

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

**Einfluß von Sauerstoffmangel auf die chronische bakterielle Lungenentzündung
von Patienten mit cystischer Fibrose**

H a b i l i t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med. habil.

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

von Dieter Worlitzsch
geboren am 16. November 1956 in Kiel

Gutachter:

1. Prof. Dr. Niels Høiby
2. Prof. Dr. rer. nat. Friedrich Goetz
3. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Jürgen Heesemann

Habilitationsverteidigung: 07.09.2010

Habilitationsvorlesung: 21.09.2010

Referat und bibliographische Beschreibung

Bei fast allen Patienten mit cystischer Fibrose (synonym: Mukoviszidose, abgekürzt CF) kommt es zu chronischen bakteriellen Lungenentzündungen mit *Pseudomonas aeruginosa*, an denen die CF-Patienten in vergleichsweise jungem Lebensalter versterben. Die Pathogenese der Lungenentzündung ist weitgehend unklar.

Zielsetzung: Entwicklung einer experimentell belegten neuen Hypothese zur Pathogenese der chronischen *P. aeruginosa*-Lungeninfektion bei CF-Patienten.

Material und Methoden: Nachweis von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) im Atemkondensat und Bestimmung der Enzymaktivitäten von Katalase (CAT) und Myeloperoxidase (MPO) im Sputum von CF-Patienten. Messung des Sauerstoffpartialdrucks (pO_2) in Sputum von CF-Patienten *in vivo* und Einfluss eines reduzierten pO_2 auf den Phänotyp von *P. aeruginosa*. Aerobe und anaerobe Genexpression der *P. aeruginosa*-Alginate-Gene *in vitro*, in infizierten Mäuselungen, und im Sputum von CF-Patienten. Nachweis obligat anaerober Bakterien im Sputum von CF-Patienten.

Ergebnisse: H_2O_2 ist im Atemkondensat der CF-Patienten nur in geringen Konzentrationen zu finden, während die H_2O_2 -metabolisierenden Enzyme CAT und MPO in hohen Aktivitäten im Sputum vorhanden sind. Der pO_2 im CF-Sputum ist massiv erniedrigt, was eine starke Alginateproduktion und die Bildung von Mikrokolonien durch *P. aeruginosa* bewirkt. Die *P. aeruginosa*-Alginate-Gene werden *in vitro* wie auch *in vivo* stark vermehrt exprimiert. Bei fast allen CF-Patienten (91%) sind zusätzlich zu den fakultativen Anaerobiern auch obligat anaerobe Bakterien im Sputum zu finden.

Schlußfolgerungen: Der stark reduzierte pO_2 im CF-Sputum hat in mikrobiologischer, inflammatorischer und pharmakologischer Hinsicht einen erheblichen Einfluss auf die chronische Lungeninfektion der CF-Patienten. Die Berücksichtigung dieser Faktoren ermöglicht eine neuartige Hypothese zur Pathogenese der CF-Lungenentzündung

Worlitzsch, Dieter: Einfluß von Sauerstoffmangel auf die chronische bakterielle Lungenentzündung von Patienten mit cystischer Fibrose. Halle, Univ., Med. Fak, Habil., 82 Seiten, 2010.

INHALTSVERZEICHNIS MIT SEITENANGABEN

	Seite
1 EINLEITUNG	1
2 ZIELSTELLUNG	13
3 MATERIAL UND METHODIK	14
3.1 Experimente zur Bildung und enzymatischen Verstoffwechslung von Sauerstoffradikalen in der Lunge von CF-Patienten	14
3.1.1 Patienten	14
3.1.2 Sammlung des Atemkondensats und Bestimmung von H ₂ O ₂	14
3.1.3 Sputum von CF-Patienten	15
3.1.4 Enzymbestimmungen	15
3.1.5 Zytotoxizitätsbestimmungen	16
3.1.6 Statistik	16
3.2 Experimente zur Bestimmung der Lokalisation von <i>P. aeruginosa</i> in der CF-Lunge, zur Sauerstoffmessung <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>, und zur Produktion von Alginat	17
3.2.1 Patienten	17
3.2.2 Bakterienstämme	17
3.2.3 Mikroskopische Untersuchungen	18
3.2.4 Bronchoskopie und Bestimmung des pO ₂	18
3.2.5 Bakterienwachstum und Alginatproduktion von <i>P. aeruginosa</i> unter aeroben und anaeroben Bedingungen	19
3.3 Experimente zur aeroben und anaeroben Genexpression der <i>P. aeruginosa</i> Alginat-Gene <i>in vitro</i>, in infizierten Mäuselungen, und im Sputum von CF-Patienten	19
3.3.1 <i>P. aeruginosa</i> -Alginat-Genexpression <i>in vitro</i>	19
3.3.2 Modell der Mäuselungeninfektion	20
3.4 Experimente zum Nachweis von obligat anaeroben Bakterien im Sputum von CF-Patienten	21
3.4.1 CF-Patienten	21

3.4.2	Quantifikation der obligaten Anaerobier	21
3.4.3	Identifikation der obligaten Anaerobier	22
3.4.4	Resistenzbestimmung	22
4	ERGEBNISSE	23
4.1	Bildung und enzymatische Verstoffwechslung von Sauerstoffradikalen in der Lunge von CF-Patienten	23
4.2	Sauerstoffmessung in der Lunge von CF-Patienten und <i>in vitro</i>, Lokalisation von <i>P. aeruginosa</i> in der CF-Lunge, und Produktion von Alginat durch <i>P. aeruginosa</i>	29
4.3	Aerobe und anaerobe Genexpression der <i>P. aeruginosa</i> Alginat-Gene <i>in vitro</i>, in infizierten Mäuselungen, und im Sputum von CF-Patienten	35
4.4	Nachweis von obligat anaeroben Bakterien im Sputum von CF-Patienten	42
5	DISKUSSION	48
5.1	Sauerstoffradikale in der Lunge von CF-Patienten	48
5.2	Bedeutung von Sauerstoff für die chronische Entzündung in der Lunge von CF-Patienten und für den Phänotyp von <i>P. aeruginosa</i>	50
5.3	Aerobe und anaerobe Genexpression der <i>P. aeruginosa</i> Alginat-Gene <i>in vitro</i>, in infizierten Mäuselungen, und im Sputum von CF-Patienten	53
5.4	Obligat anaerobe Bakterien im Sputum von CF-Patienten	55
6	SCHLUßFOLGERUNGEN	58
7	ZUSAMMENFASSUNG	59
8	LITERATURVERZEICHNIS	61
9	THESEN	81

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

α_1 -PI	α_1 -Proteinase-Inhibitor
ASL	airways surface liquid
BAL	bronchoalveoläre Lavage
CAT	Katalase
CF	cystische Fibrose, synonym: Mukoviszidose
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CHO	Chinese Hamster Ovary
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELA	neutrophile Elastase
ENaC	epithelial sodium channel
FEV ₁	forciertes expiratorisches Volumen in 1s
FVC	forcierte Vitalkapazität
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hematoxylin-Eosin
HNE	humane Nasenepithelzellen
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
KBE	koloniebildende Einheit
Met	Methionin
mg	Milligramm
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minute
μ M	Mikromol
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MPO	Myeloperoxidase
MW	Mittelwert
NF- κ B	nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells
nm	Nanometer
nM	Nanomol
OD	optische Dichte

PBS	phosphate buffered saline
PCD	primäre ciliäre Dyskinesie
pHPA	p-Hydroxyphenyllessigsäure
PIA	Pseudomonas isolation agar
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PNSG	poly-N-succinyl-glucosamine
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffverbindung
RT-PCR	reverse-transcription polymerase chain reaction
s	Sekunde
SD	standard deviation
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TSB	Tryptone Soy Broth
UpM	Umdrehungen pro Minute

1. EINLEITUNG

Cystische Fibrose

Die cystische Fibrose (synonym: Mukoviszidose, abgekürzt CF) ist die häufigste autosomal-rezessiv übertragene schwerwiegende Erbkrankheit in den westlichen Industrienationen [1, 2]. Das betroffene Gen namens *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) ist auf dem Chromosom 7 lokalisiert [3-5]. Seit der Erstbeschreibung des Gens durch die Arbeitsgruppe um Lap-Chee Tsui 1989 [3-5] sind bislang 1604 verschiedene Mutationen dieses Gens beschrieben worden (Stand Januar 2010 [6]). Das *CFTR*-Gen kodiert für das gleichnamige Polypeptid CFTR, welches wiederum als Chloridkanal in der Membran von Epithelzellen fungiert [3-5].

Unbehandelt führt die Erkrankung an CF in der Regel zum Tode im Säuglings- oder Kleinkindesalter, es bestehen aber starke regionale wie auch ethnisch bedingte Unterschiede bezüglich der Lebenserwartung [7]. Derzeit (Stand Januar 2010) liegt die durchschnittliche Lebenserwartung bei Geburt für einen CF-Patienten in den westlichen Industrienationen bei mehr als 35 Jahren [8, 9].

Die Fehlanlage des CFTR-Chloridkanals bewirkt bei CF-Patienten die Sekretion eines hochviskösen, zähen Schleims (**Abb. 1**) in alle Organe, in deren Epithelzellen normalerweise CFTR exprimiert wird. So sind alle Drüsen und Schleimhäute betroffen. Dies schließt eine Affektion von Lunge, Pankreas, Leber, Nebenhöhlen, Verdauungs- und Reproduktionstrakt ein [1]. Die klinischen Auswirkungen äußern sich in chronischen Lungeninfektionen mit begleitender Entzündung, exo- und endokriner Pankreasinsuffizienz mit stark reduzierter Sekretion von Pankreasenzymen und Diabetes mellitus, Leberinsuffizienz mit Fettleber bis hin zur Leberzirrhose, vermehrtem Verlust von Gallensäuren, daraus resultierender Maldigestion mit Fettstühlen und Wachstumsverzögerung, sowie männlicher und (seltener) weiblicher Infertilität [1, 2]. Durch die Einführung einer hochkalorischen Ernährung und durch die Substitution von Pankreasenzymen [10] können mittlerweile die gastrointestinalen Auswirkungen begrenzt werden, so dass diese in der Regel nicht mehr ursächlich für den verfrühten Tod der Patienten sind [10]. Auch eine frühe Diagnosestellung ist mit einer verlängerten Lebenserwartung der CF-Patienten korreliert [11]. Die Infertilität kann mit Hilfe

verschiedener Eingriffe korrigiert werden [12]. Somit bestimmt in erster Linie der Verlauf der chronischen Lungeninfektion die Lebenserwartung der CF-Patienten [2, 13].

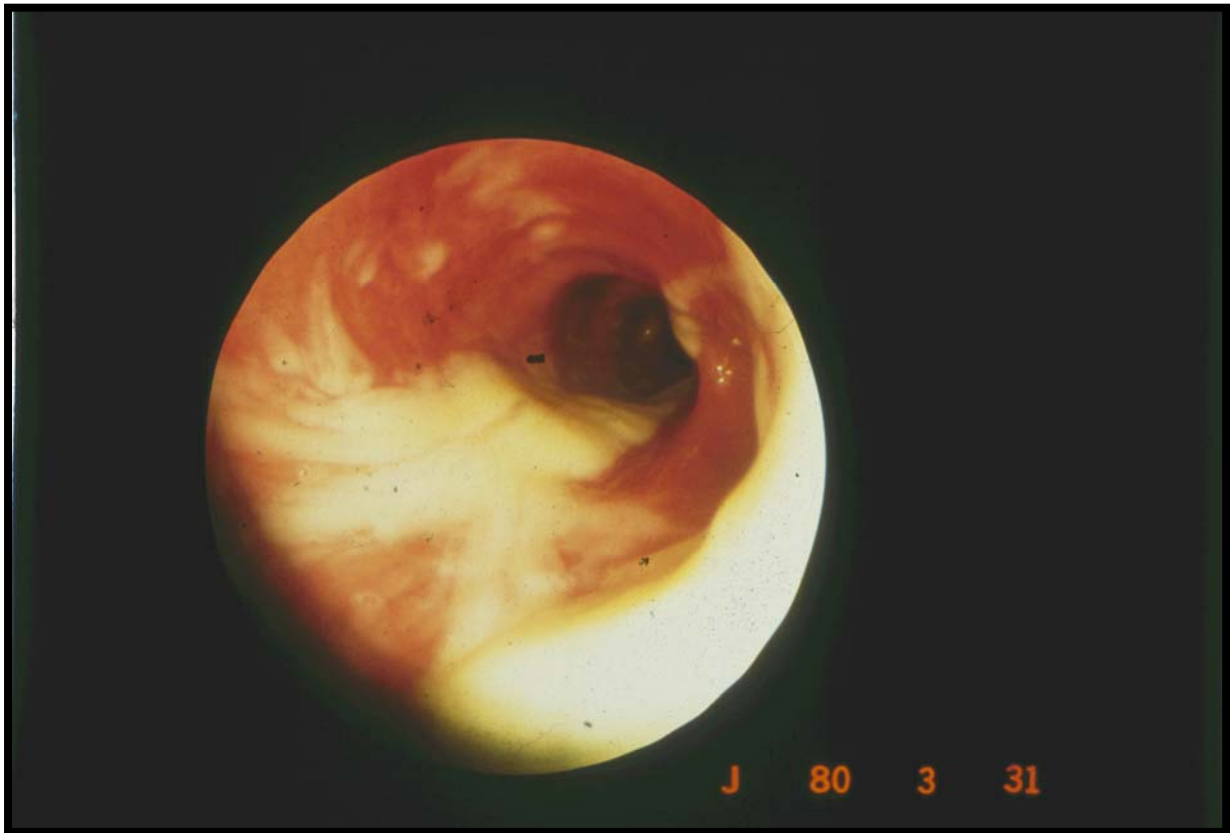


Abb. 1: Schleimstrassen in der Trachea eines CF-Patienten.

Chronische Lungeninfektionen bei CF-Patienten

Bereits bei Geburt kommt es zu ersten bakteriellen Kolonisationen der Lunge von CF-Patienten, die schnell in chronische Lungeninfektionen übergehen. Mit zunehmendem Lebensalter wird der Anteil der Patienten mit chronischen Pneumonien immer grösser [13]. Extrem auffällig ist bei diesen Infektionen, dass es sich lediglich um eine kleine Zahl verschiedener Erreger handelt, die bei den CF-Patienten zu finden sind: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, Bakterien des *Burkholderia cepacia*-Komplexes (im weiteren vereinfacht als *B. cepacia* bezeichnet), und *Stenotrophomonas maltophilia* sind in absteigender Häufigkeit zu finden [1, 2, 13]. Weitere Erreger wie *Aspergillus spp.*, *Candida albicans*, *Moraxella catarrhalis* oder atypische Mykobakterien werden weit seltener bei CF-Patienten nachgewiesen [9, 14, 15]. Eine ganze Reihe von Erregern wie *Escherichia coli*, Klebsiellen, Neisserien, *Campylobacter spp.*, Enterokokken oder auch Koagulase-negative Staphylokokken, die bei non-CF-Patienten akute

Pneumonien verursachen können, werden bei CF-Patienten praktisch nie gefunden [9, 14]. Der Grund für diese Tatsache ist bislang unklar.

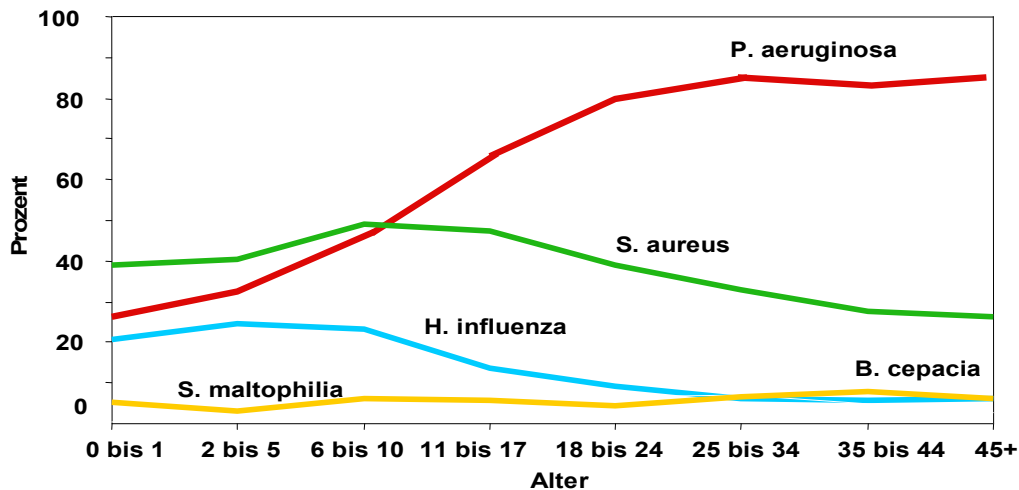


Abb. 2: Prävalenz unterschiedlicher Bakterien in der CF-Lunge. Modifiziert nach [13].

Mit zunehmendem Lebensalter kommt es bei den CF-Patienten zu einer Verschiebung des Keimspektrums. Während bei Kleinkindern noch *S. aureus* den am häufigsten nachgewiesenen Erreger darstellt, nimmt in höherem Lebensalter *P. aeruginosa* eine immer prominentere Rolle ein (**Abb. 2**, [13]), so dass ab einem Lebensalter von 18 Jahren mehr als 80% der CF-Patienten an einer chronischen *P. aeruginosa*-Lungeninfektion leiden [13, 16]. Auch der Grund für diese Verschiebung ist bislang unklar. Verkürzt ist jedoch festzuhalten: die chronische Lungeninfektion (mit begleitender Lungenentzündung) und deren Folgen stellen für fast alle CF-Patienten die Ursache für den weit verfrüht eintretenden Tod dar. Bei den bei weitem meisten CF-Patienten liegt zum Zeitpunkt ihres Todes eine chronische *P. aeruginosa*-Pneumonie vor. *P. aeruginosa* ist damit der mit Abstand wichtigste Erreger für CF-Patienten.

Vermeidung der chronischen *P. aeruginosa*-Pneumonie

Wenige Wochen bis Monate nach Erstbesiedlung der Lunge eines CF-Patienten mit *P. aeruginosa* kommt es zu einer Chronifizierung der resultierenden Pneumonie. Dies äußert

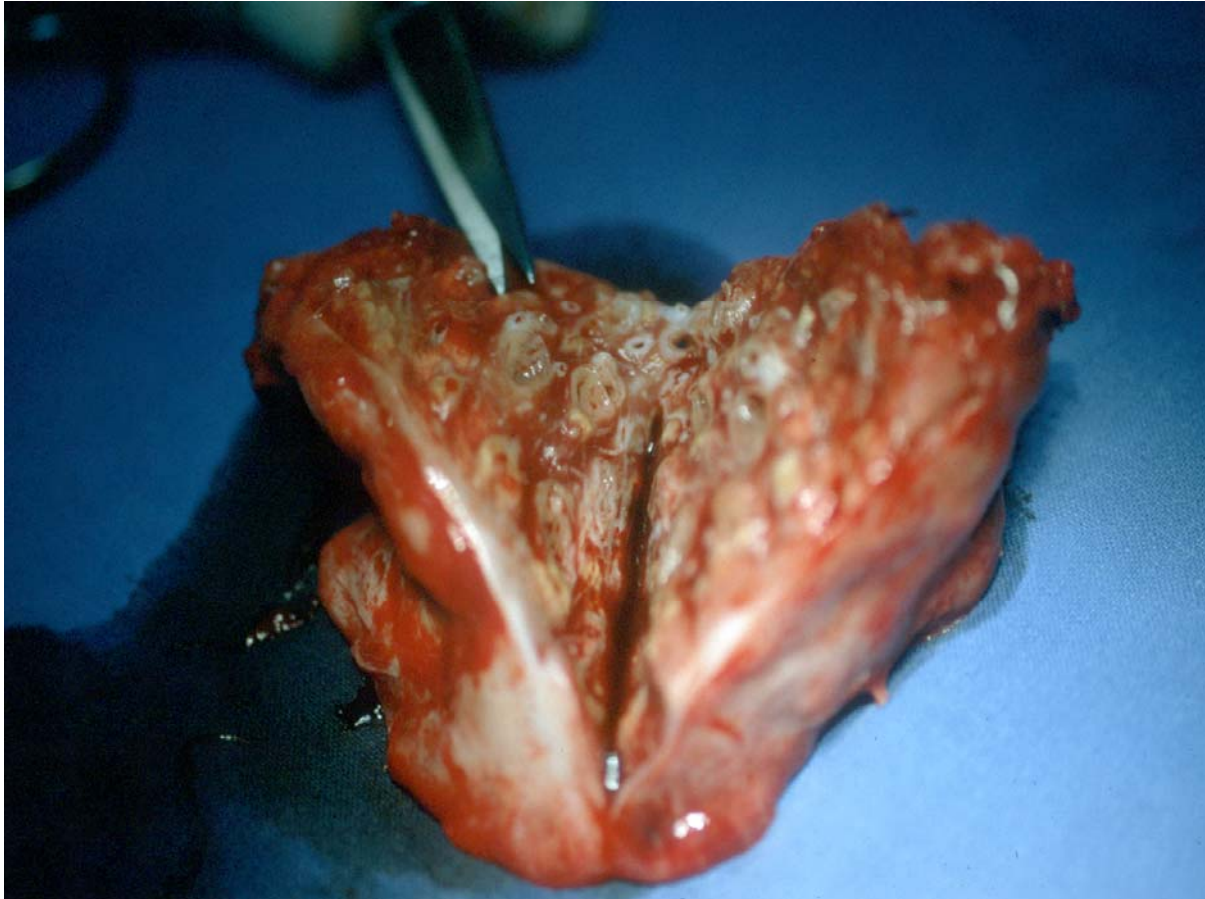


Abb. 3: Explantierter Lungenlappen (mit Explorationsschnitt) eines CF-Patienten mit chronischer *Pseudomonas aeruginosa*-Lungeninfektion.

sich darin, dass nach einmal eingetretener Chronifizierung eine Eradikation der Bakterien nicht mehr möglich ist. Zwar kann eine Reduktion der pulmonalen Symptomatik durch Gabe von Antibiotika in der Regel erreicht werden [16], doch verbleiben die Pseudomonaden lebenslang in der Lunge, und führen dort zu massiven Infektionen und Entzündungen mit dem Endresultat der Zerstörung der Lunge (**Abb. 3**).

Eine kausale Therapie der chronischen Lungeninfektion, also eine Korrektur des Gendefekts, ist nur mit Hilfe von Lungentransplantationen oder durch die Einbringung des intakten Gens in die CF-Lunge denkbar. Im Jahre 2007 wurden in Deutschland 71 Lungentransplantationen bei CF-Patienten durchgeführt [17]. Die Fünf-Jahres-Funktionsrate nach einer Lungentransplantation lag bei 53% [17]. Bei Mangel an Spenderorganen und nur mässigen mittelfristigen Erfolgsaussichten kann lediglich ein geringer Prozentsatz der CF-Patienten auf diese Weise behandelt werden. Zudem kommt es auch nach Transplantation bei einem erheblichen Teil der Patienten trotz Korrektur des Gendefekts zu Re-Infektionen [18-20], was

die Lungentransplantation zumindest derzeit als Ausnahmetherapie erscheinen lässt. Eine Korrektur des Gendefekts durch Einbringen des intakten Genes für den CFTR-Chloridkanal wurde bereits kurz nach der Entdeckung des Gendefekts [3-5] erstmalig versucht [21], allerdings erfolglos. Obwohl in den letzten Jahren erhebliche Anstrengungen für Gentherapien mit viralen oder liposomalen Vektoren unternommen wurden, sind diese bislang nicht klinisch erfolgreich [zur Übersicht 22]. Somit ist eine kausale Therapie für CF derzeit nur in seltenen Ausnahmefällen möglich.

Um so wichtiger sind neue Ansätze, die versuchen, eine Erstinfektion mit *P. aeruginosa* zu verhindern: eine strikte Separation der CF-Patienten voneinander und von möglichen Infektionsquellen wie kontaminierten Wasservorkommen [23, 24] führen dazu, dass die Erstinfektion immer später erfolgt [25]. Bislang existiert kein in Deutschland zugelassener Impfstoff gegen *P. aeruginosa*, es befindet sich aber mindestens ein vielversprechender Impfstoff in der Entwicklung [26]. Am meisten aber verspricht die sogenannte Frühtherapie: eine Therapie mit Antibiotika möglichst zeitnah nach der Erstkolonisation kann offensichtlich bei der Mehrheit der CF-Patienten die Pseudomonaden erfolgreich bekämpfen und damit verhindern, dass es zu einer chronischen *P. aeruginosa*-Pneumonie kommt, die dann nicht mehr therapierbar wäre [9, 13, 27, 28]. Die Frühtherapie wird mittlerweile in den meisten CF-Zentren mit Erfolg durchgeführt. Im Kopenhagener CF-Zentrum, welches weltweit führend ist in der Etablierung neuer Behandlungsstrategien von CF-Patienten, sind mittlerweile alle Patienten unter einem Alter von 14 Jahren frei von *P. aeruginosa* [Prof. Dr. Niels Høiby, Rikshospitalet Copenhagen, Denmark; persönliche Mitteilung]. Allerdings sind derartig gute Ergebnisse bislang noch die Ausnahme.

Unabhängig von diesen neuen Therapieansätzen wird deshalb zusätzlich versucht, die Pathomechanismen der chronischen *P. aeruginosa*-Pneumonie bei CF-Patienten näher zu beschreiben. Diese Versuche verfolgen das Ziel, über eine Beschreibung der detaillierten Zusammenhänge zwischen den wenigen bei CF-Patienten vorkommenden Bakterien und dem CF-Lungenepithel die Gründe aufzudecken, weshalb es ausgerechnet bei dieser – durch den Gendefekt charakterisierten – Patientengruppe zu chronischen Pneumonien durch *P. aeruginosa* kommt. Eine Kolonisation mit diesem Bakterium bei non-CF-Patienten führt dagegen entweder zu keinerlei Symptomen (weil die Keime sofort aus der Lunge eliminiert werden), oder zu akuten Pneumonien, wie dies bei Nosokomialinfektionen von beatmeten

Intensivpatienten der Fall sein kann [29]. Es existieren eine Reihe von pathogenetischen Modellen für die chronische *P. aeruginosa*-Lungeninfektion bei CF-Patienten.

Hypothesen zur Pathogenese der *P. aeruginosa*-Lungeninfektion bei CF-Patienten

Hypothese 1: Der CFTR-Gendefekt bewirkt eine Fehlfunktion des CFTR-Chloridkanals, was zu einer erhöhten Salzkonzentration in dem das Lungenepithel bekleidenden Flüssigkeitsfilm und weiter zu einer Beeinträchtigung der Funktion von Defensinen führt ("high salt hypothesis")

Von Smith et al. [30, 31] wird postuliert, dass eine aus dem Gendefekt resultierende erhöhte Salzkonzentration in dem die Atemwege auskleidenden Flüssigkeitsfilm (airways surface liquid, ASL) die Funktion der körpereigenen kationischen Peptide (Defensine) beeinträchtigt. Eine hypertone ASL konnte in zwei Untersuchungen demonstriert werden [32, 33]. Ein erhöhter Salzgehalt führt *in vitro* zu einer eingeschränkten antibiotischen Wirksamkeit der Defensine [30]. Bei Verdünnung der ASL hingegen wird die antibiotische Wirkung der Defensine wiederhergestellt [30]. Die Hypertonizität in der ASL wird damit erklärt, dass bei CF kein Chlorid über den (bei CF defekten) Chloridkanal absorbiert werden kann [33]. Auch die Phagozytose von Neutrophilen und Makrophagen ist bei erhöhten Salzkonzentrationen reduziert.

Aus den Beobachtungen zu schliessen, dass dieser Mechanismus relevant für die chronische *P. aeruginosa*-Lungeninfektion bei CF wäre, ist allerdings verfrüht: Smith und Mitarbeiter nahmen in einem Erratum 1996 ihre oben zitierten Ergebnisse zum Teil zurück [30]. Die Annahme einer hypertonen Ionenkonzentration in der ASL wird sehr kontrovers diskutiert; mehrere neuere Untersuchungen stehen im Widerspruch zu dieser Hypothese. So konnte mit anderen Versuchsanordnungen und unter Verwendung neuartiger Techniken gezeigt werden, dass zwischen der ASL von CF-Patienten und der von Gesunden kein Unterschied in Bezug auf ihre Salzkonzentration besteht [34, 35], sondern dass die ASL bei beiden Gruppen isoton ist [35-37]. Ausserdem konnte demonstriert werden, dass nicht, wie ursprünglich angeführt [33], Einflüsse wie osmotischer Druck, Oberflächenspannung oder Kapillarkräfte für die Ausbildung einer hypotonen ASL bei Gesunden verantwortlich sind, sondern dass aktiver Ionentransport die Zusammensetzung und damit das Volumen der ASL bestimmt [38]. Schliesslich gibt es keine Erklärung dafür, wie ein durch hohe Salzkonzentration bedingter

Funktionsverlust der Defensine allein zu chronischen Infektionen führen kann, da die Defensine nur einen kleinen Teil der körpereigenen antimikrobiellen Abwehr darstellen [39-42]. Vor diesem Hintergrund muss die "high salt"-Hypothese als unwahrscheinlich eingeschätzt werden.

Hypothese 2: Das CFTR-Protein ist ein Rezeptor für die Internalisation von *P. aeruginosa*

Die CFTR-Rezeptor-Theorie wird von der Arbeitsgruppe um Gerald B. Pier vertreten. Es wird postuliert, dass *P. aeruginosa* auf den Atemwegsepithelzellen von Gesunden durch das CFTR-Protein gebunden wird. Im Anschluss findet eine Phagozytose in das Epithel statt, und die Bakterien werden abgetötet [43-46]. Weil bei CF das CFTR-Protein nicht oder nur unvollständig gebildet wird, ist dieser Mechanismus im CF-Atemwegsepithel gestört, und es kommt zur chronischen *P. aeruginosa*-Lungeninfektion. Dabei interagiert *P. aeruginosa*-Lipopolysaccharid mit dem CFTR-Protein [47]. Non-mukoide klinische Bakterienisolate und Laborstämme, nicht aber mukoide Patientenstämme binden an das CFTR-Protein [48].

Allerdings existieren widersprüchliche Auffassungen über den Beitrag von Epithelzellen zur Phagozytose von *P. aeruginosa*: Die meisten Autoren sehen die neutrophilen Granulozyten (im Gegensatz zu den Epithelzellen) als die wesentliche Zellsorte bei der Abwehr von *P. aeruginosa* an [2, 49, 50-52]. Zudem zeigen neue Experimente, dass *P. aeruginosa* vorrangig an den Mukus in den Atemwegen, nicht aber direkt an das Epithel adhärirt [53]. Ausserdem erklärt die CFTR-Rezeptor-Theorie nicht, weshalb andere Bakterien wie *Staphylococcus aureus* bei CF zu finden sind [8, 54], welche wiederum vermehrt an Mukus und nicht an das Atemwegsepithel adhäreren [53]. Somit besitzt auch diese Hypothese erhebliche Lücken beim Versuch einer kausalen Herleitung der *P. aeruginosa*-Lungeninfektion bei CF.

Hypothese 3: Eine vermehrte Zahl von asialo-GM₁-Rezeptoren in den CF-Epithelzellen führt zu einer verstärkten Adhärenz von *P. aeruginosa*

Wenn *P. aeruginosa* vermehrt an die Zelloberfläche des CF-Epithels adhärirt, sollte dies zu einer verschlechterten Eradikation der Bakterien führen, was die häufigen *P. aeruginosa*-Infektionen bei CF erklären könnte. Die Arbeitsgruppe um Alice Prince konnte zeigen, dass CF-Epithelzellen einen Rezeptor besitzen, an den *P. aeruginosa* binden kann [55]. Bei

vermehrter intrazellulärer Retention des unfertigen CFTR-Proteins kommt es zu einer vermehrten Sialisierung von Glykolipiden auf den Membranen einer Epithelzellkultur [56]. Vermehrte Glykolipide sind auch auf nasalem Epithel von CF-Patienten zu finden [57]. Dies führt zu einer erhöhten Anzahl der asialo-GM₁-Rezeptoren auf den Zellmembranen, was sich wiederum in einer verstärkten Pilus-vermittelten Bindung von *P. aeruginosa* äussert [57]. Somit würde eine verringerte CFTR-Expression an der Zellmembran mit einer vermehrten Zahl von Rezeptoren für *P. aeruginosa* einhergehen.

Im Widerspruch zu dieser Hypothese steht die Beobachtung, dass bei gleichem Versuchsaufbau keine vermehrte Zahl der asialo-GM₁-Rezeptoren in den CF-Epithelzellen gefunden wird, wenn ein spezifisches Lektin zum Rezeptornachweis verwendet wird. Zudem wird kritisiert, dass die Untersuchungen lediglich mit Laborstämmen und nicht mit klinischen Isolaten von *P. aeruginosa* durchgeführt wurden. So konnte auch gezeigt werden, dass Patientenisolat nicht vermehrt an asialo-GM₁-Rezeptoren in den CF-Epithelzellen binden [48]. Weiterhin sollten *P. aeruginosa*-Stämme ohne Pili oder Flagellen, wie sie bei CF-Patienten gehäuft vorkommen [58, 59], auch nicht vermehrt gebunden werden. Auch die Beobachtung, dass *P. aeruginosa* überwiegend an den Mukus in der ASL, nicht aber direkt an das Epithel adhärert [53], lässt das asialo-GM₁-Modell als unwahrscheinlich erscheinen.

Hypothese 4: Der Entzündungsvorgang in der CF-Lunge ist CF-spezifisch und unterscheidet sich von dem in gesunden Lungen

Innerhalb dieser Hypothese werden divergente Aussagen über den Beginn der chronischen Lungenentzündung bei CF und über die Beteiligung verschiedener Zytokine bei dieser Entzündung diskutiert. Es besteht kein Zweifel darüber, dass bei einmal eingetretener Infektion der CF-Lunge ausser der Infektion auch eine starke Entzündung auftritt, die den Verlauf der Erkrankung wesentlich beeinflusst [2, 60]. Allerdings existieren unterschiedliche Aussagen zu der wichtigen Frage, ob bereits bei Säuglingen oder Kleinkindern mit CF eine Lungenentzündung ohne gleichzeitige Lungeninfektion vorliegt. In einer vielzitierten Untersuchung [61] konnte gezeigt werden, dass in Proben von bronchoalveolärer Lavage (BAL) bei sieben von 16 Kleinkindern mit CF keine Bakterien nachweisbar waren, dagegen aber erhöhte Werte für Neutrophile und für das proinflammatorische Zytokin Interleukin-8 (IL-8). Auch DNA ist in der BAL von CF-Kindern bereits vermehrt nachweisbar [62]. In der BAL von CF-Kindern, deren Lungen sämtlich bakteriell kontaminiert waren, wurden hohe

Aktivitäten der proinflammatorischen neutrophilen Elastase (ELA) gefunden [63]. Bei der kombinierten Untersuchung von mikrobiologischem Untersuchungsmaterial und Serum-Antikörpern gegen *P. aeruginosa* wurden bei 97.5% der untersuchten Kinder in einem Alter von unter drei Jahren positive Befunde erhoben [64]. In einer australischen Untersuchung konnten erhöhte Entzündungsparameter fast ausschliesslich bei infizierten CF-Kindern nachgewiesen werden [65]. Zusammengenommen besagen diese Beobachtungen, dass in der überwiegenden Zahl der Fälle eine Infektion mit einer Entzündung einher geht. Allerdings ist nicht auszuschliessen, dass es in einzelnen Fällen auch zu einer Entzündung ohne Infektion kommen kann.

Eine Reihe von weiteren Untersuchungen beschäftigt sich mit der inhaltlich verwandten Frage, ob das Entzündungsgeschehen in der CF-Lunge eine Antwort auf einen bakteriellen Reiz darstellt, oder ob es durch spezifische Eigenschaften des CF-Epithels intrinsisch zu einer vermehrten Entzündungsneigung kommt. Die wohl wesentlichste Studie zu diesem Thema zeigt, dass in Bronchialepithelzellen von Gesunden das antiinflammatorische Zytokin IL-10 zu finden ist, nicht aber die proinflammatorischen Interleukine IL-6 und IL-8 [66]. CF-Epithel dagegen sezerniert IL-6 und IL-8, aber kein IL-10. Auch konnte gezeigt werden, dass im Tiermodell die Gabe von IL-10 eine durch *P. aeruginosa* bedingte Lungenentzündung verringert [67], wogegen es bei IL-10 knockout-Mäusen zu einer verstärkten Entzündung bei einer *P. aeruginosa*-Lungeninfektion kommt [68]. Auch sezernieren CF-Epithelzellen nach Stimulation deutlich mehr IL-8 als normale Zellen [69], was mit einer vermehrten Aktivierung von NF- κ B in den CF-Zellen gekoppelt ist [70]. In einer Reihe von Studien wurden aber keine Hinweise auf CF-spezifische Entzündungsabläufe gefunden [60, 63, 64], so dass die Frage nach einer intrinsischen Entzündungsneigung bei CF nicht definitiv beantwortet werden kann. Diese Unsicherheit erklärt sich auch dadurch, dass die Bedeutung der zahlreichen bekannten Entzündungsmediatoren bei CF sehr divergent diskutiert wird, wobei sich eine Reihe von antiinflammatorisch wirkenden Substanzen in der klinischen Erprobung befinden.

Hypothese 5: Durch die Fehlfunktion des CFTR-Chloridkanals kommt es zur Produktion von ungewöhnlich viskösen Sekreten aus submukösen Drüsen ("abnormal gland secretion"-Hypothese)

Die älteste der pathophysiologischen Hypothesen basiert auf den Beobachtungen, dass bei Gesunden die höchste Zahl von CFTR-Kanalproteinen in serösen Epithelzellen innerhalb von submukösen Drüsen gefunden werden [71], und dass ungewöhnlich grosse Drüsen bereits bei Kindern mit CF in den Atemwegen gefunden werden [72]. Dies führt zu der Annahme, dass die Auswirkungen der CFTR-Fehlfunktion auf die submukösen Drüsen ursächlich für die CF-Lungenerkrankung sind. Bestätigend sind Untersuchungen an der explantierten Schweine-Trachea, in denen gezeigt wird, dass das CFTR-Protein die Sekretion von Chlorid und Bikarbonat in den submukösen Drüsen bewirkt [73, 74]. Die Gabe von CFTR-Inhibitoren reduziert deutlich die Sekretion von Flüssigkeit nach Gabe von Acetylcholin [73, 74] und führt zu einer Verstopfung der Drüsenausführungsgänge mit ungewöhnlich viskösen, mucinhaltigen Sekreten [74]. Die Gabe von anionischen Sekretions-Inhibitoren äussert sich in einer Reduktion des Mukustransports auf der Trachea und einer zunehmenden Adhäsion von Mukus-Plaques an der Oberfläche der Atemwege [75]. Diese Tierexperimente legen die Annahme nahe, dass der CFTR-Chloridkanal für eine normale Funktion von Mucinen benötigt wird.

Auch in menschlichen Drüsensekreten sind pH und Ionenkonzentration ähnlich wie in der ASL, und es existieren in dieser Hinsicht keine Unterschiede zwischen CF-Patienten und Gesunden. Die Sekrete sind jedoch - wie im Tierversuch - so auch beim CF-Patienten ungewöhnlich viskös [76]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Menge der Sekretion zum grossen Teil cAMP-abhängig ist, und dass die Sekretion in CF-Drüsen reduziert ist [77]. Somit kann die erhöhte Viskosität der Drüsensekrete durch eine verringerte Sekretion von Salz und Wasser erklärt werden. Als Kritik an dieser Hypothese wird angeführt, dass submuköse Drüsen in der menschlichen Lunge lediglich in den grossen Bronchien, nicht aber in den Bronchiolen vorhanden sind, was mit dem einheitlichen Krankheitsbild in beiden Kompartimenten schwierig in Übereinstimmung zu bringen ist.

Hypothese 6: Durch die Fehlfunktion des CFTR-Chloridkanals kommt es zu einer Verringerung des ASL-Volumens mit daraus resultierender Beeinträchtigung des Mukus-Transports ("low volume“-Hypothese)

Diese Hypothese geht davon aus, dass die mechanische Reinigung der Atemwege von Mukus die wichtigste Form der körpereigenen Abwehr gegen inhalierte Bakterien darstellt. Hierzu sind eine unbeeinträchtigte Zilienfunktion, eine normale Sekretion von Mucinen durch die

Drüsenzellen, und eine optimal zusammengesetzte ASL-Schicht von Nöten. Optimal bedeutet hierbei, dass die Muzine in der ASL einerseits nicht zu stark verdünnt werden, damit die Bakterien noch von der ASL abgefangen werden können, andererseits aber nicht zu stark konzentriert werden, damit die Mukusschicht noch durch die Zilien oralwärts abtransportiert werden kann. Das Volumen der ASL wird in der Lunge durch eine komplexe Regulation der Na^+ -Absorption und der Cl^- -Sekretion bestimmt, welche ihrerseits durch das CFTR-Protein koordiniert wird (**Abb. 4a**).

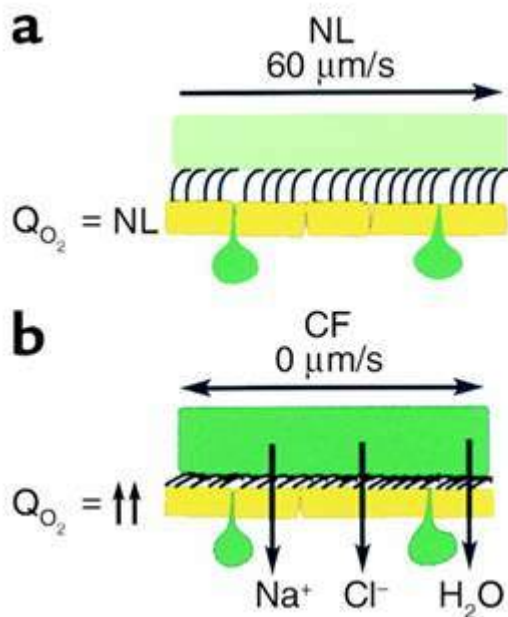


Abb. 4: Bei Gesunden wird die dünnflüssige ASL (hellgrün) durch die Zilien oralwärts abtransport (a). Bei CF-Patienten kommt es durch die Fehlfunktion des CFTR-Chloridkanals zu einer reduzierten Sekretion von Chlorid-Ionen aus dem Epithel in die Atemwege (b). Das Chlorid verbleibt in der Epithelzelle, Natriumionen strömen zum Ladungsausgleich in die Epithelzelle ein, und Wasser strömt passiv nach, um die erhöhte Salzkonzentration auszugleichen. Diese Mechanismen bewirken eine Dehydratation der ASL, und die Bildung eines zunehmend viskösen Mukuslayers (dunkelgrün). Modifiziert nach [B].

Das CFTR-Protein besitzt zwei Funktionen: Erstens kann es aktiv Cl^- -Ionen aus der Zelle sezernieren, was zu einem passiven Nachstrom von Wasser und damit zu einer Volumenzunahme der ASL führt. Zweitens inhibiert das CFTR-Protein den epithelialen Natriumkanal ENaC, was zu einer Verringerung der Na^+ -Absorption aus der ASL in die Zelle und damit wieder zu einer Volumenzunahme der ASL mit einer verstärkten Verdünnung der Mucine und anderer hochmolekularer ASL-Bestandteile führt. Wenn nun bei CF das CFTR-Protein vermindert oder gar nicht in der Zellmembran vorhanden ist, bewirkt dies einerseits eine verringerte aktive Cl^- -Sekretion, und andererseits durch eine verringerte Inhibition des ENaC eine verstärkte Na^+ -Absorption aus der ASL in die Zelle. Damit nimmt die Elektrolytkonzentration in der Zelle zu, und da die Zellmembran in hohem Masse für Wasser (nicht aber für grosse Moleküle) permeabel ist, strömt Wasser passiv hinter den Elektrolyten her, und die Konzentration an Mucinen und Proteinen in der ASL nimmt zu. Dadurch kommt es bei Isotonizität der ASL zu einer erhöhten Viskosität mit dem Ergebnis, dass die

Mukusschicht nicht mehr durch die koordinierte Zilientätigkeit oralwärts abtransportiert werden kann, sondern in den Atemwegen verbleibt (**Abb. 4b**).

Diese Hypothese wird durch die Untersuchungen unterstützt, dass Messungen in Zellkulturen eine Isotonizität der ASL ergaben [34, 35, 76], dass die Höhe der ASL bei CF niedriger als bei Gesunden ist [35, 38], und dass es nach einer Reduktion des ASL-Volumens auch im Experiment zu einer Mukus-Stase kommt [35]. Auch im Tierversuch konnte an CFTR knockout-Mäusen eine isotone Ionenkonzentration und reduzierte Höhe der ASL demonstriert werden [38]. Als Kritik an der "low volume"-Hypothese wird angeführt, dass sie nicht die Anfälligkeit der CF-Lunge für Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* erklärt, und dass bislang bei Kindern mit CF nicht gezeigt werden konnte, dass es auch ohne die Entwicklung einer chronischen Lungenerkrankung zur Mukus-Stase kommt. Trotz dieser Kritikpunkte wird die "low volume"-Hypothese zunehmend akzeptiert. Falls keine kausale Therapie in Form einer Einbringung von funktionellem CFTR in die Zelle erfolgen kann, liegen die möglichen therapeutischen Konsequenzen der Hypothese in einer Beeinflussung des ENaC-Natriumkanals oder in anderen Ansätzen mit dem Ziel einer Vermehrung des ASL-Volumens sowie in einer mukolytischen Therapie und anderen Versuchen der Wiederherstellung einer mukoziliären Clearance.

Allen beschriebenen Hypothesen ist gemeinsam, dass sie Erklärungslücken aufweisen. So weisen sie zum Beispiel keine Spezifität für die Erkrankung CF auf, oft können Ergebnisse nicht reproduziert werden oder sind nur *in vitro* gültig, wurden mittlerweile von neueren Ergebnissen widerlegt oder sind nur für eine der bei CF vorkommenden Bakterienspezies gültig, wurden auf fehlerhafte Versuche gegründet, lassen die spezifische Umgebung in der CF-Lunge ausser Acht, oder beziehen sich nur auf einzelne Teile der CF-Lunge. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden kumulativen Habilitation mit Hilfe einer Reihe von Experimenten die Grundlage für eine umfassende, neue Hypothese zur Erklärung der Pathomechanismen der chronischen CF-Lungeninfektion gelegt. Diese "low oxygen" Hypothese ist mittlerweile weitgehend akzeptiert, und hat die oben beschriebenen Pathogenitätsmodelle weitgehend ergänzt bzw. abgelöst. Im Weiteren sei die Entwicklung dieses neuen Erklärungsmodells für die chronische Lungeninfektion der CF-Patienten beschrieben.

2. ZIELSTELLUNG

In der vorliegenden kumulativen Habilitationsschrift wird beschrieben:

- A Die Bildung und enzymatische Verstoffwechslung von Sauerstoffradikalen in der Lunge von CF-Patienten (Worlitzsch D, Herberth G, Ulrich M, Döring G. Catalase, myeloperoxidase and hydrogen peroxide in patients with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 1998; 11: 377-83).
- B Die Messung des Sauerstoffpartialdrucks *in vitro* und in der Lunge von CF-Patienten sowie der Einfluss von Hypoxie auf den Phänotyp von *Pseudomonas aeruginosa* (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* 2002; 109: 317-325).
- C Der Einfluss von Hypoxie auf die genetische Regulation der Alginatproduktion von *Pseudomonas aeruginosa in vitro* und in der Mäuselunge (Bragonzi A, Worlitzsch D, Pier GB, Timpert P, Ulrich M, Hentzer M, Andersen JB, Givskov M, Conese M, Döring G. Non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* expresses alginate in lungs of patients with cystic fibrosis and in a murine model. *J Infect Dis* 2005; 192: 410-419).
- D Die Auswirkung von Hypoxie auf die bakterielle Besiedlung der Lunge von CF-Patienten durch obligate Anaerobier (Worlitzsch D, Rintelen C, Böhm K, Wollschläger B, Merkel N, Borneff-Lipp M, Döring G. High numbers of obligate anaerobes in sputum of patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Infect* 2009, 15: 454-460).

Ziel der Habilitationsschrift ist die Darstellung einer experimentell belegten neuen Hypothese zur Pathogenese der chronischen *Pseudomonas aeruginosa*-Lungeninfektion bei CF-Patienten. Diese mittlerweile weltweit weitgehend akzeptierte "low oxygen"-Hypothese ermöglicht zahlreiche neue Ansätze zur Therapie der chronischen *P. aeruginosa*-Pneumonie bei Patienten mit cystischer Fibrose.

3. MATERIAL UND METHODIK

3.1. Experimente zur Bildung und enzymatischen Verstoffwechslung von Sauerstoffradikalen in der Lunge von CF-Patienten

Hintergrund: Die erste Studie [A] beschäftigte sich mit dem Nachweis von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) im Atemkondensat von CF-Patienten sowie mit der Bestimmung der H_2O_2 -metabolisierenden Enzyme Katalase (CAT) und Myeloperoxidase (MPO) im Sputum von CF-Patienten. Weiterhin wurde die Zytotoxizität von CF-Sputum in der Zellkultur untersucht. Mit diesen Versuchen wurde der Beitrag von reaktiven Sauerstoffverbindungen (synonym benutzt: Sauerstoffradikale, reactive oxygen species, ROS) und von ROS-metabolisierenden Enzymen zur Pathogenese der chronischen Lungenentzündung in der CF-Lunge quantifiziert.

3.1.1. Patienten

An der Studie nahmen 63 CF-Patienten aus sechs deutschen CF-Kliniken teil (33 weiblich, 30 männlich, Alter 8-37 Jahre, MW \pm SD 24 \pm 8 Jahre), die alle chronisch mit *P. aeruginosa* oder anderen CF-Erregern infiziert waren. Alle Patienten bekamen keine antiinflammatorische Medikation, wurden aber antibiotisch behandelt. Als Kontrollgruppen dienten 51 gesunde Nichtraucher (Alter 12-61 Jahre, MW \pm SD 27 \pm 8 Jahre), und 23 Patienten mit Asthma bronchiale (Alter 12-61 Jahre, MW \pm SD 36 \pm 16 Jahre). Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Tübingen genehmigt.

3.1.2. Sammlung des Atemkondensats und Bestimmung von H_2O_2

Das Atemkondensat der Versuchspersonen wurde mit Hilfe eines wassergekühlten doppelwandigen sterilen Glaskühlers (2-4°C, Vetter, Ammerbuch) für die Dauer einer Viertelstunde gesammelt. Die Patienten und Kontrollpersonen atmeten während dieser Zeit mit normaler Atemfrequenz durch die Nase ein und durch den Glaskühler wieder aus. Das sich an der Innenseite des Kühlers niederschlagende Atemkondensat (2-4mL) wurde in einem sterilen Plastikröhrchen gesammelt und bis zur Bestimmung des H_2O_2 eingefroren. Diese Bestimmung erfolgte mit Hilfe der Methode nach Hyslop [78] unter Verwendung der Reagentien p-Hydroxyphenylelessigsäure (pHPA) und Meerrettich-Peroxidase. Die Bestimmungen wurden in Quartz-Mikroküvetten (109.009 F-QS, Perkin-Elmer, Überlingen)

in einem auf 37°C temperierten Küvettenhalter und mit einem LS-50 Fluorimeter (Perkin-Elmer) bei einer Exzitationswellenlänge von 288 nm und einer Emissionswellenlänge von 405 nm durchgeführt. Die Bestimmung des H₂O₂ in den einzelnen Kondensatproben wurde jeweils für 40 s unter Verwendung eines Mikro-Magnetrührers durchgeführt, und mit Hilfe einer Standardkurve, erstellt unter Verwendung von reinem H₂O₂, quantifiziert. Die untere Nachweisgrenze lag bei 0.01 µM.

3.1.3. Sputum von CF-Patienten

Sputumproben von 38 CF-Patienten wurden sofort nach Expektoration eingefroren. Zur Messung wurden die aufgetauten Proben gewogen, 1:1 mit steriler Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) versetzt, homogenisiert (Vortex-Schüttelrührer, Vetter, Ammerbuch), und bei 4°C für 10 min abzentrifugiert (1.000 Umdrehungen pro Minute, UpM). Von 9 Sputumproben wurde die CAT durch Absorption an eine Protein A Sepharose Cl-4B-Säule (Pharmacia, Freiburg), die mit 2,2 mg Kaninchen anti-Mensch CAT IgG gekoppelt war (Athens Research Inc, Athens, GA, USA), entfernt. Einzelne Sputen wurden bei 80°C für 30 min hitzeinaktiviert.

3.1.4. Enzymbestimmungen

Die Konzentrationen von CAT und MPO wurde mit Hilfe von Festphase-Radioimmunoassays [79] in 38 Sputumüberständen und in Plasma-Proben ermittelt. Zu diesem Zweck wurden gereinigte menschliche CAT (Sigma-Aldrich) oder MPO (Wieslab, Lund, Schweden) und Kaninchen-Antikörper gegen menschliche CAT (Athens Research Inc) oder MPO (Merck, Darmstadt) verwendet. Die Konzentration von Elastase aus polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (polymorphonuclear neutrophils, PMN) in Sputumüberständen und in Plasma wurde mit Hilfe eines ELIZA-Tests (PMN-Elastase-Test, Merck) bestimmt. MPO-Aktivitäten wurden photometrisch nach der Methode von Klebanoff [80] gemessen, bei der die durch MPO katalysierte Oxidation von Guaiacol zu Tetraguaiacol untersucht wird. CAT-Aktivitäten wurden gleichfalls photometrisch nach der Methode von Aebi [81] und Bergmeyer [82] bestimmt, wobei der Abbau von H₂O₂ an Hand der Extinktionsänderung bei 240 nm quantifiziert wurde. Protein-Konzentrationen wurden mit Hilfe des Pierce-Assays (BCA protein assay reagent, Pierce, Rockford, IL, USA) ermittelt.

3.1.5. Zytotoxizitätsbestimmungen

1×10^5 Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters (CHO-Zellen, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) ACC 110) oder menschliche Lungenkarzinomzellen (A-549, DSMZ ACC 107) wurden in Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM, Gibco, Eggenstein), welches mit 10% foetalem Kälberserum, 1% Natriumpyruvat, 1% nichtessentiellen Aminosäuren, und 50 μg Gentamicin pro mL versetzt war, für 48 Stunden bei 37°C unter 5% CO₂ auf 96-well Mikrotiterplatten ausgesät [83]. Die Zytotoxizität der verschiedenen Ansätze wurde nach 5 Stunden durch Verwendung von 0.025% Trypanblau untersucht. Hierbei wurde der Prozentsatz von blaugefärbten Zellen mikroskopisch bestimmt, wobei mindestens 1.000 Zellen pro Ansatz gezählt wurden.

Zusätzlich zu den Zelllinien wurden humane Nasenepithelzellen (HNE) als primäres Zellkultursystem verwendet [84]. Diese Zellen wurden von CF-Patienten nach nasaler Polypektomie gewonnen, indem sie mit Hilfe von Pronase 0,1% abgedaut wurden, und in DMEM, welches mit mehreren Antibiotika und Antimykotika versetzt war, bei 37°C und 5% CO₂ unter kontinuierlicher Rotation gehalten wurden, bis sie ein Monolayer bildeten. Nach 2 Wochen wurden die Primärzellen in geschüttelte Suspensionskulturen überführt, wo die Zellen sich zu Sphäroiden (HNE-Vesikel) weiterentwickelten. Nach weiteren 4 Wochen entwickelten die Zellen Zilien mit normaler Struktur und koordinierter Tätigkeit, die für bis zu 3 Monate am Leben gehalten werden konnten. Die Zilientätigkeit wurde in UpM quantifiziert.

3.1.6. Statistik

Die Rohdaten wurden mit dem Shapiro-Wilks-Test auf Normalverteilung untersucht. Im Anschluss wurde die Signifikanz mit Hilfe des Student's t-Tests oder des Wilcoxon-Tests bestimmt. Werte <0.05 wurde als signifikant erachtet. Korrelationen wurden als Pearson'sche Korrelationskoeffizienten errechnet. Es wurde das Programm SAS/STAT (Version 6, 4. Auflage 1990, SAS Institut, Cary, NC, USA) verwendet.

3.2. Experimente zur Bestimmung der Lokalisation von *P. aeruginosa* in der CF-Lunge, zur Sauerstoffmessung *in vivo* und *in vitro*, und zur Produktion von Alginat.

Hintergrund: Die zweite Studie [B] beschäftigt sich mit der Frage, wo im Sputum und auf dem Epithel *P. aeruginosa* lokalisiert ist, wie hoch der Sauerstoffpartialdruck (pO₂) *in vivo* und *in vitro* ist, und welchen Einfluss ein reduzierter pO₂ auf den Phänotyp von *P. aeruginosa* hat. Mit diesen Messungen konnte eine neue Hypothese zur Pathophysiologie der chronischen *P. aeruginosa* Lungenentzündung und -infektion bei Patienten mit CF entwickelt und experimentell untermauert werden.

3.2.1. Patienten

Es wurden Lungen von sieben CF-Patienten nach Lungentransplantation (5 männlich, 2 weiblich, mittleres Alter 29,5 Jahre, CF Center, University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA) für die Studie verwendet. Zwei Lungenlappen von Kindern (mittleres Alter 8 Jahre, Service de Pédiatrie, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Pierre-Bénite, France) wurden nach Lobektomie untersucht. Nasenpolypen von 4 CF-Patienten (mittleres Alter 14,3 Jahre, Hals-, Nasen- und Ohrenklinik Ludwigshafen) und von vier non-CF Patienten (mittleres Alter 46,5 Jahre, Hals-, Nasen- und Ohrenklinik Tübingen) wurden für die Herstellung von primären Zell-Sphäroiden verwendet. Ferner wurden Zellen von sieben Spendern von Transplantatlungen (vier männlich, 3 weiblich, mittleres Alter 42 ± 6 Jahre), acht CF Transplantatempfängern (vier männlich, 4 weiblich, mittleres Alter 34 ± 3 Jahre), und zwei Transplantatempfängern mit primärer ziliärer Dyskinesie (ein männlich, ein weiblich, Alter 15 und 50 Jahre) für Zellexperimente untersucht. Für die *in vivo*-Messungen des pO₂ wurden sechs CF-Patienten (zwei männlich, vier weiblich, mittleres Alter 23,8 Jahre, mittleres FEV₁ 55,7% altersentsprechend) untersucht. Für alle Teilbereiche der Studie wurde die Zustimmung der jeweils zuständigen Ethikkommissionen eingeholt.

3.2.2. Bakterienstämme

Der *P. aeruginosa*-Laborstamm PAO1 [85] wurde an jedem Versuchstag in frischer Soja-Bouillon (Trypticase Soy Broth, TSB, Oxoid Ltd, Basingstoke, England) auf eine optische Dichte von OD_{600nm} 0.05 eingestellt und bei 37°C so lange inkubiert, bis eine OD_{600nm} von 1.5 erreicht wurde. Für die Alginatbestimmungen wurden 15 genetisch unterschiedliche *P. aeruginosa*-Isolate aus Umgebungsproben untersucht.

3.2.3. Mikroskopische Untersuchungen

Lungengewebe von CF-Patienten wurde unmittelbar nach Organentnahme (innerhalb von maximal 3 min) in 2.5% Glutaraldehyd oder 10% Formaldehyd fixiert, oder in Flüssigstickstoff schockgefroren. Immunfluoreszenz zum Nachweis von *P. aeruginosa* wurde in schockgefrorenem Gewebe mit Hilfe eines polyklonalen Kaninchen-Antikörpers unternommen. Als zweiter Antikörper wurde ein Cy3-konjugierter Ziege anti-Kaninchen Antikörper (Dianova, Hamburg) eingesetzt. Die Lokalisation von *P. aeruginosa* im Gewebe wurde mit Hilfe eines KS300 Imaging Systems (Kontron Electronic GmbH, Eching) untersucht. Zur Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurde CF-Lungengewebe in Osmiumtetroxid nachfixiert, Dünnschnitte wurden angefertigt, und mit Uracylacetat/Bleizitrat gefärbt. Zur Rasterelektronenmikroskopie wurden die Proben wie bei Ulrich et al [53] beschrieben bearbeitet. Insgesamt wurden 406 Ausschnitte von 14 Bronchien aus 2 CF-Lungen auf die Bindung von *P. aeruginosa* ans Lungenepithel untersucht. Zusätzlich wurde die Adhärenz von *P. aeruginosa* auch mit Hilfe von Sphäroiden aus primären menschlichen Epithelzellen [53] rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Zu diesem Zweck wurden Bakterien zusammen mit Sphäroiden für 2 Stunden bei 37°C unter 5% CO₂ mit einem Maus-Antikörper gegen menschliches Mucin inkubiert, mit einem zweiten Cy3-konjugierten Ziege anti-Maus-Antikörper gekoppelt, und in Permafluor (Sigma) eingebettet.

3.2.4. Bronchoskopie und Bestimmung des pO₂

Die fiberoptische Bronchoskopie wurde wie bei Meyer [86] beschrieben durchgeführt. Das Bronchoskop wurde unter Videokontrolle in den rechten oberen Lungenlappen der CF-Patienten vorgeschoben. Hier wurde durch den Arbeitskanal des Bronchoskops eine mit einem PC verbundene Sauerstoffsonde vom Clark-Typ (Licox pO₂, GMS, Kiel; Länge 65 cm, Außendurchmesser 2mm, Innendurchmesser 0.4 mm) unter Sicht in einen Segmentbronchus vorgeschoben, der mit eitrigem Mukus verlegt war. Die Sonde wurde in dem Mukus plziert, und der pO₂ wurde für bis zu eine halbe Stunde kontinuierlich registriert.

Die *in vitro*-Bestimmungen des pO₂ wurden in dem dünnen Flüssigkeitsfilm (airways surface liquid, ASL) durchgeführt, welcher sich auf einer zweidimensionalen Zellkultur bildet. Mit Hilfe von Mikromanipulatoren wurden eine O₂-Mikroelektrode und eine 3M KCl Referenzelektrode (alles Diamond General Development Corp., Ann Arbor, MI, USA) in die ASL eingebracht, und der pO₂ wurde in Abständen von 50 µm bestimmt.

3.2.5. Bakterienwachstum und Alginatproduktion von *P. aeruginosa* unter aeroben und anaeroben Bedingungen

Der *P. aeruginosa*-Laborstamm PAO1 sowie 15 *P. aeruginosa*-Umweltisolate wurden in Gegenwart von steigenden Nitratkonzentrationen (10^0 bis 10^5 μM) aerob und anaerob (Anaerocult A, Merck, Darmstadt) inkubiert. Nach 4 Tagen wurde das Bakterienwachstum mit Hilfe von Verdünnungsreihen sowie die Alginatproduktion mit Hilfe des Carbazol-Assays [87] bestimmt. Parallel wurde das Wachstum von *P. aeruginosa* mit Hilfe eines Kaninchenserums gegen *P. aeruginosa*-Alginat und einem zweiten, Cy3-konjugierten Ziege anti-Kaninchen Antikörper (Dianova) immunhistochemisch dargestellt. Außerdem wurde PAO1 aerob in einem offenen Becherglas in TSB (37°C, gerührt, Startkonzentration 1×10^6 Bakterien/ml) inkubiert, und während des Wachstums der Bakterien wurde für 4 Stunden kontinuierlich der pO_2 registriert.

3.3. Experimente zur aeroben und anaeroben Genexpression der *P. aeruginosa* Alginat-Gene *in vitro*, in infizierten Mäuselungen, und im Sputum von CF-Patienten.

Hintergrund: Die dritte Studie [C] erweitert die zweite Studie [B] um die Untersuchungen zur Expression der Gene, die für den Biofilm-bildenden Phänotyp von *P. aeruginosa* verantwortlich sind. Mit dieser Studie wurde untersucht, ob der Alginat-bildende Phänotyp seine Entsprechung in einer differenziellen Regulation der Alginat-Gene findet.

3.3.1. *P. aeruginosa*-Alginat-Genexpression *in vitro*.

Zum Vergleich der aeroben mit der anaeroben Genexpression von *P. aeruginosa* wurden Affymetrix GeneChips (*P. aeruginosa* DNA microarrays, Affymetrix UK Ltd., High Wycombe, England) und LightCycler reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) verwendet. Für die GeneChip-Experimente wurde RNA von für 2 Stunden aerob inkubierten Bakterien sowie von ein bis vier Tagen anaerob aufgezogenen Pseudomonaden isoliert. Die Zellwände wurde mit Hilfe von FastRNA tubes blue und FastPrepFP120 (beides Bio101, Visat, CA, USA) aufgeschlossen. Kontaminierende DNA wurde mittels DNaseI (Ambion, Austin, TX, USA) verdaut. Die Qualitätskontrolle erfolgte spektroskopisch (Ultraspec III, Pharmacia) und elektrophoretisch (1% Agarose-Gel, FMC Bioproducts, Rockland, ME, USA).

Die aufgereinigte DNA wurde entsprechend den Herstellerangaben (Affymetrix GeneChip *P. aeruginosa* Genome Array Expression Analysis Protocol, Affymetrix UK Ltd.) weiterbearbeitet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Affymetrix Microarray Suite software (version 5.0, Affymetrix) und des Data Mining Tools (version 3.0, Affymetrix). Es wurde 3-fach Ansätze durchgeführt, Signalintensitäten unter 500 wurden als Rauschen betrachtet und nicht in die weitere Auswertung einbezogen. Der Vergleich zwischen der aeroben und der anaeroben Genexpression jedes einzelnen Gens wurde mit Hilfe des Student's t-Tests auf Signifikanz überprüft.

Mit Hilfe der LightCycler RT-PCR wurde der *P. aeruginosa*-Stamm PAO1 [85] untersucht, der aerob (Durchströmung mit gefiltertem Sauerstoff 150 mL/min) oder anaerob (Durchströmung mit gefiltertem Helium 150 mL/min) in einem Fermenter (Biostat Q-Fermenter, Braun-Biotech) inkubiert worden war. Die Zellen wurden mit Lysozym aufgeschlossen, und die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini kits (Quiagen) isoliert, und mit DNaseI (Ambion) behandelt. Für die eigentliche RT-PCR wurde der LightCycler-RNA amplification kit SYBR Green I (Roche) und primer für *algD* sowie *gyrA* verwendet.

Die biochemische Alginatbestimmung wurde unter Verwendung des Carbazol assays [87] durchgeführt. Zusätzlich wurde für die indirekte Immunfluoreszenz ein Kaninchenserum, das spezifisch mit Alginat reagiert [88], benutzt. Hierbei wurde als zweiter Antikörper Cy3-gekoppeltes Ziege anti-Kaninchen IgG (Molecular Probes) verwendet. Diese Experimente wurden sowohl mit dem Laborstamm PAO1, seiner isogenen mukoiden Variante PDO300 [89, 90], wie auch mit 25 Umweltisolaten aus Wasser oder Salat und mit 40 Patientenisolaten durchgeführt.

3.3.2. Modell der Mäuselungeninfektion

Die experimentellen Mauslungeninfektionen wurden unter Verwendung des Agar-Bead-Modells [91] durchgeführt. Hierbei werden *P. aeruginosa*-Bakterien in verflüssigten Agar eingebracht, welcher dann in steriles kaltes Öl getropft wird. Bei diesem Vorgang bilden sich kleine (ca. 10-100 μm) Agarkügelchen, welche in Lösung (0.5 mL) über einen Trachealschnitt in die Mauslung eingebracht wurden [91, 92]. Für die Experimente wurden männliche C57Bl/6 Mäuse (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA, Gewicht 24-26g) verwendet. Nach 1, 3, 7, 14 oder 28 Tagen wurde die Tiere getötet, und die Lungen wurden entnommen, in PBS homogenisiert, und zur Quantifikation auf PIA-Agar

ausgestrichen. Zur histopathologischen Analyse wurden die Lungen am Stück entfernt, in 4% Paraformaldehyd für 24 Stunden bei 4°C fixiert, und in Paraffin eingebettet. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden 5 µm starke Dünnschnitte angefertigt, und mit Hematoxylin-Eosin (HE) gefärbt.

3.4. Experimente zum Nachweis von obligat anaeroben Bakterien im Sputum von CF-Patienten

Hintergrund: In der vierten Studie [D] wird das qualitative und quantitative Vorkommen von obligat anaeroben Bakterien vor und nach Therapie von Exazerbationen sowie deren Resistenzsituation untersucht. Diese Publikation untersucht damit eine der Konsequenzen aus dem Nachweis anaerober Umweltbedingungen in der CF-Lunge, nämlich das mögliche Vorkommen von vollständig anaerob metabolisierenden Bakterien.

3.4.1. CF-Patienten

Insgesamt nahmen 45 CF-Patienten (18 männlich, 27 weiblich, Alter 6 bis 64 Jahre, Mittelwert \pm Standardabweichung $24,6 \pm 9,7$ Jahre) des Zentrums für Cystische Fibrose am Universitätsklinikum Halle-Wittenberg an der Studie teil. Alle Patienten bekamen als Erhaltungstherapie Tobramycin (2 x 300 mg/Tag per inhalationem) und/oder Colistin (2 x 80 mg/Tag per inhalationem) plus Azithromycin (1 x 250 mg/Tag per os). Zwölf Patienten litten unter akuten Exazerbationen definiert nach Fuchs [93], sie wurden zusätzlich intravenös für 2 oder 3 Wochen mit Piperacillin/Tazobactam (3 x 1 Amp/Tag), Cefprozid (3 x 2 g/Tag), Meropenem (3 x 1 g/Tag) oder Cefepim (3 x 2 g/Tag) therapiert. 114 Sputumproben wurden innerhalb von maximal einer halben Stunde nach Expektoration untersucht. Bei sieben CF-Patienten wurden Rachenabstriche entnommen. Zusätzlich wurde bei sechs Kindern (Alter $7,2 \pm 5,3$ Jahre), die unter anderen Lungenerkrankungen als CF litten, Bronchiallavagen (BAL) durchgeführt. Fünf dieser Kinder litten unter akuten Pneumonien, ein sechstes unter einer chronisch rezidivierenden Retentionspneumonie mit eitrigen Sekreten auf der Basis eines perinatalen cerebralen Insults. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Halle-Wittenberg genehmigt.

3.4.2. Quantifikation der obligaten Anaerobier

Die Quantifikation der aeroben Bakterien aus Sputum fand bei 37°C für 24 Stunden mit Hilfe von 10fach-Verdünnungsreihen und Ausstrichen auf Columbia Blutagar (Oxoid, Basingstoke,

England) statt. Die obligaten Anaerobier wurden auf Hirn-Herz-Bouillon (Heipha, Eppelheim) und Schaedler (SCS)-Agar (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) bei 37°C für bis zu sieben Tage in einer Anaerobierbank (MAKS MG500, Meintrup, Lähden-Holte) in 10fach-Verdünnungsreihen bebrütet. Die Gasmischung in der Bank bestand aus 80% Stickstoff, 10% Wasserstoff, und 10% Kohlendioxid. Je Sputumprobe wurden bis zu vier verschiedene Stämme quantifiziert.

3.4.3. Identifikation der obligaten Anaerobier

Die aeroben Stämme wurden mit Hilfe von Routinemethoden (Gramfärbung, Oxidasetest, CAT-Nachweis, Protein-Nachweis) untersucht und dann mit Hilfe der biochemischen Identifikationssysteme Vitek (BioMérieux) und Crystal (Beckton-Dickinson, Sparks, MD, USA) identifiziert. Die obligaten Anaerobier wurden für einen Tag aerob bebrütet. Alle Stämme, die aerobes Wachstum zeigten, wurden aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die Identifikation der obligaten Anaerobier erfolgte dann mit Gramfärbung, und dem biochemischen Identifikationssystem RapID Ana II (Remel, Lenexa, KS, USA) und der ERIC software (Electronic RapID Compendium Version 1.0, Remel). Taxonomie und Nomenklatur wurden entsprechend den Vorgaben der Hersteller der Identifikationssysteme verwendet.

3.4.4. Resistenzbestimmung

Die Resistenztestung wurde bei 138 obligat anaeroben Stämmen auf SCS-Agar unter Verwendung des Etest-Systems (AB Biodisk, Solna, Schweden) durchgeführt. Zur Festlegung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) wurden die amerikanischen Bestimmungen der M11-A6 guideline (CLSI, Wayne, PA, USA) benutzt. Die Antibiotika Clindamycin (MHK 2mg/L), Metronidazol (8 mg/L), Meropenem (4 mg/L), Piperacillin-Tazobactam (32 mg/L) und Ceftazidim (≥ 8 mg/L) wurden untersucht. Die Bestimmung der MHK fand nach 48 Stunden anaerober Inkubation entsprechend den Herstellervorgaben statt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Bildung und enzymatische Verstoffwechslung von Sauerstoffradikalen in der Lunge von CF-Patienten

Die Messung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) im Atemkondensat von CF-Patienten erbrachte ein überraschendes Ergebnis: die H_2O_2 -Werte der 63 untersuchten CF-Patienten mit mässiger bis schwerer Reduktion der Lungenfunktion lagen mit $0.97 \pm 0.69 \mu\text{M}$ (**Abb. 5**) im gleichen Bereich wie die Werte der 51 Teilnehmer aus einer gesunden Kontrollgruppe ohne Lungenentzündung ($1.11 \pm 0.78 \mu\text{M}$, **Abb. 5**). Dagegen zeigte sich bei den 23 Patienten mit Asthma bronchiale mit $1.93 \pm 1.44 \mu\text{M}$ ein signifikant ($p=0.009$) erhöhter Wert im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (**Abb. 5**). Dies stellte die Bestätigung einer Studie dar, in der bei Asthmapatienten erhöhte H_2O_2 -Werte im Atemkondensat gemessen worden waren [94].

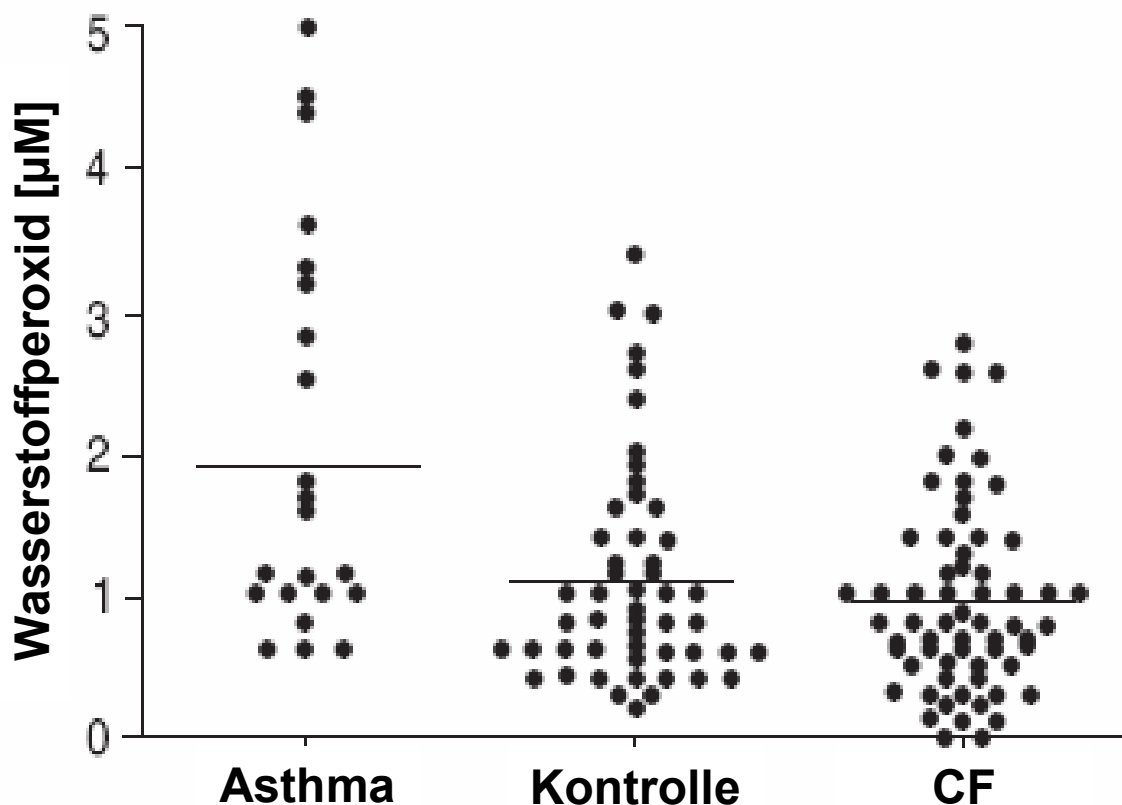


Abb. 5: Wasserstoffperoxid in Atemkondensaten von 23 Patienten mit Asthma bronchiale, 51 gesunden Kontrollpersonen, und 63 CF-Patienten. Die horizontalen Linien entsprechen den Mittelwerten.

Zur Beantwortung der Frage, ob im Atemkondensat auch wirklich H₂O₂ gemessen worden war, wurde eine Reihe von Kondensaten mit CAT versetzt, was die Fluoreszenz auf $12.4 \pm 3.7\%$ der ursprünglichen Intensität verringerte. Die vorherige Zugabe eines Antikörpers gegen CAT bewirkte einen Anstieg der Intensität auf $87.7 \pm 7.1\%$ der ursprünglichen Intensität. Mit diesen Experimenten konnte demonstriert werden, dass bei den Messungen wirklich H₂O₂ bestimmt worden war.

Die extrazelluläre Konzentration der neutrophilen Elastase, einem Marker für die Aktivierung von Neutrophilen, lag in den Sputumüberständen der 38 CF-Patienten, welche Sputum aushusten konnten, bei $2.63 \pm 1.53 \mu\text{M}$ (**Abb. 6a**). Damit konnte deutlich die starke Entzündung in der Lunge dieser Patienten aufgezeigt werden. Selbst im Plasma von 41 CF-Patienten war die neutrophile Elastase mit $5.43 \pm 5.77 \text{ nM}$ signifikant ($p < 0.0001$) höher als im Plasma von 10 gesunden Kontrollpersonen ($1.33 \pm 0.53 \text{ nM}$, **Abb. 6a**).

Im Sputum von 38 CF-Patienten waren MPO ($5.93 \pm 4.80 \mu\text{M}$, **Abb. 6b**) und CAT ($0.31 \pm 0.18 \mu\text{M}$, **Abb. 6c**) nachweisbar. Dies legt die Vermutung nahe, dass die niedrigen Werte für H₂O₂ im Atemkondensat der CF-Patienten dadurch verursacht sind, dass diese Substanz durch die beiden Enzyme metabolisiert wird. Für beide Enzyme lagen hohe Korrelationskoeffizienten zwischen den Konzentrationen und den Aktivitäten vor (CAT: $105 \pm 69 \text{ U}$, $r^2=0.7354$; MPO: $87.8 \pm 75 \text{ U}$, $r^2=0.5278$). In Bezug auf die Konzentrationen und Aktivitäten von H₂O₂, neutrophile Elastase, MPO und CAT wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt zwischen Patienten, die stationär aufgenommen waren und eine Antibiotika-Therapie bekamen, sowie klinisch stabilen ambulanten Patienten. Desgleichen fand sich auch keine Korrelation zwischen der Schwere der Erkrankung und dem Infektionsstatus der Patienten (z.B. Patienten mit oder ohne *P. aeruginosa*-Lungeninfektion) und den gemessenen Entzündungsparametern.

Die CAT-Aktivitäten in den CF-Sputen legten die Annahme nahe, dass H₂O₂ im CF-Sputum eher durch CAT detoxifiziert wird, als dass es zu einer MPO-vermittelten Toxifikation kommt. Tatsächlich ergab die Zugabe von H₂O₂ zu CHO-Zellen, die mit CF-Sputum vorbehandelt worden waren, keine sichtbare Zytotoxizität (**Abb. 7**), obwohl die Konzentrationen von MPO in den verdünnten Sputen ungefähr 10fach höher waren, als die

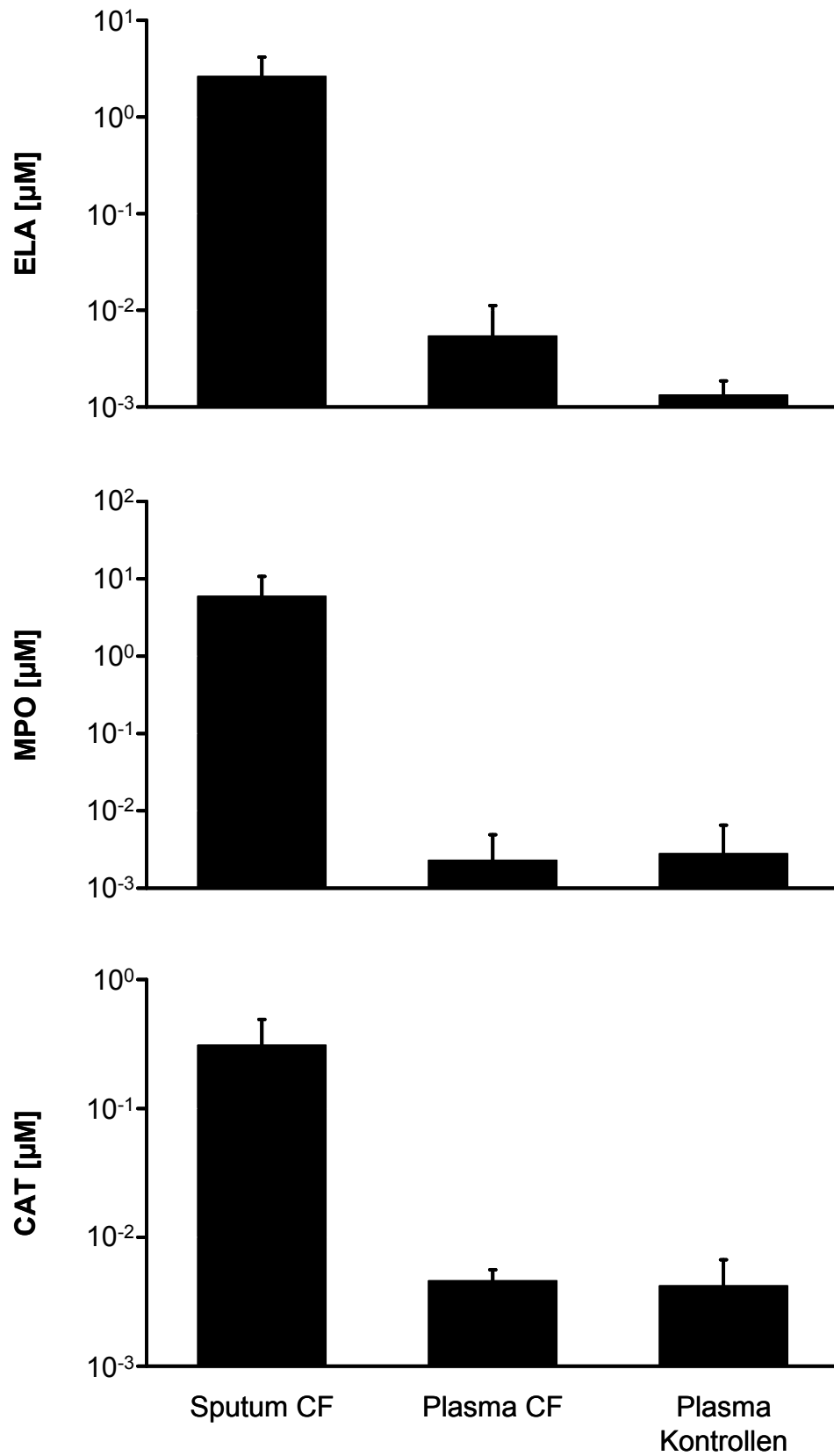


Abb. 6: Sputum- und Plasmakonzentrationen von neutrophiler Elastase (ELA, a), Myeloperoxidase (MPO, b) und Katalase (CAT, c). Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt.

Konzentration (66 μM MPO mit 300 μM H_2O_2), bei der *in vitro* Zytotoxizität erreicht werden konnte (Abb. 7). Dies deckt sich mit der Einschätzung, dass CAT einen wichtigen Radikalfänger für das System MPO/ H_2O_2 darstellt.

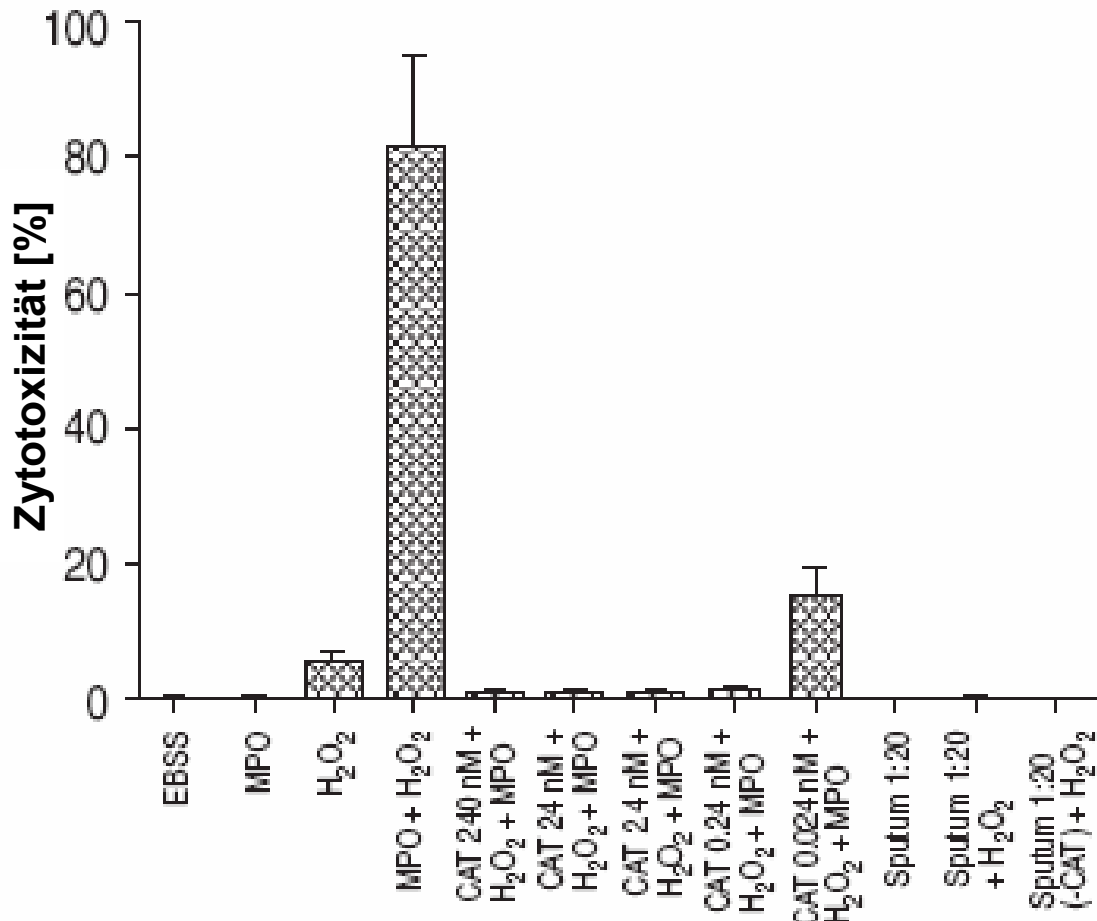


Abb. 7: Einfluss von Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Myeloperoxidase (MPO) und CF-Sputumüberständen auf Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters (CHO). CHO-Zellen wurden mit EBSS-Puffer oder verschiedenen Konzentrationen von gereinigter MPO oder H_2O_2 für 5 Stunden inkubiert. Zudem wurden CHO-Zellen mit unterschiedlichen MPO-Konzentrationen oder verdünnten Sputumüberständen für eine Stunde vorinkubiert, bevor H_2O_2 für zusätzliche 4 Stunden hinzugegeben wurde. Katalase (CAT) wurde vorher durch Immunabsorption aus Sputumüberständen von 9 CF-Patienten entfernt.

Im Gegensatz zu den CHO-Zellen waren die HNE-Vesikel wesentlich resistenter gegen die Einwirkung von MPO/H₂O₂. Es konnte selbst bei Applikation von 33 nM MPO/ 150 µM H₂O₂ kein zytotoxischer Effekt erzielt werden. Deshalb wurde die 10fache Konzentration (330 nM MPO/ 1.500 µM H₂O₂) verwendet, die dann zu einer kompletten Inhibition der Zilientätigkeit führte. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen führte die alleinige Inkubation mit CF-Sputumüberständen zu keiner Beeinträchtigung der HNE-Vesikel.

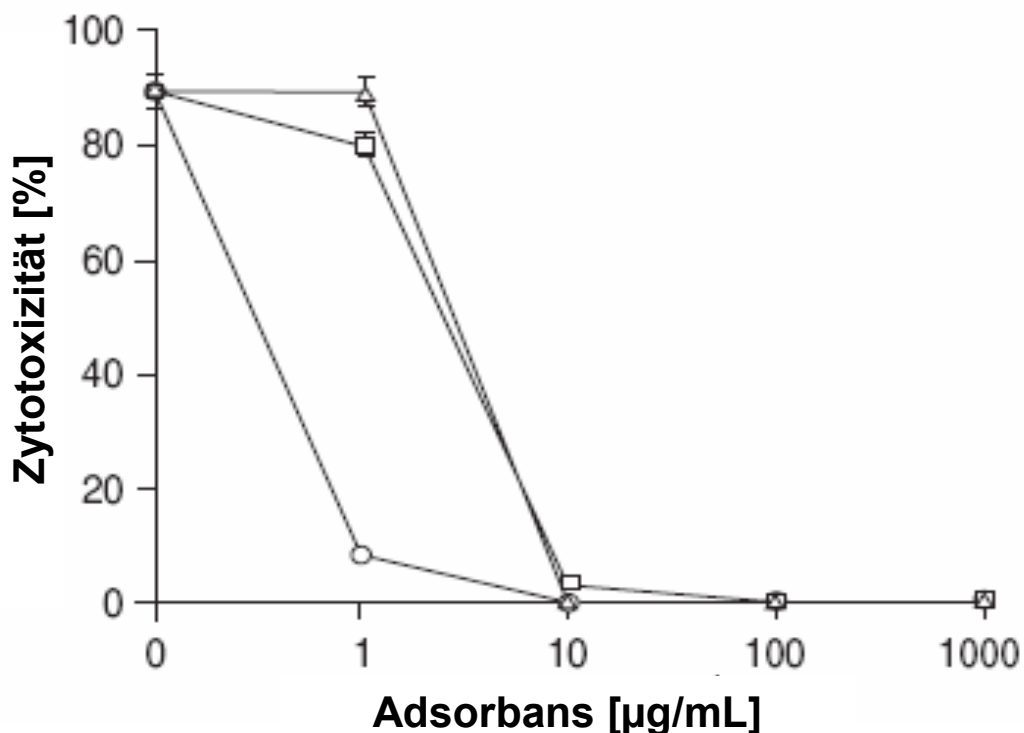


Abb. 8: Zytotoxizität von Myeloperoxidase (MPO) im Chinese Hamster Ovarial (CHO)-Zellmodell. Gereinigte MPO wurde mit DNA aus Heringssperma (Δ), Chondroitinsulfat (□), oder Heparansulfat (O) vorinkubiert. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung von Doppelbestimmungen aus sieben unabhängigen Ansätzen dargestellt.

Zur Untersuchung der Frage, ob CF-Sputum weitere Radikalfänger enthält, wurde die CAT mittels Affinitätschromatographie aus dem CF-Sputum entfernt. Aktivitätsbestimmungen ergaben, dass die CAT vollständig (< 1 IU) aus dem Sputum entnommen worden war. Erstaunlicherweise bewirkte die Entfernung der CAT weder Zytotoxizität im CHO-Zellmodell (**Abb. 7**), noch wurde die Zilientätigkeit von HNE-Vesikeln beeinträchtigt. Dies lag nicht an einem Fortfall der MPO-Aktivität: obwohl diese auf Grund von unspezifischer Adsorption während der Affinitätschromatographie auf ungefähr ein Drittel des

Ausgangswertes reduziert worden war, war die MPO-Aktivität im CF-Sputum immer noch weit höher als die in den Kontrollexperimenten mit gereinigten Reagentien. Auch eine Hitzeinaktivierung des Sputums ergab keine vermehrte Zytotoxizität nach Zugabe von gereinigter MPO/ H₂O₂ zu CF-Sputumüberständen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die im CF-Sputum vorhandene aktive MPO daran gehindert wird, die Oberfläche der CHO-Zellen zu erreichen. Dies kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass die MPO als stark kationisches Molekül an negativ geladene Substanzen im CF-Sputum gebunden wird.

Vor diesem Hintergrund wurde gereinigte MPO zusammen mit den negativ geladenen Substanzen Heparansulfat, Chondroitinsulfat, und DNA aus Heringssperma inkubiert. Tatsächlich verhinderte diese Inkubation dosisabhängig den zytotoxischen Effekt von MPO/ H₂O₂ (**Abb. 8**). Auch hitzeinaktivierte Sputumüberstände von sieben CF-Patienten, die mit MPO und H₂O₂ versetzt worden waren, zeigten keinen zytotoxischen Einfluss auf CHO-Zellen.

Auch wenn die MPO im CF-Sputum nicht mehr zytotoxisch ist, könnte sie dennoch das Methionin an Position 358 (Met³⁵⁸) im aktiven Zentrum des Serinproteinase-Inhibitors α_1 -PI oxidieren, und damit die inhibitorische Kapazität des α_1 -Proteinase-Inhibitors (α_1 -PI) gegen die neutrophile Elastase inaktivieren. Allerdings wurde diese inhibitorische Kapazität von α_1 -PI gegen die neutrophile Elastase nicht beeinträchtigt, nachdem α_1 -PI zusammen mit sieben Sputumüberständen mit nachgewiesener Elastase- und MPO-Aktivität sowie mit H₂O₂ inkubiert worden war. Auch nach Affinitätschromatographie zur Entfernung von CAT aus den Sputen (zum Ausschluss einer Detoxifikation von H₂O₂ durch die CAT) kam es zu unveränderten Versuchsergebnissen.

Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis wurde durch weitere Experimente mit aufgereinigten Enzymen anstelle des CF-Sputums erreicht. Während erwartungsgemäß die Vorinkubation von gereinigtem α_1 -PI mit MPO/ H₂O₂ vor Zugabe von Elastase die durch α_1 -PI vermittelte Inhibition der Elastase vollständig inaktivierte, resultierte die sofortige Zugabe von Elastase zu dem Ansatz mit α_1 -PI/ MPO/ H₂O₂ in einer kompletten Restaurierung der inhibitorischen Kapazität des α_1 -PI gegen die neutrophile Elastase. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die durch MPO induzierte Oxidation des Met³⁵⁸ und damit die Inaktivierung des α_1 -PI langsamer abläuft als die Bildung des Komplexes zwischen α_1 -PI und Elastase, und

dass die durch MPO induzierte Oxidation (und damit Inaktivierung) des α_1 -PI verhindert wird, wenn vorher Komplexe gebildet worden sind.

Zusammengenommen besagen diese Ergebnisse, dass bei der chronischen Lungenerkrankung von CF-Patienten offensichtlich Sauerstoffradikale und reaktive Sauerstoffverbindungen eine geringere Rolle spielen als bei akuten Lungenerkrankungen. Dies zeigt sich zum einen an einer geringeren Konzentration von H_2O_2 im Atemkondensat der CF-Patienten, zum anderen in einer Reduktion der durch MPO/ H_2O_2 -vermittelten Zytotoxizität des CF-Sputums.

4.2. Sauerstoffmessung in der Lunge von CF-Patienten und *in vitro*, Lokalisation von *P. aeruginosa* in der CF-Lunge, und Produktion von Alginat durch *P. aeruginosa*.

Auf Grund der in [A] erzielten Ergebnisse, bei denen sich zeigte, dass bei der CF-Lungenentzündung Sauerstoffradikale eine weit geringere Rolle spielten als erwartet, wurde in dieser Studie [B] untersucht, ob ein reduzierter Sauerstoffpartialdruck ursächlich für dieses Ergebnis ist. Zu diesem Zweck wurde eine O_2 -Elektrode durch den Arbeitskanal eines Bronchoskops direkt in den rechten oberen Lungenlappen von chronisch infizierten CF-Patienten eingebracht (**Abb. 9a**). Im Lumen der Atemwege betrug der pO_2 ca. 180 mmHg, was sich durch den während der Bronchoskopie nasal applizierten Sauerstoff erklärt. Nach Platzierung der Sauerstoffsonde in einem Mukuspfropfen in einem Lobärbronchus im rechten oberen Lungenlappen fiel der pO_2 schnell auf einen Mittelwert von 2.5 mmHg ab (**Abb. 9b**).

Zur Untersuchung der Frage, ob unterschiedliche Zellen unterschiedlich viel Sauerstoff verbrauchen, wurde ein planares Zellkultursystem aus primären humanen zilierten Bronchialepithelzellen benutzt, und der pO_2 wurde in der ASL auf diesem Modell bestimmt (**Abb. 9c-f**). Die ASL war frei von Bakterien und von Neutrophilen, so dass ein Sauerstoffverbrauch durch diese Zellen ausgeschlossen werden konnte.

Humanes Bronchialepithel von Gesunden bewirkte einen messbaren Sauerstoffgradienten über dem Epithel (**Abb. 9c**), der auf den Sauerstoffverbrauch der Zellen zurückzuführen war. Allerdings war der Gradient über Bronchialepithel von CF-Patienten signifikant steiler (**Abb. 9c**), was einen vermehrten Sauerstoffverbrauch durch CF-Zellen bedeutet. Bei Reduktion der Temperatur auf $4^\circ C$ wurden Stoffwechsel und Sauerstoffverbrauch der Zellen stark

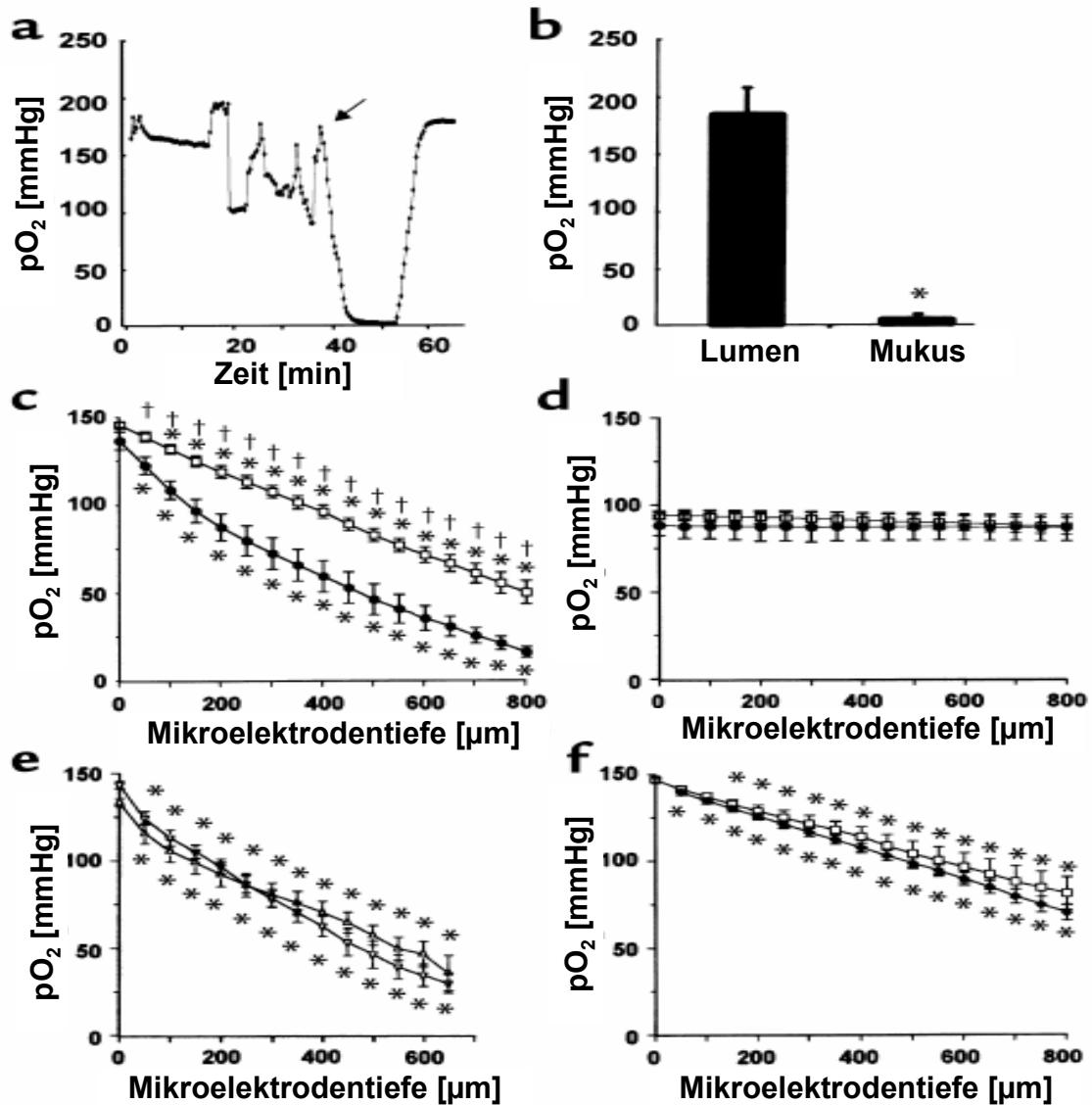


Abb. 9: Sauerstoffpartialdruck (pO_2) in den Atemwegen von CF-Patienten *in vivo* und im Flüssigkeitsfilm (airways surface liquid, ASL) auf Kulturen von menschlichem Atemwegsepithel. (a) pO_2 in CF-Atemwegen. Während der ersten 30 Minuten ist eine Messung im Lumen der Atemwege dargestellt. Der Pfeil bezeichnet die Einführung der Sauerstoffsonde in einen Mukuspfropfen. Nach Entfernen der Sonde aus dem Mukus steigt der pO_2 wieder auf Normalwerte an. (b) pO_2 im Lumen der CF-Atemwege und im Mukus in der CF-Lunge *in vivo* ($n = 3$ CF-Patienten, $*p < 0.001$). (c) pO_2 -Gradienten in der ASL auf Kulturen von Gesunden (Quadrate; $n = 8$ Kulturen/5 Personen) und von CF-Patienten (Kreise; $n = 6$ Kulturen/4 Personen). (d) pO_2 -Gradienten in der ASL gemessen bei 4°C auf Kulturen von Gesunden (Quadrate; $n = 5$ Kulturen/3 Personen) und von CF-Patienten (Kreise; $n = 5$ Kulturen/3 Personen). (e) pO_2 -Gradienten in CF-Mukus (umgekehrte Dreiecke). Nochmalige Messung des pO_2 nach Zugabe von 30 μl PBS (Dreiecke; 6 Kulturen/3 Personen). (f) Vergleich der pO_2 -Gradienten in der ASL von Kulturen von Gesunden (Quadrate; 9 Kulturen/5 Personen) und Patienten mit Primärer Ciliärer Dyskinesie (PCD) (Rauten; 5 Kulturen/2 Personen). Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. * signifikanter Unterschied ($p < 0.05$) zum pO_2 an der ASL-Luft-Grenze. † signifikanter Unterschied ($p < 0.05$) zwischen Gesunden und CF-Patienten.

heruntergefahren, was sich in einem aufgehobenen Sauerstoffgradienten über dem Epithel von Gesunden und CF-Patienten äußerte (**Abb. 9d**).

Zur Untersuchung der Frage, ob die Zilientätigkeit und die Muzinkonzentration auf den Sauerstoffverbrauch einwirken, wurde der O₂-Gradient über CF-Bronchialepithelzellen mit und ohne Zilientätigkeit bestimmt (**Abb. 9e**). Es zeigte sich, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den O₂-Gradienten über Zellkulturen mit Zilienschlag gegenüber Gewebe ohne Zilientätigkeit bestand, was darauf hinweist, dass der Vermischungseffekt durch die Zilien keinen wesentlichen Einfluss auf den Sauerstoffverbrauch besitzt.

Im Weiteren sollte geklärt werden, ob der vermehrte Sauerstoffverbrauch spezifisch für CF-Epithelzellen ist. Deswegen wurden zu Vergleichszwecken Epithelzellen von Patienten mit Primärer Ciliärer Dyskinesie (PCD) untersucht. Bei diesen Patienten ist durch einen Gendefekt die Zilienmotilität gestört, und die Patienten leiden unter chronischen Lungeninfektionen [95]. Die O₂-Gradienten in der ASL über den PCD-Zellen zeigten keinen Unterschied zu den Gradienten über Zellen von Gesunden, wohl aber zu den CF-Zellen (**Abb. 9f, 9c**). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass der steile O₂-Gradient über den Epithelzellen von CF-Patienten einzigartig für diese Erkrankung ist.

Die Lokalisation von *P. aeruginosa* innerhalb der Atemwege von CF-Patienten ist von erheblicher Bedeutung für die Frage, wie diese Bakterien ihre Pathogenität vermitteln können. *P. aeruginosa*-Bakterien lagen innerhalb des Mukus in den Atemwegen von CF-Patienten als Mikrokolonien vor (**Abb. 10a**). Diese Mikrokolonien erreichen eine Größe von 100 µm oder mehr, und sind teilweise mit bloßem Auge sichtbar. Die immunhistochemische Färbung mit einem Kaninchen-Antiserum gegen *P. aeruginosa* zeigte auch in stärkerer Vergrößerung, dass die Bakterien in Mikrokolonien zusammengelagert sind (**Abb. 10b**). Von erheblicher Bedeutung ist dabei, dass sich die Bakterien überwiegend mehr als 5 µm vom Bronchialepithel entfernt befanden (**Abb. 10a, 10c**). Mit Hilfe von Raster-elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Sphäroiden aus primären menschlichen Epithelzellen (**Abb. 10d, 10f**) wurde demonstriert, dass *P. aeruginosa* an den von den Sphäroiden sezernierten Mukus adhärert (**Abb. 10d**). Wurde der Mukus durch Waschen entfernt, adhärten die Bakterien nicht mehr an die Sphäroide (**Abb. 10f**). Die Bindung von *P. aeruginosa* an Muzine wurde auch immunhistochemisch mit Hilfe eines anti-Muzin-Antikörpers demonstriert (**Abb. 10e**). Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass

sich die Pseudomonaden in der Lunge von CF-Patienten überwiegend in Form von Mikrokolonien im Sputum innerhalb der Atemwege befinden, dabei an Muzine binden, und nicht direkt an das Bronchialepithel adhäreren.

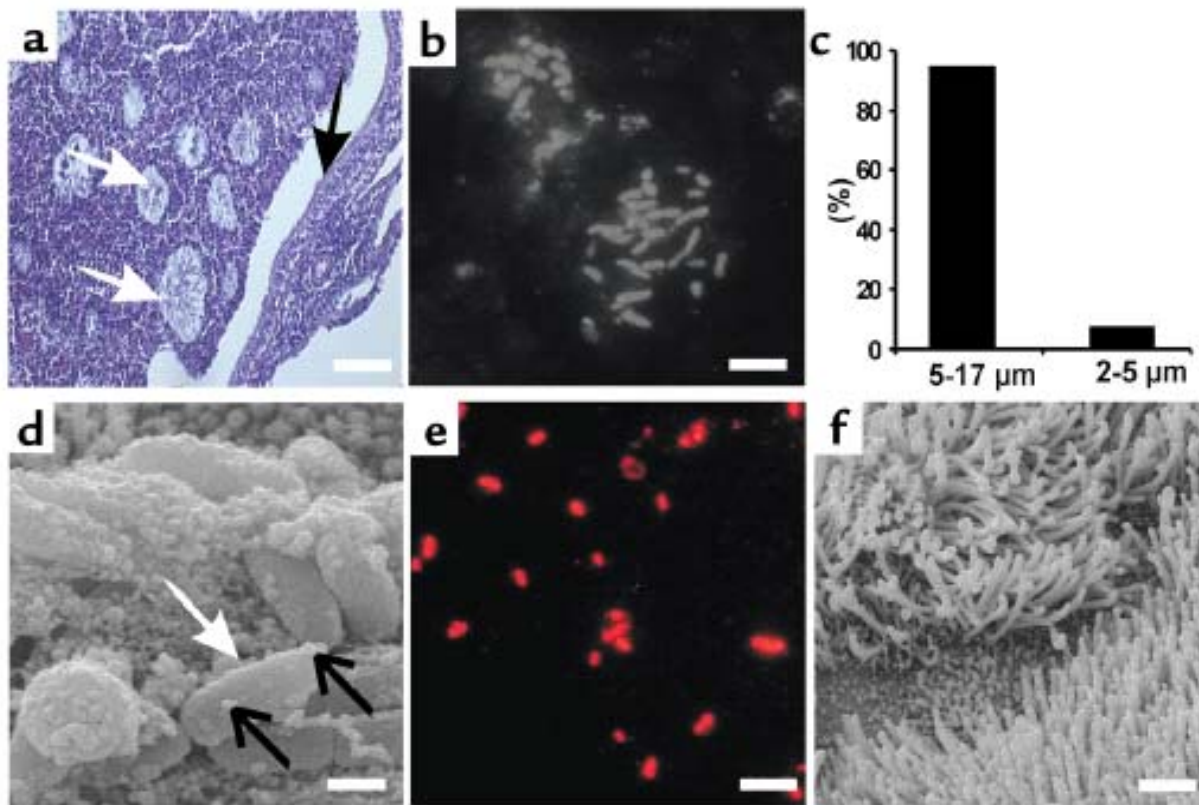


Abb. 10: Lokalisation von *P. aeruginosa* in den CF-Atemwegen. (a) Dünnschnitt eines mit einem Sputumpfropfen verschlossenen CF-Bronchus. Man beachte die Abwesenheit von *P. aeruginosa* auf dem Epithel (schwarzer Pfeil) sowie die *P. aeruginosa*-Mikrokolonien innerhalb des Sputums (weisse Pfeile). Balken 100 μm. (b) *P. aeruginosa* innerhalb einer Mikrokolonie aus einem Lungenschnitt, gefärbt mit einem Kaninchen-Antikörper gegen *P. aeruginosa*. Balken: 10 μm. (c) Prozentzahl der Bakterien, die entweder 2-5 μm oder 5-17 μm von der Oberfläche des Lungenepithels von 9 CF-Patienten nachgewiesen werden konnten. (d) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines mit Mukus bedeckten Vesikels aus CF-Atemwegsepithel. *P. aeruginosa* (weisser Pfeil) ist nach 2 Stunden Inkubation mit Mukus (schwarze Pfeile) bedeckt. Balken: 0.6 μm. (e) Immunfluoreszenzfärbung von Muzinen, die *in vitro* an *P. aeruginosa* Stamm PAO1 gebunden haben. Balken: 4 μm. (f) Zellvesikel nach Abwaschen des Mukus und nach 2 Stunden Inkubation mit *P. aeruginosa*. Man beachte die Abwesenheit von Bakterien auf der Oberfläche des zilierten Epithels. Balken: 2.5 μm.

P. aeruginosa ist ein aerob metabolisierendes Bakterium, das auch unter anaeroben Bedingungen wachsen kann, wenn eine ausreichende Menge an terminalen Elektronenakzeptoren vorhanden sind [96-98]. Als derartige Elektronenakzeptoren können Nitrat [99, 100], Arginin [101] oder Pyruvat [102] dienen.

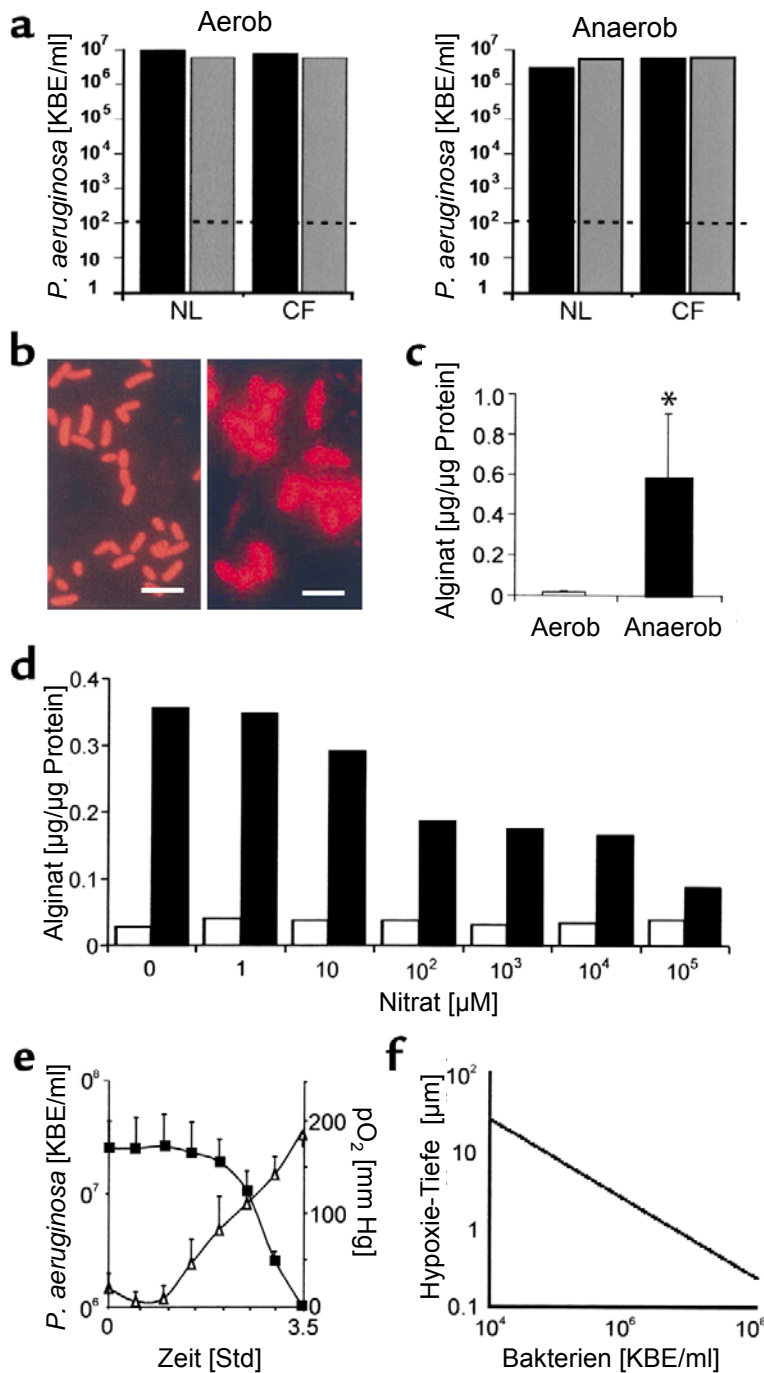


Abb. 11: Wachstum und Alginatproduktion von *P. aeruginosa* unter aeroben und anaeroben Bedingungen. **(a)** Wachstum von *P. aeruginosa* in ASL von CF-Patienten und Gesunden (NL) unter aeroben und anaeroben Bedingungen. Die Zellzahl wurde nach 72 Stunden bestimmt. **(b)** Immunfluoreszenz-Nachweis der Alginatproduktion von *P. aeruginosa* nach aerobem (links) und anaerobem (rechts) Wachstum. Balken: 10 μm . **(c)** Biochemische Bestimmung der Alginatproduktion von *P. aeruginosa* Stamm PAO1 nach aerobem (weiss) und anaerobem (schwarz) Wachstum. * $p < 0.05$. **(d)** Alginatproduktion pro μg bakterielles Protein in Abhängigkeit von beigefügtem Nitrat unter aeroben (weiss) und anaeroben (schwarz) Wachstumsbedingungen. **(e)** $p\text{O}_2$ (schwarze Quadrate) in Abhängigkeit vom Wachstum von *P. aeruginosa* (weisse Dreiecke) über 3,5 Stunden. **(f)** Mathematische Berechnung der Tiefe, in der der $p\text{O}_2$ auf Null abfällt, in einem simulierten Mukus in Abhängigkeit von der Konzentration von *P. aeruginosa*-Bakterien.

Vor diesem Hintergrund wurden Versuche zum Wachstum von *P. aeruginosa* in ASL von CF-Patienten und Gesunden unter aeroben sowie anaeroben Wachstumsbedingungen durchgeführt. Es zeigte sich, dass *P. aeruginosa* aerob wie auch anaerob gleich gut wächst (**Abb. 11a**). Als nächste Frage wurde untersucht, wie *P. aeruginosa* phänotypisch auf anaerobe Wachstumsbedingungen reagiert. Zu diesem Zweck wurde der Stamm PAO1 aerob und anaerob auf einem reichen Medium mit Nitrat angezüchtet, und die Bildung des Exopolysaccharids Alginat wurde immunhistochemisch (**Abb. 11b**) wie auch biochemisch (**Abb. 11c**) bestimmt. In der Immunfluoreszenz zeigte sich mikroskopisch eine starke Zunahme der Alginatbildung wie auch eine beginnende Bildung von Mikrokolonien (**Abb. 11b**). Biochemisch konnte eine ca. 20-fache Zunahme der Alginatproduktion unter anaeroben Bedingungen demonstriert werden (**Abb. 11c**). Dieses Ergebnis konnte auch mit 15 nonmukoiden Umweltisolaten von *P. aeruginosa* reproduziert werden: die mittlere Alginatproduktion betrug aerob 0.022 ± 0.004 µg Alginat pro µg Bakterienprotein, während dieser Wert anaerob auf 0.191 ± 0.037 µg Alginat anstieg (nicht abgebildet). Ein Mangel an Nitrat dient offenbar als zusätzlicher Stressfaktor für die Bakterien, da sich bei den niedrigsten Nitratkonzentrationen die höchste Alginatproduktion zeigt (**Abb. 11d**). Schließlich wurde die Frage untersucht, ob Bakterien zum starken Sauerstoffabfall im Mukus der CF-Patienten (**Abb. 9a, b**) beitragen. *P. aeruginosa* wuchs unter kontinuierlichem Rühren bei 37°C in einem offenen Becherglas, während der pO₂ kontinuierlich gemessen wurde. Bei einer Zellzahl von ca. 5×10^7 Bakterien/ml wurde trotz kontinuierlicher Zufuhr der gesamte Sauerstoff verbraucht, der pO₂ fiel auf Null ab (**Abb. 11e**). Bei einer mathematischen Simulation zeigte sich, dass bei hohen Bakterienzahlen von 10^6 Bakterien/ml der pO₂ bereits in geringer Tiefe (<10 µm) von der Oberfläche Nullwerte erreicht (**Abb. 11f**).

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse der Studie [B], dass der pO₂ im Mukus in den Atemwegen der CF-Patienten extrem niedrig ist (**Abb. 9a, b**), dass *P. aeruginosa* in den Atemwegen der CF-Patienten in Form von Mikrokolonien vorliegt (**Abb. 10 a, b**), nicht an das Epithel der Atemwege, sondern an Muzine im Sputum adhärirt (**Abb. 10 c, d, f**), als Antwort auf Anaerobiosis grosse Mengen von Alginat produziert (**Abb. 11b, c**), und durch Sauerstoffverbrauch selbst zum Aufrechterhalten der anaeroben Verhältnisse beiträgt (**Abb. 11e, f**).

4.3. Aerobe und anaerobe Genexpression der *P. aeruginosa* Alginat-Gene *in vitro*, in infizierten Mäuselungen, und im Sputum von CF-Patienten.

Basierend auf den Ergebnissen der Studie [B], in der der Biofilm-bildende Phänotyp von *P. aeruginosa* in der CF-Lunge aufgezeigt wurde, wurde in der Studie [C] die Genexpression der Alginat-Gene von *P. aeruginosa* untersucht, um herauszufinden, ob der Alginat-bildende Phänotyp seine Entsprechung in einer differenziellen Regulation der Alginat-Gene findet.

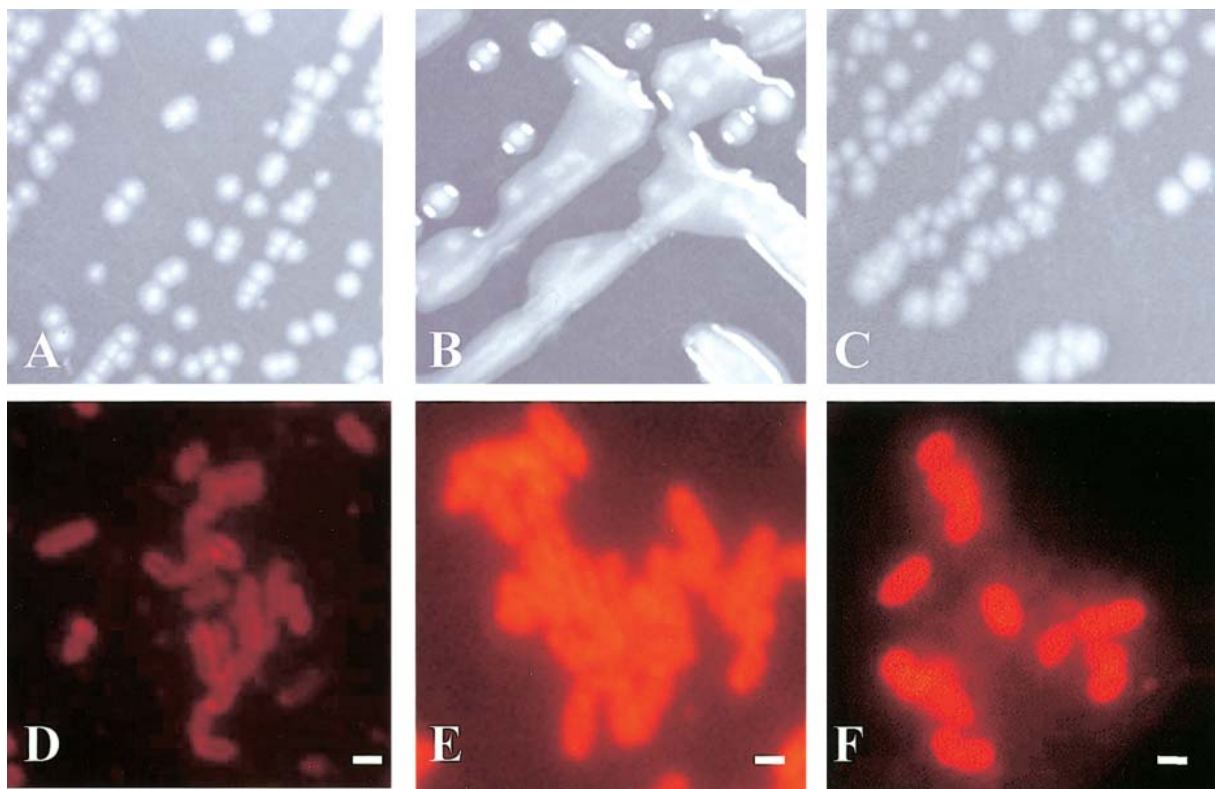


Abb. 12: Anaerobe Alginat-Produktion von *P. aeruginosa*. Der Laborstamm PAO1 zeigt einen non-mukoiden Phänotyp sowohl bei aerober (A) wie auch anaerober (C) Inkubation. Die isogene Alginat-überexprimierende Variante PDO 300 wächst immer mukoid (B). Die Alginat-Bildung dagegen wird bei PAO1 anaerob (F) im Vergleich zu aerob (D) stark hochregelt, während sie bei PDO300 konstitutiv hochregelt ist (E).

Zur Untersuchung der *P. aeruginosa*-Alginat-Genexpression *in vitro* wurden der *P. aeruginosa*-Laborstamm PAO1 und seine isogene, Alginat-überexprimierende Variante PDO300 verwendet. Im Vergleich zeigte sich, dass PAO1 aerob (Abb. 12a) wie auch anaerob (Abb. 12c) keinen mukoiden Phänotyp aufwies, während PDO300 immer mukoid wuchs (Abb. 12b). Mit Hilfe eines Antikörpers gegen Alginat konnte aber demonstriert werden, dass

PAO1 anaerob (**Abb. 12 f**) erheblich mehr Alginate bildet als aerob (**Abb. 12d**), während die Alginateproduktion von PDO300 konstitutiv bleibt (**Abb. 12e**).

Bei Vergleich der anaeroben mit der aeroben Genexpression mit Hilfe von Affymetrix GeneChips zeigte sich, dass nach 1-4 Tagen anaerober Inkubation die Expression des positiven Alginate-Regulators *algU* um ca. das 10-fache im Vergleich zur aeroben Genexpression hochreguliert war (**Abb. 13**). Auch die Transkription der *algR* und *algD* Gene war erhöht. Auch die Gene des *mucABCD* Genclusters, deren Genprodukte die Aktivität des Sigmafaktors AlgU inhibieren [59], waren hochreguliert, was sich am ehesten als Ausgleich der Aufregung der *algR* und *algU* Gene erklären lässt. Die vermehrte Transkription des *napEFDABC* und des *arcDABC* Genclusters zeigt den erhöhten Umsatz von Nitrat und Arginin unter anaeroben Bedingungen an, während das "housekeeping gene" *gyrA* unverändert abgelesen wird (**Abb. 13**).

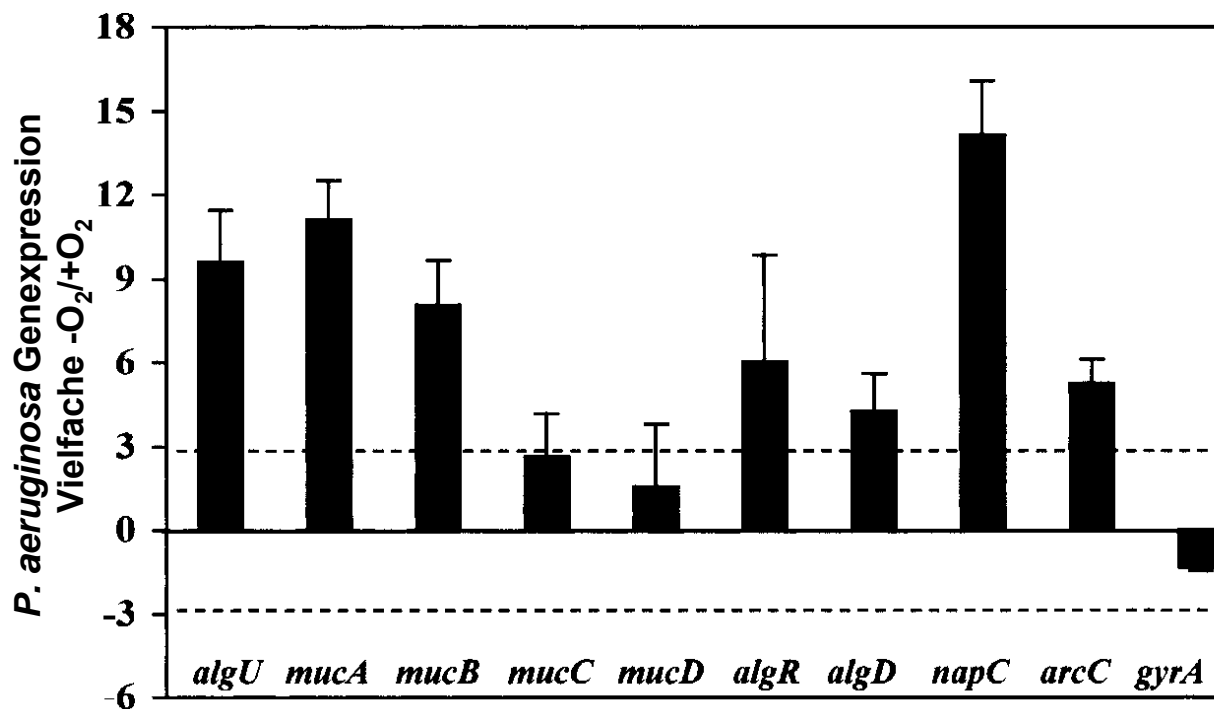


Abb. 13: Vermehrte Expression der *P. aeruginosa* Alginate-Gene nach 1-4 Tagen anaerober Inkubation. *napC* und *arcC* Gene stellen Positivkontrollen für Anaerobiosis dar. *gyrA* ist ein konstitutiv transkribiertes Gen von *P. aeruginosa*. Die gestrichelten Linien bilden den Grenzbereich für eine differentielle Regulation zwischen anaerober (-O₂) und aerober (+O₂) Genexpression.

Die Ergebnisse der GeneChip-Versuche wurden durch weitere Experimente bestätigt, in denen der Stamm PAO1 in einem Fermenter unter aeroben und anaeroben Bedingungen inkubiert, und die Expression des Sigmafaktors *algD* nach 4 und 8 Stunden anaerober Bebrütung mittels RT-PCR quantifiziert wurde. Während nach 4 Stunden noch keine differentielle Genexpression zu messen war, wurde nach 8 Stunden eine vierfach erhöhte *algD*-Expression bei anaerober im Vergleich zu aerober Inkubation gezeigt (**Abb. 14**). Damit konnte mit zwei unabhängigen Methoden eine deutlich verstärkte Transkription des Sigmafaktors *algD* unter anaeroben Wachstumsbedingungen demonstriert werden.

In weiteren Experimenten wurde die Genexpression der *P. aeruginosa*-Alginatgene im Modell der Mauslungeninfektion [91] untersucht. Bei diesem Infektionsmodell werden Bakterien in winzige Agar-Kügelchen eingegossen, welche dann in Suspension durch einen Katheter in die Mauslunge eingebracht werden. In Vorversuchen wurde *Bacteroides fragilis* als obligat anaerobes Bakterium in Agar-Kügelchen eingebracht, und dann *in vitro* für 24 Stunden aerob und anaerob bebrütet. Es zeigte sich kein Unterschied in der Keimzahl nach Bebrütung der Kügelchen (aerob vs anaerob: $0.9 \pm 0.7 \times 10^9$ KBE/ml vs $1.3 \pm 0.9 \times 10^9$ KBE/ml, $p=0.455$), während planktonische *B. fragilis*-Bakterien bei aerober Bebrütung natürlich abstarben. Diese Vorversuche beweisen, dass innerhalb der Agar-Kügelchen anaerobe Verhältnisse herrschen, wie sie auch im Mukus innerhalb der CF-Lunge vorliegen.

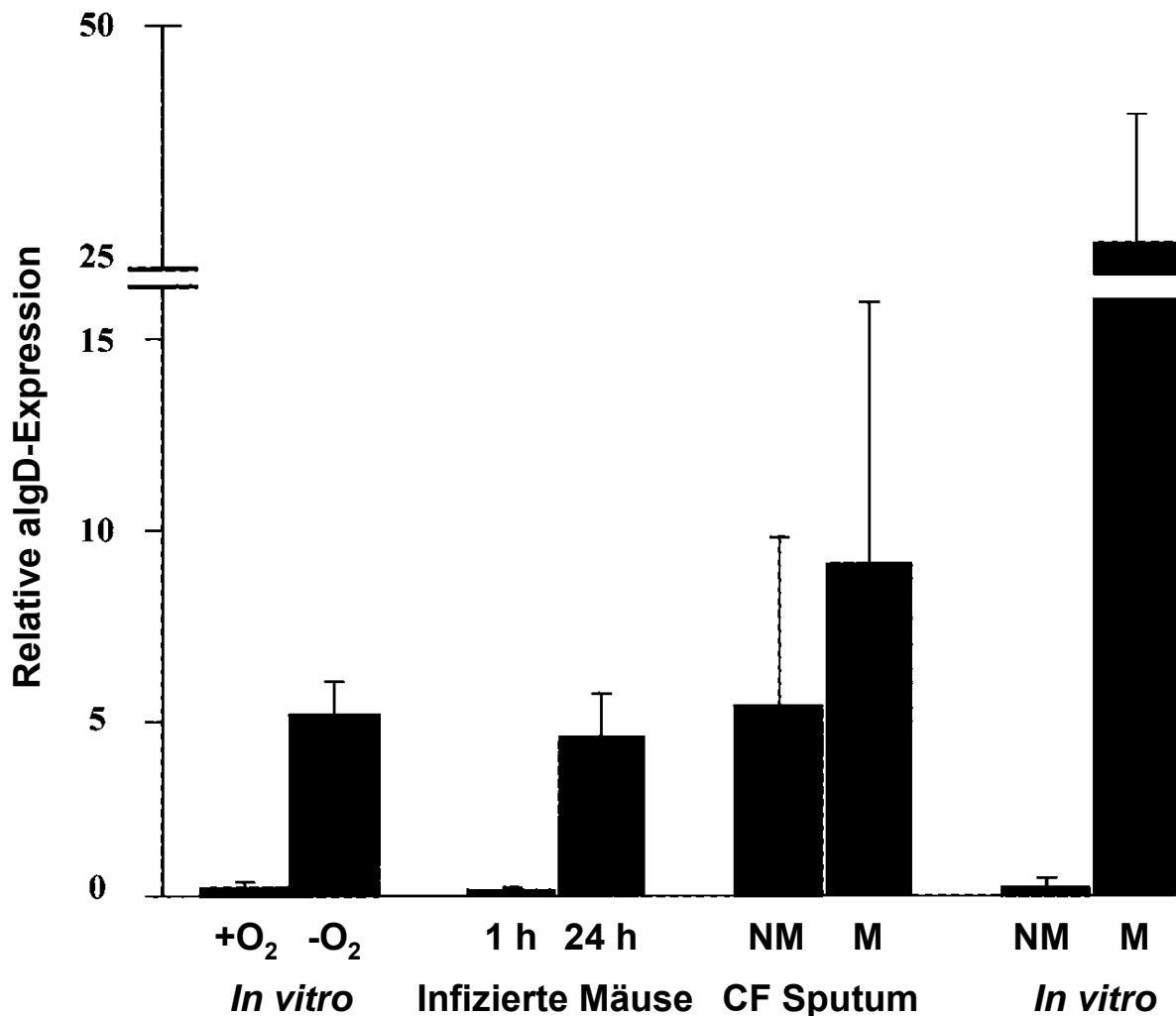


Abb. 14: Transkription des *Pseudomonas aeruginosa*-Sigmafaktors *algD* mittels RT-PCR. Die *algD*-Expression wurde auf die jeweilige konstitutive *gyrA*-Expression bezogen. Die *in vitro*-Daten ergaben eine erhöhte *algD*-Expression nach 8 Stunden anaerober (-O₂) verglichen mit aerober (+O₂) Inkubation. Infizierte Mäuse zeigten eine Stunde nach Infektion niedrige *algD*-Werte, während es 24 Stunden nach Infektion zu einem deutlichen Anstieg kam. Ähnlich verhielt es sich mit der *algD*-Expression aus dem Sputum von CF-Patienten mit nonmukoiden *P. aeruginosa*-Stämmen (NM) verglichen mit der Expression von mukoiden Stämmen (M). Bei Wachstum dieser Stämme *in vitro* zeigten wiederum M-Stämme sehr hohe *algD*-Expressionen, während die von NM-Isolaten deutlich niedriger war.

In weiteren Versuchen wurden Agar-Kügelchen mit dem *P. aeruginosa* Stamm PAO1 [10^6 - 10^7 KBE pro Maus) in die Lunge von Mäusen intratracheal eingebracht. Diese Dosis führte zu chronischen Lungeninfektionen, während höhere Dosen eine akute Pneumonie mit sofortigem letalem Ausgang bewirkten, und niedrigere Dosen keine chronische Infektion hervorriefen. Im Verlauf der chronischen Lungeninfektion kam es nach einem Tag zu einem Anstieg der Bakterienzahlen auf 6.3×10^9 KBE pro Lunge, und danach zu einem Abfall der Mittelwerte der Bakterien auf 2.3×10^4 Bakterien pro Lunge am Tag 7 (nicht abgebildet).

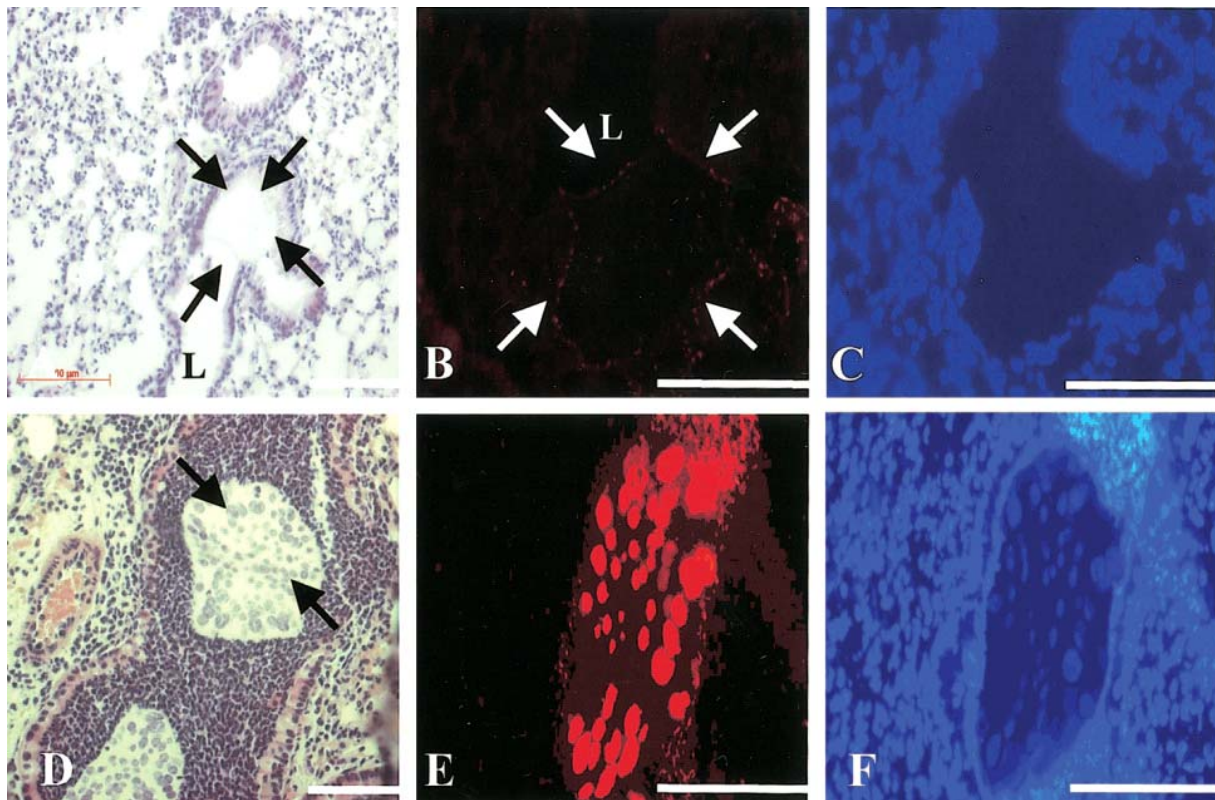


Abb. 15: Expression von Alginat in der Mauslunge durch *Pseudomonas aeruginosa* nach Injektion von Agar-Kügelchen. (A) Agar-Kügelchen (Pfeile) im Lumen (L) eines Bronchus eine Stunde nach Injektion. (B) Nach einer Stunde ist kein Alginat in dem Agar-Kügelchen (Pfeile) nachweisbar. (C) Die DAPI-Färbung des selben Schnittes wie in (B) beweist die Abwesenheit von Bakterien im Lumen. (D) Einen Tag nach Infektion sind *P. aeruginosa*-Mikrokolonien in den Atemwegen sichtbar, die (E) Alginat produzieren. (F) Die DAPI-Färbung belegt die *P. aeruginosa*-Mikrokolonien im Lumen des Bronchus. Balken: 100 µm.

Nachdem der Verlauf der Bakterienzahlen bei der chronischen *P. aeruginosa*-Lungeninfektion mit Hilfe des Agar-Kügelchen-Modells bekannt war, wurden die Lungen von infizierten Mäusen und die darin befindlichen Bakterien eine Stunde, einen Tag und 3 Tage nach Infektion histologisch, mit Hilfe der Immunfluoreszenz, und mittels RT-PCR untersucht. Eine Stunde nach Infektion produzierten die Pseudomonaden in den Atemwegen der Mäuse kein Alginat (Abb. 15A, B). Dagegen bildeten die Bakterien bereits einen Tag nach Infektion *P. aeruginosa*-Mikrokolonien in den Atemwegen (Abb. 15D), die sich in der Immunfluoreszenzfärbung stark positiv für Alginate darstellen (Abb. 15E). Diese Ergebnisse werden durch die RT-PCR-Untersuchungen der Bakterien aus den Mauslungen unterstützt. Während die Expression des *algD*-Gens (welches für den Sigmafaktor *algD* kodiert) eine Stunde nach Infektion nur gering ist, steigt sie 24 Stunden nach Infektion auf das Vierfache an ($p < 0.05$, Abb. 14). Drei Tage nach Infektion fällt die Zahl der nachweisbaren Agar-Kügelchen in den Lungenschnitten signifikant ($p < 0.01$) ab. Dies legt die Vermutung nahe,

dass die persistierenden Alginat-positiven *Pseudomonas aeruginosa* nicht mehr durch Agar-Kügelchen, sondern durch Alginat vor den Abwehrzellen in den Atemwegen der Mäuse geschützt werden.

Bei Untersuchungen der Zeitdauer, innerhalb derer es zu einem stabilen, Alginat-bildenden Phänotyp von *P. aeruginosa* kommt, zeigte sich, dass die Bakterien bereits einen Tag nach Infektion der Mauslunge Alginat produzieren (**Abb. 16A**), was sich nach einer Woche (**Abb. 16B**) und 14 Tagen (**Abb. 16C**) nicht ändert. Wenn die Bakterien aber *in vitro* unter aeroben Wachstumsbedingungen subkultiviert werden, ist einen Tag (**Abb. 16D**) und eine Woche (**Abb. 16E**) nach Infektion noch keine Alginatbildung nachzuweisen. 14 Tage nach Infektion (**Abb. 16F**) zeigten dagegen 30% der subkultivierten Kolonien auch aerob einen Alginat-produzierenden Phänotyp. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass unterschiedliche Kolonien verschieden stark einer Regulation der Alginatgene unterliegen. Allerdings konnte in keinem Fall der stabile, mukoide Phänotyp von *P. aeruginosa* nachgewiesen werden, wie er häufig in der CF-Lunge zu finden ist [103-105].

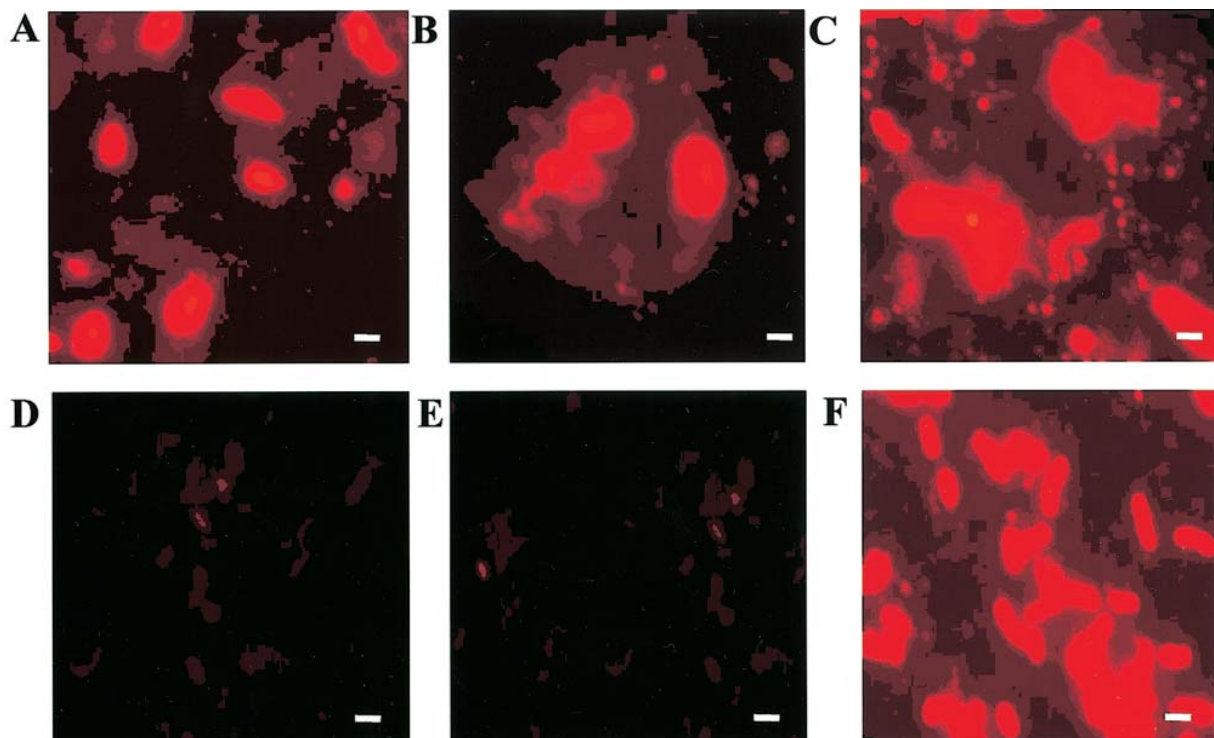


Abb. 16: Expression der *Pseudomonas aeruginosa*-Alginatgene in Mauslungen und *in vitro* bei aerober Bebrütung. Nach einem (**A**), sieben (**B**) oder 14 (**C**) Tagen Infektion in der Mauslunge exprimiert *P. aeruginosa* kontinuierlich Alginat. Bei Subkultivierung der Bakterien *in vitro* unter aeroben Konditionen verliert sich dieser Phänotyp nach einem (**D**) oder sieben (**E**) Tagen, während es nach 14 Tagen (**F**) zu einem stabilen Alginat-produzierenden Phänotyp kommt.

In der Folge wurde die Expression der Alginatgene von *P. aeruginosa*-Stämmen untersucht, die aus Sputumproben von CF-Patienten stammten. Ein mukoider *P. aeruginosa*-Stamm aus CF-Sputum (**Abb. 17A**) exprimierte erwartungsgemäß Alginat (**Abb. 17B**). Allerdings zeigte auch ein non-mukoider Patientenstamm (**Abb. 17D**) eine starke Alginatexpression (**Abb. 17E**), was auf einen genregulatorischen Mechanismus in der CF-Lunge hinweist, der ähnlich wie in der Mauslunge abläuft. Eine Bestätigung erfolgte durch Untersuchung der Expression von *algD* mittels RT-PCR: im Vergleich zur Expression im Laborstamm PAO1 war die *algD*-Expression im Sputum eines CF-Patienten mit einem non-mukoiden Stamm fünffach erhöht (**Abb. 14**), und eine neunfach erhöhte *algD*-Expression war im Sputum des Patienten mit einem mukoiden Stamm zu finden (**Abb. 14**). Diese Experimente belegen, dass auch *P. aeruginosa*-Isolate, die *in vitro* einen non-mukoiden, Alginat-negativen Phänotyp aufweisen, innerhalb der CF-Lunge Alginat produzieren.

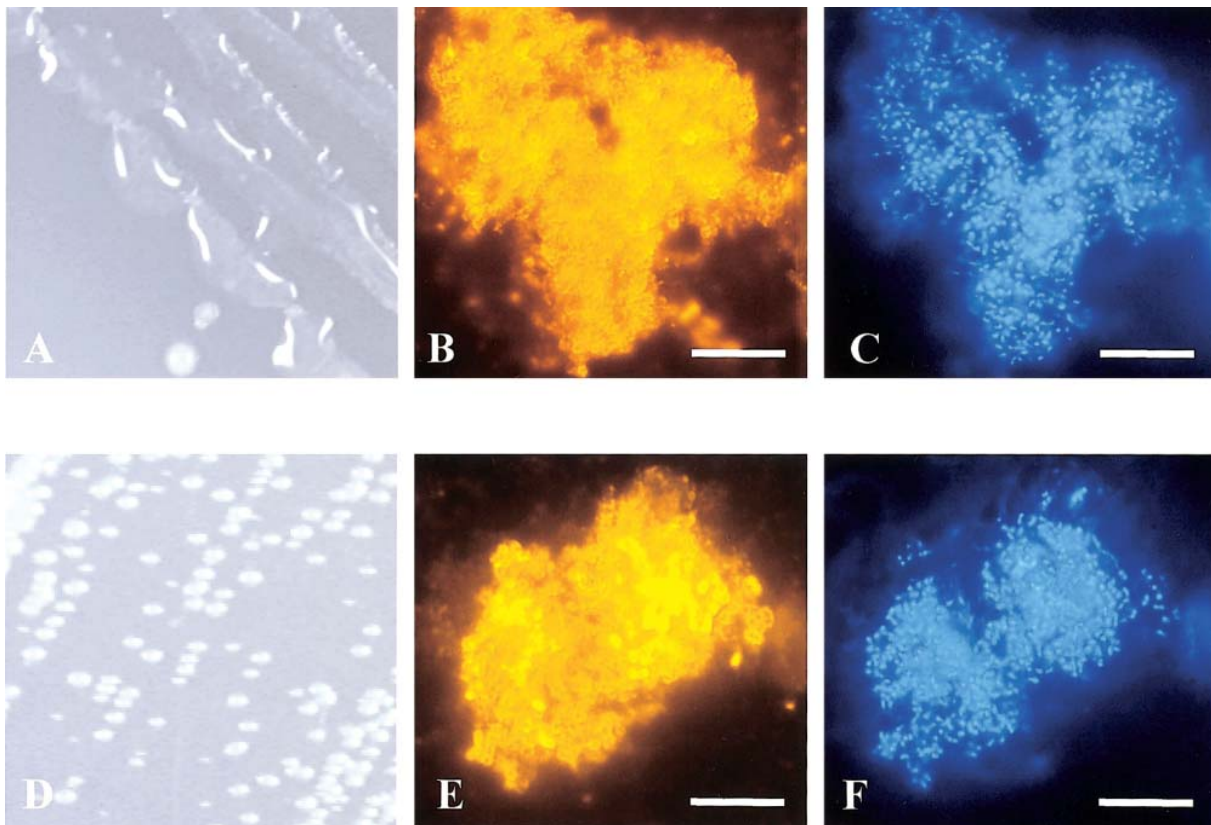


Abb. 17: Expression der *Pseudomonas aeruginosa*-Alginatgene in Sputum von CF-Patienten und *in vitro* auf Agarplatten. Ein mukoider Patientenstamm (**A**) exprimiert Alginat in der Immunfluoreszenzfärbung (**B**). Allerdings produziert auch ein non-mukoider Patientenstamm (**D**) ähnliche Mengen an Alginat (**E**). (**C**) und (**F**): DAPI-Kontrollen. Balken: 10 µm.

4.4. Nachweis von obligat anaeroben Bakterien im Sputum von CF-Patienten

Als eine weitere Konsequenz aus dem Nachweis anaerober Bereiche in der CF-Lunge [B] wurde in der vierten Studie [D] untersucht, ob auch obligat anaerobe Bakterien im Sputum von CF-Patienten vorkommen. Zusätzlich wurde die Bedeutung dieser vollständig anaerob metabolisierenden Bakterien für die Therapie von Exazerbationen bei CF-Patienten untersucht.

Bei 41 von 45 untersuchten CF-Patienten (91%) wurden ein oder mehr anaerobe Stämme im Sputum identifiziert. Die Prozentzahlen für Kinder (82%) und Erwachsene (94%) waren vergleichbar hoch. 168 Isolate aus 93 positiven Sputumproben konnten 16 obligat anaeroben Genera zugeordnet werden, wobei zusätzlich eine Identifikation von 35 Spezies aus 13 Genera möglich war (**Tab. 1**). Bis zu vier verschiedene Spezies wurden pro Sputumprobe gefunden. Die häufigsten Nachweise gelangen für *Staphylococcus spp.* (37), *Peptostreptococcus spp.* (34), *Actinomyces spp.* (19), *Veilonella spp.* (15) und *Clostridium spp.* (12). In den restlichen 51 Proben wurden 11 weitere Genera nachgewiesen (**Tab. 1**). Bei 22 der CF-Patienten wurde zusätzlich zu den obligaten Anaerobiern *P. aeruginosa* im Sputum nachgewiesen. Aber auch *S. aureus* (19x), *B. cepacia* complex-Bakterien (4x), und *Stenotrophomonas maltophilia* (3x) waren zu finden. Drei Patienten waren mit zwei fakultativ anaeroben Stämmen gleichzeitig kolonisiert. Offensichtlich existiert keine bevorzugte Besiedlung der obligaten Anaerobier zeitgleich mit einem bestimmten fakultativ anaeroben Erreger.

Tabelle 1. Obligat anaerob Bacterien in Sputum von CF-Patienten.

Genus	n	species	n
Staphylococcus <i>spp.</i>	37	<i>saccharolyticus</i>	37
Peptostreptococcus <i>spp.</i>	34	<i>anaerobius</i>	6
		<i>micros</i>	1
		<i>prevotii</i>	20
		<i>tetradius</i>	7
Actinomyces <i>spp.</i>	19	<i>israelii</i>	2
		<i>meyeri</i>	3
		<i>naeslundii</i>	1
		<i>odontolyticus</i>	7
		<i>turicensis</i>	6
Veillonella <i>spp.</i>	15		15
Clostridium <i>spp.</i>	12	<i>bifermentans</i>	1
		<i>butyricum</i>	1
		<i>clostridioforme</i>	2
		<i>difficile</i>	3
		<i>hastiforme</i>	2
		<i>innocuum</i>	1
		<i>perfringens</i>	1
		<i>sporogenes</i>	1
Bacteroides <i>spp.</i>	7	<i>tectum</i>	6
		<i>stercoris</i>	1
Mobiluncus <i>spp.</i>	7	<i>curtsii</i>	1
		<i>mulieris</i>	6
Streptococcus <i>spp.</i>	7	<i>constellatus</i>	6
		<i>intermedius</i>	1
Capnocytophaga <i>spp.</i>	6		6
Gemella <i>spp.</i>	5	<i>morbillosum</i>	5
Prevotella <i>spp.</i>	4	<i>corporis</i>	2
		<i>melaninogenica</i>	2
Eubacterium <i>spp.</i>	3	<i>aerofaciens</i>	2
		<i>limosum</i>	1
Fusobacterium <i>spp.</i>	3	<i>necrophorum</i>	3
Lactobacillus <i>spp.</i>	3	<i>acidophilus</i>	2
		<i>jensenii</i>	1
Propionibacterium <i>spp.</i>	3	<i>acnes</i>	1
		<i>granulosum</i>	1
		<i>propionicum</i>	1
Wolinella <i>spp.</i>	3		3
Gesamt	168		168

Die Quantifikation von fakultativen und obligaten Anaerobiern in Sputumproben von CF-Patienten ergab, dass die Zellzahlen für obligate Anaerobier sehr hoch waren, und mit $2.2 \pm 6.9 \times 10^7$ KBE/ml in einem vergleichbaren Bereich mit den fakultativen Anaerobiern ($5.5 \pm$

9.6×10^7 KBE/ml) lagen (**Abb. 18**). Im Gegensatz dazu wurden obligate Anaerobier in Rachenabstrichen in weit niedrigeren Keimzahlen ($7.7 \pm 11.0 \times 10^3$ KBE/ml) bei lediglich drei von sieben Patienten nachgewiesen (**Abb. 18**). Bei der Untersuchung der Keimzahlen beim gleichzeitigen Auftreten von obligaten Anaerobiern zusammen mit fakultativen Anaerobiern zeigte sich kein Einfluss der obligaten Anaerobier auf das Wachstum von *P. aeruginosa* ($p=0.970$) oder *S. aureus* ($p=0.230$). Auch die Keimzahlen der obligaten Anaerobier zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen Sputumproben, die mit *P. aeruginosa* oder *S. aureus* besiedelt waren ($p=0.176$).

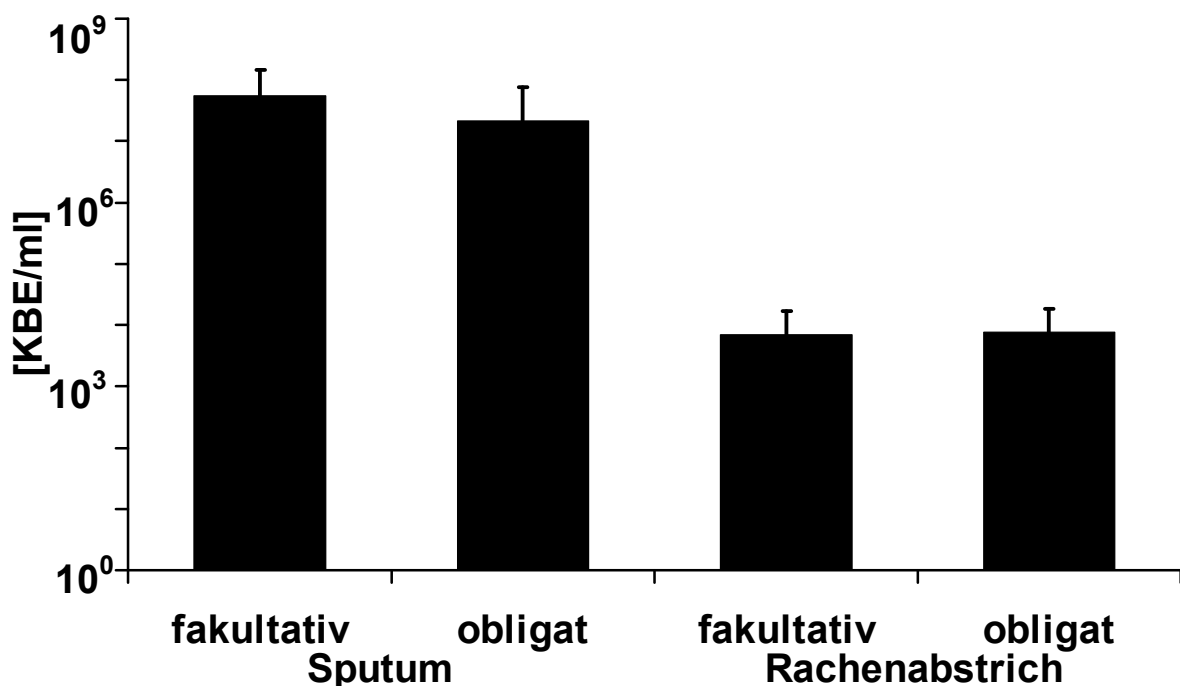


Abb. 18: In Sputumproben ($n=41$) sowie in Rachenabstrichen ($n=7$) von CF-Patienten sind vergleichbare Zahlen von fakultativ und obligat anaeroben Bakterien vorhanden.

Um den Einfluss einer *P. aeruginosa*-spezifischen Antibiotika-Therapie wegen akuter Exazerbationen auf die Zellzahlen der obligaten Anaerobier zu untersuchen, wurden die Keimzahlen der fakultativen und obligaten Anaerobier im Sputum von 12 CF-Patienten vor und nach Therapie bestimmt. Sowohl die Zahlen der fakultativen Anaerobier als auch die der obligaten Anaerobier wurden durch die Therapie nicht signifikant reduziert (**Abb. 19A**), obwohl Antibiotika benutzt worden waren, die *in vitro* gegen den jeweils dominanten Stamm von *P. aeruginosa* wirksam waren. Da es sich bei allen Patienten nicht um eine Erstinfektion handelte, ist die geringe Wirksamkeit auf die fakultativ anaeroben Bakterien wahrscheinlich

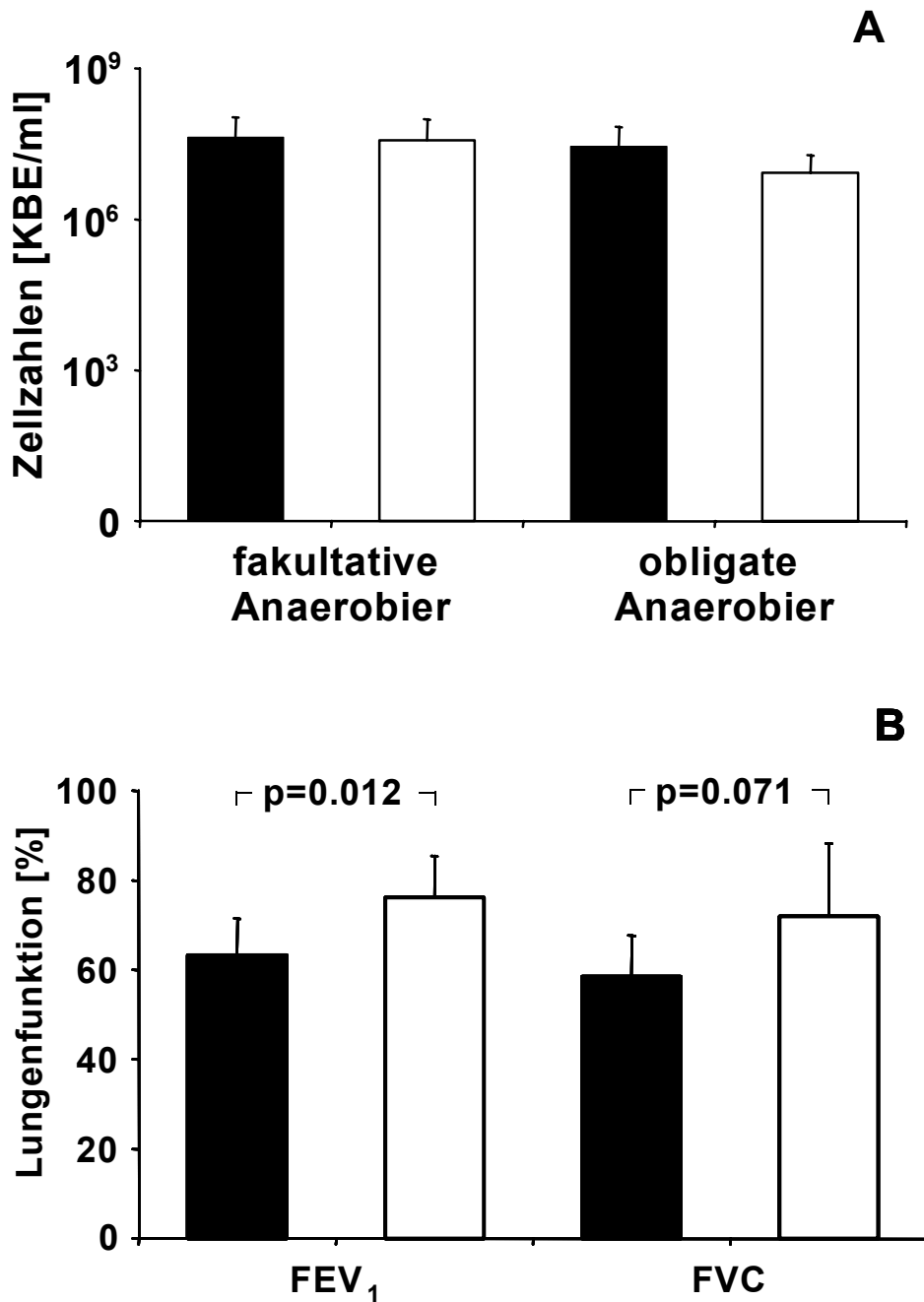


Abb. 19: Antibiotika-Behandlung von akuten Exazerbationen verändert nicht die Keimzahl der fakultativen und obligaten Anaerobier im CF-Sputum vor (■) gegen nach (□) Therapie (A), wohingegen die Lungenfunktionsparameter FEV₁ und FVC nach Therapie deutlich ansteigen.

auf die Entwicklung von chronischen Lungeninfektionen mit mukoiden, Biofilm-bildenden Pseudomonaden zurückzuführen. Der Erfolg der Therapie aber spiegelt sich in den deutlich erhöhten Lungenfunktionsparametern FEV₁ und FVC wider, die die starke Verbesserung der klinischen Situation nach Erholung von der massiven Verschlechterung während des Erstauftretens der Exazerbationen aufzeigt (Abb. 19B).

Die nur geringfügig veränderten Keimzahlen der obligat anaeroben Bakterien dagegen sind möglicherweise auf die relativ stark ausgeprägten Resistenzen der jeweiligen Stämme zurückzuführen (**Tab. 2**): gegen Ceftazidim, das am Universitätsklinikum Halle-Wittenberg am häufigsten in der Therapie gegen *P. aeruginosa* verwendete Antibiotikum, waren 51.4% der obligaten Anaerobier resistent. Eine hohe Zahl unempfindlicher Stämme (48.6%) fand sich auch für Metronidazol, ohne dass dies durch eine anti-Pseudomonas-Therapie erklärbar wäre, da dieses Antibiotikum praktisch nie für die Behandlung von CF-Patienten verwendet wird. Vergleichsweise niedrig lag dagegen mit nur 3.6% der Prozentsatz der gegen Meropenem resistenten obligaten Anaerobier (**Tab. 2**).

Zusammengenommen belegen die in der Publikation [D] beschriebenen Experimente, dass als Konsequenz aus den anaeroben Wachstumsverhältnissen im Sputum innerhalb der CF-Lunge auch eine grosse Zahl unterschiedlicher obligat anaerober Bakterien dort vorkommen, dass sie in hohen Keimzahlen vorhanden sind, und sich im Sputum vermehren müssen, da die Keimzahlen in den Rachenabstrichen weit geringer sind, und somit keine Kontamination des Sputums bei Expektoratation verursachen können. Die geringe Keimzahlreduktion der fakultativen wie auch der obligaten Anaerobier nach Therapie von Exazerbationen ist möglicherweise auf das häufige Vorkommen resistenter Erreger zurückzuführen, lässt sich aber auch dadurch erklären, dass beide Arten von Bakterien den gleichen lokalen Bedingungen unterworfen sind, wie sie bereits in [B] beschrieben worden sind.

Tabelle 2: Antibiotika-Resistenzen von obligaten Anaerobiern

Spezies	Stämme	Zahl resistenter Stämme (%)				
		PTC	CM	MZ	MP	TZ
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	32	2 (6)	5 (16)	26 (81)	0 (0)	7 (22)
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	25	14 (56)	1 (4)	2 (8)	1 (4)	24 (96)
<i>Actinomyces spp.</i>	18	0 (0)	7 (39)	9 (50)	2 (11)	8 (44)
<i>Veillonella spp.</i>	14	8 (57)	1 (7)	4 (29)	0 (0)	11 (79)
<i>Streptococcus spp.</i>	10	0 (0)	4 (40)	10 (100)	0 (0)	2 (20)
<i>Clostridium spp.</i>	9	0 (0)	4 (44)	3 (33)	1 (11)	4 (44)
<i>Bacteroides spp.</i>	8	0 (0)	3 (37)	0 (0)	0 (0)	6 (75)
<i>Propionibacterium spp.</i>	3	0	0	3	0	0
<i>Lactobacillus spp.</i>	3	0	3	0	0	0
<i>Eubacterium spp.</i>	3	0	1	2	0	3
<i>Gemella morbillorum</i>	3	0	2	2	0	1
<i>Prevotella spp.</i>	3	0	0	0	0	2
<i>Mobiluncus spp.</i>	3	0	0	2	0	0
<i>Capnocytophaga spp.</i>	2	0	1	2	1	1
<i>Wolinella spp.</i>	2	2	0	2	0	2
Gesamt	138	18.8%	23.2%	48.6%	3.6%	51.4%

Abkürzungen: PTC: Piperacillin/Tazobactam, CM: Clindamycin, MZ: Metronidazol, MP: Meropenem, TZ: Ceftazidim.

5. DISKUSSION

5.1. Sauerstoffradikale in der Lunge von CF-Patienten

Bei Patienten mit CF kommt es zu chronischen Lungeninfektionen mit der Folge von chronischen Lungenentzündungen [2, 54]. Hierbei kommt es zu einem erheblichen Einstrom von PMN in die Atemwege, die dort pro-inflammatorische Enzyme wie neutrophile Elastase oder Cathepsin G freisetzen [50, 60]. Welchen Beitrag Sauerstoffradikale und andere reaktive Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species, ROS) bei der Entzündung in der CF-Lunge leisten, war zum Zeitpunkt der Entstehung des hier besprochenen Artikels [A] noch unklar. Allerdings lagen eine Reihe von Hinweisen dafür vor, dass bei anderen Lungenerkrankungen [106] wie ARDS [107], Asthma bronchiale [94] und akuter respiratorischer Hypoxämie [108] ROS in die Pathogenese der Entzündung involviert sind. Auch wurden hohe Konzentrationen der Myeloperoxidase (MPO), einem Enzym, das Wasserstoffperoxid (H_2O_2) toxifiziert, bei CF-Patienten gefunden [79, 86, 109, 110]. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass es bei CF-Patienten zu einer vermehrten Lipidoxidation [111], einer reduzierten Konzentration an Radikalfängern [112], und zu einem veränderten Antioxidantienstatus im Plasma [111-113] kam.

Vor diesem Hintergrund wurde in der hier diskutierten Arbeit [A] untersucht, ob ROS in Form von H_2O_2 im Atemkondensat von CF-Patienten vorliegen, ob MPO und CAT, ein aus PMN stammendes Enzym, welches H_2O_2 detoxifiziert, im Sputum von CF-Patienten zu finden sind, und welche zytotoxischen Effekte CF-Sputum *in vitro* aufweist. Dabei zeigte sich, dass sowohl neutrophile Elastase als auch MPO und CAT in sehr hohen Aktivitäten im Sputum vorhanden sind. Dies bedeutet einerseits, dass auch bei dieser Untersuchung hohe Zahlen von PMN ins Sputum eingewandert sind, wie dies aus anderen Untersuchungen bereits bekannt ist [79, 86, 109, 110]. Auch geht daraus hervor, dass die PMN aktiviert und funktionstüchtig sind. Im weiteren besagen die hohen Aktivitäten der Elastase im Sputum, dass die Entzündung durch die PMN auf dem enzymatischen Wege der Serinproteasen unterhalten wird [50, 60]. Andererseits bedeuten die hohen Aktivitäten von MPO und CAT, dass auch die Enzyme zur Verstoffwechslung von ROS [79, 86, 109, 110] in sehr hohem Maße vorhanden sind.

Um so erstaunlicher war daher die Beobachtung, dass im Atemkondensat der CF-Patienten kein H_2O_2 zu finden war. Im Gegensatz zu Patienten mit Asthma bronchiale, bei denen erhöhte H_2O_2 -Konzentrationen im Atemkondensat von der Gruppe um Dohlman [94] wie auch bei den eigenen Untersuchungen [A] nachgewiesen wurden, waren die H_2O_2 -Konzentrationen im Atemkondensat der CF-Patienten signifikant niedriger, ja sogar leicht geringer als die von gesunden Kontrollpersonen. H_2O_2 ist als ROS zwar kein Sauerstoffradikal im engeren Sinne, wird aber aus verschiedenen Radikalen entweder spontan oder enzymatisch gebildet und kann auch in weitere ROS umgewandelt werden [114, 115]. H_2O_2 nimmt somit eine zentrale Rolle in der ROS-Kaskade ein, zumal die Substanz – zumindest im Vergleich zu den eigentlichen Radikalen – etwas langlebiger ist [114, 115]. Die reduzierte Bildung von H_2O_2 im Atemkondensat von CF-Patienten weist also auf eine verringerte Bildung von ROS trotz des Vorhandenseins von zahlreichen aktivierten PMN hin, ein offener Widerspruch.

Zu dessen Klärung wurde im Folgenden untersucht [A], ob *in vitro* (unter Einsatz einer Zellkultur sowie von primären humanen Epithelzell-Sphäroiden) zytotoxische Effekte durch H_2O_2 und die H_2O_2 -konvertierenden Enzyme MPO und CAT induziert werden. Bei Einsatz von gereinigten Substanzen zeigte sich, dass MPO und H_2O_2 maximale Zytotoxizität bewirkten, während die Zugabe von CAT diese reduzierte, da CAT H_2O_2 zu Wasser abbaut [114, 115]. Auch die Elastase vermittelte starke Zytotoxizität, die wiederum durch den Elastase-Inhibitor α_1 -Antitrypsin [60] aufgehoben werden konnte. Auch der inaktivierende Einfluss der MPO auf α_1 -Antitrypsin (durch Oxidation des Met³⁵⁸ im aktiven Zentrum des Moleküls [116]) bewirkt eine Reduktion der Inhibition der Elastase, falls diese nicht zeitgleich appliziert wurde. Allerdings führte Sputum von CF-Patienten zusammen mit H_2O_2 zu keiner Zytotoxizität, auch wenn hohe Aktivitäten von MPO im Sputum nachgewiesen werden konnten.

Es bestand also eine offensichtliche Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Versuche mit gereinigten Substanzen und den Ergebnissen mit CF-Sputum. Zusammen mit der Beobachtung, dass auch H_2O_2 im Atemkondensat der CF-Patienten nicht nachweisbar war, bewirkten diese Forschungsergebnisse die Überlegung, dass der Entzündungsvorgang bei der chronischen Lungenentzündung in der CF-Lunge anders als bei akuten Lungenentzündungen (z.B. bei Patienten mit Asthma bronchiale) abläuft, und bildete somit die Arbeitshypothese für die Publikation [B].

5.2. Bedeutung von Sauerstoff für die chronische Entzündung in der Lunge von CF-Patienten und für den Phänotyp von *P. aeruginosa*

Aus den im vorigen Artikel [A] geschilderten Untersuchungen ergab sich, dass die Bedeutung und das Vorhandensein von Sauerstoff in der CF-Lunge untersucht werden mussten. Auch wenn die Vorstellung, dass in Einzelbereichen des Sauerstoffaustauschorgans Lunge möglicherweise kein Sauerstoff vorhanden sein könnte, anfangs schwer zu vermitteln war, wurde dennoch an einer Reihe von Patienten eine bronchoskopische Bestimmung des Sauerstoffpartialdrucks (pO_2) *in vivo* in Sputumpropfen innerhalb der Atemwege durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass der pO_2 innerhalb des Sputums dramatisch reduziert war, so dass mit einem Mittelwert von lediglich 2.5 mmHg nahezu vollständig anaerobe Verhältnisse im Sputum vorlagen, und dies trotz der nasalen Applikation von Sauerstoff während der Bronchoskopie. Dieses Ergebnis erklärt, weshalb im Atemkondensat der CF-Patienten nur geringe Mengen an H_2O_2 zu finden sind [A]: die PMN sind die hauptsächlichen Produzenten von Sauerstoffradikalen, deren membranständige NADPH-Oxidase molekularen Sauerstoff zu Superoxid-Anionen umwandelt, welche im weiteren entweder spontan zu H_2O_2 zerfallen, oder enzymatisch über die Superoxid-Dismutase (SOD) zu H_2O_2 umgewandelt werden [114, 115]. Allerdings kann die NADPH-Oxidase nur dann Superoxid-Anionen synthetisieren, wenn molekularer Sauerstoff vorliegt, der im CF-Sputum nahezu vollständig fehlt. Damit sind die PMN, die im Sputum vorliegen, grundsätzlich einer ihrer wichtigsten Waffen zur Erzeugung einer Entzündung beraubt.

Durch welche Mechanismen kommt es nun zur Anaerobiosis im Sputum? Bei praktisch allen CF-Patienten liegt eine chronische Lungeninfektion mit Keimen wie *P. aeruginosa*, *S. aureus* oder *B. cepacia* vor [1, 2, 54]. Es handelt sich bei diesen Keimen um fakultativ anaerobe Bakterien: sie benutzen bevorzugt Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor, können aber auch anaerob überleben und sich vermehren [96, 97, 99, 100, 102, 117-121]. Die Keimzahlen der fakultativen Anaerobier im Sputum liegen bei 10^7 bis 10^9 Bakterien/ml [1, 2, 54]. Bereits 5×10^7 Bakterien/ml von *P. aeruginosa* reichen aus, um den pO_2 in einem offenen Becherglas auf Null zu reduzieren [B]. Auch das Atemwegsepithel von CF-Patienten verbraucht mehr Sauerstoff als das von Gesunden [122, B]. PMN verbrauchen $1,7 \text{ nmol } O_2/10^6 \text{ PMN/min}$ [123], was bei den hohen PMN-Zahlen im Sputum [86] gleichfalls zur Hypoxie beiträgt. Nicht zuletzt bewirkt eine stark reduzierte Sauerstoffdiffusion im Sputum [124, B] zusätzlich

die hypoxischen Verhältnisse im Sputum. Es bedingen also vier Faktoren gemeinsam, aber unabhängig voneinander die vollständige Anaerobiosis im CF-Sputum.

Die Folgen der Anaerobiosis im Sputum für Infektion und Inflammation sind vielfältig. Wohl die wichtigsten Auswirkungen sind in mikrobiologischer Hinsicht zu sehen: die bei fast allen CF-Patienten zu findenden fakultativ anaeroben Bakterien *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *B. cepacia* verändern als Antwort auf die anaeroben Verhältnisse ihren Phänotyp, indem sie extrem viele Exopolysaccharide wie Alginate (für *P. aeruginosa*) [98, 125-127], PNSG (poly-N-succinyl-glucosamine, synonym: PIA, polysaccharide intercellular adhesin für *S. aureus*) [117, 120], oder Cepacian (für *B. cepacia*) [121, 128, 129] sezernieren, und sich als Mikrokolonien in Form von dreidimensionalen bakteriellen Biofilmen zusammenschließen. Die aus zahlreichen Bakterien bestehenden, zum Teil mit bloßem Auge sichtbaren Mikrokolonien stellen auf zellulärer Ebene gewaltige Objekte dar, die nicht mehr von PMN phagozytiert werden können [123]. Zudem reduzieren die Exopolysaccharide die Diffusion von Sauerstoff, aber auch von Antibiotika. Die Mikrokolonien stellen damit praktisch unangreifbare Objekte in den Atemwegen der CF-Patienten dar [98, 120, 123, 125].

Eine weitere Folge der Anaerobiosis besteht in einer erheblichen Reduktion der antibakteriellen Kapazität der PMN: unter Anaerobiosis sind diese Zellen nicht in der Lage, Sauerstoffradikale zu synthetisieren, und somit kann diese Waffe nicht gegen die Bakterien eingesetzt werden [114, 115, 130-133]. Sogar der bei CF ohnehin stark reduzierte Chloridtransport durch CFTR wird unter Anaerobiosis weiter herabgesetzt [134].

Eine dritte Konsequenz ist pharmakologischer Art: Schon seit längerer Zeit ist bekannt, dass zahlreiche Antibiotika bei Hypoxie erheblich schlechter wirksam sind [135]. In jüngerer Zeit wurde die stark reduzierte Wirksamkeit vieler Antibiotika bei der Therapie von Infektionen bei CF-Patienten explizit auf die anaeroben Verhältnisse zurückgeführt [126, 130, 131, 136-144].

Zusammengenommen erklären die bakterielle Exopolysaccharidsekretion mit der Bildung von Biofilmen, die eingeschränkte Funktion der PMN, und die verringerte Wirkung der Antibiotika das seit langem bekannte Bild der therapieresistenten chronischen Lungeninfektion bei CF. Der in **Abb. 20** dargestellte Ablauf der Ereignisse, die zu der chronischen Lungeninfektion bei CF führen, hat mittlerweile die vorher existierenden

Hypothesen weitgehend abgelöst, und stellt zur Zeit die weltweit am häufigsten zitierte Hypothese zur Pathogenese der chronischen Pneumonie bei CF dar [B].

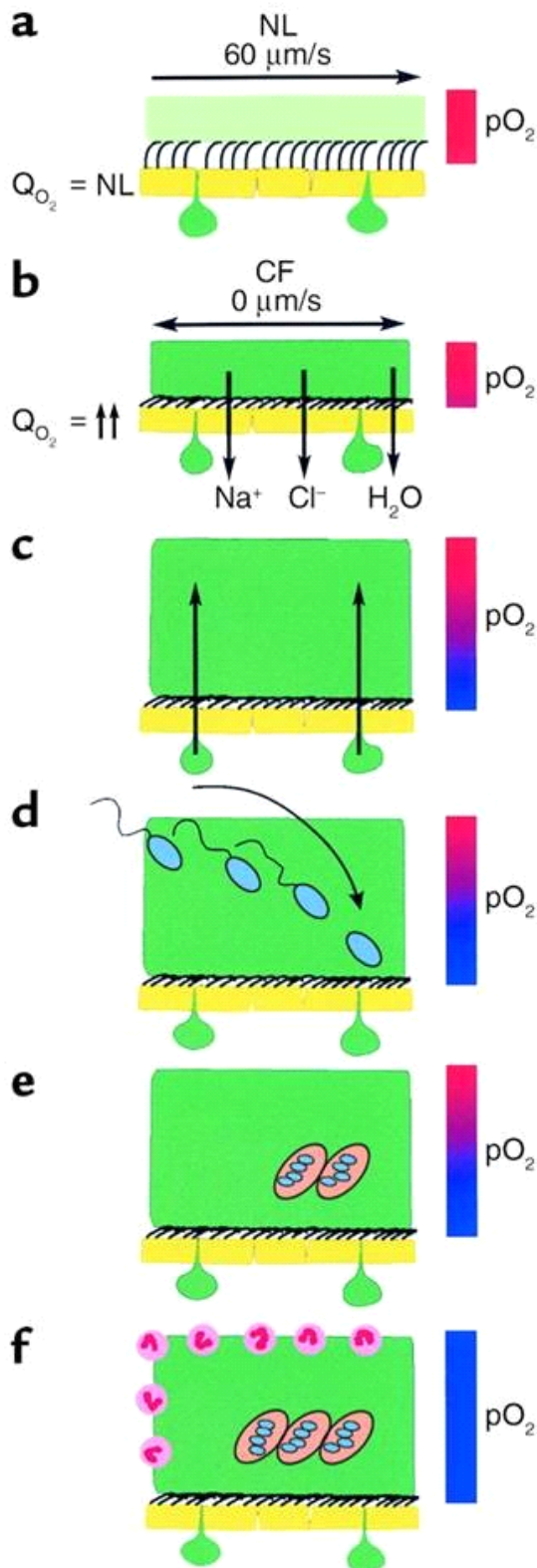


Abb. 20: Schematische Darstellung der chronischen Lungeninfektion bei CF-Patienten. **a)** bei Gesunden wird der dünne Flüssigkeitsfilm auf dem Atemwegsepithel sowie ggf. darauf abgelagerte Bakterien durch die Zilien oralwärts abtransportiert, der pO_2 ist normal, die Lunge bleibt steril. **b)** Bei CF-Patienten wird in Folge der gestörten Chloridsekretion $NaCl$ und Wasser dem Flüssigkeitsfilm entzogen, dieser wird visköser, und kann nicht mehr abtransportiert werden. **c)** Die Mukusproduktion ist ungestört, es kommt zu einer Mukus-Akkumulation und einer Reduktion des pO_2 durch epithelialen Sauerstoffverbrauch. **d)** Bakterien wie *P. aeruginosa* wandern in den Mukus ein, reduzieren weiter den pO_2 , und bilden **e)** von Exopolysacchariden umgebene dreidimensionale Biofilme, die **f)** von neutrophilen Granulozyten nicht mehr phagozytiert werden können. Der Endzustand der therapieresistenten chronischen Lungeninfektion ist erreicht.

5.3. Aerobe und anaerobe Genexpression der *P. aeruginosa* Alginat-Gene *in vitro*, in infizierten Mäuselungen, und im Sputum von CF-Patienten

In der Studie [B] konnte der Biofilm-bildende Phänotyp von *P. aeruginosa* unter anaeroben Wachstumsbedingungen sowie in der CF-Lunge aufgezeigt werden. Vor diesem Hintergrund wurde in der Studie [C] die Expression der Alginat-Gene von *P. aeruginosa* unter anaeroben Wachstumsbedingungen, in Mäuselungen sowie im Sputum von CF-Patienten untersucht, um herauszufinden, ob der Alginat-bildende Phänotyp seine Entsprechung in einer differenziellen Regulation der Alginat-Gene unter Anaerobiosis findet.

Das Exopolysaccharid Alginat wird als essentieller Bestandteil von mukoiden *P. aeruginosa*-Stämmen angesehen, wie sie sehr häufig bei CF-Patienten gefunden werden [103-105, 145]. Selbst phänotypisch nonmukoide *P. aeruginosa*-Stämme von CF-Patienten können niedrige Mengen an Alginat produzieren [146, 147]. Die Bildung einer gewissen Menge an Alginat scheint – selbst ohne Ausbildung eines mukoiden Phänotyps – Voraussetzung für die bakterielle Virulenz zu sein, da die Alginat-negative Mutante eines phänotypisch nonmukoiden Stamms keine chronische Kolonisation bei CF-Mäusen bewirken konnte [43]. Die erstmalige Isolation mukoider Stämme bei CF-Patienten zeigt oft den Beginn einer Phase mit Verschlechterung der Lungenfunktionswerte an [105, 148, 149]. Alginat scheint deshalb eine deutliche pathophysiologische Bedeutung für die chronische *P. aeruginosa*-Lungeninfektion bei CF-Patienten zu besitzen. Allerdings war es bislang nicht klar, wie schnell die Produktion von Alginat einsetzt, wenn nonmukoide, Alginat-negative Stämme die Lungen von CF-Patienten kolonisieren. In der vorliegenden Studie [C] konnte erstmals gezeigt werden, dass ursprünglich nicht-Alginat-produzierende *P. aeruginosa*-Stämme sehr schnell Alginat exprimieren, wenn sie an anaerobe Wachstumsbedingungen exponiert werden, oder in Agar-Kügelchen in Mäuselungen eingebracht werden. Dabei ist die Alginat-Expression anfangs nur vorübergehend, wird aber in einem Teil der bakteriellen Klone nach zirka zwei Wochen Infektion stabil.

Anaerobiosis ist einer von möglicherweise mehreren Stimuli, welche die Alginatproduktion durch *P. aeruginosa* initiieren können. In der Studie [B] wurde gezeigt, dass die Alginatproduktion durch den *P. aeruginosa*-Laborstamm PAO1 bereits nach wenigen Stunden anaerober Inkubation biochemisch wie auch mit Hilfe eines Alginat-spezifischen Antikörpers nachweisbar ist. Dies deckt sich mit der Beobachtung dieser Publikation [C], dass

der Wechsel von dem nicht-Alginat-produzierenden zu dem Alginat-positiven Phänotyp nach Infektion von Mäuselungen mit dem Stamm PAO1 bereits nach 24 Stunden stattfand. Obwohl das Mäuselungeninfektionsmodell mit *P. aeruginosa* in Agar-Kügelchen auch von anderen Arbeitsgruppen verwendet wurde [91, 92, 150-152], wurde bislang kein Wechsel bezüglich der Alginat-Bildung durch nonmukoide *P. aeruginosa*-Stämme berichtet. Zusätzlich konnte in [C] auch Alginat-Produktion bei einer großen Anzahl von Stämmen aus CF-Sputum nachgewiesen werden, die phänotypisch lediglich nonmukoides Wachstum aufwiesen. Diese Ergebnisse belegen, dass sowohl im Mäuselungeninfektionsmodell mit *P. aeruginosa* in Agar-Kügelchen wie auch in den Lungen von CF-Patienten die Bildung von Alginat bei vielen *P. aeruginosa*-Stämmen bereits kurz nach Infektion stattfindet.

Der schnelle Umschlag des Stammes PAO1 zu einem nonmukoiden, aber Alginat-positiven Phänotyp in der Mäuselunge wie auch unter anaeroben Wachstumsbedingungen *in vitro* war bis zu 7 Tagen nach Infektion reversibel, wenn die Bakterien unter aeroben Bedingungen inokuliert wurden. Dieses Resultat legt nahe, dass der schnelle Anstieg der Alginat-Produktion auf eine veränderte Regulation der Genaktivität, nicht aber auf neu entstandene stabile Mutationen zurückzuführen war. Ein ähnliches Ergebnis konnte auch in einer Studie mit einem Modell einer akuten Lungeninfektion durch PAO1 erreicht werden, in der eine erhebliche Alginat-Genexpression bereits eine Stunde nach Infektion nachgewiesen werden konnte [153].

In dieser Studie [C] konnte mittels DNA microchips und real-time RT-PCR nachgewiesen werden, dass die spezifischen Gene für Alginatbiosynthese und -regulation im Vergleich von anaeroben mit aeroben Wachstumsbedingungen deutlich vermehrt transkribiert werden. Diese Ergebnisse sind von klinischer Bedeutung, da nonmukoide, aber Alginat-positive *P. aeruginosa*-Stämme bereits wenige Tage nach Erstkolonisation in der CF-Lunge vorhanden sein, und zu vermehrter Virulenz beitragen können [146], ohne aber *in vitro* bei aerober Anzucht nachgewiesen werden zu können. Dieses Ergebnis stimmt auch mit einer Studie überein, in der Serumantikörper gegen *P. aeruginosa*-Alginat demonstriert werden konnten, ohne dass die betroffenen Patienten mit mukoiden Stämmen besiedelt gewesen wären [154]. Eine Konversion zum stabilen, mukoiden Phänotyp, der kontinuierlich grosse Mengen an Alginat produziert, wurde auch mit Mutationen im Alginat-Repressor Gencluster *mucABCD* in Zusammenhang gebracht [59, 155, 156].

Zusammenfassend konnte in der Publikation [C] gezeigt werden, dass Anaerobiosis schnell die Alginateproduktion durch *P. aeruginosa* induziert, und dass diese Produktion anfangs reversibel ist, aber nach zirka 2 Wochen chronischer Lungeninfektion in Mäusen stabil werden kann. Damit ist einerseits die bedeutende Rolle von Alginate für die Pathogenität der Pseudomonaden belegt, andererseits wird auch der Einfluss von Anaerobiosis auf den Pathomechanismus der chronischen *P. aeruginosa*-Lungeninfektion in Übereinstimmung mit [B] detaillierter nachgewiesen.

5.4. Obligat anaerobe Bakterien im Sputum von CF-Patienten

Als eine weitere Konsequenz aus dem Nachweis anaerober Bereiche in der CF-Lunge [B] konnte in der vierten Studie [D] demonstriert werden, dass auch obligat anaerobe Bakterien im Sputum von CF-Patienten in hohen Zellzahlen auftreten. Zusätzlich wurde die Bedeutung dieser vollständig anaerob metabolisierenden Bakterien für die Therapie von Exazerbationen bei CF-Patienten untersucht.

In dieser Publikation [D] konnte in der überwiegenden Mehrzahl der Sputumproben von CF-Patienten unabhängig vom Alter der Patienten eine grosse Zahl von obligat anaeroben Genera in hohen Keimzahlen nachgewiesen werden. Der Nachweis niedriger Keimzahlen von obligaten Anaerobiern in Rachenabstrichen von CF-Patienten legt nahe, dass die Mundhöhle die Quelle ist, von der aus sich die obligaten Anaerobier in die Lunge verbreiten, wo sie sich im anaeroben Sputum vermehren. Dieses Ergebnis stimmt mit anderen Studien überein, in denen eine grosse Anzahl obligat anaerober Bakterien in Sputum wie auch in BAL-Flüssigkeit nachgewiesen wurden [157-159]. Obwohl die Keimzahlen der Anaerobier in der BAL-Flüssigkeit niedriger war, stimmte die Identifikation der Keime mit denen im Sputum der gleichen Patienten gut überein [159]. Es waren allerdings im Vergleich zu den anderen Studien [157-159] mehrheitlich andere Stämme bei den CF-Patienten aus Halle zu finden: während in Nordirland *Prevotella spp.* überwogen [159], waren dies in Halle *Staphylococcus* und *Peptostreptococcus spp.* Diese Ergebnisse sind möglicherweise auf regionale Unterschiede in der Prävalenz der verschiedenen Spezies zurückzuführen. Auch mögen Unterschiede bei den verwendeten mikrobiologischen Techniken eine Rolle spielen. So wurden in der hier diskutierten Studie [D] keine Antibiotika-haltigen Kulturmedien zur Anzucht der obligaten Anaerobier verwendet. Auch Modifikationen bei der Taxonomie und Nomenklatur der obligaten Anaerobier können Einfluss auf die unterschiedliche Häufigkeit

im Nachweis einzelner Spezies haben [160]. Allerdings bleibt festzuhalten, dass in den verschiedenen Studien – wenn auch in unterschiedlicher Häufigkeit – immer die gleichen obligat anaeroben Spezies nachgewiesen wurden [157-159].

Der gleichzeitige Nachweis von *P. aeruginosa* im Sputum von CF-Patienten erhöht nicht die Wahrscheinlichkeit für den Nachweis von obligaten Anaerobiern. Auch in Sputumproben, die mit anderen fakultativ anaeroben Bakterien wie z. B. *S. aureus* besiedelt waren, wurden obligate Anaerobier nachgewiesen. Im Weiteren wurde auch kein Einfluss des Nachweises von obligaten Anaerobiern auf die Keimzahlen der fakultativen Anaerobier *P. aeruginosa* oder *S. aureus* festgestellt. Offenbar ist das Vorhandensein grosser anaerober Sputum-Volumina notwendig, um das Überleben von obligaten Anaerobiern in den Atemwegen der CF-Patienten zu ermöglichen. Im Umkehrschluss bedeutet allerdings auch der Nachweis von obligaten Anaerobiern (für die Sauerstoff bereits in geringen Konzentrationen toxisch ist [161]), eine unabhängige Bestätigung der Tatsache, dass im CF-Sputum wirklich hypoxische Verhältnisse vorliegen [B].

Diese Erkenntnisse wurden weiterhin dadurch unterstützt, dass obligate Anaerobier in der BAL-Flüssigkeit von Patienten mit anderen Lungenerkrankungen nur in einem von sechs Fällen nachzuweisen waren. Der betroffene Patient litt unter einer chronisch-rezidivierenden Bronchopneumonie mit Expektoration von Sputum, während die anderen fünf Patienten an akuten Lungenentzündungen ohne Sputumproduktion erkrankt waren. Möglicherweise können obligate Anaerobier vor diesem Hintergrund auch bei anderen chronischen Lungenerkrankungen (wie z.B. COPD oder chronischen Bronchiektasen) erwartet werden.

Die Frage, ob obligate Anaerobier eine Rolle bezüglich der Pathophysiologie der CF-Lungenerkrankung spielen, konnte in der vorliegenden Studie [D] nicht hinlänglich beantwortet werden. Obwohl kein Unterschied der Lungenfunktionsparameter von CF-Patienten mit und ohne Nachweis von obligaten Anaerobiern vorlag, wäre es weit verfrüht, daraus zu schliessen, dass obligate Anaerobier keinen Beitrag zur Pathogenese der CF-Pneumonie leisten. In diesem Zusammenhang könnten weitere Studien (z. B. hinsichtlich einer spezifischen Antibiotika-Therapie gegen obligate Anaerobier) nähere Einsichten ermöglichen.

In der hier besprochenen Studie [D] konnte eine spezifische, gegen *P. aeruginosa* gerichtete Antibiotika-Therapie keine Reduktion der Keimzahlen der obligaten Anaerobier bewirken. Dies mag dadurch bedingt sein, dass 58% der CF-Patienten im Sputum einen obligat anaeroben Stamm vorzuweisen hatten, der gegen ein oder mehrere der jeweils verwendeten Antibiotika resistent war. Auch bei der *in vitro*-Testung aller nachgewiesenen 138 obligaten Anaerobier fanden sich hohe Resistenzraten für Ceftazidim und Metronidazol sowie etwas geringere gegen Piperacillin/Tazobactam und Clindamycin. Nur Meropenem war gegen fast alle Stämme *in vitro* wirksam, was mit den Untersuchungen aus Nordirland [159] übereinstimmt. Die Resistenzen gegen Ceftazidim und Piperacillin/Tazobactam sind gut damit zu erklären, dass diese Antibiotika häufig in der Therapie von *P. aeruginosa* bei CF-Patienten eingesetzt werden [16]. Dagegen werden Metronidazol oder Clindamycin als klassische Therapeutika gegen Anaerobier bislang praktisch nie bei CF-Patienten eingesetzt [16].

Trotz des Nachweises von Resistenzen und trotz unveränderter Keimzahlen stiegen die FEV₁-Werte der CF-Patienten nach Therapie signifikant an. Auch dieses Ergebnis könnte dahingehend interpretiert werden, dass obligate Anaerobier keine Rolle bei der Pathogenese der CF-Lungeninfektion spielen. Allerdings wurden auch die Keimzahlen der fakultativ anaeroben Bakterien trotz deren *in vitro*-Empfindlichkeit in dieser Studie [D] nicht reduziert, was wohl auf die anaeroben Verhältnisse im Sputum [B], die verschlechterte Wirkung von Antibiotika unter Anaerobiosis [135] sowie die Bildung von dreidimensionalen Biofilmen [125, B] zurückzuführen ist. Die Beantwortung der Frage, welche Auswirkungen die obligaten Anaerobier, die bei fast allen CF-Patienten in hohen Keimzahlen in den Atemwegen nachweisbar sind, auf die chronische Lungenentzündung der Patienten ausüben, bleibt kommenden Studien vorbehalten.

6. SCHLUßFOLGERUNG

Aus den in der vorliegenden kumulativen Habilitationsschrift vorgestellten Resultaten ist zu schließen, dass Sauerstoffmangel (Anaerobiosis) einen erheblichen Einfluss auf die Infektion und Inflammation in der Lunge von CF-Patienten ausübt. Im Einzelnen bedeutet dies

1) in mikrobiologischer Hinsicht: der Phänotyp wie auch der Genotyp der fakultativ anaeroben Bakterien, die bei allen CF-Patienten in der Lunge zu finden sind, wird im Sputum massiv durch Anaerobiosis verändert. Die Bakterien verbrauchen den gesamten Sauerstoff, der im Sputum der CF-Patienten zu finden ist. Sie sezernieren grosse Menge an Exopolysacchariden, und existieren nicht mehr in planktonischer Form, sondern schliessen sich zu grossen Mikrokolonien (dreidimensionalen Biofilmen) zusammen, die von einem gemeinsamen Exopolysaccharidmantel umgeben sind. Des Weiteren kommen zahlreiche obligat anaerobe Spezies zusätzlich zu den fakultativen Anaerobiern im Sputum beinahe jedes CF-Patienten in hohen Keimzahlen vor.

2) in inflammatorischer Hinsicht: die wichtigsten Abwehrzellen in den Atemwegen, die neutrophilen Granulozyten, sind funktionell beeinträchtigt, weil sie bei hypoxischen Verhältnissen keine Sauerstoffradikale bilden können. Dies bewirkt, dass ihre antibakterielle Wirksamkeit stark eingeschränkt ist, weil sie lediglich Serinproteasen zur Abtötung der Bakterien produzieren können, dies allerdings in extrem hohen Konzentrationen. Auch mechanisch stellen die vergleichsweise riesigen Mikrokolonien ein nicht zu bewältigendes Hindernis für die Phagozytose durch neutrophile Granulozyten dar.

3) in pharmakologischer Hinsicht: praktisch alle Antibiotika besitzen unter anaeroben Bedingungen eine deutlich reduzierte antibakterielle Wirkung. Zusammen mit einer reduzierten Diffusion im Sputum und in den Mikrokolonien folgert daraus, dass (trotz erwiesener *in vitro*-Wirkung) bakterizide Antibiotika-Konzentrationen im CF-Sputum nicht erreicht werden.

Zusammengenommen bewirken diese drei Faktoren das Bild der therapieresistenten chronischen Lungeninfektion und -inflammation in der Lunge von CF-Patienten. Die Berücksichtigung dieser Faktoren ermöglicht neue Therapieformen der CF-Lungeninfektion, die zu einer weiteren Steigerung der Lebenserwartung der CF-Patienten beitragen sollten.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende kumulative Habilitationsschrift setzt sich mit dem Einfluss von Sauerstoffmangel auf die chronische bakterielle Lungenentzündung bei Patienten mit cystischer Fibrose (CF) auseinander. Eine derartige Lungenentzündung liegt bei allen CF-Patienten vor, wird in den meisten Fällen durch *Pseudomonas aeruginosa* verursacht, und stellt die bei weitem häufigste Todesursache für die CF-Patienten dar. Eine exakte Beschreibung der Pathomechanismen der chronischen CF-Lungeninfektion und -entzündung ist bislang nicht bekannt.

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, Infektion und Entzündung in der CF-Lunge experimentell näher zu beschreiben, und eine neue Hypothese zum Zustandekommen der chronischen CF-Lungeninfektion zu entwerfen.

Zu diesem Zweck wurde untersucht, ob reaktive Sauerstoffverbindungen wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) als Entzündungsmediatoren im Atemkondensat von CF-Patienten zu finden sind, ob die H_2O_2 -metabolisierenden Enzyme Katalase (CAT) und Myeloperoxidase (MPO) im CF-Sputum in hohen Aktivitäten nachweisbar sind, und ob CF-Sputum in der Zellkultur zytotoxisch wirkt. Weiterhin wurde der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) bronchoskopisch *in vivo* im Sputum von CF-Patienten gemessen, und die Auswirkungen eines reduzierten pO_2 auf den Phänotyp von *P. aeruginosa* wurden bestimmt. Zudem wurde die aerobe und anaerobe Regulation der *P. aeruginosa* Alginate-Gene *in vitro*, im Mäuselungeninfektionsmodell, sowie im CF-Sputum untersucht. Letztlich wurden obligat anaerobe Bakterien im Sputum der CF-Patienten qualitativ und quantitativ nachgewiesen.

Es zeigte sich, dass die H_2O_2 -Werte im Atemkondensat der CF-Patienten im Vergleich zu Gesunden nicht erhöht waren, während CAT und MPO im Sputum in sehr hohen Konzentrationen und Aktivitäten nachgewiesen werden konnten. Allerdings bewirkten Überstände von CF-Sputen im Vergleich zur Verwendung von aufgereinigten Enzymen eine erheblich geringere Zytotoxizität in der Zellkultur. Im weiteren konnte aufgezeigt werden, dass der pO_2 im Sputum von CF-Patienten massiv reduziert ist, so dass im CF-Sputum anaerobe Verhältnisse vorliegen. Dies ist in erster Linie auf den bakteriellen Sauerstoffmetabolismus zurückzuführen, aber auch ein vermehrter Sauerstoffverbrauch durch das CF-Lungenepithel konnte demonstriert werden. Die nahezu vollständig anaeroben

Verhältnisse im CF-Sputum bewirken eine massiv erhöhte Produktion des Exopolysaccharids Alginat durch *P. aeruginosa*, und die Bakterien lagern sich in dreidimensionalen Biofilmen, sogenannten Mikrokolonien, zusammen. Dabei befinden sich die Bakterien in vergleichsweise grossem Abstand zum Lungenepithel. Bei der Untersuchung der anaeroben Genexpression von *P. aeruginosa* zeigte sich, dass die Alginat-Gene im Vergleich zur aeroben Genexpression stark hochreguliert sind, und zwar sowohl *in vitro*, wie auch in Mäuselungen und im Sputum von CF-Patienten. Damit entspricht der anaerobe Genotyp von *P. aeruginosa* in Bezug auf die Alginatexpression dem *in vivo* vorliegenden Mikrokolonie-bildenden Phänotyp. Eine weitere Konsequenz aus dem stark reduzierten pO_2 im CF-Sputum zeigte sich in der Tatsache, dass bei fast allen CF-Patienten zusätzlich zu den fakultativ anaeroben Bakterien wie *P. aeruginosa* auch obligate Anaerobier in hohen Keimzahlen zu finden waren, also Bakterien, für die Sauerstoff toxisch ist. Dieses Ergebnis stellt einen unabhängigen Beweis für die Existenz komplett anaerober Bereiche im CF-Sputum dar.

Reaktive Sauerstoffverbindungen wie H_2O_2 scheinen für die chronische Entzündung in der CF-Lunge (im Gegensatz zu akuten Pneumonien) eine untergeordnete Rolle zu spielen. Dies ist sehr wahrscheinlich durch die größtenteils anaeroben Verhältnisse am Ort der Entzündung zu erklären: wenn kein Sauerstoff vorhanden ist, können auch keine Sauerstoffradikale gebildet werden. Damit ist die CF-Lungenentzündung überwiegend auf die proteolytische Wirkung von Serinproteasen wie der neutrophilen Elastase zurückzuführen. Die anaeroben Wachstumsverhältnisse bewirken auch, dass die Mehrzahl der in der CF-Therapie verwendeten Antibiotika weit von ihrem Wirkoptimum entfernt sind. Dies erklärt das Weiterbestehen der chronischen Lungeninfektion bei CF-Patienten trotz extensiver Applikation von Antibiotika. Eine weitere Konsequenz aus der Anaerobiosis besteht im Nachweis einer Vielzahl von obligat anaeroben Genera in hohen Keimzahlen bei fast allen CF-Patienten. Die Bedeutung dieser Bakterien für die Pathogenese der Entzündung und Infektion in der Lunge der CF-Patienten ist bislang noch unklar.

Zusammengenommen ermöglichten die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen die Erstellung der neuen "low oxygen"-Hypothese, welche mittlerweile die weltweit am häufigsten zitierte Hypothese zur Pathogenese der CF-Lungenentzündung darstellt.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- A Worlitzsch D, Herberth G, Ulrich M, Döring G. Catalase, myeloperoxidase and hydrogen peroxide in patients with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 1998; 11: 377-383.
- B 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* 2002; 109: 317-325.
- C Bragonzi A, Worlitzsch D, Pier GB, Timpert P, Ulrich M, Hentzer M, Andersen JB, Givskov M, Conese M, Döring G. Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* expresses alginate in the lungs of patients with cystic fibrosis and in a mouse model. *J Infect Dis* 2005; 192: 410-419.
- D Worlitzsch D, Rintelen C, Böhm K, Wollschläger B, Merkel N, Borneff-Lipp M, Döring G. Antibiotic-resistant obligate anaerobes during exacerbations of cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 454-460.
- 1 Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 918-951.
- 2 Ratjen F, Döring G. Cystic fibrosis. *Lancet* 2003, 361: 681-689.
- 3 Kerem B-S, Rommens JM, Buchannan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui L-C. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245: 1073-1080.
- 4 Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui L-C. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of the complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066-1073.

- 5 Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem BS, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan JR, Tsui L-C, Collins FS. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989; 245: 1059-1065.
- 6 Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Cystic fibrosis mutation data base. <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>
- 7 Fogarthy A, Hubbard R, Britton J. International comparison of median age at death from cystic fibrosis. *Chest* 2000; 117: 1656-1660.
- 8 Cystic Fibrosis Foundation. Cystic Fibrosis Foundation patient registry 2008 annual report. Bethesda, Maryland. Cystic Fibrosis Foundation, 2009. <http://www.cff.org>
- 9 Döring G, Høiby N for the Consensus Study Group. Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus. *J Cystic Fibrosis* 2004; 3: 67-91.
- 10 Sinaasappel M, Stern M, Littlewood J, Wolfe S, Steinkamp G, Heijerman HGM, Robberecht E, Döring G. Nutrition in patients with cystic fibrosis: a European consensus. *J Cystic Fibrosis* 2002; 1: 51-75.
- 11 Farrell PM, Lai HJ, Kosorok MR, Laxova A, Green CG, Collins J, Hoffman G, Laessig R, Rock MJ, Splaingard ML. Evidence on improved outcomes with early diagnosis of cystic fibrosis through neonatal screening: enough is enough! *J Pediatr* 2005; 147: S30-S36.
- 12 Rutherford AJ. Male infertility and cystic fibrosis. *J R Soc Med* 2007; 100 (suppl 47): 29-34.
- 13 Valerius NH, Koch C, Høiby N. Prevention of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in cystic fibrosis by early treatment. *Lancet* 1991; 338: 725-726.

- 14 Gilligan PH. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4: 35-51.
- 15 Leitritz L, Griese M, Roggenkamp A, Geiger AM, Fingerle V, Heesemann J. Prospective study on nontuberculous mycobacteria in patients with and without cystic fibrosis. *Med Microbiol Immunol* 2004; 193: 209-217.
- 16 Döring G, Conway SP, Heijerman HGM, Hodson ME, Høiby N, Smyth A, Tow DJ for the Consensus Committee. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur Respir J* 2000; 16: 749-767.
- 17 Deutsche Stiftung für Organtransplantation (DSO): Tätigkeitsbericht 2007. <http://www.dso.de>
- 18 Hadjiliadis D, Steele MP, Chaparro C, Singer LG, Waddell TK, Hutcheon MA, Davis RD, Tullis DE, Palmer SM, Keshavjee S. Survival of lung transplant patients with cystic fibrosis harboring panresistant bacteria other than *Burkholderia cepacia*, compared with patients harboring sensitive bacteria. *J Heart Lung Transplant* 2007; 26: 834-838.
- 19 Helmi M, Love RB, Welter D, Cornwell RD, Meyer KC. *Aspergillus* infection in lung transplant recipients with cystic fibrosis. *Chest* 2003; 123: 800-808.
- 20 Meachery G, de Soyza A, Nicholson A, Parry G, Hasan A, Tocewicz K, Oillay T, Clark S, Lordan JL, Schueler S, Fisher AJ, Dark JH, Gould FK, Corris PA. Outcomes of lung transplantation for cystic fibrosis in a large United Kingdom cohort. *Thorax* 2008; 63: 725-731.
- 21 Trapnell BC, Chu CS, Paakp PK, Banks TC, Yoshimura K, Ferrans VJ, Chernick MS, Crystal RG. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in the respiratory tract of normal individuals and individuals with cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6565-6569.

- 22 Griesenbach U, Geddes DM, Alton EW. Gene therapy progress and prospects: cystic fibrosis. *Gene Ther* 2006; 13: 1061-1067.
- 23 Döring G, Jansen S, Noll H, Grupp H, Frank K, Botzenhart K, Magdorf K, Wahn U. Distribution and transmission of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in a hospital ward. *Pediatr Pulmonol* 1996; 21: 90-100.
- 24 Worlitzsch D, Wolz C, Botzenhart K, Hansis M, Burgdörfer H, Ogle JW, Döring G. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*-urinary tract infections in paraplegic patients. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 1989, 189: 175-178.
- 25 Jelsbak L, Johansen HK, Frost AL, Thogersen R, Thomsen LE, Ciofu O, Yang L, Haagenen JAJ, Høiby N, Molin S. Molecular epidemiology and dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* populations in lungs of cystic fibrosis patients. *Infect Immun* 2007; 75: 2214-2224.
- 26 Döring G, Meisner C, Stern M, for the Flagella Vaccine Trial Study Group. A double-blind randomized placebo-controlled phase III study of a *Pseudomonas aeruginosa* flagella vaccine in cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 11020-11025.
- 27 Ratjen F, Döring G, Nikolaizik WH. Effect of inhaled tobramycin on early *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in patients with cystic fibrosis. *Lancet* 2001; 358: 983-984.
- 28 Taccetti G, Campana S, Festini F, Mascherini M, Döring G. Early eradication therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Eur Respir J* 2005; 26: 458-461.
- 29 Ibrahim EH, Ward S, Sherman G, Kollef MH. A comparative analysis of patients with early-onset vs late-onset nosocomial pneumonia in the ICU setting. *Chest* 2000; 117: 1434-1442.

- 30 Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, Welsh MJ. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 1996; 85: 229-236.
- 31 Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M, Wilson JM.. Human b-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 1997; 88: 553–560.
- 32 Joris L, Dab I, Quinton PM. Elemental composition of human airway surface fluid in healthy and diseased airways. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 1633-1637.
- 33 Zabner J, Smith JJ, Karp PH, Widdicombe JH, Welsh MJ. Loss of CFTR chloride channels alters salt absorption by cystic fibrosis airway epithelia in vitro. *Mol Cell* 1998; 2:397–403.
- 34 Jayaraman S, Song Y, Vetrivel L, Shankar L, Verkman AS. Noninvasive in vivo fluorescence measurement of airway-surface liquid depth, salt concentration, and pH. *J Clin Invest* 2001; 107: 317-324.
- 35 Matsui H, Grubb BR, Tarran R, Randell SH, Gatzky JT, Davis CW, Boucher RC. Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* 1998; 95: 1005-1015.
- 36 Boucher RC. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J* 2004; 23: 146-158.
- 37 Donaldson SH, Boucher RC: Update on pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Curr Opin Pulm Med* 2003; 9: 486-491.
- 38 Tarran R, Grubb BR, Gatzky JT, Davis CW, Boucher RC. The relative roles of passive surface forces and active ion transport in the modulation of airway surface liquid volume and composition. *J Gen Physiol* 2001; 118: 223-236.

- 39 Bals R, Weiner DJ, Meegalla RL, Accurso F, Wilson JM. Salt-independent abnormality of antimicrobial activity in cystic fibrosis airway surface fluid. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25: 21-25.
- 40 Singh PK, Jia HP, Wiles K, Hesselberth J, Liu L, Conway BD, Greenberg EP, Valore EV, Welsh MJ, Ganz T, Tack BF, McCray PB Jr. Production of β -defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 14961-14966.
- 41 Travis SM, Anderson NN, Forsyth WR, Espiritu C, Conway BD, Greenberg EP, McCray PB jr., Lehrer RI, Welsh MJ, Tack BF. Bactericidal activity of mammalian cathelicidin-derived peptides. *Infect Immun* 2000; 68: 2748-2755.
- 42 Travis SM, Singh PK, Welsh MJ: Antimicrobial peptides and proteins in the innate defense of the airway surface. *Curr Opin Immunol* 2001; 13: 89-95.
- 43 Coleman FT, Mueschenborn S, Meluleni G, Ray C, Carey V, Vargas SO, Cannon CL, Ausubel FM, Pier GB. Hypersusceptibility of cystic fibrosis mice to chronic *Pseudomonas aeruginosa* oropharyngeal colonization and lung infection. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100: 1949-1954.
- 44 Pier GB. Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 8822-8828.
- 45 Pier GB, Grout M, Zaidi T, Meluleni G, Mueschenborn SS, Banting G, Ratcliff R, Evans MJ, Colledge WH. *Salmonella typhi* uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature* 1998; 393: 79-82.
- 46 Pier GB, Grout M, Zaidi T, Olsen JC, Johnson LG, Yankaskas JR, Goldberg JB. Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science* 1996; 271: 64-67.
- 47 Schroeder TH, Lee MM, Yacono PW, Cannon CL, Gerceker AA, Golan DE, Pier GB. CFTR is a pattern recognition molecule that extracts *Pseudomonas aeruginosa* LPS

- from the outer membrane into epithelial cells and activates NF-kappaB translocation. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 6907-6912.
- 48 Schroeder TH, Zaidi T, Pier GB. Lack of adherence of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to asialo-GM1 on epithelial cells. Infect Immun 2001; 69: 719-729.
- 49 Chmiel JF, Berger M, Konstan MW: The role of inflammation in the pathophysiology of CF lung disease. Clin Rev Allergy Immunol 2002; 23: 5-27.
- 50 Döring G. The role of proteinases from *Pseudomonas aeruginosa* and polymorphonuclear leukocytes in cystic fibrosis. Drugs of Today 1997; 33: 393-403.
- 51 Hostoffer RW, Krukovets I, Berger M. Enhancement by tumor necrosis factor- α of Fc α receptor expression and IgA-mediated superoxide generation and killing of *Pseudomonas aeruginosa* by polymorphonuclear leukocytes. J Infect Dis 1994; 170: 82-87.
- 52 Mandell GL. Bactericidal activity of aerobic and anaerobic polymorphonuclear neutrophils. Infect Immun 1974; 9: 337-341.
- 53 Ulrich M, Herbert S, Berger J, Bellon G, Louis D, Münker G, Döring G. Localization of *Staphylococcus aureus* in infected airways of patients with cystic fibrosis and in a cell culture model of *S. aureus* adherence. Am J Respir Cell Mol Biol 1998; 19: 83-91.
- 54 Koch C, Høiby N. Pathogenesis of cystic fibrosis. Lancet 1993; 341: 1065-1069.
- 55 Imundo L, Barasch J, Prince A, Al-Awqati Q. Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 3019-3023.
- 56 Bryan R, Kube D, Perez A, Davis P, Prince A. Overproduction of the CFTR R domain leads to increased levels of AsialoGM1 and increased *Pseudomonas aeruginosa* binding by epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol 1998; 19: 269-277.

- 57 Zar H, Saiman L, Quittell L, Prince A. Binding of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelial cells from patients with various mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator. *J Pediatr* 1995; 126: 230-233.
- 58 Govan JRW, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 1996; 60: 539-574.
- 59 Martin DW, Schurr MJ, Mudd MH, Govan JRW, Holloway BW, Deretic V. Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8377-8381.
- 60 Döring G. State of the art: Serine proteinase inhibitor therapy in α_1 -antitrypsin inhibitor deficiency and cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1999; 28: 363-375.
- 61 Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DWH. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1075-1082.
- 62 Kirchner KK, Wagener JS, Khan TZ, Copenhaver SC, Accurso FJ. Increased DNA levels in bronchoalveolar lavage fluid obtained from infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 1426-1429.
- 63 Birrer P, McElvaney MG, Rudeberg A, Wirz Sommer C, Liechti-Gallati S, Kraemer R, Hubbard R, Crystal RG. Protease-antiprotease imbalance in the lungs of children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 207-213.
- 64 Burns JL, Gibson RL, McNamara S, Yim D, Emerson J, Rosenfeld M, Hiatt P, McCoy K, Castile R, Smith AL, Ramsey BW. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 2001; 183: 444-452.
- 65 Armstrong DS, Grimwood K, Carlin JB, Carzino R, Gutierrez JP, Hull J, Olinsky A, Phelan EM, Robertson CF, Phelan PD. Lower airway inflammation in infants and young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 1197-1204.

- 66 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* 1995; 152: 2111-2118.
- 67 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* 1999; 160: 2040-2047.
- 68 Chmiel JF, Konstan MW, Saadane A, Krenicky JE, Kirchner HL, Berger M. Prolonged inflammatory response to acute *Pseudomonas* challenge in interleukin-10 knockout mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 1176-1181.
- 69 DiMango E, Zar HJ, Bryan R, Prince A. Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. *J Clin Invest* 1995; 96: 2204-2210.
- 70 DiMango E, Ratner AJ, Bryan R, Tabibi S, Prince A. Activation of NF-kappaB by adherent *Pseudomonas aeruginosa* in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. *J Clin Invest* 1998; 101: 2598-2605.
- 71 Engelhardt JF, Yankaskas JR, Ernst SA, Yang Y, Marino CR, Boucher RC, Cohn JA, Wilson JM. Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in the human bronchus. *Nat Genet* 1992; 2: 240-248.
- 72 Sturgess J, Imrie J. Quantitative evaluation of the development of tracheal submucosal glands in infants with cystic fibrosis and control infants. *Am J Pathol* 1982; 106: 303-311.
- 73 Ballard ST, Trout L, Bebök Z, Sorscher EJ, Crews A. CFTR involvement in chloride, bicarbonate, and liquid secretion by airway submucosal glands. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1999; 277: L694-L699.

- 74 Trout L, Gatzky JT, Ballard ST. Acetylcholine-induced liquid secretion by bronchial epithelium: role of Cl⁻ and HCO₃⁻ transport. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1998; 19: L1095-L1099.
- 75 Ballard ST, Trout L, Mehta A, Inglis SK. Liquid secretion inhibitors reduce mucociliary transport in glandular airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283: 336-345.
- 76 Jayaraman S, Joo NS, Reitz B, Wine JJ, Verkman AS. Submucosal gland secretions in airways from cystic fibrosis patients have normal [Na⁺] and pH but elevated viscosity. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98: 8119-8123.
- 77 Joo NS, Irokawa T, Wu JV, Robbins RC, Whyte RI, Wine JJ. Absent secretion to vasoactive intestinal peptide in cystic fibrosis airway glands. *J Biol Chem* 2002; 277: 50710-50715.
- 78 Hyslop PA, Sklar LA. A quantitative fluorimetric assay for the determination of oxidant production by polymorphonuclear leukocytes: its use in the simultaneous fluorimetric assay of cellular activation processes. *Anal Biochem* 1974; 141: 280-286.
- 79 Goldstein W, Döring G. Lysosomal enzymes and proteinase inhibitors in the sputum of patients with cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134: 49-56.
- 80 Klebanoff SJ, Waltersdorff AM, Rosen H. Antimicrobial activity of myeloperoxidase. *Meth Enzymol* 1984; 105: 399-403.
- 81 Aebi H. Catalase *in vitro*. *Meth Enzymol* 1984; 105: 121-126.
- 82 Bergmeyer HU. Zur Messung von Katalaseaktivitäten. *Biochem Z* 1955; 327: 255.
- 83 Döring G, Müller E. Different sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and diphtheria toxin to enzymes from polymorphonuclear leukocytes. *Microbial pathogenesis* 1989; 6: 287-295.

- 84 Jorissen M, van der Schueren B, van den Berghe H, Cassiman J-J. The preservation and regeneration of cilia on human nasal epithelial cells cultured *in vivo*. Arch Otorhinolaryngol 1989; 246: 303-314.
- 85 Holloway BW, Krishnalillai V, Morgan AF. Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. Microbiol Rev 1979; 43: 73-102.
- 86 Meyer KC, Zimmerman J. Neutrophil mediators, *Pseudomonas*, and pulmonary dysfunction in cystic fibrosis. J Lab Clin Med 1993; 121: 654-661.
- 87 May TB, Chakrabarty AM. Isolation and assay of *Pseudomonas aeruginosa* alginate. Meth Enzymol 1994; 235: 295-304.
- 88 Theilacker C, Coleman FT, Mueschenborn S, Llosa N, Grout M, Pier GB. Construction and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide-alginate conjugate vaccine. Infect Immun 2003; 71: 3875-3884.
- 89 Mathee K, Ciofu O, Sternberg C, Lindum PW, Campbell JIA, Jensen P, Johnsen AH, Givskov M, Ohman DE, Molin S, Høiby N, Kharazmi A. Mucoid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. Microbiology 1999; 145: 1349-1357.
- 90 Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, Brinkman FSL, Hufnagle 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* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature 2000; 406: 959-964.
- 91 Cash HA, Woods DE, McCullough B, Johanson WE, Bass JA. A rat model of chronic respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa*. Am Rev Respir Dis 1979; 119: 453-459.

- 92 Starke JR, Edwards MS, Langston C, Bacer CJ. A mouse model of chronic pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia*. *Pediatr Res* 1987; 22: 698-702.
- 93 Fuchs HJ, Borowitz DS, Christiansen DH, Morris EM, Nash ML, Ramsey BW, Rosenstein BJ, Smith AL, Wohl ME. Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. *New Engl J Med* 1994; 331: 637-642.
- 94 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* 1993; 148: 955-960.
- 95 Schidlow DV. Primary ciliary dyskinesia (the immotile cilia syndrome). *Ann Allergy* 1994; 73: 457-468.
- 96 Bazylnski DA, Soohoo CK, Hollocher TC. Growth of *Pseudomonas aeruginosa* on nitrous oxide. *Appl Environ Microbiol* 1986; 51: 1239-1246.
- 97 Carlson CA, Ingraham JL. Comparison of denitrification by *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Paracoccus denitrificans*. *Appl Environ Microbiol* 1983; 45: 1247-1253.
- 98 Hassett DJ. Anaerobic production of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*: alginate restricts diffusion of oxygen. *J Bacteriol* 1996; 178: 7322-7325.
- 99 Chen F, Xia Q, Ju L-K. Aerobic denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* monitored by online NAD(P)H fluorescence. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 6715-6722.
- 100 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* 2005; 73: 3764-3772.

- 101 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* 1984; 160: 928-934.
- 102 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.* 2006; 188: 659-668.
- 103 Doggett RG, Harrison GM, Stillwell RN, Wallis ES. An atypical *Pseudomonas aeruginosa* with cystic fibrosis of the pancreas. *J Pediatr* 1966; 68: 215-221.
- 104 Lam J, Chan R, Lam K, Costerton JW. Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect Immun* 1980; 28: 546-556.
- 105 Li Z, Kosorok MR, Farrell PM, Laxova A, West SHE, Green CG, Collins J, Rock MJ, Splaingard ML. Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. *JAMA* 2005; 293: 581-588.
- 106 Crystal RG. Oxidants and respiratory tract epithelial injury: pathogenesis and strategies for therapeutic intervention. *Am J Med* 1991; 91 (suppl. 3C): 39S-45S.
- 107 Baldwin SR, Simon RH, Grum CM, Ketai LH, Boxer LA, Devall LJ. Oxidant activity in expired breath of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 1986; 1: 11-4.
- 108 Sznajder JI, Fraiman A, Hall JB, Sanders W, Schmidt G, Crawford G, Nahum A, Factor P, Wood LDH. Increased hydrogen peroxide in the expired breath of patients with acute hypoxemic respiratory failure. *Chest* 1989; 96: 606-12.
- 109 Koller DY, Götz M, Eichler I, Urbanek R. Eosinophilic activation in cystic fibrosis. *Thorax* 1994; 49: 496-9.

- 110 Regelman WE, Siefferman CM, Herron JM, Elliott GR, Clawson CC, Gray BH. Sputum peroxidase activity correlates with the severity of lung disease in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1995; 19: 1-9.
- 111 Portal BC, Richard MJ, Faure HS, Hadjian AJ, Favier AE. Altered antioxidant status and increased lipid peroxidation in children with cystic fibrosis. *Am J Clin Nutr* 1995; 61: 843-7.
- 112 Langley SC, Brown RK, Kelly FJ. Reduced free-radical-trapping capacity and altered plasma antioxidant status in cystic fibrosis. *Pediatr Res* 1993; 33: 247-50.
- 113 Roum JH, Buhl R, McElvaney NG, Borok Z, Hubbard RC, Chernick M, Cantin AM, Crystal RG. Cystic fibrosis is characterized by a marked reduction in Glutathione levels in pulmonary epithelial lining fluid. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: A87.
- 114 Döring G, Worlitzsch D. Reaktive Sauerstoffverbindungen und Arachidonsäuremetaboliten polymorphkerniger Leukozyten. *Immun Infekt* 1995; 23: 148-57.
- 115 Karnovsky MJ. Cytochemistry and reactive oxygen species: a retrospective. *Histochemistry* 1994; 102: 15-27.
- 116 Padrines M, Schneider-Pozzer M, Bieth JG. Inhibition of neutrophil elastase by alpha-1-proteinase inhibitor oxidized by activated neutrophils. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139: 783-90.
- 117 Cramton SE, Ulrich M, Götz F, Döring G. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 2001; 69: 4079-4085.
- 118 Cunha MV, Sousa SA, Leitao JH, Moreira LM, Videira PA, Sa-Correia I. Studies on the involvement of the exopolysaccharide produced by cystic fibrosis-associated isolates of the *Burkholderia cepacia* complex in biofilm formation and in persistence of respiratory infections. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3052-3058.

- 119 Hoboth C, Hoffmann R, Eichner A, Henke C, Schmoltdt S, Imhof A, Heesemann J, Hogardt M. Dynamics of adaptive microevolution of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 2009; 200: 118-130.
- 120 McKenney D, Pouliot KL, Wang Y, Murthy V, Ulrich M, Döring G, Lee JC, Goldman DA, Pier GB. Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo-expressed antigen. *Science* 1999; 284: 1523-7.
- 121 Sousa SA, Ulrich M, Bragonzi A, Bruke M, Worlitzsch D, Leitao JH, Meisner C, Eberl L, Sa-Correia I, Döring G. Virulence of *Burkholderia cepacia* complex strains in gp91phox^{-/-} mice. *Cell Microbiol* 2007; 9: 2817-2825.
- 122 Stutts MJ, Knowles MR, Gatzky JT, Boucher RC. Oxygen consumption and ouabain binding sites in cystic fibrosis nasal epithelium. *Pediatr Res* 1986; 20: 1316-20.
- 123 Kolpen M, Hansen CR, Bjarnsholt T, Moser C, Christensen LD, van Gennip M, Ciofu O, Mandsberg L, Kharazmi A, Döring G, Givskov M, Høiby N, Jensen PØ. Polymorphonuclear leukocytes consume oxygen in sputum from chronic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in cystic fibrosis. *Thorax* 2010; 65: 57-62.
- 124 Logan SR. *Physical chemistry for the biomedical sciences*. Taylor & Francis, London, United Kingdom 1998.
- 125 Costerton JW. Anaerobic biofilm infections in cystic fibrosis. *Mol Cell* 2002; 10: 699-700.
- 126 Hassett DJ, Sutton MD, Schurr MJ, Herr AB, Caldwell CC, Matu JO. *Pseudomonas aeruginosa* hypoxic or anaerobic biofilm infections within cystic fibrosis airways. *Trends Microbiol* 2009; 17: 130-138.
- 127 Ramsey DM, Wozniak DJ. Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Mol Microbiol* 2005; 56309-322.

- 128 Ferreira AS, Leitao JH, Silva IN, Pinheiro PF, Sousa SA, Ramos CG, Moreira LM. Distribution of Cepacian biosynthetic genes among environmental and clinical strains of the *Burkholderia* genus and role of this exopolysaccharide on resistance to stress conditions. *Appl Environ Microbiol* 2009, online early, doi:10.1128/AEM.01828-09.
- 129 Pirone L, Bragonzi A, Farcomeni A, Paroni M, Auriche C, Conese M, Chiarini L, Dalmastrri C, Bevivino A, Ascenzioni F. *Burkholderia cenocepacia* strains isolated from cystic fibrosis patients are apparently more invasive and more virulent than rhizosphere strains. *Environment Microbiol* 2008; 10: 2773-2784.
- 130 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* 2004; 48: 2659-2664.
- 131 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* 2005; 24: 577-587.
- 132 Meyer KC. Neutrophils, myeloperoxidase, and bronchiectasis in cystic fibrosis: Green is not good. *J Lab Clin Med* 2004; 144:124-126.
- 133 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* 2007; 65: 1276-1287.
- 134 Guimbellot JS, Fortenberry JA, Siegal GP, Moore B, Wen H, Venglarik C, Chen Y-F, Oparil S, Sorscher EJ, Hong JS. Role of oxygen in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and function. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008; 39: 514-521.

- 135 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.
- 136 Bjarnsholt T, Jensen P, Fiandaca MJ, Pedersen J, Hansen CR, Andersen CB, Pressler T, Givskov M, Høiby N. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol* 2009; 44: 547-558.
- 137 Davies JC, Bilton D. Bugs, biofilms and resistance in cystic fibrosis. *Respir Care* 2009; 54: 628-638.
- 138 Elborn JS. Difficult bacteria, antibiotic resistance and transmissibility in cystic fibrosis. *Thorax* 2004; 59: 914-915.
- 139 Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* 2009; 11: 1034-1043.
- 140 Hassett DJ, Cuppoletti J, Trapnell B, Lyman SV, Rowe JJ, Sun-Yoon S, Hilliard GM, Parvatiyar K, Kamani MC, Wozniak DJ, Hwang SH, McDermott TR, Ochsner UA. Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. *Adv Drug Deliver Rev* 2002; 54: 1425-1443.
- 141 Hill D, Rose B, Pajkos A, Robinson M, Bye P, Bell S, Elkins M, Thompson B, MacLeod C, Aaron SD, Harbour C. Antibiotic susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates derived from patients with cystic fibrosis under aerobic, anaerobic, and biofilm conditions. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5085-5090.
- 142 Kobayashi H, Kobayashi O, Kawai S. Pathogenesis and clinical manifestations of chronic colonization by *Pseudomonas aeruginosa* and its biofilms in the airway tract. *J Infect Chemother* 2009; 15: 125-142.

- 143 Landry RM, An DD, Hupp JT, Singh PK, Parsek MR. Mucin-Pseudomonas aeruginosa interactions promote biofilm formation and antibiotic resistance. *Mol Microbiol* 2006; 59: 142-151.
- 144 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* 2006; 48: 373-380.
- 145 Høiby N. Prevalence of mucoid strains of Pseudomonas aeruginosa in bacteriological specimens from patients with cystic fibrosis and patients with other diseases. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl* 1975; 83: 549-552.
- 146 Anastassiou ED, Mintzas AC, Kounavis C, Dimitracopoulos G. Alginate production by clinical nonmucoid Pseudomonas aeruginosa strains. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 656-659.
- 147 Pier GB, DesJardins D, Aguilar T, Barnard M, Speert DP. Polysaccharide surface antigens expressed by non-mucoid isolates of Pseudomonas aeruginosa from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 1986; 24: 189-196.
- 148 Demko CA, Byard PJ, Davis PB. Gender differences in cystic fibrosis Pseudomonas aeruginosa infection. *J Clin Epidemiol* 1995; 48: 1041-1049.
- 149 Pedersen SS, Espersen F, Høiby N, Jensen T. Immunoglobulin A and immunoglobulin G antibody responses to alginate from Pseudomonas aeruginosa in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 747-755.
- 150 Morissette C, Skamene E, Gervais F. Endobronchial inflammation following Pseudomonas aeruginosa infection in resistant and susceptible strains of mice. *Infect Immun* 1995; 63: 1718-1724.
- 151 O'Reilly T. Relevance of animal models for chronic bacterial airway infections in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 2101-2108.

- 152 Van Heeckeren AM, Tscheikuna J, Walenga RW, Konstan MW, Davis PB, Erokwu B, Haxhiu MA, Ferkol TW. Effect of *Pseudomonas* infection on weight loss, lung mechanics, and cytokines in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 271-279.
- 153 Pier GB, Boyer D, Preston M, Coleman FT, Llosa N, Mueschenborn-Koglin S, Theilacker C, Goldenberg H, Uchin J, Priebe GP, Grout M, Posner M, Cavacini L. Human monoclonal antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* alginate that protect against infection by both mucoid and nonmucoid strains. *J Immunol* 2004; 173: 5671-5678.
- 154 Pedersen SS, Høiby N, Espersen F, Koch C. Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Thorax* 1992; 47: 6-13.
- 155 Anthony M, Rose B, Pegler MB, Elkins M, Service H, Thamothersampillai K, Watson J, Robinson M, Bye P, Merlino J, Harbour C. Genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the sputa of Australian adult cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2772-2778.
- 156 Boucher JC, Yu H, Mudd MH, Deretic V. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: characterization of *muc* mutations in clinical isolates and analysis of clearance in a mouse model of respiratory infection. *Infect Immun* 1997; 65: 3838-3846.
- 157 Harris JK, de Groote MA, Sagel SD, Zemanick ET, Kapsner R, Penvari C, Kaess H, Deterding RR, Accurso FJ, Pace NR. Molecular identification of bacteria in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104: 20529-33.
- 158 Rogers GB, Carroll MP, Serisier DJ, Hockey PM, Jones G, Bruce KD. Characterization of bacterial community diversity in cystic fibrosis lung infections by use of 16S ribosomal DNA terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5176-5183.
- 159 Tunney MM, Field TR, Moriarty TF, Patrick S, Doering G, Muhlebach MS, Wolfgang M, Boucher R, Gilpin DF, McDowell A, Elborn SJ. Detection of anaerobic bacteria in

- high numbers in sputum from patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 995-1001.
- 160 Vandamme PAR. Taxonomy and classification of bacteria. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of clinical microbiology*. 8th ed. Washington, DC: ASM Press; 2003. p. 271-85.
- 161 Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, jr., editors. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Philadelphia-New York: Lippincott 1997.

9 Thesen

- 1 Fast alle Patienten mit cystischer Fibrose (CF, synonym: Mukoviszidose) leiden an chronischen bakteriellen Lungeninfektionen.
- 2 Mit zunehmendem Lebensalter nimmt der Prozentsatz der CF-Patienten mit einer *Pseudomonas aeruginosa*-Lungeninfektion kontinuierlich zu, so dass der größte Teil der CF-Patienten letztlich an einer chronischen *P. aeruginosa*-Pneumonie verstirbt.
- 3 Die exakten Pathomechanismen der Infektion sowie der assoziierten Lungenentzündung sind weitgehend unklar.
- 4 In den der vorliegenden kumulativen Habilitationsschrift zugrundeliegenden Publikationen wird die Bildung von Wasserstoffperoxid im Atemkondensat sowie der Sauerstoffpartialdruck im CF-Sputum untersucht, und der Einfluss dieser beiden Größen auf den Phänotyp und den Genotyp von *P. aeruginosa* sowie auf das Vorhandensein von obligat anaeroben Bakterien nachgewiesen.
- 5 Wasserstoffperoxid im Atemkondensat von CF-Patienten ist im Vergleich zu gesunden Personen nicht erhöht.
- 6 Der Sauerstoffpartialdruck im CF-Sputum ist extrem niedrig. Die anaeroben Verhältnisse werden durch Sauerstoffverbrauch der Bakterien und des CF-Lungenepithels geschaffen.
- 7 Die anaeroben Verhältnisse im CF-Sputum bewirken phänotypisch eine gesteigerte Sekretion des Exopolysaccharids Alginate sowie die Bildung von dreidimensionalen Biofilmen (Mikrokolonien) durch *P. aeruginosa*.
- 8 Genotypisch findet sich die Entsprechung zum Phänotyp in einer anaerob stark hochregulierten Expression der Alginate-Gene von *P. aeruginosa in vitro*, im Mäuselungeninfektionsmodell sowie im CF-Sputum.

- 9 Im Sputum fast aller CF-Patienten können zusätzlich zu den fakultativen Anaerobiern (wie *P. aeruginosa* oder *Staphylococcus aureus*) auch obligat anaerobe Bakterien aus 16 verschiedenen Genera in hohen Keimzahlen nachgewiesen werden.
- 10 Reaktive Sauerstoffverbindungen wie Wasserstoffperoxid spielen bei der chronischen CF-Lungenentzündung eine untergeordnete Rolle.
- 11 Die hypoxischen Verhältnisse im CF-Sputum bewirken, dass die dort in hohen Zahlen vorhandenen neutrophilen Granulozyten keine Sauerstoffradikale bilden können.
- 12 Weil fast alle Antibiotika-Gruppen unter Anaerobiosis schlechter wirksam sind, bewirkt dies den chronischen Verlauf der CF-Lungeninfektion trotz extensiver Antibiotika-Therapie.
- 13 Die massive Sekretion von Exopolysacchariden durch die fakultativen Anaerobier und die Bildung von Mikrokolonien begünstigen zusätzlich die chronische bakterielle Infektion der CF-Lunge.
- 14 Der Beitrag der obligat anaeroben Bakterien zur Pathogenese der CF-Lungenentzündung und -infektion ist bislang unklar.
- 15 Die in dieser Habilitationsarbeit aufgeführten Ergebnisse sind in der "low oxygen"-Hypothese zur Pathogenese der chronischen CF-Lungenentzündung zusammengefasst.

Catalase, myeloperoxidase and hydrogen peroxide in cystic fibrosis

D. Worlitzsch, G. Herberth, M. Ulrich, G. Döring

Catalase, myeloperoxidase and hydrogen peroxide in cystic fibrosis. D. Worlitzsch, G. Herberth, M. Ulrich, G. Döring. ©ERS Journals Ltd 1998.

ABSTRACT: An oxidant-antioxidant imbalance with damaging consequences for the bronchial epithelium has been hypothesized in the airways of patients with cystic fibrosis (CF). It is based on the assumption that neutrophils entering the lumen of the infected airways undergo activation and release toxic oxygen metabolites and myeloperoxidase (MPO), an enzyme which transforms hydrogen peroxide (H_2O_2) into highly toxic oxygen metabolites. Our aims were to substantiate this hypothesis.

H_2O_2 levels were measured in breath condensates of 63 CF patients and 51 normal subjects. In CF sputum samples, activities and concentrations of MPO and catalase (CAT) were determined. MPO/ H_2O_2 -mediated cytotoxicity of CF sputum was measured in cell culture assays.

H_2O_2 levels were similar in CF patients and normal subjects (mean \pm SD 0.97 \pm 0.69 versus 1.11 \pm 0.78 μ M; $p=0.427$). Concentrations and activities of CAT (0.31 \pm 0.18 μ M; 105 \pm 69 units) and MPO (5.93 \pm 4.8 μ M; 87.8 \pm 75 units) were detectable in 38 CF sputa. Addition of H_2O_2 to *in vitro* cells preincubated with CF sputum did not induce cytotoxicity even when CAT was removed from sputum. Sputum MPO together with H_2O_2 did not inactivate α_1 -proteinase inhibitor. Preincubation of MPO with sulphated glycoconjugates or deoxyribonucleic acid (DNA) totally inhibited its cytotoxic effect.

In conclusion, catalase, sulphated glycoconjugates and deoxyribonucleic acid may prevent myeloperoxidase-mediated oxygen radical generation in cystic fibrosis sputum. *Eur Respir J 1998; 11: 377–383.*

Dept of General and Environmental Hygiene, Hygiene-Institut, University of Tübingen, Tübingen, Federal Republic of Germany

Correspondence: G. Döring
Dept of General and Environmental Hygiene Hygiene-Institut
University of Tübingen
Wilhelmstrasse 31
D-72074 Tübingen
Federal Republic of Germany
Fax: 49 7071293011

Keywords: α_1 -proteinase inhibitor
catalase
cystic fibrosis
hydrogen peroxide
myeloperoxidase

Received: April 30 1997
Accepted after revision November 17 1997

Supported in part by a grant for D. Worlitzsch from the German Mukoviszidose e.V., Bonn, and for G. Herberth from the FORTÜNE programme of the University of Tübingen

In cystic fibrosis (CF), the most common autosomal recessive disorder of white populations, abnormal exocrine gland secretions lead to persisting endobronchial bacterial infections [1]. Consequently, large numbers of polymorphonuclear leukocytes (PMN) are recruited to the infected airways where PMN activation and lysosomal enzyme release occur [2]. In particular PMN-elastase (PMN-Ela) has been implicated in chronic lung destruction [2], the major cause of morbidity and mortality in CF, and, consequently, trials of aerosol therapy with α_1 -proteinase inhibitor (α_1 -PI, synonymous: α_1 -antitrypsin) have been initiated [3].

It is not yet certain whether toxic oxygen metabolites produced by stimulated PMN also contribute to lung injury in CF, as has been suggested in other airway diseases [4–7]. However, indirect evidence may support this hypothesis; high sputum concentrations of extracellular myeloperoxidase (MPO), a PMN-derived enzyme which transforms hydrogen peroxide (H_2O_2) into highly reactive oxygen metabolites, have been detected in CF patients [8–11], and lung function has been inversely correlated with MPO levels [9–11]. In addition, increased lipid peroxidation [12], reduced free-radical-trapping capacity [13] and altered plasma antioxidant status [12–14] have been reported to occur in CF patients.

In this study, we have attempted to test this hypothesis by measuring H_2O_2 concentrations in breath condensates of CF patients, to determine in CF sputum samples activities and concentrations of MPO and catalase (CAT), an

enzyme that detoxifies H_2O_2 to oxygen and water, and, also, to investigate a possible cytotoxic effect of CF sputum on cells and on α_1 -PI *in vitro*.

Materials and methods

Patients

A total of 63 CF patients from six German CF clinics were studied. Patients (mean \pm SD (range) age 24 \pm 8 (8–37) yrs, males $n=30$; females $n=33$) had significantly increased sweat electrolyte levels [15], and were chronically infected by *Pseudomonas aeruginosa* ($n=30$) or other pathogens ($n=33$). All patients were receiving pancreatic enzyme replacement therapy, but no anti-inflammatory medication. All hospitalized patients ($n=23$) were being treated with parenteral antibiotics against *P. aeruginosa*. Of the hospitalized patients 10 suffered from acute exacerbations. Mean \pm SD maximal vital capacity (VC_{max}) (75 \pm 19%) and forced expiratory volume in one second (FEV_1) (69 \pm 25%) in the CF patients ranked below normal age-predicted values. A total of 54% of the patients had moderately reduced lung function and 46% had severely reduced lung function. Controls included 51 healthy, nonsmoking subjects (27 \pm 8 (12–61) yrs) and 23 patients with bronchial asthma (36 \pm 16 (12–61) yrs). Informed written consent was obtained from all individuals or their surrogates. The protocol was approved by the Ethics Committee of the University of Tübingen.

Breath collection and H₂O₂ quantification

Breath condensates were collected from 63 CF patients, 51 normal subjects and 23 patients with bronchial asthma. All participants breathed at a normal rate and tidal volume and expired for 15 min into a cooled (2–4°C) sterilized glass tube (Vetter, Ammerbuch, Germany) held at an angle of roughly 45°. Condensate (2–4 mL) was collected in plastic tubes and immediately frozen to -70°C. Condensate H₂O₂ was assayed by the p-hydroxyphenylacetic acid (pHPA)/horseradish peroxidase method [16]. Measurements (excitation 288 nm; emission 405 nm) were carried out in a quartz microcuvette (Type 109.009 F-QS; Perkin-Elmer, Überlingen, Germany) inserted in a thermostatic (37°C) cuvette holder of a LS-50 fluorimeter (Perkin-Elmer): 500 µL condensate, 50 µL pHPA (1.5 mM; Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) and 50 µL horseradish peroxidase (1 mg·mL⁻¹; Sigma-Aldrich), suspended in distilled water and prewarmed to 37°C, were added at 10 s intervals, mixed immediately with a magnetic stirrer inserted in the cuvette, and the reaction followed for 40 s. H₂O₂ was quantitated using a standard curve from 0–10 µM and specified in condensates by quenching (pHPA)₂ formation by addition of 100 ng purified CAT (Sigma-Aldrich) prior to adding horseradish peroxidase, and, in addition, by adding 10 µg rabbit anti-human CAT immunoglobulin (Ig)G (Athens Research Inc, Athens, GA, USA). The minimal detectable H₂O₂ level was 0.01 µM.

Cystic fibrosis sputum preparation

Sputum samples from 38 CF patients were collected and immediately frozen at -70°C. Supernatants were prepared by dilution of the sputum 1:1 (volume/volume (v/v)) with sterile saline. The mixture was homogenized (Unimag ZX, Vetter) and centrifuged at 1,000 revolutions per minute (rpm) at 4°C for 10 min. From nine sputum supernatants (3 mL) CAT was quantitatively removed by adsorption with 0.5 mL of Protein A Sepharose Cl-4B (Pharmacia, Freiburg, Germany) coupled with 2.2 mg of rabbit anti-human CAT IgG (Athens Research Inc) according to the method of the supplier, before the addition of the supernatant to the cells. Heat-inactivation of sputum supernatants was accomplished by heating the 1:10 diluted supernatants for 30 min at 80°C.

Enzyme and total protein quantification

CAT and MPO concentrations in 38 CF sputum supernatants and plasma samples were determined by solid phase radioimmunoassays [8] using purified human CAT (Sigma-Aldrich) or MPO (Wieslab, Lund, Sweden) and rabbit antibodies to human CAT (Athens Research Inc.) or MPO (Merck, Darmstadt, Germany). PMN-Ela concentrations in CF sputum supernatants and in plasma samples from CF patients and healthy individuals were measured using an enzyme linked immunosorbent assay (PMN-Elastase-Test, Merck). MPO activities in sputum supernatants were determined photometrically according to the method of KLEBANOFF [17], following the MPO catalyzed oxidation of guaiacol to tetraguaiacol by H₂O₂. Enzyme units for MPO were determined using the formula:

$$U = (\Delta OD \cdot 4 \cdot V_t \cdot \text{dilution factor}) / (L \cdot \epsilon_{470} \cdot \Delta t \cdot V_s)$$

where ΔOD =density change, V_t = total volume (mL), L = light path (1 cm), ϵ_{470} = extinction coefficient for tetraguaiacol: 26.6 mM⁻¹·cm⁻¹, Δt =time of measurement in min, V_s = sample volume in mL.

CAT activities in sputum supernatants were determined photometrically according to the method of AEBI [18] and BERGMAYER [19], following the decomposition of H₂O₂ by CAT at 240 nm. CAT units were determined using the Lambert-Beer law:

$$\Delta OD = \Delta c \cdot \epsilon \cdot L$$

for the calculation of the reaction speed

$$k = 2.3/30 \text{ s} \cdot \log \Delta c.$$

One IU was defined as

$$13 \cdot k/6.39 \cdot 10^{-3} \text{ s}$$

where $\Delta c = [H_2O_2]$ change, ϵ_{240} = extinction coefficient for H₂O₂: 0.0039 mM⁻¹·mm⁻¹. The minimal detectable levels of CAT, MPO and PMN-Ela in the radioimmunoassays and the enzyme linked immunosorbent assay ranged 5–10 ng·mL⁻¹, whereas the lower detection level in the enzyme activity assays for the three enzymes was 0.5 U. Protein concentrations in CF sputum specimens were determined using the Pierce assay (BCA protein assay reagent; Pierce, Rockford, IL, USA).

Cytotoxicity assays

A total of 1×10⁵ Chinese Hamster Ovary (CHO) cells (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) ACC 110) or human lung carcinoma A-549 cells (DSMZ ACC 107) in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) (Gibco, Eggenstein, Germany), supplemented with 10% foetal calf serum, 1% sodium pyruvate, 1% nonessential amino acids, and 50 µg·mL⁻¹ gentamycin, were seeded for 48 h at 37°C and 5% CO₂ into 96 well flat bottom microtitre plates (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ, USA), washed and then incubated with buffer alone or in various test conditions for 5 h [20]. Cytotoxicity was assessed with 0.025% trypan blue. After 30 min the percentage of blue coloured cells was determined microscopically using a 0.5 mm grid attached to the bottom of each well. A minimum of 1,000 cells were counted in each well.

In addition, human nasal epithelial (HNE) cells were used as primary cell culture system [21]. Nasal polyps were obtained from CF patients undergoing polypectomy. After repeated washings, the polyps were digested with 0.1% pronase (Sigma-Aldrich) in DMEM and Ham's F12 1:1 medium (Gibco) supplemented with penicillin (50 µg·mL⁻¹) (Gibco), streptomycin (50 µg·mL⁻¹) (Gibco) and nystatin (1,000 U·mL⁻¹) (Gibco) overnight at 4°C under continuous rotation. After three washes with culture medium the cells were incubated 1–2 days in DMEM: Ham's F12 1:1 with penicillin (50 µg·mL⁻¹), streptomycin (50 µg·mL⁻¹) and nystatin (1,000 U·mL⁻¹), ultoser G (2%) (Gibco), cholera toxin (10 ng·mL⁻¹) (Sigma-Aldrich), retinoic acid (10⁻⁷ M) (Sigma-Aldrich), at 37°C and 5% CO₂ under continuous rotation for vesicle formation. These 1–2 day old vesicles were used for monolayer culture. They adhered on a collagen coated membrane (Biocoat cell culture inserts; Becton Dickinson) and were grown out as a monolayer. The cells remained in monolayer culture for 10–14 days.

After this time the majority of the cells were not ciliated. For ciliogenesis, vesicles were maintained in a T-25 flask membrane (Becton Dickinson) as a suspension culture on a shaker for 1 week. Later, they were kept stationary in a T-25 flask at 37°C and 5% CO₂. After 4 weeks the vesicles developed cells with cilia with normal ultrastructure and a co-ordinated cilia beating, goblet cells and nonciliated cells. In suspension these cells remained as stable vesicles and spheroids for 3–5 months. Cilia function was assessed by measuring vesicle rpm.

Effect of H₂O₂, MPO and CF sputum supernatant on CHO, A-549 and HNE cells

For negative controls, cells were incubated with 200 µL of buffer or purified MPO (33 nM, 330 nM) or H₂O₂ (150 µM, 1500 µM) for 5 h. In other experiments, cells were preincubated with 100 µL MPO (66 nM, 660 nM) for 1 h before 100 µL of H₂O₂ (300 µM, 3,000 µM) was added for an additional 4 h. In order to determine the minimal CAT concentration which inhibits the cytotoxicity of MPO/H₂O₂, 10 fold dilutions of CAT (0.024 nM–240 µM) were added to the cells before the addition of H₂O₂ and MPO. The potential cytotoxic effect of CF sputum, containing CAT and MPO or deprived of CAT, was tested by preincubating the different cell lines and primary cells with 100 µL diluted (1:10, 1:20) CF sputum supernatants for 1 h before 300 µM H₂O₂ were added for an additional 4 h. Additionally, 100 µL of heat-inactivated CF sputum supernatants, supplemented with 33 µM MPO and 150 µM H₂O₂ was used in CHO cell cytotoxicity assays. Since sputum supernatants contain serine proteinases, including PMN-Ela, which lead to the destruction of the cell monolayer, the 1:10 diluted supernatants were mixed with α₁-PI (0.2 mg/100 µL sputum) for 30 min before the cell experiments were carried out.

Effect of negatively charged substances on the cytotoxicity of the MPO/H₂O₂ system

In order to test the effect of negatively charged substances on the cytotoxic effect of the MPO/H₂O₂ system, 66 nM purified MPO was preincubated for 30 min at 37°C with 1, 10, 100, or 1,000 µg·mL⁻¹ heparan sulphate (Sigma-Aldrich) or chondroitin sulphate (Sigma-Aldrich) or fish sperm deoxyribonucleic acid (DNA) (Serva, Heidelberg, Germany). One hundred microlitres of the mixtures were added to the cells for 1 h before 100 µL of 300 µM H₂O₂ was added for an additional 4 h.

Capacity of α₁-PI to inhibit PMN-Ela in the presence or absence of MPO, CAT, H₂O₂, MPO/H₂O₂ or sputum

For controls, 200 µg of α₁-PI was incubated with buffer or MPO (33 nM) or H₂O₂ (150 µM) or MPO/H₂O₂ for 30 min at 37°C. Then PMN-Ela (Elastin Products, Owensville, Mo, USA) (0.3 nM) was added for 30 min at 37°C. In other experiments, PMN-Ela was added immediately to α₁-PI and MPO/H₂O₂. The total volume of the reaction mixtures was 1 mL. In order to investigate whether enzymatically active MPO present in CF sputum can inactivate added α₁-PI, seven sputum supernatants (diluted 1:20)

containing CAT or nine supernatants quantitatively deprived of CAT were incubated with 200 µg of purified α₁-PI and buffer or H₂O₂ (150 µM) for 30 min at 37°C. Thereafter, PMN-Ela activity was determined in all samples using MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-p-nitroanilide (Bachem, Heidelberg, Germany) as specific chromogenic substrate [8]. One unit was defined as the release of 1 mole p-nitroanilide·min·mL⁻¹ using ε₄₁₀ = 8,800 M⁻¹cm⁻¹.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SAS/STADT (User's Guide, Version 6, 4th edition 1990, SAS Institute, Cary, NC, USA). Raw data were checked for normality using the Shapiro-Wilks-test, thereafter significance was calculated using the Student's t-test or the Wilcoxon-test. Probability values less than 0.05 were considered significant. Correlations were calculated using the square of the Pearson correlation coefficient (r²). Results are given as mean±SD.

Results

The H₂O₂ content of breath condensate was similar in 63 CF patients with moderately to severely reduced lung function and 51 normal subjects (0.97±0.69 versus 1.11±0.78 µM; p=0.427) (fig. 1). In contrast, H₂O₂ levels from 23 patients with bronchial asthma (1.93±1.44 µM) were significantly increased (p<0.009) compared to controls. Adding CAT to condensates quenched the formation of the fluorescent (pHPA)₂ to baseline levels (12.4±3.7%) and addition of CAT antibodies to these samples raised levels again to 87.7±7.1% revealing the fact that actually H₂O₂ was measured (data not shown).

From the 63 CF patients, 38 patients produced sputum. Protein concentrations in CF sputum specimens were 920±379 µg·mL⁻¹. Extracellular concentration of PMN-Ela, a marker of PMN activation, in the 38 CF sputum supernatants was 2.63±1.53 µM (fig. 2a) clearly demonstrating pronounced lung inflammation. Even PMN-Ela (5.43±5.77 nM) in 41 CF plasma samples was significantly higher (p<0.0001) than in 10 healthy individuals (1.33±0.53 nM) (fig. 2a).

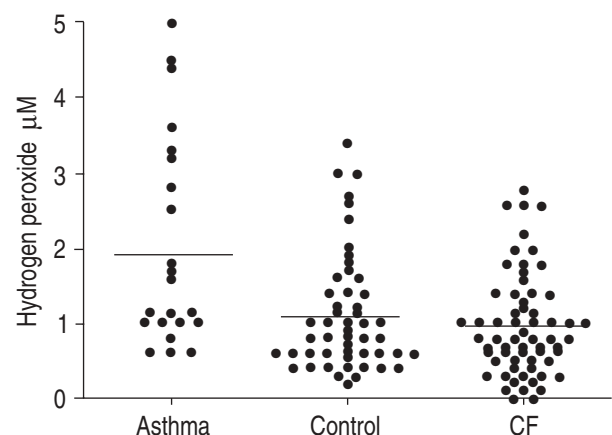


Fig. 1. – Hydrogen peroxide in breath condensates of 23 patients with bronchial asthma, 51 normal healthy controls and 63 patients with cystic fibrosis (CF). Horizontal bars represent mean values.

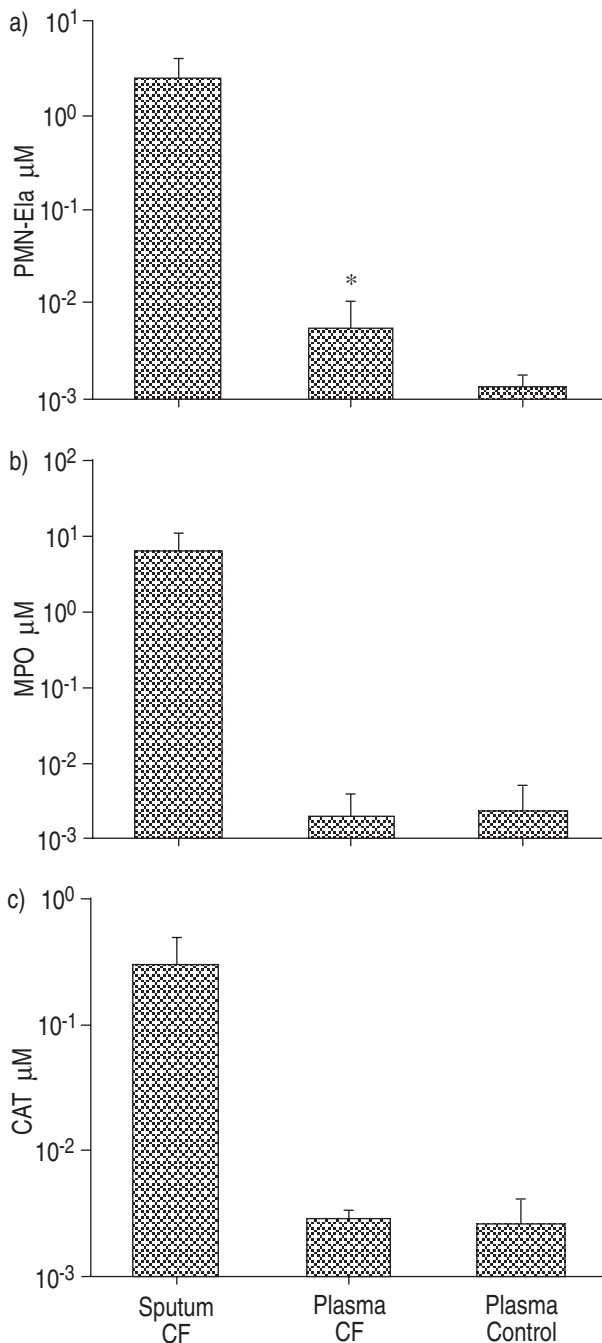


Fig. 2. – Sputum and plasma concentrations of: a) polymorphonuclear leucocyte elastase (PMN-Ela); b) myeloperoxidase (MPO) and; c) catalase (CAT). Bars represent mean \pm SD.

Sputum concentrations of MPO ($5.93\pm 4.8 \mu\text{M}$) (fig. 2b) and CAT ($0.31\pm 0.18 \mu\text{M}$) (fig. 2c) were detectable in 38 CF patients, suggesting that the low H_2O_2 levels in CF breath condensate are a result of the scavenging ability of these enzymes. Concentrations correlated with activities (CAT $105\pm 69 \text{ U}$; MPO $87.8\pm 75 \text{ U}$), giving high correlation coefficients (CAT: $r^2=0.7354$; MPO: $r^2=0.5278$). No significant differences in the concentrations or activities of H_2O_2 , PMN-Ela, MPO or CAT were detected between CF patients who were hospitalized and receiving antibiotics versus clinically stable out-patients. Similarly, disease severity and the infectious status of the patients (e.g.,

patients suffering from *P. aeruginosa* lung infection versus patients without *P. aeruginosa* infection) did not correlate with the measured parameters.

The CAT activities in CF sputa suggested that H_2O_2 in CF sputum undergoes CAT-induced detoxification rather than MPO-induced catalyzation to more toxic oxygen metabolites. Indeed, addition of H_2O_2 to CHO cells preincubated with CF sputum did not induce visible cytotoxicity (fig. 3), although the concentrations of active MPO in the diluted sputa were approximately 10 fold higher than those of purified MPO used for the CHO cell control experiments (fig. 3). As little as 0.24 nM CAT totally inhibited the cytotoxicity induced by $66 \mu\text{M}$ MPO/ $300 \mu\text{M}$ H_2O_2 supporting our notion that catalase is an important scavenger of MPO/ H_2O_2 (fig. 3).

In contrast to CHO cells, HNE vesicles were much more resistant to the effect of purified MPO/ H_2O_2 and did not show any cytotoxicity when incubated with 33 nM MPO/ $150 \mu\text{M}$ H_2O_2 . Therefore, 10 fold higher concentrations (MPO: 330 nM/ H_2O_2 : $1,500 \mu\text{M}$) were used which led to complete inhibition of cilia beating (data not shown). In contrast, cilia beating was not affected by incubating HNE vesicles with sputum specimens.

In order to investigate whether CF sputum supernatants contain other scavengers of reactive oxygen species, we removed CAT from CF sputum by affinity chromatography. Monitoring of CAT activity photometrically revealed that CAT was totally removed from the sputum material (<1 IU). Surprisingly, removal of CAT from sputum supernatants neither caused cytotoxicity nor impaired the cilia beat frequency of HNE cells (fig. 3). Although the MPO activity was reduced to approximately one third after CAT removal due to nonspecific adsorption and dilution, this activity was still much higher than that used for control experiments with purified MPO/ H_2O_2 . Also heat-inactivation of sputum supernatants did not result in visible cytotoxicity when purified MPO/ H_2O_2 was added. These results

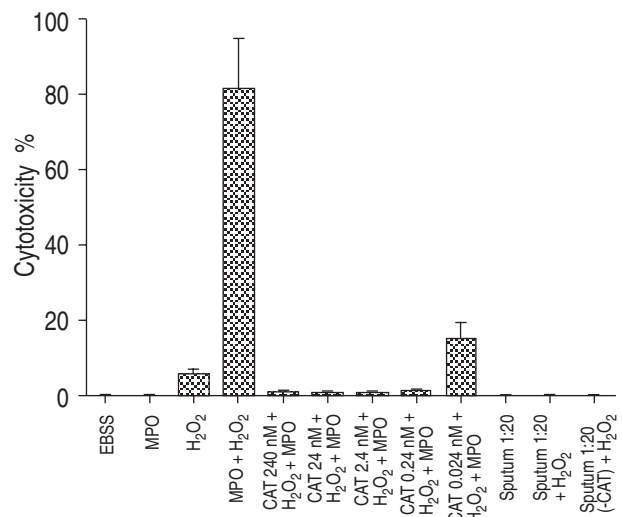


Fig. 3. – Effect of hydrogen peroxide (H_2O_2), myeloperoxidase (MPO) and cystic fibrosis (CF) sputum supernatants on chinese hamster ovary (CHO) cells. CHO cells were incubated with buffer (Earle's balanced salt solution (EBSS)) or different concentrations of purified MPO or H_2O_2 for 5 h. In other experiments, cells were preincubated with different MPO concentrations or diluted sputum supernatant for 1 h before H_2O_2 was added for an additional 4 h. Catalase (CAT) was quantitatively removed from the sputum supernatants of nine CF patients by immunoadsorption.

suggest that the active MPO present in CF sputa is prevented from reaching the surface of the CHO cell monolayer. Binding of MPO which is a highly cationic molecule to negatively charged substances present in sputum may explain this hypothesis.

We therefore preincubated purified MPO with the negatively charged substances heparan sulphate, chondroitin sulphate or fish sperm DNA. Indeed, this incubation totally inhibited the cytotoxic effect of the MPO in the presence of H₂O₂ in a dose-dependent manner (fig. 4). Also heat-inactivated sputum supernatants from seven CF patients which had been supplemented with MPO and H₂O₂ did not reveal a cytotoxic effect on CHO cells.

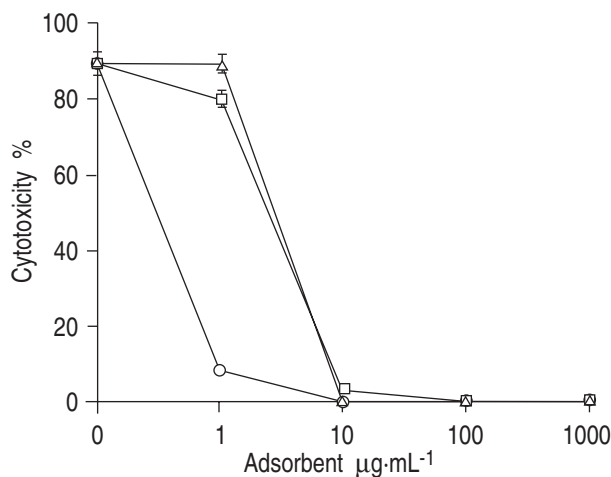


Fig. 4. — Effect of myeloperoxidase (MPO) on Chinese hamster ovary cell cytotoxicity. Purified MPO preincubated with Δ : fish sperm deoxyribonucleic acid; \square : chondroitin sulphate; \circ : heparin sulphate. Values are presented as mean \pm SD of duplicate values of at least seven independent assays.

Table 1. — Capacity of α_1 -proteinase inhibitor (α_1 -PI) to inhibit polymorphonuclear neutrophil elastase (PMN-Ela), purified or present in sputum of cystic fibrosis (CF) patients, in the absence or presence of myeloperoxidase (MPO), catalase (CAT), hydrogen peroxide (H₂O₂) or MPO/H₂O₂

Incubations	After 30 min	PMN-Ela enzyme activity	
		mUnits \pm SD	%
-	PMN-Ela	0.87 \pm 0.04*	100.0
α_1 -PI	PMN-Ela	0.07 \pm 0.01*	8.0
α_1 -PI/MPO	PMN-Ela	0.02 \pm 0.002*	2.2
α_1 -PI/H ₂ O ₂	PMN-Ela	0.02 \pm 0.003*	2.2
α_1 -PI/MPO/H ₂ O ₂	PMN-Ela	0.88 \pm 0.05*	101.1
α_1 -PI/MPO/H ₂ O ₂ /PMN-Ela	-	0.008 \pm 0.001*	0.9
Sputum		1.87 \pm 1.05 ⁺	100.0
Sputum/ α_1 -PI		0.06 \pm 0.06 ⁺	3.2
Sputum/ α_1 -PI/H ₂ O ₂		0.05 \pm 0.06 ⁺	2.7
Sputum (-CAT)		0.43 \pm 0.26 ⁺⁺	23.0
Sputum (-CAT)/ α_1 -PI/H ₂ O ₂		0.01 \pm 0.01 ⁺⁺	0.5

*: coefficients of variation ranged 4.6–15.0%. +: values represent the mean \pm SD of duplicate values of five independent assays for each sputum supernatant from seven CF patients. Coefficients of variation ranged 2.8–13.6% for each of the investigated supernatants. ++: values represent the mean \pm SD of duplicate values of five independent assays for each of the sputum supernatants devoid of CAT from nine CF patients. Coefficients of variation ranged 0–10.0 for each of the investigated sputum supernatants.

Although not cytotoxic, sputum MPO may still be capable of oxidizing the methionine residue at amino acid position 358 (Met³⁵⁸) in the active centre of the serine proteinase inhibitor α_1 -PI, thereby inactivating the inhibitory capacity of α_1 -PI towards PMN-Ela. However, when α_1 -PI was incubated with seven sputum supernatants containing active PMN-Ela and active MPO, and H₂O₂ was added, the inhibitory capacity of α_1 -PI towards PMN-Ela was not affected (table 1). These results were even obtained when nine sputum supernatants were rendered CAT-negative by totally absorbing CAT by affinity chromatography as described above, excluding that H₂O₂ was detoxified by CAT.

A plausible explanation for this surprising result was obtained from experiments using purified enzymes instead of CF sputum. Whereas, as expected, preincubation of purified α_1 -PI with MPO/H₂O₂ for 30 min before addition of PMN-Ela rendered α_1 -PI totally inactive with respect to PMN-Ela inhibition, immediate addition of PMN-Ela to the mixture of α_1 -PI/MPO/H₂O₂ resulted in a complete retention of the inhibitory capacity of α_1 -PI against PMN-Ela (table 1). These results suggest that MPO-induced oxidation/inactivation of α_1 -PI is slower than complex formation between α_1 -PI and PMN-Ela and that MPO-induced oxidation/inactivation of α_1 -PI is inhibited when complexes have been formed.

Discussion

Reactive oxygen metabolites play a pivotal role in host defense during phagocytosis [22], as demonstrated by patients with chronic granulomatous disease, in whom defective reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-oxidase leads to recurrent, life-threatening bacterial infections [23]. However, these metabolites have also been implicated in the pathogenesis of many diseases, particularly ischaemia-reperfusion injury and phagocyte-dependent inflammatory damage [24]. Endobronchial inflammation as a result of bacterial infection is a hallmark of pathogenesis in patients with CF [2]. The hypothesis that PMN, the predominant cell population in the airway lumen, release reactive oxygen metabolites with damaging consequences for host cells and proteins has been widely discussed [25] without being substantiated sufficiently.

In vivo detection of oxygen radicals has been hampered by their short half-life times and high reactivities. Measurement of the relatively long-lived, uncharged and thus volatile H₂O₂ in breath condensates of patients with adult respiratory distress syndrome [4], bronchial asthma [5] and acute hypoxaemic respiratory failure [6] has been successfully used as a direct marker of PMN activation and airway inflammation. This noninvasive technique is considered a valuable tool in the assessment of airway inflammation, particularly in paediatric patients where bronchoalveolar lavage and endobronchial biopsy are unlikely to be used routinely.

Our results clearly show that H₂O₂ is not increased in breath condensates of CF patients compared to healthy controls. This finding is not due to methodological problems, since patients with bronchial asthma who served as controls in the present study revealed significantly increased H₂O₂ levels. Furthermore, the demonstration of elevated levels of PMN-Ela, an accepted marker of PMN activation, in CF plasma and sputum samples indicates that the low H₂O₂ levels in breath condensates cannot be

explained by low or absent airway inflammation within our cohort of CF patients. A more likely explanation is based on the presence of H₂O₂ scavengers in CF airways, particularly as we detected extracellular MPO and CAT in CF sputum. MPO is present in high amounts in PMN [17] which account for 80–90% of the cellular content of CF sputum. Most probably CAT in CF sputum is also derived from de-graded PMN. In contrast, human airways epithelial cells contain relatively low antioxidative enzyme levels and activities [26] and CAT is not induced in these cells [27].

In other diseases of the respiratory tract PMN numbers may be orders of magnitude lower and, consequently, extracellular CAT levels may be orders of magnitude lower. Nevertheless, in such disorders, H₂O₂ levels may still be higher than in normal subjects, since H₂O₂ levels are derived from PMN stimulation rather than from PMN degradation. This hypothesis may explain, why H₂O₂ levels reach significantly higher values compared to normal subjects in patients with adult respiratory distress syndrome [4], bronchial asthma [5], acute hypoxaemic respiratory failure [6] and chronic obstructive pulmonary disease [28].

Here we also addressed the important issue of whether, in CF airways, toxification of H₂O₂ induced by MPO [17, 25] dominates detoxification induced by CAT or *vice versa*. Sputum CAT protected CHO, A-549 or HNE cells from the cytotoxic or ciliostatic effect of MPO/H₂O₂. *In vitro*, as little as 0.24 nM CAT protected CHO cells from 66 µM MPO. Since we determined in CF sputa mean values of 0.31 µM CAT and 5.93 µM MPO, a protective effect of CAT *in vivo* is highly probable.

Thus, our original conclusions [8], as those of others [7, 9–12, 25, 29], that reactive oxygen metabolites would play an important part in the pathogenesis of CF lung disease, may not reflect the situation in the CF airways adequately. The reported negative correlation of MPO levels and CF lung function [9–11] most probably reflects lung damage caused by PMN-derived lysosomal serine proteinases. In contrast to the proven proteinase-antiproteinase imbalance [2, 3, 8] we have found no evidence to support an oxidant-antioxidant imbalance in CF airspace secretions.

Our results do not rule out that reactions involving reactive oxygen species take place in the sputum of CF patients. DNA from decayed PMN may be oxidized to yield the major reaction product, 8-hydroxydeoxyguanosine, and, indeed, this compound has been detected in the urine of CF patients [30]. Likewise, lipids derived from decayed PMN in the sputum rather than from airways epithelial cells, may be oxidized. End products such as malondialdehyde may "escape" to the circulation where it is easily detectable [12]. Based on our results, however, the pathogenic importance of these reactions remains questionable.

MPO may also oxidize taurine to taurine chloramine which in turn may have pathogenic consequences [31]. However, catalase is known to inhibit taurine chloramine formation [31]. Nevertheless, catalase may not be present in very young children with CF in an acute stage of infection/inflammation when sputum is minimal or absent. Furthermore, in some parts of the airways activated PMN may be present, yet sputum may not be formed and, consequently, CAT not be released in sufficient amounts. In such situations, MPO/H₂O₂-mediated tissue damage may occur as it is thought to occur in patients with bronchial

asthma. A similar investigation to ours in such a CF patient group would be required to test this hypothesis.

An alternative possibility which might explain our results of normal H₂O₂ values in CF exhaled breath condensates, is a functional defect of PMN at high densities in a chronic inflammatory situation. For instance, PMN do not generate superoxide anion radicals in the presence of neutrophil elastase [32], a situation which is present in CF as we and others have shown previously [2]. Furthermore, PETERS *et al.* [33] have shown that activation of adherent PMN led to a markedly attenuated release of superoxide anion per cell when neutrophils were activated at high density in comparison with cells activated at low density.

A further possibility is related to the fact that although reactive oxygen species are formed, scavengers other than CAT are present in the CF airways. For example, a high protein burden is present in the CF sputum which may exert scavenging effects for MPO-derived oxidants. We therefore absorbed CAT from CF sputum samples and tested the cytotoxicity of these samples on cell cultures *in vitro*. Indeed, sputum supernatants totally devoid of CAT did not induce cytotoxicity of CHO cells, of HNE cells, or of the cell line A549 when H₂O₂ was added. This suggests that MPO, although present and active in CF sputa, is prevented from reaching the cell surfaces. MPO is a highly cationic enzyme at physiological pH with an isoelectric point (pI) >10 [34] and thus may be complexed by negatively charged mucus glycoproteins (or mucins) such as chondroitin sulphate or heparan sulphate, secreted by goblet cells of the surface epithelium and by submucosal glands into the lumen of the CF airways. Indeed, preincubation of MPO with heparan sulphate or chondroitin sulphate totally inhibited the cytotoxic effect of the MPO in the presence of H₂O₂. These results point to a new protective effect of hypersecretion in the process of inflammation. In this context, it is interesting that PMN-Ela and cathepsin G are potent secretagogues [35].

Alternatively, MPO may be bound by DNA released from decayed PMN in the sputum material [36] and thus may be prevented from exerting toxic effects on epithelial cells.

Although not cytotoxic, sputum MPO may still be capable of oxidizing the methionine residue at amino acid position 358 (Met³⁵⁸) in the active centre of the serine proteinase inhibitor α₁-PI, thereby inactivating the inhibitory capacity of α₁-PI towards elastase [37]. Our results clearly show that Met³⁵⁸ oxidation did not occur. Apparently, complexation of PMN-Ela by α₁-PI which renders Met³⁵⁸ inaccessible for MPO-induced oxidation is faster than MPO-induced oxidation of uncomplexed α₁-PI. This result may have considerable impact on trials of aerosol therapy with α₁-PI in CF: aerosolized α₁-PI may complex PMN-Ela despite the presence of high concentrations and activities of MPO in CF airways.

In summary, our findings reveal a major role for catalase, an enzyme which detoxifies hydrogen peroxide to oxygen and water, as a component of the extracellular antioxidant screen in the cystic fibrosis lung. Furthermore, we have shown that the potentially damaging enzyme, myeloperoxidase, is immobilized within the sputum matrix and is thus prevented from oxidising and inactivating the serine proteinase inhibitor α₁-proteinase inhibitor and from inducing cytotoxicity against lung epithelial cells. These findings have important implications for our understanding of the pathogenesis of cystic fibrosis and for the

development of novel therapeutic strategies to combat inflammatory damage in the cystic fibrosis lung.

Acknowledgements: The authors would like to thank all patients and healthy individuals who participated in this study, M. Stern, Children's Hospital, University of Tübingen, Tübingen, D. Kaiser, Städtische Kinderklinik, Pforzheim, E. Schurmann, Children's Hospital, University of München, München, A. Wolf, Children's Hospital, University of Ulm, Ulm, V. Zenkl, Olghospital, Stuttgart, and M. Schmid, Städtische Kinderklinik, Esslingen, for allowing us to study their CF patients and E. Schülen, Medizinische Klinik, University of Tübingen, for allowing us to study their asthma patients. We are further indebted to H. Bisswanger, University of Tübingen, and J. Hughes, Dept of Medical Microbiology, University of Edinburgh, U.K., for valuable discussions concerning the manuscript.

References

- Højby N. Microbiology of lung infections in cystic fibrosis patients. In: Hodson ME, Geddes DM, eds. *Cystic Fibrosis*. London, Chapman and Hall. 1994: pp. 75–98.
- Döring G, Knight R, Bellon G. Immunology of cystic fibrosis. In: Hodson ME, Geddes DM, eds. *Cystic Fibrosis*. London, Chapman and Hall. 1994: pp. 99–129.
- McElvaney NG, Hubbard RC, Birrer P, et al. Aerosol α_1 -antitrypsin treatment for cystic fibrosis. *Lancet* 1991; 337: 392–394.
- Baldwin SR, Simon RH, Grum CM, Ketai LH, Boxer LA, Devall LJ. Oxidant activity in expired breath of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 1986; 1: 11–14.
- 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* 1993; 148: 955–960.
- Sznajder JJ, Fraiman A, Hall JB, et al. Increased hydrogen peroxide in the expired breath of patients with acute hypoxemic respiratory failure. *Chest* 1989; 96: 606–612.
- Crystal RG. Oxidants and respiratory tract epithelial injury: pathogenesis and strategies for therapeutic intervention. *Am J Med* 1991; 91 (Suppl. 3C): 39S–45S.
- Goldstein W, Döring G. Lysosomal enzymes and proteinase inhibitors in the sputum of patients with cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134: 49–56.
- Meyer KC, Zimmerman J. Neutrophil mediators, *Pseudomonas*, and pulmonary dysfunction in cystic fibrosis. *J Lab Clin Med* 1993; 121: 654–661.
- Regelmann WE, Siefferman CM, Herron JM, Elliott GR, Clawson CC, Gray BH. Sputum peroxidase activity correlates with the severity of lung disease in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1995; 19: 1–9.
- Koller DY, Götz M, Eichler I, Urbanek R. Eosinophilic activation in cystic fibrosis. *Thorax* 1994; 49: 496–499.
- Portal BC, Richard MJ, Faure HS, Hadjian AJ, Favier AK. Altered antioxidant status and increased lipid peroxidation in children with cystic fibrosis. *Am J Clin Nutr* 1995; 61: 843–847.
- Langley SC, Brown RK, Kelly FJ. Reduced free-radical-trapping capacity and altered plasma antioxidant status in cystic fibrosis. *Pediatr Res* 1993; 33: 247–250.
- Roum JH, Buhl R, McElvaney NG, Borok Z, Crystal RG. Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis. *J Appl Physiol* 1993; 75: 2419–2424.
- Wood RE, Boat TF, Doershuk CF. Cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1976; 113: 833–878.
- Hyslop PA, Sklar LA. A quantitative fluorimetric assay for the determination of oxidant production by polymorphonuclear leukocytes: its use in the simultaneous fluorimetric assay of cellular activation processes. *Anal Biochem* 1974; 141: 280–286.
- Klebanoff SJ, Waltersdorff AM, Rosen H. Antimicrobial activity of myeloperoxidase. *Meth Enzymol* 1984; 105: 399–403.
- Aebi H. Catalase *in vitro*. *Meth Enzymol* 1984; 105: 121–126.
- Bergmeyer HU. Zur Messung von Katalaseaktivitäten. *Biochem Z* 1955; 327: 255.
- Döring G, Müller E. Different sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and diphtheria toxin to enzymes from polymorphonuclear leukocytes. *Microbial pathogenesis* 1989; 6: 287–295.
- Jorissen M, van der Schueren B, van den Berghe H, Cassiman J-J. The preservation and regeneration of cilia on human nasal epithelial cells cultured *in vivo*. *Arch Otorhinolaryngol* 1989; 246: 303–314.
- Karnovsky MJ. Cytochemistry and reactive oxygen species: a retrospective. *Histochemistry* 1994; 102: 15–27.
- Gallin JI, Leto TL, Rotrosen D, Kwong CH, Malech HL. Delineation of the phagocyte NADPH oxidase through studies of chronic granulomatous diseases of childhood. *Curr Opin Immunol* 1991; 4: 53–56.
- Weiss SJ. Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol Scand* 1986; Suppl. 548: 9–37.
- Cantin A, Woods DE. Protection by antibiotics against myeloperoxidase-dependent cytotoxicity to lung epithelial cells *in vitro*. *J Clin Invest* 1993; 91: 38–45.
- Pietarinen P, Raivio K, Devlin RB, Crapo JD, Chang L-Y, Kinnula VL. Catalase and glutathione reductase protection of human alveolar macrophages during oxidant exposure *in vitro*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 13: 434–441.
- Yoo JH, Erzurum SC, Hay JG, Lemarchand P, Crystal RG. Vulnerability of the human airway epithelium to hypoxia. Constitutive expression of the catalase gene in human bronchial epithelial cells despite oxidant stress. *J Clin Invest* 1994; 93: 297–302.
- Dekuijzen PNR, Aben KKH, Dekker I, et al. Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 813–816.
- Mohammed JR, Mohammed BS, Pawluk LJ, Bucci DM, Baker NR, Davis WB. Purification and cytotoxic potential of myeloperoxidase in cystic fibrosis sputum. *J Lab Clin Med* 1988; 112: 711–720.
- Brown RK, McBurney A, Lunec J, Kelly FJ. Oxidative damage to DNA in patients with cystic fibrosis. *Free Radic Biol Med* 1995; 18: 801–806.
- Weiss SJ, Klein R, Slivka A, Wei M. Chlorination of taurine by human neutrophils. Evidence for hypochlorous acid generation. *J Clin Invest* 1982; 70: 598–607.
- Döring G, Goldstein W, Botzenhart K, et al. Elastase from polymorphonuclear leukocytes - a regulatory enzyme in immune complex disease. *Clin Exp Immunol* 1986; 64: 597–605.
- Peters SP, Cerasoli F, Jr., Albertine KH, Gee MH, Berd D, Ishihara Y. "Autoregulation" of human neutrophil activation *in vitro*: regulation of phorbol myristate acetate-induced neutrophil activation by cell density. *J Leukoc Biol* 1990; 47: 457–474.
- Agner K. Verdoperoxidase. A ferment isolated from leukocytes. *Acta Physiol Scand* 1958; 2 (Suppl. 8): 1–62.
- Sommerhoff, CP, Nadel JA, Basbaum CB, Caughey GH. *J Clin Invest* 1990; 85: 682–689.
- Picot R, Das I, Reid L. Pus, deoxyribonucleic acid, and sputum viscosity. *Thorax* 1978; 33: 235–242.
- Matheson NR, Wong PS, Travis J. Enzymatic inactivation of human alpha-1-proteinase inhibitor by neutrophil myeloperoxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 1979; 88: 402–409.

Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients

Dieter Worlitzsch,¹ Robert Tarran,² Martina Ulrich,¹ Ute Schwab,² Aynur Cekici,¹ Keith C. Meyer,³ Peter Birrer,⁴ Gabriel Bellon,⁵ Jürgen Berger,⁶ Tilo Weiss,⁷ Konrad Botzenhart,¹ James R. Yankaskas,² Scott Randell,² Richard C. Boucher,² and Gerd Döring¹

¹Institute of General and Environmental Hygiene, University of Tübingen, Tübingen, Germany

²Cystic Fibrosis/Pulmonary Research and Treatment Center, The University of North Carolina, Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, USA

³Department of Medicine, University of Wisconsin, Madison Medical School, Madison, Wisconsin, USA

⁴Department of Pediatrics, Inselspital, University of Berne, Berne, Switzerland

⁵Service de Pédiatrie, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Pierre-Bénite, France

⁶Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen, Germany

⁷Institute of Physical and Theoretical Chemistry, University of Tübingen, Tübingen, Germany

Address correspondence to: Richard C. Boucher, Cystic Fibrosis/Pulmonary Research and Treatment Center, 7011 Thurston-Bowles Building, CB 7248, The University of North Carolina, Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina 27599, USA. Phone: (919) 966-1077; Fax: (919) 966-7524; E-mail: rboucher@med.unc.edu.

Dieter Worlitzsch, Robert Tarran, and Martina Ulrich contributed equally to this work.

Richard C. Boucher and Gerd Döring contributed equally to this work as senior authors.

Received for publication July 31, 2001, and accepted in revised form December 19, 2001.

Current theories of CF pathogenesis predict different predisposing “local environmental” conditions and sites of bacterial infection within CF airways. Here we show that, in CF patients with established lung disease, *Pseudomonas aeruginosa* was located within hypoxic mucopurulent masses in airway lumens. In vitro studies revealed that CF-specific increases in epithelial O₂ consumption, linked to increased airway surface liquid (ASL) volume absorption and mucus stasis, generated steep hypoxic gradients within thickened mucus on CF epithelial surfaces prior to infection. Motile *P. aeruginosa* deposited on CF airway surfaces penetrated into hypoxic mucus zones and responded to this environment with increased alginate production. With *P. aeruginosa* growth in oxygen restricted environments, local hypoxia was exacerbated and frank anaerobiosis, as detected in vivo, resulted. These studies indicate that novel therapies for CF include removal of hypoxic mucus plaques and antibiotics effective against *P. aeruginosa* adapted to anaerobic environments.

J. Clin. Invest. 109:317–325 (2002). DOI:10.1172/JCI200213870.

Introduction

Lung infections with *Pseudomonas aeruginosa* constitute the predominant disease phenotype in cystic fibrosis (CF) patients (1). Despite a vigorous and rapid influx of functional peripheral blood neutrophils into infected CF airways (2) accompanied by the production of high titers of specific Ab's, *P. aeruginosa* infections become chronic (3), airways are destroyed, and lung function declines.

Several hypotheses have been offered to explain the failure of mucosal defense and the high prevalence of *P. aeruginosa* in the CF lung. Most hypotheses have focused on bacterial infection of CF airway epithelia, mediated by an increased binding of *P. aeruginosa* to the surfaces of CF airway epithelial cells (4, 5) impaired internalization and killing of *P. aeruginosa* by CF airway epithelia due to the absence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) at the apical surface (6), or “high-salt”-mediated defensin inactivation (7). In contrast, the reduced air-

way surface liquid (ASL) volume (impaired mucus clearance) hypothesis predicts infection by *P. aeruginosa* and other pathogens of stationary mucus adherent to airway surfaces.

As an approach to distinguish among these hypotheses, we sought to identify the site of *P. aeruginosa* infection in freshly excised CF airways, differentiating between the intraluminal (mucus) and epithelial surface compartments. Based on our observations that *P. aeruginosa* resided in the intraluminal contents, we asked what conditions confronted *P. aeruginosa* in this microenvironment in vivo in CF patients, focusing on O₂ availability. We extended these studies to investigate in vitro whether airway mucus hypoxia (O₂ gradients) was present in thickened CF mucus before infection and whether steep O₂ gradients within mucus were unique to the CF genotype. Finally, we explored the hypotheses that (a) bacteria deposited on airway surfaces penetrate into hypoxic mucus, and (b) *P. aeruginosa* responses to

hypoxia, e.g., increased alginate production, may favor its persistence in the CF lung.

Methods

Study subjects: normal, CF, and disease controls. Lungs from seven CF patients chronically infected with *P. aeruginosa* were obtained for morphometric analyses after lung transplantation (five males and two females, mean age 29.5 years; Cystic Fibrosis/Pulmonary Research and Treatment Center, University of North Carolina, Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, USA) or after lobectomy (two females, mean age 8 years; Service de Pédiatrie, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Pierre-Bénite, France). Nasal polyps from four CF patients (mean age 14.3 years; Ear, Nose and Throat Clinic, Klinikum Ludwigshafen, Germany), and from four non-CF individuals (mean age 46.5 years; Ear, Nose and Throat Clinic, University of Tübingen, Germany) were used for spheroid cell cultures. Cells for planar cell cultures were obtained from seven normal lung transplant donors (four males, three females, mean age 42 ± 6 years), eight CF lung transplant recipients (four males, three females, mean age 34 ± 3 years), and two primary ciliary dyskinesia (PCD) lung transplant recipients (one male, one female, ages 15 and 50 years, respectively). For in vivo oxygen partial pressure (pO_2) measurements, six CF patients (two males, four females, mean age 23.8 years; mean forced expiratory volume in one second, 55.7% predicted) were studied. Data were successfully obtained from three patients. Informed consent was obtained from all patients and/or parents, and all parts of the study were approved by the local ethical committees.

Bacterial strains. PAO1 (8) bacteria were grown for adhesion experiments in vitro overnight at 37°C in 5 ml Trypticase soy broth (TSB; Oxoid Ltd., Basingstoke, United Kingdom). A bacterial suspension ($10\text{--}50\ \mu\text{l}$) of the overnight culture ($OD_{600\text{nm}}$ 0.05) was inoculated into 5 ml fresh TSB medium and the bacteria cultured until the $OD_{600\text{nm}}$ of 1.5 was reached. For confocal microscopy studies, the *P. aeruginosa* strain ATCC 27853 was used. For alginate measurements, 15 genetically different non-CF (environmental) strains of *P. aeruginosa* as well as PAO1 were analyzed, and for growth in ASL, PAO1 and *P. aeruginosa* ATCC 700829 were tested. PAO1 grown in TSB was used for O_2 measurements.

Microscopy of lung sections. Immediately after resection, lung tissues were cut into 0.5-cm^3 cubes and fixed in 2.5% glutaraldehyde, 10% formaldehyde, or shock-frozen in liquid nitrogen. For immunofluorescence, thin sections ($5\text{--}10\ \mu\text{m}$) were prepared from shock-frozen lung tissues and *P. aeruginosa* identified in bronchi/bronchioli with polyclonal rabbit IgG specific for whole *P. aeruginosa* cells; then incubation occurred with indocarbocyanin-conjugated (Cy3-conjugated) goat anti-rabbit IgG (Dianova, Hamburg, Germany), diluted 1:500. Eight sections from each of nine separate CF lung samples (72 sections total) were analyzed for *P. aeruginosa* location, using the KS300

Imaging System (Kontron Electronic GmbH, Eching, Germany). For transmission electron microscopy (TEM), segmental bronchi ($\sim 6.5\text{-mm}$ sections) from nine CF lungs were postfixed in O_5O_4 , thin sections cut, and uracyl acetate/lead citrate stained. For scanning electron micrographs, specimens were processed as described previously (9). Squares (406) from 14 bronchi from two CF lungs were analyzed for binding of *P. aeruginosa* to the epithelium.

Adhesion of *P. aeruginosa* to mucus adherent to primary nasal epithelial spheroids. The spheroid cell culture system was used as described previously (9). To collect secreted mucus, spheroids were incubated in DMEM/Ham's F12 medium (Life Technologies Inc., Heidelberg, Germany) depleted of antibiotics and antimycotics for 5 days, supernatant collected by centrifugation (225 g), and stored at -20°C until use.

Spheroids (8 weeks; four CF and four normal [NL]), suspended in DMEM/Ham's F12 medium, were incubated with *P. aeruginosa* at a cell/bacteria ratio of 1:100 for 2 hours/ 37°C / 5% CO_2 . In some experiments, mucus was removed from spheroids by prewashing with PBS. After incubation with *P. aeruginosa*, spheroids were washed using a cell strainer (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). Twenty to 30 spheroids per individual were analyzed for adherence of *P. aeruginosa* by scanning electron microscopy (9).

P. aeruginosa was incubated with spheroid supernatants containing mucus for 2 hours at 37°C / 5% CO_2 . After washing, bacteria were fixed on coverslips, incubated with a mAb to human mucins, washed, incubated with a Cy3-conjugated goat anti-mouse IgG (DAKO Corp., Hamburg, Germany) for 40 minutes at 23°C , washed with water, and embedded in Permafluor (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA).

Fiberoptic bronchoscopy. Fiberoptic bronchoscopy was performed as described previously (2) with minor modifications. For in vivo pO_2 measurements, a computerized Clark type oxygen probe (length: 65 cm; outer diameter: 2 mm; inner diameter: 0.4 mm; Licox pO_2 ; GMS, Kiel, Germany) was fixed to the tip of the bronchoscope and guided under video control into right upper lobes obstructed with mucopurulent material.

Planar, primary bronchial culture system. Human airway epithelial cells were obtained from freshly excised bronchi by protease digestion (10), seeded directly on 12-mm Transwell Col membranes (Corning-Costar Corp., Cambridge, Massachusetts, USA) in modified bronchial epithelial growth medium under air-liquid interface conditions and studied when fully differentiated (2–5 weeks; transepithelial resistance of $\geq 350\ \Omega\ \text{cm}^2$).

Measurement of ASL pO_2 —planar bronchial cultures. O_2 microelectrodes were purchased from Diamond General Development Corp. (Ann Arbor, Michigan, USA). The O_2 microelectrode and 3 M KCl reference electrode were advanced into ASL with micromanipulators as described previously (11).

Confocal microscopy measurements of ASL/*P. aeruginosa*. PBS ($30\ \mu\text{l}$) containing 2 mg/ml Texas Red-dextran (10

kDa; Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, USA) was added to CF cultures 2–48 hours before the addition of bacteria or fluorescent beads (1 μm ; Molecular Probes Inc.) as described previously (12). For all studies, perfluorocarbon (FC-77, 3M Co., St. Paul, Minnesota, USA) was added to the mucus surface to prevent ASL evaporation.

P. aeruginosa bacteria were suspended in 3 ml PBS (OD₄₇₀ of 0.15 [$\sim 10^7$ CFU/ml]) and incubated with 5 μM SYTO 13 (Molecular Probes Inc.) for 1 hour at 37°C. The bacterial suspension was washed once in PBS, centrifuged, and the pellet resuspended in PBS (100 μl).

Bacterial growth and production of alginate by *P. aeruginosa* in aerobic and anaerobic culture conditions. To determine whether *P. aeruginosa* is able to grow in freshly harvested ASL from CF and NL well-differentiated cultures (11) under aerobic and anaerobic (anaerobic chamber from Coy Laboratory Products, Gross Lake, Michigan, USA) conditions, a small number of bacteria (~ 100 –200 CFU/0.5 μl) of PAO1 or the environmental *P. aeruginosa* strain (ATCC 700829) was added to 30 μl of ASL in parallel in two titer plates. For these experiments, the bacteria were grown on sheep blood agar overnight, suspended in PBS, with this suspension adjusted to an OD_{470nm} of 0.15, diluted 1:100 in PBS, and starved for 2 hours before addition to ASL. Titer plates were incubated aerobically and anaerobically for 72 hours at 37°C. To determine the number of bacteria in ASL, samples were serially diluted and plated onto agar.

We next measured the alginate mass/bacterial protein mass under aerobic and anaerobic conditions, using

anaerobic jars and Anaerocult A (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), with strain PAO1 and 15 environmental *P. aeruginosa* strains grown on *Pseudomonas* isolation agar (PIA). After 4 days of growth, the bacteria were rinsed with water from the plates and the alginate was measured by the carbazole assay (13). Uronic acids were quantified using a standard curve of alginate purified from *Macrocystis pyrifera* (Sigma Chemical Co.), followed by the BCA protein assay to estimate bacterial protein mass (Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois, USA). In parallel, we visualized *P. aeruginosa* alginate by immunostaining PAO1, grown on Columbia sheep blood agar and fixed on slides, with rabbit antiserum specific for *P. aeruginosa* alginate followed by Cy3-labeled goat anti-rabbit IgG (Dianova).

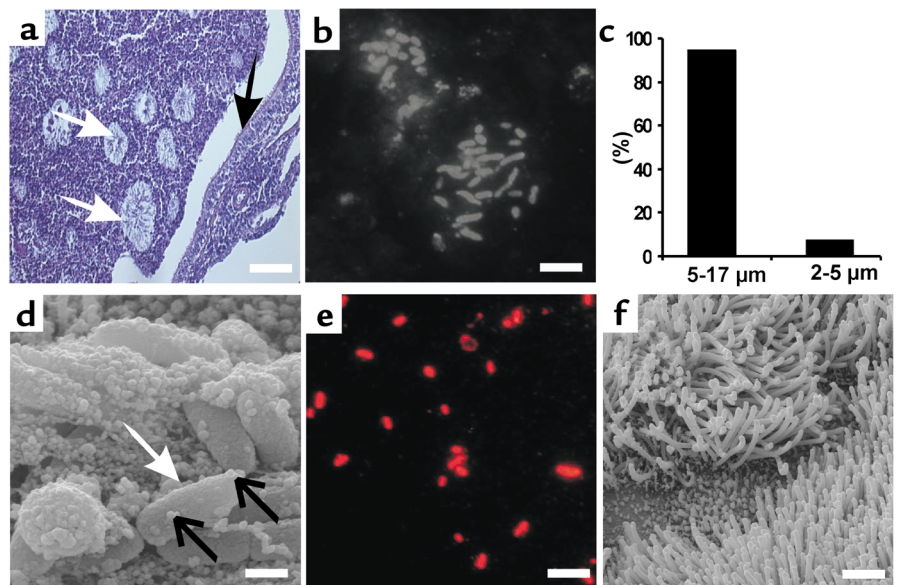
Finally, we examined the role of nitrate as a terminal electron acceptor in alginate production under aerobic versus anaerobic conditions. PAO1 was grown on PIA agar plates (63 μM nitrate without added nitrate) to which a range of KNO₃ was added (10 μM –100 mM), and after 4 days of growth, alginate and bacterial protein was quantitated as above.

Measurements of ASL total nitrate concentration. Total nitrate (nitrite/nitrate) concentrations in CF and NL ASL (each CF/NL sample was obtained from pooled ASL collections from cultures derived from ten or more different subjects) were measured in 10 μl aliquots using a Nitric Oxide Analyzer (Sievers Model 280b, Ionic Instrument Business Group, Boulder, Colorado, USA).

Bacteria and in vitro measurements of pO₂. Using the Licox oxygen probe, pO₂ was measured at 37°C in sus-

Figure 1

P. aeruginosa is localized in intraluminal material of freshly excised CF airways and binds to mucus. (a) Thin section of an obstructed CF bronchus, stained with hematoxylin/eosin. Note the absence of *P. aeruginosa* on epithelial surface (black arrow) and presence of *P. aeruginosa* macrocolonies within intraluminal material (white arrows). Blue gap is an artifact due to fixation. (b) *P. aeruginosa* within macrocolonies in a lung section, stained with rabbit Ab's against *P. aeruginosa*. Bars: a, 100 μm ; b, 10 μm . (c) Percentage of bacteria detected at a distance of 2–5 μm or 5–17 μm from the epithelial surface of lungs from nine CF patients. Shrinkage artifacts were subtracted from calculated distances. (d) Scanning electron micrograph of mucus-coated spheroid derived from CF respiratory epithelium. *P. aeruginosa* (white arrow) were enmeshed in mucus (black arrows) following a 2-hour incubation. (e) Immunofluorescent staining of mucins (anti-mucin Ab) bound to *P. aeruginosa* strain PAO1 in vitro. (f) Spheroid with adherent mucus removed by prewash, then incubated with *P. aeruginosa* for 2 hours. Note the absence of bacteria on ciliated epithelial cell surfaces. Bars: d, 0.6 μm ; e, 4 μm ; f, 2.5 μm . Quantitative comparisons of PAO1 binding revealed higher binding to mucus-coated NES from normal subjects (21.3 ± 10.6 bacteria/NES) versus non-mucus-coated (washed) NES (7.1 ± 0.1 bacteria/NES) ($n = 6$; 3 normal subjects; $P < 0.05$). Importantly, these values were not different for CF NESs (26.4 ± 4.1 bacteria/NES for mucus-coated NESs; 7.7 ± 3.9 bacteria/NES for washed NESs).



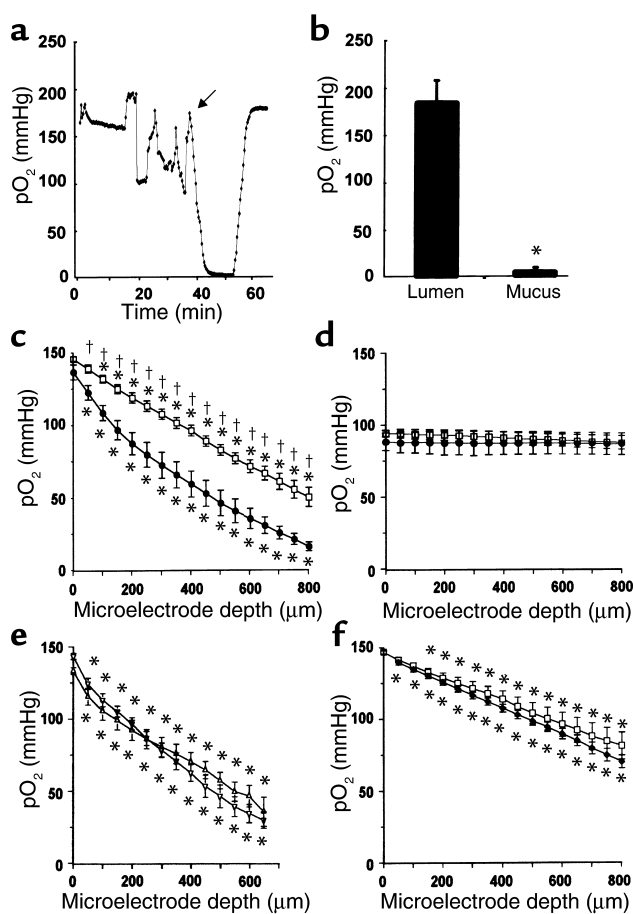


Figure 2

Oxygen partial pressure (pO_2) CF airways in vivo and in thick films of ASL on human airway epithelial cultures. (a) pO_2 in CF airways. First 30 minutes represents measurement in a nonobstructed region of the airway lumen. The arrow indicates insertion of oxygen probe into a mucopurulent mass. The pO_2 returned to basal values after probe retraction from the adherent mass into the nonobstructed airway region. (b) pO_2 in nonobstructed CF airway lumens (L) and CF mucopurulent masses (M) in vivo. $n = 3$ CF subjects; $*P = 0.001$. (c) Plots of pO_2 gradients under thick film conditions at 37°C in NL (squares; eight cultures/five subjects) and CF cultures (circles; six cultures/four subjects). (d) pO_2 gradients under thick film conditions measured at 4°C in NL (squares; five cultures/three subjects) and CF cultures (circles; five cultures/three subjects). (e) pO_2 gradients in CF mucus that had accumulated for 48 hours on CF culture surfaces and had become stationary due to volume hyperabsorption (inverted triangles). Mucus transport was restored in these cultures by addition of $30\ \mu\text{l}$ PBS, and pO_2 gradients remeasured 1–2 hours later (triangles; six cultures; three subjects each). (f) Comparison of pO_2 gradients in NL (squares; nine cultures/six subjects) and PCD (diamonds; five cultures/two subjects) cultures under thick film conditions. Data are shown as mean \pm SEM. *Significantly different ($P < 0.05$) from pO_2 at the air-liquid interface ($0\ \mu\text{m}$). †Significant difference ($P < 0.05$) between NL and CF.

pensions of PAO1 grown aerobically in TSB (Oxoid Ltd.). The pO_2 was also measured in heat-inactivated washed bacterial cultures at 10^8 CFU/ml.

Statistics. Unless otherwise stated, all data are presented as mean \pm SEM. ANOVA (followed by the Tukey test) was used as appropriate. In the case of nonhomogeneity of variance, ANOVA followed by either Dunn's multiple comparison test, the Mann-Whitney U test, or the Wilcoxon signed rank test were used.

Results

P. aeruginosa is intraluminally located in CF airways. Analyses of CF lungs revealed evidence for growth of *P. aeruginosa* predominantly as spherical intraluminal colonies (Figure 1) (14). We have elected to refer to these spherical colonies as "macrocolonies," because many are visible ($>100\ \mu\text{m}$ in diameter) to the naked eye. We used three separate techniques to test whether macrocolonies were localized to intraluminal mucus/mucopurulent material versus epithelial cell surfaces in CF lungs. First, immunolocalization in thin sections from nine different CF lungs revealed most bacteria (94.5%) were localized within the airway lumen 5–17 μm distant from the epithelial cell surface and the remainder in the zone 2–5 μm from the epithelial surface (Figure 1c). None were identified in contact with epithelial cells. Second, no *P. aeruginosa* bacteria were observed attached to airway

epithelia in TEMs of bronchi from nine CF patients, containing a total length of 300 mm of bronchial surfaces. Third, scanning electron microscopy detected no bacteria on bronchial epithelia from two patients (total surface area examined: $116.1\ \text{mm}^2$).

P. aeruginosa binding to mucus versus airway epithelial cell membranes in vitro. We also tested the hypothesis that *P. aeruginosa* binds to mucus rather than airway epithelial cells in vitro. Nasal epithelial spheroids (NESs) spontaneously produce mucin, a fraction of which adheres to ciliated cells (9). Incubation of *P. aeruginosa* PAO1 with NESs revealed that the bacteria were enveloped by the mucus attached to NESs (Figure 1d). Mucin binding was also demonstrated by incubating *P. aeruginosa* with mucins secreted by NESs (Figure 1e). In contrast, washing NESs to remove adherent mucins greatly reduced *P. aeruginosa* binding (Figure 1f).

O₂ is depleted within Pseudomonas-infected intraluminal mucopurulent masses in vivo. The pO_2 in CF mucopurulent masses in vivo was measured by inserting an O_2 electrode directly into the right upper lobar bronchi of chronically infected CF patients (Figure 2a). When the probe was in the bronchial lumen, the pO_2 reached approximately 180 mmHg, a value consistent with the supplemental O_2 administered during bronchoscopy. Upon probe insertion into the mucopurulent material obstructing the lobar bronchus, the pO_2 declined rapidly to a mean value of 2.5 mmHg (Figure 2b).

In vitro analyses of the genesis of O_2 gradients in uninfected ASLs. The diffusion of O_2 through liquids is slow compared with air (15) so that the hypoxia measured within the mucopurulent luminal masses could reflect, in part, restricted O_2 diffusion through thickened intraluminal liquids. Although bacteria or neutrophils likely consume O_2 and contribute to the low pO_2 measured

in mucopurulent luminal masses in vivo (see below), it is possible that the O₂ consumption of the underlying CF epithelium uniquely contributes to mucus O₂ gradients before infection.

To test the hypothesis that airway epithelial O₂ consumption generates O₂ gradients in liquid films that mimic in height mucus accumulated on CF airway surfaces (16), we measured O₂ gradients in NL and CF airway epithelia covered by an approximately 800- μ m thick ASL (PBS). NL airway epithelia generated measurable O₂ gradients at 37°C in this layer (Figure 2c). However, the pO₂ gradient was significantly steeper in CF cultures (Figure 2c). Both NL and CF ASL O₂ gradients were abolished at 4°C, suggesting that the gradients indeed reflected epithelial O₂ consumption (Figure 2d).

Next, we asked whether the presence of mucins within ASL and mucus transport were important determinants of O₂ gradients under these thick film conditions. No differences in O₂ gradients were observed in CF cultures with or without rotational mucus transport (Figure 2e). Thus, we conclude that neither the presence of mucus, nor mixing, which occurs as a consequence of mucus transport in situ (17), are important contributors to O₂ gradients measured within ASL. Rather, the gradient reflects ASL depth and rate of epithelial O₂ consumption.

Do CF airway epithelia generate disease-specific steeper O₂ gradients within ASL? We measured the O₂ gradients in cultures derived from patients with primary ciliary dyskinesia (PCD), a genetic disease of ciliary motility characterized by chronic airways infection (18). The pO₂ gradients in PCD ASL resembled that of normal cultures and were shallower than CF ASL gradients (compare Figure 2, f and c). Thus, it appears that the ability to generate steep O₂ gradients within ASL reflected a unique feature of CF airway epithelia.

Will bacteria deposited on mucus surfaces penetrate to hypoxic zones in mucus layers? If bacteria contained within inhaled droplet aerosols deposit and remain on the surface of the mucus layer, then bacteria would be persistently exposed to normoxic environments. Conversely, if inhaled bacteria move (“swim”) into the mucus layer, they may face low pO₂. Two sets of experiments were designed to distinguish between these possibilities.

First, we examined the behavior of bacteria contained in small volumes (25 nl), designed to mimic aerosol droplets, deposited on the surface of CF airway epithelial cultures that exhibited rotational mucus transport. At the earliest time point measurable (3 minutes), motile *P. aeruginosa* penetrated into the mucus layer (Figure 3a). We next asked whether bacterial penetration into mucus reflected bacterial motility or mucus mixing in the vertical axis during rotational surface (horizontal) mucus transport (17). Fluorescently labeled beads deposited on the airway surface exhibited similar kinetics of penetration into the mucus layer, suggesting turbulent flow within the mucus layer accounted for penetration to hypoxic zones (Figure 3b).

Second, we tested whether motile *P. aeruginosa* could penetrate mucus masses adherent to CF airway surfaces. Within 15 minutes, *P. aeruginosa* had penetrated deep into the mucus (compare Figure 3, c with d). In contrast, fluorescent beads remained on the surface of the mucus plaque (compare Figure 3, e with f), suggesting that bacterial motility was required for *P. aeruginosa* penetration into hypoxic zones within stationary mucus masses.

Response of P. aeruginosa to a hypoxic environment. *P. aeruginosa* is an aerobic bacterium that will grow under anaerobic conditions if sufficient terminal electron acceptors are provided (19–21). Because it is not yet known what bacterial culture media best mimics human ASL (mucus), we tested for *Pseudomonas* growth under aerobic versus anaerobic conditions, using ASL harvested from CF and NL cultures. *P. aeruginosa* grew equally well in aerobic and anaerobic conditions (Figure 4a).

To test whether growth of *Pseudomonas* under anaerobic conditions in ASL was supported by NO₃⁻ as a ter-

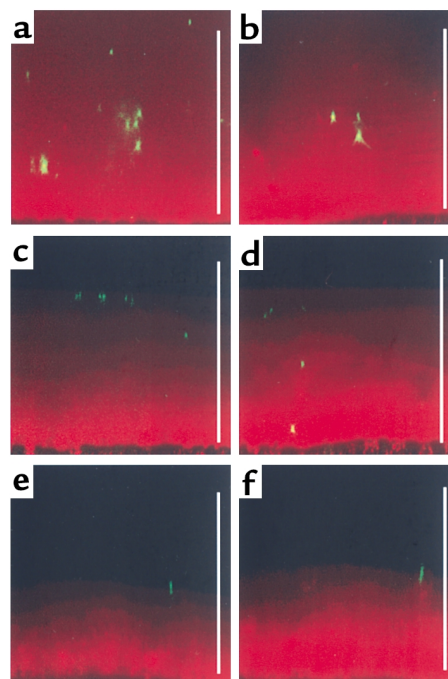


Figure 3

Localization of *P. aeruginosa* and beads in transported and stationary ASL (mucus) produced by planar CF cultures. Representative confocal images of ASL (red) fluorescent *P. aeruginosa* (green) or green fluorescent beads. *P. aeruginosa* or beads were added to the air-liquid interface in 25-nl aliquots by a microsyringe mounted in a hydraulic micromanipulator. (a) X-Z confocal image of *P. aeruginosa* 3 minutes after addition to the surface of ASL (mucus) exhibiting rotational transport. (b) X-Z confocal image of beads 3 minutes after addition to the surface of mucus exhibiting rotational transport. Note that due to the rapid “tumbling” movement of the mucus it was not possible to obtain early time-point images of *P. aeruginosa* or beads at the air-liquid interface. *P. aeruginosa* 3 minutes (c) and 15 minutes (d) after addition to stationary mucus. Beads at 3 minutes (e) and 15 minutes later (f) after addition to stationary mucus. Scale bars, 100 μ m.

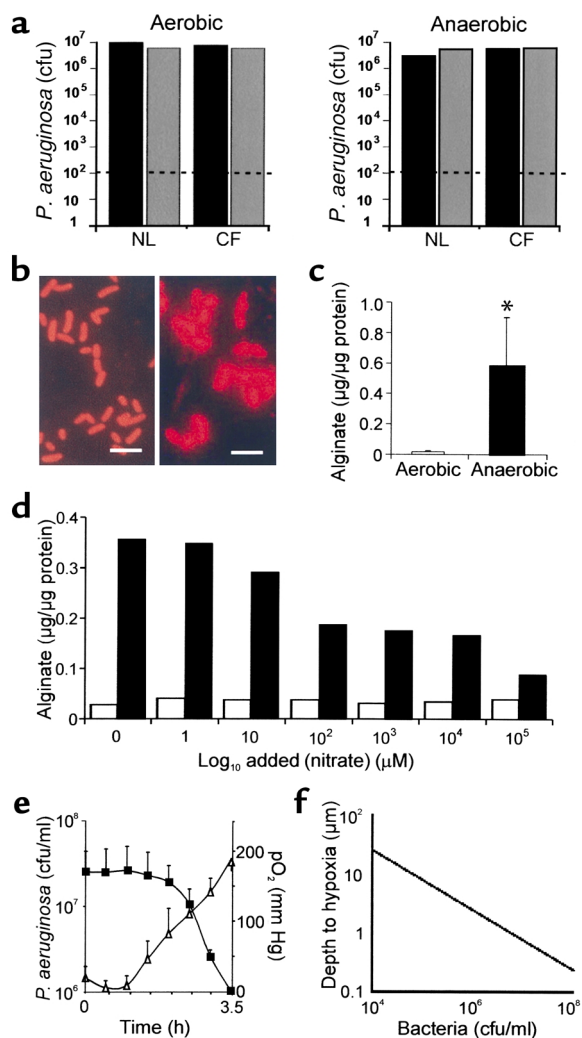


Figure 4

Growth and alginate production of *P. aeruginosa* under aerobic versus anaerobic conditions. (a) Growth of *P. aeruginosa* in NL or CF ASL under aerobic or anaerobic conditions. Two strains, PAO1 (black bars) and ATCC 700829 (gray bars), were inoculated (~100–200 bacteria, dashed line) in 30 µl NL or CF ASL and number of bacteria quantitated 72 hours later. The results presented are from a single representative experiment of three performed. The differences in the CFU/ml in the three experiments were less than 0.3 log 10. (b) Immunofluorescence detection of alginate production by PAO1 after aerobic (8 hours; left) or anaerobic (12 hours; right) conditions (magnification, ×1,000; bars, 10 µm). (c) Alginate production of PAO1 by the carbazole assay after growth under anaerobic (black bar) or aerobic (white bar) conditions for 4 days without added nitrate. **P* < 0.05. (d) Alginate production per microgram bacterial protein mass of PAO1 as a function of the added NO₃⁻ to PIA under aerobic (white bars) and anaerobic (black bars) conditions. (e) pO₂ (filled squares) in an aerobically growing suspension of *P. aeruginosa* (open triangles) as a function of time (hours). (f) Mathematical analysis of depths from air-mucus interface at which pO₂ becomes zero for simulated mucus masses/plaques containing different concentrations of *P. aeruginosa* bacteria (colony-forming units per milliliter).

nitrate concentration) that contained total nitrates in concentrations similar to that in ASL. Both immunofluorescence detection of alginate associated with the bacterial surface (Figure 4b; note thicker alginate coat in right panel) and quantitative measurement of alginate/bacterial protein mass (Figure 4c) demonstrated increased alginate production when PAO1 was grown under anaerobic conditions. A thicker alginate coat (~50%) was also observed for PAO1 grown in ASL under anaerobic versus aerobic conditions.

To test whether the behavior of PAO1 mimicked that of environmental strains that may infect CF mucus early in the course of the disease, alginate production by 15 nonmucoid *P. aeruginosa* environmental strains, genetically different by pulsed field gel electrophoretic analysis, was compared during growth in aerobic versus anaerobic environments. These strains routinely produced more alginate under anaerobic (0.191 ± 0.037 µg alginate per microgram of bacterial protein) versus aerobic (0.022 ± 0.004 µg alginate per microgram of bacterial protein) growth conditions.

We next tested whether alginate production could, in part, reflect “stress” of an anaerobic environment with limiting concentrations of [NO₃⁻] as a terminal electron acceptor. As shown in Figure 4d, the ratio of alginate to bacterial protein mass was highest at lower nitrate concentrations, including the 63 µM nitrate value of PIA (no added nitrate) that is most similar to values in ASL.

Finally, we asked whether the introduction of bacteria as O₂-consuming elements into mucus contributed to the magnitude of the O₂ gradients observed in vivo (Figure 2). O₂ tensions were reduced when *P. aeruginosa* growing in an open glass tube reached densities of approximately 5 × 10⁶ to 5 × 10⁷ CFU/ml (Figure 4e). At approximately 3 × 10⁷ CFU/ml, virtually all O₂ was consumed. Modeling of bacterial O₂ consumption (Figure 4f) showed that anaerobic conditions are gen-

minimal electron acceptor, total nitrate concentration was measured and found to be not different in uninfected ASL from NL (20 µM) and CF (26 µM) cultures. These ASL total nitrate concentration values are substantially lower than those reported for airway secretions collected in vivo. For example, tracheal secretions from control subjects have been reported to contain 144–421 µM total nitrate (22, 23). The higher levels from tracheal secretions could reflect the fact that upper airways produce more NO than the lower airway regions (24, 25) that are representative in our cultures (third to sixth generation bronchi). Importantly, as we found in ASL from NL and CF cultures, no differences in tracheal secretion total nitrate concentrations were found between “stable” CF patients (range 387–421 µM) and controls (22, 23).

We next asked whether the stress of anaerobic environments could induce *P. aeruginosa* to acquire phenotypic features that allows it to evade host defenses. Therefore, we measured *P. aeruginosa* production of alginate, an exopolysaccharide involved in *P. aeruginosa* biofilm formation, under anaerobic versus aerobic conditions on agar plates (Columbia sheep blood agar, 37 µM total nitrate concentration, and PIA, 63 µM total

erated at very shallow depths (~3 μm) in infected mucus masses when bacterial counts exceed 10^6 CFU/ml. Thus, the cell-specific O_2 gradients within uninfected mucus accumulating on the CF airway epithelial surfaces will be exacerbated by the introduction of *P. aeruginosa* into mucus.

Discussion

Our studies initially focused on the pathogenesis of established CF airways infection and, taking clues from these studies, explored whether these variables could uniquely contribute to the early pathogenesis of *P. aeruginosa* infection in CF airways.

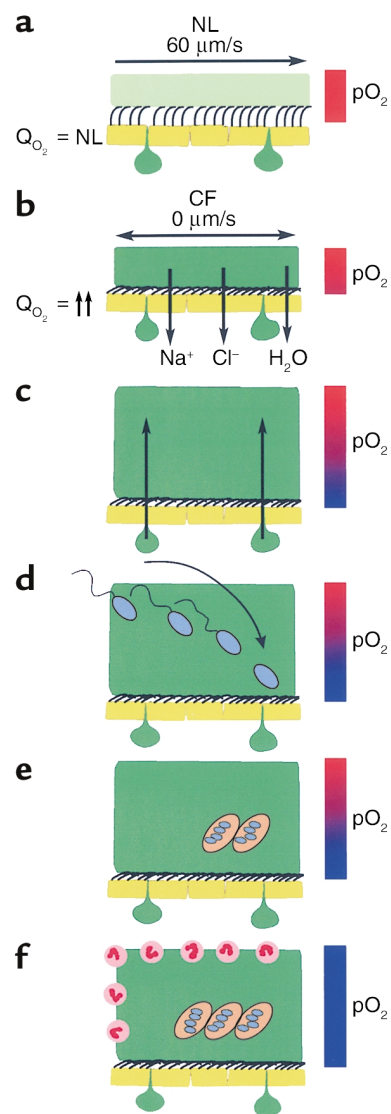
Morphometric analyses of freshly excised lungs by three techniques demonstrated that *P. aeruginosa* grows as macrocolonies in the airway intraluminal rather than the epithelial surface compartment (Figure 1, a-c). These findings contradict recent hypotheses emanating from in vitro model systems that focus on high-salt/defensin inactivation (26) or luminal epithelial cell binding (4), which predict bacterial infection of CF airway epithelial cells themselves (5, 6). However, our data are consistent with those from animal models that have demonstrated the adherence of *P. aeruginosa* to respiratory mucus (27–29), and three previous qualitative studies of CF postmortem lungs that identified *P. aeruginosa* in airway lumens rather than on airway epithelial cells (30–32). Furthermore, they are also consistent with our studies of NSEs that revealed *P. aeruginosa* preferentially bound to mucus rather than epithelial cell surfaces (Figure 1, d-f). A key extension of the in vivo characterization of CF airways infection is that *P. aeruginosa* occupies an intraluminal niche that is markedly hypoxic (Figure 2, a-b).

If the CF airways disease reflects infection of mucus, how is this process initiated and perpetuated? A sequence consistent with several aspects of the “low volume/reduced mucus clearance” hypothesis (10, 33) for CF pathogenesis is outlined in Figure 5. First, as compared with NL airway epithelial function (compare Figure 5a), data have been reported that CF airway epithelia excessively absorb Na^+ and Cl^- (and water) from the lumen, deplete the periciliary liquid layer (PCL), and slow/abolish mucus clearance (Figure 5b) (10, 34, 35). Accelerated Na^+ absorption, which reflects the absence of CFTR’s normal inhibitory activity on ENaC (36), is fueled by an increased turnover rate of ATP-consuming Na^+/K^+ -ATPase pumps (37, 38) leading to two- to threefold increases in CF airway epithelial O_2 consumption (39).

Second, persistent mucin secretion into stationary mucus generates plaques/plugs (16) (Figure 5c). The combination of thickened mucus and raised O_2 consumption by CF epithelia generated steep O_2 gradients within adherent mucus (Figure 2c). Importantly, the

Figure 5

Schematic model of the pathogenic events hypothesized to lead to chronic *P. aeruginosa* infection in airways of CF patients. (a) On normal airway epithelia, a thin mucus layer (light green) resides atop the PCL (clear). The presence of the low-viscosity PCL facilitates efficient mucociliary clearance (denoted by vector). A normal rate of epithelial O_2 consumption (QO_2 ; left) produces no O_2 gradients within this thin ASL (denoted by red bar). (b-f) CF airway epithelia. (b) Excessive CF volume depletion (denoted by vertical arrows) removes the PCL, mucus becomes adherent to epithelial surfaces, and mucus transport slows/stops (bidirectional vector). The raised O_2 consumption (left) associated with accelerated CF ion transport does not generate gradients in thin films of ASL. (c) Persistent mucus hypersecretion (denoted as mucus secretory gland/goblet cell units; dark green) with time increases the height of luminal mucus masses/plugs. The raised CF epithelial QO_2 generates steep hypoxic gradients (blue color in bar) in thickened mucus masses. (d) *P. aeruginosa* bacteria deposited on mucus surfaces penetrate actively and/or passively (due to mucus turbulence) into hypoxic zones within the mucus masses. (e) *P. aeruginosa* adapts to hypoxic niches within mucus masses with increased alginate formation and the creation of macrocolonies. (f) Macrocolonies resist secondary defenses, including neutrophils, setting the stage for chronic infection. The presence of increased macrocolony density and, to a lesser extent neutrophils, render the now mucopurulent mass hypoxic (blue bar).



steep pO₂ gradient in ASL/mucus was specific for CF epithelia because it was not reproduced in cultures from another genetic airways disease with an infectious phenotype, PCD (Figure 2f).

Third, bacteria deposited on thickened mucus can penetrate into hypoxic zones (Figure 5d). When the normal rotational mucus transport ceased due to excessive volume absorption, the vertical “currents” within transported mucus were abolished, but motile *P. aeruginosa* still penetrated thickened mucus (Figure 3, c and d). Note that environmental *P. aeruginosa* strains such as those that characterize early infection are motile and would likely penetrate mucus readily.

Fourth, *P. aeruginosa* can grow in hypoxic/anaerobic CF mucus (Figure 4a). In part, growth under anaerobic conditions may be supported by the terminal electron acceptor, nitrate (~20 μM), contained in ASL. Furthermore, we show that increased alginate production was a characteristic feature of PAO1 strains in response to hypoxia, particularly with growth in low concentrations of nitrate that mimic ASL (Figure 4, b–d), and this characteristic is also a feature of environmental *P. aeruginosa* strains. We speculate that the increased alginate formation may represent a stress response to hypoxia that is part of the process that forms biofilmlike macrocolonies, the predominant phenotype of *P. aeruginosa* in CF airways (3). Interestingly, *Staphylococcus aureus* also responds to the hypoxic environment of CF mucus with a switch from non-mucoid to a mucoid phenotype (40, 41).

Finally, the capacity of *P. aeruginosa* to proliferate in hypoxic mucus will generate fully hypoxic (anaerobic) conditions in patients with persistent CF airways infection (Figure 1, Figure 4, e and f, and Figure 5e). Hassett et al. reported that *P. aeruginosa* alginate production was maintained by anaerobic conditions (21). The reduced O₂ tension in the mucopurulent intraluminal contents of CF airways may, therefore, be one variable contributing to the persistence of *P. aeruginosa* macrocolonies in CF airways. The consequences of the macrocolony growth state have been explored in detail and include resistance to antibiotics (42) and host phagocyte killing (Figure 5f) and (42, 43), all of which contribute to the persistence of *P. aeruginosa* infection and the chronic destructive airways disease characteristics of CF.

In summary, our data demonstrate that the *P. aeruginosa* infection of CF airways occurs within the luminal (mucus) rather than the epithelial cell surface compartment. Thus, we speculate that mucus clearance is a key feature of innate lung defense (44), and a fundamental defect leading to chronic CF lung infections is the failure to effectively clear mucus that contains bound bacteria from the lung (10). Hypoxic gradients exist within poorly cleared/adherent mucus, consequent to CF-specific increases in epithelial O₂ consumption, and inhaled *P. aeruginosa* respond to hypoxic mucus with alginate production and macrocolony formation, which allows them to evade host defenses and produce a chronic destructive lung disease. These

data lead us to conclude that therapeutic strategies to treat CF lung disease should include novel drugs designed to clear the lung of retained mucus plaques/plugs, which initiate and perpetuate CF lung disease, and antibiotics that effectively treat *P. aeruginosa* growing under hypoxic/anaerobic conditions.

Acknowledgments

The authors would like to thank Carol Basbaum for a gift of an mAb against human tracheobronchial mucins, Gerald Pier for a gift of rabbit antiserum specific for *P. aeruginosa* alginate, Hans-Peter Zenner and Gerd Munker for nasal polyp material, Heinz Schwarz for TEM, and Diana Walstad, Kim Burns, and Tracy Bartolotta for technical assistance. We also thank Marie Becker for harvesting ASL and Milan Hazucha for nitrate measurements. This study was partially supported by Förderverein für mukoviszidosekranke Kinder, Jugendliche und Erwachsene der Region Ulm e.V., Deutsche Gesellschaft zur Bekämpfung der Mukoviszidose e.V., and the CF-Selbsthilfe Duisburg e.V., Germany.

1. Davis, P.B., Drumm, M., and Konstan, M.W. 1996. Cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**:1229–1256.
2. Meyer, K.C., and Zimmerman, J. 1993. Neutrophil mediators, *Pseudomonas*, and pulmonary dysfunction in cystic fibrosis. *J. Lab. Clin. Med.* **121**:654–661.
3. Doering, G., Knight, R., and Bellon, G. 2000. Immunology of cystic fibrosis. In *Cystic fibrosis*. M.E. Hodson and D.M. Geddes, editors. Arnold Publishers. London, United Kingdom. 109–140.
4. Saiman, L., and Prince, A. 1993. *Pseudomonas aeruginosa* pili bind to asialoGM1 which is increased on the surface of cystic fibrosis epithelial cells. *J. Clin. Invest.* **92**:1875–1880.
5. de Bentzmann, S., Plotkowski, C., and Puchelle, E. 1996. Receptors in the *Pseudomonas aeruginosa* adherence to injured and repairing airway epithelium. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**:S155–S162.
6. Pier, G.B., et al. 1996. Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science*. **271**:64–67.
7. Welsh, M.J., and Smith, A.E. 1995. Cystic fibrosis. *Sci. Am.* **273**:52–59.
8. Holloway, B.W., Krishnapillai, V., and Morgan, A.F. 1979. Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol. Rev.* **43**:73–102.
9. Ulrich, M., et al. 1998. Localization of *Staphylococcus aureus* in infected airways of patients with cystic fibrosis and in a cell culture model of *S. aureus* adherence. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **19**:83–91.
10. Matsui, H., et al. 1998. Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell*. **95**:1005–1015.
11. Tarran, R., Grubb, B.R., Gatzky, J.T., Davis, C.W., and Boucher, R.C. 2001. The relative roles of passive surface forces and active ion transport in the modulation of airway surface liquid volume and composition. *J. Gen. Physiol.* **118**:223–236.
12. Tarran, R., and Boucher, R.C. 2002. Thin-film measurements of airway surface liquid volume/composition and mucus transport rates in vitro. In *Cystic fibrosis methods and protocols*. W.R. Skach, editor. Humana Press. Totowa, New Jersey, USA. In press.
13. May, T.B. and Chakrabarty, A.M. 1994. Isolation and assay of *Pseudomonas aeruginosa* alginate. *Methods Enzymol.* **235**:295–304.
14. Lam, J., Chan, R., Lam, K., and Costerton, J.W. 1980. Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect. Immun.* **28**:546–556.
15. Logan, S.R. 1998. *Physical chemistry for the biomedical sciences*. Taylor & Francis. London, United Kingdom. 251 pp.
16. Zuelzer, W.W., and Newton, W.A., Jr. 1949. The pathogenesis of fibrocystic disease of the pancreas. A study of 36 cases with special reference to the pulmonary lesions. *Pediatrics*. **4**:53–69.
17. Matsui, H., Randell, S.H., Peretti, S.W., Davis, C.W., and Boucher, R.C. 1998. Coordinated clearance of periciliary liquid and mucus from airway surfaces. *J. Clin. Invest.* **102**:1125–1131.
18. Schidlow, D.V. 1994. Primary ciliary dyskinesia (the immotile cilia syndrome). *Ann. Allergy*. **73**:457–468.
19. Bazylnski, D.A., Soohoo, C.K., and Hollocher, T.C. 1986. Growth of *Pseudomonas aeruginosa* on nitrous oxide. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**:1239–1246.

20. Carlson, C.A., and Ingraham, J.L. 1983. Comparison of denitrification by *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:1247–1253.
21. Hassett, D.J. 1996. Anaerobic production of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*: alginate restricts diffusion of oxygen. *J. Bacteriol.* **178**:7322–7325.
22. Linnane, S.J., et al. 1998. Total sputum nitrate plus nitrite is raised during acute pulmonary infection in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **158**:207–212.
23. Graseemann, H., et al. 1998. Nitric oxide metabolites in cystic fibrosis lung disease. *Arch. Dis. Child.* **78**:49–53.
24. Kimberly, B., Nejadnik, B., Giraud, G.D., and Holden, W.E. 1996. Nasal contribution to exhaled nitric oxide at rest and during breathholding in humans. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **153**:829–836.
25. Lundberg, J.O.N., et al. 1994. Primarily nasal origin of exhaled nitric oxide and absence in Kartagener's syndrome. *Eur. Respir. J.* **7**:1501–1504.
26. Smith, J.J., Travis, S.M., Greenberg, E.P., and Welsh, M.J. 1996. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell.* **85**:229–236.
27. Marcus, H., and Baker, N.R. 1985. Quantitation of adherence of mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* to hamster tracheal epithelium. *Infect. Immun.* **47**:723–729.
28. Niederman, M.S., et al. 1983. Comparison of bacterial adherence to ciliated and squamous epithelial cells obtained from the human respiratory tract. *Am. Rev. Respir. Dis.* **127**:85–90.
29. Ramphal, R., and Pyle, M. 1983. Evidence for mucins and sialic acid as receptors for *Pseudomonas aeruginosa* in the lower respiratory tract. *Infect. Immun.* **41**:339–344.
30. Jeffery, P.K., and Brain, A.P. 1988. Surface morphology of human airway mucosa: normal, carcinoma, or cystic fibrosis. *Scanning Microsc.* **2**:553–560.
31. Simel, D.L., et al. 1984. Scanning electron microscopic study of the airways in normal children and in patients with cystic fibrosis and other lung diseases. *Pediatr. Pathol.* **2**:47–64.
32. Baltimore, R.S., Christie, C.D., and Smith, G.J. 1989. Immunohistopathologic localization of *Pseudomonas aeruginosa* in lungs from patients with cystic fibrosis. Implications for the pathogenesis of progressive lung deterioration. *Am. Rev. Respir. Dis.* **140**:1650–1661.
33. Tarran, R., et al. 2001. The CF salt controversy: in vivo observations and therapeutic approaches. *Mol. Cell.* **8**:149–158.
34. Boucher, R.C., Stutts, M.J., Knowles, M.R., Cantley, L., and Gatzky, J.T. 1986. Na⁺ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation. *J. Clin. Invest.* **78**:1245–1252.
35. Jiang, C., Finkbeiner, W.E., Widdicombe, J.H., McCray, P.B., Jr., and Miller, S.S. 1993. Altered fluid transport across airway epithelium in cystic fibrosis. *Science.* **262**:424–427.
36. Stutts, M.J., et al. 1995. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science.* **269**:847–850.
37. Stutts, M.J., Knowles, M.R., Gatzky, J.T., and Boucher, R.C. 1986. Oxygen consumption and ouabain binding sites in cystic fibrosis nasal epithelium. *Pediatr. Res.* **20**:1316–1320.
38. Peckham, D., Holland, E., Range, S., and Knox, A.J. 1997. Na⁺/K⁺ ATPase in lower airway epithelium from cystic fibrosis and non-cystic-fibrosis lung. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **232**:464–468.
39. Stutts, M.J., Knowles, M.R., Gatzky, J.T., and Boucher, R.C. 1985. Oxygen consumption (QO₂) and ouabain binding in cystic fibrosis (CF) and normal nasal epithelium. *Fed. Proc.* **44**:640. (Abstr.)
40. Cramton, S.E., Ulrich, M., Gotz, F., and Doring, G. 2001. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **69**:4079–4085.
41. McKenney, D., et al. 1999. Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo-expressed antigen. *Science.* **284**:1523–1527.
42. Park, M.K., Myers, R.A., and Marzella, L. 1992. Oxygen tensions and infections: modulation of microbial growth, activity of antimicrobial agents, and immunologic responses. *Clin. Infect. Dis.* **14**:720–740.
43. Hohn, D.C., MacKay, R.D., Halliday, B., and Hunt, T.K. 1976. Effect of O₂ tension on microbicidal function of leukocytes in wounds and in vitro. *Surg. Forum.* **27**:18–20.
44. Knowles, M.R., and Boucher, R.C. 2002. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J. Clin. Invest.* In press.

Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* Expresses Alginate in the Lungs of Patients with Cystic Fibrosis and in a Mouse Model

Alessandra Bragonzi,^{1,2} Dieter Worlitzsch,¹ Gerald B. Pier,³ Petra Timpert,¹ Martina Ulrich,¹ Morten Hentzer,⁴ Jens Bo Andersen,⁴ Michael Givskov,⁴ Massimo Conese,² and Gerd Döring¹

¹Institute of Medical Microbiology and Hygiene, Universitätsklinikum Tübingen, Tübingen, Germany; ²Institute for Experimental Treatment of Cystic Fibrosis, HS Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy; ³Channing Laboratory, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts; ⁴Center for Biomedical Microbiology, BioCentrum, Danish Technical University, Lyngby, Denmark

Background. In patients with cystic fibrosis (CF), lung infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains overexpressing the exopolysaccharide alginate is preceded by colonization with nonmucoid strains. We investigated the kinetics, impact of environmental signals, and genetics of *P. aeruginosa* alginate expression in a mouse model and in patients with CF.

Methods. Using indirect immunofluorescence, microarray technology and real-time reverse-transcription polymerase chain reaction, we assessed alginate gene expression during aerobic and anaerobic growth of the nonmucoid strain PAO1 in vitro, in a mouse lung-infection model and in sputum specimens from patients with CF infected with nonmucoid or mucoid *P. aeruginosa* strains.

Results. Anaerobic conditions increased the transcription of alginate genes in vitro and in murine lungs within 24 h. Alginate production by PAO1 in murine lungs and by nonmucoid *P. aeruginosa* strains in patients with CF was reversible after in vitro culture under aerobic conditions. A subpopulation of *P. aeruginosa* clones revealing stable alginate production was detected in murine lungs 2 weeks after infection.

Conclusions. Anaerobiosis and lung infection rapidly induce alginate production by gene regulation in nonmucoid *P. aeruginosa*. This trait may contribute to early persistence, leading to chronic *P. aeruginosa* infection once stable mucoid strains are generated.

Optimal survival of organisms under changing environmental conditions demands adaptation, which results in the emergence of new phenotypes [1]. In bacteria, signal-transduction systems by which the organisms sense the environment and change their phenotype accordingly have been described [2]. The presence of intricate global gene-regulation mechanisms that preserve broad cell ver-

satility under many environmental conditions is thought to be one reason for the exceptional environmental and evolutionary success of microorganisms. Indeed, organisms with larger genomes, such as *Pseudomonas aeruginosa*, have a wealth of genes involved in transcriptional regulation [3]. The emergence of mutated subpopulations is thought to permit the persistence of bacterial species in a given ecological niche [4–7].

The airways of patients with the hereditary disease cystic fibrosis (CF) [8] may be regarded as an ecosystem in which *P. aeruginosa* must adapt to challenges from factors of the innate immune system, antibiotics, and growth in an microanaerobic/anaerobic environment [5, 9]. In response to anaerobic growth, *P. aeruginosa* can change its phenotype [9]; this process is characterized by the production of increased amounts of the extracellular polysaccharide alginate [10–13]. The overexpression of alginate by *P. aeruginosa* leads to mucoid colony formation, which is a key factor in the organisms' persistence in the respiratory tracts of patients with CF.

Received 11 November 2004; accepted 23 March 2005; electronically published 24 June 2005.

Presented in part: 26th Congress of the European Cystic Fibrosis Society, Belfast, Northern Ireland, 4–7 June 2003; 17th Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Anaheim, California, 16–19 October 2003.

Financial support: Marie Curie Fellowship (grant MCFI-2001-51061); Mukoviszidose; Cystic Fibrosis Foundation; National Institutes of Health (grant AI48917); Associazione Lombarda Fibrosi Cistica.

Potential conflicts of interest: none reported.

Reprints or correspondence: Prof. Gerd Döring, Institute of Medical Microbiology and Hygiene, Universitätsklinikum, Wilhelmstr. 31, D-72074 Tübingen, Germany (gerd.doering@med.uni-tuebingen.de).

The Journal of Infectious Diseases 2005;192:410–9

© 2005 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. 0022-1899/2005/19203-0008\$15.00

Mucoid, alginate-overexpressing *P. aeruginosa* variants have recently been detected, 10.9 years after the acquisition of non-mucoid *P. aeruginosa* in patients with CF [12]; however, this may also occur earlier. Alginate overproduction has been linked to mutations in a gene cluster designated as the *mucABCD* genes, which encode proteins that inhibit the activity of the alternative σ -factor AlgU [14]. AlgU acts on the key alginate biosynthesis gene *algD*, which encodes a guanosine diphosphate mannose dehydrogenase, and on *algR*, a response regulator gene that increases alginate production [15]. Mutations in the negative regulators *mucA*, *mucB*, and *mucD* lead to alginate overproduction and conversion to a stable mucoid phenotype in *P. aeruginosa* [14, 16–18]. However, the contribution of alginate gene regulation, as opposed to adaptive mutations, as a key factor in controlling the ability of *P. aeruginosa* to both establish and chronically infect the lungs of patients with CF in the infection process is still unclear, and this has not been investigated in vivo.

The objective of the present study was to investigate whether changes in gene regulation lead to an initial increase in alginate production that precedes the adaptive mutation causing full-fledged alginate overproduction in mucoid *P. aeruginosa*. To achieve this aim, we assessed alginate gene expression during aerobic and anaerobic growth of the nonmucoid strain PAO1 in vitro, in a mouse lung-infection model and in sputum specimens from patients with CF infected with nonmucoid or mucoid *P. aeruginosa* strains. Our data suggest that alginate gene regulation is a key factor in the process of establishing infection shortly after colonization by *P. aeruginosa* nonmucoid strains and before the mucoid phenotype becomes fully detectable on bacterial cells cultured in vitro.

PATIENTS, MATERIALS, AND METHODS

Bacterial strains, growth conditions, and patients with CF.

The nonmucoid laboratory strain *P. aeruginosa* PAO1, its mucoid isogenic variant PDO300 [3, 19], and *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) were used for in vitro experiments and mouse infection studies. Twenty-five environmental *P. aeruginosa* strains were isolated from water and salad sources, and 40 clinical strains were obtained from sputum or throat swabs from patients with CF. *P. aeruginosa* was cultured in trypticase soy broth (TSB) or was plated onto Columbia blood agar plates or *Pseudomonas* isolation agar (PIA; Heipha) for 24 h at 37°C. *B. fragilis* was grown in chopped meat carbohydrate medium [20]. For anaerobic growth, strain PAO1 was cultivated aerobically on solid medium for 12 h and then incubated anaerobically for an additional 12 h in anaerobic jars with Anaerocult A (Merck). For microarray experiments, strain PAO1 was grown in TSB/PBS medium (pH 7.4) overnight, adjusted to a starting OD₆₀₀ of 0.05, and grown aerobically and anaerobically. For fermenter experiments, overnight cultures of PAO1 were adjusted to an OD₆₀₀ of 0.1 in modified basic medium (10 g of casein hy-

drolysate, 5 g of yeast extract, 2.5 g of NaCl, 10 g of disodium hydrogenphosphate-trihydrate, and 10 μ L of antifoam solution [pH 7.25], supplemented with 0.5% glucose) and cultured to the midlog (4 h) and stationary (8 h) phases in a fermenter (Biostat Q-Fermenter; Braun-Biotech) under aerobic and anaerobic conditions. Anaerobiosis was created by bubbling filtered helium gas (150 mL/min) through the medium, and aerobiosis was created by use of filtered oxygen gas (150 mL/min).

Microbiological cultures of biological specimens from 24 patients revealed only nonmucoid strains of *P. aeruginosa*, whereas 16 patients carried at least 1 mucoid colony, as detected by use of a specific anti-alginate antibody (see below). The nonmucoid phenotype of *P. aeruginosa* was defined by the appearance of single colonies on agar plates (figure 1A). The mucoid phenotype of *P. aeruginosa* was defined as a viscous, slimy colony appearing on agar plates in which single cells could not be distinguished because of the production of copious amounts of alginate (figure 1B). Nonmucoid phenotypes may be alginate negative (figure 1D) or alginate positive (figure 1F), as detected by use of a specific anti-alginate antibody.

Agar bead preparation and mouse model. Agar beads containing *P. aeruginosa* or *B. fragilis* were prepared as described elsewhere [21]. Sodium deoxycholic acid was omitted in washings of *B. fragilis* beads. C57Bl/6 male mice (Charles-River; weight, 24–26 g) were infected as described elsewhere [21, 22]. After 1, 3, 7, 14, and 28 days, mice were killed, and lungs were excised, homogenized in PBS, and plated onto PIA. Additionally, 1 loop of PAO1, grown on blood agar, was processed for immunostaining. For histopathological analysis, lungs were removed en bloc and fixed in 4% paraformaldehyde/PBS for 24 h at 4°C and processed for paraffin embedding. Longitudinal sections of 5 μ m, collected at regular intervals, were obtained by use of a microtome from the proximal, medial, and distal lung regions. Sections were stained with hematoxylin-eosin (HE).

***P. aeruginosa* alginate gene expression.** To assess how alginate gene expression responds to a change from an aerobic to an anaerobic environment, *P. aeruginosa* Affymetrix GeneChips and LightCycler reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) were used. For microarray experiments, RNA was isolated at 2 h from aerobically grown cultures and on days 1, 2, 3, and 4 for anaerobically grown cultures by use of Trizol (Gibco). Cell walls were disrupted with FastRNA tubes blue and FastPrepFP120 (Bio101). Contaminating DNA was digested by use of DNaseI (Ambion). Purified RNA was used for microarray experiments according to the manufacturer's procedure for use of the *P. aeruginosa* GeneChip (Affymetrix). Data analysis was performed by use of the Affymetrix Microarray Suite (version 5.0; Affymetrix UK) and Data Mining Tool (version 3.0; Affymetrix UK) software. Student's *t* test was applied for statistical analysis.

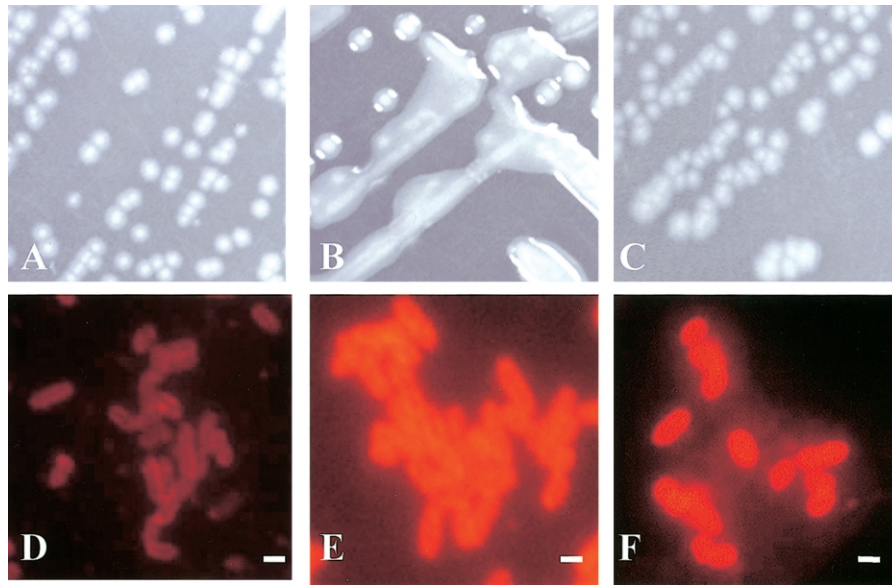


Figure 1. Production of nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* alginate grown anaerobically in vitro that does not change its phenotype. On *Pseudomonas* isolation agar, *P. aeruginosa* strain PAO1 revealed a nonmucoid phenotype when cultivated aerobically (A) or anaerobically (C), whereas its isogenic mutant PDO300 showed only a mucoid phenotype (B). When indirect immunofluorescence was used, alginate production of PAO1 was detectable under anaerobic growth conditions (F) but not under aerobic growth conditions (D), whereas PDO300 was alginate-positive under aerobic growth conditions (E). Bars in D–F, 1 μ m.

For real-time RT-PCR, fermenter-cultured PAO1 cells were incubated with RNA Protect Bacteria Reagent (Qiagen) and disrupted with lysozyme (1 mg/mL). RNA was isolated by use of the RNeasy Mini kit (Qiagen) and treated with DNaseI. This method was also used for the isolation of RNA from homogenized murine lungs and sputum specimens from patients with CF. Real-time RT-PCR was performed by use of a LightCycler

(Roche) and the LightCycler-RNA amplification kit SYBR Green I (Roche). The following primers were used: *algD*, 5'-TGTCGCGCTACTACATGCGTC-3' and 5'-GTGTCGTGGCTGGTGATGAGA-3'; and *gyrA*, 5'-IGTIGCTTATGCCATGAGCGA-3' and 5'-TCCACCGAACCGAAGTTGC-3'. After RT for 20 min at 50°C, the following temperature profile was used: denaturation for 1 cycle at 95°C for 30 s; 45 cycles at 95°C for 1 s, 62°C–58°C

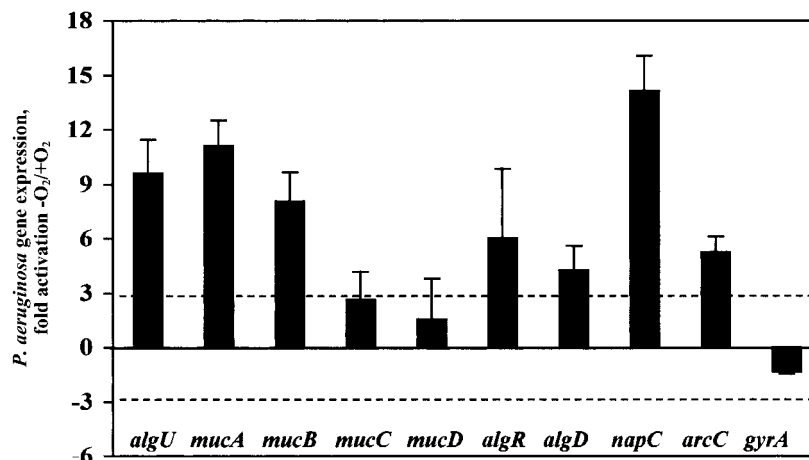


Figure 2. Increase in *Pseudomonas aeruginosa* alginate gene expression under anaerobic growth conditions. Differential gene expression by strain PAO1, grown for 1–4 days under anaerobic growth conditions ($-O_2$) or aerobically for 2 h ($+O_2$), was assessed by use of the microarray technique. Values are given as means \pm SDs. Dotted lines indicate cutoff levels for differential transcription that is increased or decreased. *napC* and *arcC* genes represent positive controls for anaerobiosis. *gyrA* is a constitutively transcribed *P. aeruginosa* gene.

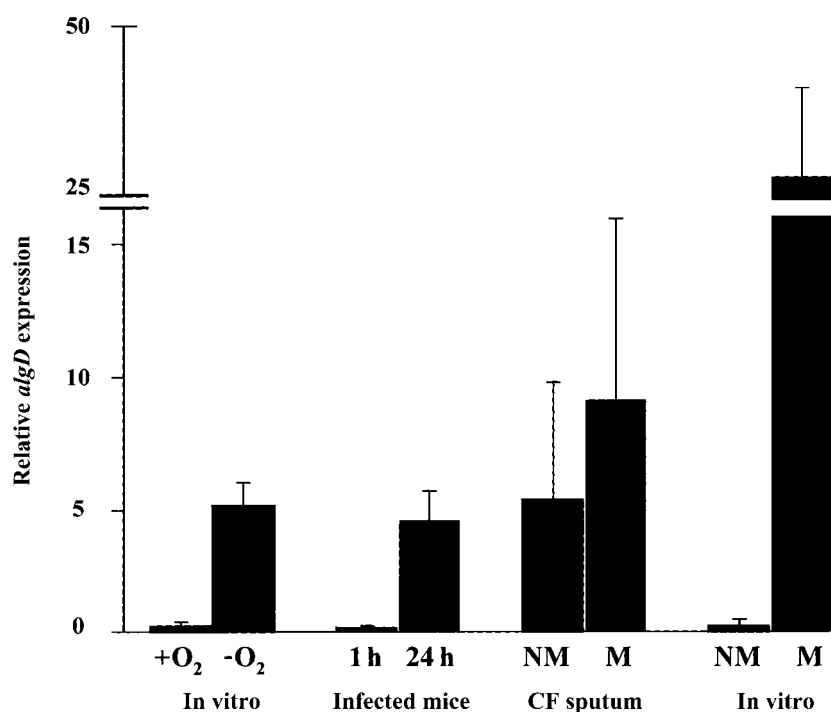


Figure 3. *Pseudomonas aeruginosa algD* transcription in murine lungs and in sputum specimens from patients with cystic fibrosis (CF), as measured by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. Total RNA from lung homogenates of mice infected with *P. aeruginosa* strain PAO1 in agar beads or from sputum specimens from patients with CF was isolated. *algD* expression was quantified in relation to the *gyrA* expression in each specimen. Data are presented as the fold change vs. the referent strain, PAO1. In vitro data showed increased *algD* expression after 8 h of anaerobic growth ($-O_2$) vs. aerobic growth ($+O_2$). Infected mice showed low *algD* expression 1 h after infection, whereas a significant increase was detected 24 h after infection. Similarly, *algD* expression was detected in sputum specimens from patients with CF whose respiratory cultures grew only nonmucoid (NM) *P. aeruginosa* and in sputum specimens from patients with CF whose respiratory cultures grew only mucoid (M) *P. aeruginosa* colonies. Control experiments were performed by growing M and NM strains in vitro. In vitro, M strains expressed high levels of *algD* transcripts, whereas only low expression was measured for NM strains.

for 10 s, and 72°C for 13 s; and fluorescence acquisition at 62°C–58°C in single mode. Melting curves were obtained from 45°C to 96°C by stepwise fluorescence acquisition.

Alginate determination. *P. aeruginosa* alginate gene expression was quantified by use of the carbazole assay [23] and was determined by indirect immunofluorescence that used a rabbit antiserum specific for *P. aeruginosa* alginate [24]. The secondary antibody was indocarbocyanin-3 (Cy3) or Texas Red-labeled goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes). For the in vivo experiments, 38 single clones and 4 mixtures of different clones from mice infected for 7 days and 101 single clones and 10 mixtures of different clones from mice infected for 14 days were randomly picked and analyzed for alginate production by use of the alginate-specific antiserum. Positive clones were subcultured twice for analysis of the stability of alginate gene expression. Because of the presence of a heterogeneous population of bacterial cells, clones were considered to be positive when at least 50% of the cells revealed positive staining with the alginate antiserum.

RESULTS

Rapid and persistent increase in alginate biosynthesis and regulatory gene transcription during anaerobic growth of P. aeruginosa in vitro.

Previous in vitro experiments that used the nonmucoid *P. aeruginosa* strain PAO1 grown anaerobically demonstrated a significant increase in alginate production [9] without the phenotypic change typical of highly mucoid strains. Figure 1 shows the nonmucoid strain PAO1 (figure 1A) and its mucoid, alginate-overexpressing isogenic variant PDO300 (figure 1B). To determine how fast the production of alginate could be detected when nonmucoid strain PAO1 was grown anaerobically and which *P. aeruginosa* genes involved in alginate production were differentially regulated, we measured alginate production and transcriptional changes during 4 days of anaerobic growth. Alginate production was detectable after 12 h under anaerobiosis that used specific antibodies (figure 1F). Aerobic PAO1 cultures were alginate negative (figure 1D). As was expected, PDO300 grown aerobically stained positive for

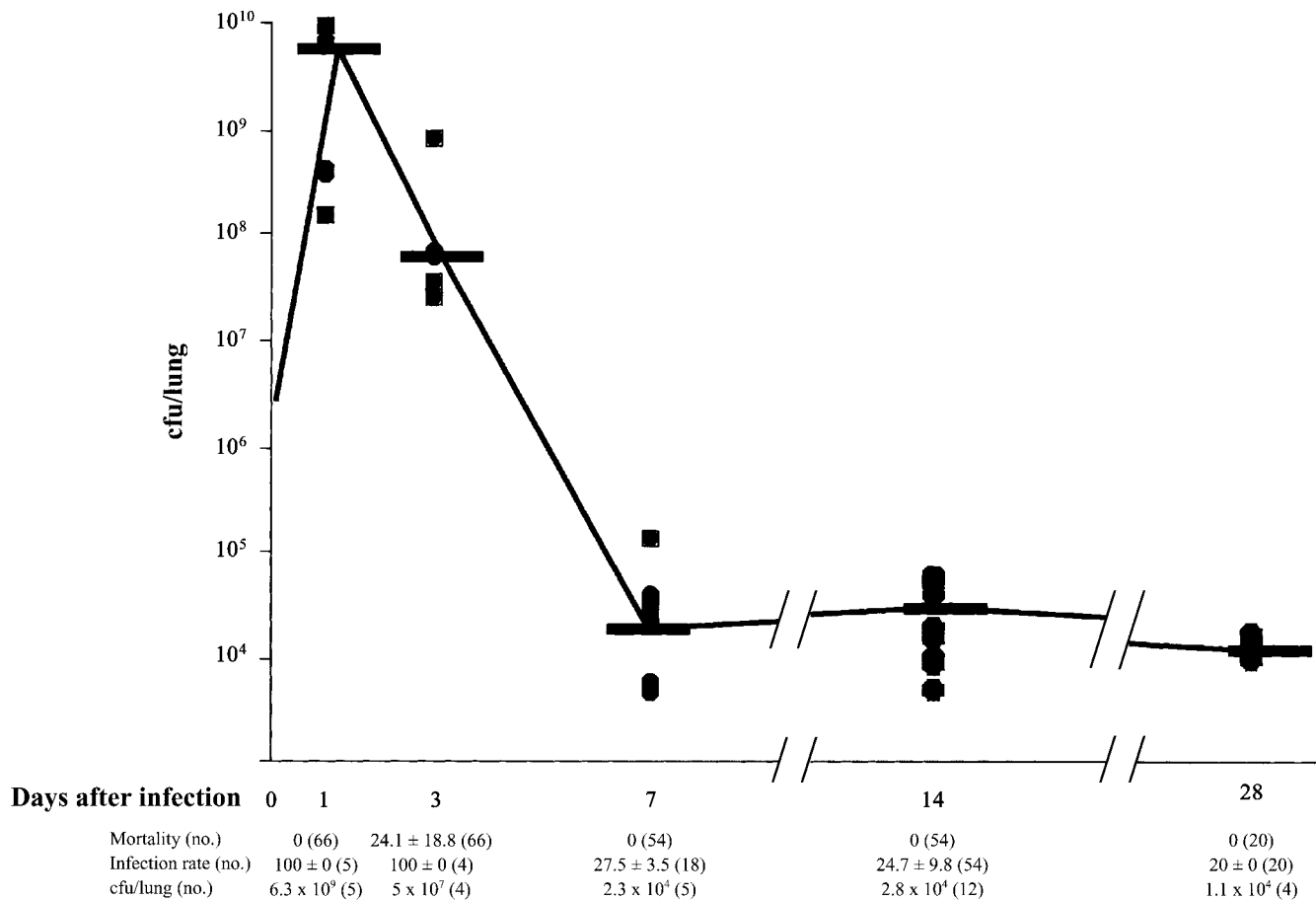


Figure 4. Subpopulation of *Pseudomonas aeruginosa* selected in the lungs of agar bead-infected C57BL/6 mice. C57BL/6 mice were infected with 10^6 – 10^7 cfu of *P. aeruginosa* strain PAO1/lung, and mortality was determined. Other groups of mice were killed at the indicated time points, for the determination of the no. of colony forming units per lung and the percentage of infected mice. Shown is the growth curve of strain PAO1 in murine lungs. Dots represent individual measurements of the no. of colony forming units per lung, and horizontal lines represent median values. Mortality (mean ± SD) and infection rates (mean ± SD) of PAO1-infected mice and no. of colony forming units per lung (median) are also shown. Values were selected from 2–6 different experiments. *n*, no. of pooled mice analyzed for each condition.

alginate (figure 1E). Thus, the phenotypically nonmucoid strain PAO1 produced detectable levels of alginate when it was grown anaerobically, without the phenotypic change (figure 1C) typical of highly mucoid strains (figure 1B).

To determine whether such a phenotypic change is a general phenomenon, we tested 25 environmental *P. aeruginosa* strains for alginate production using the carbazol assay. Only traces of alginate were produced by the strains grown aerobically (mean ± SD, 0.022 ± 0.004 μg of alginate/μg of protein), whereas a mean (± SD) of 0.191 ± 0.037 μg of alginate/μg of protein was produced under anaerobic growth conditions. Similarly, under aerobic growth conditions, these strains were all found to be negative for alginate by immunofluorescence, whereas, under anaerobic growth conditions, they were found to be positive (data not shown). We therefore conclude that increased alginate production during anaerobic growth is a general phenomenon of *P. aeruginosa* strains.

When we used *P. aeruginosa* Affymetrix GeneChips to assess differential gene expression under anaerobic versus aerobic conditions, the expression of the positive alginate regulator *algU* increased ~10-fold during days 1–4 of anaerobic growth, compared with that during aerobic growth (figure 2). Additionally, *algR* and *algD* transcription was also increased under anaerobic conditions. We also noted increased transcription of negative regulatory genes in the *muc* cluster, which may have served as a counterbalance to the increased transcription of *algR* and *algD*, resulting in increased alginate production without the transition to the full mucoid phenotype. Transcription of the *napEFDABC* and *arcDABC* clusters was increased, reflecting anaerobically increased nitrate and arginine turnover, whereas transcription of the housekeeping gene *gyrA* was not affected (figure 2).

These results were confirmed by real-time RT-PCR when strain PAO1 was grown in a fermenter under anaerobic and

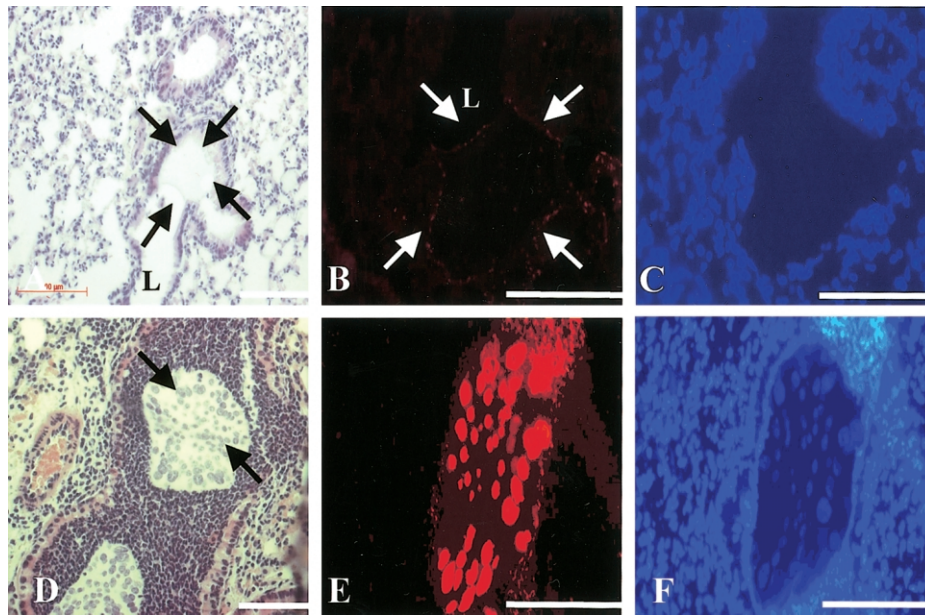


Figure 5. Expression of alginate by *Pseudomonas aeruginosa* within agar beads in murine lungs. Mice were infected with PAO1 embedded in agar beads, and lungs were investigated histologically and for alginate by indirect immunofluorescence. *A*, Agar bead (arrows), deposited in the bronchial lumen (L) 1 h after intratracheal injection. *B*, No alginate detectable by indirect immunofluorescence in an agar bead (arrows). *C*, 4',6'-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) staining of the same tissue section as that in panel *B*, 1 h after infection. *D*, Bacterial macrocolonies in an agar bead (arrows) 1 day after infection. *E*, Expression of alginate by bacterial macrocolonies 1 day after infection. *F*, DAPI staining of the same tissue section as that in panel *E*. Bars in *A*–*F*, 100 μ m.

aerobic growth conditions for 4 and 8 h. Although, at 4 h, no difference was observed in *algD* expression, a 4-fold increase in *algD* expression was detected at 8 h under anaerobic versus aerobic growth conditions (figure 3).

Induction of anaerobic growth conditions for bacteria by agar beads leading to alginate gene expression in a mouse lung-infection model of *P. aeruginosa*. We next monitored the kinetics of alginate production in vitro using the agar bead model of chronic *P. aeruginosa* lung infection [21]. We asked to what extent does this model mimic the microanaerobic growth conditions of *P. aeruginosa* in the CF lung [9]. The obligate anaerobe *B. fragilis*, embedded into agar beads, was incubated aerobically and anaerobically in vitro for 24 h at 37°C, and survival was quantified by plating serial dilutions on blood agar plates under anaerobic conditions. No statistical difference was observed in the survival of *B. fragilis* in beads incubated either aerobically or anaerobically (mean \pm SD; aerobic, $0.92 \times 10^9 \pm 6.8 \times 10^8$ cfu/mL; anaerobic, $1.3 \times 10^9 \pm 9.5 \times 10^8$ cfu/mL; $P = .455$, Student's *t* test). When *B. fragilis* was grown in the absence of beads, growth was observed under only anaerobic conditions. HE staining of freshly prepared bead sections revealed low numbers of *B. fragilis* cells, whereas, 24 h after incubation, in the absence or presence of oxygen, there was bacterial growth inside the beads (data not shown). When *B. fragilis*, embedded in beads that contained 2×10^6 bacteria, was inoculated into the lungs of C57Bl/6 mice, 7.5×10^5 cfu of *B.*

fragilis/lung were recovered after 24 h. The decrease in counts in vivo was not unexpected, because *B. fragilis* may escape from the anaerobic bead niche and subsequently be cleared by host defenses.

Next, we infected C57Bl/6 mice intratracheally with strain PAO1 embedded in beads. A total dose of 10^6 – 10^7 cfu/mouse was found to cause only low mortality during the first 3 days of infection (figure 4), whereas higher doses resulted in 100% mortality, and lower doses did not cause a chronic infection (data not shown). Numbers of bacteria increased 1 day after infection, from 10^6 – 10^7 to 6.3×10^9 cfu/lung, and decreased thereafter, to a mean of 2.3×10^4 cfu/lung at day 7 (figure 4). In parallel with the decrease in numbers of bacteria, the number of infected mice decreased after day 3, to $27.5\% \pm 3.5\%$ (mean \pm SD) on day 7. Thereafter, there were no significant differences in the percentage of infected mice ($P = .75$, χ^2 test) or the bacterial number of colony-forming units per lung during the next month ($P = .55$, Kruskal-Wallis test). The data suggest that a subpopulation of PAO1 that persists for at least 7 days is selected in vivo in approximately one-fourth of the mice.

To assess whether microaerobic or anaerobic growth conditions in agar beads would lead to a switch from a non-alginate-expressing to an alginate-expressing *P. aeruginosa* phenotype, as occurs in the airways of patients with CF [10, 12, 13], we analyzed infected murine lungs histologically and in situ bacteria by indirect immunofluorescence. One hour after infection, beads de-

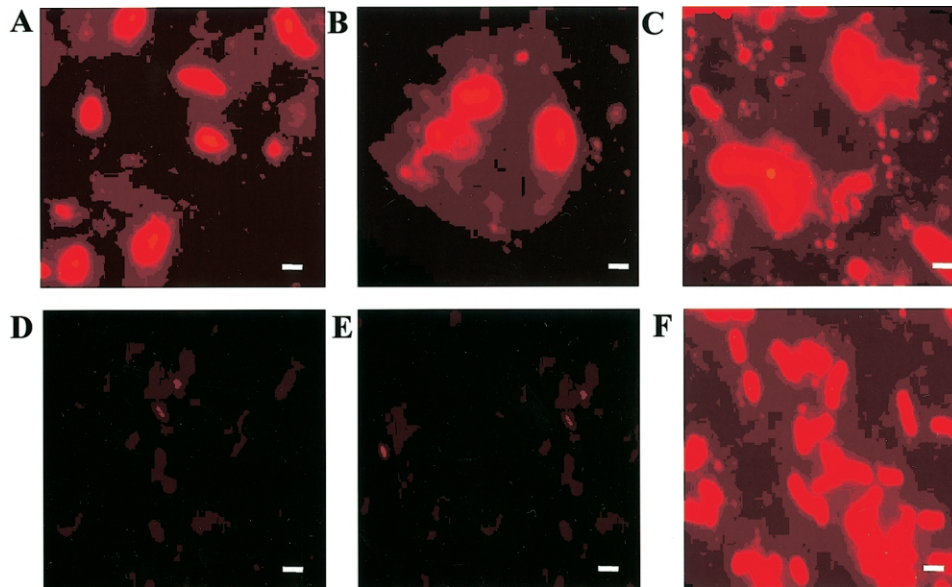


Figure 6. *Pseudomonas aeruginosa* alginate gene expression in mouse lungs and in vitro under aerobic growth conditions. *P. aeruginosa* strain PAO1 expressed alginate as detected by indirect immunofluorescence in lung homogenates of C57Bl/6 mice, infected for 1 (A), 7 (B), and 14 (C) days. Bacterial colonies analyzed after 1 (D) or 7 (E) days of infection lost this phenotypic trait when they were subcultured in vitro under aerobic conditions; after 14 days of infection (F), colonies remained positive for alginate gene expression after aerobic subculture. Bars in A–F, 1 μ m.

posited in the bronchial lumen contained bacterial cells negative for alginate (figure 5A and 5B). However, 1 day after infection, bacteria formed alginate-expressing microcolonies (figure 5D and 5E). Real-time RT-PCR was used to measure *algD* gene expression in murine lungs. One day after infection, *algD* gene expression of strain PAO1 increased 4-fold, compared with that 1 h after infection ($P < .05$, Student's *t* test) (figure 3). Three days after infection, microscopic examination of HE-stained lung-tissue sections revealed that the number of beads per lung had decreased significantly (mean \pm SD; day 1, 7.1 ± 3.5 beads/lobe; day 3, 0.3 ± 0.5 beads/lobe; $P < .01$, Student's *t* test), which suggests that the persisting alginate-positive PAO1 cells were protected from the murine respiratory defense system by the alginate coat and not by the beads.

Stability of alginate gene expression during chronic lung infection. We next monitored the phenotype of the selected population of *P. aeruginosa* during the establishment of chronic airway colonization. PAO1 was positive for alginate in all lung homogenates obtained without subculturing from mice infected for 1–14 days (figure 6A–C). *P. aeruginosa* recovered from murine lungs up to 7 days after infection reverted to a non-alginate-producing phenotype when they were cultured aerobically in vitro (figure 6D and 6E). However, later (weeks 2–4), many of the recovered colonies stably produced alginate aerobically in vitro (figure 6F). After 14 days of infection, 30.6% of the clones stably produced alginate in vitro. When selected alginate-positive clones were further subcultured aerobically (either once or twice), 67% and 60% of the clones, respectively, stained positive for

alginate, which suggests a heterogeneous population among which the majority were stably producing alginate after 14 days in murine lungs. However, none of the colonies revealed the classic alginate-overexpressing mucoid CF phenotype.

Alginate gene expression of phenotypically nonmucoid and mucoid *P. aeruginosa* in sputum specimens from patients with CF. To determine whether the increased production of alginate early after infection of mice with *P. aeruginosa* was representative of CF, we analyzed sputum specimens from patients with CF. As expected, sputum specimens from patients whose respiratory cultures grew mucoid *P. aeruginosa* when they were cultured aerobically (figure 7A) stained positive for alginate (figure 7B). However, sputum specimens from a patient with CF whose *P. aeruginosa* strain grew exclusively nonmucoid colonies on blood agar (figure 7D) also stained positive for alginate (figure 7E), which suggests a gene-regulation mechanism for alginate gene expression in the lungs of patients with CF similar to that in murine lungs. We used real-time RT-PCR to confirm the immunofluorescence data by measuring *algD* gene expression directly in sputum specimens from patients with CF. Compared with strain PAO1 expression, *algD* expression was increased by 5-fold in the sputum from a patient with CF whose respiratory cultures grew only nonmucoid *P. aeruginosa* (figure 3). A 9-fold increase in *algD* expression was detectable in sputum from patients with CF whose respiratory cultures grew mucoid *P. aeruginosa* (figure 3). No significant differences were detected in *algD* expression between the 2 patient groups ($P = .3$, Student's *t* test). The data demonstrate, for the first time,

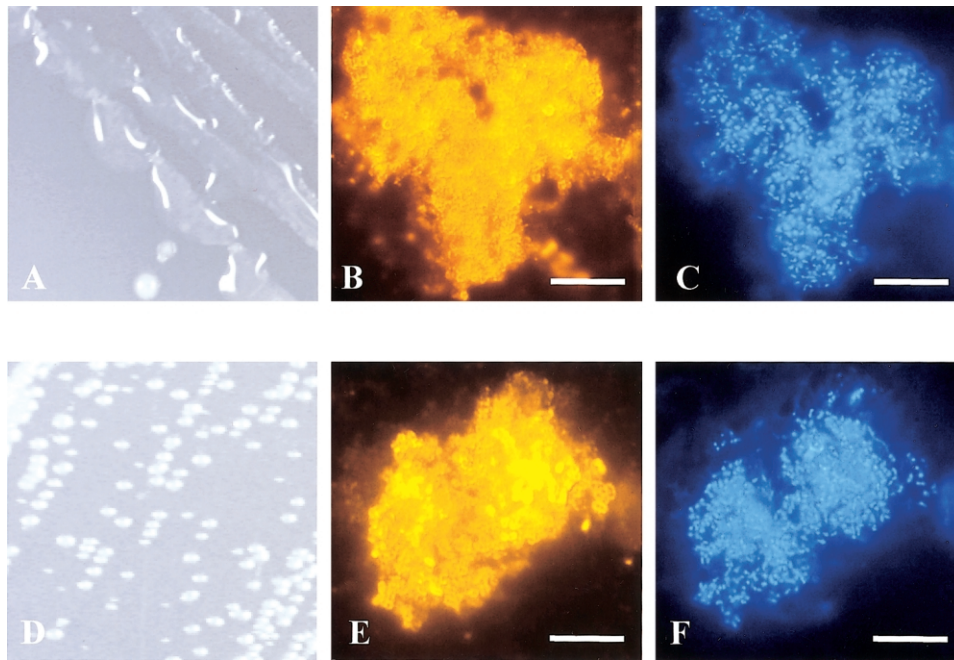


Figure 7. *Pseudomonas aeruginosa* alginate gene expression in sputum specimens from patients with cystic fibrosis (CF) and its phenotype on agar plates. *P. aeruginosa* cultured from sputum specimens from 2 different patients with CF showed a mucoid (A) or a nonmucoid (D) phenotype when they were plated on *Pseudomonas* isolation agar for 24 h. However, *P. aeruginosa* bacterial cells in the sputum from the patient with CF whose respiratory cultures grew only mucoid (B) or only nonmucoid *P. aeruginosa* (E) expressed alginate when they were stained by indirect immunofluorescence. C and F, 4',6'-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride staining of the same sputum as that in panels B and E. Bar in B, C, E, and F, 10 μ m.

that *P. aeruginosa* that reveals a nonmucoid, alginate-negative phenotype when subcultured in vitro produces alginate within the CF lung habitat.

DISCUSSION

The exopolysaccharide alginate is regarded as an essential component of the mucoid *P. aeruginosa* phenotype, and it has been observed primarily on strains recovered from chronically infected airways of patients with CF [10–13]. Also, phenotypically nonmucoid strains of *P. aeruginosa* from patients with CF have been reported to produce low levels of alginate [25, 26]. It appears that the elaboration of some alginate, even in the absence of a switch to a mucoid morphology, is critical for bacterial virulence in the setting of CF, given that an alginate-negative mutant of a phenotypically nonmucoid strain was unable to establish chronic colonization in mice with CF [27]. The isolation of mucoid strains from the airways of patients with CF indicates the onset of an increased rate of deterioration in pulmonary function [12, 28, 29]. Overall, it appears that there is a clear pathophysiological importance for alginate in chronic *P. aeruginosa* lung infection in patients with CF, but it is still not clear how fast alginate is produced when nonmucoid, alginate-negative *P. aeruginosa* strains colonize the airways of patients with CF. Our results show that non-alginate-producing *P. aeruginosa* rapidly expresses alginate when it is exposed to anaero-

bic conditions or is inoculated into murine lungs embedded in agar beads. Alginate gene expression is initially transient but becomes stable among a subset of clones after ~2 weeks of animal infection.

Anaerobic conditions may be one stimulus for initiation of alginate production by *P. aeruginosa*. We have confirmed previous findings [9] that the microaerobic/anaerobic growth conditions present in agar beads rapidly induce a switch from a completely alginate-negative to an alginate-positive but nonmucoid phenotype in strain PAO1. As a biological marker for the degree of anaerobiosis, we used the obligate anaerobic microorganism *B. fragilis*. Inside beads, this bacterium grew well in the presence of air, which suggests that the beads decrease oxygen diffusion sufficiently to allow growth. The switch from a non-alginate-producing to an alginate-producing phenotype after the infection of mice with strain PAO1 was observed within 24 h. Although this model has been used by others [21, 22, 30–32], changes in alginate elaboration by a nonmucoid *P. aeruginosa* strain has not been reported previously. Additionally, we found that, in sputum from patients with CF whose bacterial cultures grew only phenotypically nonmucoid colonies, there was detectable alginate production on a large number of bacterial cells. Our results suggest that, in agar bead-infected murine lungs as in the airways of patients with CF, alginate is elaborated by many *P. aeruginosa* strains shortly after infection.

The rapid switch of PAO1 to an alginate-positive, nonmucoid phenotype in the murine lung and under anaerobic growth conditions in vitro was reversible up to ~7 days after infection when cells were cultured in an aerobic environment, which suggests that the initial increase in alginate production was due to changes in regulatory gene activity and not to newly acquired, stable mutations (data not shown). A similar finding has been obtained in an acute lung-infection model with strain PAO1, wherein no alginate was detectable on the surface of the infecting strain but, within 1 h of infection, bacteria in lung sections stained strongly positive for alginate gene expression [33]. Here, we have shown that specific genes involved in alginate biosynthesis and its regulation have increased transcription under anaerobic versus aerobic growth conditions, according to the results of DNA arrays and real-time RT-PCR, which corroborate data derived from indirect immunofluorescence with anti-alginate antibodies. These results are of clinical importance, because alginate-producing, nonmucoid *P. aeruginosa* variants may be present in the airways of patients with CF (but this phenotype may not be expressed by organisms cultured on agar plates in vitro) within days after colonization and may contribute to bacterial persistence [26]. Consistent with this conclusion are the results of a previous study that demonstrated the presence of serum antibodies to *P. aeruginosa* alginate in patients with CF harboring only nonmucoid strains, as determined by in vitro cultures from respiratory secretions [34]. Conversion to the stable, mucoid *P. aeruginosa* phenotype that produces high levels of alginate has been linked to mutations in the alginate repressor gene cluster *mucABCD* [14, 18, 35, 36]; however, whether such mutations would occur in alginate-producing, nonmucoid strains is not known and is subject to further investigations.

In summary, we found that anaerobic conditions induce a rapid production of alginate in *P. aeruginosa* and that this response is initially reversible but can become stable after a fairly short period (2 weeks) of chronic lung infection in mice. These findings corroborate those of an analysis of nonmucoid *P. aeruginosa* isolates from patients with CF, which showed that these phenotypes are also alginate positive. Because alginate gene expression by nonmucoid strains is key in the establishment and maintenance of chronic lung infection in transgenic mice with CF [27], it appears that this exopolysaccharide has to be regarded as one of the most important virulence factors of this opportunistic pathogen, at least in patients with CF.

Acknowledgments

We thank Lisa Cariani, for assistance in collecting the specimens from patients with CF; and Giliola Calori, for statistical analysis.

References

1. Darwin C. The origin of species. Available at: <http://www.literature.org/authors/darwin-charles/the-origin-of-species/> Accessed 20 June 2005.
2. Vicente M, Chater KF, De Lorenzo V. Bacterial transcription factors involved in global regulation. *Mol Microbiol* **1999**; 33:8–17.
3. Stover CK, Pham XQ, Erwin AC, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **2000**; 406:959–64.
4. LeClerc JE, Li B, Payne WL, Cebula TA. High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella pathogenes*. *Science* **1996**; 274: 1208–11.
5. Oliver A, Canton R, Campo P, Baquero F, Blazquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* **2000**; 288:1251–4.
6. Oliver A, Baquero F, Blazquez J. The mismatch repair system (*mutS*, *mutL*, and *uvrD* genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants. *Mol Microbiol* **2002**; 43: 1641–50.
7. Taddei F, Radman M, Maynard-Smith J, Toupance B, Gouyon PH, Godelle B. Role of mutator alleles in adaptive evolution. *Nature* **1997**; 387:700–2.
8. Ratjen F, Döring G. Cystic fibrosis. *Lancet* **2003**; 361:681–9.
9. Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, et al. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infection of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* **2002**; 109:317–25.
10. Doggett RG, Harrison GM, Stillwell RN, Wallis ES. An atypical *Pseudomonas aeruginosa* with cystic fibrosis of the pancreas. *J Pediatr* **1966**; 68:215–21.
11. Høiby N. Prevalence of mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa* in bacteriological specimens from patients with cystic fibrosis and patients with other diseases. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl* **1975**; 83:549–52.
12. Li Z, Kosorok MR, Farrell PM, et al. Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. *JAMA* **2005**; 293:581–8.
13. Lam J, Chan R, Lam K, Costerton JW. Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect Immun* **1980**; 28:546–56.
14. Martin DW, Schurr MJ, Mudd MH, Govan JRW, Holloway BW, Deretic V. Mechanisms of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci USA* **1993**; 90:8377–81.
15. Schurr MJ, Yu H, Martinez-Salazar JM, Boucher JC, Deretic V. Control of AlgU, a member of the σ^E -like family of stress sigma factors, by the negative regulators MucA and MucB and *Pseudomonas aeruginosa* conversion to mucoidy in cystic fibrosis. *J Bacteriol* **1996**; 178:4997–5004.
16. Boucher JC, Martinez-Salaza J, Schurr MJ, Mudd MH, Yu H, Deretic V. Two distinct loci affecting conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis encode homologs of the serine protease HtdA. *J Bacteriol* **1996**; 178:511–23.
17. Boucher JC, Schurr MJ, Yu H, Rowen, Deretic V. *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: role of *mucC* in the regulation of alginate production and stress sensitivity. *Microbiology* **1997**; 143:3473–80.
18. Martin DW, Shurr MJ, Mudd MH, Deretic V. Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* into the alginate-producing form: inactivation of *mucB* causes conversion to mucoidy. *Mol Microbiol* **1993**; 9:497–506.
19. Mathee K, Ciofu O, Sternberg C, et al. Mucoid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. *Microbiology* **1999**; 145:1349–57.
20. Holdeman LV, Cato EP, Moore WEC. *Anaerobe laboratory manual*. 4th ed. Blacksburg, VA: Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University, **1972**.
21. Cash HA, Woods DE, McCullough B, Johanson WE, Bass JA. A rat model of chronic respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Am Rev Respir Dis* **1979**; 119:453–9.
22. Starke JR, Edwards MS, Langston C, Bacer CJ. A mouse model of

- chronic pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia*. *Pediatr Res* **1987**;22:698–702.
23. May TB, Chakrabarty AM. Isolation and assay of *Pseudomonas aeruginosa* alginate. *Methods Enzymol* **1994**;235:295–304.
 24. Theilacker C, Coleman FT, Mueschenborn S, Llosa N, Grout M, Pier GB. Construction and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide-alginate conjugate vaccine. *Infect Immun* **2003**;71:3875–84.
 25. Pier GB, DesJardins D, Aguilar T, Barnard M, Speert DP. Polysaccharide surface antigens expressed by non-mucoid isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* **1986**;24:189–96.
 26. Anastassiou ED, Mintzas AC, Kounavis C, Dimitracopoulos G. Alginate production by clinical nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Clin Microbiol* **1987**;25:656–9.
 27. Coleman FT, Mueschenborn S, Meluleni G, et al. Hypersusceptibility of cystic fibrosis mice to chronic *Pseudomonas aeruginosa* oropharyngeal colonization and lung infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **2003**;100:1949–54.
 28. Demko CA, Byard PJ, Davis PB. Gender differences in cystic fibrosis: *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Clin Epidemiol* **1995**;48:1041–9.
 29. Pedersen SS, Espersen F, Høiby N, Jensen T. Immunoglobulin A and immunoglobulin G antibody responses to alginate from *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **1990**;28:747–55.
 30. Van Heeckeren AM, Tscheikuna J, Walenga RW, et al. Effect of *Pseudomonas* infection on weight loss, lung mechanics, and cytokines in mice. *Am J Respir Crit Care Med* **2000**;161:271–9.
 31. O'Reilly T. Relevance of animal models for chronic bacterial airway infections in humans. *Am J Respir Crit Care Med* **1995**;151:2101–8.
 32. Morissette C, Skamene E, Gervais F. Endobronchial inflammation following *Pseudomonas aeruginosa* infection in resistant and susceptible strains of mice. *Infect Immun* **1995**;63:1718–24.
 33. Pier GB, Boyer D, Preston M, et al. Human monoclonal antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* alginate that protect against infection by both mucoid and nonmucoid strains. *J Immunol* **2004**;173:5671–8.
 34. Pedersen SS, Hoiby N, Espersen F, Koch C. Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Thorax* **1992**;47:6–13.
 35. Boucher JC, Yu H, Mudd MH, Deretic V. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: characterization of *muc* mutations in clinical isolates and analysis of clearance in a mouse model of respiratory infection. *Infect Immun* **1997**;65:3838–46.
 36. Anthony M, Rose B, Pegler MB, et al. Genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the sputa of Australian adult cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* **2002**;40:2772–8.

Antibiotic-resistant obligate anaerobes during exacerbations of cystic fibrosis patients

D. Worlitzsch^{1,2}, C. Rintelen¹, K. Böhm¹, B. Wollschläger³, N. Merkel⁴, M. Borneff-Lipp¹ and G. Döring²

1) Institute of Hygiene, University of Halle, Halle, 2) Institute of Medical Microbiology and Hygiene, University of Tübingen, Tübingen,

3) Hospital of Internal Medicine and 4) Children's Hospital, University of Halle, Halle, Germany

Abstract

Pseudomonas aeruginosa and *Staphylococcus aureus* are thought to cause the majority of lung infections in patients with cystic fibrosis (CF). However, other bacterial pathogens may contribute to the pathophysiology of lung disease. Here, obligate anaerobes were identified in a cross-sectional study, and cell numbers and antibiotic susceptibilities of facultative and obligate anaerobes from 114 sputum samples from nine children and 36 adults with CF were determined. Furthermore, in 12 CF patients, we investigated whether conventional intravenous antibiotic therapy, administered during acute exacerbations, would affect the numbers of obligate anaerobes. Fifteen genera of obligate anaerobes were identified in 91% of the CF patients. Cell numbers (mean: $2.2 \times 10^7 \pm$ standard deviation 6.9×10^7 CFU/mL of sputum sample) were comparable to those of *P. aeruginosa* and *S. aureus*. *Staphylococcus saccharolyticus* and *Peptostreptococcus prevotii* were most prevalent. Infection with *P. aeruginosa* did not increase the likelihood that obligate anaerobes are present in sputum specimens. Single obligate anaerobic species persisted for up to 11 months in sputum plugs *in vivo*. Patients with and without obligate anaerobes in sputum specimens did not differ in lung function. Intravenous therapy directed against *P. aeruginosa* during acute exacerbations increased lung function, but did not reduce the numbers of obligate anaerobes. Obligate anaerobic species differed widely in their patterns of resistance against meropenem, piperacillin-tazobactam, clindamycin, metronidazole and ceftazidime. In 58% of patients with acute exacerbations, obligate anaerobes were detected that were resistant to the antibiotics used for treatment. Antibiotic therapy, optimized to target anaerobes in addition to *P. aeruginosa*, may improve the management of CF lung disease.

Keywords: Anaerobic bacteria, antibiotic resistance, chronic lung infection, cystic fibrosis, exacerbations

Original Submission: 25 April 2008; **Revised Submission:** 8 July 2008; **Accepted:** 9 August 2008

Editor: R. Cantón

Clin Microbiol Infect 2009; **15**: 454–460

Corresponding author and reprint requests: D. Worlitzsch, Institute of Hygiene, University of Halle, Johann-Andreas-Segner Str. 12, D-06097 Halle (Saale), Germany
E-mail: dieter.worlitzsch@medizin.uni-halle.de

Introduction

In patients with the hereditary disease cystic fibrosis (CF), the major reason for premature death is lung tissue destruction as a consequence of bacterial lung infection. Epidemiological data show that the facultative anaerobic pathogens *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* are the most prevalent bacterial species causing lung disease [1,2]. These pathogens colonize CF airways due to impaired innate immune functions, secondary to mutations in the CF transmembrane conductance regulator gene [3,4]. In particular, biofilm formation within viscous, hypoxic mucous plugs [5]

and deposition of DNA on the respiratory epithelium [6] are thought to facilitate chronic infection in CF patients. As a response to the persisting pathogens, large numbers of neutrophils enter the site of infection, decay and considerably enlarge the volume of viscous sputum plugs. Oxygen consumption by respiratory epithelial cells [7], bacteria [5] and phagocytes [8] eventually leads to anaerobic environmental conditions in the sputum [5], which further impair innate immune functions [9] and compromise antibiotic therapy [10–13].

Large anaerobic sputum plugs in airways of CF patients may provide a perfect niche for obligate anaerobic bacterial species. Indeed, Rogers *et al.* [14] detected 16S rRNA specific for various fastidious anaerobes in CF sputum. Similarly, Harris *et al.* [15] identified rRNA of 65 different obligate anaerobic bacterial species in bronchoalveolar lavage (BAL) fluids from 28 children with CF. Recently, Tunney *et al.* [16] isolated obligate anaerobes of 14 different genera, including *Prevotella*, *Veillonella*, *Propionibacterium* and *Actinomyces*, in 64%

of sputum samples from adults with CF. This group also found that obligate anaerobes were present in equal or greater numbers than *P. aeruginosa* in 78% of sputum specimens [16].

The rapidly growing interest of clinicians and researchers in obligate anaerobes present in CF sputum specimens led to a number of questions in this context. Do genera and species of obligate anaerobes differ among CF centres? Does infection with *P. aeruginosa* increase the likelihood that anaerobic bacteria will be present in CF sputum specimens? Do obligate anaerobes persist in CF airways for longer periods of time? Can obligate anaerobic bacteria also be found in patients suffering from other pulmonary diseases? Do obligate anaerobes play a role in the pathophysiology of CF lung disease and affect lung function? Are cell numbers of obligate anaerobes in CF airways comparable to those of *P. aeruginosa* or *S. aureus*, and does the presence of obligate anaerobes influence cell numbers of facultative anaerobes? Does antibiotic therapy directed against *P. aeruginosa* efficiently reduce the numbers of obligate anaerobes in CF respiratory specimens? How sensitive are obligate anaerobes to various antibiotics?

In response to these questions, obligate anaerobes were identified and cell numbers and antibiotic susceptibilities of facultative and obligate anaerobes were determined in sputum and throat swab samples from children and adults with CF. Furthermore, the antibiotic susceptibility pattern of obligate anaerobes from CF patients was assessed, and lung function in the patient cohort was determined. Finally, the question of whether conventional intravenous antibiotic therapy administered during acute exacerbations would affect the numbers of facultative and obligate anaerobes, as well as lung function, was addressed.

Patients and methods

Patients

Forty-five CF patients (18 male, 27 female; age 24.6 ± 9.7 years; range 6–64 years), attending the Children's Hospital (nine patients; age 6–18 years) and the Hospital of Internal Medicine (36 patients; age 18–64 years) of the University Hospital Halle, were included in the study. Diagnosis of CF was confirmed by sweat testing and/or genotyping. All patients received tobramycin (2×300 mg/day inhaled) and/or colistin (2×80 mg/day inhaled) plus oral azithromycin (1×250 mg/day). Twelve patients suffered from acute exacerbations, defined according to the criteria of Fuchs et al. [17], during the investigation period. These patients received additional (in hospital or at home) intravenous

courses for 2 or 3 weeks with piperacillin–tazobactam (3×1 amp./day), ceftazidime (3×2 g/day), meropenem (3×1 g/day) or cefepim (3×2 g/day). From all 45 patients, 114 expectorated sputum samples were obtained. Within 30 min after collection, samples were processed in the laboratory. Furthermore, throat swabs were obtained from seven CF patients. For determination of oral contamination, throat swabs of the pharynx were performed using phosphate-buffered saline-moistened cotton swabs following sputum expectoration. Additionally, BAL fluids from six children (age 7.2 ± 5.3 years; range 2–16 years), attending the Children's Hospital of the University Hospital Halle, suffering from pulmonary diseases other than CF were obtained. Five of the patients suffered from acute pneumonia; one patient had chronic retention pneumonia with purulent secretions on the basis of perinatal cerebral insults and scoliosis. Explorative BAL was performed as described previously [18]. All patients, or their parents, gave written informed consent. The study was approved by the Ethical Committee of the Medical Faculty of the Martin-Luther University Halle–Wittenberg. The research was carried out in accordance with the Helsinki Declaration.

Cell numbers of facultative and obligate anaerobic bacteria in sputum samples of CF patients

For facultative anaerobes, sputum samples solubilized in phosphate-buffered saline (1 : 1) were incubated in ten-fold dilutions on Columbia agar (Oxoid, Basingstoke, UK), supplemented with sheep blood (10%), aerobically for 24 h at 37°C. For obligate anaerobes, sputum samples were incubated in ten-fold dilutions on brain–heart infusion agar (Heipha, Eppelheim, Germany) and Schaedler (SCS) agar (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France), supplemented with sheep blood (5%), at 37°C for up to 7 days in an anaerobic box (MAKS MG500; Meintrup, Lähden-Holte, Germany). The oxygen-free gas mixture in the box contained 80% nitrogen, 10% hydrogen and 10% carbon dioxide. Up to four phenotypically different anaerobic strains were counted per sputum specimen. An aliquot of 2 mL of BAL fluid was used for bacterial cultures.

Identification of facultative and obligate anaerobic bacteria in sputum samples of CF patients

For identification of facultative anaerobes, single colonies were plated on Columbia, Cetremide and McConkey agar (Oxoid) and incubated aerobically for 24 h at 37°C. Thereafter, Gram staining was performed, and the bacteria were tested for oxidase (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA), catalase (ID-Ase; BioMérieux) and protein A (Staphaurex Plus; Remel, Lenexa, KS, USA). Further

identification was performed using the Vitek biochemical identification system (BioMérieux) and the Crystal system (Becton Dickinson). Micro-aerophilic streptococci were considered to represent upper-airway contamination and were not included in the further evaluation [19,20]. All strains quantified in the anaerobic box were incubated aerobically to exclude facultative or aerotolerant anaerobes. Only strains that did not grow aerobically were analysed further. These bacteria were Gram-stained, and identified employing the RapID Ana II (Remel) identification system and ERIC software (Electronic RapID Compendium version 1.0, Remel).

For taxonomy and nomenclature [21], the recommendations of the manufacturers of the identification systems were used.

Antibiotic sensitivity testing of obligate anaerobes from CF sputum samples

Sensitivity testing for 138 obligate anaerobic strains was performed using SCS agar and the Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden). Breakpoints for the antibiotics were according to the M11-A6 guideline (CLSI, Wayne, PA, USA). The antibiotics clindamycin (breakpoint MIC: 2 mg/L), metronidazole (8 mg/L), meropenem (4 mg/L), piperacillin–tazobactam (32 mg/L) and ceftazidime (≥ 8 mg/L) were tested. MICs were determined after 48 h of anaerobic incubation according to the instructions of the manufacturers.

Determination of lung functions of CF patients

Lung function measurements were performed during quarterly routine visits of the CF patients in the outpatient clinic of the University of Halle. For body plethysmography, the MasterScreen Body (Jaeger, Hoechberg, Germany) was used. Forced expiratory volume in 1 s (FEV₁) and forced vital capacity (FVC) were determined and expressed as percentage of age-predicted lung function. During acute exacerbations, the patients were subjected to additional measurements at the beginning of the exacerbation and, at the latest, 2 weeks (mean \pm standard deviation (SD); 6 \pm 5 days) after termination of the intravenous antibiotic course.

Statistics

For statistical analysis, raw data were checked for normality using the Shapiro–Wilks test. Significance (Student's *t*-test) and correlation (Pearson correlation coefficient) values were calculated using Excel (Microsoft, Redmont, WA, USA). A *p*-value < 0.05 was considered significant. Results are given as means \pm SD.

Results

Identification of facultative and obligate anaerobic bacteria in sputum samples of CF patients and correlation with *P. aeruginosa* infection status, persistence of single species over time, other pulmonary diseases and CF lung function

To determine the prevalence of obligate anaerobes in CF airways and to assess whether genera and species of obligate anaerobes differed among CF centres, 114 sputum specimens from 45 CF patients were analysed. In 41 of 45 CF patients (91%), one or more obligate anaerobic species were detected in sputum samples. Obligate anaerobes were present at comparable rates in children younger than 18 years (82%) and adults (94%). In the 93 positive sputum samples, 168 isolates were assigned to 16 obligate anaerobic genera, with 35 species being identified in 13 genera (Table 1). Up to four different species were found per sputum sample. Species of *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella* and *Clostridium* were detected in 37, 34, 19, 15 and

TABLE 1. Obligate anaerobic bacteria in sputum of cystic fibrosis patients

Genus	N	Species	N
<i>Staphylococcus</i>	37	<i>saccharolyticus</i>	37
<i>Peptostreptococcus</i>	34	<i>anaerobius</i>	6
		<i>micros</i>	1
		<i>prevatii</i>	20
		<i>tetradius</i>	7
<i>Actinomyces</i>	19	<i>israelii</i>	2
		<i>meyeri</i>	3
		<i>naeslundii</i>	1
		<i>odontolyticus</i>	7
<i>Veillonella</i>	15	<i>turicensis</i>	6
<i>Clostridium</i>	12	spp.	15
		<i>bifermantans</i>	1
		<i>butyricum</i>	1
		<i>clostridioforme</i>	2
		<i>difficile</i>	3
		<i>hastiforme</i>	2
		<i>innocuum</i>	1
		<i>perfringens</i>	1
		<i>sporogenes</i>	1
<i>Bacteroides</i>	7	<i>tectum</i>	6
		<i>stercoris</i>	1
<i>Mobiluncus</i>	7	<i>curtsii</i>	1
		<i>mulieris</i>	6
<i>Streptococcus</i>	7	<i>constellatus</i>	6
		<i>intermedius</i>	1
<i>Capnocytophaga</i>	6	spp.	6
<i>Gemella</i>	5	<i>morbillorum</i>	5
<i>Prevotella</i>	4	<i>corporis</i>	2
		<i>melaninogenica</i>	2
<i>Eubacterium</i>	3	<i>aerofaciens</i>	2
		<i>limosum</i>	1
<i>Fusobacterium</i>	3	<i>necrophorum</i>	3
<i>Lactobacillus</i>	3	<i>acidophilus</i>	2
		<i>jensenii</i>	1
<i>Propionibacterium</i>	3	<i>acnes</i>	1
		<i>granulosum</i>	1
		<i>propionicum</i>	1
<i>Wolinella</i>	3	spp.	3
Total	168		168

12 different sputum specimens, respectively, and members of 11 other genera were found in the remaining 51 different specimens (Table 1). Obligate anaerobes were detected in sputum samples from 22 CF patients who were chronically infected with *P. aeruginosa*. However, obligate anaerobes were also present in sputum specimens of 19 patients with *S. aureus*, in four with *Burkholderia cepacia* complex bacteria, and in three with *Stenotrophomonas maltophilia*. Three patients harboured two strains simultaneously. Thus, infection with *P. aeruginosa* does not seem to increase the likelihood of the presence of obligate anaerobic bacteria in CF sputum specimens.

Next, it was investigated whether obligate anaerobes persist in CF airways for extended periods of time. From 26 of 45 patients, two or more sputum specimens taken at different time-points were available. In 42% of the patients, the same species was found repeatedly. In five patients, up to four different obligate anaerobic species were cultured simultaneously over a period of 6 months. Identical species were re-identified in three patients for up to 11 months. These results show that single obligate anaerobes are able to persist in CF airways for extended periods of time.

To assess whether the presence of obligate anaerobic bacteria in respiratory specimens is specific for CF patients, BAL fluids from six children suffering from pulmonary diseases other than CF were assessed for obligate anaerobes. Three of the patients had sterile lungs. In BAL fluids of the three other patients, low numbers of *Streptococcus* spp. and other aerobic bacteria ($\leq 4 \times 10^4$ CFU/mL), which possibly represent upper-airway contamination [19,20], were detected. BAL fluid from only one patient with chronic retention pneumonia yielded obligate anaerobic bacteria. In the purulent secretions from this patient, the facultative anaerobe *S. aureus* (2×10^2 CFU/mL) was detected, along with the obligate anaerobic species *Staphylococcus saccharolyticus* (1×10^2 CFU/mL). The results suggest that, under anaerobic conditions, large volumes of sputum are needed to allow proliferation of obligate anaerobes to reach the numbers found in CF patients (see below).

Next, it was investigated whether obligate anaerobes contribute to the pathophysiology of CF lung disease by affecting lung function. Lung function values did not differ significantly between patients with and those without obligate anaerobes (FEV₁, $p = 0.087$; FVC, $p = 0.880$).

Cell numbers of facultative and obligate anaerobic bacteria in sputum samples of CF patients and comparison with bacteria isolated from throat swabs

To investigate whether cell numbers of obligate anaerobes in CF airways were comparable to those of *P. aeruginosa* or

S. aureus, a quantitative microbiological determination was carried out. Cell numbers of facultative (mean: 5.5×10^7 CFU/mL) and obligate (mean: 2.2×10^7 CFU/mL) anaerobic bacteria in sputum samples of CF patients were high and within comparable ranges (Fig. 1). In contrast, obligate anaerobes were detected from throat swabs in low numbers ($7.5 \times 10^3 \pm 1.1 \times 10^4$ CFU/mL) and in only three of seven patients. To answer the question of whether the presence of obligate anaerobes would influence cell numbers of *P. aeruginosa* or *S. aureus*, facultative and obligate anaerobe counts were compared in all sputum samples. *P. aeruginosa* cell numbers in sputum specimens with and without obligate anaerobes did not differ significantly ($p = 0.970$). A similar result was obtained when *S. aureus* cell numbers were compared in sputum specimens with and without obligate anaerobes ($p = 0.230$). Furthermore, the numbers of obligate anaerobes in sputum samples with *P. aeruginosa* or *S. aureus* did not differ significantly ($p = 0.176$).

Impact of *P. aeruginosa*-specific antibiotic therapy during acute exacerbations on cell numbers of obligate anaerobes and lung function, and antibiotic resistance patterns of obligate anaerobes in CF respiratory specimens

To test the impact of antibiotic therapy, directed against *P. aeruginosa* during acute exacerbations, on numbers of obligate anaerobes in CF respiratory specimens and on lung function, cell numbers of obligate anaerobes were determined in 12 CF patients before and after *P. aeruginosa*-specific antibiotic therapy. In sputum samples of all patients, obligate anaerobes were found before and after antibiotic therapy. The number of obligate anaerobes did not decrease significantly after therapy, and the numbers of facultative anaerobes did not change (Fig. 2a). In seven of 12 patients,

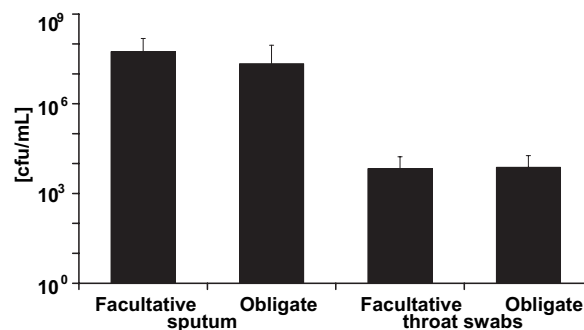


FIG. 1. Equivalence of facultative and obligate anaerobic bacterial cell numbers in respiratory specimens of cystic fibrosis (CF) patients. Cell numbers of facultative and obligate anaerobes were evaluated in 41 sputum samples and seven throat swabs obtained from CF patients.

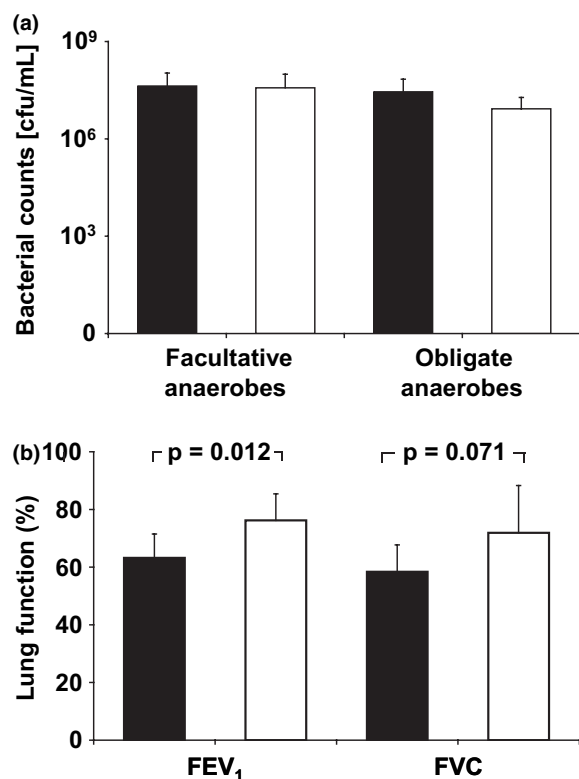


FIG. 2. Antibiotic therapy for acute exacerbations does not influence sputum cell numbers of facultative and obligate anaerobic bacteria, but does lead to an increase in lung function. Sputum bacterial counts of facultative and obligate anaerobes (a), forced expiratory volume in 1 s (FEV₁) and forced vital capacity (FVC) (b) in 12 cystic fibrosis patients suffering from acute exacerbations before (■) and after (□) intravenous *Pseudomonas aeruginosa*-specific antibiotic therapy.

one or more obligate anaerobes were detected that were resistant to the respective antibiotics used for treatment of acute exacerbations. However, FEV₁ increased significantly after therapy ($p = 0.012$), and a trend towards improvement

was observed with respect to FVC, reflecting an improved clinical condition (Fig. 2b).

To assess the antibiotic resistance patterns of obligate anaerobes, susceptibility testing using the Etest was performed for 138 obligate anaerobic strains isolated from CF sputum specimens (Table 2). Only 3.6% of the obligate anaerobic strains tested were resistant to meropenem. Much larger variability was observed in the resistance to piperacillin–tazobactam, clindamycin, metronidazole and ceftazidime. Ceftazidime was the least active antibiotic with regard to obligate anaerobes (Table 2).

Discussion

In the vast majority of sputum samples from CF patients, a large variety of obligate anaerobic genera is present, independently of the age of the patient. Up to four different species were found in single sputum samples. The presence of low numbers of obligate anaerobes in throat swabs of CF patients suggests that the oral cavity is the niche from which obligate anaerobes spread into the lower airways, where they proliferate in the anaerobic sputum plugs. These findings partly corroborate previous studies showing a high diversity of obligate anaerobes in sputum as well as in BAL fluid. Although bacterial numbers in BAL fluid were lower, the identification of specific bacteria corresponded well with that of the bacteria found in the sputum of the respective patients [16]. However, other species were dominant in the airways of CF patients attending the CF centre in Halle, as compared to those in other studies [14–16]. Specifically, a high prevalence of *Prevotella* spp. was not found. Rather, different species of *Staphylococcus* and *Peptostreptococcus* were predominant. This may be due to regional differences in species prevalence, or differences in the identification techniques

TABLE 2. Antibiotic susceptibilities of obligate anaerobes

Species	Strains tested	No. of resistant strains (%)				
		PTC	CM	MZ	MP	TZ
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	32	2 (6)	5 (16)	26 (81)	0 (0)	7 (22)
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	25	14 (56)	1 (4)	2 (8)	1 (4)	24 (96)
<i>Actinomyces</i> spp.	18	0 (0)	7 (39)	9 (50)	2 (11)	8 (44)
<i>Veillonella</i> spp.	14	8 (57)	1 (7)	4 (29)	0 (0)	11 (79)
<i>Streptococcus</i> spp.	10	0 (0)	4 (40)	10 (100)	0 (0)	2 (20)
<i>Clostridium</i> spp.	9	0 (0)	4 (44)	3 (33)	1 (11)	4 (44)
<i>Bacteroides</i> spp.	8	0 (0)	3 (37)	0 (0)	0 (0)	6 (75)
<i>Propionibacterium</i> spp.	3	0	0	3	0	0
<i>Lactobacillus</i> spp.	3	0	3	0	0	0
<i>Eubacterium</i> spp.	3	0	1	2	0	3
<i>Gemella morbillorum</i>	3	0	2	2	0	1
<i>Prevotella</i> spp.	3	0	0	0	0	2
<i>Mobiluncus</i> spp.	3	0	0	2	0	0
<i>Capnocytophaga</i> spp.	2	0	1	2	1	1
<i>Wolinella</i> spp.	2	2	0	2	0	2
Total	138	18.8%	23.2%	48.6%	3.6%	51.4%

used. For example, in the present study, the use of antibiotic-containing culture media for growing obligate anaerobes was abandoned. In addition, taxonomy and nomenclature of the obligate anaerobes are subject to continuous modifications [21]. Obligate anaerobes were also found to persist in CF airways for longer periods of time.

The present results also indicate that infection with *P. aeruginosa* does not significantly increase the likelihood that anaerobic bacteria are present in CF sputum specimens, as reported previously [16], as obligate anaerobes were also found in sputum specimens from patients infected with other facultative anaerobic species, e.g. *S. aureus*. Furthermore, the presence of obligate anaerobes does not reduce or increase the cell numbers of *P. aeruginosa* or *S. aureus*, as no correlations were found when facultative and obligate anaerobes were quantified in sputum specimens of CF patients. Thus, the presence of large anaerobic sputum volumes is essential to allow obligate anaerobes to prevail in the airways of CF patients. This notion is further supported by the finding that obligate anaerobes were found, in low cell numbers, in BAL fluids of only one of six patients suffering from other pulmonary diseases. Only this single patient expectorated small amounts of purulent sputum. BAL samples were used, as the children would not spontaneously produce sputum, and as the detection limit for bacteria in BAL fluid is low (10^1 CFU/mL). Possibly, obligate anaerobes can also be detected in the lungs of patients with other chronic lung diseases associated with sputum production, e.g. chronic obstructive lung disease.

The question of whether obligate anaerobes play a role in the pathophysiology of CF lung disease affecting lung function could not be sufficiently answered at the end of this study. Although lung function values did not differ significantly between patients with and those without obligate anaerobes in their airways, it is far too early to conclude that obligate anaerobes do not contribute to CF lung disease. Further studies, e.g. using antibiotics targeted specifically to obligate anaerobes, may be more informative.

Antibiotic therapy directed against *P. aeruginosa* did not reduce the numbers of obligate anaerobes in CF respiratory specimens. This may be a reflection of the fact that 58% of the patients harboured obligate anaerobes that were resistant to the antibiotics used for the treatment of acute exacerbations. When these experiments were enlarged to include 138 obligate anaerobic strains, a much larger variability in resistance to piperacillin-tazobactam, clindamycin, metronidazole and ceftazidime was observed, with the exception of meropenem, to which only 3.6% of all obligate anaerobic strains tested were resistant. A similar result was also found by Tunney et al. [16].

However, FEV₁ increased significantly after therapy. This finding may also be interpreted as meaning that obligate anaerobes play no role in the pathophysiology of CF lung disease. However, *P. aeruginosa*-specific antibiotics did not affect the cell numbers of facultative anaerobes, a phenomenon that requires further investigation.

Taken together, these data demonstrate that obligate anaerobes are present in the airways of the vast majority of chronically infected CF patients. If obligate anaerobic bacteria contribute to inflammation and damage in the CF lung, altered antibiotic therapy, optimized to target anaerobes in addition to the primary infecting pathogens, may improve the management of CF patients.

Acknowledgements

Parts of this work have been presented in abstract form: Worlitzsch D, Rintelen C, Böhm K, Wollschläger B, Merkel N, Borneff-Lipp M, Döring G. Persistence of antibiotic-resistant strict anaerobes in sputum. 21st Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Anaheim, CA, USA, 3–6 October 2007. Published in: *Pediatr Pulmonol* 2007; suppl. 30: 317.

Transparency declaration

D. Worlitzsch, C. Rintelen, K. Böhm, B. Wollschläger, N. Merkel, M. Borneff-Lipp and G. Döring do not have any commercial or potential dual interests. C. Rintelen received a travel grant from Novartis Pharma GmbH, Nürnberg, Germany.

References

1. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 918–951.
2. Anonymous. *Cystic fibrosis foundation patient registry 1997 annual data report*. Bethesda, MD: Cystic Fibrosis Foundation, 1998.
3. Ratjen F, Döring G. Cystic fibrosis. *Lancet* 2003; 361: 681–689.
4. Döring G. New insights into the pathophysiology of lung disease in cystic fibrosis patients. *Eur Respir Monogr* 2006; 35: 1–20.
5. Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M et al. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* 2002; 109: 317–325.
6. Teichgräber V, Ulrich M, Riethmüller J et al. Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis. *Nat Med* 2008; 14: 382–391.
7. Stutts MJ, Knowles MR, Gatzky JT, Boucher RC. Oxygen consumption and ouabain binding sites in cystic fibrosis nasal epithelium. *Pediatr Res* 1986; 20: 1316–1320.

8. Worlitzsch D, Herberth G, Ulrich M, Döring G. Catalase, myeloperoxidase and hydrogen peroxide in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 1998; 11: 377–383.
9. Ulrich M, Bastian M, Cramton S *et al*. 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* 2007; 65: 1276–1287.
10. 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: 720–740.
11. Hill D, Rose B, Pajkos A *et al*. Antibiotic susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates derived from patients with cystic fibrosis under aerobic, anaerobic, and biofilm conditions. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5085–5090.
12. 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* 2005; 24: 677–687.
13. Döring G, Hoiby N, for the Consensus Study Group. Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus. *J Cyst Fibrosis* 2004; 3: 67–91.
14. Rogers GB, Carroll MP, Serisier DJ, Hockey PM, Jones G, Bruce KD. Characterization of bacterial community diversity in cystic fibrosis lung infections by use of 16S ribosomal DNA terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5176–5183.
15. Harris JK, De Groote MA, Sagel SD *et al*. Molecular identification of bacteria in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 20529–20533.
16. Tunney MM, Field TR, Moriarty TF *et al*. Detection of anaerobic bacteria in high numbers in sputum from patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 995–1001.
17. Fuchs HJ, Borowitz DS, Christiansen DH *et al*. Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331: 637–642.
18. Paul K, Rietschel E, Ballmann M *et al*. Effect of treatment with dornase alpha on airway inflammation in cystic fibrosis patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 719–725.
19. Gilligan PH. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4: 35–51.
20. Taylor L, Corey M, Matlow A, Sweezey NB, Ratjen F. Comparison of throat swabs and nasopharyngeal suction specimens in non-sputum-producing patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2006; 41: 839–843.
21. Vandamme PAR. Taxonomy and classification of bacteria. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of clinical microbiology*, 8th edn. Washington, DC: ASM Press, 2003; 271–285.

Tabellarischer Lebenslauf

Dr. med. Dieter Worlitzsch

Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Familienstand:	Ledig
Geburt:	16.11.56 in Kiel als Sohn der Hauptschullehrerin Maria Worlitzsch und des Grund- und Hauptschulrektors Manfred Worlitzsch
1962– 1975	Schulbesuch in Kiel, Abschluß Abitur
1976 – 1978	Zivildienst als Rettungssanitäter
1978 – 1983	Studium der Geschichte und Politikwissenschaften, Christian-Albrechts-Universität Kiel
1983 – 1990	Studium der Humanmedizin, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
1989	Promotion: Molekulare Epidemiologie der <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Harnwegsinfektion bei Querschnittgelähmten
1991 - 1993	Arzt im Praktikum und Assistenzarzt, Chirurgische Abteilung des Kreiskrankenhauses Melsungen (Hessen)
1994 - 2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene, Medizinische Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
2002	Facharzt für Hygiene und Umweltmedizin
seit 2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Hygiene, Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2005	Ernennung zum Oberarzt

Auslandsaufenthalte zu Forschungszwecken:

04/95 Department of Clinical Microbiology, Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark. Erlernen der Methoden zur Messung der Sauerstoffradikalproduktion durch stimulierte neutrophile Granulozyten (Cytochrom C-Methode, Biolumineszenz). Prof. Dr. Arsalan Kharazmi, Ph.D.

11/96, 04/97, 05/97, 03/99, 03/01, 03/02, 10/02. Centre Hospitalier Lyon Sud, Service de Pédiatrie, Unité de Pneumologie et Mucoviscidose, Pierre-Bénite, France. Glutaraldehyd- und

Kryokonservierung von frisch explantiertem Lungengewebe von Patienten mit Cystischer Fibrose. Prof. Dr. Gabriel Bellon.

02/98, 09/01, 06/02 Department of Medicine, University of Wisconsin School of Medicine and Public Health, Madison, Wisconsin, U.S.A. Bronchoskopische Bestimmung des Sauerstoffpartialdrucks in Sputum innerhalb der Lunge von Patienten mit Cystischer Fibrose. Keith C. Meyer, MD, MS, FACP, FCCP, Professor of Medicine.

02/97 Inselspital Bern, Bern, Switzerland. Bronchoskopische Bestimmung des Sauerstoffpartialdrucks in Sputum innerhalb der Lunge von Patienten mit Cystischer Fibrose. Oberarzt Dr. med. Peter Birrer, M.D.

Halle, den 26.01.2010