfassung

Bei Patienten mit Cystischer Fibrose (synonym: Mukoviszidose) ist die bei weitem häufigste Todesursache die schwere chronische Bronchopneumonie. Dabei wird das in der Lunge befindliche Sputum bei einer Vielzahl der Patienten mit dem Erreger *P. aeruginosa* infiziert. Dieser ist durch seine Virulenz in der Lage, den Gesundheitszustand der Patienten massiv zu beeinträchtigen. Um eine verbesserte Therapie gegen diesen schwerig zu therapierenden Erreger zu entwickeln, sind genaue Kenntnisse der Stoffwechselwege dieses Bakteriums unabdingbar.

Um den Erfolg einer antibiotischen Therapie gegen den die Lungenentzündung verursachenden Erreger kontrollieren zu können, ist ein Entzündungsmarker vonnöten. Die spezifischen Umstände in der CF-Lunge schränken die Effektivität schon untersuchter Markersubstanzen erheblich ein.

Es ist daher von aktueller Bedeutung, eine Substanz zu finden, die unter den in der CF-Lunge vorherrschenden Bedingungen als Marker genutzt werden kann. Vor diesem Hintergrund wurde die Bedeutung des Laktats als mögliche Markersubstanz untersucht.

Es wurde die Laktatkonzentration, die Keimzahl sowie die Keimidentifikation in Sputen von 25 CF-Patienten ermittelt. Die Laktatkonzentration wurde sowohl spektrophotometrisch, als auch gaschromatographisch bestimmt, um eine mögliche Abweichung vom Gesamtlaktat zum L-Laktat feststellen zu können. Die Keimquantifikation wurde mittels Mehrfachbestimmungen in Verdünnungsreihen durchgeführt.

Die Keimidentifikation erfolgte durch Verwendung eines biochemischen Identifikationssystems. Bei der Durchführung der *in vitro*-Versuche wurden Laborstämme (*P. aeruginosa*-Stamm PA01 (ATCC 15692), *S. aureus*-Stamm SA113 (ATCC 35556), *B. cenocepacia*-Stamm J2315 (ET12 lineage, LMG 16656)) verwendet.

Die Genexpression von *P. aeruginosa* wurde sowohl unter aeroben, als auch unter anaeroben Bedingungen mit Affymetrix DNA-microarrays bestimmt. Die Eigenschaften der PMN bezüglich der Laktatproduktion unter verschiedenen Bedingungen wurden durch die Verwendung von buffy coats untersucht.

Es wurden bei jedem Patienten die Werte für die forcierte expiratorische Einsekundenkapazität (FEV<sub>1</sub>) sowie für die forcierte Vitalkapazität (FVC) erhoben. Dabei wurde untersucht, inwieweit sich diese routinemäßig erhobenen Lungenfunktionsparameter zu der Laktatkonzentration der Sputen verhalten.

In allen Sputen konnte Laktat nachgewiesen werden. Die Laktatkonzentration betrug  $3,0 \pm 3,1$  mmol/L (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung), im Bereich von 0,3 bis 14,1 mmol/L. Es konnte kein Unterschied zwischen der spektrophotometrischen und gaschromatographischen Nachweismethode festgestellt werden. Es wurden in 14 Sputen *P. aeruginosa* ( $3,3 \pm 3,7$  mmol/L Laktat), in 10 Sputen *S. aureus* ( $2,8 \pm 2,3$  mmol/L Laktat) und in einem Sputum *B. cenocepacia* (1,9 mmol/L Laktat) nachgewiesen.

Aufgrund der großen Bedeutung von *P. aeruginosa* für die Pathogenese der CF wurde dessen Genexpression unter aeroben sowie unter anaeroben Bedingungen untersucht. Die Genexpression der Laktatdehydrogenasen von *P. aeruginosa* war unter anaeroben Bedingungen herunterreguliert. Andererseits wurden die Gene, die für Enzyme kodieren, welche Pyruvat zum Acetyl-CoEnzymA metabolisieren, massiv exprimiert (PA3416 275 fach und PA3417 78 fach). Daher wird deutlich, dass *P. aeruginosa* unter anaeroben Bedingungen keinen metabolischen Nutzen vom Laktat hat.

*S. aureus* produzierte als einziger Erreger unter *in vitro*-Bedingungen Laktat, welche denjenigen im CF-Sputum ähnlich sind ( $2,8 \pm 0,1$  mmol/L). Es existierten also keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Laktatwerte in den Sputen mit unterschiedlicher bakterieller Besiedlung. Da *S. aureus* lediglich in 10 CF-Sputen nachgewiesen werden konnte, musste es eine andere Quelle für die hohen Laktatkonzentrationen geben. Die aus buffy coats isolierten PMN produzierten unter anaeroben Bedingungen  $4,8 \pm 3,1$  mmol/L Laktat.

Das Ergebnis zeigt eine dreifache Erhöhung im Vergleich zu den Laktatkonzentrationen, die unter aeroben Bedingungen gemessen wurden ( $1,6 \pm 1,0$  mmol/L Laktat). Durch Versuche, bei denen die Zellmembran der PMN durch das Einfrieren bei  $-18^{\circ}\text{C}$  aufgebrochen wurde, konnte gezeigt werden, dass kein Laktat im Intrazellularraum der PMN verbleibt. Da PMN in großer Anzahl bei chronischen Entzündungen wie bei der CF-Pneumonie vorkommen, sind sie die höchstwahrscheinliche Hauptursache für die Laktatkonzentrationen im CF-Sputum.

Um die Rolle des Laktats für die Pathogenese der CF zu klären, wurden die Laktatkonzentrationen im Sputum mit dem Lungenfunktionsparameter  $\text{FEV}_1$  korreliert. Es wurde eine negative Korrelation von  $r=-0,446$ ,  $p=0,043$  ermittelt. Damit besteht ein deutlicher Zusammenhang zwischen einem erhöhten Laktatgehalt und einer verminderten Lungenfunktion.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals geklärt werden, dass Laktat im Sputum aller CF-Patienten vorkommt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, welche Organismen für die Laktatproduktion verantwortlich sind. Durch die *in vitro*-Versuche wurde demonstriert, dass *P. aeruginosa* und *B. cenocepacia* nicht an der Laktatproduktion beteiligt sind.

Bei den Untersuchungen, ob *P. aeruginosa* von externem Laktat metabolisch profitieren kann, wurde durch *in vitro*-Versuche und Genexperimente herausgefunden, dass der Pyruvatstoffwechsel zur anaeroben Energiegewinnung eine untergeordnete Rolle spielt.

Im Gegensatz dazu ist *S. aureus* nur bedingt in der Lage, zur Laktatkonzentration im Sputum beizutragen. Da Laktat in allen Sputen, auch in solchen ohne *S. aureus*-Besiedlung, und in oft höheren Keimzahlen vorkommt, wird deutlich, dass die geringe Laktatproduktion von *S. aureus* nicht hauptursächlich für die Laktatkonzentrationen in den CF-Sputen darstellt.

Die Quelle für Laktat müssen also Zellen sein, die in großer Anzahl im CF-Sputum vorkommen. Dabei ist auf die überwiegend im CF-Sputum vorkommende Zellart bei der chronischen Lungeninfektion zu verweisen. Diese Zellen sind die neutrophilen

Granulozyten (PMN). Es konnte in *in vitro*-Versuchen deutlich dargestellt werden, dass PMN für die Laktatkonzentration verantwortlich sind. Damit ist der Ursprung des Laktats im CF-Sputum geklärt.

Aufgrund der negativen Korrelation zwischen Laktat und FEV<sub>1</sub> ist es wahrscheinlich, dass Laktat einen Entzündungsmarker darstellen kann.

Ein wesentlicher Vorteil von Laktat als Inflammationsmarker im Gegensatz zu den bekannten Markern liegt darin, dass dieser noninvasiv erhoben werden kann. Laktat ist im Gegensatz zu Enzymen als strukturell stabil anzusehen und wird unter anaeroben Bedingungen, wie in der CF-Lunge vorherrschend, von PMN gebildet.

Weiterhin könnte Laktat zukünftig als Routinewert bei jeder Untersuchung des Sputums erhoben werden. Das ist ein weiterer Vorteil, der somit einen wesentlichen Beitrag zur Optimierung der Therapie für CF-Patienten darstellen kann.

## 8 Literatur

1. Banner KH, de Jonge H, Elborn S, Growcott E, Gulbins E, Konstan M, Moss, Poll C, Randell SH, Rossi AG, Thomas L, Waltz D: Highlights of a workshop to discuss targeting inflammation in cystic fibrosis. *J Cystic Fibros* 8 (1) (2009) 1-8
2. Boes N, Schreiber K, Härtig E, Jaensch L, Schobert M: The *Pseudomonas aeruginosa* universal stress protein PA4352 is essential for surviving anaerobic energy stress. *J Bacteriol* 188 (2006) 6529-6538
3. Bonfield TL, Panuska JR, Konstan MW, Hilliard KA, Hilliard JB, Ghnaim H, Berger M: Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 152 (6Pt 1) (1995) 2111-2118
4. Borriello G, Richards L, Ehrlich GD, Stewart PS: Arginine or nitrate enhances antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 50 (2006) 382-384
5. Borriello G, Werner E, Roe F, Kim AM, Ehrlich GD, Stewart PS: Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 48 (2004) 2659-2664
6. Bragonzi A, Worlitzsch D, Pier GB, Timpert P, Ulrich M, Hentzer M, Andersen JB, Givskov M, Conese M, Doring G: Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* expresses alginate in the lungs of patients with cystic fibrosis and in a mouse model. *J infect Dis* 192 (2005) 410-419
7. Braun C, Zumft WG: Marker exchange of the structural genes for nitric oxide reductase blocks the denitrification pathway of *Pseudomonas stutzeri* at nitric oxide. *J Biol Chem* 266 (1991) 22785-22788
8. Buchwald M, Tsui LC, Riordan JR: The search for the cystic fibrosis gene. *Am J Physiol.* 257(2 Pt 1) (1989) 47-52

9. Carpagnano GE, Barnes PJ, Geddes DM, Hodson ME, Kharitonov SA: Increased leukotriene B4 and Interleukin-6 in exhaled breath condensate in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 167 (2003) 1109-1113
10. Castellani C, Cuppens H, Macek Jr M, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael BM, Bombieri C, Brown A, Casals T, Claustres M, Cutting GR, Dequeker E, Dodge J, Doull I, Farrell P, Ferec C, Girodon E, Johannesson M, Kerem B, Knowles M, Munck A, Pignatti PF, Radojkovic D, Rizzotti P, Schwarz M, Stuhmann M, Tzetis M, Zielenski J, Elborn JS: Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cystic Fibrosis* 7 (2008) 179-196
11. Chen F, Xia Q, Lu L-K: Aerobic denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* monitored by online NAD(P)H fluorescence. *Appl Environ Microbiol* 69 (2003) 6715-6722
12. Chmiel JF, Konstan MW, Knesebeck JE, Hilliard JB, Bonfield TL, Dawson DV, Berger M: IL-10 attenuates excessive inflammation in chronic *Pseudomonas* infection in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 160 (1999) 2040-2047
13. Comolli JC, Donohue TJ: *Pseudomonas aeruginosa* RoxR, a response regulator related to *Rhodobacter sphaeroides* PrrA, activates expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase. *Mol Microbiol* 45 (2002) 755-768
14. Costerton JW: Anaerobic biofilm infections in cystic fibrosis. *Mol Cell* 10 (2002) 699-700
15. Cramton SE, Ulrich M, Götz F, Döring G: Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 69 (2001) 4079-4085
16. Dacheux D, Epaulard O, de Groot A, Guery B, Leberre R, Attree I, Polack B, Toussaint B: Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system

- requires an intact pyruvate dehydrogenase aceAB operon. *Infect Immun* 70 (2002) 3973-3977
17. DiMango E, Ratner AJ, Bryan R, Tabibi S, Prince A: Activation of NF- $\kappa$ B by adherent *Pseudomonas aeruginosa* in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. *J Clin Invest* 101 (1998) 2598-2606
18. DiMango E, Zar HJ, Bryan R, Prince A: Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce Interleukin-8. *J Clin Invest* 96 (1995) 2204-2210
19. Dohlman AW, Black HR, Royall JA: Expired breath hydrogen peroxide is a marker of acute airway inflammation in pediatric patients with asthma. *Am Rev Respir Dis* 148 (1993) 995-1060
20. Döring G: State of the art: Serine proteinase inhibitor therapy in  $\alpha_1$ -antitrypsin inhibitor deficiency and cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 28 (1999) 363-375
21. Döring G, Elborn JS, Johannesson M, de Jonge H, Griese M, Smyth A, Heijerman H for the Consensus Study Group: Clinical Trials in Cystic Fibrosis. *J Cystic Fibrosis* 6 (2007) 85-90
22. Döring G, Hoiby N for the Consensus Study Group (B Assael, M Ballmann, A Bush, B Button, A Clement, S Conway, J Dankert-Roelse, F de Baets, C de Boeck, M de Braekeleer, G Döring, S Elborn, P Farrell, B Frederiksen, J Govan, E Kerem, M Hodson, N Hoiby, C Koch, L Lannefors, T Lee, A Lindblad, J Littlewood, A Mehta, A Munck, J Navarro, T Pitt, T Pressler, V Raia, F Ratjen, L Romano, M Stern, G Taccetti, P Vandamme, C Wainwright, K Webb, D Worlitzsch): Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus. *J Cystic Fibrosis* 3 (2004) 67-91.
23. Döring G, Meisner C, Stern M for the Flagella Vaccine Trial Study Group: A doubleblind randomized placebo-controlled phase III study of a *Pseudomonas*

- aeruginosa* flagella vaccine in cystic fibrosis patients. Proc Natl Acad Sci USA 104 (2007) 11020-11025
24. Downey DG, Bell, SC, Elborn JS: Neutrophils in cystic fibrosis. Thorax 64 (2009) 81-88
25. Eschbach M, Schreiber K, Trunk K, Buer J, Jahn D, Schobert M: Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. J Bacteriol 186 (2004) 4596-4604
26. Field TR, White A, Elborn JS, Tunney MM: Effect of oxygen limitation on the in vitro antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* grown planktonically and as biofilms. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 24 (2005) 577-587
27. Filiatrault MJ, Wagner VE, Bushnell D, Haidaris CG, Iglewski BH, Passador L: Effect of anaerobiosis and nitrate on gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun 73 (2005) 3764-3772
28. Fischer H, Widdicombe JH: Mechanisms of acid and base secretion by the airway epithelium. J Membrane Biol 211 (2006) 139-150
29. Fuchs S, Pané-Farré J, Kohler C, Hecker M, Engelmann S: Anaerobic gene expression in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 189 (2007) 4275-4289
30. Furukawa S, Kuchma SL, O'Toole GA: Keeping their options open: acute versus persistent infections. J Bacteriol 188 (2006) 1211-1217
31. Gamper M, Zimmermann A, Haas D: Anaerobic regulation of transcription initiation in the arcDABC operon of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 173 (1991) 4742-4750



32. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW: Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 168 (2003) 918-951
33. Goldstein W, Döring G: Lysosomal enzymes from polymorphonuclear leukocytes and proteinase inhibitors in patients with cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 134 (1986) 49-56
34. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P: Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Rev Microbiol* 2 (2004) 95-108
35. Hanazawa T, Kharitonov SA, Barnes PJ: Increased nitrotyrosine in exhaled breath condensate of patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 162 (2000) 1273-1276
36. Hassett DJ: Anaerobic production of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*: alginate restricts diffusion of oxygen. *J Bacteriol* 178 (1996) 7322-7325
37. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Charkravarti A, Buchwald M, Tsui LC: Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245 (4922) (1989) 1073-1080
38. Kharitonov SA, Barnes PJ: Exhaled markers of pulmonary disease: State of the art. *Am J Respir Crit Care Med* 163 (2001) 1693-1722
39. Koch C, Hoiby N: Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet* 341 (1993) 1065-1069
40. Landry RM, An DD, Hupp JT, Singh PK, Parsek MR: Mucin-*Pseudomonas aeruginosa* interactions promote biofilm formation and antibiotic resistance. *Mol Microbiol* 59 (2006) 142-151
41. Lee B, Haagensen JAJ, Ciofu O, Andersen JB, Hoiby N, Molin S: Heterogeneity of Biofilms Formed by Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients with Cystic Fibrosis. *J Clin Microbiol* 43 (2005) 5247-5255

42. Linnane SJ, Keatings VM, Costello CM, Moynihan JB, O'Connor CM, Fitzgerald MX, McLoughlin P: Total sputum nitrate plus nitrite is raised during acute pulmonary infection in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 158 (1998) 207-212
43. Martha B, Coisier D, Durand D, Hocquet D, Plesiat P, Piroth L, Portier H, Chavanet P: In-vivo impact of the MexXY efflux system on aminoglycoside efficacy in an experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia treated with tobramycin. *Clin Microbiol Infect* 12 (2006) 426-432
44. Matsui H, Verghese MW, Kesimer M, Schwab UE, Randell SH, Sheehan JK, Grubb BR, Boucher RC: Reduced three-dimensional motility in dehydrated airway mucus prevents neutrophil capture and killing bacteria on airway epithelial surfaces. *J Immunol*. 175 (2005) 1090-1099
45. Matsui H, Wagner VE, Hill DB, Schwab UE, Rogers TD, Button B, Taylor II RM, Superfine R, Rubinstein M, Iglewski BH, Boucher RC: A physical linkage between cystic fibrosis airway surface dehydration and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (2006) 18131-18136
46. McKenney D, Pouliot K, Wang Y, Murthy V, Ulrich M, Doring G, Lee JC, Goldmann DA, Pier GB: Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo-expressed antigen. *Science* 284 (1999) 1523-1527
47. Meyer KC: Neutrophils, myeloperoxidase, and bronchiectasis in cystic fibrosis: Green is not good. *J Lab Clin Med* 144 (2004) 124-126
48. Moreno-Vivian C, Cabello P, Martinez-Luque M, Blasco R, Castillo F: Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *J Bacteriol* 181 (1999) 6573-6584
49. Nikolaizik WH, Knöpfli B, Leister E, de Boer P, Sievers B, Schöni MH: The anaerobic threshold in cystic fibrosis: comparison of V-slope method, lactate turn points, and Conconi test. *Pediatr Pulmonol* 25 (1998) 147-153

50. O'May CY, Reid DW, Kirov SM: Anaerobic culture conditions favor biofilm-like phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 48 (2006) 373-380
51. Park MK, Myers RAM, Marzella L: Oxygen tensions and infections: Modulation of microbial growth, activity of antimicrobial agents, and immunologic responses. *Clin Infect Dis* (1992) 14 720-40
52. Paul K, Rietschel E, Ballmann M, Griese M, Worlitzsch D, Shute J, Chen C, Schink T, Döring G, van Koningsbruggen S, Wahn U, Ratjen F for the BEAT study group: Effect of treatment with dornase alpha on airway inflammation in cystic fibrosis patients. *Am J Respir Crit Care Med* 169 (2004) 719-725
53. Peschel A, Jack RW, Otto M, Collins LV, Staubitz P, Nicholson G, Kalbacher H, Nieuwenhuizen WF, Jung G, Tarkowski A, van Kessel KP, van Strijp JA: Staphylococcus aureus resistance to human defensin and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with L-lysine. *J Exp Med* 193 (2001) 1067-1076
54. Ratjen F, Döring G: Cystic Fibrosis. *Lancet* 361 (2003) 681-689
55. Ratjen F, Döring G, Nikolaizik WH: Effect of inhaled tobramycin on early *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in patients with cystic fibrosis. *Lancet* 358 (2001) 983-984
56. Richardson AR, Libby SJ, Fang FC: A nitric oxide-inducible lactate dehydrogenase enables Staphylococcus aureus to resist innate immunity. *Science* 319 (2008) 1672-1676
57. Schreiber K, Boes N, Eschbach M, Jaensch L, Wehland J, Bjarnsholt T, Givskov M, Hentzer M, Schobert M: Anaerobic survival of *Pseudomonas aeruginosa* by pyruvate fermentation requires an Usp-type stress protein. *J Bacteriol* 188 (2006) 659-668

58. Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO, Welsh MJ, Greenberg EP: Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 407 (2000) 762-764
59. Sousa SA, Ulrich M, Bragonzi A, Burke M, Worlitzsch D, Leitao JH, Meisner C, Eberl, Sá-Correia I, Döring G: Virulence of *Burkholderia cepacia* complex strains in gp91<sup>phox-/-</sup> mice. *Cell Microbiol* 12 (2007) 2817-2825
60. Stern M, Wiedemann B, Wenzlaff P: From registry to quality management: the German Cystic Fibrosis Quality Assessment project 1995-2006. *Eur Respir J* 31 (2008) 29-35
61. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, Brinkman FSL, Hufnagl WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK-S, Wu Z, Paulsen IT, Relzer J, Saier MH, Hancock REW, Lory S, Olson MV: Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 406 (2000) 959-964
62. Strieter RM, Belperio JA, Keane MP: Cytokines in innate host defense in the lung. *J Clin Invest* 109 (2002) 699-705
63. Taccetti G, Campana S, Festini F, Mascherini M, Doring G: Early eradication therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Eur Respir J* 26 (2005) 458-461
64. Toffaletti J, Hammes ME, Gray R, Lineberry B, Abrams B: Lactate measured in diluted and undiluted whole blood and plasma: comparison of methods and effect of hematocrit. *Clin Chem* 38 (1992) 2430-2434
65. Ulrich M, Bastian M, Cramton S, Ziegler K, Pragman AA, Bragonzi A, Memmi G, Wolz C, Schlievert PM, Cheung A, Doring G: The staphylococcal respiratory response regulator SrrAB induces *ica* gene transcription and polysaccharide

- intercellular adhesin expression, protecting *Staphylococcus aureus* from neutrophil killing under anaerobic growth conditions. *Mol Microbiol* 65 (2007) 1276-1287
66. Valerius NH, Koch C, Hoiby N: Prevention of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in cystic fibrosis by early treatment. *Lancet* 338 (1991) 725-6
67. Vandamme P, Holmes B, Coenye T, Goris J, Mahenthiralingam E, LiPuma JJ, Govan JRW: *Burkholderia cenocepacia* sp. nov.- a new twist to an old story. *Res Microbiol* 154 (2003) 91-96
68. vander Wauven C, Piérard A, Kley-Raymann M, Haas D: *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway. *J Bacteriol* 160 (1984) 928-34
69. Weiss SJ: Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 320 (1989) 365-376
70. Whiteley M, Banger MG, Bumgarner RE, Parsek MR, Teitzel GM, Lory S, Greenberg EP: Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 413 (2001) 860-864
71. Worlitzsch D, Herberth G, Ulrich M, Döring G: Catalase, myeloperoxidase and hydrogen peroxide in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 11 (1998) 377-383
72. Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Cekici A, Meyer KC, Birrer P, Bellon G, Berger J, Weiss T, Botzenhart 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* 109 (2002) 317-325
73. Worlitzsch D, Ulrich M, Rietschel E, Ratjen F, Botzenhart K, Doering G: Exhaled breath condensate: how valuable to monitor lung inflammation? *J Cystic Fibrosis* 1 (2002) 9

74. Yoon SS, Coakley R, Lau GW, Lyman SV, Gaston B, Karabulut AC, Hennigan RF, Hwang S-H, Buettner G, Schurr MJ, Mortensen JE, Burns JL, Speert D, Boucher RC, Hassett DJ: Anaerobic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* by acidified nitrite derivatives under cystic fibrosis airway conditions. *J Clin Invest* 116 (2006) 436-446
75. Yoon SS, Hennigan RF, Hilliard GM, Ochsner UA, Parvatiyar K, Kamani MC, Allen HL, DeKievit TR, Gardner PR, Schwab U, Rowe JJ, Iglewski BH, McDermott TR, Mason RP, Wozniak DJ, Hancock REW, Parsek MR, Noah TL, Boucher RC, Hassett DJ: *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Developmental Cell* 3 (2002) 593-603
76. Zhu Y, Weiss EC, Otto M, Fey PD, Smeltzer MS, Somerville GA: *Staphylococcus aureus* biofilm metabolism and the influence of arginine on polysaccharide intercellular adhesin synthesis, biofilm formation, and pathogenesis. *Infect Immun* 75 (2007) 4219-4226

## 9 Eigene Veröffentlichungen

### Wissenschaftliche Preise

Young Investigator Award

32<sup>nd</sup> European Cystic Fibrosis Conference, Brest, France 10.-13.06.2009

### Zitierfähige Abstracts

Worlitzsch D, **Bensel T**, Stotz M, Wollschlaeger B, Tacetti G, Campana S, Meyer K, Wienke A, Borneff-Lipp M, Doering G: Lactate serves as noninvasive inflammatory marker during treatment of CF lung infections. *Pediatr Pulmonol* (eingereicht)

**Bensel T**, Stotz M, Wollschläger B, Tacetti G, Campana S, Meyer KC, Wienke A, Borneff-Lipp M, Döring G, Worlitzsch D: Lactate is a marker for therapy control of cystic fibrosis lung inflammation. *Int J Med Microbiol* (eingereicht)

**Bensel T**, Stotz M, Wollschläger B, Tacetti G, Campana S, Borneff-Lipp M, Döring G, Worlitzsch D: Lactate as a non-invasive marker of CF lung inflammation. *J Cystic Fibrosis* 8 (suppl. 2) (2009) 62

**Bensel T**, Borneff-Lipp M, Döring G, Worlitzsch D: Origin, microbiological and clinical significance of lactate in cystic fibrosis sputum. *Int J Med Microbiol* 298 (suppl. 2) (2008) 63

Worlitzsch D, **Bensel T**, Wollschlaeger B, Borneff-Lipp M, Doering G: Origin of lactate in CF sputum. *J Cystic Fibrosis* 7 (suppl. 2) (2008) 39

Worlitzsch D, **Bensel T**, Borneff-Lipp M, Döring G: *Pseudomonas aeruginosa* and lactate in vitro and in CF sputum. *Pediatr Pulmonol* (suppl 30) (2007) 317

Worlitzsch D, **Bensel T**, Borneff-Lipp M, Döring G: *Pseudomonas aeruginosa* metabolism and lactate production in sputum of cystic fibrosis patients. *Int J Med*

Microbiol 297 (suppl. 1) (2007) 115

Worlitzsch D, **Bensel T**, Borneff-Lipp M, Döring G: Lactate production and Pseudomonas aeruginosa metabolism in CF sputum. J Cystic Fibrosis 6 (suppl. 1) (2007) 21

## Konferenzbeiträge

**Bensel T**, Stotz M, Wollschläger B, Tacetti G, Campana S, Borneff-Lipp M, Döring G, Worlitzsch D: Lactate as a non-invasive marker for CF lung inflammation. 32<sup>th</sup> European Cystic Fibrosis Conference, Brest, France, 10.-13.06.2009 (auf Einladung).

Worlitzsch D, **Bensel T**, Wollschlaeger B, Borneff-Lipp M, Doering G: Origin of lactate in CF sputum. 31<sup>th</sup> European Cystic Fibrosis Conference, Prague, Czech Republic, 11.-14.06.2008 (auf Einladung).

Worlitzsch D, **Bensel T**, Borneff-Lipp M, Döring G: Lactate productions and Pseudomonas aeruginosa metabolism in CF sputum. 30<sup>th</sup> European Cystic Fibrosis Conference, Belek, Turkey 13.-16.06.2007 (auf Einladung).

## Poster

Worlitzsch D, **Bensel T**, Stotz M, Wollschlaeger B, Tacetti G, Campana S, Meyer K, Wienke A, Borneff-Lipp M, Doering G: Lactate serves as noninvasive inflammatory marker during treatment of CF lung infections. 23<sup>rd</sup> Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Minneapolis, MIN, U.S.A., 15.-17.10.2009 (eingereicht)

**Bensel T**, Stotz M, Wollschläger B, Tacetti G, Campana S, Meyer KC, Wienke A, Borneff-Lipp M, Döring G, Worlitzsch D: Lactate is a marker for therapy control of cystic fibrosis lung inflammation. 61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V. (DGHM), Göttingen, Germany, 20.-23.09.2009 (eingereicht)

**Bensel T**, Stotz M, Wollschläger, Tacetti G, Campana S, Borneff-Lipp M, Döring G, Worlitzsch D: Lactate as a non-invasive marker of CF lung inflammation. 32<sup>st</sup>



European Cystic Fibrosis Conference, Brest, France, 10.-13.06.2009

**Bensel T**, Borneff-Lipp M, Döring G, Worlitzsch D: Origin, microbiological and clinical significance of lactate in cystic fibrosis sputum. 60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V. (DGHM), Dresden, Germany, 21.-24.09.2008

Worlitzsch D, **Bensel T**, Borneff-Lipp M, Döring G: Pseudomonas aeruginosa metabolism and lactate production in cystic fibrosis chronic lung infection. XII. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, Istanbul, Turkey, 05.-09.08.2008

Worlitzsch D, **Bensel T**, Wollschlaeger B, Borneff-Lipp M, Doering G: Origin of lactate in CF sputum. 31<sup>st</sup> European Cystic Fibrosis Conference, Prague, Czech Republic, 11.-14.06.2008

Worlitzsch D, **Bensel T**, Borneff-Lipp M, Döring G: Pseudomonas aeruginosa and lactate in vitro and in CF sputum. 21<sup>st</sup> Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Anaheim, CA, U.S.A., 03.-06.10.2007

Worlitzsch D, **Bensel T**, Borneff-Lipp M, Döring G: Pseudomonas aeruginosa metabolism and lactate production in sputum of cystic fibrosis patients. 59. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Göttingen, Deutschland, 30.09.-04.10.2007

Worlitzsch D, **Bensel T**, Borneff-Lipp M, Döring G: Lactate production and Pseudomonas aeruginosa metabolism in CF sputum. 30<sup>th</sup> European Cystic Fibrosis Conference, Belek, Turkey, 13.-16.06.2007

## 10 Anhang

### 10.1 Patientendaten

Tabelle 10.1: Lungenfunktionswerte der CF-Patienten

Patient	Geb. Datum	Datum	FVC %	FEV1 %
1	14.09.1984	21.10.2005	50,3	38,1
2	16.07.1974	15.11.2005	76,4	40,8
4	01.08.1986	15.11.2005	104,9	90,2
5	05.10.1971	06.12.2005	53,1	31,5
6	25.09.1963	15.11.2005	57,6	38,5
7	08.05.1982	18.11.2005	87,9	76,3
8	06.08.1975	18.11.2005	71,2	60,5
10	19.11.1979	16.03.2006	43	18
11	14.06.1971	22.11.2005	50,4	42
13	04.03.1975	13.12.2005	70,6	46,3
14	29.03.1985	25.11.2005	70,5	50,3
15	29.07.1982	13.12.2005	87,8	76,2
16	03.03.1985	13.12.2005	104,6	93,9
17	13.05.1978	13.12.2005	71	53,2
18	09.07.1982	17.01.2006	61,7	34,4
20	23.01.1986	27.01.2006	91,4	72,8
21	01.02.1974	31.01.2006	106	80
22	08.01.1980	10.01.2006	64,9	52,8
23	08.09.1987	17.03.2006	92,3	75,3
24	05.01.1968	04.04.2006	93,2	70,7
25	20.02.1984	21.04.2006	104,8	100,1
26	10.04.1971	26.04.2006	71,3	30,7

## 10.2 Sputumwerte

Tabelle 10.2: Patientendaten und Sputumwerte

Patient	Geschlecht	Geburtsdatum	Probendatum	Gewicht Sputum [g]	Alter bei Probenentnahme	pH-Wert
1	w	14.09.1984	10.11.2005	15,4	21	7,29
2	w	16.07.1974	15.11.2005	4,98	31	7,58
3	w	05.05.1982	15.11.2005	5,74	23	7,36
4	w	01.08.1986	15.11.2005	3,08	19	5,99
5	w	05.10.1971	15.11.2005	6,83	34	7,54
6	w	25.09.1965	15.11.2005	6,36	40	7,80
7	w	02.05.1982	18.11.2005	3,48	23	7,77
8	w	06.08.1975	18.11.2005	4,55	30	7,78
10	m	19.11.1979	18.11.2005	5,88	25	7,37
11	w	14.06.1971	22.11.2005	19,32	34	7,70
12	w	14.07.1942	22.11.2005	3,54	63	7,26
13	m	04.03.1975	22.11.2005	2,89	30	7,25
14	m	29.03.1985	25.11.2005	1,68	20	6,97
15	m	29.07.1982	13.12.2005	2,68	23	7,49
16	m	03.03.1985	13.12.2005	1,24	20	7,17
17	m	13.05.1978	13.12.2005	1,89	27	7,31
18	w	09.07.1982	17.01.2006	5,44	23	6,53
19	m	23.08.1982	27.01.2006	2,53	23	6,84
20	m	23.01.1986	27.01.2006	2,57	20	7,30
21	m	01.02.1974	31.01.2006	2,36	31	7,27
22	m	08.01.1980	03.02.2006	1,4	26	7,02
23	w	08.09.1987	17.03.2006	2,67	18	7,05
24	w	05.01.1968	04.04.2006	2,27	38	n.b.
25	m	20.02.1984	21.04.2006	2,18	22	n.b.
26	w	10.04.1971	19.05.2006	1,77	35	6,75

n.b.: nicht bestimmt

### 10.3 Sputumdaten der CF-Patienten

Tabelle 10.3: Sputumdaten der CF-Patienten

Patient	Hauptkeim	Nebenkeim	Keimzahl/ Mittelwert	Keimzahl/ Standard- abweichung	Laktat (mmol/L)
1	<i>S. aureus</i>		3,67E+07	2,89E+06	3,10
2	<i>P. aeruginosa</i>		4,29E+07	1,55E+07	1,90
3	<i>S. aureus</i>	<i>B. cenocepacia</i>	1,64E+06	9,29E+04	0,70
4	<i>S. aureus</i>		9,04E+06	5,12E+06	4,50
5	<i>P. aeruginosa</i>		3,67E+07	5,77E+06	4,90
6	<i>P. aeruginosa</i>		3,03E+07	9,50E+06	1,20
7	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	1,35E+06	2,75E+05	0,80
8	<i>S. aureus</i>		1,08E+07	1,57E+06	2,80
10	<i>S. aureus</i>	<i>B. cenocepacia</i>	9,17E+04	2,38E+04	2,30
11	<i>P. aeruginosa</i>		1,83E+07	1,26E+07	3,00
12	<i>P. aeruginosa</i>		1,02E+07	8,39E+05	0,90
13	<i>B. cenocepacia</i>		7,72E+07	1,99E+07	1,90
14	<i>P. aeruginosa</i>		9,28E+06	3,23E+06	1,70
15	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	5,69E+07	1,41E+07	1,20
16	<i>S. aureus</i>		1,05E+07	1,57E+06	0,20
17	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	5,59E+07	1,20E+06	6,80
18	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	2,49E+07	7,28E+06	14,10
19	<i>P. aeruginosa</i>		8,67E+07	1,59E+07	5,50
20	<i>P. aeruginosa</i>		9,34E+06	2,74E+06	0,50
21	<i>P. aeruginosa</i>		1,49E+09	1,50E+08	1,50
22	<i>S. aureus</i>		7,64E+06	8,49E+05	3,30
23	<i>S. aureus</i>		2,76E+07	9,37E+06	0,70
24	<i>P. aeruginosa</i>		5,74E+06	3,27E+06	2,10
25	<i>S. aureus</i>		2,25E+06	n.b.	2,00
26	<i>S. aureus</i>		1,27E+07	n.b.	8,10

n.b.: nicht bestimmt

## 11 Thesen

1. Die Cystische Fibrose (CF, Synonym: Mukoviszidose) ist die häufigste schwerwiegende autosomal rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung in den westlichen Industrienationen. Chronische bakterielle Bronchopneumonien stellen für CF-Patienten die bei weitem häufigste Todesursache dar.
2. Bei CF werden in der Lunge der Patienten große Mengen von viskösem Sputum gebildet. In diesem liegen auf Grund von bakteriellem und zellulärem Sauerstoffverbrauch sowie auf Grund von reduzierter Sauerstoffdiffusion anaerobe Verhältnisse vor.
3. Die bakterielle Besiedelung der Lunge erfolgt im Erwachsenenalter am häufigsten durch *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* oder *Burkholderia cenocepacia*. Weiterhin wandern aufgrund der vorherrschenden chronischen Entzündung große Mengen an polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) in die Atemwege ein.
4. Bisherige Studien gehen davon aus, dass *P. aeruginosa* unter definierten anaeroben Bedingungen über den Pyruvatstoffwechsel Laktat metabolisiert.
5. In der vorliegenden Studie wurde im Rahmen von *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen das Vorhandensein, der Ursprung, Wechselwirkungen mit Bakterien sowie die klinische Relevanz von Laktat untersucht.
6. In 25 Sputen von erwachsenen CF-Patienten wurde eine Keimidentifikation (Vitek® Senior-System), eine Keimquantifikation (Verdünnungsreihe) und die Bestimmung der jeweiligen bakteriellen Laktatkonzentration (Synchron LX System, Shimadzu-GC 14A Gaschromatograph) sowie eine Ermittlung der Laktatkonzentration von PMN durchgeführt.
7. Die aerobe und anaerobe Genexpression von *P. aeruginosa* wurde mit Hilfe von Affymetrix® microarrays gemessen.

8. Laktat konnte in allen Sputen nachgewiesen werden. Die Laktatkonzentration betrug  $3,0 \pm 3,1$  mmol/L (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung), im Bereich von 0,3 bis 14,1 mmol/L.
9. Die *in vitro*-Laktatproduktion und die Genexpression von *P. aeruginosa* demonstrierte, dass der Pyruvatmetabolismus unter anaeroben Bedingungen, wie sie bei CF vorherrschen, nicht genutzt wird.
10. Unter *in vitro*-Bedingungen, die denjenigen im CF-Sputum ähnlich sind, produzierte lediglich *S. aureus* Laktat ( $2,8 \pm 0,1$  mmol/L).
11. Die von *S. aureus* produzierte Menge an Laktat ist nicht ausreichend, um das in vielen Fällen höhere Vorkommen des Laktats zu erklären. Außerdem ist in allen Sputen ohne *S. aureus*-Besiedelung Laktat gefunden worden, daher muss eine weitere Quelle existieren.
12. Die Laktatproduktion von  $6 \times 10^8$  PMN betrug unter anaeroben Bedingungen  $4,8 \pm 3,1$  mmol/L.
13. Bei der Untersuchung der klinischen Bedeutung des Laktats zeigte sich eine negative Korrelation zwischen der forcierten expiratorischen Einsekundenkapazität (FEV<sub>1</sub>) der CF-Patienten mit der Laktatkonzentration im Sputum ( $r=-0,446$ ,  $p=0,043$ ).
14. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass das im CF-Sputum vorkommende Laktat hauptsächlich von PMN gebildet wird und nicht bakteriellen Ursprungs ist.
15. Die klinische Bedeutung dieser Untersuchung ist darin begründet, dass Laktat als noninvasiver Inflammationsmarker zu sehen ist, der unter anaeroben Bedingungen entsteht, eine strukturelle Stabilität aufweist, und mit Routinemessmethoden ermittelt werden kann.
16. Weiterführende Studien müssen zeigen, ob eine Nutzung des Markers im klinischen Alltag Anwendung finden könnte.

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, Tobias Bense, geb. 15.12.1980, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe mich dabei keiner anderen als der von mir angegebenen Quellen und Hilfen bedient.

Halle, den 17.08.2009

---

(Tobias Bense)

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich, Tobias Bense, geb. 15.12.1980, bisher an keiner in- und/oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um eine Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt zu haben.

Halle, den 17.08.2009

---

(Tobias Bense)



## **Danksagung**

Mein besonderer Dank geht an:

**Allen beteiligten CF-Patienten** der CF-Ambulanz des Universitätsklinikums Halle für die Teilnahme an dieser Studie.

**Frau Prof. Dr. Marianne Borneff-Lipp**, Direktorin des Institutes für Hygiene des Universitätsklinikums Halle, für die freundliche Überlassung des Themas der Dissertation sowie für die ständige Bereitschaft, mit konstruktiven Fragen und kritischen Hinweisen die Arbeit voranzubringen, was eine immense Hilfe darstellte.

**Herrn Prof. Dr. Johannes Haerting**, Direktor des Institutes für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Medizinische Informatik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, danke ich für die freundliche Unterstützung bei den statischen Auswertungen.

**Herrn OA Dr. Dieter Worlitzsch**, wissenschaftlicher Mitarbeiter des Institutes für Hygiene, danke ich für die umfangreiche und hervorragende Betreuung bei der Umsetzung der Arbeit.

**Frau PD Dr. Ute Lechner**, von der Naturwissenschaftlichen Fakultät I-Biowissenschaften an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die freundliche Unterstützung, Zusammenarbeit und Bereitstellung ihrer Laborkapazitäten.

**Frau OÄ Dr. Bettina Wollschläger**, Leiterin der CF-Ambulanz der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums Halle, für die freundliche Unterstützung und Zusammenarbeit.

**Frau OÄ Dr. Annegret Heider**, Leiterin des Zentrallabors am Universitätsklinikum Halle, für die freundliche Unterstützung und Zusammenarbeit.

**Herrn Dr. Morten Hentzer** und dessen Laboratorium in der Molecular Microbial Ecology Group der Technischen Universität von Dänemark in Lyngby, für die freundliche Unterstützung und Zusammenarbeit.

**Frau Nadine Höchst, Frau Barbara Christgen und Frau Christiane Hinze**, technische Mitarbeiterinnen des Institutes für Hygiene, für die konstruktive Zusammenarbeit.

**Herrn Sascha Schmidt**, EDV-Anwendungsbetreuer im Institut für Hygiene, für die ständige Bereitschaft, mich bei Problemlösungen zu unterstützen.