

Mikrodiversität von *Stenotrophomonas maltophilia*

Untersuchungen zur Phylogenie und Virulenz

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich

genehmigte

DISSERTATION

von

Diplom-Umweltwissenschaftlerin Martina Maria Adamek

aus

Oppeln - Polen

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Korreferent: PD Dr. Charles Franz

Tag der mündlichen Prüfung: 09.02.2012

meinen Eltern gewidmet

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Juli 2008 bis September 2011 am Institut für Ingenieurbiologie und Biotechnologie des Abwassers und am Institut für Funktionelle Grenzflächen, Abteilung Mikrobiologie an natürlichen und technischen Grenzflächen des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) unter der Betreuung von Herrn Dr. Stephan Bathe und Herrn Dr. Thomas Schwartz durchgeführt.

Ich versichere hiermit, dass ich meine Dissertation mit dem Titel "Mikrodiversität von *Stenotrophomonas maltophilia* – Untersuchungen zur Phylogenie und Virulenz" selbständig und nur mit Hilfe der erlaubten Mittel angefertigt habe. Dabei habe ich mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Karlsruhe, Januar 2012

Martina Adamek

Im Rahmen dieser Dissertation entstanden folgende Publikationen:

Artikel in einer Fachzeitschrift:

Adamek M, Overhage J, Bathe S, Winter J, Fischer R, Schwartz T (2011) Genotyping of Environmental and Clinical *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates and their Pathogenic Potential. **PLoS ONE** 6(11): e27615.

Kapitel in einem Fachbuch:

Martina Adamek and Stephan Bathe. Chapter 90. *Stenotrophomonas*
in
Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens
p. 1063-1072. Published: April 18, 2011 by CRC Press - 1,278 Pages
Edited By: Dongyou Liu, *RCPA Biosecurity QAP, New South Wales, Australia*

Zusammenfassung

Stenotrophomonas maltophilia ist eine ubiquitär verbreitete und äußerst vielseitige Bakterienspezies. Als opportunistisches Pathogen ist das Bakterium in der Lage bei immungeschwächten Patienten schwere Infektionen hervorzurufen. Faktoren, die zur Virulenz von *S. maltophilia* beitragen, wurden bislang nur wenig untersucht.

Um das Virulenzpotential der Spezies *S. maltophilia* zu charakterisieren, wurde die genetische und physiologische Mikrodiversität von *S. maltophilia* im Zusammenhang mit klinisch relevanten Faktoren untersucht. Kandidaten für neue Virulenzgene wurden in diesem Zusammenhang beschrieben und weitergehend untersucht.

Eine Genotypisierung der Spezies wurde mittels rep-PCR Fingerprinting und einer Sequenzanalyse des *gyrB*-Gens durchgeführt. Die Basis dafür war eine *S. maltophilia* Stammsammlung von 167 Isolaten aus dem klinischen Milieu sowie natürlichen Boden- Wasser- und Flusssedimentproben, entnommen aus unterschiedlichen Gewässern in der näheren Umgebung von Karlsruhe. Es war möglich, die Isolate mittels rep-PCR in 12 genetische Subgruppen zu unterteilen und anhand der Sequenzierung des *gyrB*-Gens 10 genetische Gruppen zu unterscheiden, welche größtenteils bestimmten Ökotypen zugeordnet werden konnten. An einer exemplarischen Auswahl von Isolaten aus den jeweiligen Gruppen wurde das Potential zur Produktion virulenzrelevanter Sekundärmetabolite, die Motilität und das Potential zur Biofilmbildung untersucht. Fast alle *S. maltophilia* Isolate waren in der Lage, Sekundärmetabolite wie Proteasen, Hämolysin und Siderophore zu produzieren. Hinsichtlich ihrer Motilität und Biofilmbildung konnten deutliche Unterschiede aufgezeigt werden, die aber nicht mit bestimmten Genotypen korrelierten. Das Virulenzpotential wurde in einem Amöbenmodell mit *Dictyostelium discoideum* und *Acanthamoeba castellanii* evaluiert. Eine erhöhte Virulenz gegenüber *D. discoideum* konnte bei zwei genetischen Gruppen beobachtet werden, aber nur eine dieser Gruppen zeigte auch Virulenz gegenüber *A. castellanii*. Diese teilweise abweichenden Ergebnisse in der Virulenz und die Tatsache, dass Stämme die bereits als virulent getestet wurden im Amöbenmodell als nicht virulent eingestuft wurden, zeigten die Grenzen dieses Virulenznachweises auf. Eine weitergehende Analyse von Virulenzfaktoren benötigt ein komplexeres Modell, das vergleichbar mit dem Menschen als Wirt ist.

Anhand des Genomvergleichs von fünf *S. maltophilia* Stämmen konnten potentielle Virulenz- und Antibiotikaresistenzgene identifiziert werden. Es zeigte sich, dass alle *S. maltophilia* Isolate ein vergleichbar hohes Potential für Antibiotikaresistenzen besaßen. Ebenso wiesen alle Isolate das gleiche genetische Grundpotential zur Ausprägung von Virulenzfaktoren auf.

Die dargestellte genetische Charakterisierung von Virulenzdeterminanten kann in Zukunft als Ausgangspunkt für die Erstellung von Klonbanken genutzt werden.

Als Kandidaten für neue Virulenzgene wurden ein Typ-6-Sekretionssystem sowie Gene für zwei Proteine der RTX (*repeats in toxin*)-Familie näher charakterisiert. Der Vergleich konservierter Domänen legt die Vermutung nahe, dass es sich bei den RTX-Proteinen um ein Hämolysin und eine Protease, die das Hämolysin aktiviert, handelt. Ihre Genexpression konnte in verschiedenen Medien, die Nährstoffe aus Serum, Blut oder Urin zur Verfügung stellen, nachgewiesen werden. Das Vorkommen der RTX-Gene konnte nur bei einem *S. maltophilia* Isolat nachgewiesen werden, daher konnten sie als Ursache der Virulenz gegenüber Amöben ausgeschlossen werden. Ein Vorkommen des Typ-6-Sekretionssystems konnte bei 16 % der untersuchten *S. maltophilia* Isolate nachgewiesen werden. Diese waren aber nur zum Teil virulent gegenüber Amöben und kamen daher in diesem Modell nicht als allgemein gültiger Virulenzfaktor in Frage.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte eine Basis für die taxonomische Eingliederung von *S. maltophilia* in verschiedene Subgruppen geschaffen werden. Eine Bestandsaufnahme genetischer und physiologischer Faktoren, die zur Antibiotikaresistenz und Virulenz der Bakterienspezies führen können, kann als Grundlage für weitergehende Untersuchungen verwendet werden.

Abstract

Stenotrophomonas maltophilia is a highly versatile species, which is ubiquitously distributed in the environment. As an opportunistic pathogen, the bacterium is capable to cause severe infections in immunocompromised patients. Factors, influencing the virulence of *S. maltophilia* have been rarely described so far.

To characterize the virulence potential of *S. maltophilia*, the genetic and physiologic microdiversity was described in the context of clinically relevant factors. Moreover, candidates for novel virulence genes were described and further analyzed.

The intraspecies diversity of *S. maltophilia* was elucidated by means of two different genotyping methods, rep-PCR fingerprinting and *gyrB*-gene sequencing. A strain collection of 167 isolates from clinical and environmental specimen (soil, freshwater and sediments from different surface water sources around Karlsruhe) was analyzed. Rep-PCR fingerprinting revealed 12 genetic subgroups, while *gyrB*-gene sequencing distinguished 10 subgroups. Both typing methods revealed a similar group composition, with some of the groups representing different ecotypes.

The potential for the production of virulence associated secondary metabolites, the motility properties and the potential for biofilm formation were analyzed on a subset of 51 isolates, representative for the genetic groups. Nearly all *S. maltophilia* strains were able to produce secondary metabolites, such as proteases, hemolysins and siderophores. However, they showed significant differences in motility and biofilm formation, which did not correlate with the genotype.

The virulence potential of *S. maltophilia* was tested in an amoeba model with *Dictyostelium discoideum* and *Acanthamoeba castellanii* as hosts. Increased virulence towards *D. discoideum* was detected for two *S. maltophilia* genogroups, whereas only one group showed virulence towards *A. castellanii*. Several strains, involved in human infections, did not show any virulence against amoeba. These discrepancies revealed the limits of this model. Further analysis of virulence factors will need more complex models, which better resemble infections in a human host.

Based on the genome comparison of five *S. maltophilia* strains, it was possible to identify potential virulence and antibiotic resistance genes. A high potential for antibiotic resistance was revealed for all strains. Likewise, all strains showed an equal potential for virulence. The presented genetic characterization of virulence determinants could be used as basis for the creation of clone banks to further analyze the impact of these factors.

As candidates for novel virulence genes of *S. maltophilia*, a type-6-secretion system and two RTX (repeats in toxin)-family proteins were characterized in more detail. A comparison of conserved domains suggests the RTX proteins being a hemolysin and a protease which activates the hemolysin. Their gene expression was shown in different media, containing nutrients from serum, blood or urine. Occurrence of the RTX-genes was shown only for one single *S. maltophilia* strain. Thus, they could not be attributed to the virulence mechanism towards amoeba. The type-6-secretion system was ascertained in 16 % of the tested strains. As only some of these strains were virulent for the amoebae, they could not be accounted as a major virulence factor for amoeba, either.

The present study created a basis for the taxonomic classification of subtypes of *S. maltophilia*. The evaluation of genetic and physiologic factors that lead to the antibiotic resistances and virulence of *S. maltophilia* could be used as a basis for further studies.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	III
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 <i>Stenotrophomonas</i> – eine Übersicht	2
1.2 Morphologische und physiologische Charakterisierung von <i>S. maltophilia</i>	5
1.3 Vorkommen und Eigenschaften von <i>S. maltophilia</i> in der Umwelt	6
1.4 <i>S. maltophilia</i> als nosokomiales Pathogen	6
1.5 Diversität von <i>S. maltophilia</i>	8
1.6 Das Genom von <i>S. maltophilia</i>	9
1.7 Antibiotikaresistenzen von <i>S. maltophilia</i>	10
1.8 Virulenz von <i>S. maltophilia</i> und diese beeinflussende Faktoren	11
1.8.1 Primäre Adhäsion und Biofilmbildung	11
1.8.2 Potentielle Virulenzfaktoren	12
1.8.3 Sekretionssysteme	13
1.9 Virulenzuntersuchungen mit Amöben als Modellorganismen	14
1.9.1 Die Modellamöbe – <i>Dictyostelium discoideum</i>	15
1.9.2 Die Modellamöbe – <i>Acanthamoeba castellanii</i>	17
1.10 Next Generation Sequencing erlaubt Vergleiche des Kern- und Pangenoms von <i>S. maltophilia</i>	18
1.10.1 Die Illumina/Solexa Technologie	19
1.10.2 Computerbasierte Auswertung von Next Generation Sequencing Daten	21
1.11 Aufgabenstellung	23
2 Material	25
2.1 Bakterien- und Amöbenisolate	25
2.1.1 Bakterienisolate	25
2.1.2 Amöben	28

2.2 Nährmedien und Puffer	28
2.2.1 Allgemeine Nährmedien	28
2.2.2 Selektivnährmedien	29
2.2.3 Testnährmedien	30
2.2.4 Puffer und Lösungen	30
2.3 Antibiotika	31
2.4 Chemikalien	31
2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)	32
2.6 Kommerzielle Reaktions-Kits	33
2.7 Geräte und Materialien	34
2.8 Computer Software und Datenbanken	35
3 Methoden.....	36
3.1 Mikrobiologische Methoden	36
3.1.1 Isolierung von <i>S. maltophilia</i> aus Umweltproben	36
Isolierung mittels XMSM Selektiv-Agar	36
Isolierung auf Müller-Hinton Agar mit Imipenem	36
3.1.2 Anzucht und Stammhaltungsbedingungen.....	37
Anzucht der Bakterien	37
Stammhaltung der Bakterien	37
Anzucht der Amöben	37
Stammhaltung der Amöben	38
Anzuchtbedingungen für die spätere RNA-Isolierung	38
3.1.3 Physiologische Charakterisierung der Bakterienisolate	39
Aufnahme einer Wachstumskurve	39
Charakterisierung des Potentials zur Biofilmbildung	39
Beweglichkeit durch Pili - <i>Twitching</i>	40
Beweglichkeit durch Flagellen - Schwimmen	41
Sekretion von Siderophoren	41
Sekretion von Hämolytinen	42
Sekretion von Proteasen	42
Bestimmung der Antibiotikaresistenz - Plattendiffusionstest	42
Bestimmung der Antibiotikaresistenz – Mikrobouillon-Verdünnung	43
3.1.4 Virulenztests am Amöbenmodell	44

3.2 Molekularbiologische Methoden	45
3.2.1 Zellaufschluss, RNA- und DNA-Isolierung.....	45
Hitzenaturierte Zellextrakte	45
Phenol-Chloroform-Extraktion	45
DNA-Extraktion mit kommerziell erhältlichen Kits (QIAGEN)	46
Ethanolpräzipitation der isolierten DNA	46
RNA-Isolierung mittels RNeasy Kit (QIAGEN)	47
Optische Vermessung von RNA und DNA	48
Reverse Transkription	49
3.2.2 Polymerasekettenreaktion	49
PCR-Nachweis von <i>S. maltophilia</i>	50
Rep-PCR	51
PCR-Amplifikation des <i>housekeeping</i> -Gens <i>gyrB</i>	51
PCR-Amplifikation der potentiellen Virulenzgene <i>frpA</i> , <i>frpC</i> und des <i>hcp</i> -Gens des Typ-6-Sekretionssystems	52
3.2.3 Gel-Elektrophorese	53
3.2.4 Computergestützte Datenauswertung der molekularbiologischen Versuche.....	53
3.3 Gen-Sequenzierung nach dem modifizierten Sanger-Prinzip	54
3.4 Genomsequenzierung: Computergestützte Datenbearbeitung und Auswertung.....	55
3.4.1 <i>De novo</i> Assembly	55
3.4.2 Funktionelle Gen-Annotation	57
Vergleich der Genomsequenzen von <i>S. maltophilia</i>	58
Problematik der Annotation und des Alignments von <i>draft</i> -Genomdaten	60
4 Ergebnisse	61
4.1 Genetische Diversität von <i>S. maltophilia</i>	61
4.1.1 Rep-PCR Fingerprinting	62
4.1.2 Sequenzanalyse des <i>gyrB</i> -Gens	66
4.1.3 Vergleich der Ergebnisse des rep-PCR Fingerprinting mit der Klassifizierung durch frühere Studien	68
4.1.4 Vergleich der <i>S. maltophilia</i> Klassifizierung mit der Klassifizierung durch frühere Studien.....	68
4.2 Physiologische Diversität von <i>S. maltophilia</i>	69
4.2.1 Wachstum von <i>S. maltophilia</i>	69

4.2.2 Biofilmbildungs-Potential von <i>S. maltophilia</i>	70
4.2.3 Beweglichkeit – <i>Twitching</i> und <i>Swimming</i> Motilität von <i>S. maltophilia</i>	72
4.2.4 Sekretion von Sekundärmetaboliten im Zusammenhang mit bakterieller Virulenz	73
Hämolytine	73
Proteasen	74
Siderophore	74
4.2.5 Antibiotikaresistenzen	76
Plattendiffusionstest	76
Mikrobouillon-Verdünnung	77
4.2.6 Phänotypische Klassifikation des Virulenzpotentials von <i>S. maltophilia</i>	79
Vergleich des <i>S. maltophilia</i> Virulenzpotentials mit dessen Genotypen	81
4.3 Genomsequenzierung der <i>S. maltophilia</i> Isolate SKK35 und RA8	82
4.3.1 Vergleich der Antibiotikaresistenz-Gene bei <i>S. maltophilia</i>	86
Multidrug Effluxpumpen	86
Makrolid-Resistenzgene	86
Aminoglycosid-Resistenzgene	88
4.3.2 Vergleich der potentiellen Virulenzgene bei <i>S. maltophilia</i>	88
Protein-Sekretionssysteme	88
Adhäsionsfaktoren	89
Extrazelluläre Sekundärmetabolite	91
4.3.3 Genomische Inseln bei <i>S. maltophilia</i>	93
GEI und Prophagen	93
GEI und Schwermetallresistenz	94
GEI und Antibiotikaresistenz	95
GEI und Virulenzfaktoren	95
RTX-Proteine bei <i>S. maltophilia</i> SKK35	96
4.4 Nähere Charakterisierung und Verbreitung der <i>S. maltophilia</i> RTX-Gene und des Typ-6-Sekretionssystems	97
4.4.1 PCR-Nachweis der Gene für die RTX-Proteine <i>frpA</i> und <i>frpC</i>	97
4.4.2 Medium abhängige Genexpression von <i>frpA</i> und <i>frpC</i> durch <i>S. maltophilia</i> SKK35.....	98
4.4.3 PCR-Nachweis des <i>hcp1</i> -Gens für die Bildung des Protein-Tubus des Typ-6-Sekretionssystems	100

4.4.4 Medium abhängige Genexpression von <i>hcp1</i> durch <i>S. maltophilia</i> SKK35	101
4.5 Fazit	102
5 Diskussion	104
5.1 Genetische Diversität	104
5.2 Physiologische Diversität – Virulenzfaktoren	106
5.3 Physiologische Diversität – Antibiotikaresistenz	108
5.4 Physiologische Diversität – Virulenz gegenüber Amöben	109
5.5 Vergleich der Genomsequenzen von <i>S. maltophilia</i>	112
5.5.1 Antibiotikaresistenz-Gene	112
5.5.2 Potentielle Virulenzgene	115
Adhäsion: Pili, Fimbrien und Flagellen	115
Sekretionssysteme	116
Proteine, Toxine und andere Sekundärmetabolite	120
5.5.3 Genomische Inseln von <i>S. maltophilia</i>	125
Problematik bei der Identifikation von genomischen Inseln bei <i>draft</i> -Genom- Sequenzen	125
Vergleich des akzessorischen Genoms von <i>S. maltophilia</i>	125
5.6 Nachweis und Expression der RTX-Gene	128
5.7 Nachweis und Expression des Typ-6-Sekretionssystems am Beispiel des <i>hcp</i> -Gens	130
5.8 Fazit	131
5.9 Ausblick	132
6 Literatur.....	133

Abkürzungsverzeichnis

AFLP	<i>Amplified fragment length polymorphism</i> (Amplifizierter-Fragmentlängen Polymorphismus)
AUM	<i>Artificial urine medium</i> (künstliches Urinmedium)
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
CAS	Chrom-Azurol-S
CDS	Codierende Sequenz
CF	Cystische Fibrose (Mukoviszidose)
COG	<i>Cluster of orthologous groups</i> (Cluster der orthologen Gruppen)
CVC	<i>central venous catheter</i> (zentraler Venenkatheter)
EPS	Exopolysaccharide
FKS	Fötale Kälberserum
GEI	Genomische Insel
GO	<i>Gene Ontology</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharide
MALDI-TOF	<i>Matrix associated laser desorption/ionization time of flight</i>
MATE	<i>multidrug and toxic compound extrusion</i>
MF	<i>major facilitator</i>
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i> (Multilocus Sequenz Typisierung)
ORF	<i>Open reading frame</i> – Offenes Leseraster
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PSI-BLAST	<i>Position specific iterated basic local alignment search tool</i>
rep-PCR	<i>repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction</i> (repetitive, extragen-palindrome PCR)
RFLP	Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus
RND	<i>Resistance nodulation division</i> (Resistenz-Nodulation-Zellteilung)
SXT	Trimethoprim/Sulfamethoxazol
T1SS	Typ-1-Sekretionssystem
T2SS	Typ-2-Sekretionssystem
T3SS	Typ-3-Sekretionssystem
T4SS	Typ-4-Sekretionssystem
T5SS	Typ-5-Sekretionssystem
T6SS	Typ-6-Sekretionssystem
VAP	<i>Ventilator associated pneumonia</i> (ventilations assoziierte Pneumonie)

1 Einleitung

Bakterien, die geographisch ubiquitär verbreitet sind und verschiedenste Habitate einnehmen, besitzen häufig eine hohe Diversität innerhalb der Spezies. Diese physiologische und genetische Diversität nahe verwandter Bakterienstämme wird unter dem Begriff Mikrodiversität zusammengefasst. Sie ist darauf zurückzuführen, dass sich Bakterien an verschiedenste ökologische (Mikro-)Nischen anpassen können. Es kann zur Akquise oder dem Verlust von Genen kommen, was letztendlich dazu führt, dass ehemals klonal identische Bakterien sich in ihren genetischen und physiologischen Ausprägungen unterscheiden (Jaspers & Overmann, 2004; Kassen & Rainey, 2004). Anpassungen an diverse ökologische Nischen können auch dazu führen, dass Bakterien Faktoren adaptieren, die für sie nicht nur einen Überlebensvorteil in der Umwelt bilden, sondern die auch eine Besiedlung und Manifestation im menschlichen Wirt ermöglichen und letzten Endes zu Infektionen führen können (Berg *et al.*, 2005).

Als Erreger von Infektionen sind Bakterien für zahlreiche verschiedene Krankheitsbilder verantwortlich. Es gibt Erreger, die bestimmte Faktoren wie Toxine und Kapseln produzieren, die sich direkt infektiös auf den Wirt auswirken. Bakterien, denen diese Faktoren fehlen, rufen entsprechend keine Infektionen hervor. Immer wieder kommt es allerdings zu Erkrankungen durch Bakterien, die überall in der Umwelt verbreitet sind, im Normalfall aber nicht zu Infektionen führen. Dies passiert meist, wenn der Wirt aufgrund von Vorerkrankungen ein geschwächtes Immunsystem hat. Um diese fakultativ pathogenen Erreger zu beschreiben, wurde der Begriff opportunistisches Pathogen geprägt, d.h. der Erreger ist in der Lage Substanzen zu produzieren die einem Wirtsorganismus Schaden zufügen können, löst aber nur eine Krankheit aus, wenn er die Gelegenheit dazu bekommt (Casadevall & Pirofski, 2007).

Faktoren, bzw. Gene, die die Virulenz von Bakterien bewirken, lassen sich hinsichtlich ihrer Funktion unterscheiden. Als „wahre“ Virulenzgene gelten Toxine und andere Produkte, die den Wirt unmittelbar schädigen. Entscheidend für die Kolonisierung sind Adhäsine, Fimbrien und Invasine, die mit Faktoren zusammenspielen können, die das Immunsystem des Wirts negativ beeinflussen, wie beispielsweise Proteasen und Cytotoxine, die auf Immunzellen wirken. Hinsichtlich der Virulenz opportunistischer Pathogene sind häufig auch weitere Gene von Bedeutung, die zur Virulenz beitragen. Darunter fallen Genprodukte, die Effektorproteine aktivieren können, Mechanismen, die die Sekretion von Effektorproteinen bewirken, Produkte, die einen Kolonisationsvorteil oder Konkurrenzvorteil gegenüber anderen

Mikroorganismen vermitteln und regulatorische Gene, die die Expression dieser Gene vermitteln (Wassenaar & Gaastra, 2001).

Verschiedene Gegebenheiten können dazu führen, dass Menschen eine Immunschwäche entwickeln. Mukoviszidose (Cystische Fibrose = CF) ist eine angeborene Stoffwechselerkrankung, die auf eine Mutation des CFTR-Gens, das die Bildung von Chloridkanälen in der Zellmembran ermöglicht, zurückzuführen ist. Defekte im CFTR-Gen führen zu einer unzureichenden Bronchienklärung. Der Mucus (= Schleim) wird weitestgehend einbehalten und bietet einen geeigneten Nährboden für Bakterien (George *et al.*, 2009). Immunsuppressive Therapien werden zum Beispiel angewandt, damit Patienten nach Organtransplantationen das neue Gewebe nicht abstoßen. Die Chemotherapie von Krebsleiden stört das Immunsystem, ebenso wie eine Erkrankung mit dem humanen Immundefizienz Virus (HIV), welches mit fortlaufender Erkrankung zu einer Schädigung des Immunsystems führt (Corti *et al.*, 2009). Häufig sind es opportunistisch pathogene Bakterien, die überall in der Umgebung vorkommen, die den Patienten besiedeln und eine Infektion hervorrufen können. Daher werden CF-Patienten meist lebenslänglich mit Antibiotika behandelt, was im späteren Verlauf der Krankheit häufig zur Besiedlung der Lungen von CF-Patienten mit antibiotikaresistenten Bakterienspezies führt.

Von zunehmender Bedeutung als opportunistisch pathogene Erreger sind nicht-fermentative, gram-negative Bakterien. Diese besitzen neben ihrem pathogenen Potential häufig multiple Antibiotikaresistenzen, was sie widerstandsfähiger gegenüber Desinfektions- und Hygienemaßnahmen macht und dadurch die Behandlung des Patienten erschwert. Zu den in den letzten Jahren am häufigsten nachgewiesenen opportunistisch pathogenen Bakterienspezies zählen, neben *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* und Spezies des *Burkholderia cepacia* Komplexes, *Stenotrophomonas maltophilia* (Enoch *et al.*, 2007).

1.1 *Stenotrophomonas* – eine Übersicht

Das heute als *Stenotrophomonas maltophilia* bekannte γ -Proteobakterium wurde 1961 zum ersten Mal von Hugh und Ryschenkow (1961) entdeckt und als *Pseudomonas maltophilia* beschrieben. In dieser Studie wurden Bakterien aus Wasser, Milch, tierischem und menschlichem Faeces sowie einigen klinischen Proben aus verschiedenen Geweben und Körperflüssigkeiten isoliert. Alle Isolate wiesen die Besonderheit auf, Maltose statt Glukose

zu oxidieren, daher wurde der Speziesname *maltophilia* (= *malt*, alt-engl.: Malz, *philos*, griech.: Freund) gewählt. 22 Jahre später, basierend auf DNA-rRNA und DNA-DNA Hybridisierungen sowie physiologischen Charakterisierungsmethoden, wurde *Pseudomonas maltophilia* durch Swings *et al.* (1983) zum Genus *Xanthomonas maltophilia* transferiert. Endgültig wurde dann von Palleroni und Bradbury (1993) der separate Genus *Stenotrophomonas* (*Stenos*, griech.: schmal, eng; *trophos*, griech.: der Nährende; *monas*, griech.: eine Einheit) für *Xanthomonas maltophilia* vorgeschlagen. Mit dem Typstamm ATCC 13637 wurde *Stenotrophomonas maltophilia* als erste Spezies des Genus festgelegt. Seitdem wurden beständig neue Spezies der Gattung *Stenotrophomonas* zugeordnet. Aktuell sind *S. nitritireducens* (Finkman *et al.* 2000), *S. rhizophila* (Wolf *et al.*, 2002), *S. acidaminiphila* (Assih *et al.*, 2002), *S. koreensis* (Yang *et al.*, 2006), *S. terrae* und *S. humi* (Heylen, *et al.*, 2007), *S. chelatiphaga* (Kaparullina *et al.*, 2009), *S. daejonensis* (Lee *et al.*, 2010), *S. ginsengisoli* (Kim *et al.*, 2010), *S. panachihumi* (Yi *et al.*, 2010) und *S. pavanii* (Ramos *et al.*, 2011) bekannt. Die von Drancourt *et al.* (1997) beschriebene Spezies *Stenotrophomonas africana* wurde von Coenye *et al.* (2004^b) als Synonym für *S. maltophilia* zurückgestuft. Die als *S. dokdonensis* beschriebene Spezies (Yoon *et al.*, 2006) wurde von Lee *et al.* (2008) als *Pseudoxanthomonas dokdonensis* reklassifiziert. In einem phylogenetischen Baum (Abbildung 1), basierend auf 16S rRNA Gen Sequenzen der *Stenotrophomonas* spp. sind die Sequenz-Distanzen der Spezies zueinander zu sehen.

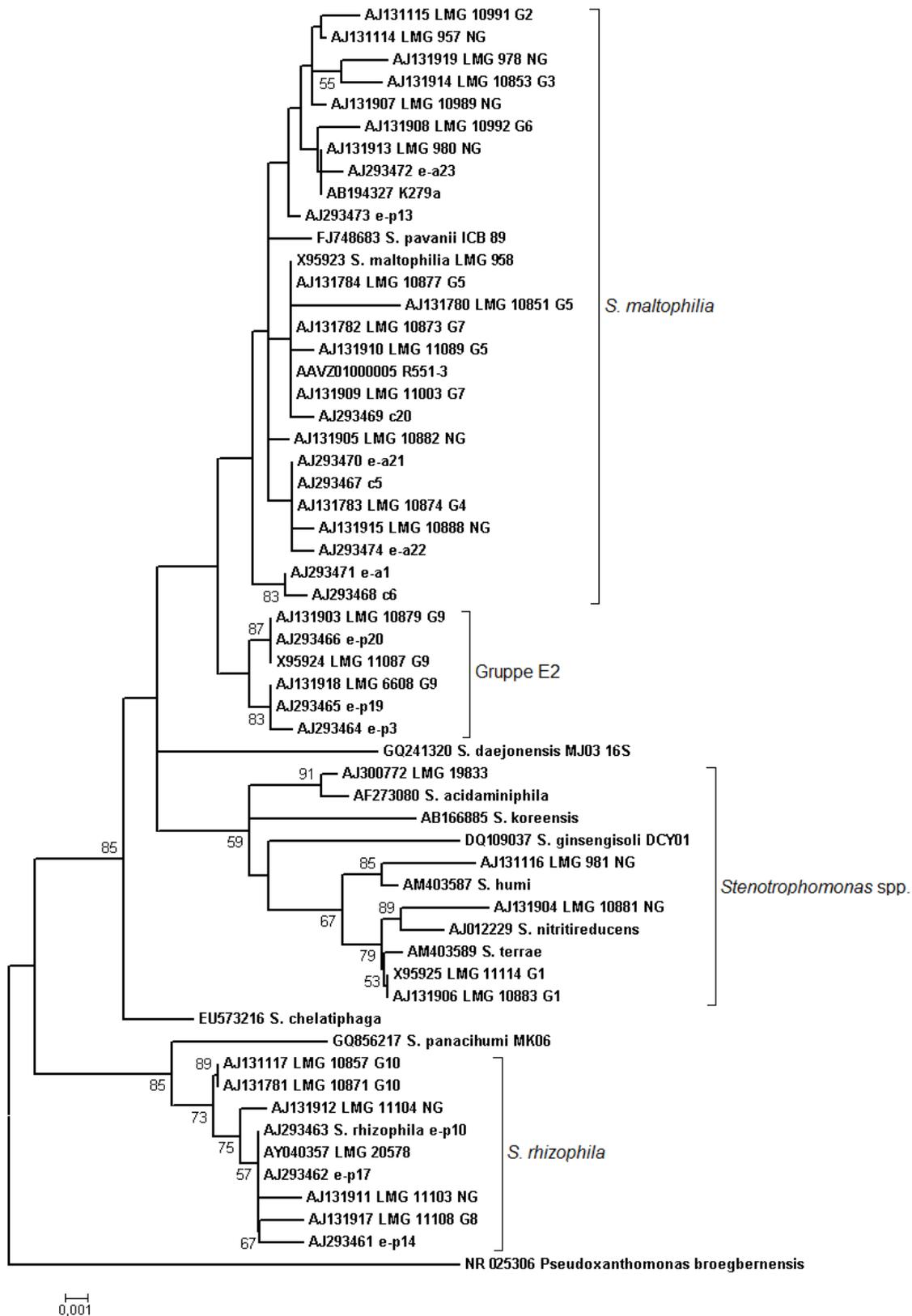


Abb. 1: Phylogenetischer Baum basierend auf den 16S rRNA Sequenzen der *Stenotrophomonas* Typstämme (p-Distanz). *Pseudoxanthomonas broegbernensis* wurde genutzt, um den Baum zu wurzeln. Der Baum wurde konstruiert unter Benutzung des Neighbour Joining Algorithmus. Bootstrap-Werte über 50 %, ausgehend von 1000 Wiederholungen, sind an den Ästen angegeben.

1.2 Morphologische und physiologische Charakteristika von *S. maltophilia*

S. maltophilia ist ein nicht-fermentierendes gram-negatives Stäbchenbakterium. Es lebt fakultativ anaerob und ist in der Lage Kohlenhydrate unter anoxischen Bedingungen über den Pentosephosphatweg und den Entner-Doudroff Weg abzubauen. Es bildet keine Sporen aus. Die Zellen sind meist 0,5 bis 1,5 μm lang und gerade bis leicht gekrümmt. Sie sind beweglich aufgrund von mehreren polaren Flagellen. Die Bakterien wachsen bei Temperaturen von 5 °C bis 37 °C, wobei die optimale Wachstumstemperatur bei 30 °C liegt. Sie wachsen auf einem breiten Spektrum an Medien (u.a. MacConkey, Müller-Hinton, Blut Agar) und bilden meist gelbliche, zum Teil bräunliche bis graue Kolonien (Abb. 2). Für einige Stämme ist bekannt, dass sie Methionin und/oder Cystein auxotroph sind (Denton & Kerr, 1998; Nyč & Matějková, 2010).



Abb. 2: *S. maltophilia* Stamm 4.1; β -hämolytische Kultur auf Blutagar.

1.3 Vorkommen und Eigenschaften von *S. maltophilia* in der Umwelt

S. maltophilia ist ubiquitär in der Umwelt verbreitet. Häufig findet man sie im Boden, wo sie insbesondere die Rhizosphäre verschiedener Pflanzenarten kolonisieren (Berg *et al.*, 2005). Ebenso finden die Bakterien weite Verbreitung in Gewässern wie Flüssen und Seen, in Brunnen sowie im Abwasser, aber auch in marinen Gewässern (Denton & Kerr, 1998; Hagström *et al.* 2000). Insbesondere durch die Möglichkeit der Übertragung aus der Umwelt in ein klinisches Milieu wurde *S. maltophilia* als Trinkwasserkeim beobachtet (Squier *et al.* 2000). Auch aus zahlreichen Nahrungsmitteln wie tiefgekühltem Fisch, Milch, Hühnereiern und Lammfleisch konnte *S. maltophilia* isoliert werden (Denton & Kerr, 1998).

Einige *S. maltophilia* Stämme weisen ein hohes Potential zur biotechnologischen Nutzbarmachung auf. Sie sind in der Lage, Xenobiotika wie PAHs (polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe), BTEX (Benzol, Toluol, Ethylbenzol, Xylol), p-Nitrophenol und 4-Chlorphenol abzubauen (Ryan *et al.*, 2009). Darüber hinaus produziert *S. maltophilia* Chitinasen, wodurch sie zum Chitin-Abbau in kontaminierten Böden eingesetzt werden kann (Krsek & Wellington, 2001). Auf die Produktion von Chitinase ist auch die fungizide Wirkung von *S. maltophilia* zurückzuführen, was in der industriellen Produktion von Chitinase oder zum direkten Einsatz von *Stenotrophomonas* als Biokontrollorganismus genutzt werden kann (Kobayashi *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2010).

1.4 *S. maltophilia* als nosokomiales Pathogen

Als opportunistischer Krankheitserreger gewann *S. maltophilia* in den letzten 15 Jahren zunehmend an Bedeutung. Insbesondere im Zusammenhang mit im Krankenhaus erworbenen Infektionen ist *S. maltophilia* zu einem immer größeren Problem geworden. Bei Patienten mit längeren Krankenhausaufenthalten auf Intensivstationen besteht erhöhte Gefahr, nicht zuletzt, da Antibiotika-Multiresistenzen eine Behandlung erschweren. Betroffen sind in erster Linie schwer immungeschädigte Patienten, CF-Patienten oder HIV-Infizierte. Außerhalb des Krankenhausmilieus erworbene *S. maltophilia* Infektionen sind selten, treten aber gelegentlich auf (Falagas *et al.*, 2009).

Im Rahmen des SENTRY *Antimicrobial Surveillance* Programms wurden über einen Zeitraum von fünf Jahren (1997-2001) etwa 18.500 nicht-fermentierende gram-negative

Bakterien aus Krankenhäusern weltweit isoliert und charakterisiert. Dabei wurde *S. maltophilia* als dritthäufigster Erreger mit 8 % aller Isolate, nach *Pseudomonas aeruginosa* mit 64,5 % und *Acinetobacter* spp. mit 18,7 %, identifiziert (Jones *et al.*, 2003). In einer aktuellen Studie von 2010, die das Vorkommen von nicht-fermentierenden, gram-negativen Bakterien in Krankenhäusern in Frankreich über einen Zeitraum von 6 Monaten untersuchte, gehörte *S. maltophilia* mit 38 % zu den am häufigsten vorkommenden Arten (Jacquier *et al.*, 2011).

Als Kontamination wurde *S. maltophilia* häufig aus Infusionslösungen, sterilisiertem Wasser, Desinfektionslösungen und Trinkwasser in Kunststoffflaschen isoliert (Spencer, 1995; Wilkinson & Kerr, 1998). Infektionswege über Katheter, Geräte zur künstlichen Beatmung oder andere invasive Apparaturen werden vermutet. Dabei spielt die Möglichkeit zur Biofilmbildung auf der Oberfläche dieser Apparaturen eine große Rolle (Passerini de Rossi *et al.*, 2007). Ein höheres Risiko für Infektionen wurde nach Langzeittherapie mit Breitbandantibiotika beobachtet (Paez & Costa, 2008). *S. maltophilia* besitzt durch seine intrinsische Antibiotika-Multiresistenz anderen Bakterienarten gegenüber einen Kolonisationsvorteil (Graff & Burns, 2002; Apisarnthranarak *et al.*, 2003; Meyer *et al.*, 2006). Die Dauer der Antibiotikatherapie hat maßgeblich Einfluss auf den Ausgang der Krankheit (Nseir *et al.*, 2006). Mukoviszidose-Patienten, die aufgrund ihrer Anfälligkeit für bakterielle Infektionen häufig über lange Zeiträume hinweg mit Antibiotika behandelt werden, sind daher eine besonders gefährdete Gruppe (Talmaciu *et al.*, 2000).

Zahlreiche Arten von Infektionen wurden für *S. maltophilia* beschrieben. Dabei treten am häufigsten Pneumonien, Infektionen des Blutkreislaufs, Harnwegsinfekte und entzündete Wunden auf. Seltener kommen Infektionen von Haut, Knochen und Gelenken sowie Entzündungen der Augen, des Gastrointestinaltraktes und des Nervensystems vor (Looney *et al.* 2009). Der Zustand des Patienten vor der Infektion ist meist maßgeblich für den Ausgang bzw. die Schwere der Krankheit (Paez & Costa, 2008).

1.5 Diversität von *S. maltophilia*

S. maltophilia zeichnet sich durch eine hohe Diversität innerhalb der Spezies aus. Bereits ein Vergleich der 16S rRNA Gensequenz, welche in der Regel für eine Spezieszuordnung herangezogen wird, zeigt eine Untergliederung in zwei Gruppen. Eine große Gruppe, erfasst den Hauptanteil der *S. maltophilia* Isolate. Eine davon abgegrenzte Gruppe E2, die von Minkwitz & Berg (2001) beschrieben wurde, beinhaltet nur Umweltisolate (Vgl. Abb. 1 16S rRNA phylogenetischer Baum). In einer groß angelegten Studie charakterisierten Hauben *et al.* (1999) über 100 *Stenotrophomonas* Isolate mittels AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)-Fingerprinting. Daraus resultierte eine Einteilung in 10 verschiedene genetische Subgruppen. Eine Zuordnung von *Stenotrophomonas* Isolaten zu vergleichbaren Gruppen konnte durch Coenye *et al.* (2004^a) gezeigt werden. Mittels einer RFLP (Restriktions Fragment Längen Polymorphismus) Analyse des *gyrB* Gens von 191 *S. maltophilia* Isolaten überwiegend klinischen Ursprungs wurde eine Unterteilung in 9 genetische Gruppen unternommen. Das *gyrB*-Gen codiert für die ATP-Domäne des Enzyms DNA-Gyrase, welches essentiell für die DNA-Replikation ist. Insbesondere lag in dieser Studie das Augenmerk auf Isolaten von Mukoviszidose-Patienten. Diese waren vorwiegend zwei Gruppen zuzuordnen. Zwei jüngste Studien am Freiburger Universitätsklinikum unternahmen eine genetische Charakterisierung basierend auf MLST (Multilocus Sequencing Typing). Sie konnten die von Hauben *et al.* (1999) charakterisierten Gruppen bestätigen und beschrieben selber fünf weitere Gruppen. Diese Zuordnung wurde durch MALDI-TOF (Matrix Associated Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight) Analysen an einer Auswahl an Isolaten bestätigt (Kaiser *et al.*, 2009; Vasileuskaya-Schulz *et al.*, 2011).

Trotz verschiedener Ansätze zur genetischen Differenzierung von *S. maltophilia* gibt es weiterhin Bedarf an Methoden zur schnellen und kostengünstigen Identifikation, Klassifizierung von Subtypen innerhalb der Spezies und Einschätzung ihres Gefahrenpotentials. Ein Ökotyp, der scheinbar kein Potential zur Kolonisation von menschlichen Wirten aufweist, ließ sich nur im Fall der von Minkwitz & Berg (2001) charakterisierten Gruppe E2 zuordnen. Tendenzen, dass einige Stämme ein verstärktes Potential besitzen, die Atemwege von Mukoviszidose-Patienten zu kolonisieren und auch bestimmten genetischen Subgruppen zuzuordnen sind, müssen bestätigt werden.

1.6 Das Genom von *S. maltophilia*

Das erste vollständig sequenzierte Genom von *S. maltophilia* wurde von Crossman *et al.* (2008) publiziert. Stamm K279a wurde aus einer Blutkultur eines älteren männlichen Patienten, der aufgrund einer Krebserkrankung einer Chemotherapie unterzogen wurde, isoliert. Das Genom besteht aus einem einzelnen zirkulären Chromosom mit einer Größe von 4.851.126 bp und einem mol % GC-Gehalt von 66,7%. Es zeigte sich, dass K279a eine hohe Kapazität für Resistenzen gegenüber Antibiotika und Schwermetallen besitzt, was u.a. auf das Vorkommen von neun verschiedenen RND (*resistance nodulation division*) Effluxpumpen zurückzuführen ist (vgl. 1.7 Antibiotikaresistenzen). Eine Reihe von Genen für Pili, Fimbrien und Flagellen wurde beschrieben, ebenso wie Sekretionssysteme und extrazelluläre Proteine, die potentiell zur Virulenz des Organismus beitragen (vgl. 1.8 Virulenzfaktoren).

Das zweite vollständig sequenzierte Genom von *S. maltophilia*, R551-3, wurde im Rahmen einer Charakterisierung endophytischer Bakterien bei Pappeln von Taghavi *et al.* (2008) publiziert. R551-3 wurde aus der Wurzel der Pappel *Populus trichocarpa* isoliert. Das Genom ist mit 4.573.969 bp etwas kleiner als das von K279a, der mol % GC Gehalt von 67% ist etwa gleich. Ein Vergleich der beiden Genome durch Rocco *et al.* (2009) zeigte eine hohe Übereinstimmung. Bei beiden wurden allerdings auch ca. 40 genomische Inseln identifiziert, die für Proteine, welche eine Interaktion mit der Umgebung vermitteln, codieren. Als Beispiele wären Transmembranproteine, Hämagglutinine, Komponenten von Sekretionssystemen sowie Effluxpumpen zu nennen.

Im Weiteren steht noch die Genomsequenz von *Stenotrophomonas* sp. SKA14 als „draft“- (engl.: Entwurf, Gerüst) Genom zur Verfügung. Dabei handelt es sich um ein marines Bakterium, das im Rahmen einer Diversitätsbestimmung von marinem Bakterioplankton isoliert wurde (Hagström *et al.*, 2000). Gemäß der 16S rRNA Gensequenz ist die Spezies mit 98,8 % Übereinstimmung *S. maltophilia* zuzuordnen. In einer Studie, welche die Häufigkeit von Virulenzgen-Homologen in marinen Bakterien zeigt, wurden bei SKA14 ein Typ5- und ein Typ6-Sekretions-System beschrieben (Persson *et al.*, 2009).

1.7 Antibiotikaresistenzen von *S. maltophilia*

Ein großes Problem für die Therapie von *S. maltophilia* ist, dass viele Stämme gegen eine Reihe verschiedener Antibiotika resistent sind. Dazu gehören Breitband β -Lactam Antibiotika wie Carbapeneme und Aminoglycoside, Macrolide, Tetracycline, Chloramphenicol und z.T. Chinolone. Verschiedene Faktoren und Mechanismen, wie eine geringe Permeabilität der Zellmembran, das Vorhandensein von aktiven Effluxpumpen und die Expression von Enzymen, die Antibiotika inaktivieren können, sind verantwortlich für diese Vielzahl an Resistenzen.

Einen großen Anteil haben dabei die sog. Multidrug Effluxpumpen. Dabei handelt es sich um aktive Membrantransportsysteme, die über einen Kationengradienten oder die Hydrolyse von ATP ein breites Spektrum an antimikrobiellen Substraten und Schwermetallen aus der Zelle exportieren können (Poole, 2004). Zwei Multidrug Effluxpumpen SmeDEF und SmrA wurden bereits charakterisiert (Alonso & Martínez, 2000 und 2001; Al-Hamad *et al.*, 2009). Darüber hinaus wurden im Genom von *S. maltophilia* K279a sechs weitere potentielle Effluxtransporter des RND (*resistance nodulation division*) Typs anhand der Sequenz-Homologie zu SmeDEF beschrieben, wobei deren tatsächliche Expression und Zusammenhang mit Resistenzen gegen Antibiotika noch nachzuweisen ist.

Resistenz gegen β -Lactame wird auf die induzierte Expression der β -Lactamasen L1 und L2 zurückgeführt, die β -Lactame durch Hydrolyse inaktiviert. Bei *S. maltophilia* liegen diese sowohl chromosomal als auch plasmidgebunden vor (Avison *et al.*, 2000, 2001 & 2002). Ferner wurden auch die Aminoglycosidresistenzgene *aac(6')-Iz* und *aph(3')-IIc* identifiziert. Dabei codiert das *aac(6')-Iz* Gen eine 6'-N-Acetyltransferase, die in der Lage ist, viele klinisch relevante Antibiotika außer Gentamicin zu modifizieren (Lambert *et al.*, 1999). *Aph(3')-IIc*, welches bei *S. maltophilia* K279a nachgewiesen wurde, codiert für eine Aminoglycosid Phosphotransferase, welche Auswirkungen auf die Resistenzen gegen Neomycin, Butirosin, Paromomycin und Kanamycin zeigt (Okazaki & Avison, 2007). Das *spgM* Gen codiert eine Phosphoglucomutase. *S. maltophilia* Mutanten ohne das *spgM* Gen zeigten eine moderate Reduktion der Resistenz gegenüber Nalidixinsäure, Gentamicin, Vancomycin und Polymixin B und E (McKay *et al.*, 2003).

Das bei *S. maltophilia* D457R identifizierte Resistenzgen *mphBM* codiert für eine Makrolid Phosphotransferase, die in Zusammenhang mit der Resistenz gegen Erythromycin steht (Alonso *et al.*, 2000). Das Chinolon-Resistenzgen *Smqnr* liegt bei verschiedenen

S. maltophilia Isolaten in verschiedenen Variationen vor. Diese codieren Pentapeptid Repeat Proteine, die eine Chinolonresistenz auf geringem Level vermitteln, indem sie DNA-Gyrase und Topoisomerasen vor Inhibition schützen (Shimizu *et al.*, 2008; Gordon *et al.*, 2010).

Eines der am häufigsten angewandten Antibiotika bei diagnostizierter *S. maltophilia* Infektion ist ein Trimethoprim/Sulfamethoxazol-Kombipräparat (Co-Trimoxazol oder SXT). In jüngster Zeit wurden zunehmend SXT-resistente *S. maltophilia* Stämme dokumentiert. Der Anteil an resistenten Isolaten wird auf ca. 5 % geschätzt. Resistenzen werden auf ein Zusammenspiel der Gene *sul1*, *sul2* und *drfA* zurückgeführt. Eine Gefahr ist, dass die Resistenzen weitergegeben werden können, da diese Resistenzgene z.T. auf Plasmiden zu finden sind und häufig mit Klasse-1-Integrans ins Chromosom eingebaut werden (Barbolla *et al.*, 2004; Toleman *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2011).

Die meisten Studien zu Antibiotikaresistenzen von *S. maltophilia* sind auf klinische Stämme fokussiert, nur wenige haben bisher klinische und Umweltisolate vergleichend betrachtet (Berg *et al.*, 1999). Mögliche Zusammenhänge von Antibiotikaresistenzen, dem jeweiligen Habitat und der Klassifizierung der Bakterien wurden noch nicht weitergehend analysiert.

1.8 Virulenz von *S. maltophilia* und diese beeinflussende Faktoren

Faktoren, die zur Virulenz von *S. maltophilia* beitragen, sind noch wenig untersucht. Eine Reihe mutmaßlicher Virulenzfaktoren sind zwar bekannt, noch ist aber unklar, wie und in welchem Ausmaß sie tatsächlich für eine Infektion bei immunschwachen Personen verantwortlich sind. Ferner ist nur wenig darüber bekannt, ob sich *S. maltophilia* Isolate aus verschiedenen Habitaten in ihren Virulenzeigenschaften unterscheiden, d.h. ob es möglich ist, Isolate von Mukoviszidose-Patienten und andere Patientenisolate oder Umweltisolate auf physiologischer Ebene zu differenzieren.

1.8.1 Primäre Adhäsion und Biofilmbildung

Als ein möglicher Ausgangspunkt für die Kolonisation von Patienten mit *S. maltophilia* wird eine vorhergehende Kolonisation/Biofilmbildung auf invasiven medizinischen Vorrichtungen, wie z.B. Kathetern oder Beatmungsgeräten, angenommen. Oft wird in diesem Zusammenhang

auch von VAP (*ventillator associated pneumonia* = mit Beatmungsgeräten verbundene Pneumonie) und CVC (*central venous catheter* = zentraler Venen Katheter)-Pneumonie gesprochen (Weber *et al.*, 2007; Boktour *et al.*, 2006). Ein verstärktes Potential zur Adhäsion von *S. maltophilia* an Glas und Teflon wurde von Jucker *et al.* (1996) beschrieben. Sie stellten fest, dass *S. maltophilia* im Gegensatz zu den meisten anderen Bakterien bei physiologischem pH eine leicht positiv geladene Oberfläche haben, was ihnen eine Adhäsion an negativ geladene Oberflächen erleichtert. Wichtig für die Adhäsion an Oberflächen sind Flagellen und Pili. De Oliveira-Garcia *et al.* (2002) charakterisierten die Expression von einer bis mehreren polaren Flagellen und Flagellen ähnlichen Strukturen und vermuteten deren Anteil an der Adhäsion an Plastikoberflächen. In einer späteren Studie untersuchten de Oliveria-Garcia *et al.* (2003) die Bildung von Fimbrien bei *S. maltophilia* und zeigten die Beteiligung des SMF-1 Fimbrins an der Adhäsion an abiotischen Oberflächen sowie an Epithelzellen.

In verschiedenen Studien wurde das Biofilmbildungspotential von meist klinischen Isolaten untersucht. Deutliche Unterschiede bei der Biofilmbildung auf verschiedenen abiotischen Materialien wurden beobachtet, wobei eine positive Korrelation mit der durch Pili vermittelten Bewegungsrate „*Twitching*“ und der Biofilmbildung auf Polypropylen bestand (Passerini de Rossi *et al.*, 2007; Pompilio *et al.*, 2008). Bei der Untersuchung von Adhäsion und Biofilmbildung an bronchialen Zellkulturen zeigte sich, dass *S. maltophilia* in verschiedenem Maß an IB3-1 Bronchialzellen adhären kann. Ebenso ist eine Invasion der Zellen zu einem geringen Anteil (1-5 % der Zellen) möglich. Flagellen sind an der Zelladhäsion beteiligt (Pompilio *et al.*, 2008).

1.8.2 Potentielle Virulenzfaktoren

Einige *S. maltophilia* Stämme sind generell in der Lage, Enzyme und andere extrazelluläre Komponenten zu produzieren, die Anteil an Virulenzreaktionen hätten. Welche Stoffe allerdings unter welchen Bedingungen produziert werden, unterscheidet sich bei verschiedenen Vertretern der Spezies. Nachgewiesen wurde für einige *S. maltophilia* Isolate eine Produktion von Hämolytinen, Proteasen, Lipasen und Lecithinasen. Diese Isolate hatten auch einen cytotoxischen Effekt auf verschiedene Zellkulturen (Figueirêdo *et al.*, 2006). Weitere extrazelluläre Substanzen, bei denen vermutet wird, dass sie einen Anteil an der Virulenz haben, da sie bei anderen bakteriellen Spezies als Virulenzfaktoren gelten, sind EPS (Exopolysaccharide) und LPS (Lipopolysaccharide) sowie Siderophore (Chibber *et al.*, 2008).

Ein System zum Signalaustausch zwischen den Zellen hat signifikanten Einfluss auf die Expression dieser extrazellulären Substanzen. Bei *S. maltophilia* liegt ein DSF (*diffusible signal factor*)-abhängiges Signalsystem vor, ähnlich wie es für das Pflanzenpathogen *Xanthomonas campestris* bekannt ist (Fouhy *et al.*, 2007).

S. maltophilia produziert eine alkaline Serinprotease (StmPr1), bei der bekannt ist, dass sie beim Menschen Proteine aus Serum und Bindegewebe abbauen kann (Windorst *et al.*, 2002). Sowohl das StmPr1, als auch die später beschriebenen StmPr2, StmPr3 und StmPr4 Gene, liegen in verschiedenen Variationen bei *Stenotrophomonas* vor (Nicoletti *et al.*, 2011; Ribitsch *et al.*, 2011). Ferner ist das Fimbrin (SMF-1) nicht nur für Biofilmbildung und Zelladhäsion, sondern auch für Agglutination von Erythrozyten verantwortlich (de Oliveria-Garcia *et al.*, 2003). Als erstes potentiell Toxin von *S. maltophilia* wurde ein dem *zonula occludens* Toxin von *Vibrio cholerae* ähnliches Gen (*zot*) auf einem Phagengenom bei einigen Isolaten klinischer Herkunft entdeckt (Hagemann *et al.*, 2006).

Die vollständige Sequenzierung des *S. maltophilia* K279a Genoms bestätigte die vorausgehenden Beobachtungen. Das Gen für die extrazelluläre Protease StmPr1 ist vorhanden. Pili und Fimbrien, u.a. das Smf-1 fimbriale Operon, wurden nachgewiesen. Ferner codiert K279a eine nicht-hämolytische Phospholipase C (PlcN1) ebenso wie Enzyme der Phospholipase D Familie. Ein *tadE* ähnlicher Gen-Cluster sowie Typ-IV-Pili, welche hohe Ähnlichkeiten mit dem „Giant Cable Pilus“ aufweisen, der als wichtiger Virulenzfaktor von *Burkholderia cepacia* gilt, wurden gefunden. Es wurden Hämagglutinine der YadA Protein Familie, wie sie bei *Yersinia* vorkommen, und filamentöse Hämagglutinine, die bei *Bordetella pertussis* für Adhäsion und Verbreitung in den Atemwegen wichtig sind, beschrieben (Chrossman *et al.*, 2008).

1.8.3 Sekretionssysteme

Einen weiteren wichtigen Anteil an der Virulenz von gram-negativen Bakterien haben die Sekretionssysteme. Diese können neben der generellen Sekretion von Exoproteinen auch virulente Effektormoleküle wie Proteine, Enzyme oder Toxine aus der Zelle heraus, oder direkt in das Cytosol einer Wirtszelle hinein transportieren. Ein genereller Sekretionsweg (Sec) besteht aus einem Membranprotein-Komplex (SecEYGDF) und einer Cytosol-Komponente (SecA), wobei das Protein als Vorstufe sekretiert wird und erst nach Abspaltung eines Signalpeptids seine räumliche Konformation einnimmt. Daneben gibt es die Twin-

Arginin Translokation (Tat), bei der vollständig gefaltete Proteine aus der Zelle exportiert werden. Diese generellen Sekretionssysteme kommen bei vielen Bakterienspezies vor und sind nicht nur auf die Sekretion von virulenzrelevanten Proteinen beschränkt. Die Haupttypen der Sekretionssysteme bei gram-negativen Bakterien werden in die Typen 1 (T1SS) bis 6 (T6SS) unterteilt. *S. maltophilia* K279a besitzt Gene, die für Typ-I, Typ-II, Typ-IV und Typ-V Sekretionssysteme sowie ein Twin-Arginin Sekretionssystem codieren (Chrossman *et al.*, 2008). Die Sequenzierung von *Stenotrophomonas* sp. SKA14 zeigte das Vorhandensein von Genen für ein Typ-V und ein Typ-VI Sekretionssystem (Persson *et al.*, 2009). Die Sekretionssysteme unterscheiden sich in der Größe und Funktionsweise. Das T1SS besteht nur aus drei Proteinen, einem äußeren Membranprotein, einem Membranfusionsprotein und einem ATP-Transporter. Das T2SS und das T5SS funktionieren in einem zweistufigen System, das vom Sec oder Tat System abhängig sind. Das T3SS und das T6SS können mit Hilfe von nadelähnlichen Proteinstrukturen Effektorproteine in andere Zellen injizieren. Das T4SS ist homolog zum bakteriellen Konjugationssystem und ist über Pilusähnliche Strukturen in der Lage DNA und Proteine in andere Zellen zu transportieren (Schlegel, 2007; Backert & Meyer, 2006, Bleves *et al.*, 2010).

1.9 Virulenzuntersuchungen mit Amöben als Modellorganismen

Zur Untersuchung von bakteriellen Virulenzmechanismen werden in zunehmendem Maße Modellorganismen attraktiv, die keine Säugetiere sind. Dabei spielen zum einen ethische Bedenken eine Rolle, zum anderen haben nicht-Säuger Modellsysteme auch einen erheblichen Kostenvorteil (Kurz & Ewbank, 2007).

Einer der Organismen, die wegen der leichten Kultivierbarkeit häufig für Virulenzuntersuchungen herangezogen werden, sind Amöben. Freilebende Amöben kommen weltweit in vielen Habitaten wie Boden, Wasser und Luft vor, wurden aber z.B. auch aus der Nasenschleimhaut beim Menschen isoliert. Amöben ernähren sich hauptsächlich von Bakterien, Pilzen und Algen durch Phagozytose. Diese wiederum vollzogen ihrerseits evolutionäre Anpassungen, um sich vor ihren Fressfeinden schützen zu können. Bei Bakterien haben sich zwei Arten der Anpassung entwickelt. Einige Spezies sind in der Lage, Effektorproteine in die Umgebung oder die Amöbenzelle selbst abzugeben, die toxische oder inhibierende Wirkung auf die Amöben haben, um so nicht phagozytiert zu werden. Beispiele dafür sind *P. aeruginosa*, *Vibrio cholerae* oder *Burkholderia* spp. Andere Bakterien wiederum

sind fähig, im Inneren der Amöbenzelle zu überleben, zu wachsen und letztendlich die Zelle wieder zu verlassen, wie *Legionella* spp. und *Mycobacterium* spp. (Greub & Raoult, 2004; Steinert, 2011).

Wahrscheinlich ist, dass Mechanismen, die eigentlich zum Schutz und Überleben vor Amöben beitragen, auch bei Kontakt mit einem menschlichen Wirt eine Immunantwort auslösen und somit zur Virulenzdeterminante werden können. Nicht zuletzt haben sich z.B. die humanen Makrophagen aus Amöbenvorfahren entwickelt. Dies ist bei der Amöbe *Dictyostelium discoideum* nachzuverfolgen, deren vollständig vorliegende Genomsequenz in großen Teilen konservierte Regionen mit den humanen Makrophagen gemein hat, was auf einen gemeinsamen Vorfahren schließen lässt. Virulenzmechanismen, die auf Amöben wirken, verhelfen den Bakterien somit auch zum Schutz vor Phagozytose durch Makrophagen (Matz & Kjelleberg, 2005; Hilbi *et al.*, 2007; Cosson & Soldati, 2008).

1.9.1 Die Modellamöbe – *Dictyostelium discoideum*

Dictyostelium discoideum lebt vorwiegend im Boden und zählt zu den zellulären Schleimpilzen. Sein Lebenszyklus unterteilt sich in zwei Phasen: In der ersten Phase leben die Zellen in amöboider Form als Einzelzellen, die sich durch Zellteilung vermehren und Bodenbakterien als Nahrungsquelle nutzen. In der zweiten Phase, die durch Nährstoffmangel eingeleitet wird, sammeln sich die einzelnen Zellen auf ein chemotaxisches Signal hin (cAMP vermittelt), um einen multizellulären Körper auszubilden, an dessen Ende ein Fruchtkörper mit Sporen gebildet wird. Unter günstigeren Bedingungen keimen daraus wieder neue Amöben aus. Die Amöben haben außerdem eine sehr geringe Temperaturtoleranz. Das Wachstum in der freien Zellphase findet nur in einem Temperaturrahmen von 20 – 25 °C statt (Watts & Ashworth, 1970).

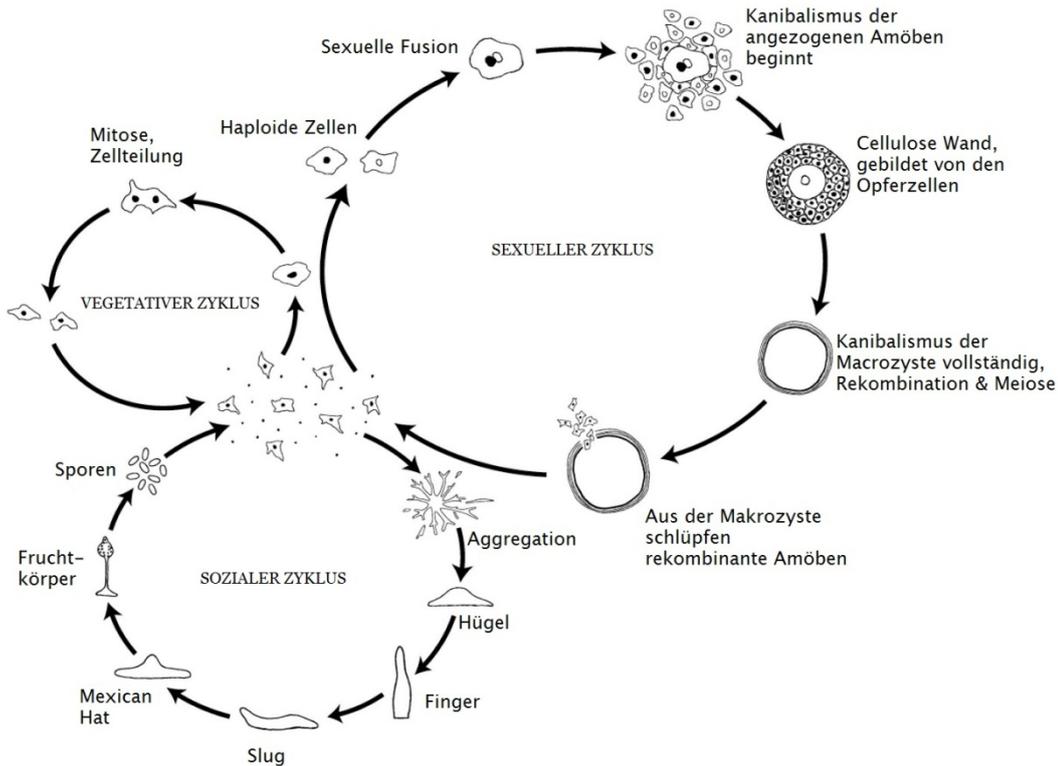


Abb. 3: Lebenszyklus von *Dictyostelium discoideum*. Im vegetativen Lebenszyklus, der den größten Teil des Lebens der Amöbe einnimmt, ernährt sich *D. discoideum* von Bodenbakterien und vermehrt sich durch Zellteilung. Unter Nahrungsmangel wird der sog. „soziale“ Zyklus eingeleitet. Im sozialen Zyklus aggregieren tausende Amöben zu einem multizellulären Körper, der sich in Richtung einer Lichtquelle bewegt. Die Zellen bilden einen Fruchtkörper aus, an dessen Kopfende sich ein Sporenkörper, der Sporen freisetzt, befindet. Im sexuellen Zyklus, der unter guten Nährstoffbedingungen im Dunkeln stattfindet, aggregieren cAMP und Pheromon-Signale bedingt zwei haploide Zellen zu einer Zygote. Andere Zellen, die durch diese Signale angezogen werden, formen eine Zellulosewand um die Zellen und dienen der Zygote anschließend als Nahrung (Quelle: David Brown & Joan E. Strassmann über DictyBase.org).

Zur Untersuchung von bakterieller Virulenz wird das freie, amöboide Zellstadium von *D. discoideum* genutzt. Mittels des sog. „Plate-killing“-Versuchs (Vgl. Kapitel 3.1.4) ist es möglich, das Virulenzpotential von Bakterien zu charakterisieren und zu quantifizieren. *D. discoideum* wird vorwiegend in Pathogenitätsuntersuchungen eingesetzt, da sie durch ihr verhältnismäßig kleines (34 kb), vollständig sequenziertes, haploides Genom für genetische Manipulationen zugänglich ist (Froquet *et al.* 2009). *D. discoideum* wurde bereits erfolgreich eingesetzt, um Infektionswege von *P. aeruginosa* (Pukatzki *et al.*, 2002; Cosson *et al.*, 2002), *Aeromonas* (Froquet *et al.*, 2007), *V. cholerae* (Pukatzki *et al.*, 2006) und anderen Bakterien (Greub & Raoult, 2004) aufzuschlüsseln.

Durch Virulenzuntersuchungen von *S. maltophilia* mit *D. discoideum* wurde nachgewiesen, dass eine Mutante des *S. maltophilia* Stamms D457R, welche eine Überexpression der

SmeDEF Effluxpumpe aufweist, geringere Virulenz im Amöbenmodell besitzt (Alonso *et al.*, 2004).

1.9.2 Die Modellamöbe – *Acanthamoeba castellanii*

Acanthamoeba castellanii ist eine freilebende Amöbe, die am häufigsten im Süßwasser und Boden vorkommt. Ebenso wurde sie aus dem menschlichen Nasen- und Rachenraum isoliert. *A. castellanii* ist der einzige, opportunistisch pathogene Vertreter seiner Gattung und kann Auslöser für Keratitis und in selteneren Fällen auch Meningitis sein. Der Lebenszyklus von *A. castellanii* besteht aus einer Wachstums- und Zellteilungsphase (Trophozoiten-Stadium) und einer darauffolgenden, oder bei Nährstoffmangel eingeleiteten Differenzierungsphase, der Encystierung (Weismann, 1976; Marciano-Cabral & Cabral, 2003).

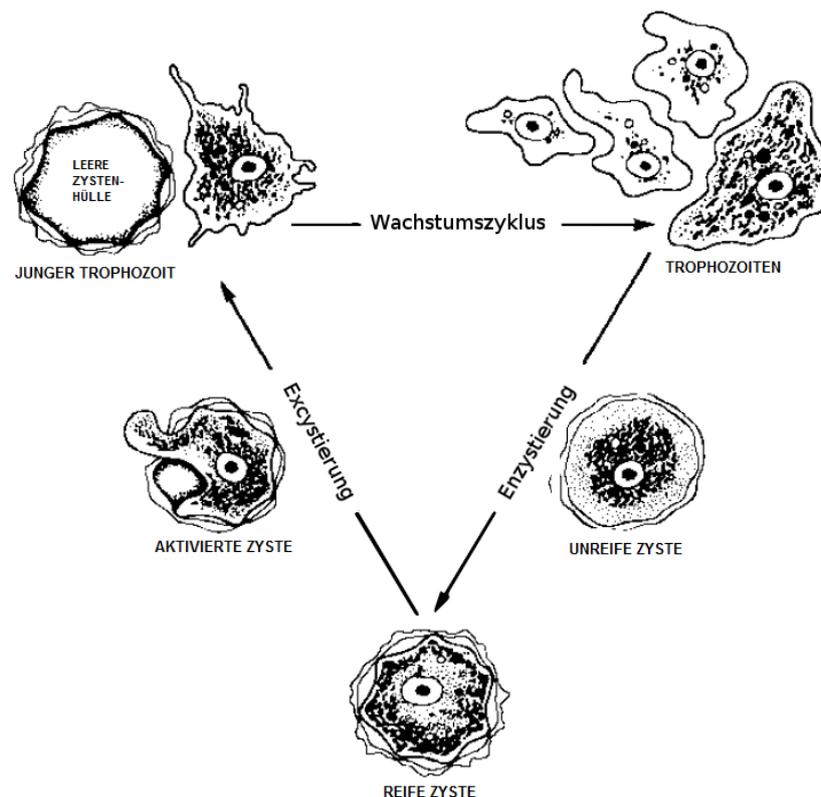


Abb. 4: Schematisches Diagramm des Wachstums und Differenzierungszyklus von *Acanthamoeba castellanii*. Der Lebenszyklus von *A. castellanii* besteht aus zwei Phasen. In der Trophozoiten Phase ernähren sich die Amöben von Bakterien, Algen und Hefe in ihrer Umgebung und vermehren sich durch Zellteilung. Unter Nahrungsmangel kann sich die Amöbe encystieren. Bei der Excystierung kann die Amöbe die durch kleine Öffnungen in der Zysten-Wand, sog. Ostiole, die Zyste verlassen und wieder das Trophozoiten Stadium beginnen (Quelle: Weismann, 1979; Nachdruck genehmigt).

Ähnlich wie bei *D. discoideum* kann das Trophozoiten-Stadium genutzt werden, um Virulenzmechanismen von Bakterien zu untersuchen. *A. castellanii* hat dabei den großen Vorteil, bei Temperaturen bis zu 37 °C wachsen zu können. Als Modellorganismus zur Untersuchung der Virulenz von *P. aeruginosa* (Fenner *et al.*, 2006) und *Mycobacterium kansasii* (Goy *et al.*, 2007) wurden *Acanthamoeba* spp. bereits erfolgreich eingesetzt.

A. castellanii wurde noch nicht für Virulenztests mit *S. maltophilia* eingesetzt. Vergleichende Untersuchungen mit zwei verschiedenen Amöben-Modellorganismen sind bislang noch nicht bekannt.

1.10 Next Generation Sequencing erlaubt Vergleiche des Kern- und Pangenoms von *S. maltophilia*

Die Sequenzierung des Genoms von *S. maltophilia* K279a bestätigte das Vorhandensein von potentiellen Virulenzgenen, die zum Beispiel für Proteasen, Hämolyse und verschiedene Sekretionssysteme codierten (Chrossman *et al.*, 2008). Ein Vergleich mit dem sequenzierten Umweltstamm R551-3 zeigte auch deutliche Unterschiede im akzessorischen Genom. So wiesen beide sog. genomische Inseln (GEIs) auf, die verschiedene Proteine produzieren, die für eine Anpassung an bzw. eine Interaktion mit der Umgebung wichtig sind (Rocco *et al.*, 2009). Durch Zugang zu mehreren genetischen Profilen der Spezies *S. maltophilia*, insbesondere auch von Stämmen mit unterschiedlichem Virulenzpotential kann ein breiteres Licht auf das genetische Potential dieser Spezies fallen. Von Interesse ist ein Vergleich des Kern-Genoms, das allen *S. maltophilia* Stämmen gemein ist, im Gegensatz zum akzessorischen Genom, das sich für die verschiedenen Stämme unterscheidet. Dieses birgt das Potential für Anpassungen an die verschiedenen Habitate, in denen *S. maltophilia* sich entwickeln kann, wobei damit auch eine Verbreitung von Resistenz- und Virulenzgenen einhergehen kann.

In den letzten 20 Jahren war die Sanger-Methode der Standard für DNA-Sequenzierung. Seit 2005 das erste kommerzielle Hochdurchsatz-Sequenziersystem, das 454 System von Roche, auf den Markt kam, gibt es stetig anwachsende Fortschritte sowohl in der Qualität der Sequenzierprodukte, als auch im Preis-Leistungsverhältnis, das diese Technologien für eine breite Masse an Anwendern zugänglich macht. Alle Sequenziertechnologien haben eine Gemeinsamkeit: es erfolgt massive Parallelsequenzierung von einzelnen DNA-Molekülen

oder klonal amplifizierten DNA-Molekülen, die in einer Flusszelle räumlich voneinander getrennt sind. Dabei werden Millionen kurzer Sequenzabschnitte sog. *reads* generiert. Mittels einer computerbasierten Strukturanalyse können diese zu längeren Sequenzabschnitten, *contigs*, zusammengesetzt werden. Im Idealfall geht dieses sog. „Assembling“ bis hin zu einem vollständigen Chromosom.

Derzeit werden drei Methoden am häufigsten genutzt. Die 454 Technologie von Roche benutzt das Prinzip der Öl-Emulsions-PCR in Kombination mit der Pyrosequenzier-Methode. Das Illumina/Solexa System repliziert kurze DNA-Stücke über die sog. *bridge* Amplifikation und benutzt reversible Terminatoren, die mittels einer Fluoreszenz-Farbreaktion nachweisbar sind. Das SOLiD (*Supported Oligonucleotide Ligation and Detection*)-System von Applied-Biosystems erzeugt ebenfalls kurze *reads* basierend auf Ligation (Shendure & Ji, 2008; Voelkerding *et al.*, 2009). Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Illumina/Solexa Technologie verwendet wurde, wird diese im folgenden Abschnitt genauer beschrieben.

1.10.1 Die Illumina/Solexa Technologie

Das Prinzip der Illumina/Solexa Sequenziertechnik basiert darauf, dass während der DNA-Synthese von kurzen Fragmenten eine Farbreaktion der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Terminator-Nukleotide aufgezeichnet wird. Zunächst wird die Ziel DNA in Stücke von mehreren 100 bp Länge fragmentiert und repariert, so dass DNA-Fragmente mit 5'-phosphorylierten stumpfen Enden entstehen. Diese stumpfen Enden werden dann mit einem 3'-Überhang Nukleotid A versehen, damit diese an einen Adapter mit 3' T-Überhang addiert werden können. Die Adapter wiederum sind komplementär zu Anker-molekülen in der Fließzelle, welche in hoher Dichte die Oberfläche bedecken. Die DNA-Fragmente mit dem Anker-molekül werden durch Hybridisierung an den Anker gebunden. Die Amplifikation der DNA erfolgt durch die sog. „Brücken“-*bridge* Amplifikation. Dabei wird das bereits an einem Ende ligierte DNA-Molekül an einen benachbarten Anker ligiert. Die Adaptersequenzen dienen auch als Primerbindestellen. Durch anschließende Denaturierung entstehen Cluster von ca. 1000 Kopien einzelsträngiger DNA, sog. *colonies* (abgeleitet von *polymerase colonies*). Im nächsten Schritt kann mittels einer Kamera das Assemblieren jedes Nukleotids nachverfolgt werden, da für jedes der vier Nukleotide ein in einer anderen Farbe fluoreszenzmarkierter Terminator eingesetzt wird. Da es möglich ist, die Terminatoren nach

jedem Schritt zu entlocken und den Fluoreszenzfarbstoff abzuspalten, können die Zyklen ohne Unterbrechung aneinandergereiht werden.

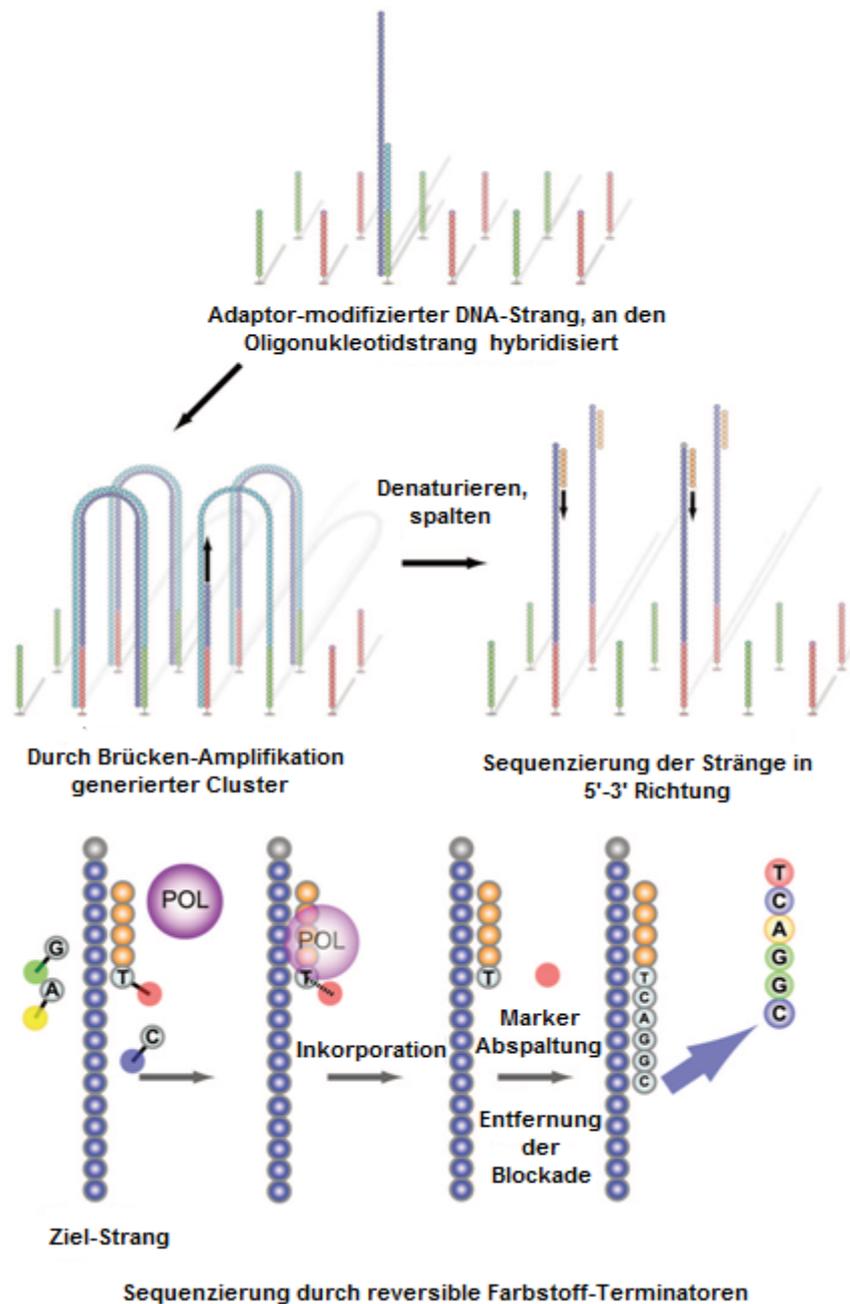


Abb. 5: Illumina Genome Analyzer Sequenzierung: Schematische Darstellung der Prozesse (Abgewandelt nach Voelkerding *et al.*, 2009; Nachdruck genehmigt). Fragmentierte DNA wird an Adapter ligiert, die an Anker-moleküle binden. Vervielfältigung in größere Cluster erfolgt durch Brückenamplifikation der an zwei Anker-molekülen gebundenen DNA. Die Sequenzierung mittels Fluoreszenzreaktion der Nucleotid-Terminatoren wird aufgezeichnet. Vor dem nächsten Zyklus werden Blockierung und Fluoreszenzmarker abgespalten.

Während beim „*Single-Read Sequencing*“ nur ein Primer für die Amplifikation verwendet wird, sind es beim „*Paired-end Sequencing*“ ein Vorwärts- und ein Rückwärts-Primer, die das DNA-Fragment amplifizieren. Diese Methode hat den Vorteil, dass so zusätzliche Positionsinformationen für die einzelnen Basen gewonnen werden, was ein späteres Alignment vereinfacht. Ein Problem ist, dass mit ansteigender Länge der *reads* die Genauigkeit der Methode sinkt, daher ist nur eine Amplifikation von kurzen Sequenzen (aktueller Standard ca. 70-100 bp) möglich (Shendure & Ji, 2008; Ansorge *et al.*, 2009; Voelkerding *et al.*, 2009).

Das Umschreiben der Bilddaten in Sequenzdaten, das sog. *base calling*, umfasst die Lokalisierung der Cluster in einer Bildserie und die Konvertierung dieser Bilder in Sequenzen unter Berücksichtigung von Hintergrundsignalen, Störungen und Qualitätsverlusten. Meist wird dazu eine plattform spezifische Software benutzt.

1.10.2 Computerbasierte Verarbeitung und Auswertung von Next Generation Sequencing Datensätzen

Eine der Schwierigkeiten im Umgang mit den immensen produzierten Datensätzen ist die Zusammensetzung der kurzen *reads* zu sinnvollen Einheiten. Im Idealfall können gesamte Chromosomen zusammengefügt werden. Die eigentliche sequenzierte Basenzahl ist um ein Vielfaches höher als die des gesamten Genoms. Durch Überlappen der einzelnen *reads* kann das Genom rekonstruiert werden. Dabei wird zwischen (i) Referenz basiertem Genom Assembly und (ii) *de novo* Assembly unterschieden. (i) Wenn ein geeignetes Referenzgenom zur Verfügung steht, d.h. bereits Sequenzen derselben Spezies oder einer nahe verwandten bzw. genetisch ähnlichen vorliegen, ist ein sog. *reference mapping* möglich. Dabei wird die Assemblierung der *reads* an der Referenz ausgerichtet. Beispiele für Programme sind Mosaik Assembler (<http://bioinformatics.bc.edu/marthlab/Mosaik>) oder MUMmer (Kurtz *et al.*, 2004). (ii) Eine andere Methode ist ein *de novo* Genom Assembly. Die kurzen *reads* werden zu längeren *contigs* assembliert. Im Idealfall entspricht ein *contig* einem Chromosom. Das wird aber meist aufgrund von repetitiven Sequenzen, die an verschiedenen Stellen des Genoms vorkommen, erschwert. Daher müssen mittels Sanger-Sequenzierung die Lücken geschlossen werden. Einige Beispiele für nicht kommerzielle *de novo* Assembly Programme sind SSAKE (Warren *et al.*, 2007), AbySS (Simpson *et al.*, 2009) und Velvet (Zerbino *et al.*, 2008). Eine weitere Möglichkeit ist die Kombination der Methoden. Dabei werden nach

einem *de novo* Assembly die *contigs* auf ein Referenzgenom gemappt. Die jeweils benötigte Software z.B. MCM (Mauve Contig Mover) steht frei im Internet erhältlich zur Verfügung (Rissman *et al.*, 2009).

Um die Rohsequenzen in auswertbare Informationen umzuwandeln, ist eine funktionelle Annotation der Gene notwendig. Dazu muss zunächst eine Genvorhersage getroffen werden. Die darauf basierenden hypothetischen Gene, bzw. deren Aminosäuresequenzen, werden dann mit Proteindatenbanken abgeglichen. Letztlich werden basierend auf Sequenzhomologien die Gene annotiert (Stothard & Wishard, 2006).

Verschiedene Computerprogramme bieten vollständig automatische Annotationssoftware, z.B. BASys (Van Domselaar *et al.*, 2005) an. Andere überlassen problematische Fälle dem Benutzer zur manuellen Annotation, z.B. SWISS-PROT (Gattiker *et al.*, 2003). Die meisten Systeme generieren eine automatische Annotation, die manuelle Bearbeitung erlaubt, wie GenDB (Meyer *et al.*, 2003) oder PUMA2 (Maltsev *et al.*, 2006).

1.11 Aufgabenstellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte zunächst eine umfassende, repräsentative Stammsammlung von *S. maltophilia* Isolaten aus dem klinischen Milieu sowie verschiedenen Umweltumgebungen gesammelt werden. Basierend auf dieser Stammsammlung sollten Methoden entwickelt werden, mit Hilfe derer die Einteilung der Stämme entsprechend ihrer genetischen und physiologischen Eigenschaften möglich ist.

Die zentralen Fragestellungen hierbei waren:

1. Wie divers ist die Spezies *S. maltophilia* wirklich?
2. Existieren bestimmte Subspezies oder Ökotypen?
3. Bestehen Unterschiede in der Pathogenität?
4. Falls ja, was ist deren genetische Grundlage?

Zu diesem Zweck wurden verschiedene Methoden zu Genotypisierung angewandt (rep-PCR Fingerprinting und *gyrB*-Gen Sequenzvergleich) und mit anderen Genotypisierungsmethoden verglichen. Anhand der genetischen Differenzierung erfolgte eine weitere Auswahl von Stämmen, die charakteristisch für die definierten Subgruppen sind. Verschiedene Virulenzeigenschaften (extrazelluläre Sekundärmetabolite, Motilität und Biofilmbildung) und das Antibiotikaresistenz-Potential wurden in verschiedenen experimentellen Ansätzen getestet. Eine zentrale Rolle spielte dabei die Untersuchung der Virulenz der Isolate gegenüber Amöben, als Modell für die Immunabwehr, die im menschlichen Körper durch Makrophagen erfolgt.

Eine zentrale Frage war, ob sich die physiologischen Eigenschaften von *S. maltophilia* mit entsprechenden genetischen Gruppierungen oder Ökotypen in Zusammenhang bringen lassen. Um den genetischen Voraussetzungen der Virulenz von *S. maltophilia* auf den Grund zu gehen, wurden, basierend auf den Ergebnissen der Virulenzversuche, ein nicht virulenter Umweltstamm und ein virulenter klinischer Stamm vollständig sequenziert. Durch einen Genomvergleich sollten Kandidaten für mögliche Virulenzgene von *S. maltophilia* ermittelt und untersucht werden. Um die tatsächliche Expression einiger dieser Gene nachzuweisen, wurde abschließend die Genexpression anhand der reversen Transkription der RNA zu cDNA, mit spezifischen Primern nachgewiesen.

Eine schematische Darstellung des Arbeitsablaufes ist in Abbildung 6 gezeigt.

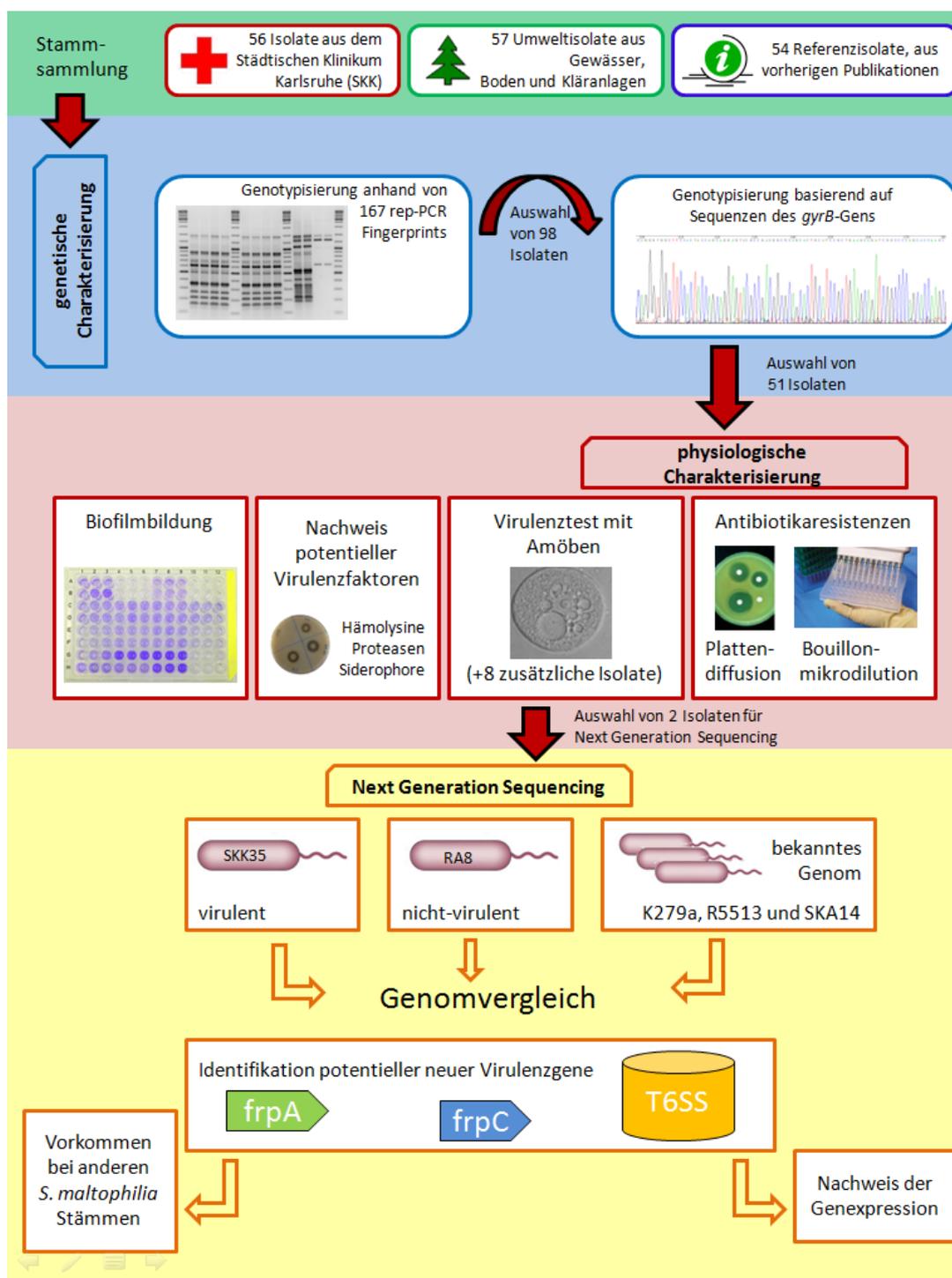


Abb. 6: Schematische Übersicht des Arbeitsablaufes: Klinische Isolate aus dem Städtischen Klinikum Karlsruhe, Umweltisolate aus Karlsruhe und Umgebung sowie Referenzisolate aus vorangegangenen Studien zur Diversität von *S. maltophilia* wurden eingesetzt. Rep-PCR Fingerprinting wurde mit allen 167 Isolaten durchgeführt. Für eine Auswahl von 98 Isolaten wurde eine weitere Genotypisierung anhand der Sequenz des *gyrB*-Gens durchgeführt. Daraus resultierte eine Einteilung in verschiedene genetische Subgruppen. Repräsentativ für diese genetischen Gruppen wurden 51 Isolate ausgewählt, bei denen physiologische Merkmale wie Biofilmbildung, Sekretion extrazellulärer Proteine, Virulenz und Antibiotikaresistenz untersucht wurden. Basierend auf den Virulenzversuchen wurden für die vollständige Sequenzierung des Bakteriengenoms, zwei *S. maltophilia* Stämme ausgewählt. Diese waren RA8, als nicht-virulenter Stamm und SKK35 als virulenter Stamm. Anhand des Vergleichs mit den bereits bekannten Sequenzen der *S. maltophilia* Stämme K279a, R551-3 und SKA14 wurden neue Kandidaten für potentielle Virulenzgene identifiziert. Die *S. maltophilia* Stammsammlung wurde auf das weitere Vorkommen dieser Gene hin gescreent. Genexpression in verschiedenen Medien wurde nachgewiesen.

2 Material

2.1 Bakterien- und Amöbenisolate

Zum Zweck der genetischen und physiologischen Charakterisierung von *S. maltophilia* wurde eine Stammsammlung von 167 *S. maltophilia* Isolaten zusammengestellt. Isolate anderer Bakterienspezies wurden als Referenz hinzugezogen. Anhand von Co-Kultur Experimenten mit Amöben als Modellorganismen wurden Virulenztests mit *S. maltophilia* Isolaten durchgeführt.

2.1.1 Bakterienisolate

Eine Auflistung der *S. maltophilia* Isolate, die im Rahmen der vorliegenden Studie untersucht wurden, ist in Tabelle 1 gegeben. Angegeben sind der Name des Stamms, die Isolationsquelle und die Literaturangabe, wenn es sich um Referenzstämme handelt, die bereits in der Literatur beschrieben wurden.

Tab. 1: Die im Rahmen dieser Studie untersuchten *S. maltophilia* Isolate. Isolate die neu aus der Umwelt isoliert wurden, sind grau unterlegt. Als SKK1-56 klassifizierte Stämme wurden vom Städtischen Klinikum in Karlsruhe zur Verfügung gestellt und wurden im Zeitraum von einem Jahr (2007-2008) dort isoliert.

Isolat	Quelle	Referenz	Isolat	Quelle	Referenz
DSM 50170	Oropharyngeal Region eines Krebspatienten	Palleroni and Bradbury 1993	SKK28	Urin	
SKK1	Wundabstrich		SKK29	Atemwegstrakt	
SKK2	Urin		SKK30	Urin	
SKK3	Atemwegstrakt		SKK31	Wundabstrich	
SKK4	Atemwegstrakt		SKK32	Atemwegstrakt	
SKK5	Atemwegstrakt		SKK33	Atemwegstrakt	
SKK6	Venenkatheter		SKK34	Urin	
SKK9	Urin		SKK35	Geschwür Abstrich	
SKK10	Wundabstrich		SKK36	Wundabstrich	
SKK11	humane Blutkultur		SKK37	Atemwegstrakt	
SKK12	Wundabstrich		SKK38	Urin	
SKK13	Urin		SKK39	Kontaktlinse	
SKK14	Atemwegstrakt		SKK40	Atemwegstrakt	
SKK16	Atemwegstrakt		SKK41	Wundabstrich	
SKK17	Urin		SKK42	Atemwegstrakt	
SKK18	Wundabstrich		SKK44	Bindehaut Abstrich	
SKK19	Atemwegstrakt		SKK45	Atemwegstrakt	
SKK20	Atemwegstrakt		SKK46	Geschwür Abstrich	
SKK21	Atemwegstrakt		SKK47	Geschwür Abstrich	
SKK22	Atemwegstrakt		SKK49	Atemwegstrakt	
SKK23	Wundabstrich		SKK50	Atemwegstrakt	
SKK25	Urin		SKK51	Atemwegstrakt	
SKK27	Cervix Abstrich		SKK52	Atemwegstrakt	

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Isolat	Quelle	Referenz
SKK53	Atemwegstrakt	
SKK54	Wundabstrich	
SKK55	Atemwegstrakt	
SKK56	Wundabstrich	
K279a	Blut eines Krebspatienten	Crossman <i>et al.</i> 2008
673	Atemwegstrakt	Kaiser <i>et al.</i> 2008
674	Atemwegstrakt	Kaiser <i>et al.</i> 2008
675	Atemwegstrakt	Kaiser <i>et al.</i> 2008
676	Atemwegstrakt	Kaiser <i>et al.</i> 2008
677	Atemwegstrakt	Kaiser <i>et al.</i> 2008
680	Atemwegstrakt	Kaiser <i>et al.</i> 2008
681	Atemwegstrakt	Kaiser <i>et al.</i> 2008
682	Atemwegstrakt	Kaiser <i>et al.</i> 2008
683	Atemwegstrakt	Kaiser <i>et al.</i> 2008
685	Atemwegstrakt	Kaiser <i>et al.</i> 2008
686	Atemwegstrakt	Kaiser <i>et al.</i> 2008
c1	Mensch	Minkwitz und Berg, 2001
c2	Mensch	Minkwitz und Berg, 2001
c3	Mensch	Minkwitz und Berg, 2001
c4	Mensch	Minkwitz und Berg, 2001
c5	Mensch	Minkwitz und Berg, 2001
c6	Mensch	Minkwitz und Berg, 2001
c7	Mensch	Minkwitz und Berg, 2001
c8	Mensch	Minkwitz und Berg, 2001
c9	Mensch	Minkwitz und Berg, 2001
c10	Mensch	Minkwitz und Berg, 2001
c11	Mensch	Minkwitz und Berg, 2001
c12	Mensch	Minkwitz und Berg, 2001
c13	Mensch	Minkwitz und Berg, 2001
c14	Mensch	Minkwitz und Berg, 2001
c15	Mensch	Minkwitz und Berg, 2001
c16	Mensch	Minkwitz und Berg, 2001
c18	Mensch	Minkwitz und Berg, 2001
c19	Mensch	Minkwitz und Berg, 2001

Isolat	Quelle	Referenz
c20	Mensch	Minkwitz und Berg, 2001
c21	Mensch	Minkwitz und Berg, 2001
c22	Mensch	Minkwitz und Berg, 2001
c23	Mensch	Minkwitz und Berg, 2001
c24	Mensch	Minkwitz und Berg, 2001
c25	Mensch	Minkwitz und Berg, 2001
LMG 10853	Sputum	Hauben <i>et al.</i> 1999
LMG 10873	Bindehautentzündung	Hauben <i>et al.</i> 1999
LMG 10874	humane Blutkultur	Hauben <i>et al.</i> 1999
LMG 10991	Bein, Eiter	Hauben <i>et al.</i> 1999
LMG 10996	Bein, Geschwür	Hauben <i>et al.</i> 1999
LMG 11114	humane Blutkultur	Hauben <i>et al.</i> 1999
LMG 10879	Reisfeld	Hauben <i>et al.</i> 1999
e1	Brackwasser	Minkwitz und Berg, 2001
e2	Brackwasser	Minkwitz und Berg, 2001
e4	Rhizosphäre von Raps	Minkwitz und Berg, 2001
e7	Rhizosphäre von Raps	Minkwitz und Berg, 2001
e8	Rhizosphäre von Raps	Minkwitz und Berg, 2001
e13	Rhizosphäre von Raps	Minkwitz und Berg, 2001
e19	Geocaulosphäre, Kartoffel	Minkwitz und Berg, 2001
e20	Rhizosphäre, Kartoffel	Minkwitz und Berg, 2001
e21	Kläranlage	Minkwitz und Berg, 2001
e22	Kläranlage	Minkwitz und Berg, 2001
e23	Augentropfen	Minkwitz und Berg, 2001
GR3	Klärschlamm	
GR4	Klärschlamm	
GR5	Klärschlamm	
GR6	Klärschlamm	
GS1	Klärschlamm	
GS2	Klärschlamm	
GS3	Klärschlamm	
GS5	Klärschlamm	
GS6	Klärschlamm	
GS7	Klärschlamm	
GS8	Klärschlamm	
GS9	Klärschlamm	
KS3	Klärschlamm	
KS8	Klärschlamm	

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Isolat	Quelle	Referenz
KS13	Klärschlamm	
KS14	Klärschlamm	
KA24	Klärschlamm	
KA41	Klärschlamm	
KA42	Klärschlamm	
HA1	Kläranlage Ablauf	
HA14	Kläranlage Ablauf	
HA22	Kläranlage Ablauf	
NA16	Kläranlage Ablauf	
NA18	Kläranlage Ablauf	
NA20	Kläranlage Ablauf	
NB2	Klärschlamm	
NB12	Klärschlamm	
RA8	Kläranlage Ablauf	
RA9	Kläranlage Ablauf	
RA19	Kläranlage Ablauf	
RB16	Klärschlamm	
B4	Klärschlamm	
B6	Klärschlamm	
F4	Klärschlamm	
F11	Klärschlamm	
X434	Leitungswasser	
X743	Leitungswasser	
X968	Leitungswasser	
R551-3	Pflanzengewebe, <i>Populus trichocarpa</i>	Taghavi <i>et al.</i> 2009
SKA14	Meer	Hagström <i>et al.</i> 2000
NS1-5	Umwelt	Minkwitz und Berg, 2001

Isolat	Quelle	Referenz
NS2-6	Umwelt	Minkwitz und Berg, 2001
NS68	Umwelt	Minkwitz und Berg, 2001
NS296	Umwelt	Minkwitz und Berg, 2001
1.4	Süßwasser Sediment	
4.1	Süßwasser Sediment	
4G	Süßwasser Sediment	
5.7	Süßwasser Sediment	
5.8	Süßwasser Sediment	
5F17	Süßwasser Sediment	
6.7	Süßwasser Sediment	
6F2	Süßwasser Sediment	
7.4	Süßwasser Sediment	
7.5	Süßwasser Sediment	
7E	Süßwasser Sediment	
7F	Süßwasser Sediment	
8.1	Süßwasser Sediment	
8.5	Süßwasser Sediment	
8.6	Süßwasser Sediment	
8E	Süßwasser Sediment	
8F	Süßwasser Sediment	
8a1	Süßwasser Sediment	
VUN 10010	PAH-kontaminierter Boden, verlassenes Fabrikgelände	

Neben *S. maltophilia* wurden auch die folgenden Bakterienspezies als Referenzisolate eingesetzt:

- *Escherichia coli* (ATCC 25922) DSM 1103
- *Klebsiella aerogenes* DSM 2026
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) DSM 1117
- *Pseudomonas aeruginosa* PA14
- *Pseudoxanthomonas broegbernensis* DSM 12573
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) DSM 1104
- *Stenotrophomonas acidaminiphila* DSM 13117
- *Stenotrophomonas humi* DSM 18929
- *Stenotrophomonas nitritireducens* DSM 12575
- *Stenotrophomonas koreensis* DSM 17805
- *Stenotrophomonas rhizophila* DSM 14405

- *Stenotrophomonas sp.* DSM 2408
- *Stenotrophomonas terrae* DSM 18941
- *Xanthomonas campestris pv. campestris* DSM 3586

2.1.2 Amöben

Als Modellorganismen zur Untersuchung der Virulenz von *S. maltophilia* wurden die beiden Amöbenstämme *Dictyostelium discoideum* Ax2 und *Acanthamoeba castellanii* DSM 30234 eingesetzt.

2.2 Nährmedien und Puffer

Alle Nährmedien sind, wenn nicht anders angegeben, auf das Volumen von 1 l bezogen und mit deionisiertem Wasser (dH₂O) angesetzt.

2.2.1 Allgemeine Nährmedien

Die für die allgemeine Anzucht und Stammhaltung der Bakterien und Amöben genutzten Nährmedien sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tab. 2: Liste der Verwendeten allgemeinen Nährmedien, entweder als Fertignährmedien oder nach Rezept.

Feststoff- oder Flüssigmedium	Zusammensetzung
Nährbouillon	5 g Pepton (Merck, Darmstadt, Deutschland), 3 g Fleischextrakt (Merck), 50 g NaCl (Merck)
DEV-Nähragar	Fertignährmedium (Merck)
Müller-Hinton-Bouillon	Fertignährmedium (Merck)
Müller-Hinton-Bouillon II	Kationen angepasst Fertignährmedium (Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
Müller-Hinton-Agar	Fertignährmedium (Merck)
LB-Medium (Luria-Bertani)	Fertignährmedium (Roth)
BHI-Medium (Brain heart infusion)	1:4 mit dH ₂ O verdünnt; Fertignährmedium (Merck)
10 x M9-Salze	60 g NaH ₂ PO ₄ , 30 g KH ₂ PO ₄ , 5 g NaCl, 10 g NH ₄ Cl

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Feststoff- oder Flüssigmedium	Zusammensetzung
M9-Agar	20 g Agar-Agar wurden auf 850 ml mit dH ₂ O aufgefüllt. Nach dem Autoklavieren wurden 100 ml 10x M9-Salze, 10 ml 100 mM MgSO ₄ (Merck), 10 ml 10 mM CaCl ₂ (Merck), 10 ml 2 M D-Glucose (Merck), und 10 ml (5 mg/ml) D-/L-Methionin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) hinzugegeben.
HL5-Medium	5 g Trypton (Beckton Dickinson), 5 g Pepton (Merck), 5 g Hefeextrakt (Merck), 1,2 g KH ₂ PO ₄ (Merck) und 0,35 g Na ₂ HPO ₄ (Merck) Mit dH ₂ O wurde auf 950 ml aufgefüllt; nach dem Autoklavieren wurden 50 ml (2 M) D-Glucose (Merck) und 300 µl Streptomycinsulfat (Roth) (Stammlösung: 300 mg/ml) hinzugefügt.
PYG-Medium (Peptone yeast extract glucose)	20 g Pepton (Merck), 1 g Hefeextrakt (Merck), 1 g Natrium Citrat (Sigma-Aldrich) Mit dH ₂ O wurde auf 870 ml aufgefüllt und autoklaviert; separat autoklaviert bzw. sterilfiltriert und anschließend zugegeben wurden: 10 ml 0,4 M MgSO ₄ (Merck), 10 ml 0,25 M Na ₂ HPO ₄ (Merck), 10 ml 0,25 M KH ₂ PO ₄ (Merck), 50 ml 0,005 M (NH ₄) ₂ FeII(SO ₄) ₂ (Sigma-Aldrich), 50 ml 2 M D-Glucose (Merck) und 300 µg Streptomycinsulfat (Roth) (Stammlösung: 300 mg/ml).
Sorensen-Agar	8 g KH ₂ PO ₄ (Merck), 1.16 g Na ₂ HPO ₄ (Merck), 20 g Agar-Agar (Merck)

2.2.2 Selektivnährmedien

XMSM (*Xanthomonas maltophilia* selective medium)-Agar, nach Juhnke und des Jardin, (1989), wurde zur Isolierung von *S. maltophilia* aus Umweltproben benutzt. Dieser Nährboden enthält per Liter 10 g Maltose (Roth), 5 g Trypton (Merck), 4 ml Bromthymolblau 2 % (Merck) und 15 g Agar-Agar (Merck). Mit NaOH (Merck) wurde der pH auf 7,1 eingestellt. Nach Abkühlen des Agars auf ca. 50 °C wurden die folgenden Antibiotika zugegeben: 100 µg/ml Cycloheximid, 50 µg/ml Nyastin, 50 µg/ml Cephalexin, 25 µg/ml Bacitracin, 25 µg/ml Penicillin G, 10 µg/ml Novobiocin, 30 µg/ml Neomycinsulfat und 1 µg/ml Tobramycin.

2.2.3 Testnährmedien

Die Untersuchung physiologischer Parameter erfolgte auf den in Tabelle 3 dargestellten Testnährböden.

Tab. 3: Liste der verwendeten Testmedien; die Angaben beziehen sich auf 1 Liter Medium.

Test-Agar	Zusammensetzung
Swimming-Agar	10 g Trypton (Merck), 5 g NaCl (Merck), 3 g Agar-Agar (Merck)
<i>Twitching</i> -Agar	10 g TSB (Tryptic Soy Broth – Beckton Dickinson), 10 g Agar-Agar (Merck)
CAS-Agar (<u>Chrom-Azurol-S</u>)	60,5 mg CAS (Sigma-Aldrich) in 50 ml H ₂ O und 10 ml Fe(III)-Lösung (1 mM FeCl ₃ (Sigma-Aldrich), 10 mM HCl) mit 72,9 mg CTAB (<u>Cetyltrimethylammoniumbromid</u>) (Sigma-Aldrich) in 40 ml H ₂ O wurden unter Rühren vermischt. Separat autoklaviert wurden 30,24 g Pipes, 100 ml 10x M9 Salze, und 15 g Agar-Agar. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 6,8 eingestellt.
Protease-Test-Agar	38 g Müller-Hinton-Agar (Merck) und 60 g Magermilchpulver (Merck) in jeweils 500 ml dH ₂ O wurden einzeln autoklaviert und nach dem autoklavieren vermischt.
Blut-Agar	Fertigplatten mit 65ml/l Hammelblut (Merck)

2.2.4 Puffer und Lösungen

Als Wasch- oder Elektrophoresepuffer verwendete Lösungen sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tab. 4: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen.

Lösung	Zusammensetzung
PBS-Puffer	8 g NaCl (Merck), 0,2 g KCl (Merck), 1,44 g Na ₂ HPO ₄ (Merck), 0,24 g KH ₂ PO ₄ (Merck), in 800 ml deion. Wasser gelöst, pH mit HCl auf 7,4 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert
KCl-Waschpuffer (0,85 % w/v)	8,5 g KCl (Merck) in 1 l dH ₂ O gelöst
NaCl-Waschpuffer (0,9 % w/v)	9 g NaCl (Merck) in 1 l dH ₂ O gelöst
TE-Puffer (1x)	1,21 g Tris und 0,38 g EDTA 1 l dH ₂ O gelöst (<u>Ethylendiamintetraacetic acid</u>) (Riedl-deHaen)
TAE (<u>Tris-Acetat-EDTA</u>) -Puffer (100 x)	484,4 g 4 M Tris-Base (Sigma-Aldrich), 82,0 g 1 M Natriumacetat (Merck) und 37,2 g (0,1 M) EDTA (Riedl-deHaen, Seeltze, Deutschland) wurden eingewogen, 500 ml dH ₂ O zugegeben und ca. 100 ml Eisessig (Sigma-Aldrich) hinzugefügt bis zum Lösen, der pH 8.0 wurde eingestellt, auf 1 L mit dH ₂ O aufgefüllt und autoklaviert.
TBE-Puffer (<u>Tris-Borat-EDTA</u>) -Puffer (1x)	53,9 g Tris-Base (Sigma-Aldrich), 27,5 g Borsäure (Merck) und 2,3 g EDTA (Riedl-deHaen) wurden in 1 l dH ₂ O gelöst, der pH auf 8,2 eingestellt und die Lösung anschließend auf ein Volumen von 5 l aufgefüllt.

2.3 Antibiotika

Zur Herstellung von Antibiotikallösungen wurden die folgenden Antibiotika in Pulverform verwendet: Cycloheximid, Nyastin, Cephalexin, Bacitracin, Penicillin G, Novobiocin, Neomycinsulfat, Tobramycin, Vancomycin (Roth), Gentamicin (Roth), Tetracyclin (Roth), Norfloxacin (Sigma-Aldrich), Trimethoprim (Sigma-Aldrich) und Sulfamethoxazol (Sigma-Aldrich). Zur Bestimmung von Antibiotogrammen nach der Plattendiffusionsmethode wurden die in Tabelle 5 aufgeführten Antibiotikaplättchen verwendet.

Tab. 5: Antibiotikaplättchen (Beckton Dickinson, BLL™ Sensi-Disc™ Susceptibility Test Discs).

Imipenem	IMP	10 µg
Penicillin	P	10 µg
Ampicillin	AM	5 µg
Kanamycin	K	30 µg
Neomycin	N	30 µg
Chloramphenicol	C	30 µg
Gentamicin	GM	10 µg
Ofloxacin	OFX	5 µg
Norfloxacin	NOR	10 µg
Triple-Sulfa	SSS	0,25 µg
Trimethoprim/Sulfamethoxazol	SXT	23,75/1,25 µg
Vancomycin	VAN	30 µg
Tetracyclin	TET	30 µg
Ciprofloxacin	CIP	5 µg
Erythromycin	E	15 µg
Novobiocin	NB	30 µg

2.4 Chemikalien

- DL-Methionin (Sigma-Aldrich)
- Natriumhydroxid (Merck)
- HCl 37 % (Merck)
- Eisessig (Sigma-Aldrich)
- Kristallviolett (Merck)
- Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Roth)
- Roti®- Chloroform (Roth)
- Ethanol 99,8 % (Roth)
- Isopropanol 99,5 % (Roth)

- Ethidiumbromid (Merck)
- QA-Agarose TM Multipurpose (MP Biomedicals, Heidelberg, Deutschland)
- Bromthymolblau (Merck)
- Glycerin 85 % (Merck)
- Natriumacetat (Merck)
- β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)
- Lysozym aus Hühnereiweiß (Sigma-Aldrich)

2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für den Reaktionsansatz zur Polymerasekettenreaktion wurden Reagenzien verschiedener Hersteller verwendet. Die Sequenzen der Oligonukleotidprimer sind in Tabelle 6 aufgeführt. Die genaue Zusammensetzung jedes PCR-Reaktionsansatzes ist in Kapitel 3.2.2 beschrieben. Verwendet wurden:

- 10x PCR-Puffer mit 15 mM $MgCl_2$ (QIAGEN, Hilden, Deutschland)
- 10x PCR-Puffer (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)
- 25 mM $MgCl_2$ (Fermentas)
- dNTP Set, 100 mM Lösungen (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland)
- dNTP Set, 100 mM Lösungen (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Fermentas)
- Vorwärts- und Rückwärts-Primer s. Tabelle 6 (Eurofins, MWG Operon, Ebersberg, Deutschland)
- HotStar-TaqTMPolymerase (5 units/ μ l, QIAGEN)
- TrueStart Hot Start Taq Polymerase (5 units/ μ l, Fermentas)
- LiChroSolv PCR-Wasser (Merck)
- Probenpuffer (Beschickungspuffer): 2 ml EDTA (50 mM) pH 8.0 , 0,4 g (20%) Ficoll (Sigma), 5 mg (0,25%) Bromphenolblau (Sigma), 5 mg (0,25%) Xylen-Cyanol (Sigma)
- Längenstandard 100 bp-Ladder XIV (Roche)
- DMSO (Dimethylsulfoxid) 95 % (Sigma)

Tab. 6: Liste der für PCR-Reaktionen verwendeten Oligonukleotide (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland).

Primer-Name	Ziel-Gen	Sequenz	Referenz
SM1f	16S-rRNA	5'-GTT GGG AAA GAA ATC CAG C-3'	Whitby <i>et al.</i> , 2000
SM4	23S-rRNA	5'-TTA AGC TTG CCA CGA ACA G-3'	Whitby <i>et al.</i> , 2000
SMgroupE2-for	16S-rRNA	5'-TGC AGT GGA AAC TGG ACA-3'	Adamek <i>et al.</i> , 2011
SMgroupE2-rev	16S-rRNA	5'-CCA TGG ATG TTC CTC CC-3'	Adamek <i>et al.</i> , 2011
BoxA1R	repetitive Sequenz	5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3'	Versalovic <i>et al.</i> , 1994
(GTG) ₅	repetitive Sequenz	5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3'	Versalovic <i>et al.</i> , 1994
UP-1	<i>gyrB</i>	3' GAA GTC ATC ATG ACC GTT CTG CAY GCN GGN GGN AAR TTY GA -3'	Yamamoto und Harayama, 1995
UP-2r	<i>gyrB</i>	5' - AGC AGG GTA CGG ATG TGC GAG CCR TCN ACR TCN GCR TCN GTC AT - 3'	Yamamoto und Harayama, 1995
UP-1S	<i>gyrB</i>	5'-GAA GTC ATC ATG ACC GTT CTG CA-3'	Yamamoto und Harayama, 1995
UP-2S	<i>gyrB</i>	5'-AGC AGG GTA CGG ATGTGC GAG CC-3'	Yamamoto und Harayama, 1995
frpA-forw	<i>frpA</i>	5'-GAT TTC AAC TTC GAC AAC GAC A-3'	Adamek (unv.)
frpA-rev	<i>frpA</i>	5'-CAT AGA ACG CTT CGA AGA TCG-3'	Adamek (unv.)
frpA_gap1_forw	<i>frpA</i>	5'-ACA ACA CCT ACC GGA TCG AG-3'	Adamek (unv.)
frpA_gap1_rev	<i>frpA</i>	5'-CCA GTG CCT GGA AAC CAT T-3'	Adamek (unv.)
frpA_gap2-forw	<i>frpA</i>	5'-GGA CGA TCT CTA CGG CTA CG-3'	Adamek (unv.)
frpA_gap2-rev	<i>frpA</i>	5'-GAA CCC GTA CAC GTC ATT GC-3'	Adamek (unv.)
frpC-forw	<i>frpC</i>	5'-CTA TGT GGT GGA CAA CAG CAA C-3'	Adamek (unv.)
frpC-rev	<i>frpC</i>	5'-GAG ACG GTT GTT GCC TGA AT-3'	Adamek (unv.)
frpC_gap1_forw	<i>frpC</i>	5'-GGA AGT GCG GCA GTT GAT-3'	Adamek (unv.)
frpC_gap1_rev	<i>frpC</i>	5'-CAG GAC AAC GAG AGC CAA GTA T-3'	Adamek (unv.)
hcp1_forw	<i>hcp</i>	5'-CTT TCC TCT CGA TTG ACA CCA T-3'	Adamek (unv.)
hcp1_rev	<i>hcp</i>	5'-GTA GTT CGG GAT GTT CTT GGT T-3'	Adamek (unv.)

2.6 Kommerzielle Reaktions-Kits

- QIAGEN Genomic DNA Kit (QIAGEN)
- QIamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN)
- QIamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)
- RNeasy Mini Kit (QIAGEN)
- RNA-Protect Cell Reagent (QIAGEN)
- Sequenzier-Kit (incl. Premix): BigDye® Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)

- TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems): Enthält 10x TaqMan RT Puffer, 25 mM MgCl₂, desoxyNTPs Mix, RNase Inhibitor, Random Hexamer Primer 2,5 mM, MultiScribe

2.7 Geräte und Materialien

Geräte

- Autoklav Dampfsterilisator (Varioklav)
- Lumi-Imager T1TM (Roche Diagnostics Mannheim)
- Magnetrührer MR 3001 (Heidolph)
- pH-Meter 776 Calimatic (Knick)
- Analysen-Waage Laboratory LC 220 S (Satorius)
- Waage BL 3100 (Satorius)
- Zentrifuge Biofuge Pico (Heraeus, Thermo Scientific)
- Zentrifuge 5403 (Eppendorf)
- Vortexgerät: Vortex Mixer Stuart (Bibby Sterlin)
- Thermocycler GeneAmp®PCR-System 9700 (Applied Biosystems)
- Sterilbank (Holten Lamin Air)
- Elektrophoresekammer (Renner)
- Elektrophoresenetzgerät (Biorad)
- Brutschränke 23°C und 30°C (Memmert)
- Schüttler Unimax 2010 (Heidolph) mit Inkubatorhaube Certomat®H (Braun Biotech International)
- Thermomixer compact (Eppendorf)
- Photometer Aquamate (Thermo Spectronis)
- Mikrotiterplatten-Lesegerät (Thermo Labsystems Multiskan)
- Mikrotiterplatten-Lesegerät (Tecan Infinite F200 Pro)
- Mikroskop Axioplan 2 (Zeiss)

Materialien

- Duran-Flaschen 250, 500, 1000 ml (Schott)
- Research® Pipetten 10 µl, 100 µl, 1000 µl, 5 ml, 10 ml (Eppendorf) mit entsprechenden Pipettenspitzen (Eppendorf)
- Reaktionsgefäße 0,2 ml 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (Eppendorf)
- Zentrifugen-Röhrchen, 15 und 50 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Einmal-Küvetten 1,5 ml halbmikro (Brand)
- Petrischalen steril mit Nocken (90 mm Durchmesser; Sarstedt)
- Zellkulturflaschen (50 ml, 25 cm²; Greiner, Frickenhausen, Deutschland)

2.8 Computer Software und Datenbanken

- BioNumerics 5.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium)
- MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 (Tamura *et al.*, 2007; <http://www.megasoftware.net/>)
- Chromas Lite Version 2.01 (www.technelysium.com.au)
- EMBL - European Molecular Biology Laboratory
- Nucleotide Sequence Database (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>)
- NCBI - National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
- KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<http://www.genome.jp/kegg/>)
- Axio Vision Microscope Software (Zeiss)
- Velvet (Zerbino *et al.*, 2008)
- GenDB (Meyer *et al.*, 2003)
- Mauve – Multiple Genome Alignment Software (<http://gel.ahabs.wisc.edu/mauve/>)
- BRIG – Blast Ring Image Generator (<http://sourceforge.net/projects/brig/>)

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

Die im Folgenden aufgeführten mikrobiologischen Methoden wurden zur Isolierung, Anzucht und physiologischen Charakterisierung von Bakterien und Amöben angewandt.

3.1.1 Isolierung von *S. maltophilia* aus Umweltproben

Neue *S. maltophilia* Isolate aus Umweltproben wurden mit Hilfe zweier selektiver Methoden gewonnen.

Isolierung mittels XMSM Selektiv-Agar

Die selektive Isolierung von *S. maltophilia* aus Boden- und Sedimentproben erfolgte über die Resistenzen, die das Bakterium gegenüber verschiedenen Antibiotika aufweist. Hierzu wurden 2,5 g des zu beprobenden Ausgangsmaterials, d. h. Klärschlamm, Boden oder Sedimentproben, in 25 ml 0,85 % KCl suspendiert. Anschließend erfolgte eine Sedimentation für ca. 10 Minuten, wobei der resultierende Überstand für eine Verdünnungsreihe verwendet wurde. Von 10^{-1} , 10^{-2} und 10^{-3} Verdünnungen wurden jeweils 100 µl auf XMSM (*Xanthomonas maltophilia* selective medium) Agar ausplattiert. Kolonien konnten nach 3-4 Tagen rekultiviert und mittels einer spezifischen PCR Methode überprüft werden, bei der die Primer an eine für *S. maltophilia* spezifische 16S-23S intergenische Region binden (Juhnke und Des Jardin, 1989).

Isolierung auf Müller-Hinton Agar mit Imipenem

Eine alternative Isolationsmethode für *S. maltophilia* aus Umweltproben wurde nach Bollet *et al.* (1995) durchgeführt. Die Selektion erfolgt hierbei über die Methionin-Auxotrophie von *S. maltophilia* und die Resistenz gegenüber Imipenem. Die zu untersuchende Boden-, Sediment- oder Klärschlammprobe wurde über Nacht in 10 ml Nährboullion mit 0,5 mg DL-Methionin bei 30 °C inkubiert. Aus der angewachsenen Bakteriensuspension wurden je 100

µl auf Müller-Hinton-Agar ausplattiert. Jeweils vier Imipenem-getränkte Plättchen (BD Sensi-disc 10 µg) wurden sofort im Anschluss auf die Platte gelegt. Nach ca. 18 Stunden Wachstum bei 30 °C konnte man deutlich die Bildung von Hemmhöfen im Bakterienrasen erkennen. Winzige Kolonien, die innerhalb dieser Hemmhöfe wuchsen wurden auf Nähragar rekultiviert und unter Vorbehalt als *S. maltophilia* eingestuft. Mittels der spezifischen PCR-Methode (vgl. 3.2.2) wurde überprüft, ob es sich bei den so isolierten Reinkulturen um *S. maltophilia* handelte.

3.1.2 Anzucht und Stammhaltungsbedingungen

Anzucht der Bakterien

Die generelle Anzucht der Bakterien auf Festmedium erfolgte auf DEV-Nähragar über 18 bis 24 Stunden bei 30 °C. Die Anzucht als Flüssigkultur erfolgte in 5 ml LB-Medium über 18 bis 24 Stunden, bei 30 °C, im Schüttler bei ca. 70 rpm, in 15 ml Reaktionsröhrchen. Wenn es für die anschließenden Versuche erforderlich war, wurden die Inkubationszeiten, die Temperatur und das Medium variiert.

Stammhaltung der Bakterien

Kurzzeitige Lagerung, über 2 bis 3 Wochen, erfolgte auf DEV-Nähragarplatten bei ca. 4 °C im Kühlschrank.

Langzeitlagerung der Bakterienstämme wurde durch Glycerin-Stock Kulturen bei -80 °C gewährleistet. Dabei wurde eine Bakterienkolonie in 0,5 ml Nährbouillon aufgenommen, mit 0,5 ml Glycerin 85 % überschichtet und sofort eingefroren.

Anzucht der Amöben

D. discoideum Zellen wurden axenisch in 5 ml HL5-Medium bei einer Temperatur von 22,5 °C angezogen. *A. castellanii* Zellen wurden bei 30 °C in 5 ml PYG-Medium angezogen. Die Kultivierung erfolgte in 50 ml Zellkulturflaschen, wobei die Zellen zwei Mal wöchentlich

rekultiviert wurden um zu gewährleisten, dass diese eine Zelldichte von 4×10^6 Zellen pro ml nicht überschritten, da diese sie sonst zu sporulieren (*D. discoideum*) bzw. zu encystieren (*A. castellanii*) begonnen hätten.

Stammhaltung der Amöben

Zur längerfristigen Lagerung von *D. discoideum* wurden Sporen gewonnen. Dazu wurde eine Zellsuspension auf eine Dichte von ca. 1×10^8 Zellen per ml eingestellt. 200 µl dieser Suspension wurden auf Sorensen-Agar-Platten ausplattiert und bei 22,5 °C für mindestens drei Tage inkubiert. Die mit dem bloßen Auge sichtbaren Fruchtkörper, welche an ihrem Ende die Sporen tragen, wurden mit 2 ml HL5-Medium von den Agarplatten gewaschen. Die Sporen wurden bei -20 °C in HL5-Medium verwahrt.

A. castellanii Zellen wurden gemäß dem Protokoll von Axelsson-Olsson *et al.* (2009) bei 4-8 °C im Kühlschrank gelagert. Dazu wurden die Zellen wie beschrieben in Zellkulturflaschen angezogen bis eine zusammenhängende Zellschicht an der Oberfläche der Flasche zu sehen war. Die Flaschen wurden für 10 Minuten bei -20 °C gekühlt um zu bewirken, dass sich die Trophozoiten vom Boden der Flasche lösen. Anschließend wurden 1 ml Aliquots der Zellsuspension im Kühlschrank gelagert.

Anzuchtbedingungen für die spätere RNA-Isolierung

Um eine Genexpression in verschiedenen Medien nachzuweisen wurde der Stamm *S. maltophilia* SKK35 zunächst in einer Vorkultur über Nacht in LB-Medium angezogen. Die Zellsuspension wurde für 5 Minuten bei 9000 rpm abzentrifugiert, anschließend einmal mit M9-Medium gewaschen und dann im frischen Testmedium resuspendiert. So erhielt man eine ausreichend hohe Zellzahl. Nach 4 Stunden Wachstum bei 30 °C konnte die RNA der Bakterienkultur in der exponentiellen Wachstumsphase isoliert werden. Die dabei eingesetzten Medien waren: M9-Medium, M9-Medium mit 10 % FKS (fötales Kälberserum), M9 mit 0,2 µM FeSO₄, M9-Medium mit 5 % einer humanen Blutkultur, AUM (*artificial urine medium* – künstliches Urin Medium) und LB-Medium. Des Weiteren wurde die Genexpression in Co-Kultur mit Amöben untersucht. Hierzu wurden die Bakterien im Verhältnis von 1×10^5 Amöben zu 1×10^8 Bakterien pro Ansatz in 8 ml M9-Medium in

Zellkulturflaschen angezogen. Dabei wurden die Kulturen mit *A. castellanii* bei 30 °C bebrütet und die Kulturen mit *D. discoideum* bei 22,5 °C. Die Inkubationszeit betrug hier jeweils 24 Stunden.

3.1.3 Physiologische Charakterisierung der Bakterienisolate

An einer Auswahl von 51 repräsentativen *S. maltophilia* Isolaten wurden physiologische Eigenschaften von klinischer Relevanz untersucht. Dazu gehörten Biofilmbildung, Sekretion von Siderophoren, Hämolytinen und Proteasen sowie die Bestimmung von Antibiotikaresistenzen.

Aufnahme einer Wachstumskurve

Um einen Überblick über das Wachstumsverhalten der *S. maltophilia* Isolate, die für die weiteren physiologischen Tests ausgesucht wurden, zu bekommen, wurde eine Wachstumskurve aufgenommen. Die photometrische Vermessung der Kultur bei 600 nm erfolgte dabei in 96-well Mikrotiterplatten im Tecan Infinite F200 Pro Mikrotiterplatten-Lesegerät, wobei die Werte für jeden Stamm achtfach bestimmt wurden. Als Negativkontrolle diente das bloße LB-Medium. Die optische Dichte der Startkultur wurde auf 0,1 angesetzt. Die Inkubation erfolgte unter schütteln bei 30 °C über 24 Stunden, und entsprach somit den am häufigsten genutzten Bedingungen zur Anzucht von *S. maltophilia*.

Charakterisierung des Potentials zur Biofilmbildung

Eine Quantifizierung des Biofilmbildungspotentials von *S. maltophilia* wurde durch Anfärben eines 24 Stunden alten Biofilms in Polystyrol Mikrotiterplatten erreicht. Hierzu wurden *S. maltophilia* Einzelkolonien über Nacht in BHI-Medium 1:4 angezogen. Zum Einsatz im Versuch wurde die Optische Dichte bei 600 nm in BHI 1:4 auf 0,1 eingestellt und jeweils 100 µl dieser Suspension wurden in sterile 96-well Polystyrol-Mikrotiterplatten überführt. Die Platten wurden unter leichtem Schütteln bei 30 °C für 24 Stunden inkubiert. Für jeden

S. maltophilia Stamm wurde der Versuch jeweils mindestens drei Mal durchgeführt, wobei pro Versuchsdurchlauf jeder Stamm achtfach bestimmt wurde.

Nach der Bebrütung wurden die planktonischen Zellen aus den Vertiefungen der Mikrotiterplatte entfernt und in einem Verhältnis von 1:10 in BHI 1:4 verdünnt um die optische Dichte im Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 595 nm zu bestimmen.

Die noch in der Mikrotiterplatte anheftenden Biofilm-Zellen wurden mit 25 ml einer Kristallviolettlösung 0,5 % (w/v) angefärbt. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Anschließend wurde das überschüssige Kristallviolett vorsichtig mit einer Pipette entfernt und die Biofilme wurden drei Mal mit PBS-Puffer gewaschen. Das im Biofilm gebundene Kristallviolett wurde über 10 Minuten in 200 µl Ethanol abs. gelöst. Diese Lösung wurde im Verhältnis 1:10 in einer neuen Mikrotiterplatte in Ethanol abs. verdünnt und die optische Dichte bei 595 nm im Mikrotiterplatten-Lesegerät bestimmt.

Beweglichkeit durch Pili – *Twitching*

Die Beweglichkeit der verschiedenen *S. maltophilia* Stämme durch Pili lässt sich durch Kriechbewegungen, das sog. „*Twitching*“ im Zwischenraum der Petrischale und einer Agarschicht beobachten. Die *Twitching*-Agarplatten, bestehend aus 1 % TSB und 1 % Agar (w/v) per Liter H₂O, wurden sehr dünn gegossen. Als Vorkultur wurde ein Vereinzlungsausstrich des zu testenden *S. maltophilia* Stammes hergestellt. Davon wurde eine 24 Stunden alte Einzelkolonie mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze entnommen und durch den *Twitching*-Agar bis zum Boden der Petrischale gestochen. Nach 24 Stunden Inkubationszeit bei 30 °C wurde der Agar vorsichtig entfernt. Der Boden der Petrischale wurde mit einer Kristallviolett-Lösung 0,1 % (w/v) angefärbt um die *Twitching*-Zone sichtbar zu machen. Die Kristallviolett-Lösung wurde nach 15 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur durch dreimaliges Spülen mit deionisiertem Wasser entfernt. Der Durchmesser der angefärbten zirkulären trüben Zone wurde als Maß für die Beweglichkeit durch *Twitching* bestimmt (Di Bonaventura *et al.*, 2007).

Beweglichkeit durch Flagellen – Schwimmen

Durch Flagellen erzeugte Bewegung von Bakterien lässt sich auf einem sog. Schwimm-Agar nachweisen. Da diese Platten durch ihren nur geringen Agar-Anteil sehr flüssig sind, können sich Bakterienkolonien auf der Oberfläche sozusagen schwimmend ausbreiten. Der Durchmesser dieser Schwimm-Zone wurde als Maß für die Beweglichkeit bestimmt. Die Schwimm-Platten, bestehend aus 1 % Trypton, 0,5 % NaCl und 0,3 % Agar (w/v) per Liter, wurden mit der Pipette auf ein genaues Volumen von 25 ml gegossen, unter der Sterilwerkbank für 15 Minuten offen getrocknet und im Anschluss sofort verwendet. Dabei wurde eine Einzelkolonie eines 24 Stunden alten Vereinzlungsausstrichs verwendet um die neue Platte zu beimpfen. Die Kolonie wurde mit einer sterilen Pipettenspitze auf die Oberfläche des Schwimm-Agars überführt. Die Platten wurden mit dem Deckel zur Oberseite für 24 Stunden bei 30 °C inkubiert. Danach wurde der Durchmesser der Zone in der die Bakterien schwimmen konnten dokumentiert. Als Referenz wurde zusätzlich immer der *S. maltophilia* Stamm K279a mit dem zu testenden Stamm auf die Platte aufgebracht (Di Bonaventura *et al.*, 2007).

Sekretion von Siderophoren

Um die Produktion von Siderophoren durch Bakterien nachzuweisen wurden CAS (Chromazurol S)-Agarplatten verwendet. Der hierbei benutzte Indikator ist ein blau gefärbter Komplex aus Chromazurol S, Eisen(III) und CTAB. Liegen Siderophore vor, lösen diese das Eisen(III) aus dem Komplex, was mit einer Farbänderung einhergeht. Die Zusammensetzung des Agars ist von der Methode von Schwyn *et al.* (1987) abgeleitet. Für 1 l Agar wurden 60,5 mg CAS in 50 ml H₂O und 10 ml Fe(III)-Lösung (1 mM FeCl₃, 10 mM HCl) mit 72,9 mg CTAB in 40 ml H₂O unter Rühren vermischt, wobei eine tiefblaue Lösung entsteht. Einzeln autoklaviert wurde zunächst eine Mischung aus 30,24 g Pipes, 100 ml 10x MM9 Salzen, und 15 g Agar. Mit NaOH wurde der pH-Wert auf 6,8 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurden 10 ml einer 20 %igen Glucose-Lösung und 30 ml einer 10 %igen Lösung Caseinhydrolysat (beides sterilfiltriert) hinzugegeben.

Da *S. maltophilia* auf diesen Platten nur geringes Wachstum zeigte, wurde als Grundlage für den Agar ein Nähragar (5 g Pepton, 3 g Fleischextrakt, 15 g Agar) verwendet und nach dem autoklavieren mit der separat autoklavierten blauen Indikatorlösung vermischt. Auf die CAS-

Agarplatten wurden verschiedene *S. maltophilia* Stämme ausgestrichen und ca. 48 Stunden bei 30 °C bebrütet.

Sekretion von Hämolytinen

Um die verschiedenen *S. maltophilia* Isolate auf die Sekretion von Hämolytinen hin zu untersuchen, wurden Einzelkolonien der zu testenden Stämme auf Blut-Agar (mit 65 ml/l Hammelblut) ausgestrichen. Nach 24, 48, 72, und 96 Stunden Inkubation bei 30 °C wurden die Platten auf die Bildung einer klaren Hämolyse-Zone um die Bakterien herum untersucht.

Sekretion von Proteasen

Zur Ermittlung der Protease Aktivität von *S. maltophilia* wurden die zu testenden Bakterienstämme zunächst als Flüssigkultur in Müller-Hinton-Bouillon über Nacht angezogen. Das verwendete Testmedium war Müller-Hinton-Agar, der mit 30 g Magermilchpulver pro 1 l Agar angereichert wurde. Der Agar und die Magermilch-Lösung wurden getrennt voneinander für 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Die Vorkultur wurde für 20 Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert und 1 µl des Überstands wurden auf die Magermilch-Agar Platte pipettiert. Nach kurzem Antrocknen der Platte unter der Sterilwerkbank wurde die Platte bei 30 °C inkubiert. Die Bildung einer Hydrolyse-Zone um die Bakterien herum wurde nach 72 Stunden dokumentiert.

Bestimmung der Antibiotikaresistenz - Plattendiffusions-Test

Als Vorversuch, zur Auswahl der Antibiotika bei denen die MHK (minimale Hemmkonzentration) ermittelt werden sollte, wurde für 41 zufällig ausgewählte *S. maltophilia* Stämme ein Antibioogramm mittels Plattendiffusionstest erstellt. Hierzu wurden die Teststämme, nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei 30 °C in Nährbouillon, auf Müller-Hinton Agar ausplattiert. Auf diese Platten wurden jeweils mit verschiedenen Antibiotika versetzte Filterplättchen (BD Sensi-disc) gelegt. Die Platten wurden eine weitere Stunde bei Raumtemperatur und anschließend bei 30 °C bebrütet. Nach 24 Stunden ließen

sich um einige der Antibiotikaplättchen Hemmhöfe erkennen, deren Durchmesser (in mm) gemessen wurde. Die eingesetzten Antibiotika waren: Penicillin 10 µg, Ampicillin 5 µg, Kanamycin 30 µg, Neomycin 30 µg, Chloramphenicol 30 µg, Gentamicin 10 µg, Ofloxacin 5 µg, Norfloxacin 10 µg, Triple-Sulfa 0,25 µg, Trimethoprim/Sulfamethoxazol 23,75/1,25 µg, Vancomycin 30 µg, Tetracyclin 30 µg, Ciprofloxacin 5 µg, Erythromycin 15 µg und Novobiocin 30 µg. Wenn sich um ein Antibiotikaplättchen herum ein klarer Hemmhof, ohne Wachstum von Bakterien, erkennen ließ, wurde der Stamm als sensibel eingestuft. Wenn ein Hemmhof mit vermindertem Bakterienwachstum erkennbar war wurde eine intermediäre Resistenz angenommen. Wenn sich kein Hemmhof erkennen ließ, wurde der Stamm als resistent eingestuft.

Bestimmung der Antibiotikaresistenz - Mikrobouillon-Verdünnung

Fünf Antibiotika, die im Plattendiffusions-Test Unterschiede in der Resistenz/Sensibilität bei den verschiedenen *S. maltophilia* Stämmen aufwiesen, wurden für die Bestimmung der MHK ausgewählt. Diese waren: Vancomycin, Norfloxacin, Gentamicin, Tetracyclin und Co-Trimoxazol (Trimethoprim/Sulfamethoxazol). Es wurden jeweils Verdünnungsreihen im Verhältnis 1:1 mit Müller-Hinton Bouillon II gemäß den Vorgaben des CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) angelegt. Die Antibiotika-Verdünnungen wurden in einer 96well-Mikrotiterplatte vorgelegt und so gewählt, dass nach Zugabe von 100 µl der Bakteriensuspension eine Antibiotika-Endkonzentration von 512 µg/ml, 256 µg/ml, 128 µg/ml, usw. bis hin zu 0,25 µg/ml und 0,125 µg/ml erreicht wurde. Im Fall der Antibiotika-Kombination Co-Trimoxazol wurde Trimethoprim im Verhältnis 1:20 mit Sulfamethoxazol angesetzt, so dass die niedrigste eingesetzte Konzentration 0,125 µg/ml Trimethoprim mit 2,375 µg/ml Sulfamethoxazol war. Als Positivkontrolle für das Wachstum der Bakterien ohne Antibiotika wurde jeweils eine Kavität nur mit 100 µl Medium beschickt. Eine Flüssigkultur der zu testenden *S. maltophilia* Isolate wurde in Müller-Hinton-Bouillon II über Nacht angezogen. Diese wurde im Verhältnis 1:5 verdünnt um eine Endkonzentration von ca. 5×10^4 Zellen per ml zu erhalten. Die notwendige Verdünnungsstufe wurde durch Vorversuche ermittelt. Die tatsächliche Zellzahl wurde durch anschließendes Ausplattieren und Auszählen der Kolonien bestätigt. 100 µl der Bakteriensuspension wurden zu den Antibiotika in die Mikrotiterplatte gegeben. Die Platten wurden für 18 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die MHK wurde dokumentiert als diejenige Konzentration, bei der mit dem bloßen

Auge kein Wachstum der Bakterien mehr erkennbar war. Als Kontrollstämmen wurden immer *E. coli* ATTC 25922, *S. aureus* ATTC 25923 und *P. aeruginosa* ATTC 27853 mitgeführt.

Die durch das NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) festgelegten Grenzwerte zur Einschätzung von Resistenz und Sensibilität variieren, abhängig von der Bakterienspezies und dem getesteten Antibiotikum. Grenzwerte für die Resistenz und Sensibilität von *P. aeruginosa* liegen z.B. zwischen 1-64 µg/ml (sensibel) und 2-128 µg/ml (resistent), abhängig vom getesteten Antibiotikum (Hanberger *et al.*, 1999). Zur vereinfachten Interpretation wurden für die untersuchten *S. maltophilia* Isolate folgende Grenzwerte festgelegt: resistent ≥ 64 µg/ml, intermediär 31-8 µg/ml und sensibel ≤ 4 µg/ml.

3.1.4 Virulenztests am Amöbenmodell

Um das Virulenzpotential der verschiedenen *S. maltophilia* Stämme zu ermitteln wurde ein Plattentest mit Amöben als Wirtsorganismen, abgewandelt nach Pukatzi *et al.* (2002), durchgeführt. Dazu wurden die beiden Bodenamöben *D. discoideum* und *A. castellanii* eingesetzt. Bakterien und Amöben wurden in Co-Kultur auf Agarplatten angezogen, wobei jeweils 5 µl PBS-Puffer mit einer definierten Anzahl an Amöben als Tropfen auf einen Bakterienrasen überführt wurden.

Der zu testende Bakterienstamm wurde zunächst als Übernachtskultur in LB-Medium bei 30 °C inkubiert. Um eine vergleichbare Bakteriendichte als Ausgangsgröße zu erhalten wurde die optische Dichte der Kultur bei 600 nm auf 1,6 bis 1,8 eingestellt. Jeweils 1 ml dieser Suspension wurde auf einer M9-Agar Platte ausplattiert. Im Anschluss wurden die Platten für 3 Stunden offen unter der Sterilwerkbank getrocknet.

Die Amöben wurden wie in 3.1.2 beschrieben angezogen. Abgesehen vom Anzuchtmedium, der Wachstumstemperatur und der Inkubationsdauer unterschied sich die Behandlung der beiden Amöben nicht. Die Zellen wurden einmal mit PBS-Puffer gewaschen, jeweils bei 1.600 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert und anschließend in PBS-Puffer resuspendiert. Damit sich die Amöben gut von der Oberfläche lösen ließen, wurden sie während der gesamten Durchführungszeit auf Eis gelagert. Eine Ausgangszellzahl von ca. 2.000.000 Amöben per ml wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer eingestellt, um eine Zellzahl von ca. 10.000 Amöben pro 5 µl zu erhalten. Diese wurde in 11 weiteren Verdünnungsschritten im Verhältnis 1:1 verdünnt, so dass die finale Konzentration der Amöben pro 5 µl Tropfen, die auf den Bakterienrasen aufgebracht wurde, etwa 10.000, 5.000, 2.500, 1.250, 625, 312,

156, 78, 39, 19, 9 und 5 Amöben entsprach. Nach kurzem Antrocknen wurden die Platten mit *A. castellanii* bei 30 °C für 3 Tage inkubiert, und die mit *D. discoideum* bei 22,5 °C für 5 Tage inkubiert. Als Maß für die Virulenz der Bakterien wurde jeweils dokumentiert bei welcher Amöbenkonzentration deutlich sichtbare Plaquebildung zu erkennen war. Pro Bakterienstamm wurde jeder Versuch mindestens als Dreifachbestimmung mit *D. discoideum* und als Dreifachbestimmung mit *A. castellanii* durchgeführt. Bei jedem Versuchsansatz wurden jeweils *Pseudomonas aeruginosa* PA14 als Negativkontrolle und *Klebsiella aerogenes* DSM 2026 als Positivkontrolle für das Wachstum der Amöben getestet.

3.2 Molekularbiologische Methoden

Die hier aufgeführten molekularbiologischen Methoden umfassen die Isolierung von DNA und RNA, Protokolle für PCR-Reaktionen, reverse Transkription und Sequenzierung nach dem Sanger-Prinzip.

3.2.1 Zellaufschluss, RNA- und DNA-Isolierung

Hitzenaturierte Zellextrakte

Bakterielle Biomasse, die von frisch bewachsenen Agarplatten geerntet wurde, wurde zweimal mit 0,85 % KCl gewaschen, bei 13.000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert und in PCR-Wasser resuspendiert. Die wässrige Zellsuspension wurde für 10 Minuten bei 95 °C erhitzt um die Bakterien zu lysieren. Durch erneute Zentrifugation wurden die Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand wurde als Template in PCR-Reaktionen eingesetzt. Die Lagerung der Template DNA erfolgte bis zu 4 Monate bei -20 °C.

Phenol-Chloroform Extraktion

Die frisch geerntete bakterielle Biomasse aus dem oben beschriebenen Ansatz wurde in 0,85 % KCl suspendiert. Durch Zentrifugation, bei 13.000 rpm für 5 Minuten, wurde die Zellsuspension einmal gewaschen und in 380 µl TE Puffer resuspendiert. Zu dieser

Zellsuspension wurden 20 µl 10 % SDS zugegeben und die Probe wurde für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Lösung mit 70 µl 5 M NaCl und 60 µl 10 % CTAB/0,7 M NaCl versetzt und für weitere 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Die Extraktion der DNA erfolgte in 3 Schritten, mit (i) je 1 Volumen Chloroform, (ii) 1 Volumen Phenol-Chloroform 1:1 und (iii) wiederum 1 Volumen Chloroform. Die Trennung der Phasen erfolgte durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für jeweils 5 Minuten, wobei für die aufeinanderfolgenden Extraktionsschritte jeweils die nach der Zentrifugation entstandene obere Phase verwendet wurde. Im abschließenden Schritt wurde die isolierte DNA mit 0,6 Vol. Isopropanol gefällt und mit 70 % Ethanol gewaschen.

DNA-Extraktion mit kommerziell erhältlichen Kits (QIAGEN)

Die Isolierung von DNA für die Genomsequenzierung erfolgte mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit der Fa. QIAGEN. Dazu wurde jeweils eine Übernachtskultur von *S. maltophilia* SKK35 und RA8 in LB-Medium bei 30 °C angezogen. 2 ml der Kultur wurden abzentrifugiert und das Pellet wurde zur DNA Isolierung verwendet. Um die Zellen zu lysieren wurde das Zellpellet mit 180 µl Puffer ATL und 20 µl Proteinase K bei 56 °C für 3 Stunden inkubiert. Für eine RNA freie DNA-Probe wurde die Lösung mit 4 µl RNase A (100 mg/ml) für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 200 µl AL Puffer versetzt und bei 70 °C für 10 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol abs. wurde die QIAamp Spin Säule mit dem Lysat beladen und für 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde dabei verworfen. Zum Waschen wurden je 500 µl Puffer AW1 im ersten und Puffer AW2 im zweiten Schritt auf die Säule gegeben und abzentrifugiert. Die DNA-Elution erfolgte in zwei weiteren Schritten, wobei jeweils 25 µl Puffer AE auf die Säule gegeben und nach 5 Minuten Inkubation abzentrifugiert wurde.

Ethanolpräzipitation der isolierten DNA

Die isolierte bzw. aufzureinigende DNA wurde, bezogen auf ein Volumen von 10 µl, mit 2 µl 3M Natriumacetat, 50 µl Ethanol abs. und 10 µl ddH₂O versetzt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugation bei 13.000 x g für 20 Minuten wurde die DNA pelletiert, nach vorsichtigem Abnehmen des

Überstands wurde dieser verworfen und das Pellet wurde mit einer 70 %igen Ethanol-Lösung gewaschen. Nach Zentrifugation bei 13.000 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde wiederum der Überstand verworfen während das Pellet bei geöffnetem Reaktionsgefäß für ca. 30 Minuten unter der Sterilwerkbank getrocknet wurde um die Ethanolreste zu entfernen. Anschließend wurde das Pellet im gewünschten Volumen ddH₂O bzw. TE-Puffer aufgenommen.

RNA-Isolierung mittels RNeasy Kit (QIAGEN)

Da RNA durch die ubiquitär verbreiteten Ribonukleasen (RNasen) sehr leicht abbaubar ist, mussten Vorkehrungsmaßnahmen getroffen werden, um ein RNase-freies Arbeitsmilieu zu schaffen. Dazu gehörte die Verwendung RNase freier Reaktionslösungen und Verbrauchsmaterialien, sowie die Reinigung wiederverwendbarer Gefäße mit 0,5 %iger SDS-(Natriumdodecylsulfat)-Lösung.

Zur RNA Extraktion wurde der RNeasy Kit der Fa. QIAGEN verwendet. Die RNA wurde aus Bakterienkulturen in Flüssigmedium in ihrer exponentiellen Wachstumsphase isoliert. Zur Stabilisierung der RNA wurde 1 ml der Bakterienkultur mit 2 ml RNA-Protect Lösung (QIAGEN) vermischt. RNA-Protect beinhaltet Tetradecyl-trimethyl-ammoniumoxalat, welches Nukleasen und die Gen-Transkription inhibiert. Die Suspension wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde sie bei 10.000 x g für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, verworfen und das Bakterien-Pellet für die weiteren Arbeitsschritte verwendet.

Der Zellaufschluss der gramnegativen Bakterienzellen erfolgte mittels einer Lysozym-Lösung (400 µg/ml Lysozym in TE-Puffer). Das Pellet wurde in 100 µl der Lysozymlösung resuspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Zu dem Zellaufschluss wurden 350 µl RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol (10 µl β-ME/ml RLT-Puffer) hinzugefügt. Der Puffer enthält das chaotrope Salz Guanidinisothiocyanat, welches Wasserstoff-brückenbindungen spaltet und somit einen denaturierenden Effekt hat, der die zellulären RNasen inaktiviert. β-Mercaptoethanol hat ebenfalls inhibierende Wirkung auf RNasen, durch Inaktivierung der proteinstabilisierenden Disulfidbrücken. Dieser Ansatz wurde mit 250 µl Ethanol (99 %) versetzt und auf die Spin-Säule gegeben. Die selektiven Adsorptionseigenschaften der Silicagel-Membran der Spin-Säule ermöglichen die Extraktion von RNA-Molekülen, die länger als 200 Nukleotide sind.

RNA-freie DNase wurde eingesetzt um die Probe von DNA aufzureinigen. Pro Ansatz wurden 10 µl einer DNase Stammlösung in 70 µl RDD-Puffer (QIAGEN) verwendet. Die Inkubation erfolgte für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Der Extrakt wurde mit jeweils 350 µl Puffer RW1 (15 s bei 10.000 rpm), und zweimal mit 500 µl RPE-Puffer (15 s und 2 min bei 10.000 rpm) gewaschen. Anschließend wurde die RNA in zwei Schritten in 50 µl RNase freiem Wasser eluiert. Die RNA wurde jeweils für 5 Min gelöst und für 15 s bei 10.000 rpm abzentrifugiert. Die Lagerung der RNA bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -80°C.

Optische Vermessung von DNA und RNA

Die optische Vermessung der extrahierten RNA bzw. DNA erfolgte mittels des NanoDrop-Photometers (Peqlab). Die Vermessung beruht darauf, dass RNA und DNA ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm haben. Eine optische Dichte von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml bzw. einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes berechnet sich aus der Extinktion bei 260 nm die RNA- bzw. DNA-Konzentration gemäß der Formel 3.1.

(3.1)

$$E_{260} \cdot 40 \cdot \text{Verdünnungsfaktor} = \text{RNA}[\mu\text{g/ml}]$$

$$E_{260} \cdot 50 \cdot \text{Verdünnungsfaktor} = \text{DNA}[\mu\text{g/ml}]$$

Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei 280 nm, daher wird auch immer die Extinktion bei 280 nm bestimmt. Liegt der Quotient der Messergebnisse OD_{260}/OD_{280} zwischen 1,8 und 2,2 handelt es sich um besonders reine DNA bzw. RNA. Ist der Quotient unter 1,6 sollte eine weitere Aufreinigung in Erwägung gezogen werden.

Reverse Transkription

Die Reverse Transkription (RT), d.h. das Umschreiben der isolierten RNA in komplementäre DNA (cDNA) wird mit Hilfe des aus Retroviren gewonnenen Enzyms Reverse Transkriptase durchgeführt. Die Reverse Transkriptase besitzt außerdem Exoribonuclease-Aktivität, d.h. sie baut die RNA ab, die mit der DNA hybridisiert ist, nicht aber die einzelsträngige RNA. So entsteht einzelsträngige cDNA, die durch die Reverse Transkriptase in doppelsträngige cDNA vervollständigt wird.

Mit Hilfe des NanoDrop Photometers wurde die RNA-Konzentration jeder Probe bestimmt. Pro 25 µl RT-Ansatz wurden, wenn möglich 1000 ng RNA eingesetzt. Nach Zugabe der individuell errechneten Menge RNA wurde der Ansatz mit RNase freiem Wasser auf ein Volumen von 25 µl aufgefüllt. Die Reverse Transkriptionsreaktion erfolgte im Thermocycler unter den in Tabelle 7 dargestellten Bedingungen.

Tab. 7: Temperaturprogramm der Reversen-Transkription.

Reagenz (Applied Biosystems)	Menge pro 25 µl
10 x RT Puffer	2,5 µl
MgCl ₂	5,5 µl
dNTP	5 µl
Random-Hexamer Primer (2,5mM)	1,25 µl
RNase Inhibitor	0,5 µl
MultiScribe	0,63 µl
Ziel-RNA	1000 ng

	Zeitdauer (Min)	Temperatur (°C)
1	10	25
2	30	48
3	5	95
4	∞	4

3.2.2 Polymerasekettenreaktionen

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient zur *in vitro* Amplifikation einer Ziel-DNA. Dabei wird zunächst die doppelsträngige Template-DNA bei einer hohen Temperatur denaturiert. Ein anschließendes Senken der Temperatur ermöglicht das *Annealing*: ein Oligonukleotidprimer kann an die Template-DNA binden. Dann wird die Temperatur wieder auf das Temperaturoptimum der eingesetzten DNA-Polymerase erhöht, so dass diese an das 3'-Ende des Primers binden und den DNA-Strang in 5' → 3' Richtung verlängern kann. Mit Hilfe eines Thermocyclers und einer thermostabilen DNA-Polymerase ist es möglich mehrere dieser Zyklen hintereinander zu reihen, wodurch es zu einer exponentiellen Anreicherung der Ziel-DNA kommt. Die Sequenzen der eingesetzten Primer sind in Kapitel 2.5 in Tabelle 6 aufgeführt.

PCR Nachweis von *S. maltophilia*

Der Nachweis für *S. maltophilia* erfolgte durch PCR-Amplifikation der 16S-23S intergenischen Region. Die dabei eingesetzten Primer banden an Sequenzabschnitte der Region, die spezifisch für *S. maltophilia* ist. Bei den isolierten Reinkulturen wurden mittels Hitzedenaturierung (siehe 3.2.1.) die Zellen aufgeschlossen und die Extrakte wurden direkt als Template in der PCR-Reaktion eingesetzt. Der Primer SM1f, der an der 441 Position des 16S rRNA Gens bindet, und der Primer SM4, der an Position 594 des 23S rRNA Gens bindet, wurden dabei eingesetzt. Tabelle 8 zeigt die bei der PCR Reaktion benutzten Bedingungen und Konzentrationen der einzelnen Agenzien.

Tab. 8: PCR-Bedingungen SM1f/SM4.

Reagenz	Menge pro 25 µl	Zeitdauer (Min)	Temperatur (°C)
10x Puffer (Fermentas)	2,5 µl	1. 5	95
MgCl ₂ (Fermentas)	2,5 mM	2. 0,5*	95 *
dNTP (Fermentas)	0,2 mM	3. 1*	55 *
Primer (UP-1)	0,2 µM	4. 2*	72*
Primer (UP-2)	0,2 µM	5. 5	72
Taq-Polymerase (Fermentas)	0,5 U	6. ∞	4
Ziel-DNA	1 µL		

* Die Schritte 2.-4. werden in 35 Zyklen wiederholt

Zusätzlich wurden alle neu gewonnenen Isolate auf ihre Zugehörigkeit zur 16S rRNA Subgruppe E2 hin untersucht. Das hierzu verwendete neu entwickelte Primersystem beinhaltet die Primer SMgroupE2-for und SMgroupE2-rev. Die genauen Bedingungen der PCR sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tab. 9: PCR-Bedingungen SMgroupE2.

Reagenz	Menge pro 25 µl	Zeitdauer (Min)	Temperatur (°C)
10x Puffer (Fermentas)	2,5 µl	1. 5	95
MgCl ₂ (Fermentas)	2,5 mM	2. 0,5*	95 *
dNTP (Fermentas)	0,2 mM	3. 0,5*	52 *
Primer (SMgroupE2-for)	0,2 µM	4. 0,5*	72*
Primer (SMgroupE2-rev)	0,2 µM	5. 5	72
Taq-Polymerase (Fermentas)	0,5 U	6. ∞	4
Ziel-DNA	1 µL		

* Die Schritte 2.-4. werden in 30 Zyklen wiederholt

Rep-PCR

Im gesamten Bakteriengenom verteilt findet man Sequenzen, die sich häufig wiederholen. Durch Binden eines spezifischen Primers an diese repetitiven Sequenzen werden verschieden lange DNA-Fragmente amplifiziert. Da diese, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, spezifische Bandenmuster entsprechend der Bakterienstämme aufweisen, lassen sich mit dieser Methode genetische Ähnlichkeiten charakterisieren und vergleichen. Die rep-PCR Analysen wurden jeweils mit den Primern BoxA1 oder (GTG)₅ gemäß den Vorgaben von Versalovic *et al.* (1994) durchgeführt. Das verwendete Protokoll ist in Tabelle 10 dargestellt. Die Reaktion unterscheidet sich von den Standard PCR-Reaktionen darin, dass nur ein Vorwärts-Primer eingesetzt wurde. Die Konzentrationen für Primer, dNTPs und Polymerase waren höher und die Elongation erfolgte bei geringerer Temperatur, über eine vergleichsweise längere Zeit.

Tab. 10: PCR-Bedingungen rep-PCR.

Reagenz	Menge pro 25 µl	Zeitdauer (Min)	Temperatur (°C)
10 x Puffer (Fermentas)	2,5 µl	1.	10
MgCl ₂ (Fermentas)	5 mM	2.	0,75*
dNTP (PegLabGold)	1 mM	3.	1,5*
DMSO	2,5 µl	4.	8*
Primer (BoxA1R oder (GTG) ₅)	5 µM	5.	16
Taq-Polymerase (Fermentas)	1 U	6.	∞
Ziel-DNA	1 µL		4

* Die Schritte 2.-4. werden in 25 Zyklen wiederholt

PCR-Amplifikation des *housekeeping*-Gens *gyrB*

Teile der Sequenz des *gyrB* Gens (ca. 1200 bp), eines *housekeeping* Gens welches für das Enzym DNA-Gyrase codiert, wurden mittels PCR amplifiziert um abschließend sequenziert werden zu können. Dabei wurde zunächst das universelle Primerpaar UP-1/UP-2r wie bei Yamamoto und Harayama, (1995) beschrieben eingesetzt. In einer zweiten PCR-Amplifikation, bei der das PCR-Produkt der ersten Reaktion als Template-DNA genutzt wurde, wurden die Primer UP-1S/UP-2S eingesetzt. Mit der modifizierten Sanger-Methode (vgl. Kapitel 3.3), mit UP-1S als Sequenzier-Primer, konnten 500-700 bp Fragmente vom 5'-Ende aus sequenziert werden. Die Zusammensetzung des PCR-Reaktionsmix und das Temperaturprogramm für die beiden PCR-Amplifikationen sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tab. 11: Bedingungen der *gyrB*-Gen Amplifikation in zwei PCR-Schritten.

Reagenz	Menge pro 25 µl		Zeitdauer (Min)	Temperatur (°C)
10 x Puffer (Fermentas)	2,5 µl	1.	5	95
MgCl ₂ (Fermentas)	2,5 mM	2.	1*	95 *
dNTP (Fermentas)	0,25 mM	3.	1*	60 [UP-1/UP-2] 63 [UP-1S/UP-2S]*
(DMSO nur bei UP-1/UP-2)	(2,5 µl)	4.	2*	72*
Primer (UP-1 bzw. UP-1S)	0,25 µM	5.	5	72
Primer (UP21 bzw. UP-2S)	0,25 µM	6.	∞	4
Taq-Polymerase	0,5 U			
Ziel-DNA	1 µL			

* Die Schritte 2.-4. werden in 30 Zyklen mit den Primern

PCR-Amplifikation der potentiellen Virulenzgene *frpA*, *frpC* und des *hcp*-Gens des Typ6-Sekretionssystems

Durch die Genomsequenzierung von *S. maltophilia* konnten einige Gene identifiziert werden, die Kandidaten für neue Virulenzgene sind. Die *frpA* und *frpC* Gene codieren für Proteine der RTX-Familie, das *hcp*-Gen bildet ein kanalförmiges-Protein aus, das essentiell für ein funktionsfähiges Typ-6-Sekretionssystem ist. Die Primerpaare *frpA_forw/frpA_rev* und *frpC_forw/ frpC_rev* wurden zum PCR-Nachweis der jeweiligen Zielgene der RTX-Proteine eingesetzt. Das Primerpaar *hcp1_forw/hcp1_rev* diente zum Nachweis des Typ-6-Sekretionssystems. Die Primersysteme wurden sowohl für ein Screening der *S. maltophilia* Stammsammlung, als auch für den Nachweis der Genexpression durch Amplifikation von cDNA verwendet.

Da die Sequenzen für die Gene *frpA* und *frpC* noch unbekannte Teilsequenzen enthielten, wurden Primer entwickelt, die vor und hinter den unbekannt Zielsequenzen binden, um die diese Lücken durch Sanger-Sequenzierung schließen zu können. Um zwei Lücken im *frpA*-Gen zu schließen wurden die Primerpaare *frpA_gap1_forw/frpA_gap1_rev* und *frpA_gap2_forw/frpA_gap2_rev* eingesetzt. Bei *frpC* lag ein unbekannter Sequenzabschnitt vor, dieser wurde durch das Primerpaar *frpC_gap1_for/frpC_gap1_rev* amplifiziert.

Die Sequenzen aller Oligonukleotid-Primer sind der Tabelle 6 in Kapitel 2.5 zu entnehmen. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze, sowie das Temperaturprogramm sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tab. 12: Bedingungen der *gyrB*-Gen Amplifikation in zwei PCR-Schritten.

Reagenz	Menge pro 25 µl Ansatz		Zeitdauer (Min)	Temperatur (°C)
10 x Puffer (Peqlab)	2,5 µl	1.	0,5	95
dNTP (Peqlab)	0,25 mM	2.	0,5*	95 *
Primer (forw)	0,75 µM	3.	1*	55 [fipA, hcp] 50 [fipC]*
Primer (rev)	0,75 µM	4.	2*	72*
Taq-Polymerase	0,5 U	5.	5	72
Template-DNA	1 µL (genomische DNA)	6.	∞	4

* Die Schritte 2.-4. werden in 35 Zyklen wiederholt

3.2.3 Gel-Elektrophorese

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Für die rep-PCR Produkte wurde dabei ein 2 %iges Agarose-Gel mit 0,5 x TBE-Puffer als Laufpuffer verwendet. Bei einer Spannung von 200 V lief die Elektrophorese für 150 Minuten für die BoxA1R-PCR und für 175 Minuten für die (GTG)₅-PCR. Für alle anderen PCR-Reaktionen wurde zur Auftrennung ein 0,8 %iges Agarosegel verwendet. Als Laufpuffer wurde 0,5 x TBE-Puffer oder 1 x TAE-Puffer benutzt. Die Sichtbarmachung der DNA-Banden erfolgte mit Ethidium-Bromid (2 µg/ml).

3.2.4 Computergestützte Datenauswertung der molekularbiologischen Versuche

Die rep-PCR Fingerprint Gel-Bilder wurden mit Hilfe der BioNumerics 5.0 Software (Applied Maths) normalisiert. An der ersten, jeder sechsten, und der letzten Position im Gel wurde eine Markerbande aufgetragen, an der die Normalisierung ausgerichtet wurde. Fragmentgrößen von 150 bp bis 2500 bp wurden für BoxA1R-Fingerprints, und von 150 bp bis 3000 bp für (GTG)₅-Fingerprints analysiert. Der Schwellenwert für ein Hintergrundrauschen wurde mittels Spektralanalyse für jedes Gel mit BioNumerics ermittelt.

Die Clusteranalyse erfolgte mittels des Pearsons Korrelations-Koeffizienten.

GyrB-Gen Sequenzdaten wurden anhand der Elektropherogramm Darstellung mittels ChromasLite manuell korrigiert. Ein Alignment der Sequenzen wurde mittels MEGA 4 und dem ClustalW-Algorithmus erstellt. Der phylogenetische Baum wurde mit dem Neighbour-Joining-Algorithmus erstellt. Bootstrapping Werte, unter Annahme von jeweils 1000 Wiederholungen, wurden ermittelt.

3.3 Gen-Sequenzierung nach modifiziertem Sanger-Prinzip

Die Sequenzierung bestimmter Gene bzw. Genabschnitte bis zu einer Länge von 500 bp erfolgte mittels des ABI Prism 310 Sequencers (Applied Biosystems) in Anlehnung an das von Sanger *et al.* (1977) begründete Prinzip. Einem PCR-Ansatz werden zusätzlich unterschiedlich fluoreszenzmarkierte ddNTPs (di-Desoxyribo-nukleotidphosphate) zugegeben, denen am 3'-C-Atom die Hydroxylgruppe fehlt. Während der PCR-Reaktion werden neben den dNTPs auch ddNTPs eingebaut, was zu einer sog. Kettenabbruchreaktion führt. Durch das Fehlen der Hydroxylgruppe kann das nächste Nukleotid nicht mehr angeknüpft werden, wodurch verschieden lange DNA-Fragmente mit 3'-terminaler Fluoreszenzmarkierung entstehen.

Mittels Kapillarelektrophorese können die Produkte unter denaturierenden Bedingungen ihrer Länge entsprechend aufgetrennt werden. Die Fluoreszenz wird mittels CCD (charge coupled device)-Kamera detektiert. Durch die Nukleotid-spezifischen Fluoreszenzsignale wird ein Elektropherogramm erstellt mit dessen Hilfe die Gen-Sequenz rekonstruiert werden kann.

Zur Entfernung der Primer wurden die PCR-Produkte durch einen ExoSAPit-Verdau enzymatisch aufgereinigt. 1,5 – 5 ng DNA wurden in 10 ml Sequenzierreaktion eingesetzt (Tab. 13). Nach der Sequenzierreaktion wurde die DNA mittels Ethanolfällung von überschüssigen ddNTPs aufgereinigt (vgl. 3.2.1).

Tab. 13: Bedingungen für die Sequenzierreaktion zur späteren Analyse auf dem ABI-Prism 310 Sequencer mit dem BigDye-Terminator Sequencing-Kit.

Reagenz	Menge pro 10 µl		Zeitdauer	Temperatur (°C)
BigDye Terminator Premix	2 µl	1.	5 Min	96
Primer	0,2 µM	2.	10 Sek*	95 *
Verdautes PCR-Produkt	1 µl	3.	5 Sek*	XX (Primerspezifisch)*
		4.	1 Min*	60*
		5.	∞	4

* Die Schritte 2.-4. werden in 25 Zyklen wiederholt

Für die elektrophoretische Auftrennung im ABI 310 Sequencer wurden 6 µl der aufgereinigten DNA mit 9 µl HiDi-Formamid gemischt und in den Sequencer geladen. Die Auftrennung erfolgte unter den in folgenden Bedingungen:

- *Modul: P4rapidSeqE.md4*
- *Injection time 10 sec*
- *Electrophoresis voltage 15 kV*
- *Collection time 20 min*
- *EP voltage 15 kV*
- *Heat plate temperature 50°C*
- *Syringe pumping time 240 sec*

Ausgewertet wurden die Sequenzen mit Hilfe der Chromas Lite Software Version 2.01 und MEGA4. Über die Datenbank NCBI wurden die ausgewerteten Sequenzen mit bekannten Sequenzen verglichen.

3.4 Genomsequenzierung: Computergestützte Datenbearbeitung und Auswertung

Während die Sanger-Sequenzierung immer noch die Methode der Wahl ist, um die Sequenzen einzelner Gene oder kurzer Genabschnitte zu erhalten, werden für die Entschlüsselung des gesamten Genoms eines Bakterium die sog. Next-Generation-Sequencing Techniken eingesetzt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde für zwei *S. maltophilia* Stämme das gesamte Genom sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte durch die Fa. Baseclear (Leiden, Niederlande) auf einer Illumina GAIIx Plattform. Zur Probenvorbereitung wurde die DNA mittels des QIAamp DNA Blood Mini Kit extrahiert. Für die Sequenzierung wurde genomische DNA, 206 ng/μl für *S. maltophilia* SKK35 und 215 ng/μl für *S. maltophilia* RA8, eingesetzt. 50 bp *paired-end reads* wurden generiert und im *.fasta sowie im *.fastq Dateiformat zur Verfügung gestellt. Die Qualität der Basen wurde mit Hilfe des Programms FastQC überprüft. Die abschließende Gen-Annotation wurde mittels der GenDB Software, in Kooperation mit der Universität Bielefeld, durchgeführt. Die Genomsequenzen werden in der Datenbank des EBI (European Bioinformatics Institute) unter der Projekt ID: 77885 für SKK35 und der ID: 77887 für RA8 veröffentlicht.

3.4.1 *De novo* Assembly

Ein *de novo* Assembly erfolgte für beide Genomsequenzen mittels der Velvet Software von Zerbino *et al.* (2008). Bei diesem Assembling-Programm wird ein de Bruijn-Graph erstellt, der basierend auf den Überlappungen der *reads* die Sequenzabfolge rekonstruiert. Die 50 bp *reads*, die ein Vielfaches der tatsächlichen Größe des Genoms widerspiegeln, werden zunächst in kürzere Fragmente, sog. *k*-mere zerlegt. Die *k*-mer Länge ist ein vom Nutzer zu wählender Parameter. Zu jedem *k*-mer wird das komplementäre *k*-mer ermittelt und aus den Überlappungen der *k*-mere um jeweils 1 Base werden sog. Noden konstruiert, in welcher die Sequenzinformationen zu einer Basenabfolge zusammengesetzt werden (Abb. 7).

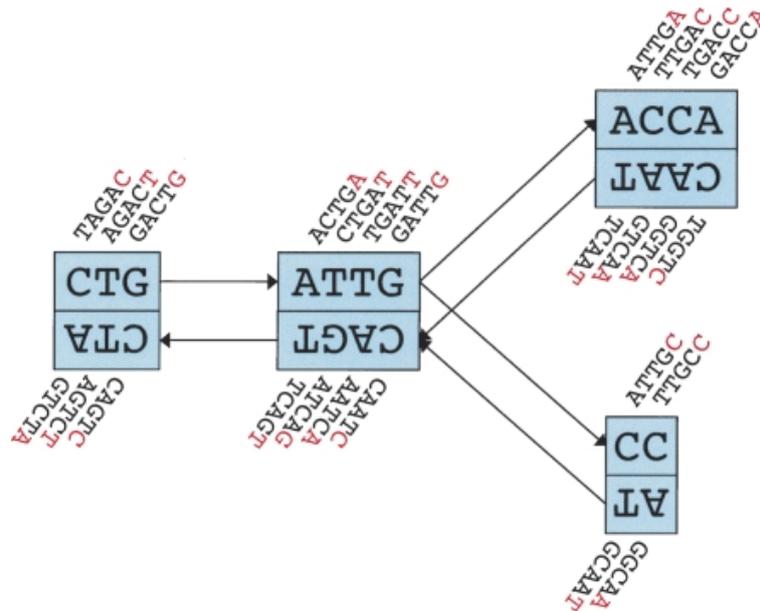


Abb. 7: Schematische Darstellung eines de Bruijn Graphs. Jede Node (im blauen Rechteck) wird aus einer Reihe überlappender k -mere (in diesem Fall, $k = 5$) gebildet. Dargestellt sind die k -mere der Node und ihre revers-komplementäre Sequenz (Quelle: Zerbino *et al.*, 2008; Nachdruck genehmigt).

Noden, für die es nur einen möglichen Pfad gibt, werden miteinander verknüpft. Diese Aneinanderreihung kann nicht immer erfolgen, da repetitive Sequenzen im Genom keine eindeutige Zuordnung der Pfade erlauben. Das Genom ist daher in sog. *contigs* untergliedert, die zusammenhängende Sequenzabschnitte darstellen, deren Zusammenhang untereinander aber nicht zu bestimmen ist. Da durch die *paired-end reads* noch eine zusätzliche Information zur Position der k -mere zueinander gegeben ist, ist es möglich, die *contigs* zu größeren Einheiten, den *scaffolds* oder *supercontigs*, zusammenzufügen. Diese beinhalten unbekannte Sequenzen, deren Länge allerdings bekannt ist. In der Gensequenz sind sie durch kurze Abschnitte mit N gekennzeichnet.

Die für den *de novo* Assembly gewählten Parameter sind in Tabelle 14 dargestellt. Es müssen das Eingangsdatenformat, der Typ der *reads*, sowie die Insert Länge angegeben werden. Die sog. „*hash length*“ stellt die Länge der k -mer Fragmente dar. Für den Assembly beider Sequenzen wurden die gleichen Parameter gewählt.

Tab. 14: Für den Velvet *de novo* Assembly gewählte Parameter.

Datenformat	Datentyp	<i>hash length</i>	<i>insert length</i>	<i>expected coverage</i>
fastq	shortPaired	39	350	auto

3.4.2 Funktionelle Gen-Annotation

Um die genetische Information in letztlich auswertbare Daten umzuwandeln, d.h. welche Gene sind vorhanden und für welche Proteine codieren sie, ist die funktionelle Gen-Annotation notwendig. Zahlreiche computerbasierte Programme zu diesem Zweck, sowohl kommerziell erhältliche als auch OpenSource Programme, befinden sich derzeit auf dem Markt. Allen gemein ist, dass sie zunächst anhand der Gensequenz ORFs (*open reading frames* = offene Leserraster) identifizieren und diese dann mit bereits annotierten DNA- bzw. Aminosäuresequenzen abgleichen. Basierend auf diesen Informationen kann dann die automatische oder manuelle Annotation erfolgen. Da eine vollständig automatische Annotation auch fehlerbehaftet sein kann, bieten viele Programme die zusätzliche Option, die automatische Annotation manuell nachzubearbeiten.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Genom-Annotationssystem ist GenDB (Meyer *et al.*, 2003). Das System ist speziell zur Annotation von Prokaryoten-Genomen vorgesehen und verknüpft die automatisch generierte Annotation mit der Möglichkeit der manuellen Nachbearbeitung. Das System umfasst mehrere Tools zur Vorhersage von Regionen (ORFs). Sequenzhomologien werden als Beobachtung durch Abgleich mit der BLAST Datenbank ermittelt. Zusätzliche Anwendungen ermöglichen das Erkennen von Motiven, Signalpeptiden, Vorhersagen von α -helicalen transmembran Regionen und weiteren Eigenschaften. Ein Schema des Annotationsprozesses ist in Abbildung 8 dargestellt. Neben den annotierten Regionen kann der Anwender noch Informationen zu metabolischen Pfaden und Zusammenhängen in Abgleich mit den KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), COG (Cluster of Orthologous Groups) und GO (Gene Ontology) Datenbanken erhalten.

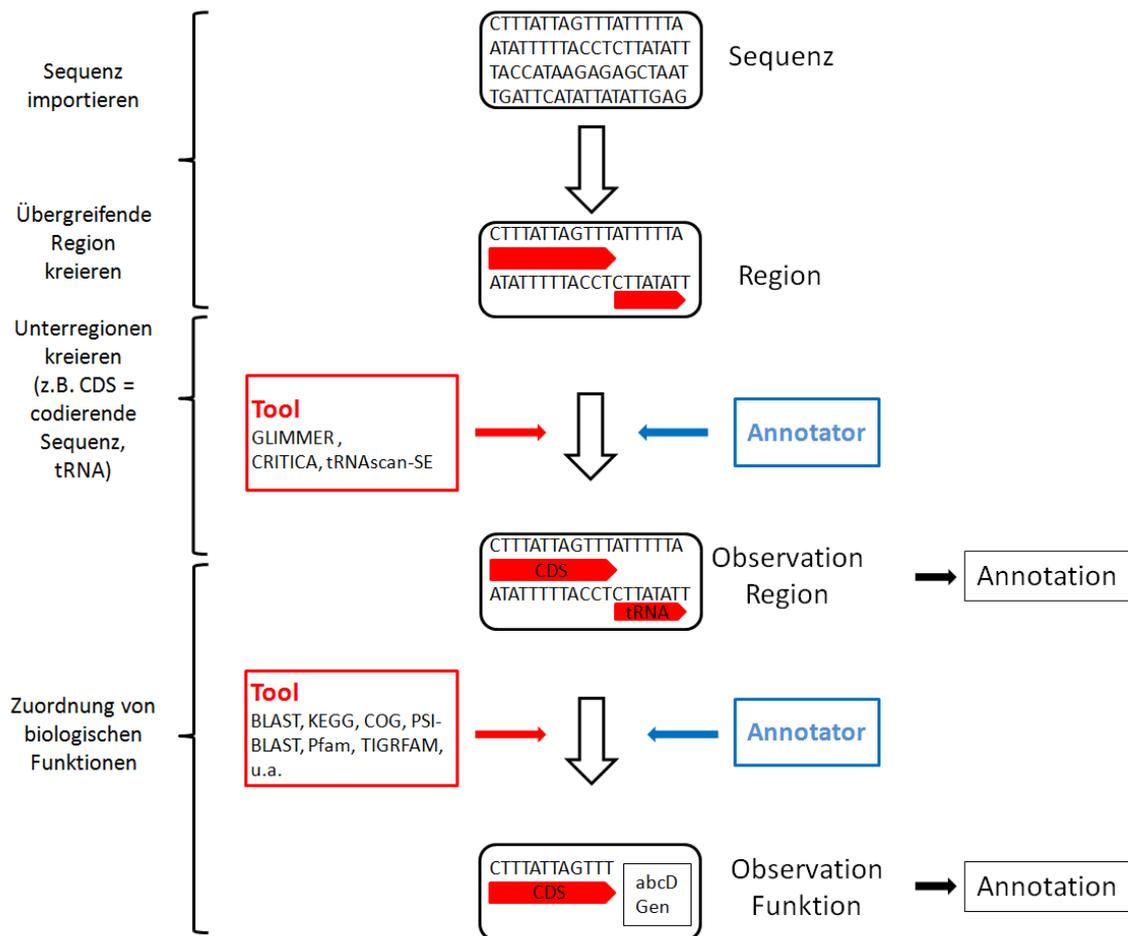


Abb. 8: Schematische Darstellung der Genom-Analyse Pipeline von GenDB. Basierend auf der Rohsequenz werden Regionen vorausgesagt die potentiell Gene darstellen. Beobachtungen durch Abgleich mit BLAST und anderen Datenbanken führen zur Vorhersage bestimmter Gene die annotiert werden können. Zusätzlich ermöglichen weitere Tools die Vorhersage von Funktionen der entsprechenden potentiellen Gene (abgewandelt nach Meyer *et al.*, 2003).

Vergleich der Genomsequenzen von *S. maltophilia*

Mit Hilfe der Mauve Genome Alignment Software ist es möglich, Alignments mehrerer Genomsequenzen zu erhalten (Darling *et al.*, 2010). Mauve ist in der Lage konservierte Regionen zu erkennen, und stellt diese als sog. lokale kollineare Blöcke (LCBs = *local collinear blocks*) visuell verschiedenfarbig dar. Dies ermöglicht es, die Sequenzabschnitte verschiedener Genome miteinander zu vergleichen, ohne die Position der Region auf dem Genom zu kennen, wie es bei Sequenzen, die unterteilt in *contigs* vorliegen, der Fall ist.

Außerdem können bei vollständig bekannter Sequenzabfolge homologe Regionen hinsichtlich einer möglichen Neuordnung der Genabfolge betrachtet werden.

Mauve benutzt eine Anker-Alignment Technik für das Genom-Alignment. Dabei werden grundlegend übereinstimmende Abschnitte, die sich in der Detailsequenz aber geringfügig unterscheiden, als sogenannte *seeds* (engl.: Samen) genutzt, um einen orthologen Anker zu bestimmen, und von dort aus das Sequenzalignment zu erweitern. Der Nutzer kann selber definieren in wie weit die Sequenzabschnitte übereinstimmen müssen oder, wie in der vorliegenden Arbeit geschehen, die automatische Voreinstellung von Mauve übernehmen. Nachdem die Ankerregionen bestimmt wurden, wird das darauffolgende Alignment mit dem ClustalW-Algorithmus für jeden LCB berechnet. Abbildung 9 zeigt das Alignment der fünf *S. maltophilia* Genomsequenzen. Unter diesen Bedingungen definierte Regionen, die keine, oder nur eine geringe Sequenzhomologie aufweisen, und dementsprechend als farblose Regionen in den LCBs zusammengefasst sind, wurden als genomische Inseln (GEIs) betrachtet.

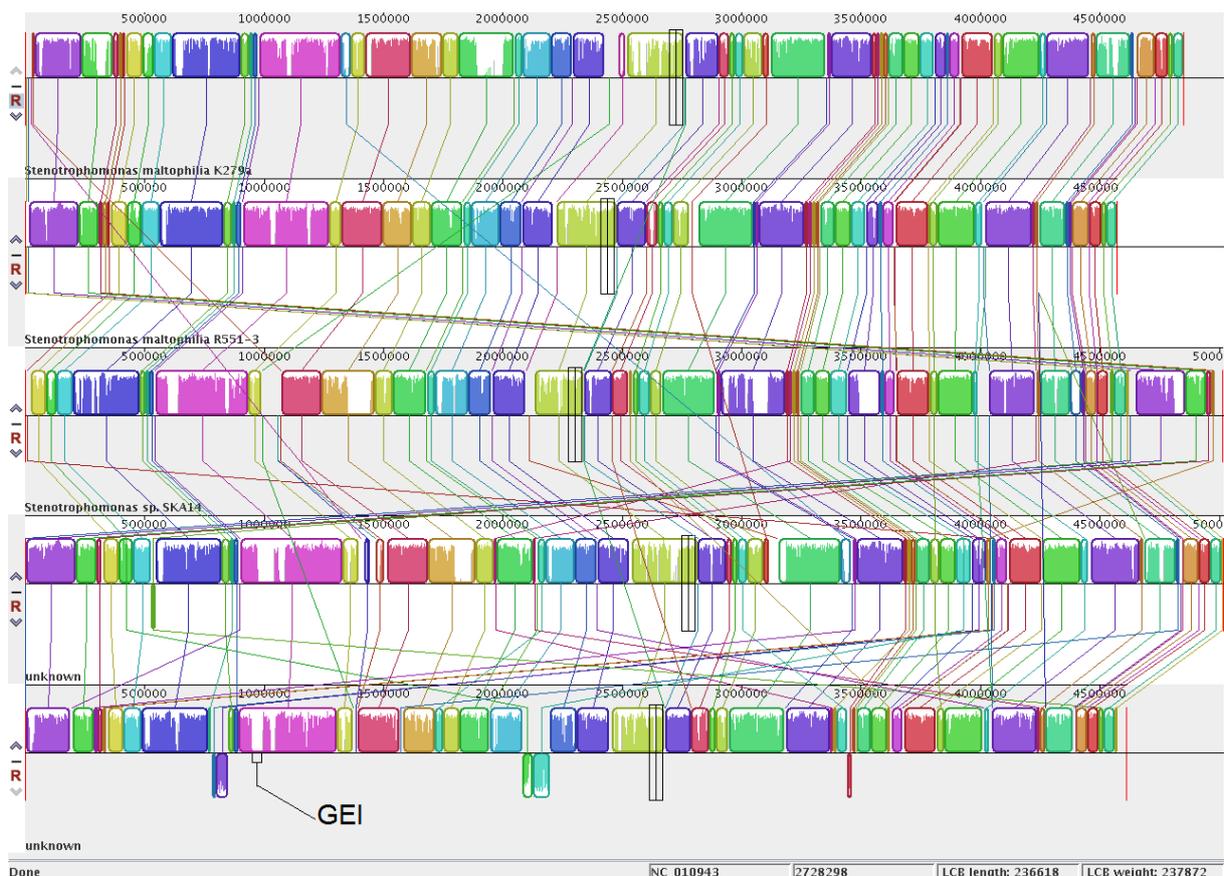


Abb. 9: Genom-Alignment mit Mauve. Dargestellt sind (von oben nach unten) *S. maltophilia* K279a, R551-3, SKA14, RA8 und SKK35. Verschiedenfarbige Blöcke stellen die sog. LCBs (*local collinear blocks*) dar, die für homologe Sequenzabschnitte stehen, die bei mindestens zwei *S. maltophilia* Stämmen vorkommen. Nicht farblich markierte Regionen bilden genomische Inseln (GEIs) die nur bei dem jeweiligen *S. maltophilia* Stamm auftreten, exemplarisch ist eine GEI-Region in der Abbildung hervorgehoben.

Die Anfertigung von Genom-Karten erfolgte mit Hilfe der BRIG (Blast Ring Image Generator) Software (Alikhan *et al.*, 2011). Dabei wurden die Sequenzdaten mittels des BLAST-Algorithmus verglichen und für SKK35 und für RA8 jeweils ein Alignment konstruiert. Sequenz-Übereinstimmungen mit dem Ausgangs-Genom wurden in % ausgedrückt und als Helligkeitsabstufungen dargestellt.

Problematik der Annotation und des Alignments von *draft*-Genomdaten

Da die Lücken im Genom nicht vollständig geschlossen werden konnten, wurde für SKK35 und RA8 das *draft*-Genom annotiert und die auf *supercontigs* liegenden Regionen wurden anhand der Referenzsequenz K279a ausgerichtet. Die einzelnen *contigs*, sowie *contigs* die sich nicht an der Referenz ausrichten ließen wurden durch die Abfolge von 100x N an den Sequenzenden gekennzeichnet und aneinandergereiht zusammengefügt. Diese Vorgehensweise hat den Vorteil, dass sich die Genome so viel leichter auf Übereinstimmungen oder Unterschiede hin vergleichen lassen. Problematisch wird es in den Fällen wenn z. B. ein Gen auf zwei *contigs* verteilt vorliegt. Bei der automatisierten Annotation wird dieses zweifach annotiert, obwohl keine der Sequenzen vollständig vorliegt. Andersherum kann bei der Annotation auch eine Abfolge von NNN – Markierungen an den Stellen vorliegen, an denen eigentlich ein Stop Codon zu finden wäre. Die automatische Annotationsfunktion fügt in diesem Fall mehrere, eigentlich separate Gene zu einem großen ORF (*open reading frame*) zusammen. Diese Problematik gilt es im Folgenden beim Vergleich der genetischen Ausstattung von *S. maltophilia* SKK35 und RA8 zu berücksichtigen.

4 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 57 verschiedene, bislang noch nicht charakterisierte, *S. maltophilia* Stämme aus der Umwelt isoliert. Davon stammen 27 aus Klärschlamm und 9 aus dem Kläranlagenablauf. Weitere 18 Isolate wurden aus Wasser und Sediment von Nebenarmen des Rheins bei Karlsruhe gewonnen. Drei Isolate wurden aus Leitungswasser aus dem Städtischen Klinikum in Karlsruhe gewonnen. Eine Anzahl von 56 *S. maltophilia* Patientenisolaten aus dem Städtischen Klinikum in Karlsruhe wurde über den Zeitraum von einem Jahr gesammelt und zur Verfügung gestellt. Ferner standen als Referenzisolate 10 Typstämme der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) von einigen *Stenotrophomonas* Spezies sowie 10 *S. maltophilia* Stämme der Belgian Coordinated Culture Collection of Microorganisms (BCCM/LMG) zur Verfügung. Isolate von Mukoviszidosepatienten aus dem Universitätsklinikum in Freiburg sowie drei Referenzisolate, für welche vollständige Genomsequenzinformationen verfügbar sind, wurden in die Untersuchungen mit einbezogen. Für detaillierte Informationen vgl. Tabelle 1 im Materialteil.

4.1 Genetische Diversität von *S. maltophilia*

Um einen Überblick über die genetische Diversität von *S. maltophilia* zu erhalten, wurden zwei verschiedene Methoden angewandt. Rep (repetitive extragenic palindromic)-PCR zielt auf repetitive Sequenzen, die über das ganze Genom verteilt sind. Durch Amplifikation der verschieden langen DNA-Abschnitte zwischen diesen repetitiven Sequenzen erhält man spezifische Fingerprints. Diese, angeordnet in einem Dendrogramm, liefern Hinweise auf genetische Ähnlichkeiten oder Unterschiede und erlauben die Charakterisierung von genetischen Gruppen. Das *gyrB* Gen, ein *housekeeping* Gen, das für eine Gyrase codiert, zeichnet sich durch eine hohe phylogenetische Auflösung aus. Eine Genotypisierung, auch von nahe verwandten Isolaten, lässt sich basierend auf Unterschieden in der Nukleotidsequenz von *housekeeping*-Genen erstellen.

4.1.1 rep-PCR Fingerprinting

Um die genetische Diversität an einer breiten Auswahl von *S. maltophilia* Stämmen zu testen, wurden rep-PCR Fingerprints mit zwei verschiedenen Primersystemen, BoxA1R und (GTG)₅ erstellt. Insgesamt wurden 167 Bakterienisolate charakterisiert. Hierunter fielen auch die Typstämme weiterer *Stenotrophomonas*-Spezies. *S. rhizophila*, *S. nitritireducens*, *S. acidaminiphila*, *S. terrae*, *S. humi*, *S. koreensis* sowie die Typstämme von *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* und *Pseudoxanthomonas broegbernensis*, die als Außengruppen verwendet wurden. Klonal identische Isolate, d.h. Isolate derselben Herkunft mit identischen Fingerprints, wurden im Arbeitsprozess aussortiert.

Das Clustering-Verfahren UPGMA (Unweight Pair Group Method with Arithmetic Mean) mit Pearsons Korrelationskoeffizient wurde verwendet. Mit beiden Primern ermittelte rep-PCR Fingerprints wurden als ein Datenset analysiert. Hierzu wurde eine Matrix aus den Mittelwerten der Ähnlichkeitsmatrices für die beiden Primer errechnet und in einem einzigen Dendrogramm, Abbildung 10, dargestellt. Da Cluster, die charakteristische Bandenmuster aufwiesen, eine Profil-Ähnlichkeit von mindestens $r = 45\%$ besaßen, wurde dieser Wert als Schwellenwert für die Definition von genetischen Gruppen festgelegt. Mit einem Minimum von drei Stämmen pro Cluster konnten so zwölf verschiedene Gruppen (auf der rechten Seite von Abbildung 10 zu sehen) unterschieden werden. Die mittlere Profilähnlichkeit zusammen mit der entsprechenden Standardabweichung ist auf der linken Seite in Abbildung 10 zu sehen. An jeden Ast des Dendrogramms wurden Fehlerbalken sowie der kophenetische Korrelationskoeffizient angefügt.

Die zwölf beschriebenen Gruppen setzten sich zum größten Teil aus klinischen und aus Umweltisolaten zusammen. In der folgenden Beschreibung sollen nur diejenigen Cluster hervorgehoben werden, die von besonderer Relevanz für die Charakterisierung von *S. maltophilia* sind. Die größte Gruppe war Cluster 7 mit 28 Isolaten. Hier war eine Tendenz zur Akkumulation von Atemwegsisolaten zu beobachten, denn 13 von 19 klinischen Isolaten waren aus den Atemwegen von Patienten isoliert. Die Umweltisolate in diesem Cluster waren überwiegend aus Klärschlamm gewonnen. Die Cluster 3 und 4 bestanden ebenfalls beide aus klinischen und Umweltisolaten, wobei jeweils der Anteil an klinischen Isolaten überwog. Auch Cluster 3 zeigte einen überwiegenden Anteil an Atemwegsisolaten. Cluster 4 dagegen ließ sich nicht auf einen bestimmten Ursprung zurückführen.

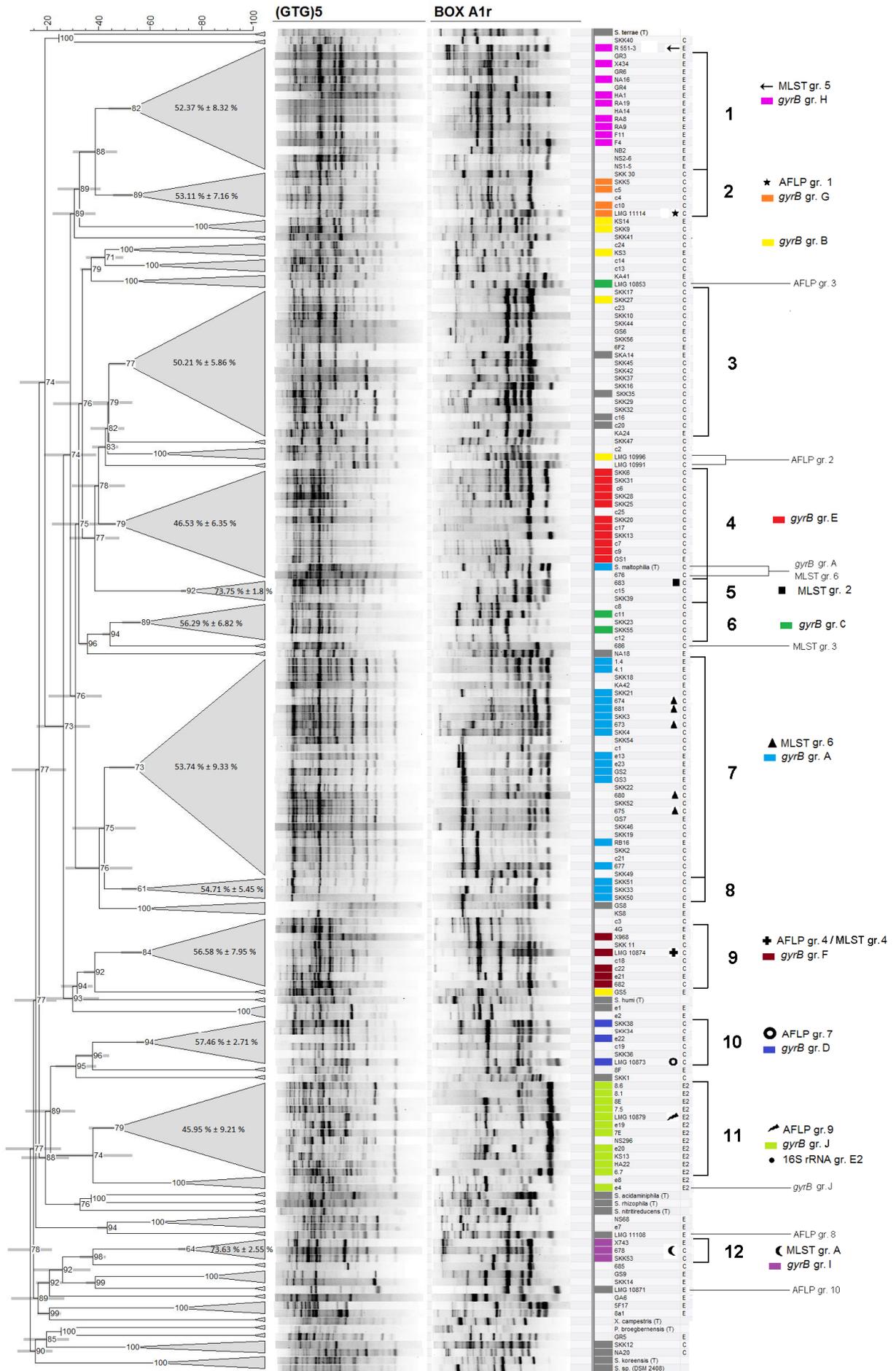


Abb. 10: Dendrogramm basierend auf (GTG)₅ und BoxA1R Fingerprint Profilen. Die Clusteranalyse erfolgte mittels UPGMA mit Pearsons Korrelationskoeffizient. Isolate, die zusätzlich mittels *gyrB* Gen Sequenzierung charakterisiert wurden, sind in verschiedenen Farben dargestellt, die für die Zuordnung zu *gyrB* Genotypisierungs-Gruppen stehen. Referenzstämme von vorhergehenden AFLP/MLST Untersuchungen sind durch entsprechende Symbole gekennzeichnet. Referenzisolate, die zur 16S rRNA Gruppe E2 gehören, wurden mit einem schwarzen Punkt gekennzeichnet.

Die drei kleineren Cluster 9, 10 und 12 setzten sich ebenfalls aus beiden Typen, klinischen und Umweltisolaten, zusammen. Zwei der größeren Cluster, namentlich 1 und 11, bestanden nur aus Umweltisolaten. Auffällig dabei war, dass sich in Cluster 1 überwiegend Kläranlagenisolate fanden (12 von 16 Isolaten). Cluster 11 dagegen bestand überwiegend aus Isolaten von Süßwassersedimentproben. Darüber hinaus gab es noch vier kleinere Gruppen, Cluster 2, 5, 6 und 8, die nur klinische Isolate enthielten.

Zwölf kleine Cluster mit jeweils nur 2 Isolaten waren zu erkennen. Es gab 13 Isolate, die keiner Gruppe zugeordnet werden konnten. Die Außengruppen *X. campestris pv. campestris* und *P. broegbernensis* sowie die *Stenotrophomonas* sp. Typstämme ließen sich mit dieser Methode nicht deutlich von den *S. maltophilia* Isolaten differenzieren.

150 der 167 Isolate wiesen verschiedene BoxA1R- beziehungsweise (GTG)₅-Profile auf. Dabei zeigten die (GTG)₅-Fingerprints zwischen 5 und 21 Banden, die Box-Fingerprints besaßen zwischen 5 und 15 Banden. Das Auftreten bestimmter Bandenkombinationen ließ sich mit der Eingliederung in bestimmte Cluster verbinden, sog. Signaturbanden.

Für die größeren rep-PCR Gruppen sind diese in den Abbildungen 11 a)-d) dargestellt. Bei Gruppe 1 (in Abbildung 11a) waren im Fall der (GTG)₅-Fingerprints zwei Banden mit ungefähr 610 bp und 700 bp Größe maßgeblich. Bei BoxA1R Fingerprints der Gruppe 1 traten zwei spezifische Banden im Bereich von circa 600 bis 620 bp auf. Kennzeichnend für Isolate der Gruppe 3 (in Abbildung 11b) war im Box-Profil eine Kombination von drei Banden mit circa 270, 320 und 440 bp Länge.

Gruppe 7, die größte der beschriebenen Gruppen, dargestellt in Abbildung 11c, wurde im (GTG)₅-Profil durch drei Banden von circa 310, 380 und 500 bp Länge charakterisiert. Beim Box-Profil lag bei allen Isolaten eine kurze Bande von ca. 175 bp vor. Eine markante Bande, die allerdings nicht bei allen Isolaten der Gruppe 7 vorkam, war auf der Höhe von 1500 bp zu finden. Diese würde noch eine weitere Unterteilung ermöglichen. Das Box Profil von Gruppe 11, dargestellt in Abbildung 11d, ließ sich durch das Auftreten einer meist sehr stark ausgeprägten Bande mit einer Größe von ungefähr 160 bp charakterisieren. Diese trat, mit Ausnahme der Stämme e4 und e8, die direkt benachbart zur Gruppe 11 clustern, bei keinem anderen *S. maltophilia* Isolat auf.

Mittels spezifischer Primer konnte für alle diese Isolate auch nachgewiesen werden, dass sie zur von Minkwitz & Berg (2000) beschriebenen Gruppe E2 gehören. Somit stellte diese Bande eine Signaturbande für E2 Isolate dar. Diese Bande trat lediglich noch bei drei Isolaten auf, die der Spezies *S. rhizophila* zugeordnet wurden.

4.1.2 Sequenzanalyse des *gyrB* Gens

Die Sequenz des *gyrB* Gens (partiell: 500 bis 700 bp vom 5'-Ende ausgehend) wurde für 98 *S. maltophilia* Isolate ermittelt. *Stenotrophomonas* sp. Typstämme, sowie Sequenzdaten von *Xanthomonas* sp. und *Xylella fastidiosa*, die über die NCBI Datenbank erhältlich waren, wurden als Außengruppen mit einbezogen. Die Neighbour-Joining-Clusteranalyse mündete in einem phylogenetischen Baum mit elf Clustern, die drei oder mehr Isolate enthielten. Um diese von den rep-PCR-Clustern zu unterscheiden, wurden sie mit A-J beziffert (Abb. 12). Einer dieser Cluster enthielt drei *S. rhizophila* Isolate und wurde dementsprechend benannt. Drei weitere Cluster beinhalteten jeweils zwei Isolate. Vier Isolate ließen sich keiner der Gruppen zuordnen.

Cluster A bildete mit 22 Isolaten die größte Gruppe. Sie bestand aus 14 klinischen und 8 Umweltisolaten. Dabei waren zwölf der klinischen Stämme Atemwegs isolate. Vier der acht Umweltisolate stammten aus Klärschlamm. Der zweitgrößte Cluster war Gruppe E mit zwölf Isolaten. Zehn davon waren klinische Isolate, am häufigsten aus Urinproben, ansonsten aus einem Venenkatheter, einem Wundabstrich, dem Atemwegstrakt, sowie zwei humane Isolate, bei denen die Quelle unbekannt war. Zwei kleinere Cluster, C und G, enthielten nur klinische Isolate. Zwei größere Cluster, H und J, enthielten dagegen nur Umweltisolate. Bei Cluster H stammten die Umweltisolate vorwiegend aus Klärschlammproben, bei Cluster J größtenteils aus Süßwassersediment. Cluster B, D, F und I wiesen eine recht gleichgewichtete Verteilung zwischen klinischen und Umweltisolaten auf. *S. koreensis* clusterte mit *Stenotrophomonas* sp. 2408. Typstämme der anderen *Stenotrophomonas*-Spezies, *Xanthomonaden* und *Xylella fastidiosa*, welche als Außengruppen verwendet wurden, waren deutlich von den *S. maltophilia* Isolaten zu unterscheiden.

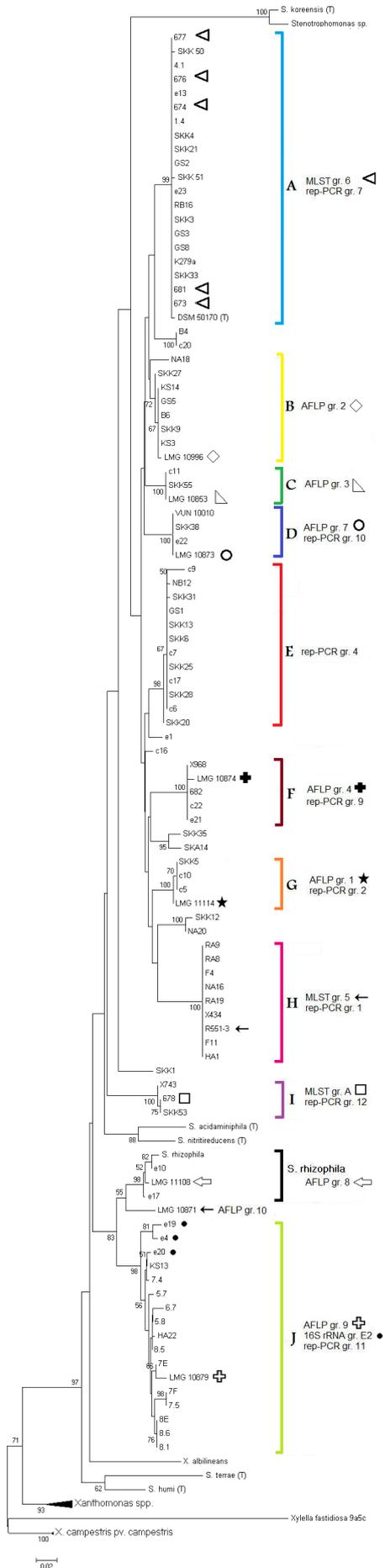


Abb. 12: Neighbour-Joining phylogenetischer Baum basierend auf partiellen gyrB Gen Sequenzen (475 Nukleotid-Positionen) von *Stenotrophomonas*-Stämmen mit *Xanthomonaden* und *Xylella fastidiosa* als Außengruppen. Rechts ist die Gruppierung der Isolate in der vorangehenden Genotypisierung mittels rep-PCR angefügt. Referenzisolate aus AFLP/MLST-Gruppierungen aus der Literatur wurden mit verschiedenen Symbolen gekennzeichnet. Referenzisolate der 16S rRNA Gruppe E2 wurden mit einem schwarzen Punkt gekennzeichnet. Spezies-Typstämme sind durch (T) gekennzeichnet.

4.1.3 Vergleich der Ergebnisse des rep-PCR Fingerprinting und der *gyrB*-Gensequenzanalyse

Beim Vergleich der beiden Genotypisierungsmethoden war bemerkenswert, dass die meisten rep-PCR Cluster auch bei der *gyrB*-Gensequenzanalyse wiedergefunden werden konnten (vgl. Farbcode-Zuordnungen in Abb. 10 und 12). Im Detail bedeutet das, dass alle Isolate aus der *gyrB*-Gruppe H in der rep-PCR-Gruppe 1 clusterten, und alle Isolate der Gruppe G in Gruppe 2. Die drei Stämme der rep-Gruppe bildeten keinen Cluster. Isolate der rep-Gruppe 4 waren, mit einer Ausnahme, in *gyrB*-Gruppe E zu finden. Lediglich der *S. maltophilia* Typstamm DSM 50170 clusterte bei der *gyrB*-Gruppe A. Aus Gruppe 5 wurden keine Isolate für die Sequenzierung verwendet. Die Stämme aus Gruppe 6 clusterten in der *gyrB*-Gruppe C. Der rep-Gruppe 7, dem größten Cluster, konnten die meisten Isolate der *gyrB*-Gruppe A zugeordnet werden. Isolate aus Gruppe 8, die in einer nur kurzen Distanz zu Gruppe 7 lag, waren ebenfalls in Gruppe A wiederzufinden. Die rep-Cluster 9 und 10 entsprachen jeweils den *gyrB*-Clustern F und D. Cluster 11 beinhaltete alle *gyrB*-Gruppe J Isolate bis auf das Isolat e4, welches allerdings in direkter Nachbarschaft mit 38% Profilähnlichkeit clusterte. Alle Stämme aus der rep-Gruppe 12 waren in *gyrB* Cluster I wiederzufinden.

Zusammenfassend konnte man feststellen, dass die auf der rep-PCR Methode basierende Genotypisierung weitestgehend mit der *gyrB* basierten Genotypisierung übereinstimmte, was die Aussagefähigkeit dieser Unterteilung unterstreicht.

4.1.4 Vergleich der *S. maltophilia* Klassifizierung mit der Klassifizierung durch frühere Studien

Beim Vergleich der Verteilung der Referenzisolate aus verschiedenen Studien zeigte sich eine hohe Kongruenz der rep-PCR- und *gyrB*-Gruppen vorhergehenden Genotypisierungsstudien durch AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) (Hauben *et al.*, 1999) und MLST (*multi locus sequence typing*) (Kaiser *et al.*, 2009). Bei den *gyrB*-Gensequenzen war es möglich, durch die Referenzisolate alle Gruppen, Hauben 1-9 und Kaiser A-E, in entsprechender Verteilung in den *gyrB*-Gruppen wiederzufinden. In Abbildung 10 und 12 sind die Referenzisolate aus der AFLP- und der MLST-Untersuchung jeweils mit entsprechenden Symbolen gekennzeichnet. Eine hohe Korrelation ließ sich für die MLST-Gruppe 6 Isolate erkennen, welche alle in Gruppe A clusterten. Die meisten davon konnten ebenfalls der rep-PCR-Gruppe 7 zugeordnet werden, mit Ausnahme des *S. maltophilia*

Typstamms DSM 50170 und dem Stamm 676, welche zur rep-Gruppe 4 gehörten. In den *gyrB*-Gruppen B, C, D, F, G, H, I und J waren jeweils Referenzisolate aus den Gruppen 2, 3, 7, 4, 1, 5, A und 9 zu finden. Da die Gruppenverteilung der *gyrB*-Cluster mit der Verteilung der rep-Gruppen korrelierte, konnten diese auch entsprechend mit den AFLP/MLST-Gruppierungen in Verbindung gebracht werden. Ausnahmen waren die Isolate aus der AFLP-Gruppe 2, welche zwar beieinander clusterten, aber nicht mit irgendeinem der anderen Isolate. Ferner wurden auch Referenzisolate aus einer Genotypisierungsstudie von Minkwitz *et al.* (2001) mit einbezogen. Diese clusterten alle in *gyrB*-Gruppe J beziehungsweise alle in rep-PCR-Gruppe 11 oder der unmittelbaren Nachbarschaft.

4.2 Physiologische Diversität von *S. maltophilia*

Zur Untersuchung der physiologischen Diversität wurde ein repräsentativer Satz von 51 *S. maltophilia* Isolaten ausgewählt. Dabei wurden, wenn möglich, aus jeder genetischen Subgruppe, gemäß den rep-PCR- und den *gyrB*-Clustern, vier Isolate gewählt. Wenn möglich waren es zwei klinische und zwei Umweltisolate. Untersucht wurden physiologische Faktoren von potentiell klinischer Relevanz wie Biofilmbildung, Motilität, Sekretion extrazellulärer Komponenten sowie die Virulenz in einem Amöbenmodell.

4.2.1 Wachstum von *S. maltophilia*

Um zunächst einen generellen Überblick über das Wachstumsverhalten von *S. maltophilia* zu erhalten, wurden Wachstumskurven aufgenommen. Getestet wurde das Wachstumsverhalten in LB-Medium bei 30°C, da dies die am häufigsten genutzte Inkubationstemperatur für die nachfolgenden Versuche war. Es wurden Wachstumskurven für die 51 Testisolate ermittelt. Die mittlere Generationszeit lag bei (Mittelwert \pm Standardabweichung) 1,59 \pm 0,35 Stunden. Dabei zeigte *S. maltophilia* Stamm 678 mit 2,54 Stunden die höchste ermittelte Generationszeit. Ähnliche lange Generationszeiten besaßen auch die Stämme 682 und 683. Diese sind alle Atemwegs isolate von Mukoviszidosepatienten. *S. maltophilia* NA20 hatte mit 1,1 Stunde die kürzeste ermittelte Generationszeit. In Abbildung 13 sind beispielhaft Wachstumskurven von 7 *S. maltophilia* Stämmen dargestellt. Aufgetragen ist jeweils der

Mittelwert aus der achtfach bestimmten OD_{600} der Stämme R551-3, SKA14, SKK35, RA8, 678, NA20 und K279a.

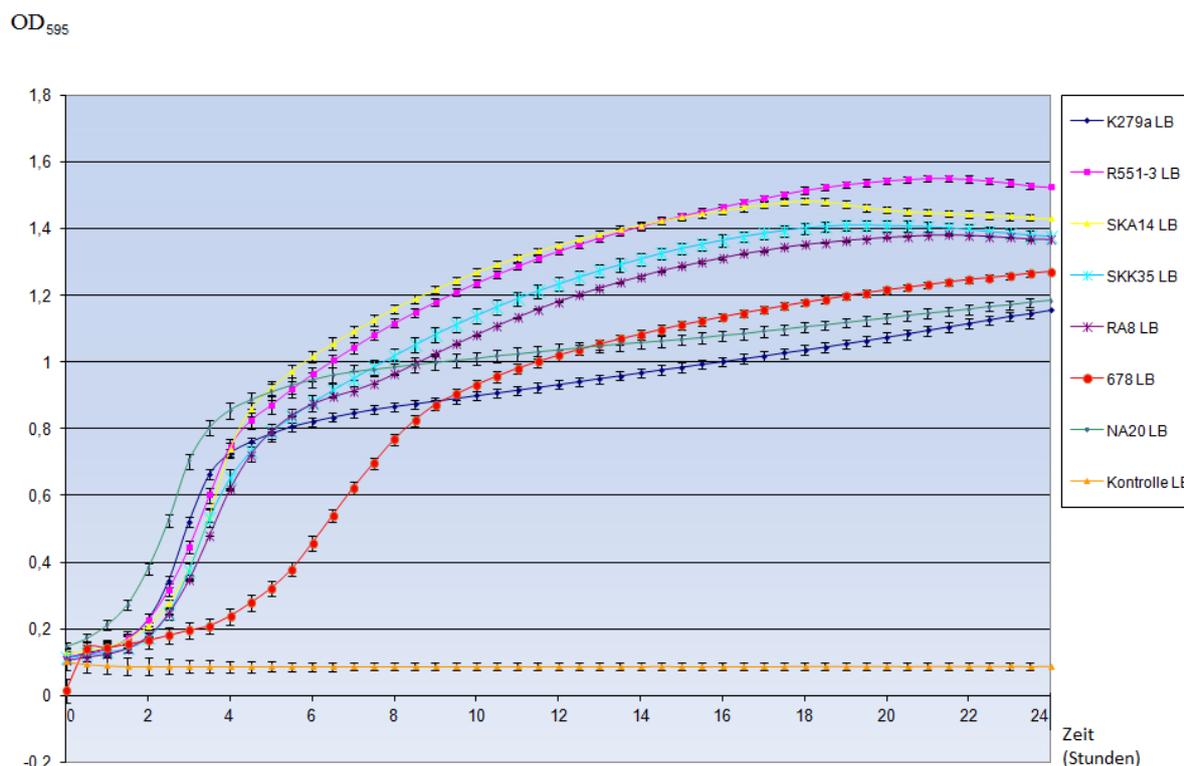


Abb. 13: Wachstumskurven für 7 *S. maltophilia* Isolate (R551-3, SKA14, SKK35, RA8, 678, NA20 und K279a) in LB-Medium. Ermittelt wurde die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) über einen Zeitraum von 24 Stunden bei 30°C unter Schütteln. Aufgetragen ist der Mittelwert einer Achtfachbestimmung. Als Negativkontrolle wurde LB-Medium ohne Zugabe einer Bakterienkultur vermessen. Als Fehlerbalken ist die Standardabweichung dargestellt.

4.2.2 Biofilmbildungs-Potential von *S. maltophilia*

Das Potential zur Biofilmbildung der verschiedenen *S. maltophilia* Isolate wurde als Wachstum von Biofilmen in Polystyrol-Mikrotiterplatten mit BHI 1:4 als Medium bestimmt. Nach 24 Stunden wurde die Menge an Biofilm durch Färbung der Zellen mit Kristallviolett und anschließender photometrischer Quantifizierung bei 595 nm bestimmt. Für jeden der 51 Teststämme wurde jeweils der Mittelwert aus mindestens 24 Einzelmessungen bestimmt.

Die verschiedenen *S. maltophilia* Stämme zeigten deutliche Unterschiede im Biofilmbildungs-Potential. Dabei reichte das Spektrum der gemessenen OD_{595} von 0,022 für den niedrigsten bis zu 0,386 für den höchsten Wert. Als Vergleichswert für einen guten Biofilmbildner wurde *P. aeruginosa* PA14 als Referenzstamm verwendet, welcher im Mittel eine OD_{595} von 0,443 aufwies. Als Schwellenwert für das Hintergrundrauschen der Messung

wurde der ODC gemäß den Vorgaben von Stephanovic *et al.* (2007) berechnet. Dieser setzt sich zusammen aus dem Mittelwert (MW) der Extinktion der Negativkontrolle (nur Medium) und dem dreifachen Wert der Standardabweichung (SD) der Negativkontrolle.

$$ODc = MW OD_{595} \text{Negativkontrolle} + (3 \times SD \text{Negativkontrolle})$$

Der ODC-Wert für die vorliegenden Ergebnisse betrug 0,072. Eine oberhalb dieses Wertes vorliegende OD_{595} -Messung wurde als Biofilmbildung bewertet. Die Einteilung in schwache, moderate und starke Biofilmbildung erfolgte anhand der Vielfachen des ODC-Werts. Von den 51 untersuchten *S. maltophilia* Stämmen bildeten 15 keinen Biofilm. Der größere Teil der Isolate zeigte ein schwaches Biofilmbildungs-Potential ($OD_{595} = 0,072$ bis $0,144$). Sechs der Isolate waren moderate Biofilmbildner ($OD_{595} = 0,144$ bis $0,288$) und nur der *S. maltophilia* Typstamm DSM 50170 wurde mit einer OD_{595} von $0,386$ als starker Biofilmbildner eingestuft. Abbildung 14 zeigt die Mittelwerte der OD_{595} der verschiedenen *S. maltophilia* Isolate nach ihrem Isolierungsursprung angeordnet, in einem Säulendiagramm.

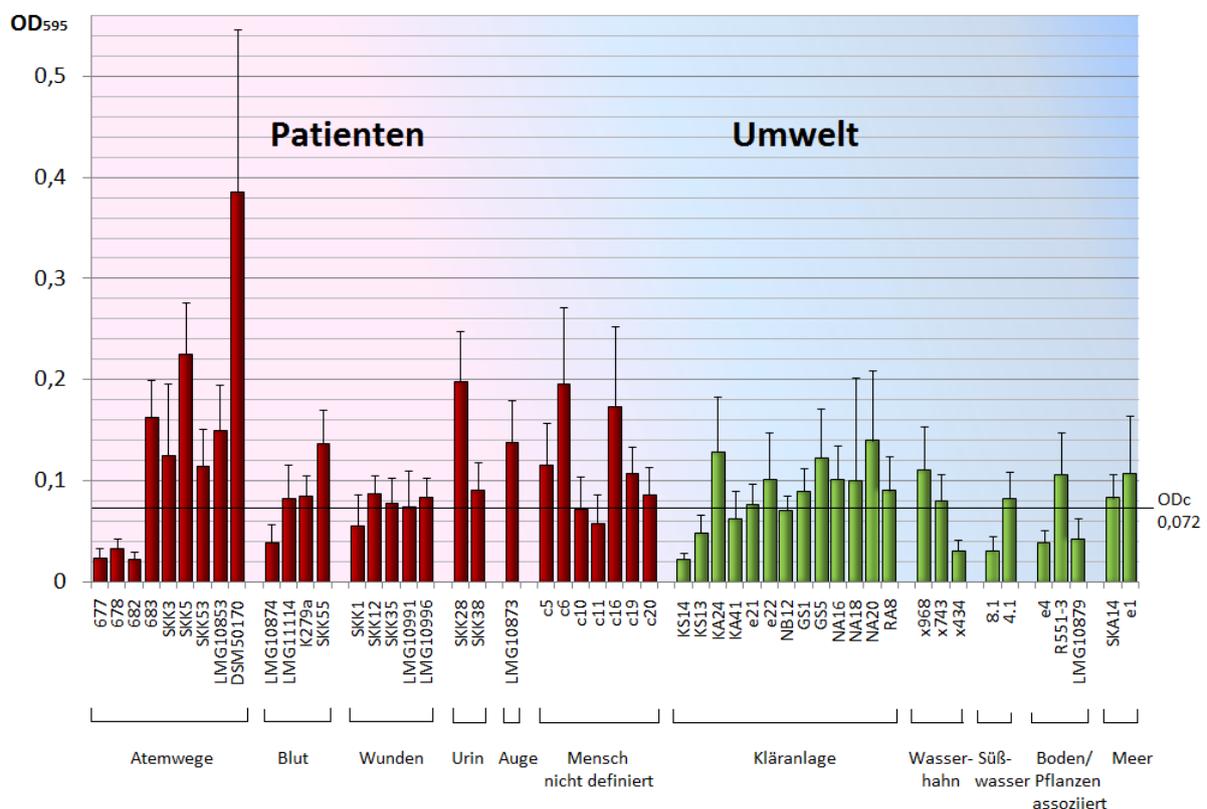


Abb. 14: *S. maltophilia* Biofilmbildung in Polystyrol-Mikrotiterplatten nach 24 Stunden Wachstum in BHI 1:4. Als Säulen sind die Mittelwerte der OD_{595} der Biofilme (mit 0,5%iger Kristallviolett-Lösung angefärbt und 1:10 in Ethanol verdünnt) aufgetragen. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung aus mindestens 24 Einzelwerten. Unterhalb der Stammnamen sind die Patientengewebe beziehungsweise der Umweltursprung der Isolate näher bezeichnet.

75% der Patientenisolate waren Biofilmbildner. Der mittlere OD₅₉₅-Wert der klinischen Isolate war 0,115. Bei den Umweltisolaten waren 65% Biofilmbildner, wobei der mittlere OD₅₉₅-Wert mit 0,081 etwas unter dem der klinischen Isolate lag. Generell waren alle moderaten und starken Biofilmbildner klinischen Ursprungs. Statistisch, im zweiseitigen t-Test ermittelt, zeigten sich allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen Umweltisolaten und klinischen Isolaten ($p > 0,05$).

In Abbildung 15 sind die Genogruppen gemäß der *gyrB*-Gen Cluster in verschiedenen Farben dargestellt. Vergleicht man die Biofilmbildung mit den im Vorversuch definierten genetischen Subgruppen, kann man sehen, dass sich kein Zusammenhang aus der genetischen Klassifizierung und dem Biofilmbildungspotential ergab.

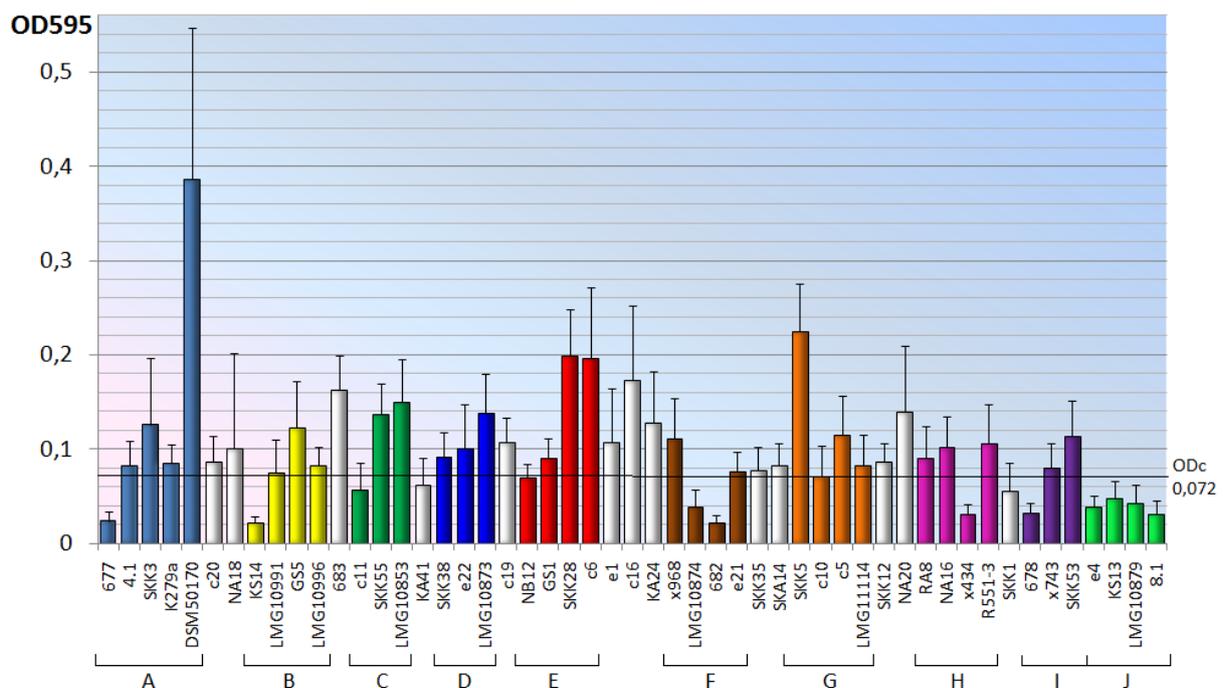


Abb. 15: *S. maltophilia* Biofilmbildung in Polystyrol-Mikrotiterplatten nach 24 Stunden Wachstum in BHI 1:4. Als Säulen sind die Mittelwerte der OD₅₉₅ der Biofilme (mit 0,5%iger Kristallviolett-Lösung angefärbt und 1:10 in Ethanol verdünnt) aufgetragen. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung aus mindestens 24 Einzelwerten. Die verschiedenen Farben repräsentieren die genetischen Gruppen A-J gemäß der *gyrB*-Gen Klassifizierung (Vgl. 4.1.2 Abb. 12).

4.2.3 Beweglichkeit – *Twitching* und *Swimming* Motilität von *S. maltophilia*

In Zusammenhang mit der Virulenz wurden häufig Flagellen und Pili diskutiert. Dabei wurde deren Funktion als Adhäsionsfaktoren in Zusammenhang mit einer erleichterten Kolonisierung des Wirts, aber auch der Hämagglutination von Erythrozyten in

Zusammenhang gebracht (Jonson *et al.*, 2005). Die Anwesenheit intakter Flagellen kann durch Schwimmtests nachgewiesen werden. Die Fähigkeit der Fortbewegung durch Pili kann durch sog. *Twitching* gezeigt werden. Im Folgenden wurde das Schwimm- und *Twitching*-Verhalten der 51 *S. maltophilia* Testisolat untersuchen. Ergebnisse sind u.a. in Tabelle 15 zusammengefasst. Die Beweglichkeit durch intakte Flagellen kann als Schwimm-Motilität auf 0,3%igen Agarplatten getestet werden. Zugrunde gelegt wurde der Mittelwert aus mindestens drei Versuchsansätzen. Von den getesteten 51 Isolat wiesen 14 keinerlei Fähigkeiten zum Schwimmen auf. Für die verbleibenden Isolat betrug der sichtbare Durchmesser der Schwimmfläche zwischen 4,9 mm bis 20,1 mm. Dabei ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen klinischen und Umweltisolaten festmachen. Ebenso ließ sich kein Zusammenhang mit der Herkunft der Isolat oder ihrer genetischen Klassifizierung ausmachen und es konnte keine Korrelation zwischen Schwimmen und Biofilmbildung erkannt werden. Im Fall der *Twitching*-Motilität waren ähnliche Ergebnisse zu verzeichnen. Diese wurde auf sehr dünn gegossenen Agarplatten als Bewegungsdurchmesser ermittelt. Auch hier wurden 24 Stunden alte Kolonien auf den Test-Agar überführt und nach 24 Stunden wurde der Durchmesser vermessen. Achtzehn Isolat zeigten keinerlei *Twitching*. Die anderen Isolat wiesen Bewegung in einem Durchmesser von 3,2 mm bis 9,5 mm auf. Für beide Versuche wurde *P. aeruginosa* PA14 als Referenzstamm für *Twitching* und Schwimmen verglichen. Wobei *S. maltophilia* im Vergleich zu *P. aeruginosa* mit einem Schwimmdurchmesser von 28 mm und einem *Twitching*-Durchmesser von 17 mm eine geringer ausgeprägte Schwimm- und *Twitching*-Motilität aufwies. Es ließ sich kein Zusammenhang der Motilität mit der genetischen Klassifizierung, der Herkunft der Isolat oder dem Biofilmbildungspotential feststellen.

4.2.4 Sekretion von Sekundärmetaboliten im Zusammenhang mit bakterieller Virulenz

Hämolyse

Hämolytische Eigenschaften wurden als klare Hämolyse-Zone auf Schafsblut-Agar nach 24, 48, 72 und 96 Stunden Wachstum bei 30°C dokumentiert. Von den 51 getesteten *S. maltophilia* Isolat wurde für 45 Isolat β -Hämolyse nachgewiesen, sechs zeigten keine Hämolyse. Erste Ergebnisse konnten dabei bereits nach 48 Stunden dokumentiert werden. Die

meisten der getesteten Isolate zeigten nach 72 Stunden klare Anzeichen von β -Hämolyse. Die Ergebnisse sind im Einzelnen in Tabelle 15 zusammengefasst.

Proteasen

Die Produktion extrazellulärer Proteasen wurde auf Müller-Hinton-Agar mit 30% (w/v) Magermilchpulver untersucht. Dabei wurde jeweils 1 μ l einer *S. maltophilia* über Nachtkultur auf die Testplatte aufgebracht. Produktion von Proteasen wurde nach 72 Stunden bei 30 °C als klarer Proteolyse-Ring um die Bakterienfläche gemessen. Aus dem Durchmesser des Proteolyse-Rings im Verhältnis zum Durchmesser der von Bakterien bewachsenen Fläche wurde der Quotient als Maß für die Proteolyse berechnet. Tabelle 15 zeigt die Einteilung der verschiedenen *S. maltophilia* Isolate. Fünf Isolate zeigten keine proteolytischen Eigenschaften, neun zeigten nur schwache Proteolyse mit einem Verhältnis der Proteolysezone bis zum Koloniedurchmesser von bis zu 1,49. Bei 25 Isolaten lag dieser Quotient bei 1,50-1,99. Elf Isolate zeigten starke Proteolysezonen mit einem Quotienten von über 2,0.

Siderophore

Die Produktion von Siderophoren wurde auf Chrom-Azuroil-S (CAS)-Agar nachgewiesen. Die Platten enthalten Chrom-Azuroil-S, welches mit Eisen zusammen einen tiefblauen Komplex ausbildet. Durch die Produktion von Siderophoren kann das Eisen aus dem Komplex entfernt werden, wodurch sich dieser entfärbt. Die zu testenden Stämme wurden auf den CAS-Agarplatten ausgestrichen und bei 30 °C bebrütet. Bei allen Stämmen ließ sich nach 24 Stunden eine Entfärbung des Agars um die Bakterien herum erkennen, die auf die Produktion von Siderophoren schließen lässt (vgl. Tabelle 15).

Tab. 15: Physiologische Eigenschaften von klinischer Relevanz für 51 *S. maltophilia* Isolate.

Isolat	Quelle	Schwimmen (mm)	<i>Twitching</i> (mm)	Hämolyse	Proteasen	Siderophore
677	Atemwege	-	+	+	++	+
678		-	-	-	-	+
682		-	-	-	-	+
683		-	++	+	+	+
SKK 3		++	++	+	++	+
SKK 5		-	-	-	+	+
SKK53		+	+	++	++	+
LMG 10853		++	++	+++	++	+
DSM 50170		+	+	-	++	+
LMG 10874	Blut	+	-	+	+	+
LMG 11114		++	+	+	+++	+
K279a		+++	++	+++	++	+
SKK 55		++	++	++	+++	+
SKK 1	Wunde	+++	+	++	++	+
SKK12		+++	++	++	+++	+
SKK 35		+	-	+	+	+
LMG 10991		+	-	++	+++	+
LMG 10996		+	-	++	++	+
SKK 28	Urin	-	-	-	-	+
SKK38		++	+	+	++	+
LMG10873	Auge	-	-	-	-	+
e5	Mensch (nicht definiert)	+	-	++	++	+
e6		+	-	+	++	+
e10		-	+	+	-	+
e11		-	-	+++	++	+
e16		++	+	+	++	+
e19		+++	++	++	+	+
e20		+	-	+++	++	+
KS 14	Kläranlage	-	-	++	++	+
KS 13		+	+	++	++	+
KA 24		-	-	++	+++	+
KA 41		++	+	+	+	+
e21		++	-	++	+++	+
e22		++	++	++	+	+
NB 12		+++	++	++	+	+
GS 1		+++	+	++	+++	+
GS 5		+++	+	++	++	+
NA16		++	++	+	++	+
NA 18		++	++	++	+	+
NA 20		+++	++	++	+++	+
RA 8		-	+	++	++	+
X968	Wasserhahn	+++	++	++	+++	+
X743		++	-	++	++	+
X434		-	+	+	++	+
8.1	Süßwasser	-	-	++	+++	+
4.1		+	++	+	++	+
e4	Boden/Pflanzenassoziiert	+	++	++	++	+
R551-3		+	++	++	+++	+
LMG 10879		+	++	+	++	+
SKA 14	Meer	++	++	+	++	+
e1		++	++	++	++	+

Motilität durch Flagellen und Pili wurde jeweils getestet als *Twitching*- und Schwimm-Motilität nach 24 Stunden. Bildung von Siderophoren wurde als klare Zone auf CAS (Chrom-Azuroil S)-Agar nach 24 Stunden bestimmt. Produktion von Hämolyysin wurde nach 24 bis 96 Stunden auf Blut-Agar-Platten mit 65 ml/l Schaf-Blut untersucht. Produktion von extrazellulären Proteasen wurde als klare Proteolyszone auf Müller-Hinton-Agar mit 30% (w/v) Magermilch im Verhältnis zum Durchmesser der Bakterienkolonie nach 72 Stunden dokumentiert. Alle Versuche wurden bei 30 °C durchgeführt.

*1 – kein *Twitching*; + Durchmesser 3 - 6 mm; ++ Durchmesser >6 mm

*2 – kein Schwimmen; + Durchmesser 5-10 mm; ++ Durchmesser 10-15 mm; +++ Durchmesser >15 mm

*3 – keine Hämolyse; + Hämolyse nach 96 Stunden sichtbar; ++ Hämolyse nach 72 Stunden sichtbar; +++ Hämolyse nach 48 Stunden sichtbar

*4 – keine Proteolyse; + Quotient bis 1,49; ++ Quotient 1,50-1,99; +++ Quotient $\geq 2,0$

*5 – positiver Nachweis für Siderophore +

4.2.5 Antibiotikaresistenzen

Um eine generelle Übersicht über die Antibiotikaresistenzen von *S. maltophilia* zu erhalten, wurde zunächst ein breites Spektrum an klinisch relevanten Antibiotika mittels Plattendiffusionstest an einigen *S. maltophilia* Isolaten untersucht. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden fünf Antibiotika aus fünf verschiedenen Stoffklassen, bei denen die verschiedenen *S. maltophilia* Stämme Diversität in der Resistenz/Sensibilität aufwiesen, ausgewählt. Mittels des Mikrobouillon-Verdünnungstests wurde für diese fünf Antibiotika mit den 51 Teststämmen Resistenzprofile inklusive einer Bestimmung der Minimalen Hemmstoff-Konzentration (MHK) erstellt.

Plattendiffusionstest

Mittels des Plattendiffusionstests wurden 36 *S. maltophilia* Stämme auf ihre Resistenzen gegenüber fünfzehn verschiedenen Antibiotika getestet. Konnte die Bildung eines Hemmhofes um die mit Antibiotika imprägnierten Plättchen herum beobachtet werden, wies das auf Resistenzen hin. Einige der Isolate wiesen intermediäre Hemmhöfe auf, d.h. ein eingeschränktes Wachstum der Bakterien war zu beobachten. Diese wurden in der folgenden Auswertung als resistent gewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 als Säulendiagramm zusammengefasst.

Alle Isolate waren resistent gegen Penicillin (P10), Ampicillin (AM10), Novobiocin (NB30) und Kanamycin (K30). Auch gegen die beiden anderen Aminoglycoside Neomycin (N30) und Gentamicin (GM10) wiesen zahlreiche *S. maltophilia* Isolate Resistenzen auf. Diese lagen für Neomycin bei 90% und für Gentamicin um 77%. Die Gruppe der Chinolone erwies sich als am effektivsten gegen *Stenotrophomonas* wirkend. Für Ciprofloxacin (CIP5) und Ofloxacin (OFX5) lagen die Resistenzraten nur jeweils bei 3% und 10%, während sie für Norfloxacin (NOR10) 29% aufwiesen. Gegenüber den Sulfonamid Kombinationspräparaten zeigten die *S. maltophilia* Isolate verhältnismäßig hohe Resistenzraten, mit 51% resistenten Isolaten gegen Trimethoprim/Sulfamethoxazol 23,75/1,25 µg (SXT) und 79% Triple-Sulfa 0,25 µg (SSS.25) resistenten Isolaten. Resistenzraten gegen Vancomycin (VA30) lagen bei 74%, für Tetracyclin (TE30) bei 31%, für Chloramphenicol (C30) bei 10%, dagegen für Erythromycin (E15) bei 91%. Basierend auf dieser Auswahl wurden für weitere Untersuchungen fünf Antibiotika, die eine Diversität in den jeweiligen Resistenzprofilen aufwiesen, ausgesucht.

Aus jeweils verschiedenen Stoffklassen waren diese: Norfloxacin, Gentamicin, Trimethoprim/Sulfamethoxazol (co-Trimoxazol), Vancomycin und Tetracyclin.

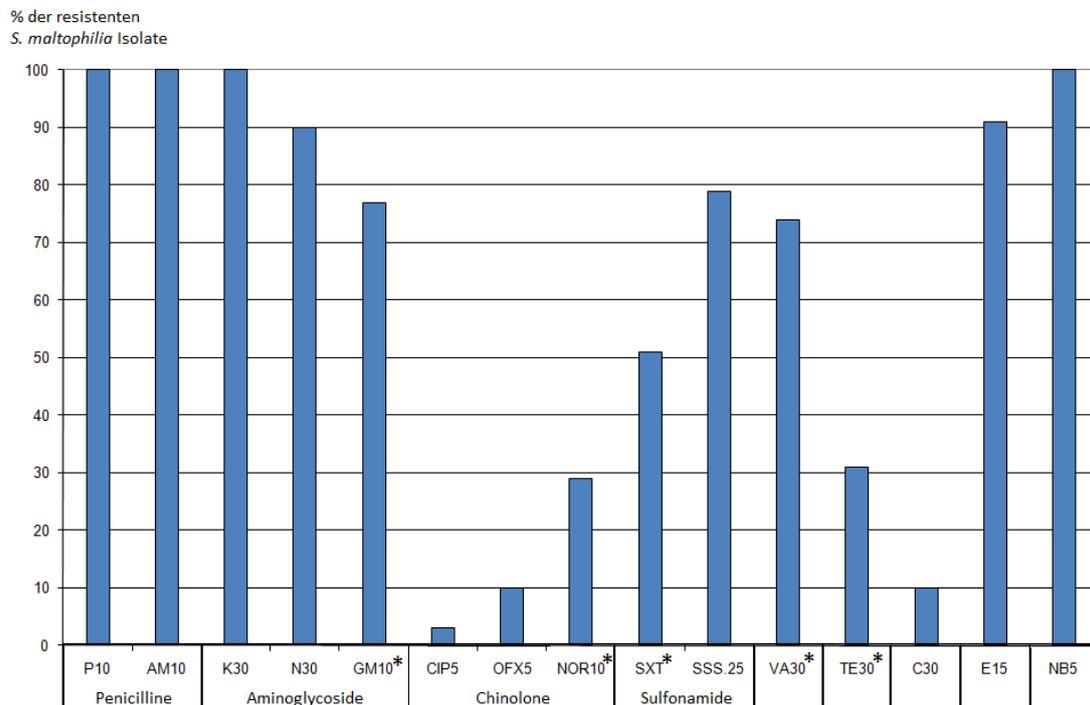


Abb. 16: Antibiotikaresistenzen ermittelt durch den Plattendiffusionstest. Es wurden 36 *S. maltophilia* Isolate getestet. Dargestellt ist die Anzahl der resistenten Isolate in Prozent für die Antibiotika Penicillin 10 µg (P10), Ampicillin 5 µg (AM5), Kanamycin 30 µg (K30), Neomycin 30 µg (N30), Gentamicin 10 µg (GM10), Ciprofloxacin 5 µg (CIP5), Ofloxacin 5 µg (OFX5), Norfloxacin 10 µg (NOR10), Trimethoprim/Sulfamethoxazol 23,75/1,25 µg (SXT), Triple-Sulfa 0,25 µg (SSS.25), Vancomycin 30 µg (VA30), Tetracyclin 30 µg (TET30), Chloramphenicol 30 µg (C30), Erythromycin 15 µg (E15) und Novobiocin 30 µg (NB30). Mit * markierte Antibiotika wiesen die meisten Unterschiede in der Wirksamkeit gegen unterschiedliche *S. maltophilia* Isolate auf und wurden daher für weitere Untersuchungen im darauffolgenden Versuch benutzt.

Mikrobouillon-Verdünnung

Mittels der Mikrobouillon-Verdünnung wurde die MHK für die Antibiotika Norfloxacin, Gentamicin, Co-Trimoxazol, Vancomycin und Tetracyclin bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 dargestellt. Es konnte für fast alle Isolate eine hohe MHK von 512-128 µg/ml gegen Gentamicin und Vancomycin beobachtet werden. MHK-Werte im intermediären Bereich von 32-8 µg/ml wurden meist für Tetracyclin und Norfloxacin beobachtet. Lediglich gegen co-Trimoxazol waren, bis auf eine Ausnahme, alle Isolate sensibel. Generell zeichneten sich die Antibiotikaresistenz-Profile der verschiedenen *S. maltophilia* Isolate nicht durch eine hohe Diversität aus, vielmehr waren sie sich bis auf wenige Ausnahmen sehr ähnlich.

resistent	intermediär	sensibel
512	32	4
256	16	2
128	8	1
64		0,5
		0,25
		0,125

Tab 16.: Antibiotikaresistenzen von *S. maltophilia* Isolaten verschiedenen Ursprungs gegen Gentamicin, Vancomycin, Norfloxacin, Tetracyclin sowie co-Trimoxazol in Kombination. Dargestellt ist die MHK in µg/ml. Entsprechend der Zuordnung links wurden die Isolate in verschiedene Farbabstufungen entsprechend ihrer MHK eingeteilt.

Isolat	Quelle	Gentamicin (µg/ml)	Vancomycin (µg/ml)	Tetracyclin (µg/ml)	Norfloxacin (µg/ml)	co-Trimoxazol (µg/ml)
677	Atemwege	2	256	32	32	≤0,125/2,375
678		128	64	8	64	≤0,125/2,375
682		512	256	16	64	2/38
683		512	32	32	32	≤0,125/2,375
SKK 3		512	256	32	16	≤0,125/2,375
SKK 5		512	512	16	8	≤0,125/2,375
SKK53		256	256	16	16	≤0,125/2,375
LMG 10853		8	64	8	4	≤0,125/2,375
DSM 50170		8	128	4	4	≤0,125/2,375
LMG 10874		Blut	64	128	32	8
LMG 11114	512		128	8	8	≤0,125/2,375
K279a	512		128	64	32	≤0,125/2,375
SKK 55	128		256	16	32	≤0,125/2,375
SKK 1	Wunde	64	128	16	4	≤0,125/2,375
SKK12		64	256	64	64	≤0,125/2,375
SKK 35		256	256	16	16	≤0,125/2,375
LMG 10991		32	128	32	16	≤0,125/2,375
LMG 10996		8	256	32	64	≤0,125/2,375
SKK 28	Urin	64	128	32	64	≤0,125/2,375
SKK38		256	128	16	16	≤0,125/2,375
LMG10873	Auge	32	256	32	8	≤0,125/2,375
c5	Mensch (nicht definiert)	64	256	32	8	≤0,125/2,375
c6		256	128	16	16	≤0,125/2,375
c10		128	512	16	8	≤0,125/2,375
c11		256	256	32	8	≤0,125/2,375
c16		8	256	16	8	≤0,125/2,375
c19		64	256	8	16	≤0,125/2,375
c20		512	256	32	4	≤0,125/2,375
KS 14	Kläranlage	256	128	16	16	≤0,125/2,375
KS 13		32	128	16	8	≤0,125/2,375
KA 24		64	512	16	16	≤0,125/2,375
KA 41		2	256	8	16	≤0,125/2,375
e21		256	256	32	16	≤0,125/2,375
e22		256	256	16	8	≤0,125/2,375
NB 12		256	512	32	32	≤0,125/2,375
GS 1		256	128	16	16	≤0,125/2,375
GS 5		128	256	32	16	≤0,125/2,375
NA16		256	256	32	8	≤0,125/2,375
NA 18		128	256	32	16	≤0,125/2,375
NA 20		128	256	32	32	≤0,125/2,375
RA 8		128	256	8	4	0,5/9,5
X968	Wasserhahn	128	128	32	8	≤0,125/2,375
X743		32	128	16	16	≤0,125/2,375
X434		512	256	32	8	≤0,125/2,375
8.1	Süßwasser	256	128	16	16	≤0,125/2,375
4.1		512	256	32	16	≤0,125/2,375
e4	Boden/Pflanzen-assoziiert	8	64	16	8	≤0,125/2,375
R551-3		256	256	32	8	≤0,125/2,375
LMG 10879		64	128	8	16	≤0,125/2,375
SKA 14	Meer	64	128	16	16	≤0,125/2,375
e1		32	128	16	8	≤0,125/2,375

4.2.6 Phänotypische Klassifikation des Virulenzpotentials von *S. maltophilia*

Um eine Übersicht über das Virulenzpotential der *S. maltophilia* Isolate zu erhalten, wurden zwei Amöben, *D. discoideum* und *A. castellanii*, als Modellsysteme gewählt, um die Isolate in Co-Kultur zu testen. Dabei wurden jeweils die Amöben in 5 µl Tropfen, welche seriell verdünnt etwa 10000 - 5 Amöben enthielten, auf einen Bakterienrasen auf M9-Medium aufgebracht. Die nötige Anzahl an Amöben, um einen Plaque in dem Bakterienrasen zu erzeugen, wurde als Maß für die Virulenz des jeweiligen *S. maltophilia* Stammes dokumentiert. Dabei war eine höhere Anzahl an Amöben auch gleichzusetzen mit einem hohen Virulenzpotential. Die so ermittelten Virulenzprofile sind in Tabelle 17 dargestellt.

Drei Kategorien wurden ausgewählt, um die Virulenz zu unterteilen. Isolate, bei denen weniger als 400 Amöben notwendig waren, um einen Plaque zu bilden, wurden als nicht-virulent eingestuft. Wenn 400 bis 2500 Amöben einen Plaque erzeugen konnten, wurde der Stamm als schwach virulent eingestuft und bei mehr als 2500 Amöben als stark virulent. Diese Einteilung beruht auf einer Einschätzung durch Beobachtung. Unter dem Wert von 400 Amöben traten deutliche Schwankungen der Werte für dasselbe Isolat auf. Bei Werten darüber ließ sich vorhandene Plaquebildung deutlicher abgrenzen. Die meisten *S. maltophilia* Isolate zeigten keine Virulenz gegenüber *D. discoideum*. Bei vierzig der getesteten Isolate waren weniger als 400 Amöben notwendig, um einen Plaque zu erzeugen. Bei drei Isolaten wurde eine schwache Virulenz beobachtet (400-2500 Amöben); sechzehn Isolate wurden als stark virulent eingestuft.

Im Fall von *A. castellanii* war generell eine größere Zahl an Amöben notwendig, um einen Plaque im *S. maltophilia* Bakterienrasen zu erzeugen. Davon abgesehen war es möglich, die Virulenz anhand derselben Abstufungen wie bei *D. discoideum* zu charakterisieren. 34 der untersuchten Isolate waren nicht virulent gegenüber *A. castellanii*, 12 waren schwach virulent und 13 stark virulent.

Das Virulenzverhalten gegenüber beiden Amöbenarten war für den größeren Teil der *S. maltophilia* Isolate übereinstimmend. Diskrepanzen in der Form, dass ein Bakterienstamm für die eine Amöbenart virulent war für die andere aber nicht, traten bei 15 der 51 Stämme (29,4%) auf.

Tabelle 17: Virulenz von *S. maltophilia* ermittelt in Co-Kultur auf M9-Agar mit den zwei Modellamöben *Dictyostelium discoideum* und *Acanthamoeba castellanii*. Die Auswertung wurde bei *D. discoideum* nach fünf Tagen bei 23 °C und bei *A. castellanii* nach drei Tagen bei 30 °C durchgeführt.

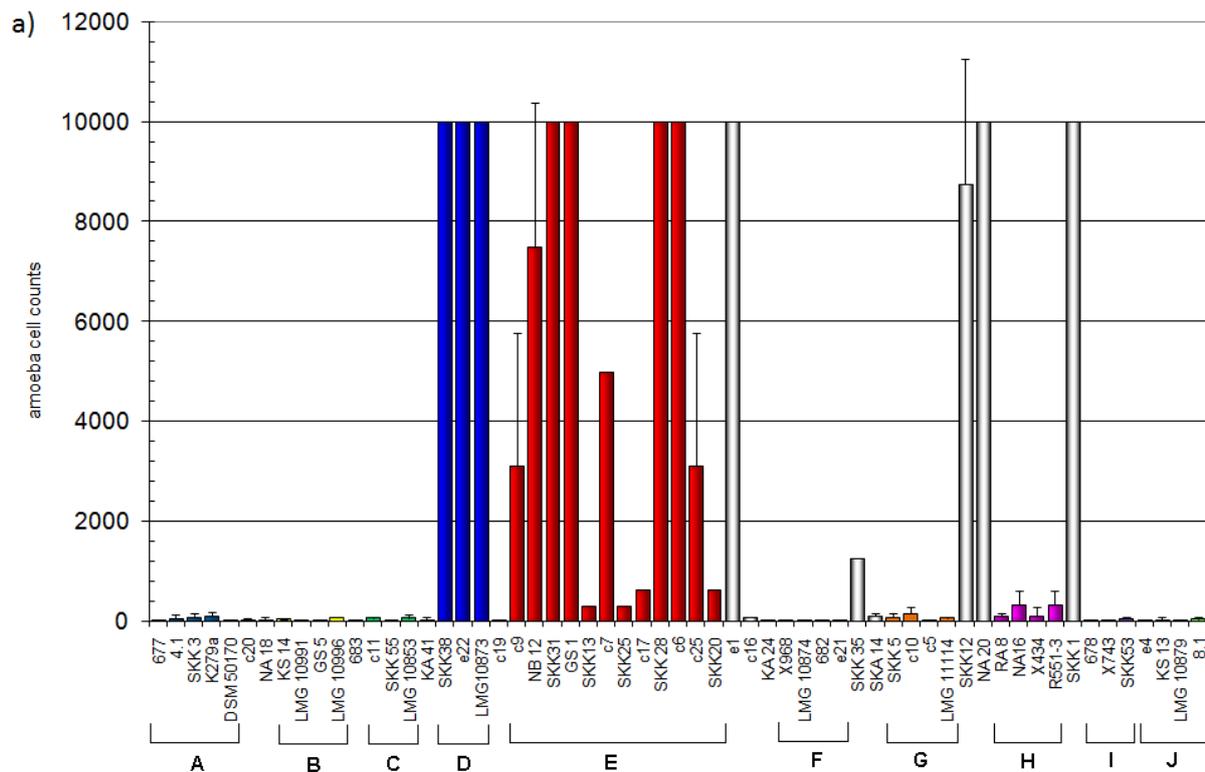
– nicht virulent; + schwach-virulent; ++ stark virulent

Isolat	Quelle	<i>D. discoideum</i> M9 5 Tage	<i>A. castellanii</i> M9 3 Tage
677	Atemwege	-	-
678		-	-
682		-	-
683		-	-
SKK 3		-	-
SKK 5		-	+
SKK20		+	-
SKK53		-	-
LMG 10853		-	-
DSM 50170		-	-
LMG 10874	Blut	-	-
LMG 11114		-	+
K279a		-	-
SKK 55		-	-
SKK 1	Wunde	++	-
SKK12		++	-
SKK 31		++	++
SKK 35		+	++
LMG 10991		-	-
LMG 10996		-	-
SKK13	Urin	-	-
SKK 25		-	++
SKK 28		++	++
SKK38		++	+
LMG10873	Auge	++	-
c5	Mensch (nicht definiert)	-	+
c6		++	++
c7		++	++
c9		++	++
c11		-	++
c16		-	++
c17		+	++
c19		-	-
c20		-	-
c25		++	++
KS 14	Kläranlage	-	-
KS 13		-	-
KA 24		-	+
KA 41		-	-
e21		-	+
e22		++	-
NB 12		++	++
GS 1		++	++
GS 5		-	-
NA16		-	+
NA 18		-	-
NA 20		++	++
RA 8		-	-
X968	Wasserhahn	-	+
X743		-	-
X434		-	-
8.1	Süßwasser	-	+
4.1		-	-
e4	Boden/Pflanzen-assoziert	-	-
R551-3		-	-
LMG 10879		-	-
SKA 14	Meer	-	-
e1		++	++

Vergleich des *S. maltophilia* Virulenzpotentials mit dessen Genotypen

Verglich man die Virulenz von *S. maltophilia* gegenüber *D. discoideum* mit den vorher eingeteilten Genogruppen (Abb. 17a), konnte man sehen, dass die virulenten Stämme hauptsächlich in Gruppe D und in Gruppe E clusterten. Die anderen sechs virulenten Stämme e1, c16, SKK35, SKK12, NA20 und SKK1 gehörten zu keiner der Gruppen. Die Gruppen A-C, sowie F-J beinhalteten keine virulenten Stämme.

Zum Teil ähnlich verhielt es sich mit der Virulenz von *S. maltophilia* gegenüber *A. castellanii*. Verglich man diese mit den genetischen Subgruppen (Abb. 17b), konnte man sehen, dass sich die Gruppen A, B und I nur aus nicht virulenten Stämmen zusammensetzten, während der Großteil der virulenten Isolate wieder in Gruppe E clusterte. Die Gruppen C, D, H und J beinhalteten jeweils einen schwach beziehungsweise stark virulenten Stamm. In Gruppe F waren zwei von vier Isolaten schwach virulent und in Gruppe G waren alle Isolate schwach virulent. Nicht zu den Gruppen zugeordnete, virulente Isolate waren e1, c16, KA24, SKK35 und NA20.



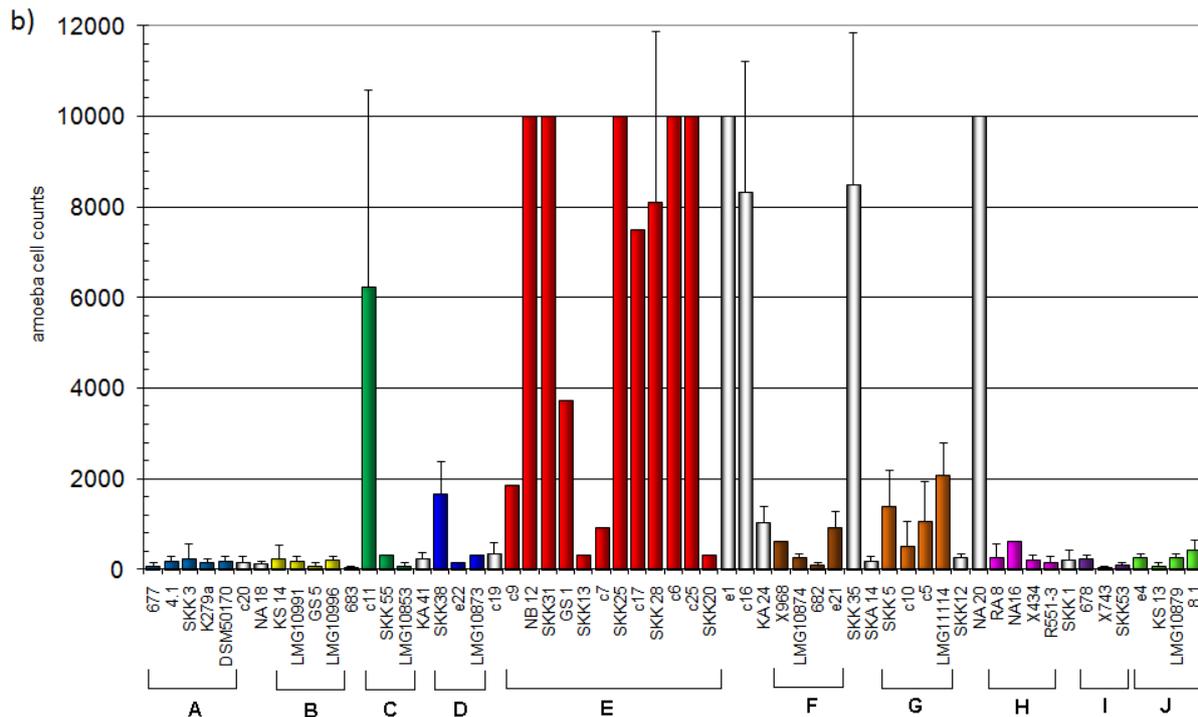


Abb. 17: a) *Dictyostelium discoideum*, b) *Acanthamoeba castellanii* Co-Kultur-Virulenztest. Die Balken repräsentieren die Anzahl der Amöben, die notwendig sind, einen Plaque auf dem Bakterienrasen des jeweiligen *S. maltophilia* Isolates zu bilden. Der Mittelwert aus mindestens drei Versuchsansätzen wurde für jedes Isolat ermittelt. Die Standardabweichung ist jeweils als Fehlerbalken dargestellt. Die genetischen Gruppen, wie sie durch die *gyrB*-Sequenz-Profile ermittelt wurden, sind in verschiedenen Farben als A-J dargestellt.

S. maltophilia zeichnete sich hinsichtlich klinisch relevanter, physiologischer Eigenschaften als diverse Spezies aus. Sowohl im Biofilmbildungspotential und der Motilität, als auch bei der Virulenz gegenüber Amöben waren deutliche Unterschiede im Verhalten der einzelnen Stämme zu sehen. Nur im Virulenztest zeigte sich eine Prädisposition bestimmter genetischer Subgruppen. Hinsichtlich der Produktion von extrazellulären Sekundärmetaboliten und der Antibiotikaresistenz präsentierte sich *S. maltophilia* durchweg als virulenz- und resistenzfähig.

4.3 Genomsequenzierung der *S. maltophilia* Isolate SKK35 und RA8

Um weiteren Einblick in das genetische Potential und die Diversität von *S. maltophilia* zu erhalten, wurden zwei Isolate ausgewählt, deren vollständiges Genom mittels Illumina Sequenzier Technologie analysiert wurde. Es wurden der klinische, im Amöbenmodell virulente, Stamm SKK35 und der nicht-virulente Umweltstamm RA8 ausgewählt. Ein weiteres Kriterium für die Auswahl dieser Stämme war die Gruppierung von SKK35 und

RA8, welche in jeweils die gleichen genetischen Gruppen wie die bereits sequenzierten Stämme SKA14 und R551-3 fielen. Das sollte ein Mapping der *reads* auf eine Referenz erleichtern. Trotz derselben genetischen Gruppierung stellten sich große Unterschiede im Genom heraus. Daher wurde statt eines Referenzmappings ein *de Novo* Assembly der Daten durchgeführt.

Die 50 bp *paired-end reads* wurden mittels des *de novo* Assembly Programms Velvet zu *contigs* beziehungsweise *supercontigs/scaffolds* zusammengesetzt. Die anschließende Annotation der Gene erfolgte auf der GenDB-Plattform. Mittels der zur Verfügung stehenden Möglichkeiten war ein Assembly bis zum vollständig geschlossenen Genom nicht möglich, daher wurden die *supercontigs* annotiert. Generelle Informationen zu den Parametern des Assemblys und der Annotation sowie ein Vergleich aller bekannten/annotierten *S. maltophilia* Sequenzen sind in Tabelle 18 gegeben.

Tab. 18: Übersicht über das Gesamtgenom der bislang sequenzierten *S. maltophilia* Stämme. Die Sequenzen der Stämme SKK35, RA8 und SKA14 liegen als unvollständiges „draft“-Genom vor. ¹ORF=*open reading frame* (engl.: offenes Leseraster). ²N50=Qualitätsmaß für den *de novo Assembly*. ³n.v.=diese Daten waren nicht verfügbar.

Stamm	SKK35	RA8	K279a (Chrossman <i>et al.</i> 2008)	R551-3 (Taghavi <i>et al.</i> 2009)	SKA14 (Perrsson <i>et al.</i> 2009)
Größe	4.611.016 bp	5.021.753 bp	4.851.126 bp	4.573.969 bp	5.017.753 bp
mol % G+C	66,8	65,7	66,7	66,3	66,4
ORFs¹	4079	4348	4386	4041	4469
rRNAs	3	3	4	4	³ n. v.
tRNAs	68	63	74	76	64
Anzahl der <i>supercontigs</i>	325	397			
längster <i>supercontig</i>	213.677 bp	250.436 bp			
N50²	76.656	44.856			

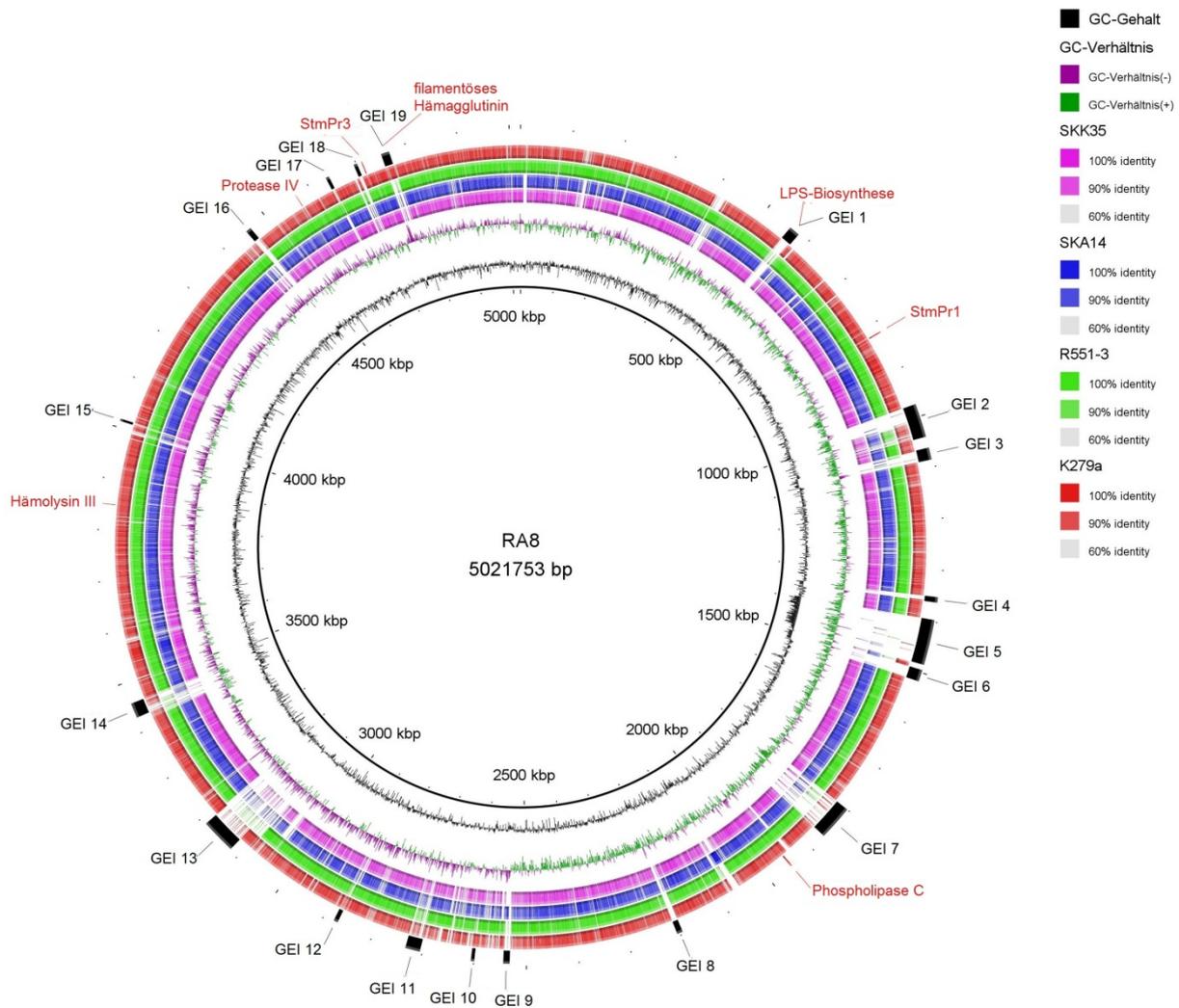


Abb. 18: Genomkarte von *S. maltophilia* RA8. Auf den einzelnen Ringen ist, dargestellt von innen nach außen: 1. der GC-Gehalt der Sequenz; 2. das Verhältnis von C/G als *GC Skew* $[(C-G)/(C+G)]$; 3. der neu sequenzierte klinische Stamm SKK35, und die Referenzstämme 4. SKA14, 5. R551-3 und 6. K279a. BLASTn Übereinstimmungen zwischen 100-60% sind in verschiedenen Helligkeitsabstufungen für das jeweilige Genom dargestellt. Als schwarze Bögen sind die genomischen Inseln (GEI) gezeigt. In rot sind einige potentielle Virulenzgene von *S. maltophilia* markiert. Die Abbildung wurde mit dem Blast Ring Image Generator angefertigt.

Ein Vergleich der neuen *S. maltophilia* Genomsequenzen mit den bisher bekannten Isolaten zeigte, dass sich die Sequenzen über ihre gesamte Länge hin in Deckung bringen lassen, jedoch an einigen Stellen auch größere Lücken aufweisen. Dies ist in Abbildung 18 gut zu erkennen. Diese zeigt eine Genom-Karte der drei Referenzstämme K279a, R551-3 und SKA14 sowie der Sequenz von SKK35, die auf das Genom von RA8 angepasst sind. Größere Regionen, > 3 kbp, die mindestens 4 ORFs (*open reading frames*, also potentiell für Proteine codierende Regionen) beinhalteten, wurden hier als genomische Inseln (GEI) benannt. In Abbildung 19 ist eine vergleichbare Genom-Karte für SKK35 mit RA8 und den

Referenzstämmen dargestellt. Potentielle Virulenzgene bzw. -regionen wurden in beiden Abbildungen markiert. Deren Vorkommen und die nähere Charakterisierung der GEIs ist in den folgenden Kapiteln dargestellt.

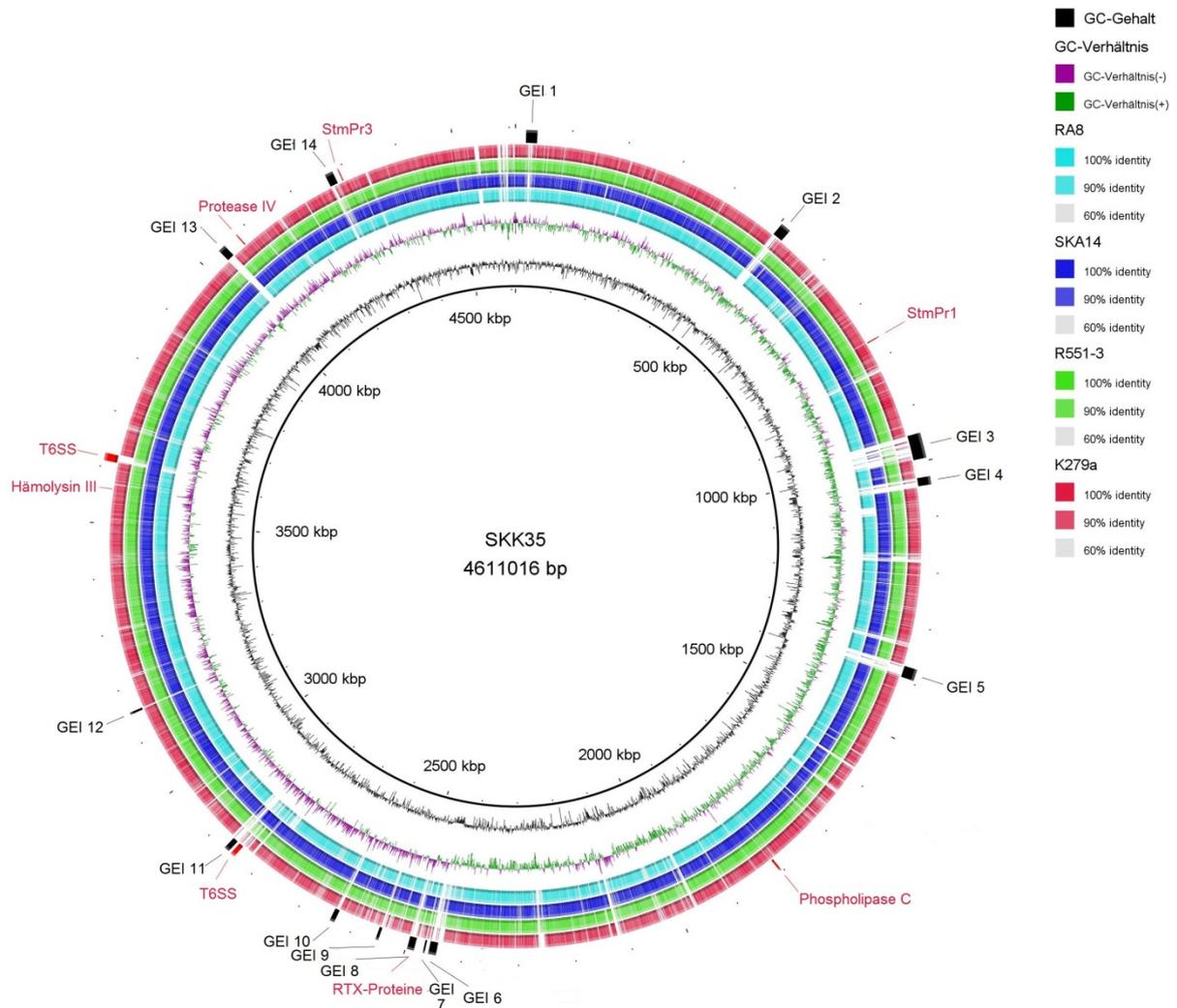


Abb. 19: Genomkarte von *S. maltophilia* SKK35. Auf den einzelnen Ringen ist, dargestellt von innen nach außen: 1. der GC-Gehalt der Sequenz; 2. das Verhältnis von C/G als $GC\ Skew = \frac{(C-G)}{(C+G)}$; 3. der neu sequenzierte Umweltstamm RA8 und die Referenzstämmen 4. SKA14, 5. R551-3 und 6. K279a. BLASTn Übereinstimmungen zwischen 100-60% sind in verschiedenen Helligkeitsabstufungen für das jeweilige Genom dargestellt. Als schwarze Bögen sind die genomischen Inseln (GEI) gezeigt. In rot sind einige potentielle Virulenzgene von *S. maltophilia* markiert. Die Abbildung wurde mit dem Blast Ring Image Generator angefertigt.

4.3.1 Vergleich der Antibiotikaresistenz-Gene bei *S. maltophilia*

Die Untersuchung der Antibiotikaresistenz von *S. maltophilia* als physiologischer Parameter zeigte zahlreiche Resistenzen gegenüber verschiedenen Antibiotika-Stoffklassen auf. Um deren genetische Grundlagen zu überprüfen, wurden die Genomsequenzen von *S. maltophilia* im Folgenden auf das Vorkommen von Antibiotikaresistenz-Genen hin betrachtet.

Multidrug-Effluxpumpen

Basierend auf dem Genom-Mapping mit Mauve konnten dreizehn verschiedene Regionen ausgemacht werden, die homolog zu Multidrug Effluxpumpen des RND-Typs sind. Davon sind neun bereits bekannt. Vier weitere Regionen, die beim bislang beschriebenen Stamm K279a nicht vorkommen, konnten entsprechend der Gen-Annotation zum RND-Typ zugeordnet werden. Die homologen Regionen im jeweiligen *S. maltophilia* Genom sind in Tabelle 19 gekennzeichnet.

Ein weiteres Antibiotika-Multidrug-Effluxsystem beruht auf Na⁺-getriebenen Effluxpumpen, den sog. MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion*)-Transportern. Bei allen *S. maltophilia* Stämmen konnten zwei Gene, die für diese MATE-Transporter-Proteine codieren, nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnten Proteine der Major-Facilitator Superfamilie (MFS) darunter ein Tetracyclin spezifischer Transporter, TetA, der MFS Klasse E, identifiziert werden.

Makrolid-Resistenzgene

Für Resistenzen gegenüber Makrolid-Antibiotika lagen Makrolid-Transporter-Gene bei allen *S. maltophilia* Stämmen vor. Diese gehören zur MacAB-ABC-Transporter-Familie, die für *E. coli* beschrieben wurde (Kobayashi *et al.*, 2001). Sie setzen sich zusammen aus einem Membran-Fusions-Protein MacA, dem inneren Membranprotein MacB und bilden einen dreiteiligen Komplex mit dem äußeren Membranprotein TolC. Vier Regionen, die homolog zu den *macAB*-Genen von *E. coli* sind liegen bei allen sequenzierten *S. maltophilia* Stämmen vor. Diese sind in Tabelle 20 aufgeführt. RA8 besitzt noch zwei weitere Makrolid-Transporter Regionen.

Tab 19: Potentielle und bekannte Multidrug-Effluxtransporter bei *S. maltophilia*.

Multidrug Efflux-pumpen	Typ	K279a	R551-3	SKA14	RA8	SKK35
SmeABC	RND	4474-76	3836-38	3930; 1453; 4119	4362-64	3107-09
SmeDEF	RND	4072-74	3468-70	1171; 1209; 477	3977	3284
SmeVWX	RND	1830-31; 1833	1567-68; 1570	864; 63; 1332	1676-79	2693-96
SmeYZ	RND	2201-02	1793-94	2600; 4106	2009-10	1907-08
SmeGH	RND	3170-71	2607-08	3586; 2940	3054	349 (unterbr.)
SmeMN	RND	3787-78	3203-04	4402; 2978	3751-52	542-43
SmeOP	RND	3924-25	3339-40	1897; 1049	3890	1934-35
SmeIJK	RND	4279-81	3689-91	4201; 2384; 4003	4206-08	1169-71
diese Arbeit	RND	2033-35	1636-38	2572; 3556; 789	2066-68	2341-42
diese Arbeit	RND	-	3610-12	-	4120-23	-
diese Arbeit	RND	-	-	1508; 3782; 2918	-	3640-42
diese Arbeit	RND	-	-	3991; 4392; 3100; 1839	-	-
diese Arbeit	MATE	1381	1160	121	1404	2152
diese Arbeit	MATE	4191	3598	518	4109	4015
emrA/emrB	MF	1528-30	1287-89	1423; 4032; 3976	1609-11	583-85
diese Arbeit	MF	1443-44	1211-12	1606; 614	1531-32	961-62
diese Arbeit	MF	3970-71	3379-80	190; 1865	3536-37	3313-14
diese Arbeit tet	MF	2832	2277	1849; 2214	2722	1625; 832

Dargestellt in einer Zeile sind die jeweils homologen Regionen auf dem Genom. Die Zuordnung basierte auf Sequenzhomologien mit den bereits von Chrossman *et al.* (2008) beschriebenen neun Effluxpumpen des RND-Typs. Basierend auf der Gen-Annotation konnten vier weitere Regionen identifiziert werden, die potentiell für RND-Effluxpumpen codieren, sowie zwei MATE-Transporter-Proteine und Export-Proteine der MF-Familie. Die Region, die bei SKK35 für SmeGH codiert, ist unterbrochen, da an dieser Stelle der *contig* endet. Auf GEIs (genomischen Inseln) lokalisierte Regionen sind grau unterlegt.

Tab 20: Potentielle Makrolid-Transporter-Gene bei *S. maltophilia*.

Resistenzgen	K279a	R551-3	SKA14	RA8	SKK35
macAB	1537-39	1296-98	1856; 3579; 4207	1616-18	594-96
macAB	2642-43	2115-16	3761; 4462	2536-37	1225-26
macAB	-	-	-	1764-66	-
macAB	-	2466-67	1911; 2068	2883-84	1257-58
macAB	4100-03	3500-03	3750; 81; 2367; 2739	4009-12	1820-23
macAB	-	-	-	4296-97	-
macAB	0360-62	0251-53	640; 995; 2166	466-68	2616-18

Dargestellt in einer Zeile sind die jeweils homologen Regionen auf dem Genom. Die Benennung macAB ist entsprechend einer Sequenzhomologie zu den macAB-Transporter-Genen von *E. coli* abgeleitet (Kobayashi *et al.*, 2001). Auf GEIs lokalisierte Regionen sind grau unterlegt.

Aminoglycosid-Resistenzgene

Bei allen *S. maltophilia* Stämmen lagen insgesamt vier Regionen vor, die potentiell für die Expression einer Aminoglycosid-Phosphotransferase notwendig sind. Ein 6'-N-Acetyltransferase-Gen war nur bei K279a zu finden. Die jeweiligen homologen Regionen für Aminoglycosid-Resistenzgene sind in Tabelle 21 zu finden.

Tab 21: Potentielle Aminoglycosid-Resistenzgene bei *S. maltophilia*.

	K279a	R551-3	SKA14	RA8	SKK35
Resistenzgen					
Aminoglycosid-6'-N-acetyltransferase	3615	-	-	-	-
Aminoglycosid-phosphotransferase	1131	0976	3958	1225	1877
Aminoglycosid-phosphotransferase	2120	1717	3234	2139	3920
Spectinomycin-phosphotransferase	2125	721	4135	2143	3917
Streptomycin-kinase	2336	1923	1304	2351	3561

Dargestellt in einer Zeile sind die jeweils homologen Regionen auf dem Genom. Auf GEIs lokalisierte Regionen sind grau unterlegt.

Weitere Antibiotikaresistenz-Gene, die bei allen *S. maltophilia* Stämmen nachzuweisen waren, sind die Beta-Lactamasen L1 und L2 sowie das *Smqnr*-Chinolon-Resistenz-Gen. Wie zu erwarten war, nachdem alle getesteten *S. maltophilia* Isolate sensibel gegenüber Trimethoprim/Sulfamethoxazol waren, wurden die Resistenzgene *sul1* und *sul2* bei keinem der Isolate gefunden.

4.3.2 Vergleich der potentiellen Virulenzgene bei *S. maltophilia*

Protein-Sekretionssysteme

Über Protein-Sekretionssysteme sind die Bakterien in der Lage, Effektorproteine aus der Zelle heraus und zum Teil in andere Zellen hinein zu transportieren. Der Vergleich der Genomsequenzen zeigte, dass alle fünf *S. maltophilia* Stämme ein T1SS, T2SS und ein T5SS besitzen. Bei keinem kommt ein T3SS vor. T4SS-Gene wurden bei K279a, R551-3 und RA8, nicht aber bei SKA14 und SKK35 gefunden. Im Gegensatz dazu besaßen nur SKA14 und SKK35 ein T6SS. Tabelle 22 zeigt die spezifischen Regionen für die Sekretionssysteme.

Tab 22: Potentielle Protein-Sekretionssysteme in den *S. maltophilia* Genomsequenzen.

Sekretionssystem	K279a	R551-3	SKA14	RA8	SKK35
T1SS	-	-	-	4243-4244	-
T1SS	-	-	-	-	1685-86
T2SS	0687-97	0546-56	1236; 1379; 2177; 4485; 2596; 2257; 3882; 218; 274; 2297; 1285	754-64	1848-54; 2051; 2849
T2SS	2732; 2740-46	2204; 2209-15	4148; 3424; 3314; 3546; 492; 3575; 1243; 3945	2640; 2647-53	4086-92; 4097
T4SS	1283-91	-	-	3179-89	-
T4SS	2997- 3008	2439-51	-	2857-69	-
T5SS Autotransporter Adhäsion	0880	0734	-	936	-
T5SS Autotransporter Protein	1001	0734	-	936	-
T5SS Autotransporter Protein	1009	0847	2147	1110+1111	2208
T5SS Autotransporter Serin-Protease	1350	1135	2556	1373	442
T5SS Autotransporter Hämagglutinin	2737	2206	4023	-	2642
T5SS Autotransporter Adhäsion	2834	2288	-	2733-37	-
T5SS Autotransporter Serin-Protease	3524	2954	4181	1913	1898
T5SS Autotransporter Lipase/Esterase	3773	3188	520	3714	526
T5SS Autotransporter Adhäsion	4018	3419	3008	3932	1328+3341
T5SS Autotransporter Serin-Protease	4145	3549	3970	4058	4058
T6SS	-	-	965; 779; 1926; 261; 2607; 4166; 3152; 2991; 4316; 3356; 2507	-	1084-1095
T6SS	-	-	3388; 3746; 4150; 3331	-	2268-2274

Dargestellt in einer Zeile sind die jeweils homologen Regionen auf dem Genom. Auf GEIs lokalisierte Regionen sind grau unterlegt.

Adhäsionsfaktoren

Die genetische Grundlage für Adhäsionsfaktoren wie Pili und Fimbrien lag für alle *S. maltophilia* Isolate vor. Das Smf-1 fimbriale Operon konnte bei allen fünf sequenzierten Isolaten nachgewiesen werden, ebenso wie die notwendigen Gene zur Ausbildung von Typ-IV-Pili. Im Detail sind diese in Tabelle 23 und 24 dargestellt. Auch das im *Twitching* defiziente Isolat SKK35 besaß die für die Ausbildung von Pili notwendigen Gene. Umgekehrt besaß das Isolat RA8 Gene für die Ausbildung von Flagellen, war allerdings im Experiment nicht schwimmfähig.

Tab 23: Gene involviert in die Ausbildung des Flagellenapparates von *S. maltophilia*.

Flagellares System						
Funktion	Gene	K279a	R551-3	SKA14	RA8	SKK35
Flagellenmotor	motAB	561-62	438-39	4293; 128	628-29	3091-92
Chemotaxis		1402	1169	970	1489	2173
Chemotaxis	CheRB	2142-43	1738-39	2026; 2103	2160-61	3900-01
Chemotaxis	SmpA	2242	-	-	-	-
Chemotaxis	CheBDR	2248-51	1843-46	4308; 252; 4374; 176	2255-58; 2263	2471-72; 4071
Chemotaxis	CheW; CheAy	2254; 2256; 2258; 2260-61; 2263	1847; 1849; 1851; 2852- 53; 1855	3683; 2053;----; 2455; 797; 1214	2265; 2267; 2270; 2273-75; 2278	4073; 383;---; 362; 556; 558
Flagellenmotor	motD; cheAZY; fliA	2265-70	1857-62	2471; 1820; 2500; 1224; 2929; 2401	2280-86	1065-67; 766- 769
Sekretion	flhFAB	2272-74	1864-66	1832; 570; 1125	2288-91	765; 1330-31
Sekretion, Zusammen- setzung, Regulierung	fliRQPON MLKJIH GFE	2277-90	1868-81	2912; 615; 2486; 1774; 3162; 2966; 2790; 2180; 2555; 3029; 2475; 1385; 1882; 227	2293-2306	1333-46
Zusammen- setzung, Regulierung	fliSD	2302-03	1891-92	4110; 3364	231-165	1458-95
Flagellen Bestandteile	Flagellin	2304	1893	-	2318	-
Flagellen Bestandteile	Filament; Flagellin	-	-	-	-	415-16
Flagellen Bestandteile, Flagellin; Chemotaxis, Regulation	Flagellin; flgLJIHG FEDCBW AM	2306-20	1895-1909	1727; 1729; 3290; 1629; 1805; 1936; 346; 68; 3390; 1354; 440; 3099; 3242; 2751	2322-37	3533-47
Chemotaxis		2330	1917	4343	2345a	3555
Chemotaxis		2954	2405	1829	2823	3648
Chemotaxis		4138	3537	2136	4044-45	4068-69

Dargestellt in einer Zeile sind die jeweils homologen Regionen des Genoms. Die Auswahl basierte auf der Zuordnung zur KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)-Datenbank. Auf GEIs lokalisierte Regionen sind grau unterlegt.

Tab 24: Gene involviert in die Ausbildung von Pili und Fimbrien bei *S. maltophilia*.

Pilus System						
Funktion	Gene	K279a	R5513	SKA14	RA8	SKK35
Twitching Motilität Proteine	pilU	612	483	3358	689	1474
Fimbriale Proteine	smfl	706	561	3834	769	2843
Biogenese (äußeres Membranprotein)		708	563	3645	771	2842
Pilus Assembly Protein	pilZ	1037	879	803	1155	3467
Twitching Motilität Proteine	pilTU	1089-90	931-32	1573; 2926	1185-86	3416-17
Pilus Assembly Protein	pilW	1323	1380	1949	1706	868
Fimbriale Proteine		1508	1267	24	1590	2969
Fimbriale Proteine		1511-12	1270-71	4230-2004	1592; 1594	2963-64; 2967
Pilus Assembly Protein	pilVXYE	1622; 1624-26	1379; 1381-83	3452; 2870; 2797; 1907	1705; 1707-09	867; 869-71
Pilus Assembly Protein	pilF/W	Smlt2056	1658	4013	2086	2321
Pilus Assembly Proteine		2867-68; 2870-73	2317-18; 2320-23	1339; 255; 1381; 2566; 3849; 682	-	1997-98; 409-10
Twitching Motilität Regulation		3598	3018	350	3501	4252
Twitching Motilität Proteine	cheAW; pilEJIHG	3668-74	3083-89	148; 2315; 1836; 2467; 4387; 2714; 714	3602-10	4170-77
Twitching Motilität Protein; Pilus Assembly Proteine	pilS	3754-60	3165-67; -- ; 3177-78	3320; 663; 497; --; 2507; 4486	3684-87; -- ; 3695-96	507-10; -- ; 513-14
Pilin		3787-88	-	-	-	-
Pilin		-	3175-76	-	-	-
Pilus Assembly Proteine	pilQPONM	3821-25	3236-40	1300; 2590; 4436; 3979; 1646	3789-93	1458-61; 1463
Pilus Assembly Proteine	fimA; papCD	-	-	2627; 3569; 3353; 2682; 1118	-	-
Pilus Assembly Proteine	fimA; papCD; Adhäsine	-	-	-	2548-2556	-

Dargestellt in einer Zeile sind die jeweils homologen Regionen des Genoms. Die Auswahl basierte auf der Zuordnung zur KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)-Datenbank. Auf GEIs lokalisierte Regionen sind grau unterlegt.

Extrazelluläre Sekundärmetabolite

Extrazelluläre Sekundärmetabolite, die möglicherweise zur Virulenz von *S. maltophilia* beitragen, sind DNasen, Hämolyse und Hämagglutinine, Proteasen, Esterasen bzw. Phospholipasen sowie Siderophore. Wie man Tabelle 25 entnehmen kann, kamen die meisten dieser Virulenzgene bei allen *S. maltophilia* Isolaten vor und sind nicht nur auf den im Amöbenmodell virulenten Stamm SKK35 beschränkt. Eine Ausnahme davon bilden

Hämagglutinine sowie Hämoglobin-bindende Proteine, die zwar generell bei allen *S. maltophilia* Stämmen vorkommen, allerdings meist nicht homolog sind.

Tab 25: Potentielle Virulenzgene von *S. maltophilia*.

Protein	Gene	K279a	R551-3	SKA14	RA8	SKK35
DNase		3212	2645	664	3088	3367
Hämolyisin III		3638	3054	3402	3570	4210
nicht fimbriales Adhäsion	afaD	4423	-	-	-	-
filamentöses Hämagglutinin		1390	-	-	-	-
filamentöses Hämagglutinin		4452	-	-	-	-
filamentöses Hämagglutinin		-	0113	-	327a-328	-
filamentöses Hämagglutinin	fhaB	-	-	-	4348	-
Hämagglutinin ähnliches Adhäsion		3829	3254	-	3796	-
T5SS Autotransporter Hämagglutinin		2737; 2728	2206; 2200	4227; 4023	2642; 2436	4095-4096; 4101
Hämoglobin bindendes Protein	hgbB	-	-	-	3546	-
Hämoglobin bindendes Protein	hgbB	4432	3813	802	4431	1494
Hämoglobin bindendes Protein	hgbB	-	-	-	-	1042
Hämoglobin bindendes Protein	hgbC	3478	2904	3181	3404	2402
Serin-Protease	StmPr1	0861	0712	2363	919	1038
Serin-Protease		0381	0267	1532	482	672
Serin-Protease		0686	0545	1641	753	1846
Serin-Protease		0746				
T5SS Serin-Protease		1350	1135	2556	1373	442
Serin-Protease	sphB	3524	2954	4181	1913	1898
T5SS Serin-Protease		4145	3549	3970	4058	4058
Serin-Protease		4420	-	-	-	-
Serin-Protease		-	-	-	2498	-
Serin-Protease	StmPr3	4395	3789	1164	4307	3039
Serin-Protease	yapH	1009	0854	2147	1111	2208
Clp-Protease	clpAPS	0989-91	0836-38	4170; 3933; 696	1039-41	4352; 4354-55
Clp-Protease	clpAPS	2335-37	1922-24	3722; 1069	2350-52	3560-62
Protease IV	sppA	4190	3597	2320	4180*	4016
Metallprotease	ppqL/ ptrA	0203	0165	4321	380	4321
Metalloprotease		0006	0005	3829	4561	3681
Metalloprotease		0445	0327	3392	522	908
Metalloprotease		1499	1258	196	1580	2978+2979
Autotransporter Lipase/Esterase		3773	3188	520	3714	526
potentielle Lipase		0625	-	-	-	-
Phospholipase B		0080 ; - 3053	0035; -; -	3989; -; -	250; -; -	3490; 3485; -
Phospholipase C	plcN1	1755	1494	1612	1895	1412-14
Phospholipase A		3218	2651	2962	3094	3375
Phospholipase D		3521; 0013; 4597; 2111; -; -; -	2951; 0012; 3949, 1708; -; -; -	253; 2278; 2480; 3191; 403; -; -3053	1910; 226; 4472; 2130; -; -; -	777; 760; 2897; 3925; 837; 950;
Siderophor Enterobactin Synthetase	entACF	2817-18; 2822	2271-72; 2276	2204; 2720, 4280	2116-17; 2721	1619-20; 1624
RTX-Toxin	frpAC	-	-	-	-	1683-84

Dargestellt in einer Zeile sind die jeweils homologen Regionen des Genoms. Auf GEIs lokalisierte Regionen sind grau unterlegt. Mit * markierte Regionen beinhalten potentiell eine Verschiebung des Leserahmens.

4.3.3 Genomische Inseln bei *S. maltophilia*

Durch ein Alignment der fünf Genomsequenzen mittels Mauve konnten diejenigen Abschnitte definiert werden, die in diesem Vergleich einzigartig für den jeweiligen Stamm waren, d.h. ORFs (*open reading frames*) oder Gen-Cluster, die keine Sequenzhomologie zu den anderen Stämmen aufwiesen. Solche genomischen Inseln (GEI) waren für alle Stämme zu finden, waren aber in der Anzahl und Größe unterschiedlich. Es konnte zwischen solo ORFs, 1-3 ORFs, die an unterschiedlichen Stellen im jeweiligen Genom inseriert waren, und großen Inserts, 4 ORFs und mehr unterschieden werden. *S. maltophilia* K279a und SKA14 besaßen die meisten einzigartigen ORFs, R551-3 besaß die wenigsten ORFs. Die genaue Verteilung ist Tabelle 26 zu entnehmen.

Tab. 26: Einzigartige ORFs (*open reading frames*) bei *S. maltophilia*.

Dargestellt für die verglichenen Genomsequenzen von *S. maltophilia* ist jeweils: 1. die Anzahl der ORFs des Gesamten Genoms; 2. die Anzahl der ORFs, die nur bei diesem Genom vorkommen; 3. die Prozentzahl, welchen Anteil des Gesamtgenoms diese ausmachen; 4. die Anzahl der genomischen Inseln; 5. die ORFs, die auf Genomische Inseln entfallen; 6. & 7. die Größen der kleinsten und der größten genomischen Insel sowie 7. die Anzahl der ins Chromosom eingliederten solo ORFs.

Stamm	¹ ORFs Gesamt	² Anzahl der einzigartigen ORFs	³ Anteil der einzigartigen ORFs	⁴ Anzahl Genomische Inseln (≥ 4 ORFs)	⁵ GEI ORFs	⁶ kleinste Genomische Insel	⁷ größte Genomische Insel	⁸ solo ORFs (1-3 ORFs)
K279a	4386	722	16,6 %	25	565	4.061 bp	109.757 bp	157
R551-3	4041	185	4,6 %	8	126	7.229 bp	41.037 bp	59
SKA14	4469	699	15,6 %	23	618	7.941 bp	93.221 bp	81
RA8	4348	450	10,3 %	19	398	4.491 bp	67.591 bp	56
SKK35	4079	248	6,2 %	14	143	3.871 bp	45.339 bp	105

GEI und Prophagen

Die meisten GEIs stehen im Zusammenhang mit Insertionselementen wie Integrasen und Transposasen. Oft sind die besonders großen genomischen Inseln durch Phagen übertragen und als sogenannte Prophagen in das Genom integriert. Phagen sind häufig in verschiedenen funktionalen Stadien in die Bakterien-DNA integriert. Sie können weitere, Nicht-Phagen-Gene aufnehmen und diese im Laufe ihres Reproduktionszyklus auf andere Bakterienspezies übertragen. Das macht sie zu wichtigen Akteuren des Mechanismus des horizontalen Gentransfers (Juhas *et al.*, 2008). SKA14 besaß insgesamt sieben Regionen mit einzigartiger Phagen-DNA. Bei K279a waren es fünf Regionen, bei R551-3 dagegen lagen nur zwei und bei RA8 und SKK35 jeweils nur eine Region vor. D.h. die bedeutend höhere Anzahl an

einzigartigen ORFs bei K279a und SKA14 konnte weitestgehend auf die DNA-Übertragung durch Phagen zurückgeführt werden.

GEI und Schwermetall-Resistenz

K279a und SKA14 besaßen große Regionen (108 bzw. 88 ORFs), welche Schwermetall-Resistenz vermitteln. Auf kleineren genomischen Inseln und solo ORFs waren weitere Schwermetallresistenzgene zu finden. Diese sind genauer in Tabelle B aufgeführt.

Tab. 27: *S. maltophilia* GEIs mit Regionen, die Schwermetallresistenzgene beinhalten. Die Gene liegen zwar zum Teil bei mehreren *S. maltophilia* Stämmen vor, sind aber nicht homolog. In der gleichen Farbe gekennzeichnete Regionen liegen auf derselben genomischen Insel.

Funktion	Gene	K279a	R551-3	SKA14	RA8	SKK35
Arsen-Resistenz	<i>ars</i>	Smlt0176-79	Sml1977	SSKA14_1896; 680; 1273	RA8_2696-98	SKK35_2217-20
		Smlt2419-25				
Nickel-Kobalt-Resistenz	<i>cnr</i>			SSKA14_595; 2099; 461		
Quecksilber-Resistenz	<i>mer</i>	Smlt2409-12				
Kupfer-Resistenz	<i>cus</i>	Smlt2433-34				
Kupfer-Resistenz	<i>cop</i>	Smlt2440-49		SSKA14_2823; 2763; 1046; 3323; 3409		
Kobalt-Zink-Cadmium-Resistenz	<i>czc</i>	Smlt2456-59		SSKA14_4326; 1073	RA8_2693	
				SSKA14_273; 1030; 623		
Tellur-Resistenz	<i>ter</i>				RA8_1122-23; 1125; 1131	

Arsenresistenzgene kamen bei allen *S. maltophilia* Stämmen vor. Ein Gen für die Arsenat-Reductase (*arsC*) war dabei Bestandteil des Kern-Genoms und zeigte eine homologe Region bei allen Isolaten. Weitere Gene, die Arsenresistenz vermitteln (*arsCRH*), zeigten dagegen keine Sequenzhomologie und sind auf genomischen Inseln lokalisiert. Ähnlich verhält es sich mit den Kobalt-Zink-Cadmium-Resistenzgenen (*czcABCD*) und den Kupferresistenzgenen (*copABDL*), die sowohl einen Bestandteil des Kern-Genoms darstellten, als auch auf genomischen Inseln von K279a, SKA14 und RA8 zu finden waren. Quecksilberresistenzgene (*merRTPA*) lagen dagegen nur bei K279a vor, die Nickel-Kobalt-Resistenzgene (*cnrRC*) nur bei SKA14, und Tellurresistenzgene (*terADEZ*) nur bei RA8.

GEI und Antibiotikaresistenz

Neben den Schwermetallresistenzgenen waren auch einige Antibiotikaresistenz-Gene auf genomischen Inseln zu finden. RA8 besaß zwei individuelle Makrolid-Effluxpumpen (vgl. Tabelle 21). Proteine der Beta-Lactamase-Familie lagen bei allen *S. maltophilia* Stämmen vor und waren häufig als solo ORFs im Genom lokalisiert. Darüber hinaus lagen eine Aminoglycosid-Acetyltransferase und eine Chloramphenicol-Acetyltransferase nur bei K279a vor.

GEI und Virulenzfaktoren

Einige Regionen, die für die Ausbildung von Flagellen und Pili verantwortlich sind, waren auf genomischen Inseln oder solo ORFs zu finden, der wesentliche Teil der Motilitätsgene war aber Bestandteil des Kern-Genoms (vgl. Tabelle 24). Weitere Virulenzgene, die nur bei einzelnen *S. maltophilia* Isolaten vorkommen, sind in Tabelle 25 hervorgehoben. Auffallend war, dass Adhäsine, wie das filamentöse Hämagglutinin, bei K279a, R551-3 und RA8, nicht aber bei SKK35 und SKA14 vorkamen. Die Adhäsine zeigten nur eine geringe Sequenzhomologie oder waren auf genomischen Inseln lokalisiert. Alle *S. maltophilia* Stämme besaßen Gene, die für die Phospholipasen A, B, C und D codieren. Darüber hinaus waren, als Bestandteil von genomischen Inseln, noch weitere Phospholipase D und Lysophospholipase B Gene bei SKA14, SKK35 und K279a zu finden. Eine genomische Insel von RA8 wies einen Gen Cluster mit LPS-Biosynthesegenen auf (RA8_694a-708), der unter anderem auch ein weiteres Phosphoglucomutase Gen beinhaltete. Bei K279a liegt ein Cluster vor, der unter anderem für einen ABC-Transporter, ein LPS-O-Antigen Biosynthesegen, mehrere Glycosyltransferasen und eine Lipase codiert (Smlt0618-0644).

Von besonderer Bedeutung war eine GEI-Region bestehend aus vier ORFs bei SKK35. Diese Gene codieren vermutlich für Proteine der RTX (*repeats-in-toxin*)-Familie und ein Typ-1-Sekretionssystem, welches auch für die Sekretion der Proteine zuständig ist. Das Vorkommen von RTX-Proteinen wurde bislang noch nicht bei *S. maltophilia* beschrieben.

RTX-Proteine bei *S. maltophilia* SKK35

Nur bei *S. maltophilia* SKK35 liegen Gene vor, die aufgrund von Aminosäuresequenz-Homologien zu der sog. RTX-Familie zugerechnet werden können. Die automatische Annotation durch GenDB benannte diese als *frpA* (SKK35_joined_1684) und *frpC* (SKK35_joined_1683) entsprechend den RTX-Proteinen von *Neisseria meningitidis*. Charakteristika, die zur Zuordnung zu dieser hoch diversen Proteinfamilie führten, waren Ca^{2+} -Bindestellen am C-terminalen Ende der Aminosäure (COG 2931), die durch wiederholte Aminosäuresequenzen mit der Abfolge GGXGGXD gebildet werden, wobei X für eine beliebige Aminosäure steht. Ein weiteres Charakteristikum war die Sekretion der Proteine durch ein Typ-1-Sekretionssystem (T1SS). Proteine der RTX-Familie sind Exoproteine mit verschiedenen biologischen Funktionen. Oft sind es Leukotoxine, Bakteriocine oder hydrolytische Enzyme mit Metalloprotease- oder Lipase-Aktivität (Linhartová *et al.*, 2010). Daher kommen sie als potentielle Virulenzgene von *S. maltophilia* in Frage. Direkt benachbart befanden sich die T1SS Gene *lktD* (SKK35_joined_1685), homolog zum Leukotoxin-Sekretionsprotein D von *Mannheimia haemolytica* und *hlyB* (SKK35_joined_1686), welches eine ATP-bindende Kasette exprimiert. Insgesamt bildet diese Genregion eine genomische Insel von 12.137 bp Größe (Abbildung 20). In der Nähe befanden sich keine Elemente, die auf den Erwerb dieser Region durch horizontalen Gentransfer schließen ließen. Der mol % GC-Gehalt der RTX-Gene entsprach mit ca. 66% dem des gesamten Genoms von *S. maltophilia* SKK35, was untypisch für eine Pathogenitätsinsel ist.

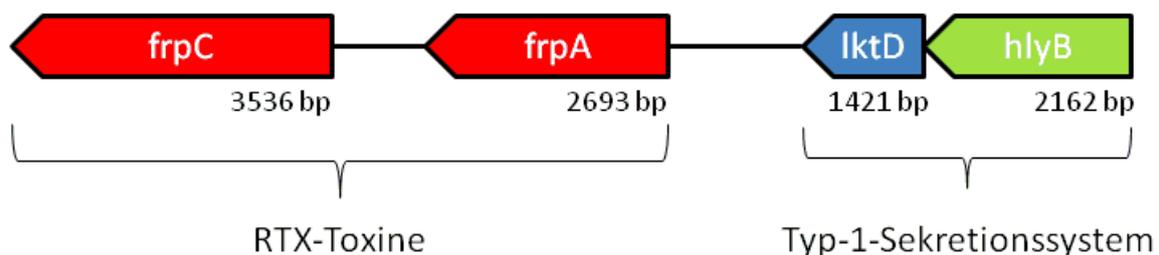


Abb. 20: Genomische Insel von *S. maltophilia* SKK35. 12137 bp Region, die für Proteine der RTX-Familie und ein Typ-1-Sekretionssystem codiert.

4.4 Nähere Charakterisierung und Verbreitung der *S. maltophilia* RTX-Gene und des Typ-6-Sekretionssystems

Da die RTX-Proteine und das T6SS als potentielle Virulenzgene von *S. maltophilia* noch nicht näher beschrieben wurden, lag der weitere Fokus dieser Arbeit auf dem Nachweis und der Genexpression dieser Komponenten.

4.4.1 PCR-Nachweis der Gene für die RTX-Proteine *frpA* und *frpC*

Basierend auf den jetzt bekannten Sequenzen der *frpA*- und *frpC*-Regionen bei *S. maltophilia* SKK35 wurden PCR-Primer zum Nachweis dieser Regionen entworfen. Da sowohl bei *frpA* als auch bei *frpC* durch das *Scaffolding* noch Lücken im Gen waren, wurden darüber hinaus Primer entworfen, die vor und hinter den unbekannt Sequenzen binden, um diese durch Sanger-Sequenzierung schließen zu können. Das Primerpaar *frpA* amplifiziert eine 495 bp lange Sequenz des *frpA*-Gens; die Primerpaare *frpA_gap1* und *frpA_gap2* binden jeweils vor und hinter zwei Lücken im *frpA*-Gen. Das Primerpaar *frpC* amplifiziert einen 762 bp Bereich des *frpC*-Gens, während *frpC_gap1* vor und hinter einer Lücke in der bekannten Sequenz bindet. Durch Sequenzierung der jeweiligen Abschnitte mit der Sanger Methode war es möglich, die Lücken im Gen zu schließen und es konnte nachgewiesen werden, dass die entworfenen Primer tatsächlich an die gewünschte Zielregion binden und diese amplifizieren konnten.

In PCR-Versuchen wurde die *S. maltophilia* Test-Stammsammlung nach dem Vorhandensein der *frpA* und *frpC*-Gene untersucht. Als Ziel-DNA wurde die isolierte genomische DNA der 59 Isolate, die auch in den Virulenzuntersuchungen eingesetzt wurden, verwendet. Drei Primerpaare, die an das *frpA*-Gen, und zwei Primerpaare, die an das *frpC*-Gen binden, wurden eingesetzt. Mittels PCR ließ sich bei keinem Stamm außer SKK35 das Vorhandensein der für RTX-Proteine codierenden Gene nachweisen.

4.4.2 Medium-abhängige Genexpression von *frpA* und *frpC* durch *S. maltophilia* SKK35

RNA wurde aus verschiedenen Ansätzen zur Kultivierung von *S. maltophilia* SKK35 isoliert. Hierzu wurde eine Vorkultur der Bakterien jeweils über Nacht bei 30°C in LB-Medium angezogen. Die Bakteriensuspension wurde dann abzentrifugiert, einmal mit M9-Medium gewaschen und dann mit dem eigentlichen Testmedium bei 30°C für vier Stunden bebrütet. Die hierbei eingesetzten Medien waren: M9-Medium, M9-Medium mit 0,2 µM FeSO₄ angereichert und LB-Medium sowie Medien, die die Nährstoffgehalte von Körperflüssigkeiten nachstellen: M9-Medium mit 10% FKS (fötale Kälberserum), AUM (künstliches Urinmedium) sowie M9-Medium mit 5% humanem Blut angereichert. Ferner wurde die RNA aus Co-Kultur mit Amöben extrahiert. Dabei wurden Amöben und Bakterien im Verhältnis 1x10⁸ Bakterien zu 1x 10⁵ Amöben pro Ansatz in M9-Medium für 24 Stunden angezogen.

Die isolierte RNA wurde mit Random Hexamer Primern in cDNA umgeschrieben. Vorher wurde mittels NanoDrop die RNA-Konzentration bestimmt und die eingesetzte Konzentration der RNA für die Reverse Transkription (RT) wurde auf 1000 ng RNA/RT-Ansatz eingestellt. Die Positivkontrolle für eine erfolgreiche Reverse Transkription der RNA in cDNA erfolgte anhand einer PCR mit 16S rRNA-Primern. Als Positivkontrolle (+K) für die PCR-Reaktion diente ein genomischer DNA-Extrakt von SKK35. Als Negativkontrolle (-K), um mögliche DNA-Kontamination der Probe nachzuweisen, wurde die isolierte RNA in dem Verhältnis verdünnt, wie sie bei der Reversen Transkription eingesetzt wurde, und ebenfalls als Ziel-DNA in der PCR-Reaktion benutzt. In Abbildung 21 sind die PCR-Produkte der Reaktion mit den Primern für das *frpA*-Gen zu sehen. Die Kontroll-PCR mit der entsprechend verdünnten RNA (hier exemplarisch gezeigt) fiel in allen Fällen negativ aus, ein Einfluss durch Reste genomischer DNA kann somit ausgeschlossen werden.

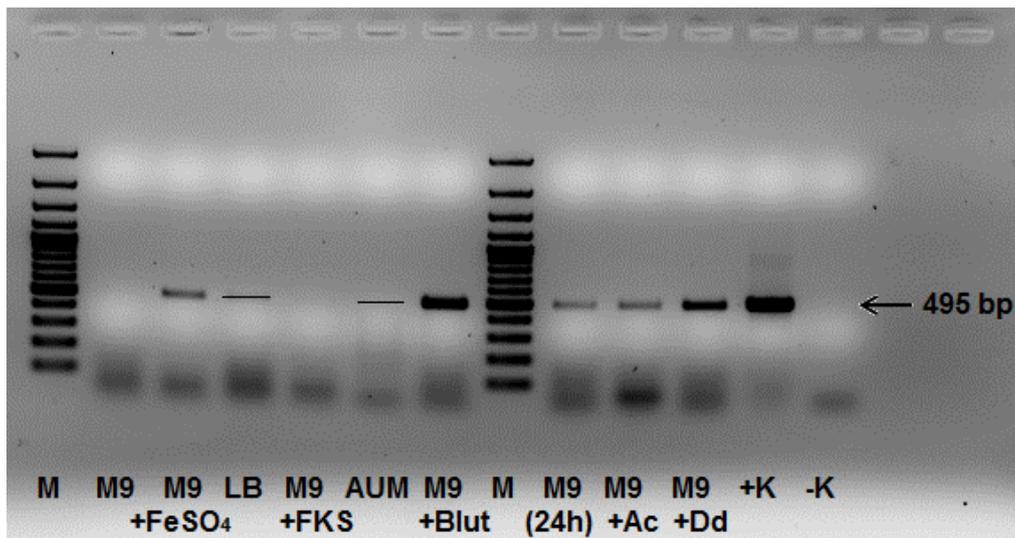


Abb. 21: Nachweis der Genexpression des *frpA*-Gens durch PCR der cDNA. RNA wurde aus Kulturen von *S. maltophilia* SKK35 in verschiedenen Nährmedien, in der exponentiellen Wachstumsphase, isoliert. RNA von *S. maltophilia* SKK35 in Co-Kultur mit Amöben wurde in der stationären Wachstumsphase isoliert. Die Reverse Transkription zu cDNA, die in einer PCR-Reaktion mit spezifischen Primern für das *frpA*-Gen eingesetzt wurde, erfolgte mit Random Hexamer Primern. Eine Negativkontrolle auf mögliche DNA-Kontaminationen hin, mit der isolierten RNA als Template, fiel in allen Fällen negativ aus und wurde daher nur exemplarisch dargestellt. Zu sehen sind die PCR-Produkte, von links nach rechts: M=100 bp Marker; M9 = M9-Medium nach 4 Stunden; M9+FeSO₄=M9-Medium mit 0,02M Eisensulfat, LB = Luria Bertani Medium; M9+FKS = M9 mit 10 % fötalem Kälberserum; M9+Blut = M9 mit 5% humanem Blut; M = 100 bp Marker; M9(24h) = M9 nach 24 Stunden; M9+Ac = Co-Kultur mit *A. castellanii* in M9; M9+Dd = Co-Kultur mit *D. discoideum* in M9; +K = Positivkontrolle mit genomischer DNA von SKK35; -K = Negativkontrolle. Banden, die im Fall von LB und AUM nur sehr schwach zu sehen waren, sind hervorgehoben.

Die Kultur von SKK35, die nur in M9-Medium angezogen wurde, zeigte keine Expression des *frpA*-Gens. M9-Medium unter Zugabe von FeSO₄ dagegen zeigte eine Bande von 495 bp Länge. Dies sprach für eine Expression des RTX-Protein-Gens. Schwächere, aber sichtbare Banden waren für LB-Medium, ebenso wie für das künstliche Urinmedium (AUM) erkennbar. M9 in Addition von 10% Kälberserum zeigte keine Genexpression. Eine besonders starke Bande dagegen war bei der mit humanem Blut supplementierten Probe zu erkennen. Die Co-Kulturen von Bakterien und Amöben sind über 24 Stunden angezogen worden. Hier ist auch bei der Probe, die als Kontrolle nur M9-Medium enthielt, eine schwache Bande zu erkennen. Deutlichere Banden sind auch in Co-Kultur mit *A. castellanii* und besonders mit *D. discoideum* auszumachen. Auch hier war die RNA-Kontrolle negativ.

Betrachtet man die Expression des *frpC*-Gens, dargestellt in Abbildung 22, kann man ähnliche Bandenverteilungen sehen. Wieder zeigte die Kultur mit M9-Medium nach vier Stunden keine nachweisbare Expression und erst nach 24 Stunden war eine schwache Bande zu erkennen. Eiseninduzierte Genexpression ließ sich in der Probe mit FeSO₄ erkennen, ebenso im Vollmedium LB und AUM. Die Zugabe von FKS schien keinen Einfluss auf die

Genexpression zu haben. Wiederum ist die stärkste Bande unter Zugabe von 5% humanem Blut im Medium zu verzeichnen. Weitere Banden bei einer Höhe von ca. 250 bp, resultierend aus Fehlpaarungen der Primer, sind bei M9 plus FeSO₄ und M9 plus Blut zu sehen. Diese ließen sich auch durch Anpassung der Annealing Temperatur nicht vollständig vermeiden.

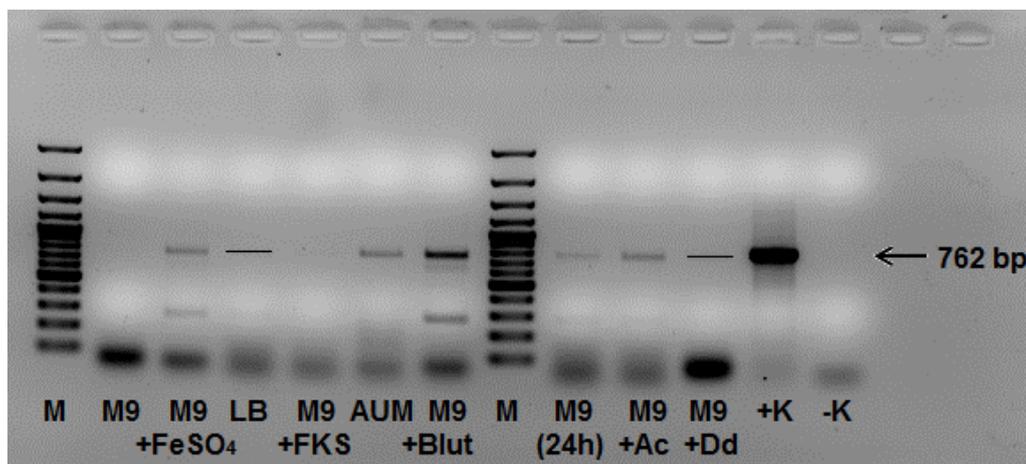


Abb. 22: Nachweis der Genexpression des *frpC*-Gens durch PCR der cDNA. RNA wurde aus Kulturen von *S. maltophilia* SKK35 in verschiedenen Nährmedien, in der exponentiellen Wachstumsphase, isoliert. RNA von *S. maltophilia* SKK35 in Co-Kultur mit Amöben wurde in der stationären Wachstumsphase isoliert. Die Reverse Transkription zu cDNA, die in einer PCR-Reaktion mit spezifischen Primern für das *frpC*-Gen eingesetzt wurde, erfolgte mit Random-Hexamer-Primern. Eine Negativkontrolle auf mögliche DNA-Kontaminationen hin, mit der isolierten RNA als Template, fiel in allen Fällen negativ aus und wurde daher nur exemplarisch dargestellt. Zu sehen sind die PCR-Produkte, von links nach rechts: M = 100 bp Marker; M9 = M9-Medium nach 4 Stunden; M9+FeSO₄ = M9-Medium mit 0,02M Eisensulfat, LB = Luria Bertani Medium; M9+FKS = M9 mit 10 % fötalem Kälberserum; M9+Blut = M9 mit 5% humanem Blut; M = 100 bp Marker; M9(24h) = M9 nach 24 Stunden; M9+Ac = Co-Kultur mit *A. castellanii* in M9; M9+Dd = Co-Kultur mit *D. discoideum* in M9; +K = Positivkontrolle mit genomischer DNA von SKK35; -K = Negativkontrolle. Banden, die im Fall von LB und M9+Dd nur sehr schwach zu sehen waren, sind hervorgehoben.

4.4.3 PCR-Nachweis des *hcp1*-Gens für die Bildung des Protein-Tubus des Typ-6-Sekretionssystems

Zum Nachweis des T6SS bei *S. maltophilia* wurde ein, für das *hcp*-Gen des T6SS spezifisches, PCR-Primerpaar entworfen. Die Primer basieren auf den Sequenzen des *hcp1*-Gens von *S. maltophilia* SKK35 und SKA14 und decken mit 478 bp fast die gesamte Länge des 498 bp großen *hcp1*-Gens ab. Als Ziel-DNA wurde wiederum die isolierte genomische DNA der 59 Isolate, die auch in den Virulenzuntersuchungen eingesetzt wurden, verwendet. Abbildung 23 zeigt die PCR-Produkte der *hcp1*-Nachweisreaktion für die 59 *S. maltophilia*

Isolate. Das T6SS war demzufolge bei acht *S. maltophilia* Isolaten vorzufinden. Davon waren fünf klinische und drei Umweltisolate. 683, 678 und SKK53 sind CF-Isolate beziehungsweise Atemwegs-Isolate, SKK35 und SKK12 stammten aus Wunden. SKA14 war marinen Ursprungs, NA 20 stammte aus dem Ablauf einer Kläranlage und x743 aus Leitungswasser im Krankenhaus.

Betrachtete man das Vorkommen eines T6SS hinsichtlich der zu Beginn getroffenen Unterscheidung von genetischen Gruppen (mit farbigen Markierungen in Abbildung 23 hervorgehoben) konnte man sehen, dass alle Isolate der rep-Gruppe 12/*gyrB*-Gruppe I ein T6SS besitzen. Die anderen Isolate, für die ein T6SS nachgewiesen werden konnte, gehörten dagegen zu keiner Gruppe, wobei SKK35 und SKA14, sowie SKK12 und NA20 jeweils eine genetische Verwandtschaft zeigten, allerdings keiner der großen Gruppen zugeordnet waren.

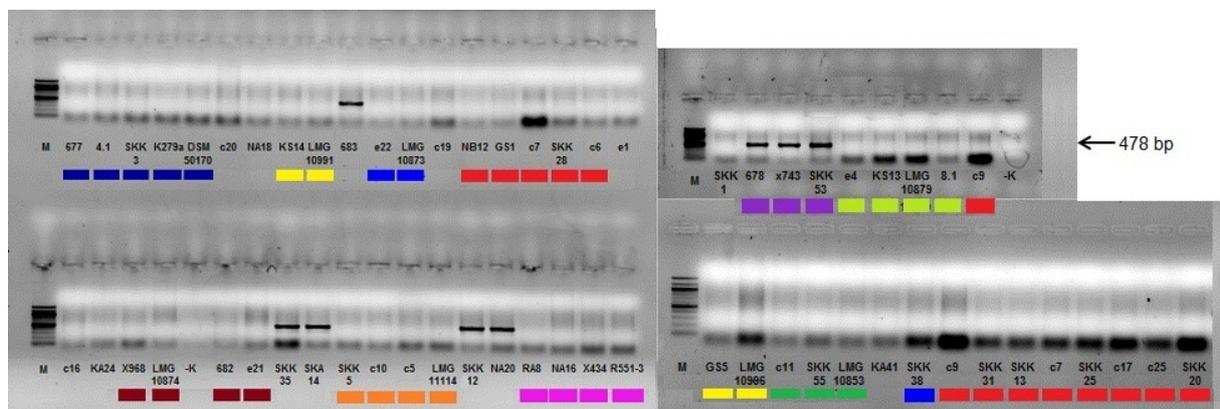


Abb. 23: Nachweis für das *hcp1*-Gen. PCR-Produkte der Reaktion mit dem Primerpaar *hcp1* wurden auf ein 1% (w/v) Agarose-Gel aufgetragen. Als Ziel-DNA dienten 59 *S. maltophilia* Isolate. Amplifiziert wurde ein 478 bp Fragment des *hcp*-Gens, das Bestandteil des Typ-6-Sekretionssystems gram-negativer Bakterien ist. Etwaige Banden unter 100 bp sind Primer-Wolken. M = molekularer Marker 100 bp; -K = PCR Negativkontrolle mit PCR-Wasser. Die Farbcodierungen entsprechen den genetischen Gruppen von *S. maltophilia* gemäß der Eingliederung nach den *gyrB*-Gen Sequenzen: A: dunkelblau, B: gelb, C: dunkelgrün, D: blau; E: rot, F: braun, G: orange, H: Pink, I: lila, J: hellgrün.

4.4.4 Medium-abhängige Genexpression von *hcp-1* durch *S. maltophilia* SKK35

Zur Untersuchung der Genexpression des *hcp-1* Gens, stellvertretend für das T6SS, wurde RNA aus Kulturen von *S. maltophilia* SKK35 in verschiedenen Medien extrahiert. Es wurden M9-Medium, M9-Medium mit FeSO_4 und LB-Medium sowie AUM und M9-Medium mit 10% FKS beziehungsweise M9 mit 5% menschlichem Blut verwendet. Des Weiteren wurde wiederum die RNA aus Co-Kulturen von *S. maltophilia* SKK35 mit *D. discoideum* beziehungsweise *A. castellanii* isoliert. Die reverse Transkription (RT) erfolgte mit Random-

Hexamer-Primern. Pro RT-Ansatz wurden 1000 ng RNA eingesetzt. Die cDNA wurde als Ziel-DNA für den Nachweis des *hcp-1*-Gens mit *hcp1*-Primern verwendet. Als Negativkontrolle diente die, entsprechend in RNase freiem Wasser verdünnte, RNA.

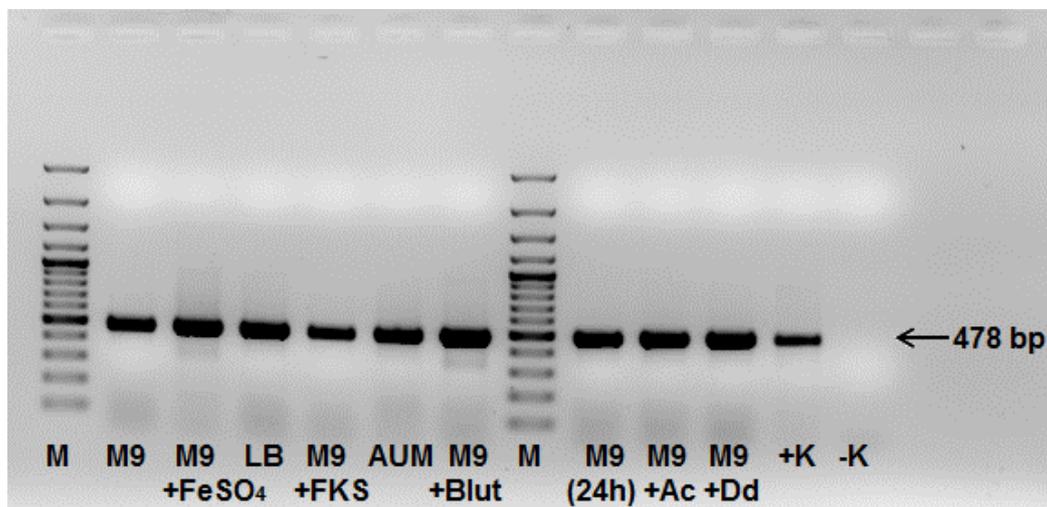


Abb. 24: Nachweis der Genexpression des *hcp-1*-Gens durch PCR der cDNA. RNA wurde aus Kulturen von *S. maltophilia* SKK35 in verschiedenen Nährmedien, in der exponentiellen Wachstumsphase, isoliert. RNA von *S. maltophilia* SKK35 in Co-Kultur mit Amöben wurde in der stationären Wachstumsphase isoliert. Die Reverse Transkription zu cDNA, die in einer PCR-Reaktion mit spezifischen Primern für das *hcp-1*-Gen eingesetzt wurde, erfolgte mit Random-Hexamer-Primern. Eine Negativkontrolle auf mögliche DNA-Kontaminationen hin, mit der isolierten RNA als Template, fiel in allen Fällen negativ aus und wurde daher nur exemplarisch dargestellt. Zu sehen sind die PCR-Produkte, von links nach rechts: M = 100 bp Marker; M9 = M9-Medium nach 4 Stunden; M9+FeSO₄ = M9-Medium mit 0,02M Eisensulfat, LB = Luria Bertani Medium; M9+FKS = M9 mit 10 % fötalem Kälberserum; M9+Blut = M9 mit 5% humanem Blut; M = 100 bp Marker; M9(24h) = M9 nach 24 Stunden; M9+Ac = Co-Kultur mit *A. castellanii* in M9; M9+Dd = Co-Kultur mit *D. discoideum* in M9; +K = Positivkontrolle mit genomischer DNA von SKK35; -K = Negativkontrolle.

Die DNA-Kontrolle fiel in allen Fällen negativ aus. Für alle getesteten Medien und Kulturbedingungen war als PCR-Produkt eine deutliche Bande auf der Höhe von 478 bp zu sehen (vgl. Abbildung 24). Das lässt darauf schließen, dass unter ausreichender Nährstoffversorgung das *hcp*-Gen generell exprimiert wird.

4.5 Fazit

Durch die Genomsequenzierung von *S. maltophilia* RA8 und SKK35, und den Vergleich mehrerer Genomsequenzen, war es möglich, weitere Einblicke in das Resistenz- und Virulenzpotential von *S. maltophilia* zu erhalten. Die Beobachtung, dass zahlreiche Virulenzgene und Antibiotikaresistenz-Gene zum Kern-Genom von *S. maltophilia* gehören, deckt sich mit den Beobachtungen, dass extrazelluläre Sekundärmetabolite von beinahe allen

getesteten Stämmen produziert wurden und Antibiotikaresistenz bei allen getesteten Stämmen auf einem vergleichbar hohen Niveau vorlag. Es war möglich, durch Genvergleich neue Kandidaten für Virulenzgene, die RTX-Proteine und ein Typ-6-Sekretionssystem, zu identifizieren. Für die RTX-Proteine ließ sich im Experiment zwar Genexpression nachweisen, aber deren Vorkommen konnte nur bei einem einzigen Stamm nachgewiesen werden. Sie sind somit als Bestandteil des akzessorischen Genoms von *S. maltophilia* zu sehen, aber nicht als essentiell für die Virulenz gegenüber Amöben einzustufen. Das *hcp*-Gen des T6SS wurde ebenfalls unter allen getesteten Bedingungen exprimiert, kam allerdings nur bei acht *S. maltophilia* Stämmen vor, von denen nur drei auch im Amöbenmodell als virulent eingestuft wurden. Es kann damit auch zum akzessorischen Genom von *S. maltophilia* gezählt werden. Eine tatsächliche Relevanz des T6SS als Virulenzfaktor gegenüber Amöben konnte nicht gezeigt werden.

5 Diskussion

Zur Charakterisierung der Diversität von *S. maltophilia* und ihres Virulenzpotentials wurde ein breites Spektrum an *S. maltophilia* Stämmen verschiedener Herkunft untersucht. Hierzu wurden Isolate aus der Umwelt, sowie anthropogen beeinflusste Umweltisolate aus einer Kläranlage und Krankenhausisolate analysiert.

5.1 Genetische Diversität

Mittels zweier verschiedener Genotypisierungsmethoden wurden die Isolate, anhand der Ähnlichkeit ihrer genetischen Profile (rep-PCR Fingerprint- und *gyrB*-Sequenz-Typisierung), verschiedenen genetischen Subgruppen zugeordnet. Diese Gruppenbildung stimmte mit beiden angewandten Methoden weitestgehend überein und es konnten Übereinstimmungen in der Gruppierung mit vorangehenden Genotypisierungsstudien festgestellt werden.

Im Folgenden wurden die verschiedenen Isolate, auch hinsichtlich ihrer Herkunft, mit den genetischen Gruppen, denen sie zugerechnet wurden verglichen. Diesbezüglich sollte man nicht außer Acht lassen, dass für einige Isolate (c1-c25) keine weitere Herkunft außer „menschlichen Ursprungs“ bekannt war. Diese konnten daher nur als klinische Isolate im allgemeinen Sinn berücksichtigt werden.

Betrachtete man die Verteilung der Isolate in den verschiedenen Gruppen nach ihrer Herkunft konnte man sehen, dass in der rep-Gruppe 7/*gyrB*-Gruppe A am häufigsten Atemwegsisolate vertreten waren. Die Tendenz zur Akkumulation von Atemwegsisolaten steht im Einklang mit Beobachtungen von Kaiser *et al.* (2009) und Coenye *et al.* (2004). Diese führten Genotypisierungsstudien anhand von MLST (*multilocus sequence typing*) bzw. RFLP (*restriction fragment length polymorphism*)-Typisierung des *gyrB*-Gens durch und beobachteten eine Tendenz hin zu einem Atemwegs/CF-Genotyp in bestimmten Gruppen. Die gleichen Tendenzen zeigten sich auch in der vorliegenden Arbeit. Daher stellte sich die Frage, ob einige *S. maltophilia* Isolate einen Selektionsvorteil anderen Stämmen gegenüber besitzen, was die Kolonisierung und Persistenz im Atemwegstrakt betrifft.

Eine andere, weitestgehend aus klinischen Isolaten zusammengesetzte, Gruppe war die rep-Gruppe 4/*gyrB*-Gruppe E. Der Großteil der Isolate war aus Urinproben, zusammen mit Isolaten aus einer Blutkultur, einer Wunde sowie einem Atemwegsisolat. Dies wirft die Frage

auf, ob hier ebenfalls eine Selektion vorliegt beziehungsweise ob es sich eher um einen invasiven als um einen persistenten Genotyp handelt.

Im Fokus auf Gruppen, die nur Umweltisolate beinhalteten, konnte man sehen, dass in rep-Gruppe 1/*gyrB*-Gruppe H ein großer Teil der Isolate aus Kläranlagen stammte. Da Bakterien generell auch durch Ausscheidung aus dem menschlichen Körper in das Abwassersystem gelangen können, wurden diese als anthropogen-beeinflusste Umweltisolate angesehen. Die biologische Stufe einer Kläranlage ist darauf ausgelegt, das Wachstum von Bakterien zu fördern. In diesem Zusammenhang wurde allerdings auch eine Akkumulation von Schwermetallen, antimikrobiellen Wirkstoffen und Detergenzien beobachtet. Die Antibiotikafracht hing dabei mit dem Zufluss aus der Umgebung, wie beispielsweise Krankenhausabwasser oder landwirtschaftlicher Tierhaltung, zusammen. Es konnte auch ein saisonaler Effekt durch verstärkten Antibiotikakonsum im Winter beobachtet werden (Baquero *et al.*, 2008). Ein hoher Selektionsdruck könnte so zu einer Selektion multiresistenter Bakterien führen. Darüber hinaus wurde in Kläranlagen ein verstärkender Effekt auf die Ausbildung von Co-Resistenz bzw. Kreuzresistenz gegenüber Antibiotika festgestellt, der auf die Akkumulation von Antibiotika, Desinfektionsmitteln und Schwermetallen zurückzuführen war (Alonso & Martínez, 2001). Da für *S. maltophilia* bereits eine hohe Resistenz gegenüber zahlreichen Antibiotika bekannt ist (Chrossman *et al.*, 2008), könnten Isolate der rep-Gruppe 1/*gyrB*-Gruppe H das Potential besitzen, sich an solch eine Umgebung anzupassen und zusätzliche Resistenzen durch die verstärkte Möglichkeit des horizontalen Gentransfers erhalten.

Eine weitere Gruppe, die sich nur aus Umweltisolaten zusammensetzt, ist die rep-Gruppe 11/*gyrB*-Gruppe J. Die hierin clusternden Isolate konnten der von Minkwitz & Berg (2001) charakterisierten Gruppe E2, die sich aus Isolaten der Rhizosphäre von Kulturpflanzen zusammensetzte, zugeordnet werden. Auffällig war, dass sich die rep-Gruppe 11/*gyrB*-Gruppe J fast ausschließlich aus Süßwassersediment-Isolaten zusammensetzte. Dies war aber damit zu erklären, dass ein Großteil der Probenahmestellen in direkter Nähe zu Feldern lag, die mit Kulturpflanzen bewirtschaftet waren. Bedingungen in der Rhizosphäre können die Selektion bestimmter Eigenschaften bewirken. Dadurch, dass die Rhizosphäre einen hohen Nährstoffanteil besitzt, wird sie sozusagen zum „Hot-Spot“ für die Selektion antagonistischer Merkmale. Mechanismen, die es Bakterien ermöglichen, die Rhizosphäre zu kolonisieren, können ebenfalls relevant werden, wenn es darum geht, den menschlichen Körper zu besiedeln. Dazu gehören Mechanismen zur Adhärenz, Antibiosis und Toxizität, Antibiotikaresistenz und Biofilmbildung (Berg *et al.*, 2005).

5.2 Physiologische Diversität – Virulenzfaktoren

Auf genetischer Ebene konnten Subgruppen, die bestimmte Ökotypen von *S. maltophilia* favorisieren, definiert werden. Daraus resultierte die Frage, ob diese Gruppen Unterschiede in ihren phänotypischen Merkmalsausprägungen aufweisen. Zu diesem Zweck wurde anhand einer Auswahl an Isolaten, die repräsentativ für die definierten Genogruppen waren, eine Reihe physiologischer Parameter überprüft. Dabei lagen insbesondere Faktoren, die bekannt sind zur Virulenz von Bakterien beizutragen, sowie Faktoren, die verantwortlich für die Kolonisierung und Persistenz im menschlichen Körper sind im Fokus. Als extrazelluläre Komponenten, die von Relevanz für die Virulenz von Bakterien sind, wurde die Bildung von Hämolysin, Proteasen und Siderophoren untersucht (Edberg *et al.*, 1996; Lamont *et al.*, 2002). Die Bildung von Siderophoren konnte für alle getesteten *S. maltophilia* Isolate nachgewiesen werden. Hämolysin und Proteasen wurden von dem überwiegenden Teil der Stämme gebildet. Lediglich drei klinische Isolate zeigten weder hämolytische noch proteolytische Eigenschaften. Figueirêdo *et al.* (2006) untersuchten cytotoxische Eigenschaften von *S. maltophilia* Isolaten aus Leber und Luftröhre auf verschiedene Zelltypen. In diesem Zusammenhang wiesen sie auch Proteolyse-, Hämolyse-, Lipase- und Lethicinase-Aktivität von klinischen *S. maltophilia* Isolaten nach. Phänotypen, die Protease, Hämolysin, Lipasen und Lecithinasen produzierten, hatten auch einen cytotoxischen Effekt, während fünf Isolate aus Blutkulturen, die keinen dieser Virulenzfaktoren bildeten, keinen toxischen Effekt auf die Zellkulturen hatten. Eine weitere Studie untersuchte die Bildung von Lipopolysacchariden (LPS), Exopolysacchariden (EPS), Protease, Hämolysin, Phospholipase C und der Siderophore Pyochelin und Ornibactin. Sie zeigte, dass die Bildung von Protease und Hämolysin der untersuchten klinischen *S. maltophilia* Isolate variierte, aber alle Isolate LPS und EPS ausbildeten, ebenso wie Pyochelin, nicht aber Ornibactin (Chibber *et al.*, 2008). Diese Studien belegen eine Diversität beim Vermögen, Virulenzfaktoren wie Hämolysin oder Proteasen zu bilden. Sie beschränken sich allerdings auf die Untersuchung einer geringen Anzahl von klinischen *S. maltophilia* Stämmen. In der vorliegenden Studie konnte im Vergleich dazu aufgezeigt werden, dass diese Virulenzfaktoren vom größten Teil der *S. maltophilia* Isolate produziert werden können. Dabei zeigte sich kein Unterschied zwischen klinischen und Umweltisolaten. Es war keine Zuordnung der Protease oder Hämolyse defizienten Isolate zu genetischen Gruppen möglich. Das Fehlen von Proteasen und Hämolysin in Stämmen aus Blutkulturen, wie bei Figueirêdo *et al.* (2006) gezeigt, konnte nicht bestätigt werden.

Während Hämolyisin, Proteasen und Siderophore generell von *S. maltophilia* gebildet werden und das Fehlen derer eine Ausnahme zu sein scheint, zeigten sich hinsichtlich der Beweglichkeit und des Potentials zur Biofilmbildung deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Isolaten. Bisherige Studien bezogen sich fast ausschließlich auf die Charakterisierung von klinischen Isolaten. Passerini de Rossi *et al.* (2007) untersuchten die Biofilmbildung von *S. maltophilia* Isolaten, die mit Infektionen durch invasive Apparaturen in Zusammenhang standen. Sie konnten zeigen, dass die Biofilmbildung dieser Isolate auf verschiedenen Oberflächen variabel war. Allerdings bildeten alle Isolate stark ausgeprägte Biofilme in Polystyrol-Mikrotiterplatten aus. Auch konnten sie eine Korrelation der *Twitching*-Motilität mit der Biofilmbildung feststellen. Derartige Beobachtungen konnten in dieser Arbeit nicht gemacht werden. Vielmehr präsentierten sich die meisten Isolate als mäßige Biofilmbildner auf Polystyrol und es konnte keinerlei Korrelation zwischen der Biofilmbildung und dem Flagellen-assoziierten *Twitching* festgestellt werden. Dies ließe sich aber auch damit erklären, dass in dieser Arbeit keine *S. maltophilia* Stämme, die von invasiven Apparaturen stammen, untersucht worden sind.

Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit den Beobachtungen von Di Bonaventura *et al.* (2007) und Pompilio *et al.* (2008), die Biofilmuntersuchungen sowie Schwimm- und *Twitching*-Versuche mit *S. maltophilia* CF-Isolaten durchführten. In beiden Arbeiten zeigten sich im Schwimm- und *Twitching*-Verhalten, sowie beim Biofilmbildungspotential auf Polystyrol, deutliche Unterschiede. Ungefähr 23% der von Di Bonaventura *et al.* (2007) untersuchten Isolate zeigte keinerlei Biofilmbildung, was mit dem Wert in der vorliegenden Arbeit von 30% vergleichbar ist. Auch konnten bei beiden Arbeiten keine Zusammenhänge zwischen der Biofilmbildung und der Motilität erkannt werden. In einer späteren Arbeit von Pompilio *et al.* (2010) konnte außerdem nachgewiesen werden, dass alle Isolate, auch welche, die nur mäßige Biofilmbildner waren, in der Lage waren, an bronchiale Zellen zu adhären und einen Biofilm zu bilden. Die jüngsten Feststellungen von Pompilio *et al.* (2011), die Hinweise für die Bildung eines CF-Phänotyps entdeckt hatten, konnten anhand der Ergebnisse dieser Arbeit weder bestätigt noch widerlegt werden. Bei Pompilio *et al.* (2011) wurde ein geringeres Potential zur Biofilmbildung bei CF-Isolaten im Vergleich zu nicht CF-Isolaten beschrieben. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten zwar bei den vier näher untersuchten CF-Isolaten kein Schwimmvermögen, doch bei lediglich drei Isolaten zusätzlich keine Biofilmbildung, und nur bei zwei Isolaten keine Fähigkeit zum *Twitching*. Es wäre nötig, eine größere Anzahl an CF-Isolaten zu testen. Der Fokus dieser Arbeit lag jedoch nicht ausschließlich auf der Untersuchung von CF-Stämmen.

Extrazelluläre Sekundärmetabolite, die für den Virulenzmechanismus relevant sein können, kommen generell bei *S. maltophilia* vor. Dagegen scheinen Fähigkeiten wie Biofilmbildung und Motilität zwar bei der Adhäsion an Oberflächen und Zellen, also bei der Invasion eine Rolle zu spielen, aber nicht generell zu den Grundeigenschaften der Spezies zu gehören. Vielmehr bewirken sie einen Vorteil bei der Kolonisierung unwirtlicher Umgebungen, wie beispielsweise dem menschlichen Körper, sind aber nicht zwingend für das Überleben und die Persistenz der Spezies notwendig.

5.3 Physiologische Diversität – Antibiotikaresistenz

Im Plattendiffusionstest zeigte sich eine meist homogene Verteilung der Antibiotikaresistenzen. Das heißt, der überwiegende Anteil der getesteten Isolate war entweder resistent gegen Penicilline, Aminoglycoside außer Gentamicin, Erythromycin und Novobiocin oder sensibel für Chinolone außer Norfloxacin und Chloramphenicol. Diese Ergebnisse decken sich weitestgehend mit vorangegangenen klinischen Studien zur Antibiotikaresistenz von *S. maltophilia* (Alonso & Martínez, 1997; Traub *et al.*, 1998; Nicodemo *et al.*, 2004, Tatman-Okun *et al.*, 2005). Bei einigen Antibiotika dagegen (Gentamicin, Norfloxacin, Vancomycin, Trimethoprim-Sulfamethoxazol (SXT) und Tetracyclin) zeigten sich Unterschiede im Resistenzprofil. Daher wurden dafür genauere Untersuchungen mit der Mikrobouillon-Verdünnungs-Methode durchgeführt. Im Gegensatz zum Plattendiffusionstest ergab sich hier wiederum ein homogenes Bild der ermittelten MHK mit hohen Resistenzen gegen Vancomycin und Gentamicin, intermediären Resistenzen für Tetracyclin und Norfloxacin und Sensibilität gegenüber SXT. Diskrepanzen bezüglich der Ergebnisse des Plattendiffusionstest und der Mikrobouillon-Verdünnung wurden bei Antibiotikaresistenztests mit *S. maltophilia* bereits in früheren Arbeiten beobachtet (Caroll *et al.*, 1998; Marsgala *et al.*, 2010). Caroll *et al.* (1998) beobachteten zum Beispiel, dass MHK für β -Lactame, Chinolone und Aminoglycoside generell höher waren, wenn sie mittels Mikrobouillon-Verdünnung getestet wurden. Dagegen wies *S. maltophilia* im Mikrobouillon-Verfahren deutlich geringere MHK gegenüber SXT auf (Caroll *et al.*, 1998).

Trotz der beobachteten Diskrepanzen zwischen den verschiedenen Methoden sind die Ergebnisse hinreichend aussagekräftig, um die hier formulierte Frage nach Unterschieden der Resistenz zwischen klinischen und Umweltisolaten beziehungsweise Ökotypen zu klären. Eine Resistenz oder Sensibilität gegenüber den verschiedenen Antibiotika stellte sich als

unabhängig von genetischen Gruppen und der Zugehörigkeit zu bestimmten Ökotypen heraus. Die sonst sehr heterogene Spezies *S. maltophilia* zeigt sich hier durchgehend homogen. Dadurch, dass zahlreiche Resistenzen auf hohem Niveau vorliegen, präsentiert sich *S. maltophilia* umso mehr als riskanter Keim im Krankenhausmilieu.

Dies deckt sich weitestgehend mit den Beobachtungen von Berg *et al.* (1999), die zeigten, dass sich Resistenzen gegenüber verschiedenen Antibiotika-Stoffklassen zwar deutlich unterscheiden, dass sich aber bei der Betrachtung der einzelnen Antibiotika ein homogenes Bild zeigt, in dem sich klinische und Umweltstämme von *S. maltophilia* nicht signifikant unterscheiden.

5.4 Physiologische Diversität – Virulenz gegenüber Amöben

In Anbetracht der Ergebnisse der Genotypisierung könnte man erwarten, dass die verschiedenen genetischen Gruppen zum Teil auch Unterschiede in der Virulenz an den Tag legen. In einem DAB/2 Maus-Modell war es Pompilio *et al.* (2010) möglich, zu zeigen, dass es Unterschiede in der Virulenz zwischen einem *S. maltophilia* Umweltstamm und einem CF-Patientenisolat gab. Angesichts bisheriger Ergebnisse bei der Untersuchung der Diversität potentieller Virulenzfaktoren von *S. maltophilia* würde man dagegen erwarten, dass es keine Unterschiede zwischen klinischen und Umweltisolaten oder den verschiedenen genetischen Gruppen gibt. Um dies zu überprüfen, wurde ein Pathogenitätsmodell mit Amöben als Wirtsorganismus gewählt. In den letzten Jahren wurden Amöben immer häufiger genutzt, um Virulenzmechanismen und deren Zusammenhänge aufzuschlüsseln. Mit einem *D. discoideum* Virulenzmodell war es zum Beispiel möglich, zu zeigen, dass die Virulenz von *P. aeruginosa* durch ein Typ-III-Sekretionssystem vermittelt wird, durch welches das Cytotoxin ExoU in die Wirtszelle injiziert wird (Pukatzki *et al.*, 2002). Ebenfalls in einem *D. discoideum* Modell wurde beobachtet, dass das *rhl* Quorum Sensing System von *P. aeruginosa* eine zentrale Rolle bei der Virulenz spielt (Cosson *et al.*, 2002). *A. castellanii* wurde erfolgreich eingesetzt, um die Virulenz von *Mycobacterium kansasii* zu beschreiben. Es konnte außerdem ein Zusammenhang zwischen der Virulenz gegenüber der Amöbe und der Zugehörigkeit zu bestimmten genetischen Subgruppen festgestellt werden (Greub & Raoult, 2004). Weitere Wirt-Pathogen-Interaktionen wurden ebenfalls von Greub & Raoult (2004) beschrieben. Die Virulenz des *S. maltophilia* Stamms D457 gegenüber *D. discoideum* konnte in Co-Kultur-Experimenten beobachtet werden, wobei eine Mutante dieses Stamms (D457R), welche die

Multidrug-Effluxpumpe SmeDEF überexprimierte, eine geringere Virulenz gegenüber *D. discoideum* als der Wildtyp zeigte (Alonso & Martínez, 2001). In einer Studie über den Effekt von Bakterien auf das Wachstum und Überleben von *A. castellanii* wurde *S. maltophilia* ATCC 420207 als besonders gute Nahrungsquelle für *A. castellanii* beschrieben (Wang & Ahearn, 1997). Unterschiede in der Virulenz von *S. maltophilia* gegenüber den Amöben wären demnach zu erwarten.

Tatsächlich war es möglich, Unterschiede im Virulenzpotential von *S. maltophilia* zu zeigen, und diese zum Teil mit genetischen Subgruppen zu korrelieren. Generell waren im Fall von *A. castellanii* mehr Amöben notwendig, um einen Plaque in den Bakterienrasen zu fressen, als bei *D. discoideum*. Dies galt selbst für die nicht-virulenten Isolate. Im Mittel waren, bei nicht-virulenten Stämmen in Co-Kultur mit *A. castellanii*, 194 Amöben nötig, während es in Co-Kultur mit *D. discoideum* im Mittel nur 77 Amöben waren. Diese Varianz könnte durch die verschiedenen Wachstumstemperaturen erklärt werden. Die optimale Wachstumstemperatur von *A. castellanii*, bei welcher der Versuch auch durchgeführt wurde, liegt bei 30°C. Dies ist auch die optimale Wachstumstemperatur von *S. maltophilia*. Der Versuch mit *D. discoideum* wurde bei 22,5°C durchgeführt, da dieser nur bei Temperaturen zwischen 20 und 25°C wächst. Bei dieser Temperatur wächst *S. maltophilia* dagegen langsamer, was in einem Wachstumsnachteil resultiert.

Eine der Genogruppen (*gyrB* Gruppe E/rep-Gruppe 4) besaß die meisten virulenten Isolate gegenüber beiden Amöben. Zunächst wurden aus dieser Gruppe nur vier Stämme (NB12, GS1, SKK28 und c6) ausgewählt, um die Virulenz zu testen. Nachdem diese alle ein sehr hohes Virulenzpotential aufwiesen, wurden weitere Isolate aus dieser Gruppe getestet, da die Vermutung nahelag, dass diese Gruppe generell ein hohes Virulenzpotential besitzt. Tatsächlich zeigten nicht alle Isolate aus dieser Gruppe ein so hohes Virulenzpotential, sondern lediglich ein überwiegender Anteil von acht der zwölf getesteten Isolate wurde als stark virulent eingestuft. Einige *S. maltophilia* Stämme waren ausschließlich gegenüber *Acanthamoeba* oder *Dictyostelium* virulent. Dies ließ sich insbesondere bei den Isolaten der *gyrB*-Gruppe D beobachten, die virulent gegenüber *D. discoideum*, aber nicht gegenüber *A. castellanii* waren. Diese Diskrepanzen konnten nicht einfach anhand der unterschiedlichen Wachstumstemperaturen erklärt werden. Eine Hypothese war, dass einige Bakterienstämme temperaturabhängige Unterschiede im Proteinstoffwechsel zeigen, die in irgendeiner Weise die Interaktion zwischen Bakterien beeinflussen könnten. Um das nachzuweisen, wurde das Experiment mit *A. castellanii*, drei Stämmen der Gruppe D sowie SKK35 als Positivkontrolle bei 22,5°C wiederholt. Die Bakterien und Amöben wuchsen langsamer, man konnte die

Ergebnisse erst nach fünf Tagen auswerten. Dennoch zeigte sich auch dann keine Virulenz der Stämme der Gruppe D gegenüber *A. castellanii*. Im Gegensatz dazu war der Kontrollstamm SKK35 auch bei der geringeren Temperatur stark virulent. Das zeigte eindeutig, dass eine temperaturabhängige Änderung der Virulenz ausgeschlossen werden konnte. Eine andere Möglichkeit wäre, dass *D. discoideum* andere Verteidigungsmechanismen gegenüber pathogenen Bakterien besitzt als *A. castellanii*.

Ein weiteres interessantes Ergebnis war, dass aus der *gyrB*-Gruppe A/rep-Gruppe 7, die den höchsten Anteil an Atemwegsisolaten aufwies, kein einziges Isolat in diesem Modell virulent war. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Pompilio *et al.* (2011), welche die Selektion eines *S. maltophilia* CF-Phänotyps zeigten. Sie wiesen auch nach, dass die Virulenz von CF- und nicht-CF-Isolaten in einem Lungeninfektionsmodell der Maus gleich war. Daher liegt die Vermutung nahe, dass verschiedene Mechanismen Atemwegserkrankungen bei Mäusen und Pathogenität gegenüber Amöben bewirken.

Von generellem Interesse, hinsichtlich der Interaktion zwischen *S. maltophilia* und den Amöben, ist die Frage nach dem Virulenzmechanismus. Intrazelluläres Wachstum von *S. maltophilia* wurde bislang nicht beobachtet, daher liegt die Vermutung nahe, dass extrazelluläre Substanzen als Cytotoxine wirken. Für *P. aeruginosa* ist es bekannt, dass ein Typ-3-Sekretionssystem (T3SS) für die Toxizität notwendig ist (Pukatzki *et al.*, 2002). Im Fall von *Vibrio cholerae* ist es ein Typ-6-Sekretionssystem (T6SS), das die Injektion von Effektorproteinen in eine andere Zelle ermöglicht (Pukatzki *et al.*, 2006). Keiner der bislang sequenzierten *S. maltophilia* Stämme besaß ein T3SS. Dagegen war bisher nur bei *S. maltophilia* SKA14 bekannt, dass es ein T6SS besitzt. Dieser Stamm war allerdings für beide Amöbenarten nicht virulent. Das bedeutet, ein T6SS wäre zumindest nicht die einzige Voraussetzung für die Virulenz von *S. maltophilia* beziehungsweise ein oder mehrere Effektorproteine werden nicht von allen *S. maltophilia* Stämmen gebildet. Eine andere Vermutung wäre, dass ein T6SS gar nicht in die Virulenz von *S. maltophilia* gegenüber Amöben involviert ist. Auch K279a und R551-3, für die das gesamte Genom bekannt ist, waren nicht virulent gegenüber den Amöben.

Obwohl *D. discoideum* und *A. castellanii* bereits erfolgreich als Virulenz-Modellorganismen eingesetzt wurden, konnten einige Diskrepanzen im Modell festgestellt werden. Nicht alle klinischen *S. maltophilia* Stämme, bei denen es bekannt war, dass sie in eine Infektion beim Menschen involviert waren, waren auch im Amöbenmodell virulent. Der Stamm K279a, der aus dem Blut eines Krebspatienten isoliert wurde, wurde als virulent in einem Nematodenmodell mit *C. elegans* charakterisiert (Fouhy *et al.*, 2007), zeigte aber keine

Virulenz gegenüber den Amöben. Diskrepanzen zwischen der bakteriellen Virulenz gegenüber Makrophagen und *C. elegans* wurden bereits dokumentiert (Kurz & Ewbank, 2007). Ein Vergleich der beiden Modellamöben als System wurde, soweit bekannt, noch nicht unternommen. Die Ursache für die zum Teil unterschiedlichen Reaktionen der beiden Amöben auf dieselben Bakterienstämme gilt es zu klären. Nichtsdestotrotz war das Amöbenmodell hilfreich, um einen Einblick in das Virulenzverhalten von *S. maltophilia* zu bekommen, das sich möglicherweise auch auf Makrophagen übertragen lässt. Für eine erste Untersuchung, insbesondere wenn eine hohe Anzahl an Stämmen oder Mutanten zu testen ist, ist das Amöbenmodell eine einfache, kosteneffektive und ethisch weniger bedenkliche Alternative zum Säugetiermodell. Im Detail kann dieses Modell das klassische Säugetiermodell allerdings nicht ersetzen.

5.5 Vergleich der Genomsequenzen von *S. maltophilia*

Basierend auf den Ergebnissen des Virulenztests wurden ein virulenter (SKK35) und ein nicht-virulenter (RA8) Bakterienstamm vollständig sequenziert. Ein Genom-Mapping der beiden Stämme zusammen mit den *S. maltophilia* Referenzstämmen (K279a, R551-3 und SKA14), welche im Amöbenmodell nicht virulent waren, wurde hierfür erstellt. Die Genomsequenzen wurden auf das Vorkommen bereits bekannter Virulenzgene und -faktoren, die mit der Virulenz in Zusammenhang stehen sowie das Vorkommen und die Verbreitung von Antibiotikaresistenz-Genen hin verglichen. Protein-codierende Regionen, die einzigartig für den entsprechenden Stamm waren, wurden als genomische Insel charakterisiert. Darauf lokalisierte Regionen wurden hinsichtlich ihrer Relevanz für das klinische Auftreten von *S. maltophilia* betrachtet. So war es auch möglich Kandidaten für Virulenzgene zu identifizieren.

5.5.1 Antibiotikaresistenz-Gene

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass zahlreiche potentielle Antibiotikaresistenz-Gene bei allen *S. maltophilia* Stämmen zu finden waren. Diese wurden bereits zuvor bei *S. maltophilia* oder anderen Bakterienspezies charakterisiert und ihre Funktionen konnten im Experiment nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 28).

Tab. 28: Antibiotikaresistenz-Gene, die im Genomvergleich bei *S. maltophilia* identifiziert wurden und deren nachgewiesene Funktion gegenüber bestimmten Antibiotika.

Resistenzgene	Resistenz gegen	nachgewiesen für	Referenz
RND-Effluxpumpen	Tetracycline, Chinolone, Aminoglycoside, Chloramphenicol, Erythromycin	<i>S. maltophilia</i>	Chrossman <i>et al.</i> , 2008; Li <i>et al.</i> , 2002; Alonso & Martínez, 2000 & 2001; Al-Hamad <i>et al.</i> , 2009
MATE-Transporter	Ciprofloxacin, Norfloxacin, Chinolone	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Kuroda & Tsuchiya, 2009
MF-Transporter	verschiedene, meist substratspezifisch	<i>E. coli</i> , <i>L. lactis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i>	Fluman & Bibi, 2009
ABC-Transporter	Makrolide	<i>E. coli</i>	Kobayashi <i>et al.</i> , 2001
Aminoglycosid-N-Acetyltransferase	Aminoglycoside	<i>S. maltophilia</i>	Lambert <i>et al.</i> , 1999
Aminoglycosid Phosphotransferase	Aminoglycoside	<i>S. maltophilia</i>	Okazaki und Avison, 2007
β-Lactamasen	β-Lactame	<i>S. maltophilia</i>	Avison <i>et al.</i> , 2001; Yang <i>et al.</i> , 2009; Huang <i>et al.</i> , 2010
Qnr-Chinolon-Resistenzgen	Chinolone	<i>K. pneumoniae</i>	Martínez- Martínez <i>et al.</i> , 1998

Darunter fielen die RND-Effluxpumpen, die bei allen verglichenen *S. maltophilia* Isolaten vorzufinden waren. Es ist zu vermuten, dass diese Effluxpumpen für einen großen Teil der Antibiotikaresistenzen verantwortlich sind. *S. maltophilia* R551-3, RA8 und SKK35 besitzen jeweils eine, SKA14 besitzt zwei zusätzliche Regionen, die für potentielle Effluxpumpen von RND-Typ codieren. Eine weitere Klasse von Multidrug Effluxtransportern, die bei allen Isolaten identifiziert werden konnte, waren sog. MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*)-Transporter. Die meist Na⁺ (seltener H⁺) gekoppelten Kationenpumpen haben im Vergleich zu RND Effluxpumpen ein engeres Substratspektrum (vgl. Tabelle 28). Transporter der MF (*major facilitator*)-Superfamilie konnten ebenfalls bei allen *S. maltophilia* Stämmen lokalisiert werden. Diese sind meist substratspezifische Transportproteine. Sie kommen aber auch als Multidrug Transporter vor.

Im Vergleich zu den RND-Effluxpumpen sind sowohl MATE- als auch MF-Transporter für Antibiotikaresistenzen bei gram-negativen Bakterien von untergeordneter Bedeutung. Beide katalysieren den Transport von Antibiotika durch die innere Membran in den periplasmatischen Raum. RND Effluxpumpen dagegen sind durch ein Membran-Fusions-Protein in der Lage antimikrobielle Substanzen durch beide Membranen hindurch aus der Zelle hinaus zu transportieren, was sie besonders effizient macht (Kumar & Schweizer, 2005). Eine weitere große Familie von Transportsystemen sind ABC-Transporter. Diese haben entweder Aufnahme- oder Efflux-Funktionen. Sie gewinnen Energie durch die Hydrolyse von

ATP und sind so in der Lage, verschiedene Substrate durch die innere und äußere Membran von gram-negativen Bakterienzellen zu transportieren. Bei Bakterien kommen ABC-Transporter, die den Efflux von Antibiotika vermitteln, eher selten vor (Kumar & Schweitzer, 2005). Zu diesen Multidrug-ABC-Transportern gehört der macAB-Transporter, der bei allen *S. maltophilia* Isolaten vorlag.

Hohe Resistenzen gegenüber Aminoglycosiden konnten generell bei *S. maltophilia* beobachtet werden. Hohe MHKs wurden für Gentamicin ermittelt. Als genetische Grundlage für Resistenzen gegenüber Aminoglycosiden wurde eine Aminoglycosid-6'-N-acetyltransferase (*aac(6')Iz*) charakterisiert, welche Resistenz gegenüber Amikacin, nicht aber gegenüber Gentamicin vermittelt (Lambert *et al.*, 1999). In der vorliegenden Studie konnte man dieses Gen nur bei K279a identifizieren. Als weitere genetische Grundlage für die hohe Aminoglycosid-Resistenz bei *S. maltophilia* sind vier Aminoglycosid-Phosphotransferase-Gene zu berücksichtigen, die bei allen sequenzierten Isolaten zu finden waren.

Zahlreiche Gene der β -Lactamase-Familie, einschließlich der β -Lactamasen L1 und L2 (Avison *et al.*, 2001), wurden bei allen *S. maltophilia* Isolaten gefunden. Diese waren häufig in Form von chromosomalen solo-ORFs im Genom lokalisiert. Fraglich ist, ob diese alle generell exprimiert werden und auch tatsächlich Resistenz gegenüber β -Lactam-Antibiotika vermitteln.

Eine zum *qnr*-Chinololon-Resistenzgen homologe Region war bei allen *S. maltophilia* Stämmen chromosomal gebunden zu finden. Tatsächlich lagen aber auch im Experiment ermittelte Resistenzen gegen Norfloxacin im intermediären bis sensiblen Bereich (MHK 4-32 $\mu\text{g/ml}$), ebenso wie nur 3% bzw. 10% der getesteten Isolate Resistenzen gegenüber Ciprofloxacin bzw. Ofloxacin im Plattendiffusionstest aufwiesen. Dies deckt sich mit Beobachtungen, die für das bei *S. maltophilia* identifizierte *Smqnr*-Gen gemacht wurden. Dieses konnte nur minimale Resistenz gegenüber Chinolonen vermitteln (Shimizu *et al.*, 2008; Gordon *et al.*, 2010).

Die co-Trimoxazol Resistenzgene *sul1* und *sul2*, die mittels eines Plasmid-lokalisierten Klasse-1-Integrans übertragen werden (Toleman *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2011), wurden bei *S. maltophilia* nicht gefunden. Die MHK-Werte für co-Trimoxazol sprachen auch dafür, dass diese nicht bei der untersuchten Stammsammlung auftraten.

5.5.2 Potentielle Virulenzgene

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen, eine generelle Beschreibung der potentiell in die Virulenz von *S. maltophilia* involvierten Gene auf genomweiter Ebene zu geben. Faktoren, welche die tatsächliche Ausprägung eines virulenten Phänotyps zur Folge haben, sind zu komplex, um eine vollständige Darstellung des Virulenzpotentials nur anhand der Genomsequenz zu ermöglichen. Neben den eigentlichen Effektormolekülen sind Regulationsmechanismen und Transportsysteme von Bedeutung. Ebenso bedeutet das Vorliegen eines bestimmten Gens nicht, dass dieses auch tatsächlich aktiv ist. Ferner ist es nicht immer eindeutig möglich, Genen oder Genkomplexen anhand ihrer DNA- oder Aminosäuresequenz bestimmte Funktionen zuzuordnen. Daher erhebt die vorliegende Darstellung keinen Anspruch auf Vollständigkeit, sondern soll zunächst einen Einblick in das pathogene Potential von *S. maltophilia* geben.

Adhäsion: Pili, Fimbrien und Flagellen

Noch immer ist nicht geklärt, welche Faktoren zusammenspielen, um die Virulenz von *S. maltophilia* im immungeschwächten Wirt auszulösen. Als erster Schritt zur Manifestation einer Infektion wurde die Besiedlung von Oberflächen invasiver, medizinischer Apparaturen beschrieben. Dazu gehören Venen- bzw. Blasenkateter oder Beatmungsgeräte (Lai *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2007). Die Besiedlung von Oberflächen steht auch im Zusammenhang mit dem Potential zur Biofilmbildung.

Adhäsine, wie das bei *S. maltophilia* identifizierte filamentöse Hämagglutinin, werden sekretiert und können zum Beispiel die Adhäsion an den Epithelzellen der Atemwege erleichtern. Auch wird durch die Funktion des filamentösen Hämagglutinins, als sog. Brückenadhäsine, die Adhäsion anderer Mikroorganismen erleichtert, was zur Bildung von Multispezies-Biofilmen beitragen kann (Smith *et al.*, 2001). Als Virulenzfaktor von *Bordetella* sp. wurde nachgewiesen, dass das filamentöse Hämagglutinin Fha notwendig für die tracheale Kolonisation ist, aber nicht alleine dafür ausreicht und noch andere Faktoren eine Rolle spielen müssen (Cotter *et al.*, 1998).

Eine weitere wichtige Rolle bei der Kolonisierung des Wirtsgewebes spielen Flagellen, Pili und Fimbrien. Deren Funktion geht dabei über die bloße Motilität und Adhäsion an Oberflächen hinaus. So können zum Beispiel Fimbrien die Agglutination von Erythrozyten

und die Anheftung der Bakterien an die Zellen des Wirtsorganismus bewirken. Dies konnte für das Smf-1 fimbriale Operon von *S. maltophilia* bereits gezeigt werden (De Oliveria-Garcia, *et al.*, 2003). Weitere Funktionen von Fimbrien und Pili sind die Fähigkeit verschiedene Bindegewebs-, Serum- und Plasmaproteine zu binden und dadurch eine Kaskade von Immunreaktionsmechanismen auszulösen (Jonson *et al.*, 2005).

Die Hauptaufgabe von Flagellen ist die Motilität der Bakterien. Diese Funktion steht aber auch im Zusammenhang mit der bakteriellen Virulenz. Bei Transkriptom-Analysen im Infektionsprozess von *Vibrio cholerae* konnte eine Hochregulation der Motilitätsgene beobachtet werden (Xu *et al.*, 2003). Für flagellenlose Mutanten von *P. aeruginosa* dagegen konnte nachgewiesen werden, dass sie in einem Lungeninfektionsmodell bei Mäusen eine deutlich verringerte Virulenz aufwiesen (Feldman *et al.*, 1998). Ebenso wie Fimbrien und Pili werden Flagellen vom Immunsystem erkannt und können eine Immunantwort bis hin zu Entzündungsreaktionen auslösen (Jonson *et al.*, 2005).

Sekretionssysteme

Generell sind für gram-negative Bakterien bisher sechs verschiedene Typen von Sekretionssystemen erforscht. Diese sind essentiell für die Virulenz und das Überleben von Bakterien. In der vorliegenden Arbeit wurden bei *S. maltophilia* Typ-1-, Typ-2-, Typ-4-, Typ-5 und Typ-6-Sekretionssysteme (T1SS-T6SS) identifiziert. In Abbildung 25 und 26 sind diese Sekretionssysteme schematisch dargestellt.

Typ-1-Sekretionssysteme (T1SS) bestehen aus einem ATP-bindenden Porenprotein, das den Transport durch die innere Membran erlaubt, einem äußeren Membranprotein und einem Adaptorprotein, welches die beiden verbindet. Für die Virulenz von *S. maltophilia* relevante T1SS sind ein Hämolyysin-spezifischen Transporter (RA8_4243-44) und ein Transporter für die RTX-(*repeats in toxin*)-Proteine (SKK35_1685-86), welche in den Kapiteln 5.5.2 c) und d) genauer beschrieben sind. Auffällig war, dass beide Regionen auf genomischen Inseln lokalisiert waren.

Bei allen *S. maltophilia* Stämmen wurden zwei Regionen, die für ein **Typ-2-Sekretionssystem** (T2SS) codieren, gefunden. Eine große Vielfalt an verschiedenen Proteinen kann durch diesen Mechanismus in die Umgebung sekretiert werden. Darunter fällt auch der Transport von Effektorproteinen wie Toxinen, Proteasen, Lipasen, aber auch

zellwandabbauenden Enzymen von Pflanzenpathogenen (Stathopoulos *et al.*, 2000; Sandkvist, 2001; Bleves *et al.*, 2010).

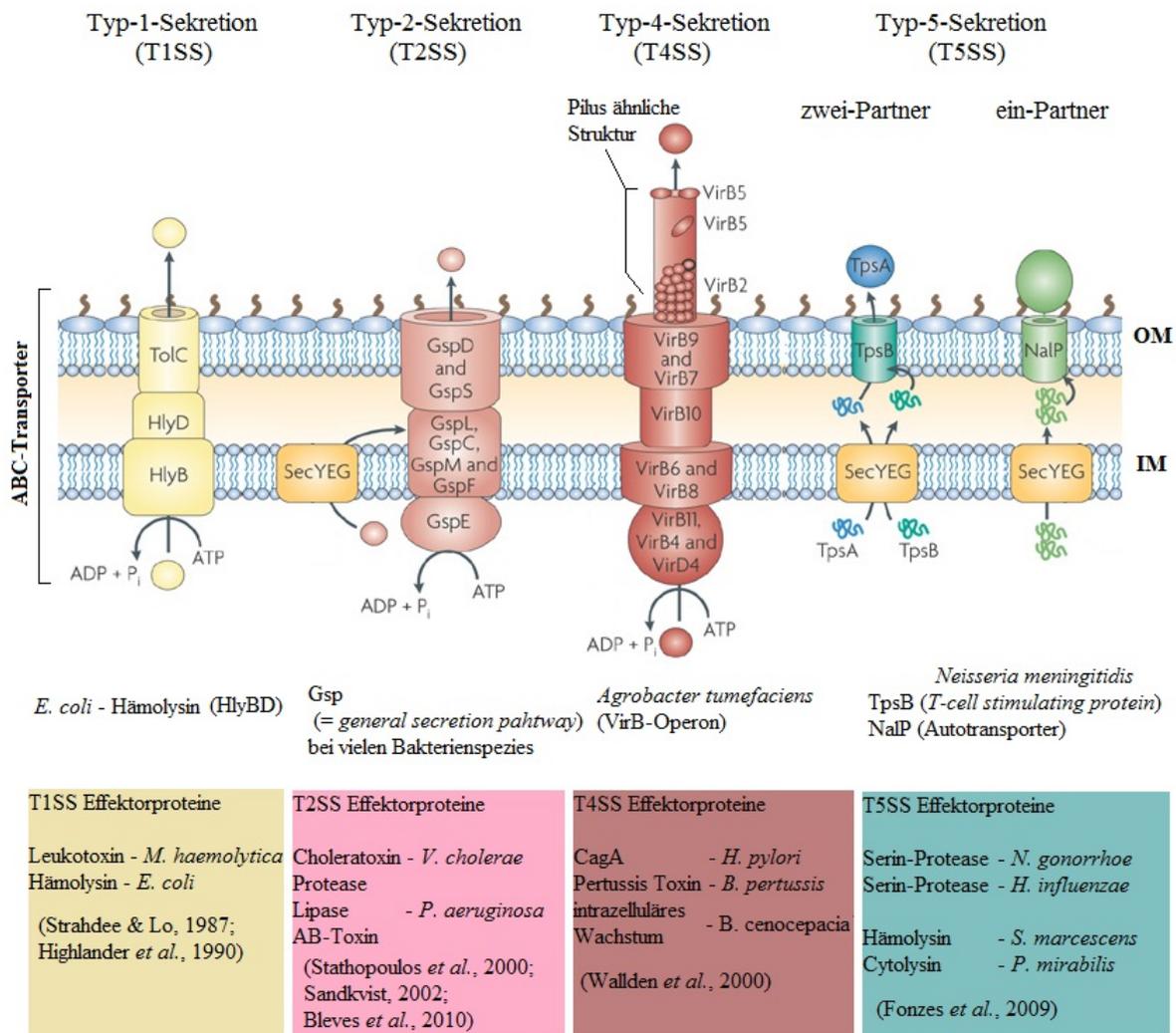


Abb. 25: Schematische Darstellung der bakteriellen Sekretionssysteme und Beispiele für Effektorproteine, die mittels des entsprechenden Sekretionssystems transportiert werden können. Als Beispiel für ein T1SS ist das Hämolsin Sekretionssystem von *E. coli* gezeigt, welches aus drei Komponenten, einem ATP-bindenden Transporter, einem äußeren Membranprotein und einem Adaptor-Protein, das diese beiden verbindet, besteht. Über das T2SS erfolgt die Sekretion in zwei Schritten. Zunächst erfolgt der Transport über die Sec-Membranproteine in den periplasmatischen Raum. Der T2SS Apparat selbst ist in beide Membranen eingebettet. Er transportiert das Effektorprotein durch die äußere Membran nach außen. Das T4SS (Bsp. hier T4SS von *Agrobacter tumefaciens*) bildet einen großen Membrankomplex aus meist 12 Proteinen aus. Es ist in der Lage, eine Pilus ähnliche Struktur zu bilden, die Effektorproteine durch die Plasmamembran in andere Zellen injizieren kann. Das T5SS kann als Ein- oder Zwei-Partner-System vorliegen (Bsp. hier Autotransporter von *Neisseria meningitidis*). Mittels des Sec-Transportmechanismus erfolgt der Transport in den periplasmatischen Raum. Das Autotransportermolekül kann daraufhin selbst, oder mit Hilfe eines separaten Translokator-Proteins eine Pore durch die äußere Membran bilden (abgewandelt nach Fonzes *et al.*, 2009; Nachdruck genehmigt).

Das **Typ-4-Sekretionssystem** (T4SS) besteht aus einem Proteinkomplex aus meist zwölf Proteinen, die einen Übergang durch die innere und äußere Membran erlauben. Unter Einfluss eines noch nicht bekannten Stimulus kann eine Pilus ähnliche Struktur ausgebildet werden, die die Sekretion von Effektormolekülen in andere Zellen hinein erlaubt (Fonzes *et al.*, 2009). *S. maltophilia* R551-3 besitzt eine Region, die für ein T4SS codiert, K279a und RA8 besitzen jeweils zwei Regionen. Im Fall des CF-Pathogens *Burkholderia cenocepacia* ist ein T4SS essentiell für die Virulenz des Bakteriums. *B. cenocepacia* kann intrazellulär wachsen, wobei durch das T4SS übertragene Proteine einen wesentlichen Anteil an der intrazellulären Replikation der Bakterien haben (Sajjan *et al.*, 2008). Intrazelluläres Wachstum wurde bislang nicht bei *S. maltophilia* beobachtet. Es ist daher fraglich, ob ein T4SS einen tatsächlichen Einfluss auf die Virulenz von *S. maltophilia* hat.

Das **Typ-5-Sekretionssystem** (T5SS) ist ein sogenannter Autotransporter. Das Substratprotein und das Transportermolekül liegen in nur einem einzigen Präprotein vor und werden über den sec- oder tat-Mechanismus durch die innere Membran transportiert. Ein Teil des Präproteins bildet eine Membranpore, durch die der Teil des Substratproteins aus der Zelle hinaus transportiert und anschließend vom Porenprotein abgespalten wird (Henderson *et al.*, 1998). T5SS existieren auch als Zwei-Partner Sekretionssystem, bei denen das Porenprotein separat vorliegt (Mazar & Cotter, 2007). Vergleichbare Gene wurden bei allen *S. maltophilia* Stämmen identifiziert. Dazu gehören Autotransporter Adhäsine, Hämagglutinine, Proteasen und Lipasen sowie filamentöse Hämagglutinine bei K279a, R551-3 und RA8, die als Zwei-Partner-T5SS vorliegen (vgl. 5.5.2 Proteine, Toxine und Sekundärmetabolite).

Das jüngst als Sekretionssystem bei gram-negativen Bakterien entdeckte **Typ-6-Sekretionssystem** (T6SS) wurde bislang nur bei *S. maltophilia* SKA14 im Zusammenhang mit Virulenzgen-homologen Regionen bei marinen Bakterien erwähnt, aber nicht näher charakterisiert (Persson *et al.*, 2009). Da dieses Sekretionssystem auch bei dem amöbenvirulenten, klinischen Isolat SKK35 vorlag, wurde dieses als neuer, potentieller Virulenzfaktor berücksichtigt.

Das T6SS von *S. maltophilia* besteht aus fünfzehn Genen. Darunter sind die zum T4SS homologen Gene (ImcF/DotU) die als Teile des Sekretionsapparates in der inneren Membran des Bakteriums lokalisiert sind. Eine ATPase (ClpV) bildet eine Pore, durch die Proteine durch die innere Membran transportiert werden. Die essentielle Komponente des T6SS wird durch die sekretierten strukturellen Bestandteile, Hcp (*hemolysin coregulated protein*)-Proteine und VgrG (*valine glycine repeat G*) gebildet. Hcp bildet hexamere Ringstrukturen

aus, die eine röhrenförmige Konformation annehmen, durch die Proteine aus der Zelle heraus, oder auch bis ins Cytosol einer Wirtszelle hinein, transportiert werden können. Die VgrG-Proteine bilden die Spitze des hcp-Tubus, der durch die Membran einer Wirtszelle hindurch gelangen kann. Die genaue Funktion der anderen Komponenten ist bislang noch unbekannt (Pukatzki *et al.*, 2009, Hayes *et al.*, 2010). In Abbildung 26 ist ein T6SS schematisch dargestellt, entsprechend der bei *S. maltophilia* vorkommenden Komponenten.

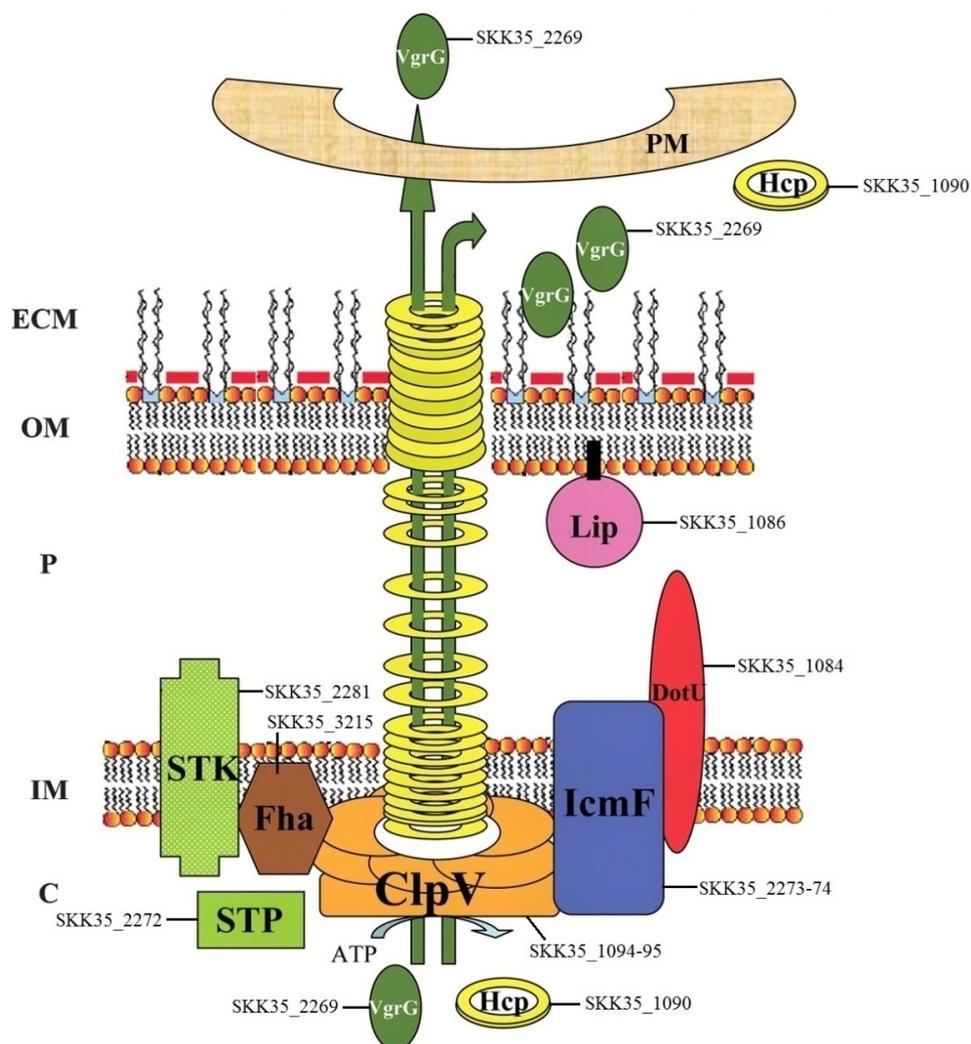


Abb. 26: Schematische Darstellung eines Typ-6-Sekretionssystems. Die jeweiligen Komponenten, wie sie im Genom von *S. maltophilia* SKK35 vorkommen, sind indiziert. Die ATPase ClpV (orange) bildet eine Pore in der inneren Membran, durch welche die Struktur-/Effektorproteine Hcp (gelber Ring) und VgrG (dunkelgrün) transportiert werden können. Hcp-Proteine bilden einen tubusförmigen Kanal, der die innere Membran bis zu der Membran von Wirtszellen durchdringen kann. Das VgrG-Protein dient entweder als Punktionsvorrichtung zum Durchdringen der Zellmembran einer Wirtszelle oder wird in die Umgebung sekretiert. IcmF (dunkelblau) und DotU (rot) sind Membranproteine, die mit ClpV interagieren. Lip (rosa) ist ein Lipoprotein der äußeren Membran. Regulatorische Proteine sind die Serin/Threonin Kinase STK und die Serin/Threonin Phosphatase STP, die über den Grad der Phosphorylierung des Fha-Proteins (braun) die Aktivität des T6SS regulieren. ECM: extrazelluläres Milieu, OM: äußere Membran, P: periplasmatischer Raum, IM: innere Membran, PM: Plasmamembran einer Wirtszelle (abgewandelt nach Filloux *et al.* 2008; Nachdruck genehmigt).

Ein Zusammenhang mit dem T6SS und der Virulenz von Bakterien wurde von Pukatzki *et al.* (2006) beschrieben. Sie waren in der Lage nachzuweisen, dass das T6SS die Virulenz von *V. cholerae* gegenüber *D. discoideum* und Makrophagen Zelllinien bewirkt. Der Export von Hcp und drei verwandten VgrG-Proteinen war hierfür essentiell. Mougous *et al.* (2006) beschrieben einen Zusammenhang mit dem T6SS von *P. aeruginosa* PAO1 und dessen Pathogenität gegenüber CF-Patienten. In diesem Zusammenhang ist das T6SS von *S. maltophilia* als potentieller Virulenzfaktor-Sekretionssystem zu berücksichtigen. Fraglich ist, ob es für die Virulenz gegenüber Amöben und Makrophagen verantwortlich ist; es könnte aber auch einen Einfluss auf eine Virulenzreaktion bei CF-Patienten besitzen. Der Nachweis und die Genexpression des *hcp*-Gens des T6SS werden in Kapitel 5.6 diskutiert.

Proteine, Toxine und andere Sekundärmetabolite

Die physiologische Untersuchung der *S. maltophilia* Isolate zeigte, dass die meisten von ihnen fähig waren, Virulenzfaktoren wie Hämolytine, Proteasen, und Siderophore zu produzieren. Andere Studien beschrieben ebenso die Produktion von Virulenzdeterminanten wie Proteasen, Phospholipasen, LPS und EPS (Figueirêdo *et al.*, 2006; Chibber *et al.*, 2008). Im Folgenden soll die genetische Grundlage für die Produktion dieser Sekundärmetabolite und ihr Potential als Virulenzgen anhand der Erkenntnisse für andere virulente Bakterienspezies betrachtet werden.

a) Proteasen

Zahlreiche Gene, die für Proteasen codieren, kommen bei *S. maltophilia* vor. Den größten Anteil haben Serin-Proteasen und Metalloproteasen. Im Zusammenhang mit der Virulenz von *S. maltophilia* wurde bereits eine extrazelluläre Protease, StmPr1, charakterisiert. Für diese konnte nachgewiesen werden, dass sie in der Lage ist, relevante Proteine des Menschen abzubauen. Dazu gehören Bindegewebsproteine wie Collagen und Fibronectin, was zur Schädigung von Fibroblasten führt. Ferner konnte sie Immunoglobulin G abbauen, was zur Störung des Immunmechanismus des Wirts führt. Verschiedene Protease-Inhibitoren zeigten keine Wirkung auf StmPr1 (Windhorst *et al.*, 2002). Kürzlich wurden für *S. maltophilia* drei weitere extrazelluläre Proteasen der Subtilase-Familie beschrieben, die über vergleichbare

Eigenschaften wie StmPr1 verfügen und im Zusammenhang mit der Virulenz von *S. maltophilia* stehen könnten (Ribitsch *et al.*, 2010; Ribitsch *et al.*, 2011).

Weitere bei *S. maltophilia* identifizierte Proteasegene sind vier Zink-abhängige Metalloproteasen, eine Serin-Protease, die homolog zur Protease VI von *P. aeruginosa* ist sowie Clp-Proteasen, die eine regulatorische Funktion haben und zum Beispiel die Bildung von Toxinen regulieren können. Die verschiedenen Protease-Familien und ihre mögliche Relevanz als Virulenzfaktor sind in Tabelle 29 dargestellt.

Tab. 29: Proteasen und ihr mögliches Virulenzpotential.

Proteasen	Virulenz durch	Nachweis bei	Referenz
Serin-Proteasen (StmPr1-4)	Abbau von Bindegewebsproteinen und Immunoglobulin	<i>S. maltophilia</i>	Windhorst <i>et al.</i> , 2002
Serin Protease (Protease VI)	Spaltung von Fibrinogen (Störung der Blutgerinnung) und Immunoglobulin G	<i>P. aeruginosa</i>	Hoge <i>et al.</i> , 2010
Metalloproteasen	Abbau von Lactoferrin, Collagen, Immunoglobulinen und antimikrobiellen Peptiden	<i>B. cenocepacia</i>	Loutet & Velvano, 2010
ClpP-Protease	Regulation der Produktion des α -Toxins und der extrazellulären Proteasen	<i>S. aureus</i>	Michel <i>et al.</i> , 2006

Die Ergebnisse des Proteolysetests auf Magermilch-Agar (vgl. Kapitel 4.2.3 und 5.2) zeigten ebenfalls, dass extrazelluläre Proteasen von fast allen *S. maltophilia* Stämmen produziert werden können. Interessant wäre eine Untersuchung der nicht-proteolytischen *S. maltophilia* Stämme auf das Vorkommen dieser Gene.

b) Hämolyisin und Siderophore

Hämolyisine sind Exotoxine, die die Membran von Erythrozyten lysieren und die eisenbindende Komponenten wie Hämoglobin, Transferrin und Lactoferrin freisetzen können. Dieses Eisen kann dann durch eisenbindende Proteine der äußeren Membran oder Siderophore von den Bakterien aufgenommen werden. Hämolyisine können dabei nicht nur speziell Erythrozyten, sondern auch andere Zelltypen wie Mastzellen und Leukozyten lysieren und Gewebeschäden verursachen (Zhang & Austin, 2005). Hämolyisin III, für das die entsprechenden Gene bei allen *S. maltophilia* Stämmen gefunden wurden, liegt u.a. als Virulenzfaktor bei *Bacillus cerberus* und *Vibrio vulnificus* vor (Baida & Kuzmin, 1996; Chen *et al.*, 2004). Das führt zu der Annahme, dass Hämolyisine generell zum Kern Genom von *S. maltophilia* gehören, was durch die Beobachtung bestätigt wird, dass die meisten

S. maltophilia Stämme auch in der Lage waren, Hämolyse-Ringe auf Blutagarplatten zu erzeugen.

In dieser Arbeit konnte für alle *S. maltophilia* Stämme das Vorhandensein einer Genregion für die Synthese des Siderophors Enterobactin identifiziert werden. Darüber hinaus besaßen alle *S. maltophilia* Isolate mehrere Rezeptoren für Siderophore, sowie die Hämoglobin-bindenden Proteine HgbB/HgbC. Ein Zusammenspiel dieser Komponenten könnte zur Virulenz von *S. maltophilia* beitragen.

c) Phospholipasen

Ein im Zusammenhang mit der bakteriellen Virulenz häufig beschriebener Faktor sind die von pathogenen Bakterien produzierten Phospholipasen. Es gibt verschiedene Typen von Phospholipasen (A-D), die danach unterschieden werden, an welcher Stelle sie ein Phospholipidmolekül spalten können. Phospholipasen werden auch von Eukaryoten produziert, wo sie einen Anteil am Lipid-Metabolismus haben. Von Bakterien und Pilzen produzierte Phospholipasen besitzen dagegen einen Einfluss als Virulenzfaktor, indem sie Phospholipide abbauen, was zu einer Änderung der Bestandteile der Zellmembran und somit zur Schädigung von Zellen führt. Zahlreiche pathogene Bakterienspezies, z.B. *Clostridium* sp., *P. aeruginosa*, *Y. enterocolitica*, *S. aureus* und *L. monocytogenes*, sind in der Lage, Phospholipasen zu produzieren (Ramrakhiani & Chand, 2011). Gene, die für alle verschiedenen Arten von Phospholipasen codieren, liegen bei allen *S. maltophilia* Stämmen vor. Den größten Anteil haben die Phospholipasen B und D. Die Phospholipase C wurde bei *C. perfringens* allerdings als eines der stärksten Toxine beschrieben, das hämolytische, cytotoxische und myotoxische Aktivität besitzt (Flores-Díaz, *et al.*, 2004). Die Produktion der Phospholipase C konnte bereits in früheren Studien für einige *S. maltophilia* Stämme nachgewiesen werden (Figueirêdo *et al.*, 2006; Chibber *et al.*, 2008).

d) RTX-Proteine

Auf einer genetischen Insel von *S. maltophilia* SKK35 lokalisiert war ein Operon zu finden, das für zwei Proteine der RTX-Familie sowie zwei T1SS Proteine codiert. Proteine der RTX-Familie sind Exoproteine von gram-negativen Bakterien. Sie unterscheiden sich alle deutlich in ihren Aminosäuresequenzen. Gemein ist ihnen allen, dass sie repetitive glycin- und aspartatreiche Sequenzen besitzen, bei denen sich repetitiv das Aminosäuresequenz-Motiv

GGXGXD wiederholt. Diese formen Bindestellen für Calcium-Ionen aus (vgl. Abb. 27). Eine weitere Besonderheit ist deren Sekretion über ein TISS, welches sich auf demselben Locus befindet (Linhartová *et al.*, 2010).

Die meisten der bislang charakterisierten RTX-Proteine sind Cytotoxine wie Leukotoxine, Hämolyse und Proteasen, was zu der Annahme führt, dass die genetische Insel des virulenten *S. maltophilia* Stamms SKK35, die das RTX-Operon beinhaltet, ein Kandidat für eine bisher unbekannte Pathogenitätsinsel von *S. maltophilia* ist. Es sind auch RTX-Proteine bekannt, die nicht in Virulenzmechanismen gegenüber Eukaryoten involviert sind. Diese sind RTX-Bacteriocine, Oberflächenproteine (S-layer), die den Bakterien Schutz gegenüber aggressiven Umwelteinflüssen bieten, Proteine, die für die Schwimmeigenschaften von Cyanobakterien verantwortlich sind, und Nodulations-RTX-Proteine, die bei *Rhizobium leguminosarum* zur Bildung der stickstofffixierenden Noden an Pflanzenwurzeln beitragen (Linhartová *et al.*, 2010). Beispiele für virulente und nicht-virulente RTX-Proteine, die in der Literatur beschrieben wurden, sind in Tabelle 30 aufgeführt.

Tab. 30: RTX-Proteine und ihre Funktion.

	Funktion	Gen	Bakterienspezies	Referenz
virulente RTX-Proteine	Leukotoxin	LktA	<i>M. haemolytica</i>	Forrestier & Welch, 1991
	Hämolyse	HlyA	<i>E. coli</i>	Forrestier & Welch, 1991
	Adenylat Cyclase (AC) Toxin	CyaA	<i>B. pertussis</i>	Benz <i>et al.</i> , 1994
	alkaline Protease	AprA	<i>P. aeruginosa</i>	Hoge <i>et al.</i> , 2010
	Lipase	LipA	<i>S. marcescens</i> <i>Pseudomonas spp.</i>	Linhartová <i>et al.</i> , 2010
	MARTX (<i>multifunctional autoprocessing repeats in toxin</i>)	RtxA	<i>V. cholerae</i>	Linhartová <i>et al.</i> , 2010
nicht virulente RTX-Proteine	Bacteriocine	RczA	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>Agrobacter tumefaciens</i>	Linhartová <i>et al.</i> , 2010
	S-layer Proteine	RsaA	<i>Caulobacter crescentus</i>	Linhartová <i>et al.</i> , 2010
	Motilität	SwmA	<i>Synechococcus sp.</i>	Linhartová <i>et al.</i> , 2010
	Nodulation	NodO	<i>R. leguminosarum</i>	Linhartová <i>et al.</i> , 2010

Die Nomenklatur der RTX-Gene von *S. maltophilia* wurde durch die automatische Annotation nach den FrpA und FrpC (Fe-reguliertes Protein) RTX-Proteinen von *Neisseria meningitidis* bestimmt. FrpA und FrpC von *N. meningitidis* liegen als allelische Varianten und nicht zwangsläufig auf einem Operon vor. Sie wurden auch nicht immer beide bei den untersuchten *N. meningitidis* Stämmen lokalisiert (Osiča *et al.*, 2001). Die RTX-

Proteine von *S. maltophilia* ließen zwar grundsätzlich ein Alignment mit FrpA und FrpC von *N. meningitidis* über die Länge des Proteins mittels PSI-Blast zu. Ihre Aminosäuresequenz stimmte aber nur zu jeweils 31% überein; meist an den repetitiven, glycinreichen Abschnitten. Dies alles spricht zwar dafür, dass FrpA und FrpC von *S. maltophilia* eindeutig der diversen RTX-Proteinfamilie zugerechnet werden können, ihre Funktion dagegen bleibt unbekannt. Da die Nomenklatur als Fe-reguliertes Protein zutrifft, wurde sie für die RTX-Proteine von *S. maltophilia* beibehalten.

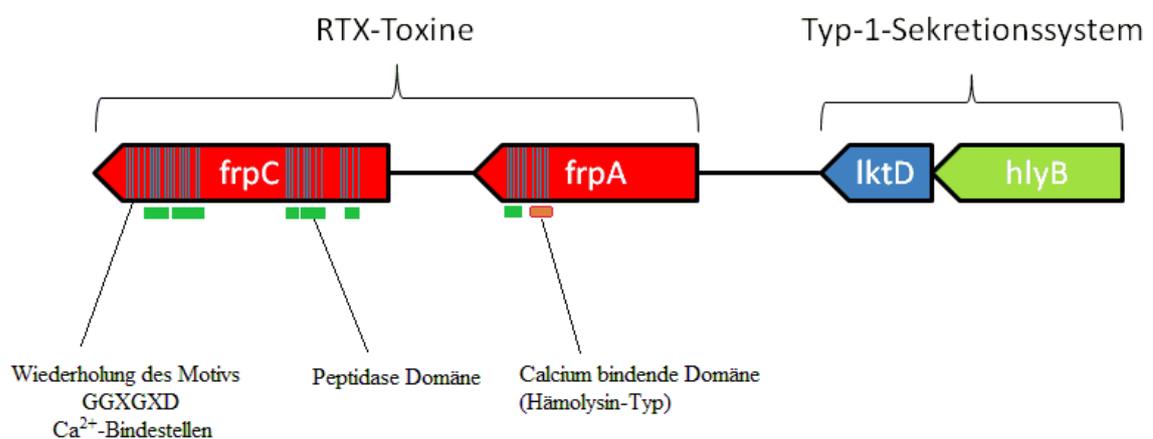


Abb. 27: RTX-Operon von *S. maltophilia* SKK35. Die RTX-Proteine besitzen 4- bis 8-fach wiederholte Aminosäuresequenz-Abschnitte mit dem Motiv GGXGXD, welche in der Lage sind Ca²⁺-Ionen zu binden. Dieses Motiv kommt bei FrpA insgesamt 11-fach und bei FrpC 24-fach vor. FrpC besitzt 5 Peptidase-Domänen, FrpA besitzt zwei Peptidase Domänen und eine Calcium bindende Domäne vom Hämolyysin-Typ (ermittelt durch PSI-Blast).

Bei den meisten bekannten RTX-Operons liegt ein A-Protein als inaktive Vorstufe vor (z.B. HlyA von *E. coli*), welches zusammen mit einem C-Protein (HlyC) über die B- und D-Proteine des Typ-1-Sekretionssystems (HlyB, HlyD) sekretiert wird. Das C-Protein wird benötigt, um das A-Protein zu aktivieren (Guzmán-Verri *et al.*, 1997). Im Fall des RTX-Operons von *S. maltophilia* liegen allerdings zwei RTX-Proteine vor, FrpA und FrpC. Es könnte sich dabei um ein Aktivator-Protein und ein Toxin handeln. Bei der Betrachtung konservierter Domänen (mittels PSI-Blast) innerhalb der Proteine, ließ sich für FrpA eine Hämolyysin-typische Domäne und eine Peptidase-Domäne erkennen. Konservierte Domänen bei FrpC dagegen waren insgesamt fünf Peptidase-Domänen. Solche Peptidase-Domänen wurden bereits bei anderen RTX-Toxinen gefunden. Es wird angenommen, dass diese durch

Abspaltung eines Teils des Proteins eine Toxin-Vorstufe in ein aktives Toxin umwandeln können (Pei *et al.*, 2009). Dies würde die Hypothese unterstützen, dass es sich bei FrpA um ein Toxin in der Vorstufe – möglicherweise mit hämolytischen Eigenschaften – handelt, das durch die Peptidase-Aktivität von FrpC aktiviert werden kann. Der Nachweis einer solchen Funktionsweise im Experiment wäre im Weiteren zu erbringen.

5.5.3 Genomische Inseln von *S. maltophilia*

Genomische Inseln wurden, ausgehend vom Genomvergleich aller fünf sequenzierten *S. maltophilia* Stämme, als Regionen, die aus vier oder mehr zusammenhängenden ORFs bestanden und eine Größe von >3 kb besaßen definiert.

Problematik bei der Identifikation von genomischen Inseln bei *draft*-Genomsequenzen

Problematisch war, dass drei der Genome *draft*-Genome, also unvollständige Genomsequenzen, waren, deren *Contigs* an einer Referenzsequenz ausgerichtet wurden. Die *contigs* von RA8 und SKK35 wurden an K279a als Referenzgenom ausgerichtet; Regionen, die auf diese Weise nicht mit K279a in Deckung gebracht werden konnten, wurden an die Genomsequenz angehängt. Daraus ergaben sich Probleme. Im Alignment mit Mauve waren diese Regionen als GEI (genomische Insel) dargestellt. Es handelt sich dabei nur um kurze, aneinanderghängte Fragmente mit extrem kurzen *contigs* (50-300 bp), die keine codierenden Sequenzabschnitte enthielten. In einigen Fällen waren die Abschnitte auch größer (1000-2000 bp) und beinhalteten die ORFs, die automatisch annotiert wurden (vgl. 3.4.2 Problematik der Annotation und des Alignments von *draft*-Genomdaten). Da diese unter Umständen keine vollständigen Gene darstellen, wurden diese ORFs aus der Betrachtung der GEIs herausgenommen. Im Fall von RA8 handelte es sich um 26 ORFs und im Fall von SKK35 um 12 ORFs. Da diese meist als hypothetische Proteine mit unbekannter Funktion annotiert wurden, waren sie im Rahmen des hier unternommenen Genomvergleichs nicht von Relevanz.

Dadurch, dass die Position der *contigs* anhand des Referenzgenoms ermittelt wurde, konnte es passieren, dass eine eigentlich große genomische Insel auf zwei oder mehreren *contigs* lokalisiert war, und damit in Form von mehreren kleinen Inseln vorlag. Umgekehrt kann es

sein, dass aus zwei nebeneinander liegenden GEI *contigs* eine große Insel entstanden ist. Dies sollte bei der Diskussion der Größe von genomischen Inseln berücksichtigt werden. Da allerdings die meisten GEI auf größeren *contigs* lokalisiert waren, sollten sich im Gesamtbild keine großen Unterschiede zeigen.

Das akzessorische Genom von *S. maltophilia*

Der Begriff „Kern-Genom“ beschreibt einen relativ invariablen Anteil des Genoms, der alle zum Überleben essentiellen Gene des Bakteriums beinhaltet. Das „akzessorische Genom“ bezeichnet, streng genommen, sämtliche variablen Gene, die gegebenenfalls an mobile Elemente wie Integrons, Transposons oder Plasmide gekoppelt sind (Kung *et al.*, 2010). Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Gesamtvergleich von fünf Genomsequenzen erfolgte, wird hier der vereinfachte Begriff des „akzessorischen Genoms“ für die Beschreibung der individuellen Komponenten der einzelnen *S. maltophilia* Stämme genutzt.

Im Gesamtvergleich heben sich K279a und SKA14 durch den größten Anteil an einzigartigen Regionen hervor, während R551-3 und SKK35 den geringsten Anteil daran haben.

Die meisten potentiellen Virulenzfaktoren, die im Rahmen dieser Arbeit beschrieben wurden, gehörten zum Kern-Genom von *S. maltophilia*. Dazu gehörten Proteasen, Hämolyisin, Phospholipasen und Siderophore. Einige potentielle Virulenzgene wie LPS-Biosynthesegene, Adhäsine und Phospholipasen kamen auch auf GEIs vor, aber meist waren andere Regionen, die für Proteine dieser Klasse codierten, auch im *S. maltophilia* Kern-Genom lokalisiert, und können somit nicht als Pathogenitätsinsel beschrieben werden. Die Ausnahme davon bildet die genomische Insel, die das RTX-Operon beinhaltet.

Auch Antibiotikaresistenz-Gene lagen fast vollständig als Bestandteil des Kern-Genoms vor, was insbesondere auch hinsichtlich der Behandlung mit Antibiotika von Relevanz ist.

Im Rahmen der Diskussion eines verstärkten Selektionsdrucks in Richtung der Antibiotikaresistenzen und der verstärkten Möglichkeit des horizontalen Gentransfers in der Kläranlage (vgl. Kapitel 5.1), hätte man den größten Anteil an einzigartigen Regionen im Genom von RA8 erwartet. Der Anteil der GEI am gesamten Genom lag aber mit 10% nur im mittleren Bereich. RA8 besitzt zwar zwei zusätzliche Makrolid-Effluxpumpen und einen Cluster mit LPS-Biosynthese-Genen, aber K279a und SKA14 besitzen ein deutlich größeres akzessorisches Genom.

Auffällig war, dass die meisten Schwermetallresistenzgene auf großen genomischen Inseln zu finden waren, die mehrere Schwermetallresistenz-Cluster beinhalteten. Dagegen waren im Kern-Genom von *S. maltophilia* nur Arsen- und Kupfer-Resistenzgene lokalisiert. Alle anderen Schwermetallresistenz-Regionen schienen zum akzessorischen Genom zu gehören. Häufig liegen essentielle Metall-Resistenzgene chromosomal vor, während nicht essentielle Metall-Resistenzgene auf Plasmiden lokalisiert sind. Diese können als mobile Elemente über den Weg des horizontalen Gentransfers auf andere Bakterien übertragen werden und auch ins Genom integriert werden. Je nach Umwelt der Bakterien kann die Akquise von Schwermetallresistenzgenen Überlebensvorteile bieten (Bruins *et al.*, 2000).

Prophagen und phagenähnliche Elemente haben häufig einen großen Anteil am Austausch von genetischem Material. Als temperente Phagen werden sie ins Genom integriert. Dabei ist es möglich, dass sie mutieren oder Rekombinationseffekten unterliegen. Wenn dabei ihre Funktionalität verloren geht, werden sie zum festen Bestandteil des Genoms und solange entsprechende Regulationsmechanismen vorhanden sind, werden ihre Gene als Teil des Genoms exprimiert. Noch funktionsfähige Prophagen können durch Stimuli wie DNA-Schädigungen wieder mobilisiert werden und dabei auch bakterieneigene DNA, die im Laufe von Rekombinationsprozessen in die Phagen DNA integriert wurde, mit mobilisieren. So kann DNA-Übertragung wiederum auf andere Bakterien erfolgen. In diesem Sinne sind Phagen wichtige Werkzeuge des horizontalen Gentransfers (Juhas *et al.*, 2008; Kung *et al.*, 2010). Im akzessorischen Genom von *S. maltophilia* waren größere Regionen, die mit Prophagen in Beziehung standen, fast ausschließlich auf genomischen Inseln zu finden. SKA14 und SKK35 besaßen als einzige eine homologe Prophagen-Region, was für eine genetische Verwandtschaft beziehungsweise einen gemeinsamen Vorfahren der beiden Stämme spricht. Regionen, die von Phagen ins Genom übertragen wurden, beinhalteten, neben den bekannten, für die Ausbildung von Phagen notwendigen Genen, meist hypothetische Proteine mit unbekannter Funktion und waren daher für die Betrachtung klinisch relevanter Eigenschaften von *S. maltophilia* nicht von Bedeutung.

Die akzessorischen Genome der hier untersuchten *S. maltophilia* Isolate haben damit keinen merklichen Einfluss auf *S. maltophilia* als antibiotikaresistentes Pathogen. Eine Ausnahme davon könnten die RTX-Proteine bilden.

In vielen Fällen konnte man im direkten Genomvergleich beobachten, dass Regionen, die Virulenzgene oder Resistenzgene beinhalten, bei SKA14 und SKK35, nicht aber bei K279a, R551-3 und RA8 vorlagen. Das beste Beispiel hierfür ist das Typ-6-Sekretionssystem. Dies

deckt sich mit den Ergebnissen der genetischen Typisierungsstudien, die eine nähere Verwandtschaft von SKA14 und SKK35 zeigten. Angesichts der Tatsache, dass SKK35 als einziger Stamm im Amöbenmodell virulent war, war es unerwartet, dass dieser ein sehr kleines akzessorisches Genom hat.

Basierend auf dem Genomvergleich der fünf *S. maltophilia* Stämme konnten die folgenden Hypothesen aufgestellt werden:

1. Die genomische Insel von SKK35, welche das RTX-Operon beinhaltet, ist für die Virulenz gegenüber Amöben relevant.
2. Aufgrund des Verwandtschaftsverhältnisses von SKA14 und SKK35 besitzen beide Genome die notwendigen Virulenzgene (z.B. das T6SS). Diese sind aber bei SKA14 inaktiv oder beschädigt, oder es liegt nur bei SKK35 ein Effektorprotein vor.
3. Alle fünf *S. maltophilia* Isolate besitzen das latente Potential der Virulenz gegenüber Amöben, nur SKK35 besitzt eine funktionierende Regulationseinheit für diese.

Hier gilt es zu berücksichtigen, dass diese Hypothesen nur für die Virulenz gegenüber Amöben gelten. Da die Virulenz von K279a bereits in anderen Modellen bewiesen wurde (Fouhy *et al.*, 2007; Rouf *et al.*, 2011), sind verschiedene Virulenzmechanismen, abhängig vom Wirt, der Immunantwort und den befallenen Zelltypen, wahrscheinlich.

5.6 Nachweis und Expression der RTX- Gene

Angenommen, die RTX-Proteine bildeten die Grundlage für die Virulenz gegenüber Amöben, könnte man davon ausgehen, dass die entsprechenden Gene bei allen virulenten *S. maltophilia* Stämmen vorkommen. Um dies nachzuweisen, wurden spezifische Primerpaare entworfen, die an die *frpA* und *frpC* Gene von *S. maltophilia* binden. Insgesamt waren es drei Primerpaare, die an das *frpA*-Gen und zwei Primerpaare, die an das *frpC*-Gen hybridisierten. Außer bei SKK35 selbst, war es bei keinem anderen *S. maltophilia* Stamm möglich *frpA* und *frpC* nachzuweisen. Möglich wäre es, falls die RTX-Gene auch bei anderen *S. maltophilia* Stämmen vorkommen, dass diese sich in ihrer Sequenz an den Stellen, an denen die Primer binden unterscheiden. Da aber insgesamt 5 verschiedene Primerpaare nicht in der Lage waren,

die Gene der RTX-Proteine bei anderen *S. maltophilia* Stämmen zu identifizieren, ist nicht anzunehmen, dass eine DNA-DNA-Hybridisierung weitere RTX-Proteine bei *S. maltophilia* nachweisen könnte. Die RTX-Proteine kommen somit als Virulenzfaktor gegenüber Amöben nicht in Frage. Eine Virulenzfunktion in anderen Modellen wäre dagegen möglich. Daher wurde überprüft, ob die RTX-Gene tatsächlich exprimiert werden.

Zu diesem Zweck wurde SKK35 in verschiedenen Medien und in Co-Kultur mit Amöben angezogen. RNA wurde isoliert, revers transkribiert und mittels der Primer für *frpA* und *frpC*, die an die entstandene spezifische cDNA binden konnten, wurde eine mögliche Genexpression nachgewiesen. Da immer die gleiche Menge an Gesamt-RNA für die reverse Transkription eingesetzt wurde, kann man davon ausgehen, dass sich anhand der Stärke der PCR-generierten DNA Banden auch Rückschlüsse auf die Intensität der Expression ziehen lassen.

Die stärkste Expression für *frpA* ließ sich bei der Inkubation mit Zugabe von humanem Blut nachweisen, die zweitstärkste mit Eisensulfatzugabe. Dies ist insbesondere interessant, da *frpA* auch eine Hämoglobin-bindende Domäne aufweist, was auf eine mögliche Funktion als Hämolyse hinweist. Unter Zugabe von fötalem Kälberserum dagegen, welches keine zellulären Bestandteile wie Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten mehr enthält, ließ sich keine Genexpression erkennen. Für eine eiseninduzierte Genexpression spricht die Tatsache, dass die zweitstärkste Expression bei Zugabe von Eisensulfat ins Medium erfolgte. Ein ähnliches Bild, auch wenn die PCR-Banden nicht so stark waren, ergab sich für die Genexpression von *frpC*.

Die RTX-Proteine gehören somit möglicherweise zu den Hämolyse. Dies müsste im Weiteren nachgewiesen werden, z.B. durch die Klonierung des RTX-Operons in ein nicht hämolytisches Bakterium. Für dieses müsste sich danach Hämolyse nachweisen lassen. Auch ist unklar, über welchen Weg die Genexpression des RTX-Operons reguliert wird und ob *frpC* aufgrund der Peptidase Domänen als Aktivator-Protein fungiert.

Während man bei einer Kultivierung von SKK35 in M9 über 4 Stunden keine Expression der RTX-Proteine sehen konnte, ließ sich nach 24 Stunden in M9-Medium die Expression von *frpA* und *frpC* nachweisen. Dies war auch der Fall für die Expression nach 24 Stunden mit Amöben. Hier waren jeweils für *frpA* moderate bis starke Banden zu verzeichnen, und für *frpC* jeweils schwache Banden. Eine weitere mögliche Annahme wäre eine Induktion der Expression durch eine hohe Zelldichte (durch Quorum Sensing) oder eine Konkurrenzsituation, hervorgerufen durch Nährstoffmangel.

Als Fazit lässt sich sagen, dass die Gene *frpA* und *frpC* nicht mit der Virulenz gegenüber Amöben in Verbindung zu bringen sind. Es wäre aber plausibel, wenn die RTX-Proteine hämolytische Eigenschaften besitzen.

5.7 Nachweis und Expression des Typ-6-Sekretionssystems am Beispiel des *hcp*-Gens

Ein weiterer, für *S. maltophilia* noch nicht näher untersuchter Faktor, der zur Virulenz beitragen könnte, ist das Typ-6-Sekretionssystem, das bei dem virulenten Stamm SKK35, aber auch bei dem nicht-virulenten Stamm SKA14 vorlag. Das T6SS erwies sich als essentiell für die Virulenz von *V. cholerae* gegenüber *D. discoideum* (Pukatzki *et al.*, 2009), daher wäre eine Rolle des T6SS in der Virulenz von *S. maltophilia* gegenüber Amöben ebenfalls möglich. Um zu überprüfen, ob weitere virulente *S. maltophilia* Isolate ein T6SS besitzen, wurde die *S. maltophilia* Stammsammlung auf das Vorkommen des *hcp*-Gens hin getestet. Das *hcp*-Gen bildet Proteine, die einen tubusförmigen Kanal des T6SS bilden. Dieser ist essentiell für die Funktion des T6SS und ist daher als Zielgen für einen PCR-Nachweis geeignet. Für das *hcp*-Gen wurde ein spezifisches Primerpaar entworfen. Damit konnte es bei 8 von 59 getesteten Isolaten nachgewiesen werden. Diese waren recht unterschiedlichen Ursprungs. Bei der Betrachtung ihrer Zuordnung zu den zu Beginn dieser Arbeit definierten genetischen Gruppen (vgl. Kapitel 4.1.1. und 4.1.2) konnte man sehen, dass nicht nur SKK35 und SKA14 näher verwandt waren und beide ein T6SS besaßen. Auch die Stämme der *gyrB*-Gruppe I besaßen ein T6SS. SKK12 und NA20 waren zwar keiner größeren Gruppe zuzuordnen, waren aber genetisch miteinander verwandt und besaßen ein T6SS. Nur SKK35 und NA20 waren virulent gegenüber beiden Amöben, SKK12 war virulent gegenüber *A. castellanii*. Daher lässt sich nicht auf eine Beteiligung des T6SS an der Virulenz gegenüber den Amöben schließen.

Zwei der Isolate, die ein T6SS besaßen, waren CF-Patientenisolate. Im Fall von *P. aeruginosa* wurde die Relevanz eines T6SS im Zusammenhang mit bakteriellen CF-Infektionen diskutiert. Im Sputum von CF-Patienten, die mit *P. aeruginosa* kolonisiert waren, waren Hcp-Proteine zu finden, und auch in ihrem Serum wurden Hcp-Antikörper nachgewiesen (Mougous *et al.*, 2006). In der genetischen *gyrB*-Gruppe A, die den größten Anteil an CF-Patientenisolaten aufwies, besaß jedoch keines ein T6SS.

Zuletzt wurde die Genexpression von *hcp* bei SKK35 unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Bei allen untersuchten Medien konnte eine sehr starke Genexpression verzeichnet werden, was dafür spricht, dass das *hcp*-Gen des T6SS generell exprimiert wird. Ob und in

welchem Ausmaß es zur Pathogenese bei CF-Infektionen mit *S. maltophilia* beiträgt gilt es noch zu klären.

5.8 Fazit

S. maltophilia präsentierte sich als hoch diverse Spezies, die in einer Vielzahl von Habitaten zu finden war. Ein Vergleich der genetischen Profile, die für die verschiedenen *S. maltophilia* Stämme ermittelt werden konnten, erlaubte die Zuordnung von genetischen Subgruppen. Diese ließen sich zum Teil spezifischen Ökotypen zuordnen. Ausnahmen davon zeigten aber auch, dass die Spezies höchst anpassungsfähig ist und in den verschiedensten Habitaten überleben kann. Dazu gehören auch Habitate wie Krankenhäuser, die wegen ihrer besonders strikten Hygienevorschriften meist eine Selektion von antibiotikaresistenten Keimen zur Folge haben. *S. maltophilia* ist ein Bakterium das aufgrund seiner zahlreichen Antibiotikaresistenzen, sowohl im klinischen Milieu, als auch in der Umwelt überleben kann. Problematisch wird es, wenn es die Möglichkeit erhält, einen immungeschwächten Wirt zu kolonisieren. Faktoren, die *S. maltophilia* eine Adhäsion und Persistenz an Oberflächen erlauben, wurden im Rahmen dieser Arbeit auf genetischer und physiologischer Ebene charakterisiert. Obwohl diese Faktoren, wie Pili, Fimbrien und Flagellen, zum Kern Genom von *S. maltophilia* gehören, war die tatsächliche physiologische Ausprägung dieser deutlich unterschiedlich.

Da die Kolonisierung eines menschlichen Wirts alleine noch nicht zur Ausbildung eines Krankheitsbilds führt, wurden Faktoren, die zur Pathogenität von *S. maltophilia* beitragen untersucht. Hierin zeigte sich keine große Diversität, vielmehr waren Virulenzfaktoren wie Hämolyse, Proteasen und Siderophore Kernbestandteil des *S. maltophilia* Genoms und wurden von der überwiegenden Mehrheit der untersuchten *S. maltophilia* Isolate sekretiert.

Die Untersuchung der Virulenz von *S. maltophilia* im Experiment zeigte deutliche Unterschiede im Potential, Amöben zu infizieren. Dabei ließ sich eine hohe Virulenz auch in Zusammenhang mit bestimmten Subspezies bringen. Diese Ergebnisse führen zu der Hypothese, dass alle *S. maltophilia* Stämme ein bestimmtes Grundpotential besitzen, einen immungeschwächten Wirt zu kolonisieren und eine Infektion hervorzurufen. Einige *S. maltophilia* Stämme besitzen dagegen ein größeres pathogenes Potential, das heißt sie besitzen noch zusätzliche Eigenschaften, die eine Virulenzreaktion noch verschlimmern oder die Immunreaktion schwächen können.

Als Kandidaten für neue Virulenzgene wurden die bei einem virulenten *S. maltophilia* Stamm identifizierten RTX-Proteine und ein Sekretionssystem untersucht. Ihre Genexpression konnte nachgewiesen werden. Es stellte sich jedoch heraus, dass sie als Ursache für das unterschiedliche pathogene Potential gegenüber Amöben nicht in Frage kommen.

5.9 Ausblick

Basierend auf diesen Erkenntnissen gibt es mehrere Optionen für eine zukünftige Charakterisierung der Virulenzdeterminanten von *S. maltophilia*.

1) Zukünftige Arbeiten erfordern die Untersuchung von Mutanten, wobei als Ziel-Gene für gerichtete Mutationen die, in dieser Arbeit beschriebenen, Virulenzgene verwendet werden können. Wenn die Deletion eines dieser Faktoren eine verminderte Virulenz bewirken würde, wäre der Nachweis für dessen tatsächliche Funktion als Virulenzgen erbracht.

2) Da es zwischen den Ergebnissen der Virulenztests mit den verschiedenen Amöbenspezies und mit vorherigen Studien zu Diskrepanzen kam, ist es notwendig, diese Ergebnisse zumindest mit einer Anzahl an repräsentativen Isolaten mit anderen Modellen abzugleichen. Dabei wäre die Nutzung eines Säugetiers als Modellorganismus am besten geeignet, um den Vergleich zur Infektion im Menschen ziehen zu können.

3) Im Rahmen eines vollständigen Genomvergleichs wäre es sinnvoll, mittels Sanger-Sequenzierung die Lücken im *Draft*-Genom von *S. maltophilia* RA8 und SKK35 zu schließen. Auch eine vollständige Genomsequenzierung eines Vertreters der nahe Verwandten, aber nicht virulenten Spezies *S. rhizophila* könnte im Vergleich mit *S. maltophilia* dazu beitragen, weitere potentielle Virulenzgene zu identifizieren.

6 Literatur

Al-Hamad A, Upton M, Burnie J (2009) Molecular cloning and characterization of SmrA, a novel ABC multidrug efflux pump from *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother* **64**: 731-734.

Alikhan NF, Petty NK, Ben Zakour NL, Beatson SA (2011) BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics* **12**: 402.

Alonso A, Martínez JL (1997) Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:1140-1142.

Alonso A, Martínez JL (2000) Cloning and Characterization of SmeDEF, a Novel Multidrug Efflux Pump from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Ch* **44**: 3079–3086.

Alonso A, Sanchez P, Martínez JL (2000) *Stenotrophomonas maltophilia* D457R contains a cluster of genes from gram-positive bacteria involved in antibiotic and heavy metal resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 1778-1782.

Alonso A, Martínez JL (2001) Expression of Multidrug Efflux Pump SmeDEF by Clinical Isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Ch* **45**: 1879–1881.

Alonso A, Morales G, Escalante R, Campanario E, Sastre L & Martínez JL (2004) Overexpression of the multidrug efflux pump SmeDEF impairs *Stenotrophomonas maltophilia* physiology. *J Antimicrob Chemother* **53**: 432–434.

Ansorge WJ (2009) Next-generation DNA sequencing techniques. *N Biotechnol* **25**: 195-203.

Apisarnthanarak A, Mayfield JL, Garison T, McLendon PM, DiPersio JF, Fraser VJ & Polish LB (2003) Risk Factors For *Stenotrophomonas maltophilia* Bacteremia In Oncology Patients: A Case–Control Study. *Infect Control Hosp Epidemiol* **24**: 269-274.

Assih EA, Ouattara AS, Thierry S, Cayol JL, Labat M & Macarie H (2002) *Stenotrophomonas acidaminiphila* sp. nov., a strictly aerobic bacterium isolated from an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 559-568.

Avison MB, von Heldreich CJ, Higgins CS, Bennett PM, Walsh TR (2000) A TEM-2 β -lactamase encoded on an active TnI-like transposon in the genome of a clinical isolate of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **46**: 879-884.

Avison MB, Higgins SH, van Heldreich CJ, Bennett PM, Walsh TR (2001) Plasmid Location and Molecular Heterogeneity of the L1 and L2 β -Lactamase Genes of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Ch* **45**: 413-419.

Avison MB, Higgins CS, Ford PJ, von Heldreich CJ, Walsh TR, Bennett PM (2002) Differential regulation of L1 and L2 β -lactamase expression in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49**: 387-389.

- Axelsson-Olsson D, Olofsson J, Ellström P, Waldenström J and Olsen B** (2009) A simple method for long-term storage of *Acanthamoeba* species. *Parasitol Res* **104**: 935–937.
- Backert S, Meyer TF** (2006) Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **9**: 207–217.
- Baida GE, Kuzmin NP** (1996) Mechanism of action of hemolysin III from *Bacillus cereus*. *Biochim Biophys Acta* **1284**: 122-124.
- Baquero F, Martínez JL, Cantón R** (2008) Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol* **19**: 260-265.
- Barbolla R, Catalano M, Orman BE, Famiglietti A, Vay C, Smayevski J, Centrón D, Piñeiro SA** (2004) Class 1 Integrons Increase Trimethoprim-Sulfamethoxazole MICs against Epidemiologically Unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates. *Antimicrob Agent Chemother* **48**: 666-669.
- Benz R, Maier E, Ladant D, Ullmann A, Sebo P** (1994) Adenylate cyclase toxin (CyaA) of *Bordetella pertussis*. Evidence for the formation of small ion-permeable channels and comparison with HlyA of *Escherichia coli*. *Jour Biol Chem* **269**: 27231-27239.
- Berg G, Roskot N & Smalla K** (1999) Genotypic and Phenotypic Relationships between Clinical and Environmental Isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Clin Microbiol* **37**: 3594-3600.
- Berg G, Eberl L, Hartmann A** (2005) The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Env Microbiol* **7**: 1673-1685.
- Blevés S, Viarre V, Salacha R, Michel GP, Filloux A, Voulhoux R** (2010) Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *Int J Med Microbiol* **300**: 534-43.
- Boktour M, Hanna H, Ansari S, Bahna B, Hachem R, Tarrand J, Rolston K, Safdar A, Raad I** (2006) Central venous catheter and *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in cancer patients. *Cancer* **106**: 1967-73.
- Bollet C, Davin-Regli A & De Micco P** (1995) A simple method for selective isolation of *Stenotrophomonas maltophilia* from environmental samples. *Appl Environ Microbiol* **61**: 1653-1654.
- Bruins MR, Kapil S, Oehme FW** (2000) Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf* **45**: 198-207.
- Carroll KC, Cohen S, Nelson R, Campbell DM, Claridge JD, Garrison MW, Kramp J, Malone C, Hoffmann M, Anderson DE** (1998) Comparison of various in vitro susceptibility methods for testing *Stenotrophomonas maltophilia*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **32**: 229-235.
- Casadevall A, Pirofski LA** (2007) Accidental virulence, cryptic pathogenesis, martians, lost hosts, and the pathogenicity of environmental microbes. *Eukaryot Cell* **6**: 2169-2174.

Chen YC, Chang MC, Chuang YC, Jeang CL (2004) Characterization and virulence of hemolysin III from *Vibrio vulnificus*. *Curr Microbiol* **49**: 175-179.

Chhibber S, Gupta A, Sharan R, Gautam V, Ray P (2008) Putative virulence characteristics of *Stenotrophomonas maltophilia* : a study on clinical isolates. *World J Microbiol Biotechnol* **24**: 2819–2825.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2006) Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline. *CLSI Document M7-A7, Vol. 26*, No. 2.

Coenye T, Vanlaere E, LiPuma JJ & Vandamme P (2004^a) Identification of genomic groups in the genus *Stenotrophomonas* using *gyrB* RFLP analysis. *FEMS Immunol Med Microbiol* **40**: 181-185.

Coenye T, Vanlaere E, Falsen E & Vandamme P (2004^b) *Stenotrophomonas africana* Drancourt et al. 1997 is a later synonym of *Stenotrophomonas maltophilia* (Hugh 1981) Palleroni and Bradbury 1993. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1235-1237.

Corti M, Palmero D, Eiguchi K (2009) Respiratory infections in immunocompromised patients. *Curr Opin Pulm Med* **15**: 209-217.

Cosson P, Zulianello L, Join-Lambert O, Faurisson F, Gebbie L, Benghezal M, Van Delden C, Curty LK & Köhler T (2002) *Pseudomonas aeruginosa* virulence analyzed in a *Dictyostelium discoideum* host system. *J Bacteriol* **184**: 3027-33.

Cosson P, Soldati T (2008) Eat, kill or die: when amoeba meets bacteria. *Curr Opin Microbiol* **11**: 271-276.

Cotter PA, Yuk MH, Mattoo S, Akerley BJ, Boschwitz J, Relman DA, Miller JF (1998) Filamentous Hemagglutinin of *Bordetella bronchiseptica* Is Required for Efficient Establishment of Tracheal Colonization *Infect. Immun* **66**: 5921-5929.

Crossman LC, Gould VC, Dow JM et al. (2008) The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biol* **9**: R74.

Darling AC, Mau B, Perna NT (2010) progressiveMauve: Multiple Genome Alignment with Gene Gain, Loss and Rearrangement. *PLoS ONE* **5**: e11147

Denton M & Kerr KG (1998) Microbiological and Clinical Aspects of Infection Associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev* **11**: 57–80.

De Oliveira-Garcia D, Dall'Agnol M, Rosales M, Azzuz AC, Martinez MB, Girón JA (2002) Characterization of flagella produced by clinical strains of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Emerg Infect Dis* **8**: 918-923.

De Oliveira-Garcia D, Dall'Agnol M, Rosales M, Azzuz AC, Alcántara N, Martínez MB, Girón JA (2003) Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. *Cell Microbiol* **5**: 625-636.

Di Bonaventura G, Prosseda G, Del Chierico F, Cannavacciuolo S, Cipriani P, Petrucca A, Superti F, Ammendolia MG, Concato C, Fiscarelli E, Casalino M, Piccolomini R, Nicoletti M, Colonna B (2007) Molecular characterization of virulence determinants of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from patients affected by cystic fibrosis. *Int J Immunopathol Pharmacol* **20**: 529-37.

Drancourt M, Bollet C & Raoult D (1997) *Stenotrophomonas africana* sp. nov., an opportunistic human pathogen in Africa. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 160-163.

Edberg SC, Gallo P, Kontnick C (1996) Analysis of the Virulence Characteristics of Bacteria Isolated from Bottled, Water Cooler, and Tap Water. *Microb Ecol Health D* **9**: 67-77.

Enoch DA, Birkett CI, Ludlam HA (2007) Non-fermentative Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents Suppl* **3**: S33-41.

Falagas ME, Kastoris AC, Vouloumanou EK & Dimopoulos G (2009) Community-acquired *Stenotrophomonas maltophilia* infections: a systematic review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **28**: 719–730.

Feldman M, Bryan R, Rajan S, Scheffler L, Brunnert S, Tang H, Prince A (1998) Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect Immun* **66**: 43-51.

Fenner L, Richet H, Raoult D, Papazian L, Martin C & La Scola B (2006) Are clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* more virulent than hospital environmental isolates in amebal co-culture test? *Crit Care Med* **34**: 823-828.

Figueirêdo PM, Furumura MT, Santos AM, Sousa AC, Kota DJ, Levy CE, Yano T (2006) Cytotoxic activity of clinical *Stenotrophomonas maltophilia*. *Lett Appl Microbiol* **43**: 443-449.

Filloux A, Hachani A, Bleves S (2008) The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology* **154**: 1570-1583.

Finkmann W, Altendorf K, Stackebrandt E & Lipski A (2000) Characterization of N₂O-producing *Xanthomonas*-like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitritireducens* sp. nov., *Luteimonas mephitis* gen. nov., sp. nov. and *Pseudoxanthomonas broegbernensis* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**: 273-282.

Flores-Díaz M, Thelestam M, Clark GC, Titball RW, Alape-Girón A (2004) Effects of *Clostridium perfringens* phospholipase C in mammalian cells. *Anaerobe* **10**: 115-123.

Fluman N, Bibi E (2009) Bacterial multidrug transport through the lens of the major facilitator superfamily. *Biochim Biophys Acta* **1794**:738-747.

Forestier C, Welch RA (1991) Identification of RTX toxin target cell specificity domains by use of hybrid genes. *Infect Immun* **59**: 4212-4220.

Fouhy Y, Scanlon K, Schouest K, Spillane C, Crossman L, Avison MB, Ryan RP, Dow JM (2007) Diffusible signal factor-dependent cell-cell signaling and virulence in the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Bacteriol* **189**: 4964-4968.

Fronzes R, Christie PJ, Waksman G (2009) The structural biology of type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* **7**:703-714.

Froquet R, Cherix N, Burr SE, Frey J, Vilches S, Tomas JM & Cosson P (2007) Alternative host model to evaluate *Aeromonas* virulence. *Appl Environ Microbiol* **73**: 5657-5659.

Froquet R, Lelong E, Marchetti A, Cosson P (2009) *Dictyostelium discoideum*: a model host to measure bacterial virulence. *Nat Protoc* **4**: 25-30.

Gattiker A, Michoud K, Rivoire C, Auchincloss AH, Coudert E, Lima T, Kersey P, Pagni M, Sigrist CJ, Lachaize C, Veuthey AL, Gasteiger E, Bairoch A (2003) Automated annotation of microbial proteomes in SWISS-PROT. *Comput Biol Chem* **27**: 49-58.

George AM, Jones PM, Middleton PG (2009) Cystic fibrosis infections: treatment strategies and prospects. *FEMS Microbiol Lett* **300**:153-64.

Gordon NC, Wareham DW (2010) Novel variants of the *Smqnr* family of quinolone resistance genes in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother* **65**: 483-489.

Goy G, Thomas V, Rimann K, Jatton K, Prod'hom G & Greub G (2007) The Neff strain of *Acanthamoeba castellanii*, a tool for testing the virulence of *Mycobacterium kansasii*. *Res Microbiol* **158**: 393-397.

Graff GR, Burns JL (2002) Factors affecting the incidence of *Stenotrophomonas maltophilia* isolation in cystic fibrosis. *Chest* **121**: 1754-1760.

Greub G, Raoult D (2004) Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* **17**: 413-433.

Guzmán-Verri C, García F, Arvidson S (1997) Incomplete activation of *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) due to mutations in the 3' region of hlyC. *J Bacteriol* **179**: 5959.

Hagemann M, Hasse D, Berg G (2006) Detection of a phage genome carrying a zonula occludens like toxin gene (zot) in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* *Arch Microbiol* **185**:449-458.

Hagström Å, Pinhassi J & Li Zweifel U (2000) Biogeographical diversity among marine bacterioplankton. *Aquat Microb Ecol* **21**: 231-244.

Hanberger H, Nilsson LE, Claesson B, Kärnelid A, Larssone P, Rylanderf M, Svensson E, Sörbergf M, Söréng L (1999) New species-related MIC breakpoints for early

detection of development of resistance among Gram-negative bacteria in Swedish intensive care units. *Jour Antimicrob Chemother* **44**: 611-619.

Hauben L, Vauterin L, Moore ERB, Hostel B & Swings J (1999) Genomic diversity of the genus *Stenotrophomonas*. *Int J Syst Bacteriol* **49**: 1749-1760.

Hayes CS, Aoki SK, Low DA (2010) Bacterial contact-dependent delivery systems. *Annu Rev Genet* **44**: 71-90.

Henderson IR, Navarro-Garcia F, Nataro JP (1998) The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends in Microbiology* **6**: 370-378.

Heylen K, Vanparys B, Peirsegaale F, Lebbe L & De Vos P (2007) *Stenotrophomonas terrae* sp. nov. and *Stenotrophomonas humi* sp. nov., two nitrate-reducing bacteria isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 2056-2061.

Highlander SK, Engler MJ, Weinstock GM (1990) Secretion and expression of the *Pasteurella haemolytica* Leukotoxin. *J Bacteriol* **172**: 2343-2350.

Hilbi H, Weber SS, Ragaz C, Nyfeler Y, Urwyler S (2007) Environmental predators as models for bacterial pathogenesis. *Environ Microbiol* **9**: 563-575.

Hoge R, Pelzer A, Rosenau F, Wilhelm S (2010) Weapons of a pathogen: Proteases and their role in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. A. Méndez-Vilas (Ed.): *Current Research, Technology and Education Topics in Applied and Microbial Biotechnology* 383-395.

Hu LF, Chang X, Ye Y, Wang ZX, Shao YB, Shi W, Li X, Li JB (2011) *Stenotrophomonas maltophilia* resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole mediated by acquisition of *sul* and *dfrA* genes in a plasmid-mediated class I integron. *Int J Antimicrob Agents* **37**: 230-234.

Huang YW, Lin CW, Hu RM, Lin YT, Chung TC, Yang TC (2010) AmpN-AmpG operon is essential for expression of L1 and L2 beta-lactamases in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 2583-2589.

Hugh R & Ryschenkow E (1961) *Pseudomonas maltophilia*, an alcaligenes-like species. *J Gen Microbiol* **26**: 123-132.

Jacquier H, Carbonnelle E, Corvec S, Illiaquer M, Le Monnier A, Bill E, Zahar JR, Beretti JL, Jauréguy F, Fihman V, Tankovic J, Cattoir V (2011) Revisited distribution of nonfermenting Gram-negative bacilli clinical isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **30**: 1579-1586.

Jaspers E, Overmann J (2004) Ecological significance of microdiversity: identical 16S rRNA gene sequences can be found in bacteria with highly divergent genomes and ecophysologies. *Appl Environ Microbiol* **70**: 4831-4839.

Jones RN, Sader HS, Beach ML (2003) Contemporary in vitro spectrum of activity summary for antimicrobial agents tested against 18569 strains non-fermentative Gram-negative bacilli isolated in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Int J Antimicrob Agents* **22**: 551-556.

Jonson AB, Normark S, Rhen M (2005) Fimbriae, Pili, Flagella and Bacterial Virulence. In: Russel W, Herwald H (Hrsg.): Concepts in Bacterial Virulence. Basel, Karger Vol.12: 67-89.

Jucker BA, Harms H, Zehnder AJ (1996) Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* 70401 to glass and Teflon. *J Bacteriol* **178**: 5472-5479.

Juhas M, van der Meer JR, Gaillard M, Harding RM, Hood DW, Crook DW (2008) Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 376-393.

Juhnke ME & des Jardin E (1989) Selective medium for isolation of *Xanthomonas maltophilia* from soil and rhizosphere environments. *Appl Environ Microbiol* **55**: 747-750.

Kaiser S, Biehler K & Jonas D (2009) A *Stenotrophomonas maltophilia* multilocus sequence typing scheme for inferring population structure. *J Bacteriol* **191**: 2934-2943.

Kaparullina E, Doronina N, Chistyakova T & Trotsenko Y (2009) *Stenotrophomonas chelatiphaga* sp. nov., a new aerobic EDTA degrading bacterium. *Syst Appl Microbiol* **32**: 157-162.

Kassen R, Rainey PB (2004) The ecology and genetics of microbial diversity. *Annu Rev Microbiol* **58**: 207-231.

Kim HB, Srinivasan S, Sathiyaraj G, Quan LH, Kim SH, Bui TP, Liang ZQ, Kim YJ & Yang DC (2010) *Stenotrophomonas ginsengisoli* sp. nov., a bacterium isolated from a ginseng field. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**: 1522-1526.

Khan, Ahmad M, Hamid R, Ahmad M, Abdin MZ, Javed S (2010) Optimization of Culture Media for Enhanced Chitinase Production from a Novel Strain of *Stenotrophomonas maltophilia* Using Response Surface Methodology. *J Microbiol Biotechnol* **20**: 1597-1602.

Kobayashi DY, Reedy RM, Bick JA, Oudemans PV (2002) Characterization of a Chitinase Gene from *Stenotrophomonas maltophilia* Strain 34S1 and Its Involvement in Biological Control. *Appl Env Microbiol* **68**: 1047-1054.

Kobayashi N, Nishino K, Yamaguchi A (2001) Novel Macrolide-Specific ABC-Type Efflux Transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**: 5639-5644.

Krsek M & Wellington EMH (2001) Assessment of chitin decomposer diversity within an upland grassland. *Antonie van Leeuwenhoek* **79**: 261-267.

Kumar A, Schweizer HP (2005) Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev* **57**:1486-1513.

- Kung VL, Ozer EA, Hauser AR** (2010) The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**: 621-641.
- Kuroda T, Tsuchiya T** (2009) Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochem Biophys Acta*. **1794**: 763-768.
- Kurtz S, Phillippy A, Delcher AL, Smoot M, Shumway M, Antonescu C, Salzberg SL** (2004) Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol* **5**:R12.
- Kurz LC & Ewbank JJ** (2007) Infection in a dish: high-throughput analyses of bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **10**: 10-16.
- Lai CH, Wong WW, Chin C, Huang CK, Lin HH, Chen WF, Yu KW & Liu CY** (2006) Central venous catheter-related *Stenotrophomonas maltophilia* bacteraemia and associated relapsing bacteraemia in haematology and oncology patients. *Clin Microbiol Infect* **12**: 986–991.
- Lambert T, Ploy MC, Denis F, Courvalin P** (1999) Characterization of the Chromosomal *aac(6′)-Iz* Gene of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Ch* **43**: 2366–2371.
- Lamont IL, Beare PA, Ochsner U, Vasil AI, Vasil ML** (2002) Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:7072-7077.
- Lee DS, Ryu SH, Hwang HW, Kim YJ, Park M, Lee JR, Lee SS & Jeon CO** (2008) *Pseudoxanthomonas sacheonensis* sp. nov., isolated from BTEX-contaminated soil in Korea, transfer of *Stenotrophomonas dokdonensis* Yoon et al. 2006 to the genus *Pseudoxanthomonas* as *Pseudoxanthomonas dokdonensis* comb. nov. and amended description of the genus *Pseudoxanthomonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 2235-2240.
- Lee M, Woo SG, Chae M, Shin MC, Jung HM & Ten LN** (2010) *Stenotrophomonas daejeonensis* sp. nov., isolated from sewage. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**: 598-604.
- Li X, Zhang L, Poole K** (2002). SmeC, an outer membrane multidrug efflux protein of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 333–343.
- Linhartová I, Bumba L, Mašín J, Basler M, Osička R, Kamanová J, Procházková K, Adkins I, Hejenová-Holubová J, Sadílková L, Morová J, Šebo P** (2010) RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiology Reviews* **34**: 1076-1112.
- Looney JW, Narita M & Mühlemann K** (2009) *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. *Lancet Infect Dis* **9**: 312–323.
- Loutet SA, Valvano MA** (2010) A Decade of *Burkholderia cenocepacia* Virulence Determinant Research. *Infect Immun* **78**: 4088-4100.

- Maltsev N, Glass E, Sulakhe D, Rodriguez A, Syed MH, Bompada T, Zhang Y, D'Souza M** (2006) PUMA2–grid-based high-throughput analysis of genomes and metabolic pathways. *Nucleic Acids Res* **34**: 369-372.
- Marciano-Cabral F, Cabral G** (2003) *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. *Clin Microbiol Rev* **16**: 273–307.
- Masgala A, Galani I, Souli M, Giamarellou H** (2010) Discrepancies between various methods in susceptibility testing and epidemiological analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *Cent Eur J Public Health* **18**:119-23.
- Matz C, Kjelleberg S** (2005) Off the hook-how bacteria survive protozoan grazing. *Trends Microbiol* **13**: 302-307.
- Mazar J, Cotter PA** (2007) New insight into the molecular mechanisms of two-partner secretion. *Trends Microbiol* **15**: 508-515.
- McKay GA, Woods DE, MacDonald KL, Poole K** (2003) Role of Phosphoglucomutase of *Stenotrophomonas maltophilia* in Lipopolysaccharide Biosynthesis, Virulence, and Antibiotic Resistance. *Infect Immun* **71**: 3068–3075.
- Meyer F, Goesmann A, McHardy AC, Bartels D, Bekel T, Clausen J, Kalinowski J, Linke B, Rupp O, Giegerich R, Pühler A** (2003) GenDB-an open source genome annotation system for prokaryote genomes. *Nucleic Acids Res* **31**: 2187-2195.
- Meyer E, Schwab F, Gastmeier P, Rueden H, Daschner FD, Jonas D** (2006) *Stenotrophomonas maltophilia* and antibiotic use in German intensive care units: data from Project SARI (Surveillance of Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance in German Intensive Care Units). *J Hosp Infect*, **64**: 238-43.
- Michel A, Agerer F, Hauck CR, Herrmann M, Ullrich J, Hacker J, Ohlsen K** (2006) Global regulatory impact of ClpP protease of *Staphylococcus aureus* on regulons involved in virulence, oxidative stress response, autolysis, and DNA repair. *J Bacteriol* **188**: 5783-5796.
- Minkwitz A & Berg G** (2001) Comparison of antifungal activities and 16S ribosomal DNA sequences of clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Clin Microbiol* **39**: 139-145.
- Mougous JD, Cuff ME, Raunser S, Shen A, Zhou M, Gifford CA, Goodman AL, Joachimiak G, Ordoñez CL, Lory S, Walz T, Joachimiak A, Mekalanos JJ** (2006) A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science* **312**: 1526-1530.
- Nicodemo AC, Garcia Paez JI** (2007) Antimicrobial therapy for *Stenotrophomonas maltophilia* infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **26**:229–237.
- Nicoletti M, Iacobino A, Prosseda G, Fiscarelli E, Zarrilli R, De Carolis E, Petrucca A, Nencioni L, Colonna B, Casalino M** (2011) *Stenotrophomonas maltophilia* strains from

cystic fibrosis patients: genomic variability and molecular characterization of some virulence determinants. *Int J Med Microbiol* **301**: 34-43.

Nseir S, Di Pompeo C, Brisson H, Dewavrin F, Tissier S, Diarra M, Boulo M, Durocher A (2006) Intensive care unit-acquired *Stenotrophomonas maltophilia*: incidence, risk factors, and outcome. *Crit Care* **10** R143.

Nyč O, Matějková J (2010) *Stenotrophomonas maltophilia*: Significant Contemporary Hospital Pathogen – review. *Folia Microbiol* **55**: 286-294.

Okazaki A, Avison MB (2007) Aph(3')-IIc, an Aminoglycoside Resistance Determinant from *Stenotrophomonas maltophilia* Antimicrob Agents Ch **51**: 359–360.

Osička R, Kalmusová J, Křížová P, Šebo P (2001) Neisseria meningitidis RTX protein FrpC induces high levels of serum antibodies during invasive disease: polymorphism of *frpC* alleles and purification of recombinant FrpC. *Infect Immun* **69**: 5509-5519.

Paez JI, Costa SF (2008) Risk factors associated with mortality of infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: a systematic review. *J Hosp Infect* **70**:101-108.

Palleroni NJ & Bradbury JF (1993) *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *Int J Syst Bacteriol* **43**: 606-609.

Passerini De Rossi B, Calenda M, Vay C, Franco M (2007) Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from device-associated nosocomial infections. *Revista Argentina de Microbiología* **39**: 204-212.

Pei J, Lupardus PJ, Garcia KC, Grishin NV (2009) CPDadh: a new peptidase family homologous to the cysteine protease domain in bacterial MARTX toxins. *Protein Sci* **18**: 856-62.

Persson OP, Pinhassi J, Riemann L, Marklund BI, Rhen M, Normark S, González JM, Hagström Å (2009) High abundance of virulence gene homologues in marine bacteria. *Environmental Microbiology* **11**: 1348–1357.

Pompilio A, Piccolomini R, Picciani C, D'Antonio D, Savini V, Di Bonaventura G (2008) Factors associated with adherence to and biofilm formation on polystyrene by *Stenotrophomonas maltophilia*: the role of cell surface hydrophobicity and motility. *FEMS Microbiol Lett* **287**: 41-47.

Pompilio A, Crocetta V, Confalone P, Nicoletti M, Petrucca A, Guarnieri S, Fiscarelli E, Savini V, Piccolomini R, Di Bonaventura G (2010) Adhesion to and biofilm formation on IB3-1 bronchial cells by *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from cystic fibrosis patients. *BMC Microbiol* **10**:102.

Pompilio A, Pomponio S, Crocetta V, Gherardi G, Verginelli F, Fiscarelli E, Dicuonzo G, Savini V, D'Antonio D, Di Bonaventura G (2011) Phenotypic and genotypic characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from patients with cystic fibrosis: genome diversity, biofilm formation, and virulence. *BMC Microbiol* **11**: 159.

- Pukatzki S, Kessin RH & Mekalanos JJ** (2002) The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 3159-3164.
- Pukatzki S, Ma AT, Sturtevant D, Krastins B, Sarracino D, Nelson WC, Heidelberg JF & Mekalanos JJ** (2006) Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 1528-1533.
- Pukatzki S, McAuley SB, Miyata ST** (2009) The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Curr Opin Microbiol* **12**:11-17.
- Poole K** (2004) Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* **10**: 12–26.
- Ramos PL, Van Trappen S, Thompson FL, Rocha RCS, Barbosa HR, De Vos P & Moreira-Filho CA** (2011) Screening for endophytic nitrogen-fixing bacteria in Brazilian sugarcane varieties used in organic farming and description of *Stenotrophomonas pavanii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**: 926-931.
- Ramrakhiani L, Chand S** (2011) Recent progress on phospholipases: different sources, assay methods, industrial potential and pathogenicity. *Appl Biochem Biotechnol* **164**:991-1022.
- Ribitsch D, Karl W, Birner-Gruenberger R, Gruber K, Eiteljoerg I, Remler P, Wieland S, Siegert P, Maurer KH, Schwab H** (2010) C-terminal truncation of a metagenome-derived detergent protease for effective expression in *E. coli*. *J Biotechnol* **150**: 408-416.
- Ribitsch D, Heumann S, Karl W, Gerlach J, Leber R, Birner-Gruenberger R, Gruber K, Eiteljoerg I, Remler P, Siegert P, Lange J, Maurer KH, Berg G, Guebitz GM, Schwab H** (2011) Extracellular serine proteases from *Stenotrophomonas maltophilia*: Screening, isolation and heterologous expression in *E. coli*. *J Biotechnol* Oct 1. [Epub ahead of print]
- Rissman AI, Mau B, Biehl BS, Darling AE, Glasner JD, Perna NT** (2009) Reordering contigs of draft genomes using the Mauve aligner. *Bioinformatics* **25**: 2071-2073.
- Rocco F, De Gregorio E, Colonna B, Di Nocera PP** (2009) *Stenotrophomonas maltophilia* genomes: a start-up comparison. *Int J Med Microbiol* **299**: 535-46.
- Rouf R, Karaba SM, Dao J, Cianciotto NP** (2011) *Stenotrophomonas maltophilia* strains replicate and persist in the murine lung, but to significantly different degrees. *Microbiology* **157**: 2133-2142.
- Ryan RP, Monchy S, Cardinale M, Taghavi S, Crossman L, Avison MB, Berg G, van der Lelie D & Dow JM** (2009) The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nat Rev* **7**: 514-525.

Sajjan SU, Carmody LA, Gonzalez CF, LiPuma JJ (2008) A type IV secretion system contributes to intracellular survival and replication of *Burkholderia cenocepacia*. *Infect Immun* **76**: 5447-5455.

Sandkvist M (2001) Type II secretion and pathogenesis. *Infect Immun* **69**: 3523-3535.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *P Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.

Schlegel H (2007) Allgemeine Mikrobiologie. *Thieme Verlag* **8. Auflage**: 276-279.

Schwyn B & Neilands JB (1987) Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores. *Anal Biochem* **160**: 47-56.

Shendure J, Ji H (2008) Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* **26**:1135-45.

Shimizu K, Kikuchi K, Sasaki T, Takahashi T, Ohtsuka T, Ono Y, Hiramatsu K (2008) Smqnr, a New Chromosome-Carried Quinolone Resistance Gene in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Ch* **52**: 3823–3825.

Simpson JT, Wong K, Jackman SD, Schein JE, Jones SJ, Birol I (2009) ABySS: a parallel assembler for short read sequence data. *Genome Res* **19**: 1117-1123.

Smith AM, Guzmán CA, Walker MJ (2001) The virulence factors of *Bordetella pertussis*: a matter of control. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 309-333

Spencer RC (1995) The emergence of epidemic, multiple-antibiotic-resistant *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* and *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. *J Hosp Infect* **30** Suppl: 453-464.

Squier C, Yu VL, Stout JE (2000) Waterborne Nosocomial Infections. *Current Infectious Disease Reports* **2**: 490–496.

Stathopoulos C, Hendrixson DR, Thanassi DG, Hultgren SJ, St Geme JW 3rd, Curtiss R 3rd (2000) Secretion of virulence determinants by the general secretory pathway in gram-negative pathogens: an evolving story. *Microbes Infect* **2**: 1061-1072.

Steinert M (2011) Pathogen-host interactions in *Dictyostelium*, *Legionella*, *Mycobacterium* and other pathogens. *Semin Cell Dev Biol* **22**: 70-76.

Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Čirković I, Ruzicka F (2007) Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* **115**: 891–899.

Stothard P, Wishart DS (2006) Automated bacterial genome analysis and annotation. *Curr Opin Microbiol* **9**: 505-510.

- Strathdee CA, Lo RY** (1987) Extensive homology between the leukotoxin of *Pasteurella haemolytica* A1 and the alpha-hemolysin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **55**: 3233-3236.
- Swings J, de Vos P, van den Mooter M & de Ley J** (1983) Transfer of *Pseudomonas maltophilia* Hugh 1981 to the genus *Xanthomonas* as *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1981) comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **33**: 409-413.
- Taghavi S, Garafola C, Monchy S, Newman L, Hoffman A, Weyens N, Barac T, Vangronsveld J & van der Lelie D** (2009) Genome Survey and Characterization of Endophytic Bacteria Exhibiting a Beneficial Effect on Growth and Development of Poplar Trees. *Appl Env Microbiol* **75**: 748-757.
- Talmaciu I, Varlotta L, Mortensen J, Schidlow DV** (2000) Risk factors for emergence of *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*, **30**: 10-15.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S** (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1596-1599.
- Tatman-Otkun M, Gürcan S, Ozer B, Aydoslu B, Bukavaz S** (2005) The antimicrobial susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates using three different methods and their genetic relatedness. *BMC Microbiol* **5**:24.
- Toleman MA, Bennett PM, Bennett DMC, Jones RN, Walsh TR** (2007) Global Emergence of Trimethoprim/Sulfamethoxazole Resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* Mediated by Acquisition of *sul* Genes. *Emerging Infectious Diseases* **13**: 559-565.
- Traub WH, Leonhard B, Bauer D** (1998) *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*: in vitro susceptibility to selected antimicrobial drugs, single and combined, with and without defibrinated human blood. *Chemotherapy* **44**:293-304.
- Van Domselaar GH, Stothard P, Shrivastava S, Cruz JA, Guo A, Dong X, Lu P, Szafron D, Greiner R, Wishart DS** (2005) BASys: a web server for automated bacterial genome annotation. *Nucleic Acids Res* **33** (Web Server issue):W455-459.
- Vasileuskaya-Schulz , Kaiser S, Maier T, Kostrzewa M & Jonas D** (2011) Delineation of *Stenotrophomonas* spp. by multi-locus sequence analysis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Syst Appl Microbiol* **34**: 35-39.
- Versalovic J, Schneider M, deBruijn FJ & Lupski JR** (1994) Genomic Fingerprinting of Bacteria using Repetitive Sequence- Based Polymerase Chain Reaction. *Meth Mol Cell Biol* **5**: 25-40.
- Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD** (2009) Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem* **55**: 641-658.
- Wallden K, Rivera-Calzada A, Waksman G** (2010) Type IV secretion systems: versatility and diversity in function. *Cell Microbiol* **12**:1203-1212.

- Wang X & Ahearn DG** (1997) Effect of Bacteria on Survival and Growth of *Acanthamoeba castellanii*. *Current Microbiol* **34**: 212-215.
- Warren RL, Sutton GG, Jones SJ, Holt RA** (2007) Assembling millions of short DNA sequences using SSAKE. *Bioinformatics* **23**: 500-501.
- Wassenaar TM, Gastra W** (2001) Bacterial virulence: can we draw the line? *FEMS Microbiol Lett* **201**: 1-7.
- Watts DJ, Ashworth JM** (1970) Growth of myxameobae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem J* **119**: 171-174.
- Weber DJ, Rutala WA, Sickbert-Bennett EE, Samsa GP, Brown V, Niederman MS** (2007) Microbiology of ventilator-associated pneumonia compared with that of hospital-acquired pneumonia. *Infect Control Hosp Epidemiol* **28**: 825–31.
- Weisman RA** (1976) Differentiation in *Acanthamoeba castellanii*. *Annu Rev Microbiol* **30**: 189-219.
- Whitby P, Carter CB, Burns JL, Royall JA, LiPuma J, Stull TL** (2000) Identification and Detection of *Stenotrophomonas maltophilia* by rRNA-Directed PCR. *J Clin Microbiol* **38**: 4305-4309.
- Wilkinson FH, Kerr KG** (1998) Bottled water as a source of multi-resistant *Stenotrophomonas* and *Pseudomonas* species for neutropenic patients. *European Journal of Cancer Care* **7**: 12-14.
- Windhorst S, Frank E, Georgieva DN, Genov N, Buck F, Borowski P, Weber W** (2002) The major extracellular protease of the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*: characterization of the protein and molecular cloning of the gene. *J Biol Chem* **277**: 11042-11049.
- Wolf A, Fritze A, Hagemann M & Berg G** (2002) *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 1937-1944.
- Xu Q, Dziejman M, Mekalanos JJ** (2003) Determination of the transcriptome of *Vibrio cholerae* during intrainestinal growth and midexponential phase in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:1286-1291.
- Yamamoto S, Harayama S** (1995) PCR Amplification and Direct Sequencing of *gyrB* Genes with Universal Primers and Their Application to the Detection and Taxonomic Analysis of *Pseudomonas putida* Strains. *Appl Environ Microbiol* **61**: 1104-1109.
- Yang HC, Im WT, Kang MS, Shin DY, Lee ST** (2006) *Stenotrophomonas koreensis* sp. nov., isolated from compost in South Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 81-84.

Yang TC, Huang YW, Hu RM, Huang SC, Lin YT (2009) AmpDI is involved in expression of the chromosomal L1 and L2 beta-lactamases of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 2902-2907.

Yi H, Srinivasan S & Kim SK (2010) *Stenotrophomonas panacihumi* sp. nov., Isolated from Soil of a Ginseng Field. *J Microbiol* **48**: 30-35.

Yoon JH, Kang SJ, Oh HW & Oh TK (2006) *Stenotrophomonas dokdonensis* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 1363-1367.

Zerbino DR, Birney E (2008) Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res* **18**: 821-829.

Zhang XH, Austin B (2005) Haemolysins in *Vibrio* species. *J Appl Microbiol* **98**: 1011-1009.

Martina Adamek

Werderstraße 55
76137 Karlsruhe

☎ 0721 3354128
📞 0170 1994968

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

geboren 09. März 1983 in Oppeln (Polen)
Staatsangehörigkeit deutsch

Promotion

Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

07/2008 – 06/2009

Institut für Ingenieurbiologie und Biotechnologie des Abwassers (IBA)

07/2009 - heute

Institut für Angewandte Biowissenschaften (IAB) –
Abteilung Mikrobiologie

Thema der Dissertation:
Mikrodiversität von *Stenotrophomonas maltophilia* –
Untersuchungen der Phylogenie und Virulenz

Diplomarbeit

07/2007 – 02/2008

Abteilung für Proteom- und Metabolomforschung
Fakultät für Biologie, Universität Bielefeld

Thema der Diplomarbeit:
Etablierung eines Trennverfahrens für Nukleotidzucker mittels
CE und HPLC zur Analyse komplexer Metabolitgemische aus
Xanthomonas campestris pv. campestris

Studium

10/2002 – 02/2008

Studium der Umweltwissenschaften an der Universität
Bielefeld
Hauptfächer: Ökologie und Rechtswissenschaften,
Wahl-Nebenfächer: Mikrobiologie/Biotechnologie und Chemie

Schulbildung

08/1993 – 06/2002

Christian-Rauch-Schule, Bad Arolsen

Abschluss: Abitur

Karlsruhe, 03/01/2012

Danksagung

Prof. Dr. Reinhard Fischer möchte ich für die Übernahme des Projekts und für die damit verbundene Möglichkeit meine Arbeit fortzusetzen, sowie für die Bereitschaft zur Übernahme des Gutachtens und sein Interesse an meinem Projekt, danken.

PD Dr. Charles Franz danke ich ebenfalls für die Bereitschaft zur Übernahme des Gutachtens, die hilfreichen Anregungen und das Interesse an diesem Projekt.

Dr. Thomas Schwartz danke ich für die Betreuung der Arbeit. Herzlich möchte ich mich außerdem für die vielen fachlichen Diskussionen und die Unterstützung in allen Phasen dieser Doktorarbeit bedanken. Außerdem danke ich ihm für die Anregungen und Hinweise während aller schriftlichen Ausarbeitungen.

Dr. Stephan Bathe danke ich für die Möglichkeit das Thema zu bearbeiten, die Unterstützung meiner Arbeit im ersten Jahr sowie die fachliche Unterstützung und Diskussion auch in der darauf folgenden Zeit.

Prof. Dr. Josef Winter danke ich für die Möglichkeit meine Arbeit im ersten Jahr am Institut für Ingenieurbiologie und Biotechnologie des Abwassers durchzuführen.

Prof. Dr. Ursula Obst danke ich für die Möglichkeit meine Arbeit am Institut für Funktionelle Grenzflächen fortzusetzen.

Dr. Julio Rodriguez und **Dr. Ivan Kondov** danke ich für die große Hilfe bei meiner Auseinandersetzung mit der Bioinformatik.

Burkhard Linke danke ich für die Annotation der Genomsequenzen mit GenDB und die Hilfe bei allen diesbezüglichen Fragen.

Thomas Untucht danke ich für den Beitrag zu dieser Arbeit im Rahmen seiner Tätigkeit als studentische Hilfskraft.

Silke Kirchen, Mareike Marten und **Kerstin Matthies** danke ich für die fachlichen Diskussionen und die Hilfe bei der Korrektur der Arbeit.

Harald Neidhardt, Jennifer Knieper, Eva Jäger, Jens Meißner und **Catrine Bauer** danke ich für die Hilfe bei der Korrektur der Arbeit.

Den Mitarbeitern am Institut für Ingenieurbiologie und Biotechnologie des Abwassers danke ich für die Hilfe und die Unterstützung bei allen Fragen und Problemen.

Der gesamten Abteilung Mikrobiologie an natürlichen und technischen Grenzflächen danke ich für die tolle Atmosphäre bei der Arbeit und die ständige Hilfsbereitschaft bei allen Fragen und Problemen.

Harald Neidhardt danke ich für die Motivation, die Ratschläge und für die Ablenkung von meiner Arbeit.

Meinen Eltern danke ich für die fortwährende Unterstützung.