

DISSERTATION

Bakteriophagen-Therapie gegen *Acinetobacter baumannii*:  
Experimentelle Evaluation in zwei präklinischen Modellen

Bacteriophage therapy against *Acinetobacter baumannii*:  
Experimental evaluation in two preclinical models

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Markus Christian Brack

Erstbetreuung: Prof. Dr. med. Martin Witzenrath

Datum der Promotion: 30. Juni 2024

## Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden vorab veröffentlicht in:

- 1) Publikation:** Sandra-Maria Wienhold\*, Markus C. Brack\*, Geraldine Nouailles, Gopinath Krishnamoorthy, Imke H. E. Korf, Claudius Seitz, Sarah Wienecke, Kristina Dietert, Corinne Gurtner, Olivia Kershaw, Achim D. Gruber, Anton Ross, Holger Ziehr, Manfred Rohde, Jens Neudecker, Jasmin Lienau, Norbert Suttorp, Stefan Hippenstiel, Andreas C. Hocke, Christine Rohde, Martin Witzentrath. Preclinical Assessment of Bacteriophage Therapy against Experimental *Acinetobacter baumannii* Lung Infection. *Viruses* 2022, 14(1):33; <https://doi.org/10.3390/v14010033> **(1)** \*gleicher Anteil
  
- 2) Publikation:** Kristina Dietert, Birgitt Gutbier, Sandra M. Wienhold, Katrin Reppe, Xiaohui Jiang, Ling Yao, Catherine Chaput, Jan Naujoks, Markus Brack, Alexandra Kupke, Christin Peteranderl, Stephan Becker, Carolin von Lachner, Nelli Baal, Hortense Slevogt, Andreas C. Hocke, Martin Witzentrath, Bastian Opitz, Susanne Herold, Holger Hackstein, Leif E. Sander, Norbert Suttorp, Achim D. Gruber. Spectrum of pathogen- and model-specific histopathologies in mouse models of acute pneumonia. 2017; 12(11):e0188251. doi: 10.1371/journal.pone.0188251 **(2)**



# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	4
Abbildungsverzeichnis.....	8
Tabellenverzeichnis.....	9
Abkürzungsverzeichnis.....	10
1 ZUSAMMENFASSUNG.....	13
2 SUMMARY.....	14
3 EINLEITUNG.....	15
3.1 Die Antibiotikaresistenz-Krise.....	15
3.1.1 Ausgangslage.....	15
3.1.2 Ausmaß des Problems und Ursachen.....	15
3.2 <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	17
3.2.1 Vorkommen.....	17
3.2.2 Eigenschaften.....	18
3.2.3 Pathogenese der <i>A. baumannii</i> -Pneumonie.....	19
3.3 Bakteriophagen.....	23
3.3.1 Allgemeines.....	23
3.3.2 Replikationszyklus.....	24
3.3.3 Phagentherapie.....	26
3.3.3.1 Historisches.....	26
3.3.3.2 Offene Fragen.....	27
4 FRAGESTELLUNG.....	28
5 MATERIAL UND METHODEN.....	29
5.1 Material.....	29
5.1.1 Allgemeine Laborgeräte.....	29
5.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	31
5.1.3 Kommerziell erhältliche Testkits.....	32
5.1.4 Reagenzien.....	32
5.1.5 Tierarzneimittel.....	32

## Inhaltsverzeichnis

5.1.6 Medien, Puffer und Zusätze .....	32
5.1.7 Monoklonale Antikörper für Durchflusszytometrie .....	34
5.1.8 Tiere .....	34
5.1.9 Humanes Lungengewebe .....	34
5.2 Relevante Studienvorarbeiten externer PartnerInnen .....	35
5.2.1 Verwendeter <i>Acinetobacter baumannii</i> -Stamm .....	35
5.2.2 Bakteriophage und Zusammensetzung der Phagen-Pufferlösung .....	36
5.2.3 Elektronenmikroskopie-Aufnahmen von <i>A. baumannii</i> und vB_Acibel004.....	37
5.3 Methoden .....	38
5.3.1 Herstellung des Nährmediums für die Bakterienzucht.....	38
5.3.2 Herstellung der Kryostocks .....	38
5.3.3 Anzucht von <i>A. baumannii</i> .....	38
5.3.4 Tierexperimentelle Untersuchungen .....	39
5.3.4.1 Tierhaltung.....	39
5.3.4.2 Modell der <i>A. baumannii</i> -Pneumonie .....	39
5.3.4.3 Design der Experimente.....	39
5.3.4.4 Endpunkte der Studie und Versuchsgruppen .....	40
5.3.4.5 Infektion der Tiere mit <i>A. baumannii</i> .....	41
5.3.4.6 Applikation der Bakteriophagen-Lösung und des Lösungsmittels.....	41
5.3.4.7 Klinische Beurteilung.....	42
5.3.4.8 Endpräparation der Mäuse und Probenentnahme.....	43
5.3.4.9 Quantifizierung der Bakterienlast .....	45
5.3.4.10 Herstellung von Zellkulturmedium für den Lungenverdau.....	45
5.3.4.11 Quantifizierung der Gesamtleukozytenzahl und Differenzierung der Leukozyten-Populationen in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit, Lungenhomogenat und Blut .....	46
5.3.4.12 Untersuchung der Permeabilität im pulmonalen Gefäßsystem .....	50
5.3.4.13 Bestimmung der Konzentrationen verschiedener Zytokine und Chemokine in BAL und Plasma .....	50
5.3.4.14 Histologische und immunhistochemische Untersuchungen.....	51

## Inhaltsverzeichnis

5.3.5 Experimente mit humanem Lungengewebe <i>ex vivo</i> .....	52
5.3.5.1 Aufbereitung des humanen Lungengewebes .....	52
5.3.5.2 Infektion des humanen Lungengewebes mit <i>A. baumannii</i> .....	52
5.3.5.3 Applikation der Phagen-Lösung, Endpunkte und Probenverarbeitung.....	52
5.3.5.4 Zytokinmessungen von IL1 $\beta$ und IL-8 im humanen Lungengewebe .....	53
5.3.6 Statistische Datenanalyse.....	53
6 ERGEBNISSE .....	55
6.1 Die Infektion mit $5 \times 10^8$ KfE <i>A. baumannii</i> RUH 2037 resultierte in einer klinisch apparenten Infektion der Lunge im Mausmodell .....	55
6.2 Die Applikation des Phagen <i>vB_AbaM_Acibel004</i> führte zu einer Besserung des klinischen Verlaufes der <i>A. baumannii</i> Infektion.....	57
6.3 Die einmalige intratracheale Applikation von <i>vB_AbaM_Acibel004</i> bewirkte eine Reduktion der pulmonalen bakteriellen Last von <i>A. baumannii</i> .....	59
6.4 Die einmalige intratracheale Applikation von <i>vB_AbaM_Acibel004</i> führte zu einer geringeren Ausbreitung der Entzündung in die Lungenperipherie und einer reduzierten immunhistochemischen Detektion von <i>A. baumannii</i> mittels Histopathologie.....	61
6.5 Die einmalige intratracheale Applikation von <i>vB_AbaM_Acibel004</i> war mit einer geringeren alveolokapillären Permeabilität im Rahmen der Infektion mit <i>A. baumannii</i> assoziiert .....	65
6.6 Die einmalige intratracheale Applikation von <i>vB_AbaM_Acibel004</i> führte zu einer verringerten Sekretion von CCL2 in BAL und G-CSF BAL und Plasma .....	67
6.7 Die quantitative und qualitative Charakterisierung der Leukozytenpopulationen in BAL, Lunge und Blut zeigte nach Phagenapplikation keine Unterschiede .....	75
6.7.1 Leukozytenpopulation in BAL und Lungengewebe.....	75
6.7.2 Leukozytenpopulationen im Blut .....	79
6.8 Die einmalige Applikation von <i>vB_Aba_Acibel004</i> führte zu einer vorübergehenden Reduktion der bakteriellen Last nach Infektion im <i>ex vivo</i> Modell humanen Lungengewebes ohne gesteigerte Freisetzung von IL-1 $\beta$ und IL-8.....	81
7 DISKUSSION .....	83
7.1 Vergleich mit anderen präklinischen Modellen.....	83
7.2 Reduktion der bakteriellen Last durch die Phagenapplikation .....	86

## Inhaltsverzeichnis

7.2.1 Reduktion im <i>in vivo</i> Modell .....	86
7.2.2 Reduktion im humanen <i>ex vivo</i> Modell.....	87
7.3 Keine Anzeichen proinflammatorischer Reaktionen nach Phagentherapie .....	88
7.4 Künftige Ansätze und Ausblick .....	91
7.5 Künftige Rolle der Phagentherapie .....	92
8 LITERATURVERZEICHNIS.....	93
9 ANHANG.....	107
9.1 Eidstattliche Versicherung und Anteilserklärung .....	107
9.2 Lebenslauf.....	109
9.3 Publikationsliste.....	110
9.4 Danksagung .....	113
9.5 Bescheinigung des akkreditierten Statistikers .....	114

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.</b> <i>Acinetobacter baumannii</i> RUH-2037 .....	18
<b>Abbildung 2.</b> Aufbau eines Bakteriophagen .....	23
<b>Abbildung 3.</b> Übersicht zu den zwei Formen des Phagen-Replikationszyklus .....	26
<b>Abbildung 4.</b> Bakteriophage vB_Acibel004 .....	36
<b>Abbildung 5.</b> <i>A. baumannii</i> RUH-2037 infiziert mit vB_Acibel004 .....	37
<b>Abbildung 6.</b> Versuchsdesign <i>in vivo</i> .....	40
<b>Abbildung 7.</b> Darstellung der Gating-Strategie .....	49
<b>Abbildung 8.</b> Etablierung eines murinen <i>A. baumannii</i> Infektionsmodells .....	56
<b>Abbildung 9.</b> Klinischer Verlauf .....	58
<b>Abbildung 10.</b> Bakterielle Last .....	60
<b>Abbildung 11.</b> Lungenhistopathologie der murinen <i>A. baumannii</i> Pneumonie .....	62
<b>Abbildung 12.</b> Lungenhistopathologie der Scheininfektion mit PBS .....	64
<b>Abbildung 13.</b> Permeabilitätsindex .....	66
<b>Abbildung 14.</b> Konzentrationen proinflammatorischer Mediatoren in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit 24 h <i>post infectionem</i> .....	68
<b>Abbildung 15.</b> Konzentrationen proinflammatorischer Mediatoren in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit 48 h <i>post infectionem</i> .....	70
<b>Abbildung 16.</b> Konzentrationen proinflammatorischer Mediatoren gemessen in Blutplasma 24 h <i>post infectionem</i> .....	72
<b>Abbildung 17.</b> Konzentrationen proinflammatorischer Mediatoren gemessen in Blutplasma 48 h <i>post infectionem</i> .....	74
<b>Abbildung 18.</b> Leukozytenpopulationen in bronchoalveolärer Lavage (BAL) .....	76
<b>Abbildung 19.</b> Leukozytenpopulationen in homogenisiertem Lungengewebe .....	78
<b>Abbildung 20.</b> Leukozytenpopulationen im Blut .....	80
<b>Abbildung 21.</b> Bakterielle Last von <i>A. baumannii</i> und Sekretion proinflammatorischer Zytokine im <i>ex vivo</i> Modell humanen Lungengewebes. ....	82



## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1.</b> Auflistung der "ESKAPE"-Pathogene .....	17
<b>Tabelle 2.</b> Antibiogramm <i>A. baumannii</i> DSM 101993.....	35
<b>Tabelle 3.</b> Übersicht über die Versuchsgruppen der <i>in vivo</i> Experimente.....	40
<b>Tabelle 4.</b> Score Sheets.....	42
<b>Tabelle 5.</b> Auflistung des klinischen Punktesystems (Score).....	43

## Abkürzungsverzeichnis

®	Eingetragenes Warenzeichen
<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>A. baum.</i>	<i>A. baumannii</i>
ACB-Komplex	<i>Acinetobacter-Calcoaceticus-Acinetobacter-baumannii</i> -Komplex
ANOVA	Analysis Of Variance
Aq. bidest.	<i>Aqua bidest</i>
BAL	Bronchoalveolärer Lavage
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CAP	Community-Acquired Pneumonia
CCL	CC-Chemokine Ligand
CCL2	CC-Chemokine Ligand 2
CCL3	CC-Chemokine Ligand 3
CD	Cluster of Differentiation
CRISPR/Cas	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR Associated
cRPMI	Complemented Roswell Park Medical Institute
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CXCL1	(C-X-C motif) Ligand 1
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbend Assay
EU	Endotoxin Units
ESBL	Extended spectrum betalactamases
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal calf serum
FiO <sub>2</sub>	inspiratorische Sauerstofffraktion
FSC	Forward Scatter
G	Gauge
g	Gramm
GC1	Global Clone 1
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor
GMP	Good Manufacturing Practice

## Abkürzungsverzeichnis

h	Hour
HAP	Hospital-Acquired Pneumonia
HEPES	Hydroxyethyl-Piperazinyl-Ethansulfonsäure)
HZI	Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
IE	Internationale Einheit
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IgA	Immunglobulin A
IL-1 $\beta$	Interleukin-1beta
IL-10	Interleukin-10
IL-17A	Interleukin-17A
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
i.p	Intraperitoneal
ITEM	Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin
IU	International Unit
KbE	Koloniebildende Einheit
kg	Kilogramm
KM	Körpermasse
LB	Lysogeny Broth
LOS	Lipooligosaccharid
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
mM	Millimolar
MACS	Magnetic Cell Separation
MALDI-ToF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time Of Flight
mg	Milligramm
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MSA	Murines Serumalbumin
MYD88	Myeloid Differentiation Primary Response 88

## Abkürzungsverzeichnis

NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NF $\kappa$ B	Nuclear Factor „Kappa-Light-Chain-Enhancer“ of Activated B-Cells
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
OmpA	Outer membrane protein A
Oxa 51	Oxacillinase 51
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFU	Plaque-Forming Unit
p.i.	<i>post infectionem</i>
rpm <sup>-1</sup>	Revolutions Per Minute
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SD	Standard Deviation
SM	Saline Magnesium
SSC	Side Scatter
TLR-2	Toll-Like Receptor-2 (
TLR4	Toll-Like Receptor 4
™	Trade mark
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)12minomethane
U	Unit
V.	<i>Vena</i>
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Vol.-%	Volumenprozent
W	Watt
WHO	World Health Organization

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

Infektionen der Lunge und der Atemwege durch Antibiotika-resistente Bakterien wie *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) stellen eine zunehmende Bedrohung für Patienten und Gesundheitssysteme dar. Bakteriophagen eliminieren Krankheitserreger mit hoher Wirtsspezifität und Effektivität. Um eine erfolgreiche Therapie im klinischen Kontext zu ermöglichen, ist eine genauere Charakterisierung der Wirksamkeit und der angeborenen Immunantwort erforderlich. In Vorbereitung künftiger klinischer Studien, bei der aerosolisierte lytische Phagen gegen gramnegative Bakterien bei Patienten mit chronischen Atemwegsinfektionen eingesetzt werden, wurde in dieser Arbeit die Wirksamkeit und Verträglichkeit eines aufgereinigten Phagenpräparats gegen *A. baumannii* *in vivo* in immunkompetenten Mäusen und *ex vivo* in humanem Lungengewebe untersucht. Der charakterisierte Phage vB\_AbaM\_Acibel004 wurde anhand seiner lytischen Aktivität gegen den Infektionsstamm ausgewählt und als aufgereinigte Lösung hergestellt. Mäuse und humanes Lungengewebe wurden infiziert, einmalig mit Phagen oder Lösungsmittel behandelt und der Einfluss auf die bakterielle Last, sowie die klinischen und proinflammatorischen Reaktionen untersucht. Mäuse, die durch intratracheale Phagen-Applikation behandelt wurden, erholten sich schneller von der infektionsbedingten Hypothermie und wiesen eine geringere bakterielle Last im Lungengewebe sowie eine geringere Permeabilität der pulmonal-vaskulären Barriere und keine erhöhte Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren auf. Die histopathologische Untersuchung der Lungen zeigte bei den mit Phagen behandelten Tieren eine geringere Entzündung, ohne dass die Rekrutierung von Entzündungszellen beeinflusst wurde. Die Anwendung von Phagen reduzierte die bakterielle Belastung in *ex vivo* infizierten menschlichen Lungen. In keinem der Modelle wurden unerwünschte Wirkungen festgestellt.

In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal Wirksamkeit und Verträglichkeit eines gereinigten Phagenpräparats gegen *A. baumannii* in immunkompetenten Mäusen und in der humanen Lunge dokumentiert. Diese Ergebnisse unterstützen das Konzept der Entwicklung von Phagen-basierten Therapien gegen pulmonale *A. baumannii*-Infektionen

## 2 SUMMARY

Lung and airway infections by multidrug resistant bacteria including *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) impose an increasing burden on patients and health care systems. Bacteriophages eliminate pathogens with high host specificity and efficacy. To enable successful therapy in a clinical setting, deeper characterisation of efficacy and innate immune response is required.

In anticipation of a future trial applying aerosolised lytic phages against gram-negative bacteria in patients with chronic airway infection, this preclinical study aimed at determining the efficacy and tolerability of a purified phage preparation against *A. baumannii* in immunocompetent mice *in vivo* and human lungs *ex vivo*. Phage vB\_AbaM\_Acibel004 suitable for multidrug resistant *A. baumannii* RUH-2037 was identified due to its lytic activity and produced as a purified solution. Mice and human lung tissues were subjected to infection, treated once with phages or solvent, and its influence on bacterial burden, clinical inflammatory responses were investigated. Mice treated via intratracheal phage aerosolisation recovered faster from infection-associated hypothermia and displayed lower bacterial burden in lung tissue as well as lower lung permeability and cytokine release. Histopathological examination of lungs revealed less inflammation in phage-treated animals with unaffected inflammatory cellular recruitment. Phage application effectively reduced bacterial burden in *ex vivo* infected human lungs. No adverse effects were detected in any model. Efficacy and tolerability of a purified phage preparation against *A. baumannii* were observed for the first time in immunocompetent mice and in human lungs. This work supports the concept of developing phage-based therapies against pulmonary *A. baumannii* infections.

## 3 EINLEITUNG

### 3.1 Die Antibiotikaresistenz-Krise

#### 3.1.1 Ausgangslage

Infektionskrankheiten zählen zu den häufigsten Todesursachen und Infektionen des unteren Respirationstraktes stehen dabei an erster Stelle mit jährlich geschätzt zwei Millionen Todesopfern weltweit (3). Durch den wachsenden medizinischen Fortschritt seit Ende des 19. Jahrhunderts konnte die Sterblichkeit durch Infektionskrankheiten nachhaltig gesenkt werden (4, 5). Errungenschaften wie die Begründung der medizinischen Mikrobiologie, Einführung aseptischer Chirurgie und grundlegender hygienischer Maßnahmen Ende des 19. Jahrhunderts sowie die Entwicklung antimikrobieller Substanzen und flächendeckende Einführung von Vakzinierungen im 20. Jahrhundert waren bedeutende Etappen auf diesem Weg. Die Entdeckung des Penicillins durch Alexander Fleming 1929 gilt als besonderer Meilenstein (6): es war der Ausgangspunkt für eine Reihe weiterer Substanzen und führte wiederum zur Entdeckung bzw. Entwicklung zahlreicher Antibiotika (7, 8). Erstmals standen effektive Medikamente gegen bakterielle Infektionen für die breite Anwendung zur Verfügung und führten in den darauffolgenden Jahren zu einem konstanten Rückgang der Mortalität durch Infektionskrankheiten. Dieser Erfolg der modernen Medizin wurde besonders in den letzten Jahren zunehmend gefährdet durch das Auftreten antibiotikaresistenter Bakterien und einen drastischen Anstieg der dadurch verursachten Infektionen, die zunehmend schwerer zu behandeln sind und somit die heutige Gesundheitsversorgung global vor große Probleme stellt (9).

#### 3.1.2 Ausmaß des Problems und Ursachen

Antibiotika sind verschiedene Molekülklassen, die Bakterien abtöten bzw. ihr Wachstum hemmen können. Sie werden natürlicherweise von Mikroorganismen (im engeren Sinne Bakterien und Pilzen) produziert, die sich im evolutionären Konkurrenzkampf untereinander behaupten müssen. Die Entwicklung von Resistenzmechanismen gegen diese Substanzen ist demzufolge zunächst ein natürlicher Prozess. Erste resistente Bakterien wurden bereits kurz nach der Entdeckung des Penicillins beobachtet (10, 11) und auch nach der Einführung neuer Substanzklassen wurde regelmäßig kurz darauf das Auftreten erster resistenter Stämme dokumentiert (12). Bis heute wurde eine große Anzahl neuer Resistenzmechanismen gegen nahezu alle bekannten Substanzklassen beschrieben. Die Dynamik dieser Entwicklung hat allerdings in den letzten Jahrzehnten bedrohlich zugenommen: Von diversen Bakterien-Spezies wurden sowohl multiresistente (gegen mehrere Antibiotikaklassen) als auch panresistente (resistent gegen alle bekannten Wirkstoffklassen) Stämme beschrieben, gleichzeitig steigt die Zahl der Infektionen, die

## EINLEITUNG

durch diese Bakterien verursacht werden, weltweit stetig an. Nach aktuellen Schätzungen starben allein 2019 fünf Millionen Menschen im Zusammenhang mit Infektionen durch antibiotikaresistente Erreger (9). Es wird befürchtet, dass die Entwicklung neuer Substanzen in naher Zukunft nicht mehr mit der Ausbildung neuer Resistenzen Schritt halten kann. Die Weltgesundheitsorganisation (engl. *World Health Organization*, WHO) spricht in diesem Zusammenhang auch vom Eintritt in eine „postantibiotische Ära“ und hat das Problem der Antibiotikaresistenz zu einer der größten Gefahren für die globale Gesundheit der kommenden Jahrzehnte erklärt (13, 14).

Die zugrundeliegenden Ursachen liegen in einer erhöhten und vor allem wiederholten Exposition von Bakterien gegenüber diesen Substanzen, die nicht ausreichen, um die Erreger abzutöten. Dies erhöht den Selektionsdruck, was das vermehrte Auftreten resistenter Organismen zur Folge hat. Die Umstände, wie es dazu kommen kann, sind multifaktoriell: Auf der einen Seite steht ein unsachgemäßer Einsatz von Antibiotika in der Human- (v. a. durch falsche Indikationsstellung z. B. bei grippalen Infekten oder unsachgemäßer Gebrauch von Breitspektrumantibiotika (15)) sowie in der Veterinärmedizin (v. a. der Einsatz in der Intensivtierhaltung (16)). Andererseits kann es durch eine unsachgemäße Entsorgung von Antibiotika, z. B. über die Kanalisation oder über Antibiotikarückstände in der landwirtschaftlichen Produktion zu einer erhöhten Deposition in die Umwelt kommen. Prominentes Beispiel ist das massenhafte Auftreten multiresistenter Erreger in der Gegend um Hyderabad in Indien, wo im Rahmen der industriellen Antibiotikaproduktion große Mengen Antibiotika in ungeklärte Abwässer geleitet werden (17). Zusätzlich trägt die erhöhte Mobilität der Menschen aus verschiedenen Ländern im Zuge der Globalisierung oder Migrationsbewegungen dazu bei, dass resistente Erreger ebenfalls global neu auftreten und sich ausbreiten können (18–21).

Eine besondere Rolle spielen Infektionen, die während eines stationären Klinik-Aufenthaltes (nosokomial) erworben wurden, da in diesem Umfeld das Risiko einer Exposition sowohl zu Antibiotika als auch zu Patienten, die mit antibiotikaresistenten Bakterien kolonisiert sind, deutlich erhöht ist. Eine Gruppe von verschiedenen nosokomialen Bakterien, welcher die größte Bedeutung in diesem Zusammenhang zukommt, wird unter dem Akronym ESKAPE zusammengefasst, deren Vertreter in Tabelle 1 aufgelistet sind (22). Vorrangig vertreten sind dort vor allem bestimmte gramnegative Bakterien, die aufgrund ihrer Genetik besonders anpassungsfähig gegen verschiedene Antibiotikaklassen sind. Ein besonders besorgniserregender Vertreter ist *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*), der im Fokus der vorliegenden Arbeit steht.



# EINLEITUNG

**Tabelle 1.** Auflistung der "ESKAPE"-Pathogene (22).

<b>E</b>	<i>Enterococcus faecium</i>
<b>S</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>K</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>A</b>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<b>P</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>E</b>	<i>Enterobacter species</i>

## 3.2 *Acinetobacter baumannii*

### 3.2.1 Vorkommen

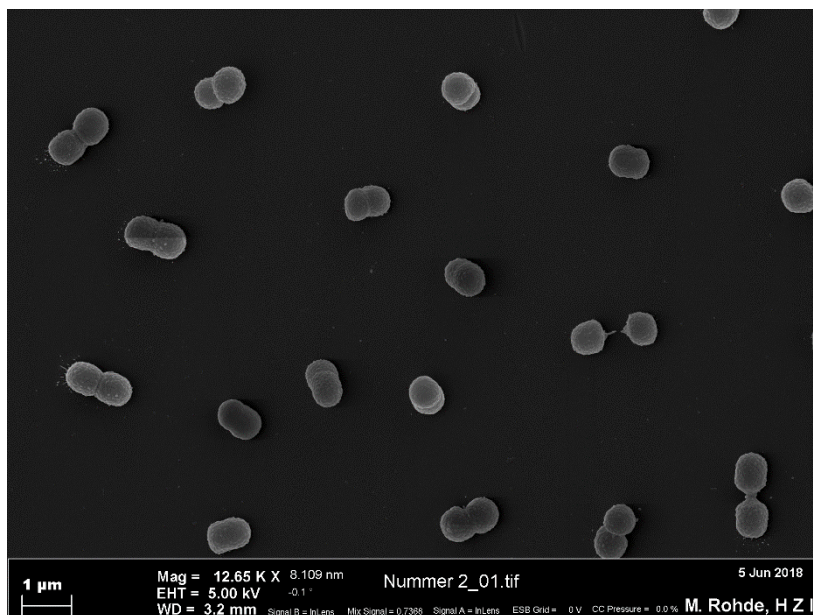
Vertreter der Spezies *Acinetobacter* werden im *Acinetobacter-calcoaceticus-Acinetobacter-baumannii*-Komplex (ACB-Komplex) zusammengefasst, wobei *A. baumannii* die größte klinische Bedeutung zukommt (23, 24). Die Pathogene können ubiquitär in der unbelebten Umwelt vor allem in Schlamm und feuchter Erde vorkommen und sind äußerst umweltbeständig. Eine genaue Speziesidentifizierung muss in der Regel mittels molekularbiologischer Methoden wie PCR (engl. *polymerase chain reaction*) oder massenspektrometrisch mittels MALDI-ToF (engl. *matrix-assisted laser desorption ionisation time of flight*) erfolgen. Lange Zeit als weitgehend harmlose, opportunistische Umweltbakterien angesehen, zeigt v. a. *A. baumannii* besonders humanpathogenes Potenzial. In den letzten Jahrzehnten wurde es weltweit immer häufiger als Erreger schwerer nosokomialer Infektionen beschrieben v. a. im Kontext von Wundinfektionen beispielsweise bei US-amerikanischen Veteranen im Rahmen der Irakkriege in den 1990er und 2000er Jahren („*Iraqibacter*“) (23–25) oder zuletzt im Rahmen des Ukraine-Konfliktes (26). Inzwischen ist bekannt, dass *A. baumannii* neben diesen beschriebenen Wundinfektionen ein breites Spektrum an nosokomialen Krankheitsbildern verursacht, wie Pneumonien (v. a. beatmungsassoziierte Pneumonien), Blutstrom- und Harnwegsinfektionen (23). Weltweit steigt der Anteil an Infektionen mit *A. baumannii*, v. a. in einigen asiatischen Ländern stellt er einen der häufigsten Erreger dar (23, 27). Aufgrund der hohen Mortalität ist die nosokomiale Pneumonie von besonderer Bedeutung und wird im Rahmen dieser Arbeit eingehend behandelt. In Deutschland machen Pneumonien auf Intensivstationen durch *A. baumannii* mit ca. 3 % noch einen geringen Anteil aus, jedoch ist auch hier, bedingt u. a. durch Import aus Ländern mit höherer Prävalenz, eine steigende Tendenz zu verzeichnen (24, 28). Inzwischen ist klar, dass

## EINLEITUNG

speziell *A. baumannii* über verschiedene Eigenschaften verfügt, die ihn vor allem im stationären Bereich zu einem äußerst gefährlichen Pathogen machen.

### 3.2.2 Eigenschaften (23)

*A. baumannii* ist ein Oxidase-negativer, gramnegativer Kokkobazillus aus der Ordnung *Pseudomonadales* (Abbildung 1). Er ist weitgehend unempfindlich gegen Austrocknung und kann mehrere Monate auf unbelebten Oberflächen überleben und vermehrungsfähig bleiben, wodurch eine Übertragung z. B. über Gegenstände im klinischen Alltag besonders leicht möglich ist. *A. baumannii* verfügt über verschiedene Virulenzfaktoren: Die Ausbildung einer Polysaccharid-Kapsel verhindert die Detektion durch das Immunsystem. Das äußere Membranprotein A (engl. *outer membrane protein A*, OmpA) ist multifunktional und vermittelt beispielsweise die Adhäsion an Zellen, Resistenz gegen Komplementfaktoren und Ausbildung von Biofilmen. Ein spezieller Aufbau der äußeren Membran der Bakterienhülle, ausgestattet mit nur wenigen, kleinen Poren, ist verantwortlich für eine hohe Impermeabilität größerer Moleküle (29, 30). Zusätzlich vorhandene oder induzierbare Effluxpumpen entfernen eingedrungene Substanzen (wie Desinfektionsmittel oder Antibiotika) aus dem periplasmatischen Spalt.



**Abbildung 1.** *Acinetobacter baumannii* RUH-2037 Diplokokken in Teilung. Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahme mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Manfred Rohde, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) Braunschweig.

Die beunruhigendste Eigenschaft des Bakteriums ist die Fähigkeit, Resistenzen gegen diverse Antibiotikaklassen auszubilden. Dies umfasst zum einen bereits intrinsisch vorhandene Resistenzen gegen mehrere Antibiotikaklassen (31), die über verschiedene Mechanismen vermittelt werden, wie beispielsweise verschiedene Betalaktamasen sowie solche mit

## EINLEITUNG

erweitertem, gramnegativem Spektrum (engl. *extended spectrum betalactamases*, ESBL). Der oben erwähnte Membranaufbau trägt zusätzlich zur geringeren Wirksamkeit antimikrobieller Substanzen an der Zellwand bei. Zum anderen besitzen Vertreter dieser Spezies aufgrund ihrer Genom-Eigenschaften die Fähigkeit, Resistenzgene aus der Umwelt oder auch direkt von anderen Spezies aufzunehmen und in ihr Genom zu integrieren. Diese Flexibilität ermöglicht es dem Erreger, sein Arsenal an verschiedenen Resistenzmechanismen kontinuierlich zu erweitern und selbst unter Therapie neue Resistenzen auszubilden (23, 32). In diesem Kontext ist vor allem das Auftreten Carbapenem-resistenter Stämme besonders besorgniserregend, weil dadurch die verbliebenen effektiven Therapieoptionen limitiert werden können.

Aufgrund all dieser Eigenschaften zählt *A. baumannii* speziell im intensivmedizinischen Bereich zu den gefürchtetsten Erregern. Ausbrüche auf Intensivstationen, vor allem beatmungsassoziierte Pneumonien, sind oft nur schwer beherrschbar und mit einer besonders hohen Mortalität verbunden (33, 34).

### 3.2.3 Pathogenese der *A. baumannii*-Pneumonie

Pneumonie bezeichnet eine Infektion des Lungenparenchyms und ist klinisch charakterisiert durch Fieber, Husten mit purulentem Sputum und Dyspnoe. Zur Diagnosestellung gehören daneben laborchemische Zeichen einer Infektion (eine Leukozytose mit Rechtsverschiebung, sowie eine Erhöhung von Entzündungsparametern, wie C-reaktives Protein und Procalcitonin) und ein neu aufgetretenes Infiltrat im Röntgen-Thorax (35). Es wird zwischen ambulant erworbener Pneumonie (*community-acquired pneumonia*, CAP) und nosokomialer Pneumonie (*hospital-acquired pneumonia*, HAP) differenziert, wobei letztere durch einen Krankheitsbeginn mehr als 48 Stunden nach stationärer Krankenhausaufnahme definiert ist (36). Beide Formen unterscheiden sich in erster Linie durch das Spektrum verursachender Erreger: Während die ambulant erworbene Pneumonie am häufigsten von *Streptococcus pneumoniae* (Pneumokokken) verursacht wird, sind im nosokomialen Umfeld vor allem gramnegative Erreger von Bedeutung (37), zu welchen auch *A. baumannii* zählt. Zum grundlegenden Verständnis der Pathogenese soll im Folgenden zunächst die Struktur des Respirationstraktes rekapituliert werden.

Die Lunge (*Pulmo*) befindet sich in den beiden Pleurahöhlen des Thorax beidseits des Mediastinums und stellt den Gasaustausch des Organismus sicher. Ausgehend von den großen, luftleitenden Atemwegen (*Trachea* und Bronchien) teilt sich der Respirationstrakt dichotom über ca. 15 Generationen in immer kleiner werdende *Bronchioli* bis in die kleinste Funktionseinheit, die Alveole, mit einem Durchmesser von circa 250 µm und einer Gesamtzahl von 300 – 500 Millionen. Dieser Alveolarraum ist mit einem flachen Epithel ausgekleidet (bestehend zu 93 % aus Pneumozyten vom Typ 1, den Rest machen kubische Pneumozyten vom Typ 2 aus), welches

## EINLEITUNG

zusammen mit dem Endothel (37) der Kapillaren des pulmonalen Gefäßbettes eine dünne Schicht von 0,2 – 0,4 µm ausbildet. Diese wird als pulmonal-vaskuläre Barriere oder Luft-Blut-Schranke bezeichnet und erstreckt sich über einer Gesamtläche von ca. 70 – 140 m<sup>2</sup>, über welche die Oxygenierung und die Elimination von Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) des Blutes erfolgt (38). Diese Barriere stellt einen großflächigen Kontakt zur Außenwelt dar, über den Pathogene nur eine geringe Distanz überwinden müssen, um in das Blut und in das Körperinnere zu gelangen. Daher ist die Lunge prädisponiert für invasive Infektionen und die Pneumonie entsprechend häufigster Ausgangspunkt einer systemischen Infektion (Sepsis) (39). Die Lunge besitzt daher eine Reihe ineinandergreifender Abwehrmechanismen, um den Alveolarraum vor potenziellen Pathogenen zu schützen.

Zunächst greifen physikalische Mechanismen, wie die mukoziliäre Reinigung (engl. *mucociliar clearance*). Dabei werden Fremdpartikel aus der Atemluft in der Gelphase des bronchialen Sekrets gefangen und mit Hilfe des Zilienschlags des bronchialen Flimmerepithels nach oral aus dem Respirationstrakt abtransportiert, wo sie dann entweder abgehustet oder verschluckt werden. Daneben werden unspezifische, antimikrobielle Peptide und Proteine, wie Defensine und Collectine, sowie Immunglobulin A (IgA) über die bronchialen Sekrete sezerniert, wodurch etwaige Pathogene zerstört oder abgefangen werden. Weiter distal finden sich gehäuft gewebeständige Zellen des angeborenen Immunsystems, wobei die Alveolarmakrophagen unter Normalbedingungen die häufigsten Vertreter sind, eingedrungene Fremdpartikel oder Pathogene können von diesen Zellen phagozytiert werden. Alle vorhandenen Zellen (einschließlich Alveolarepithelzellen) besitzen auf ihren Membranen verschiedene Keimbahn-kodierte Rezeptoren, die stereotype Muster mikrobieller Moleküle binden können und über Aktivierung der jeweiligen Zelle eine Entzündungsreaktion initiieren. Auf diese Weise tragen alle Bestandteile des Respirationstraktes zur Überwachung etwaiger Infektionserreger bei.

Zur Ausbildung einer bakteriellen Pneumonie müssen mehrere Faktoren erfüllt sein. Zunächst muss es zu einer Kolonisation des oberen Respirationstraktes (des *Nasopharynx* oder *Oropharynx*) mit pathogenen Bakterien kommen. Im stationären Kontext erfolgt die Übertragung von *A. baumannii* und anderen multiresistenten Bakterien meist durch das Klinikpersonal, z. B. über nicht desinfizierte Hände oder Handschuhe, nachdem diese Kontakt mit einer kontaminierten Oberfläche gehabt haben (23, 40, 41). Die anschließende Kolonisation des Patienten wird im Falle multiresistenter Erreger durch die Therapie mit Breitbandantibiotika begünstigt, wodurch die lokalen Mikrobiota reduziert und resistente Bakterien selektiert werden. Im Anschluss muss es dem Bakterium gelingen, die beschriebenen Barrieren zu überwinden. Dies geschieht meist über Mikroaspiration von Bakterien aus dem Pharynxbereich (23). Bei der Beatmungsassoziierten Pneumonie ist die physikalische Barriere bereits permanent durch den endotrachealen Tubus des Beatmungsgerätes unterbrochen, daneben sind Husten- und

## EINLEITUNG

Schluckreflex in Folge der notwendigen Sedierung aufgehoben. Nachdem *A. baumannii* auf diese Art bis in den Alveolarraum gelangt ist, muss es der Elimination durch das angeborene Immunsystem entgehen. Das gelingt über verschiedene Virulenzfaktoren, z. B. die Ausbildung einer Polysaccharid-Kapsel zur Verhinderung einer Detektion oder Resistenz gegen Komplementfaktoren über OmpA.

Zentraler Faktor in der Pathogenese stellt, wie bei allen gramnegativen Bakterien, das Lipopolysaccharid (LPS) bzw. bei *A. baumannii* Lipooligosaccharid (LOS) (42) dar, welche auch als Endotoxin bezeichnet werden. Es ist Bestandteil der bakteriellen Zellwand und als Pathogen-assoziiertes molekulares Muster (engl. *Pathogen-associated molecular pattern*, PAMP) einer der potentesten Liganden für den *Toll-like receptor* (TLR) 4. Die Bindung an diesen Rezeptor, der ubiquitär von Zellen des angeborenen Immunsystems, aber auch von den meisten Epithelzellen exprimiert wird, führt zur Aktivierung der Zelle und Auslösung einer Signalkaskade, speziell des MyD88-Signalwegs (engl. *myeloid differentiation primary response 88*). An dessen Endstrecke steht die Induktion des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B (engl. *nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells*), wodurch es zur Produktion und Sekretion proinflammatorischer Mediatoren, wie Interleukin (IL) 1 $\beta$ , 6 oder den Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- $\alpha$  kommt (43–45). Die Ausschüttung dieser Mediatoren bewirkt zunächst eine Entzündungsreaktion auf lokaler Ebene, die zu einer Rekrutierung von Immunzellen, vor allem neutrophiler Granulozyten und Monozyten in den Alveolarraum führt. Der Einstrom von Entzündungszellen über die Blut-Luft-Schranke sowie die Entzündungsmediatoren (speziell *vascular endothelial growth factor*, VEGF) bewirken eine Aktivierung von Epithel- und Endothelzellen. Dadurch kommt es über den Abbau von Occludinen zur Erhöhung der alveolokapillären Permeabilität, also einem Austritt von Blutplasma in den Alveolarraum bzw. Ausbildung eines Lungenödems (46).

Je nach Ausprägung resultiert daraus eine mehr oder weniger schwere respiratorische Insuffizienz, die sich klinisch als Dyspnoe oder eine nötige Erhöhung der inspiratorischen Sauerstofffraktion (FiO<sub>2</sub>) beim ventilierten Patienten manifestiert. Gelingt keine schnelle Elimination des Pathogens, führen beschriebene Entzündungsmediatoren über positive Rückkopplungsmechanismen zu einer steigenden Sekretion weiterer Entzündungsmediatoren und einer systemischen Ausbreitung der Entzündung mit progredienter Dysfunktion verschiedener Organsysteme, was im klinischen Bild einer Sepsis resultiert (47). Zusätzlicher Verlust von Volumen über das hyperpermeable Endothel führt letztlich zur Ausbildung eines septischen Schocks mit multiplen Organversagen und im schlimmsten Falle zum Tod des Patienten.

Die Antibiotikaresistenz von *A. baumannii* trägt entscheidend zu diesem Verlauf bei: Selbst wenn eine Antibiotikatherapie kalkuliert und rechtzeitig eingeleitet wird, ist sie im Falle von *A. baumannii* aufgrund der häufig vorkommenden Multiresistenz nur unzureichend wirksam (23). Weitere Verzögerungen durch nötige mikrobiologische Diagnostik (inkl. Resistenztestung) begünstigen

## EINLEITUNG

die Ausbreitung der systemischen Inflammation, welche bis zur Anpassung der Therapie schon zu weit fortgeschritten sein kann. Immer häufiger ist aufgrund der ausgeprägten Resistenz eine Umstellung auf ein effektives Antibiotikum nicht mehr möglich. Oft bleiben in solchen Fällen nur sehr wenige Therapieoptionen, z. B. nephrotoxische Polymyxin-Antibiotika wie Colistin, die bei kritisch kranken Patienten beispielsweise bei begleitendem akuten Nierenversagen nur eingeschränkt eingesetzt werden können (48). Dies alles trägt zu der enorm hohen Mortalität dieser Infektionen mit bis zu 70 % bei besonders resistenten Isolaten bei (23).

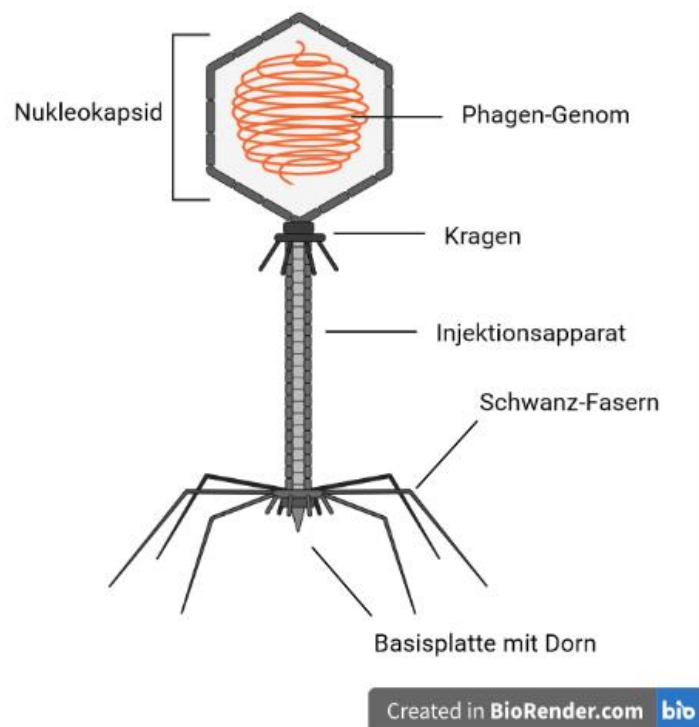
Zusammengefasst sind Infektionen verursacht durch *A. baumannii* (insbesondere nosokomiale Pneumonien) im Kontext der globalen Antibiotikaresistenz-Krise eine ernst zu nehmende Bedrohung und alternative Therapeutika werden dringend benötigt. Über die letzten Jahre fand deswegen eine zunehmende Rückbesinnung auf ältere Medikamente und Therapieansätze statt (49–51). Einer dieser Ansätze, der wachsende Beachtung findet, ist der Einsatz von Bakteriophagen (52).

### 3.3 Bakteriophagen

#### 3.3.1 Allgemeines

Bakteriophagen (kurz Phagen) sind Viren, die Bakterienzellen infizieren und wurden erstmals nahezu zeitgleich zu Beginn des 20. Jahrhunderts von Frederick Twort und Felix D'Hérelle beschrieben (53, 54).

Phagen stellen mit einer geschätzten Zahl von rund  $10^{30}$  im Meerwasser die zahlreichsten Mikroorganismen überhaupt dar und sind ubiquitär zu finden, einschließlich des menschlichen Körpers (55). Es existieren verschiedene morphologische Varianten, die bekanntesten sind Vertreter der Klasse *Caudoviricetes* mit beispielsweise dem *E. coli*-Phagen T4. Viren dieser Klasse bestehen aus einem Kapsid und einem unterschiedlich langen Injektionsapparat („Schwanz“), dessen Länge zur morphologischen Einteilung in Podoviren (kurzer Injektionsapparat), Myoviren (langer kontraktiler Injektionsapparat) oder Siphoviren (langer, nicht kontraktiler Injektionsapparat) herangezogen wird (Abbildung 2). Durch das Studium von Phagen und ihres Replikationszyklus gelang es, wesentliche Grundabläufe der Virologie und der molekularen Genetik aufzuklären, wodurch Phagen zu zentralen Modellorganismen der Biologie wurden. Das gesteigerte Interesse am Einsatz von Phagen im Rahmen der Antibiotikaresistenzkrise ist in erster Linie in ihrem antibakteriellen Potenzial während ihres Replikationszyklus begründet, an dessen Ende die Lyse von Bakterienzellen steht.



**Abbildung 2.** Aufbau eines Bakteriophagen nach Vorbild eines T4 *E. coli* Phagen mit Myovirus-Morphologie. Abbildung erstellt mit Biorender und modifiziert nach (53).

### 3.3.2 Replikationszyklus

Der Replikationszyklus von Phagen besteht aus fünf Schritten, die in den Grundzügen bei allen bekannten Viren vorkommen (56, 57):

#### 1. Adsorption

Das Viruspartikel (Virion) bindet mittels spezifischer Rezeptoren an Oberflächenmerkmale des Wirtsbakteriums. Diese können Pili, Fimbrien, Lipoteichonsäure oder Lipopolysaccharid darstellen. Die Bindung ist so spezifisch, dass Phagen nur Bakterien einer Spezies, meist auch nur einen bestimmten Stamm einer Spezies infizieren können. Diese erste, lose Bindung vermittelt einen engen Kontakt an die Bakterienzellwand.

#### 2. Injektion

Mit Hilfe seines Injektionsapparates schleust der Phage sein Genom in die Bakterienzelle ein. Je nach Subtyp des Phagen geschieht dies über spezifische Bindung an einen Transportkanal (bei Phagen mit Siphovirus- und Podovirusmorphologie) oder durch aktive Kontraktion des Injektionsapparates (bei Phagen mit Myovirusmorphologie), wobei es zur Perforation der Bakterienzellwand kommt.

#### 3. Replikation und Translation

Im Inneren der prokaryotischen Zelle kommt es mit Hilfe der dort vorhandenen Enzyme zur Replikation des Genoms, je nach genetischer Beschaffenheit wird ggf. zunächst mRNA transkribiert und die Translation von Virusprotein eingeleitet.

#### 4. Zusammenbau und Reifung der Tochter-Virionen

Mit Hilfe von zellulären Hilfsproteinen werden die Virusproteine zu Kapsiden zusammengesetzt und mit dem Virusgenom bepackt, es entstehen neue, infektiöse Virionen.

#### 5. Lyse der Wirtszelle und Freisetzung der Virionen

Es kommt zur Produktion von Phagenlysinen, die über mehrere Schritte die Lyse der bakteriellen Zellwand einleiten und zum Untergang der Wirtszelle führen. Die neu entstandenen Virionen werden in die Umgebung freigesetzt und können neue Bakterien infizieren.

Man unterscheidet zwei Formen des Replikationszyklus (56, 58, 59):



## EINLEITUNG

### *Lytischer (virulenter) Zyklus*

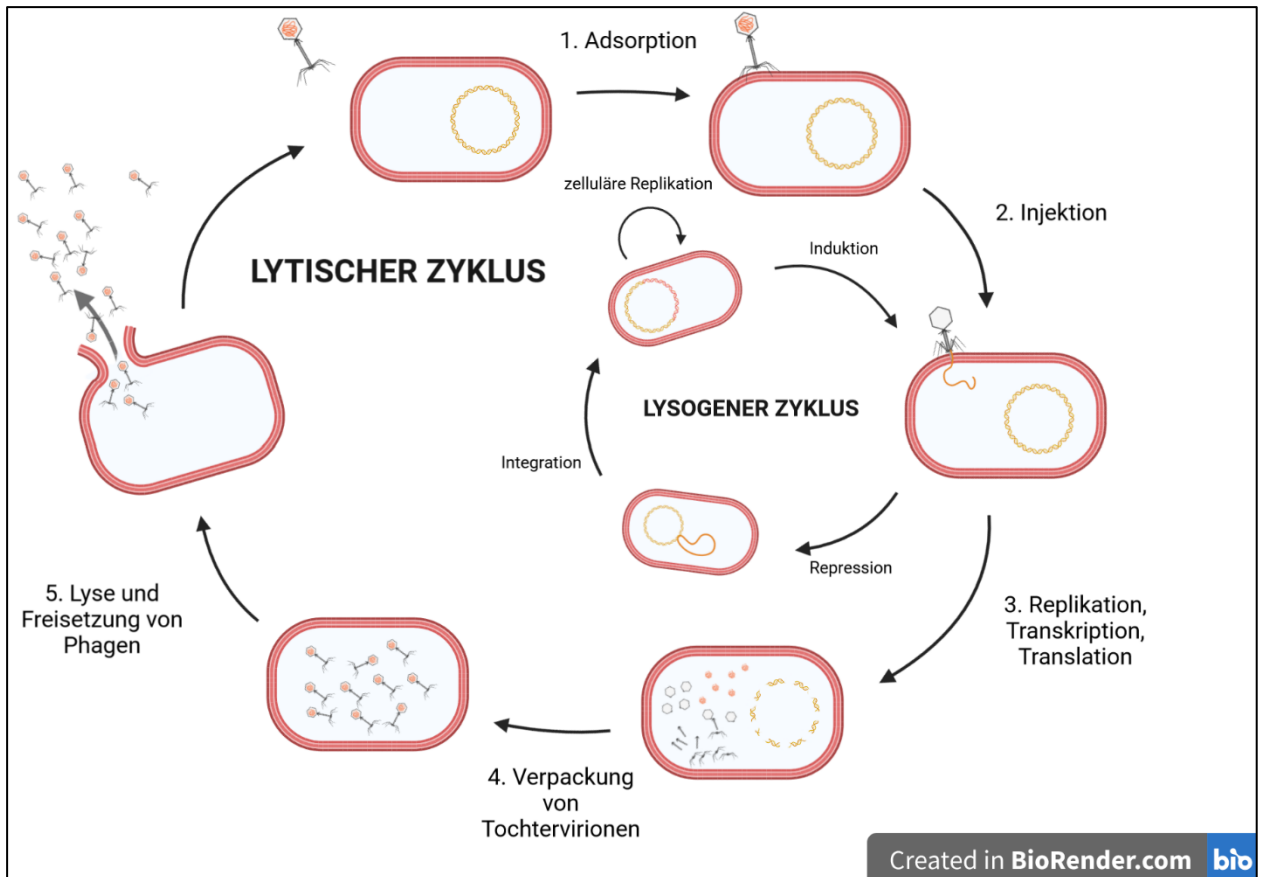
Die Replikation der Phagen wird sofort nach Eintritt des Genoms eingeleitet. Endonukleasen, welche entweder primär gemeinsam mit dem Genom in die Zelle injiziert oder erst sekundär produziert werden, degradieren zunächst das Bakteriengenom. Anschließend erfolgt die exzessive Replikation des Phagengenoms und Translation viraler Strukturproteine mithilfe der bakteriellen Enzyme und Ribosomen. Neue Tochtervirionen werden zusammengesetzt und ab einem gewissen Punkt innerhalb des Replikationszyklus vermehrt sogenannte Endolysine gebildet, die sich in die Zellwand einlagern. Dadurch kommt es zur Bildung von Poren, die die osmotische Stabilität der Bakterien stören und zur Lyse des Bakteriums und Freisetzung der produzierten Phagen führt.

### *Lysogener (temperenter) Zyklus*

Für diesen Zyklus müssen die Phagen über eine Integrase verfügen, ein Enzym, mit dessen Hilfe das virale Genom (bzw. Teile davon) in das bakterielle Genom integriert werden kann. Auf diese Weise entgehen die Phagen der Elimination durch Abwehrsysteme der Bakterien (z. B. CRISPR/Cas), persistieren als sogenannte Prophagen im Bakteriengenom oder in einem Plasmid und werden mit jeder Replikation der Wirtszelle vermehrt (vertikaler Gentransfer). Unter besonderen Umwelt-Bedingungen (z. B. metabolischem Stress) kommt es zur Induktion des Phagen, also zur vorrangigen Transkription des Phagengenoms und zum Übergang in den lytischen Zyklus. Der lysogene Zyklus stellt den häufigsten Vermehrungszyklus dar und spielt für die Übertragung von Genen zwischen verschiedenen Bakterien eine wichtige Rolle (Mechanismus der Transduktion, horizontaler Gentransfer). Beispiele hierfür sind verschiedene Virulenzfaktoren wie das *Shiga*- oder das Scharlach-Toxin, oder Resistenzgene (60, 61).

Die Unterscheidung zwischen diesen beiden Replikationsformen ist für den therapeutischen Einsatz von großer Bedeutung. Zur Bekämpfung von Bakterien werden bislang ausschließlich streng lytische Phagen eingesetzt, temperente Phagen werden aufgrund der erwähnten, möglichen Übertragung von genetischem Material nicht verwendet (62).

## EINLEITUNG



**Abbildung 3.** Übersicht zu den zwei Formen des Phagen-Replikationszyklus. Erstellt mit Biorender und modifiziert nach (56).

### 3.3.3 Phagentherapie

#### 3.3.3.1 Historisches

Aufgrund ihrer bakteriziden Eigenschaften wurden Phagen bereits kurz nach ihrer Entdeckung erstmals therapeutisch gegen Infektionen eingesetzt (63, 64). Die Entdeckung der Antibiotika in den 1940er Jahren und die kurz danach einsetzende Ost-West-Teilung während des Kalten Krieges bremste diese Entwicklung. Die Phagentherapie wurde danach vor allem in den Ländern des ehemaligen Ostblocks (Russland, Georgien und Polen) weiterhin intensiv praktiziert und erforscht, nicht zuletzt aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit von Antibiotika in diesen Ländern. Daher existiert heute vor allem dort eine langjährige praktische Erfahrung mit der Phagentherapie (65). Zu den bekanntesten Zentren zählen hierbei das Georgi-Eliava-Institut in Tiflis (Georgien), und das Ludwik-Hirszfeld-Institut für Immunologie und Experimentelle Therapie in Breslau (Polen).

### 3.3.3.2 Offene Fragen

Gerade im Zusammenhang mit der beschriebenen Problematik zunehmender Antibiotikaresistenzen bieten Phagen potenziell eine interessante Alternative und auf den ersten Blick eine ganze Reihe von Vorteilen. Da ihre lytische Aktivität auf von Antibiotika unabhängigen Wirkmechanismen beruht, haben Resistenzen gegen Antibiotika auf die Effektivität eines Phagen theoretisch keinen Einfluss (66). Im Gegensatz zum meist breiten Wirkspektrum der Antibiotika ist das Spektrum der meisten Phagen auf wenige Vertreter eines Genus, oftmals sogar nur auf einige Stämme einer Spezies begrenzt, eine bakterizide Wirkung auf die kommensale Mikrobiota wäre dementsprechend minimal (67). Da Phagen sowohl im menschlichen Körper als auch in der Umwelt vorkommen, ist eine negative immunogene Wirkung bei therapeutischer Applikation unwahrscheinlich (55, 68, 69).

Trotz dieser vermeintlich offensichtlichen Vorteile und des unverändert hohen Bedarfs an Alternativen sind Phagen bislang weder in den Vereinigten Staaten noch in der Europäischen Union als Arzneimittel anerkannt oder zugelassen. Ursächlich sind mehrere ungeklärte Fragen, z.B. bezüglich des Herstellungsverfahrens von Phagenpräparaten nach einheitlichen Qualitätsstandards (engl. *good manufacturing practice*, GMP), sowie regulatorische und organisatorische Hürden (70, 71). Hauptfaktor sind aber im Wesentlichen anhaltende Bedenken bezüglich der Effektivität zum einen und der Sicherheit für den Patienten zum anderen (72). Vor allem fehlt eine ausreichende Anzahl nach guter wissenschaftlicher Praxis durchgeführter Studien, die für eine offizielle Zulassung von Phagen als Therapeutikum dringend benötigt würden. Während es für einige Anwendungsbereiche bereits erste klinische Studien auch in Europa gegeben hat (32, 73–75), so ist speziell auf dem Gebiet der respiratorischen Infektionen nur wenige größere klinische Studie durchgeführt worden (76). Viele in der Literatur beschriebene Anwendungsbeispiele von Phagen beschränken sich in der Regel auf Einzelfallberichte (77, 78) oder Fallserien (79). Um klinische Studien durchführen zu können, fehlen oftmals auch präklinische Daten, die über die reine *in vitro* Untersuchung des Phagen-Wirtsbakterium-Systems hinausgehen und eine Wirksamkeit *in vivo* für verschiedene Anwendungsbereiche zeigen. Im Kontext der Infektion mit *A. baumannii* gab es in der Vergangenheit zwar eine Reihe verschiedener *in vitro* und *in vivo* Studien, in denen jedoch gewisse Aspekte bisher nicht adressiert wurden (80–83). Im Rahmen dieser Dissertation sollen eben solche Daten erhoben werden und dazu beitragen, diese Lücke zu schließen.

## 4 FRAGESTELLUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden experimentelle Daten zur Effektivität der Phagentherapie in Modellen der *A. baumannii* Pneumonie erhoben.

Während zahlreiche Daten zur Wirksamkeit der Phagen gegen *A. baumannii* in *in vitro*-Untersuchungen existieren, fehlen v. a. Daten zur Wirksamkeit in kontrollierten *in vivo* Modellen mit einem intakten Immunsystem. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein tierexperimentelles Modell der *A. baumannii*-Pneumonie in der Maus etabliert, in einem zweiten Schritt wurde dann in diesem Modell die Wirksamkeit einer intratrachealen Phagenapplikation überprüft. Dabei standen folgende Fragen im Mittelpunkt:

1. Führt die einmalige, intratracheale Applikation von Phagen zu einer nachweislichen Verbesserung des klinischen Zustands der Tiere?
2. Bewirkt die einmalige Phagenapplikation im Vergleich zu einer Lösungsmittelkontrolle eine messbare Reduktion der bakteriellen Last?
3. Induziert die intratracheale Phagenapplikation und/oder die damit verbundene Lyse von Bakterien eine überschießende Immunreaktion?

Die Anwendung gegen multiresistente Bakterien im humanmedizinischen Bereich ist das Hauptziel aktueller Forschungsbestrebungen. Aus diesem Grund wurden zusätzlich zu den *in vivo* Experimenten in der Maus als weiterer Schritt Richtung humanmedizinischer Anwendung Untersuchungen in einem *ex vivo* Modell an humanem Lungengewebe durchgeführt, welches für die Infektion mit *A. baumannii* adaptiert wurde. Folgende Fragen standen dabei im Fokus:

1. Bewirkt eine einmalige Applikation in der komplexen, dreidimensionalen Struktur des Lungengewebes eine wirksame Bakterienreduktion?
2. Führt die Applikation des Phagenpräparates nach Infektion mit *A. baumannii* zu einer gesteigerten Freisetzung früh ansteigender inflammatorischer Zytokine in humanem Gewebe?

Für diese Experimente wurde ein Phagenpräparat verwendet, welches gesondert über ein speziell adaptiertes Protokoll hergestellt wurde, das sich auch für eine großtechnische Produktion eignet.

## 5 MATERIAL UND METHODEN

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Allgemeine Laborgeräte

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Aerosol-Applizierhilfe	Microsprayer <sup>®</sup> Aerosolizer System	Penn-Century, Inc., USA
Beatmungsgerät für Kleinnager	MiniVent	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
Bio-Plex Array Reader		Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Durchflusszytometer	BD FACS Canto™ II	BD Biomerieux, Heidelberg, Deutschland
Fiberoptik-Laryngoskop für Kleinnager		Welch Allyn GmbH & Co. KG, Jungingen, Deutschland
Inkubator	Heraeus Typ BB 6220 O2	Kendro Laboratory Products, Osterode, Deutschland
Isofluran Vaporisator	Surgivet Isotec 4	Smiths Medical, Inc., Minneapolis, USA
Laborglasflaschen 200 ml / 500 ml / 1000 ml		Schott AG, Mainz, Deutschland
Photometer	Scanning Spectrophotometer, Uvikon XL	BioTek Instruments, Winooski, VT, USA
Photometer	Multiskan™ Mikrotiterplatten-Photometer	Thermo Fisher Scientific (USA)
Photometer	Anthos ht2 Mikroplatten Photometer	Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld, Deutschland
Präparationsbesteck		Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland

## MATERIAL UND METHODEN

### 5.1.1 Allgemeine Laborgeräte

(Fortsetzung)

Probenhomogenisator	gentleMACS™-Dissociator	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
Schüttelinkubator	Inkubationshaube TH30	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Sicherheitswerkbank	Hera Safe Typ HS 12	Kendro Laboratory Products, Osterode, Deutschland
Sicherheitswerkbank	Hera Safe Typ KS 14	Kendro Laboratory Products, Osterode, Deutschland
Trachealkanüle für Mäuse		Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
Thermometer	BAT-12 Microprobe	Physitemp Instruments, Inc., USA
Vortex	VWR Labdancer	VWR International, Radnor, PA, USA
Waage	G&G Pocket Scale Model No. LS2000H	G&G GmbH, Neuss, Deutschland
Wärmelampe		Petra Electric, Köln, Deutschland
Zentrifuge (groß)	Megafuge 1.0R	Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifuge (klein)	Biofuge fresco Heraeus	Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA

## MATERIAL UND METHODEN

### 5.1.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Material</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Columbia Agar mit 5 % Schafsblut		BD Biomerieux, Heidelberg, Deutschland
Falcon® Reaktionsgefäß 15 ml / 50 ml		BD Biomerieux, Heidelberg, Deutschland
FACS Röhren klar	Falcon® 5mL Round Bottom High Clarity PP Test Tube	Corning, NY, USA
FACS Röhren trüb		Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Einbettkassetten für Histologie		Rotilabo, Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Einwegimpfösen 1 µl / 10 µl	Impfschlinge	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Injektionsspritze 1 ml	Omnifix® F Solo, 1 ml	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Injektionsspritze (2 ml / 5 ml / 10 ml)	BD Discardit™ II	BD Biomerieux, Heidelberg, Deutschland
Kanüle Gr. 18	Sterican® 26G x ½"	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Kanüle Gr. 20	Sterican® 27G x ½"	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Homogenisier-Gefäße	gentleMACS™ M Tubes	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
Serologische Pipette (1 ml / 5 ml / 10 ml / 25 ml)	Falcon® serologische Einwegpipetten aus Polystyrol	Corning, NY, USA
Zellsiebe (40 / 70 / 100 µm)	Easy Strainer	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatte (12 / 96 Well)	Falcon® Multiwell-Zellkulturplatten	Corning, NY, USA

## MATERIAL UND METHODEN

### 5.1.3 Kommerziell erhältliche Testkits

<b>Testkit</b>	<b>Hersteller</b>
Procartaplex™ Multiplex Immunoassay	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mouse albumin ELISA Quantification Set	Bethyl Laboratories, Inc., USA
IL-1β ELISA (human)	eBioscience, San Diego, CA, USA
IL-8 ELISA (human)	BD Biomerieux, Heidelberg, Deutschland

### 5.1.4 Reagenzien

<b>Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
CountBright Absolute Counting Beads	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
DNase Typ 1	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd-Lösung (4 %), gepuffert	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd-Lösung (37 %), methanolfrei	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Imipenem/Cilastatin (500 mg/500 mg)	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland
Kollagenase Typ 2	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

### 5.1.5 Tierarzneimittel

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Ketamin (100 mg/ml)	CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland
Xylazin Rompun (2 %)	CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland
NaCl 0,9 %	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Isofluran (1 ml/ml)	CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland

### 5.1.6 Medien, Puffer und Zusätze

<b>Medium/Puffer</b>	<b>Hersteller</b>
CASO Casein-Soja-Pepton-Agar Universalmedium	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland



## MATERIAL UND METHODEN

### 5.1.6 Medien, Puffer und Zusätze

(Fortsetzung)

Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) Gibco™	Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA
FACSFlow™	BD Biotect, Heidelberg, Deutschland
FACS™ Shutdown Solution	BD Biotect, Heidelberg, Deutschland
Fötales Kälberserum (Foetal calf serum, FCS)	CAPRICORN Scientific (Ebsdorfergrund)
Glycerol 20 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) Puffer	Life Technology, Carlsbad, CA, USA
L-Glutamin	Life Technology, Carlsbad, CA, USA
NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland
Penicillin	Life Technology, Carlsbad, CA, USA
RPMI Medium 1640 Gibco™	Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA
Streptomycin	Life Technology, Carlsbad, CA, USA
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)

## 5.1.7 Monoklonale Antikörper für Durchflusszytometrie (84)

Oberflächen antigen	Klon	Fluorochrom	Konzentration (mg/ml)	eingesetztes Verhältnis	Hersteller
CD11c	N418	Cy5	1	1 : 250	ATCC, Manassas, VA, USA
F4/80	BM8	PE	0,2	1 : 125	eBioscience, San Diego, CA, USA
CD11b	M1/70	PE-Cy7	0,2	1 : 200	eBioscience, San Diego, CA, USA
CD45	30-F11	FITC	0,5	1 : 400	BD, Heidelberg, Deutschland
Ly6G	1A8	PerCP-Cy5.5	0,2	1 : 200	BD, Heidelberg, Deutschland
MHC-II	M5/11 4.15.2	Alexa700	0,2	1 : 666	eBioscience, San Diego, CA, USA
Ly6C	AL-21	BV510	0,1	1 : 200	BioLegend, San Diego, CA, USA
SiglecF	E50- 2440	BV421	0,5	1 : 125	BD, Heidelberg, Deutschland
Anti- CD16/CD32 (F <sub>c</sub> -Block)	2.4G2	-	0,5	1 : 10	BD, Heidelberg, Deutschland

## 5.1.8 Tiere

Bei den Experimenten wurden ausschließlich weibliche, 8 – 10 Wochen alte Mäuse (*Mus musculus*) eingesetzt. Es handelte sich hierbei um Tiere des Inzuchtstammes C57BL/6N (Charles River Germany, Sulzbach, Deutschland), die unter spezifisch Pathogen-freien (SPF) Bedingungen gehalten wurden. Alle tierexperimentellen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden vorab vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) genehmigt (Versuchstieranzeige A0299/15, genehmigt am 17.02.2016).

## 5.1.9 Humanes Lungengewebe

Das Material entstammte Proben, die im Rahmen von Tumoroperationen aus tumorfreiem Randgewebe gewonnen wurden. Die Verwendung erfolgte nach dem informierten Einverständnis der Patienten und nach Genehmigung durch die Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin (EA2/079/13).

## 5.2 Relevante Studienvorarbeiten externer PartnerInnen

### 5.2.1 Verwendeter *Acinetobacter baumannii*-Stamm

Bei sämtlichen Experimenten wurde das klinische Isolat RUH 2037 (DSM 101993) verwendet. Dieses wurde 1986 im Rahmen eines größeren Ausbruchs in Venlo, Niederlande, aus Patientenmaterial isoliert und von Dr. Alex De Vos und Tom van der Poll vom *Centre for Experimental and Molecular Medicine, Academic Medical Centre* (Amsterdam, Niederlande) zur Verfügung gestellt (85, 86).

Am *Leibniz Institut Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ) wurden unter der Leitung von Frau Dr. Christine Rohde vorab verschiedene Untersuchungen durchgeführt. Dazu gehörte die Sensibilitätstestung des Stammes auf unterschiedliche Bakteriophagen, der Ausschluss lytischer Prophagen im Genom und eine Bestimmung des Antibiotikaresistenzprofils (Tabelle 2). Die Analyse des *Oxa51*-Gens ergab eine Zuordnung des Stammes zum globalen Klon 1 (*global clone 1, GC1*).

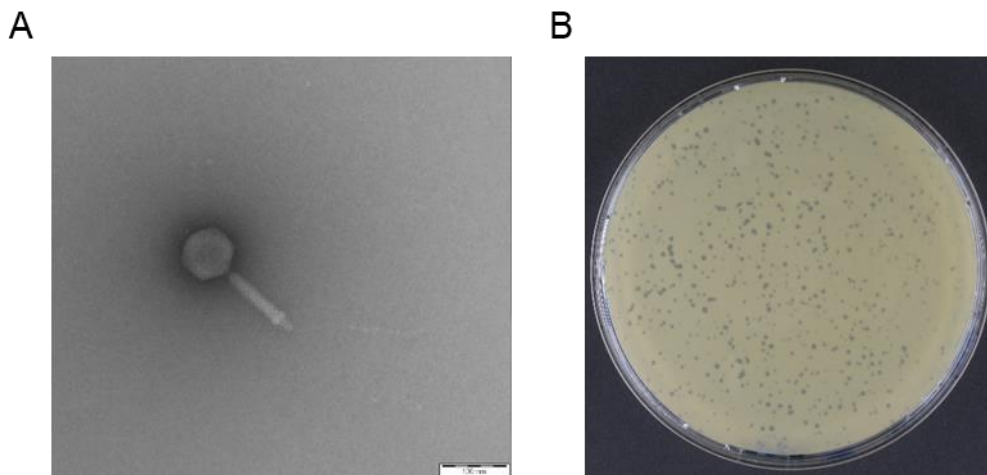
**Tabelle 2.** Antibiogramm *A. baumannii* DSM 101993

Substanz	Menge pro Disk (µg)	Durchmesser Hemmhof (mm)
Penicillin G	6 (=10 IE)	k.H.
Oxacillin	5	k.H.
Ampicillin	10	k.H.
Ticarcillin	75	k.H.
Mezlocillin	30	k.H.
Cefalotin	30	k.H.
Cefazolin	30	k.H.
Cefotaxim	30	k.H.
Aztrenoam	30	k.H.
Imipenem	10	34-36
Tetracyclin	30	k.H.
Chloramphenicol	30	k.H.
Gentamicin	10	6
Amikacin	30	20
Vancomycin	30	k.H.
Erythromycin	15	10
Lincomycin	15	k.H.
Ofloxacin	5	k.H.
Norfloxacin	10	k.H.
Colistin	10	14-16
Pipemidsäure	20	k.H.
Nitrofurantoin	100	k.H.

Antibiogramm (Auszug) getestet nach DIN 58940 (Stand: 1991) in der DSMZ, Braunschweig (87). k.H. = kein Hemmhof, entspricht Resistenz gegenüber jeweiliger Substanz. Das vollständige Antibiogramm von *A. baumannii* RUH-2037 ist einsehbar in der BacDive-Datenbank der DSMZ <https://bacdive.dsmz.de/strain/157916> doi:10.13145/bacdive157916.20201210.5

### 5.2.2 Bakteriophage und Zusammensetzung der Phagen-Pufferlösung

Der verwendete Bakteriophage *vB\_AbaM\_Acibel004* wurde von Frau Dr. Maya Merabishvili (*Queen Astrid Military Hospital*, Brüssel, Belgien) zur Verfügung gestellt. Dieser wurde eingehend charakterisiert, genetisch sequenziert und als rein lytischer Phage mit Myovirus-Morphologie identifiziert (Abbildung 4A) (88). In der DSMZ erfolgten weitere Untersuchungen zur Erfassung des Wirtsspektrums. Dort wurde der Phage *vB\_AbaM\_Acibel004* nach erfolgreicher Testung auf dem anvisierten *Acinetobacter*-Stamm DSM 101993 vermehrt mit dem Ziel, eine Phagen-Lösung mit möglichst hohem Titer zu erhalten (Abbildung 4B).



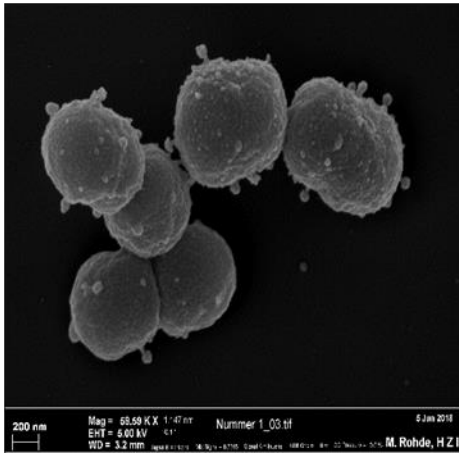
**Abbildung 4.** Bakteriophage *vB\_Acibel004*. (A) Transmissionselektronenmikroskopie-Aufnahme, Balken = 100 nm. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Manfred Rohde, HZI Braunschweig. (B) Lyseplatte von *vB\_Acibel004* auf dem *A. baumannii* Stamm RUH-2037 im Doppelagar-Overlay Plaque Assay mit LB-Agar. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr. Christine Rohde, DSMZ Braunschweig.

Diese Ausgangslösung erreichte einen Titer von circa  $1 \times 10^{10}$  *Plaque forming units* (PFU)/ml. In einem zweiten Schritt wurde diese Phagen-Lösung am *Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin* (ITEM) Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Holger Ziehr in mehreren Zyklen mittels eines für diesen Bakteriophagen speziell angepassten Chromatographieverfahrens aufgereinigt (71). Der initial vorhandene Endotoxingehalt von circa 575 000 EU (engl. *Endotoxin units*) /ml (Range von 150 000 – 1 000 000 EU/ml), gemessen mittels Chromo-LAL Assay (Associates of Cape Cod, East Falmouth, MA, USA) konnte in der finalen Phagen-Lösung auf 4 000 EU/ml gesenkt werden. Der Titer der Phagen-Lösung sank bedingt durch die Aufreinigung auf  $5 \times 10^6$  PFU/ml. Zur Phagen-Behandlung im humanen Lungen-Modell *ex vivo* wurde eine weitere Lösung mit einem höheren Titer und höherem Endotoxingehalt ( $5 \times 10^9$  PFU/ml und 8 000 EU/ml) verwendet, welches nach dem kontinuierlich weiterentwickelten Aufreinigungsverfahren am ITEM

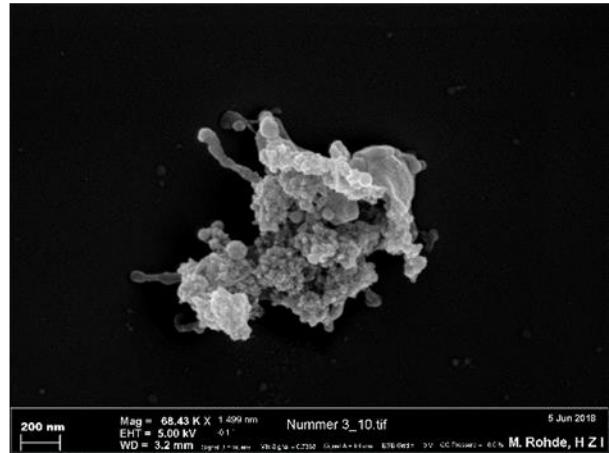
## MATERIAL UND METHODEN

hergestellt wurde. Die Phagen-Pufferlösung wurde ebenfalls am ITEM steril hergestellt. Sie enthielt 0,1 M NaCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM Tris-HCl, bei einem pH von pH 7,2–7,5.

A



B



**Abbildung 5.** *A. baumannii* RUH-2037 infiziert mit *vB\_Acibel004*, Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahme. (A) Intakte Bakterien mit adhären Phagenpartikeln. (B) Lysiertes *A. baumannii* Bakterium. Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Manfred Rohde, HZI Braunschweig.

### 5.2.3 Elektronenmikroskopie-Aufnahmen von *A. baumannii* und *vB\_Acibel004*

Die dargestellten Aufnahmen mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie (Abbildung 4A) bzw. Rasterelektronenmikroskopie (Abbildung 5) wurden von Prof. Dr. Manfred Rohde vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig nach Negativfärbung mit 2 % Uranyl-Acetat angefertigt (1).

### 5.3 Methoden

Sämtliche experimentellen Arbeiten erfolgten nach bereits in der Arbeitsgruppe etablierten Standards und Abläufen mit entsprechenden Modifikationen.

#### 5.3.1 Herstellung des Nährmediums für die Bakterienzucht

Für die Anzucht von *A. baumannii* wurde das Universalmedium Casein-Soja-Pepton-Agar eingesetzt. Zur Herstellung wurden 30 g des Pulvers in 1 Liter *Aqua bidest.* aufgelöst. Das fertige Medium wurde in saubere 500 ml-Flaschen abgefüllt und bei 121 °C für 20 Minuten sterilisiert. Nach Abkühlen wurde die Nährlösung bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

#### 5.3.2 Herstellung der Kryostocks

Einzelkolonien des Stammes wurden mithilfe einer Einweg-Impföse auf eine Columbia-Agar Platte mit 5 % Schafsblut als 3-Ösen-Ausstrich ausgebracht. Die Agarplatte wurde anschließend 16 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wurden alle Einzelkolonien mit einem sterilen Watteträger in 1,5 ml Kryomedium (CASO-Bouillon mit 20 % Glycerol) eingerührt, diese Kryostocks wurden bei –80 °C gelagert. Insgesamt wurden 2 Arbeits- und 2 Sicherheitsstocks angelegt.

#### 5.3.3 Anzucht von *A. baumannii*

Alle Arbeitsschritte mit Bakterien, inklusive aller tierexperimentellen Arbeiten sowie der Probenverarbeitung, wurden unter einer Sicherheitswerkbank unter strengen hygienischen Bedingungen durchgeführt. Die Bakterien wurden am Vortag aus einem Arbeitsstock (AS 1, angelegt am 21.01.2016) auf eine Blutagarplatte ausgestrichen und für ca. 16 Stunden bei 37 °C bebrütet. Von dieser Vorkulturplatte wurden Einzelkolonien in 55 ml des Anzuchtmediums in einen 500 ml-Erlenmeyer-Kolben überimpft und eine Kultur mit einer optischen Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) von 0,05-0,08 hergestellt. Diese Kultur wurde circa 1,5 Stunden in einem Schüttelinkubator bei 37 °C und 220 rpm bebrütet, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5-0,9 erreicht wurde. Dabei wurde in vorab durchgeführten Experimenten bestätigt, dass eine OD<sub>600</sub> = 1,0 etwa 1 x 10<sup>9</sup> Koloniebildenden Einheiten (KbE)/ml entsprach. Die Kultur wurde dann auf zwei 50 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt und das Volumen mit einer serologischen Pipette gemessen. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation über 10 Minuten bei 3 100 rpm ohne Bremse. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit steriler, Phosphat-gepufferter Kochsalz-Lösung (*Phosphate buffered saline*, PBS) resuspendiert und auf eine Konzentration von circa 25 x 10<sup>9</sup> KbE/ml für die spätere Infektion eingestellt. Zur Validierung der Infektionsdosis wurde eine Verdünnungsreihe mit PBS hergestellt: Nach einer Verdünnung im Verhältnis 1:25 (Ziel 1 x 10<sup>9</sup> KbE/ml) wurden 3

## MATERIAL UND METHODEN

Verdünnungsschritte im Verhältnis 1:100 und die beiden letzten im Verhältnis 1:10 vorgenommen. Von den drei letzten Stufen ( $10^3$  bis  $10^1$ ) wurden jeweils 50  $\mu$ l auf eine Blutagarplatte ausgebracht, über Nacht bei 37° C inkubiert und die KbE am nächsten Tag ausgezählt. Als zusätzliche Kontrolle unmittelbar vor Infektion wurde die  $OD_{600}$  des ersten Verdünnungsschrittes mit  $1 \times 10^9$  KbE/ml gemessen, welche bei korrekter Einstellung circa 1,0 ergab.

### 5.3.4 Tierexperimentelle Untersuchungen

#### 5.3.4.1 Tierhaltung

Die Unterbringung der Mäuse erfolgte in geschlossenen und individuell ventilierten Käfigen mit Filterhaube (Typ II-L, EHERT, Emmendingen) in einem eigens abgetrennten, versuchsbezogenen Tierhaltungsbereich der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie. Die Tiere wurden auf Standardeinstreu gehalten, Wasser und pelletiertes Futter standen *ad libitum* zur Verfügung. Ein physiologischer Tag-Nacht-Rhythmus wurde durch Hell-Dunkel-Phasen von jeweils 12 Stunden sichergestellt. Vor Beginn der Experimente wurde eine Mindesteingewöhnungszeit von 5 Tagen eingehalten.

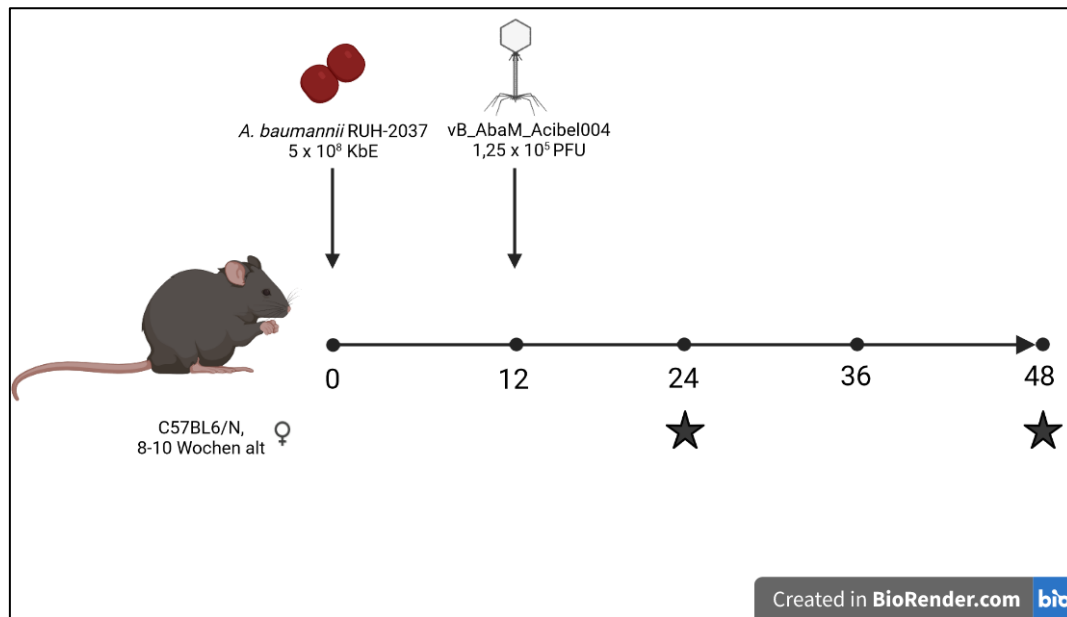
#### 5.3.4.2 Modell der *A. baumannii*-Pneumonie

Im Vorfeld der Therapie-Versuche mit dem Bakteriophagen wurde zunächst erstmalig in der Abteilung ein Pneumonie-Modell mit *A. baumannii* in Abwandlung eines publizierten Protokolls (86) etabliert. Die Tiere wurden mit  $1 \times 10^8$  bzw.  $5 \times 10^8$  KbE in 20  $\mu$ l pro Tier transnasal infiziert und alle 12 Stunden klinisch überwacht (ausführliches Infektionsprozedere siehe Punkt 5.3.4.5). Zwölf, 24 und 48 Stunden *post infectionem* wurden zunächst als Endpunkte festgelegt und der klinische Gesamtzustand bewertet, die bakterielle Last in bronchoalveolärer Lavage (BAL), homogenisierten Lungen- sowie Milzgewebe und Blut bestimmt und die verschiedenen Leukozyten-Populationen in Blut, BAL und Lunge analysiert.

#### 5.3.4.3 Design der Experimente

Die Mäuse wurden zum Zeitpunkt 0 transnasal mit der in eigenen Etablierungsversuchen festgelegten Dosis von  $5 \times 10^8$  KbE *A. baumannii* infiziert oder erhielten PBS als Scheininfection. 12 Stunden *post infectionem* erhielten die Tiere die Phagen-Lösung oder das Lösungsmittel (SM-Puffer) als Kontrolle intratracheal.

## MATERIAL UND METHODEN



**Abbildung 6.** Versuchsdesign *in vivo*. Sterne markieren Versuchsendpunkte. Abbildung erstellt mit Biorender.

### 5.3.4.4 Endpunkte der Studie und Versuchsgruppen

Anhand des beobachteten Verlaufs der *A. baumannii*-Pneumonie während der Etablierung wurden die Endpunkte für die Experimente auf 24 und 48 Stunden *post infectionem* festgelegt (Abbildung 6).

Für die Therapieversuche mit Bakteriophagen im *A. baumannii*-Modell ergab sich die folgende Gruppeneinteilung (Tabelle 3):

**Tabelle 3.** Übersicht über die Versuchsgruppen der *in vivo* Experimente

Infektion	Behandlung	Zeitpunkt
<i>A. baumannii</i>	Bakteriophagen	24 h p.i.
<i>A. baumannii</i>	Lösungsmittel	24 h p.i.
PBS Scheininfektion	Bakteriophagen	24 h p.i.
PBS Scheininfektion	Lösungsmittel	24 h p.i.
<i>A. baumannii</i>	Bakteriophagen	48 h p.i.
<i>A. baumannii</i>	Lösungsmittel	48 h p.i.
PBS Scheininfektion	Bakteriophagen	48 h p.i.
PBS Scheininfektion	Lösungsmittel	48 h p.i.



## MATERIAL UND METHODEN

### 5.3.4.5 Infektion der Tiere mit *A. baumannii*

Die Mäuse wurden den jeweiligen Versuchs-Gruppen randomisiert zugeordnet. Zunächst erfolgte bei den Tieren die Messung des Körpergewichts und der rektalen Körpertemperatur mit einer speziellen Messsonde für Mäuse. Danach wurden die Tiere markiert und im Anschluss mit einer Mischung aus 80 mg/kg Körpermasse (KM) Ketamin und 25 mg/kg KM Xylazin in steriler Kochsalzlösung in einem Gesamtvolumen von 60 µl per intraperitonealer (i.p.) Injektion narkotisiert. Nach Feststellung der ausreichenden Narkosetiefe wurde den Mäusen zum Schutz der Kornea Augengel aufgetragen. Die Infektion erfolgte in senkrechter Position nach Aufhängen der Tiere an den oberen *Incisivi* in einer eigens dafür gebauten Vorrichtung. Von der vorbereiteten Infektionsdosis mit  $25 \times 10^9$  KbE/ml wurde den Tieren je 10 µl der Bakterien-Lösung in ein Nasenloch verabreicht, so dass mit einem applizierten Gesamtvolumen von 20 µl eine Bakterienlast von  $5 \times 10^8$  KbE pro Tier erreicht wurde. Die Scheininfektion mit PBS erfolgte analog mit dem selben Volumen.

Nach Abschluss der Infektion wurden die Tiere ihrer Gruppenzuordnung entsprechend getrennt zurück in ihre Käfige gelegt, wo sie unter engmaschiger Kontrolle erwachten. Um eine rasche Erholung von der Narkose zu gewährleisten, wurde den Tieren eingeweichtes Futter angeboten, zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur wurde der Käfig über eine Stunde mit einer Wärmelampe bestrahlt. Alle 12 Stunden erfolgte die klinische Beurteilung der Tiere einschließlich Messung der rektalen Körpertemperatur und des Körpergewichts.

### 5.3.4.6 Applikation der Bakteriophagen-Lösung und des Lösungsmittels (89–91)

Zwölf Stunden nach Infektion der Tiere erfolgte die intratracheale Applikation von 25 µl der Phagen-Lösung bzw. des Lösungsmittels. Die Mäuse wurden in eine speziell angefertigte Narkose-Kammer gesetzt, die an einen Isofluran-Vaporisator angeschlossen war. Bei einem O<sub>2</sub>-Fluß von 300-500 ml/min mit 3-5 Vol.-% Isofluran wurden die Tiere narkotisiert. Nach Feststellung einer ausreichenden Narkosetiefe wurden die Mäuse in Rückenlage auf einer Intubationsvorrichtung mit Klebestreifen fixiert. Über einen Drei-Wege-Hahn wurde das Sauerstoff-Isofluran-Gemisch den Tieren über einen Narkoseschlauch kontinuierlich nasal weiter appliziert. Mit Hilfe eines Laryngoskops für Kleinnager wurden die Mäuse anschließend mit einem selbst angefertigten Tubus, welcher aus dem Plastikkatheter einer peripheren Venenverweilkanüle (20 G) angefertigt wurde, unter Sichtkontrolle orotracheal intubiert. Nach erfolgreicher Intubation erfolgte die Applikation der Phagen-Lösung bzw. des Lösungsmittels mit einer Verneblungshilfe (*Microsprayer*). Für den Einsatz als Negativkontrolle zur Phagen-Lösung wurde die o.g. Lösung mit 4 000 EU/ml Lipooligosaccharid (gewonnen mittels mechanischer Lyse) des *Acinetobacter*-Stammes DSM 101993 versetzt, um dem Endotoxingehalt der final eingesetzten Phagen-Lösung zu entsprechen. Diese Pufferlösung diente als Lösungsmittel in

## MATERIAL UND METHODEN

allen folgenden *in vivo* Untersuchungen und wurde vor jeder Applikation frisch angesetzt. Die Tiere erwachten im Anschluss innerhalb von circa 5 Minuten unter Wärmelicht.

### 5.3.4.7 Klinische Beurteilung

Der klinische Zustand aller Tiere wurde während des gesamten Versuchszeitraumes überwacht und in einer standardisierten Punktetabelle (*Score Sheet*) dokumentiert. Es erfolgte alle 12 Stunden nach Infektion (zweimal täglich) eine klinische Beurteilung der Versuchstiere bezüglich des Vorliegens definierter Kriterien, inklusive der Messung der Körpertemperatur und des Körpergewichts. Es wurden Handlungsanweisungen festgelegt, die sich an den „Empfehlungen des Arbeitskreises Berliner Tierschutzbeauftragter für die vorzeitige Tötung erheblich leidender Versuchstiere“ orientierten (Tabelle 4). Wurde festgestellt, dass ein Tier den Versuchsendpunkt wegen Erreichens der im *Score Sheet* zuvor festgelegten Abbruchkriterien nicht erreicht, wurde es gemäß Handlungsanweisungen schmerzlos euthanasiert (mittels zervikaler Dislokation nach Narkotisierung mit Ketamin und Xylazin).

**Tabelle 4.** Score Sheets

<b>Symptom</b>	<b>Kategorie</b>
Tier isoliert sich	A
Struppiges/ungepflegtes Fell	A
Verhaltens- und Haltungsauffälligkeiten	A
Augen (krustige Belege, Augenausfluss)	B
Atmung normal/beschleunigt/schwerfällig, pumpend	/B/C
Krämpfe, Torkeln, Apathie	C
Schmerzen (gekrümmte Haltung oder Leib aufgezogen, Laufen auf Zehenspitzen, beim Anfassen)	C
Tier vermeidet Bewegung / Reaktionsminderung auf äußeren Reiz	A
Fehlstellung der Zähne	A
Verletzungen Hautveränderungen	A
Abszesse, äußerlich sichtbare Infektionen, Ödeme, Automutilation	B
Hautfalten bleiben stehen	B
Leib hart und aufgetrieben	B
Hypothermie (Körperkerntemperatur < 35 °C)	B
Körpermasseabnahme ab 10 %	A
Körpermasseabnahme ab 20 %	B
Körpermasseabnahme = 25 %	C

Beurteilungskriterien erstellt nach „Empfehlungen des Arbeitskreises Berliner Tierschutzbeauftragter zum Vorzeitigen Töten erheblich leidender Versuchstiere.“

## MATERIAL UND METHODEN

Die daraus resultierenden Handlungsanweisungen waren entsprechend:

- A) Weitere Beobachtung des Versuchstieres.
- B) Ebenfalls weitere Beobachtung des Versuchstieres, Rücksprache mit Tierärztin/Projektleiterin; in Kombination mit Symptomen für Schmerzen, Torkeln oder Krämpfen musste das Tier unverzüglich schmerzlos getötet werden.
- C) Das Tier musste unverzüglich schmerzlos getötet werden.

Unabhängig erfolgte zum Präparationszeitpunkt eine Gesamtbeurteilung der Symptomatik mittels eines Punktesystems (klinischer *Score*) modifiziert nach Berger *et al.* und Müller-Redetzky *et al.* (Tabelle 5) (84, 92).

**Tabelle 5.** Auflistung des klinischen Punktesystems (Score), modifiziert nach (84, 92)

<b>Symptom</b>	<b>Punkt</b>
<b>Fell</b>	
Glänzend	0
Struppig	1
<b>Augen</b>	
Klar	0
Verkrustet, (purulenter) Ausfluss	1
<b>Verhalten</b>	
Neugierig, wach	0
Isolation	1
Reduzierte Aktivität (bei Beobachtung in Ruhe im Käfig)	1 oder
Reduzierte Reaktivität auf externen Stimulus	2
<b>Atmung</b>	
Ruhig, gleichmäßig	0
Hyper- / Hypoventilation	1
Angestrengt	2

### 5.3.4.8 Endpräparation der Mäuse und Probenentnahme

Zum Versuchsendzeitpunkt erfolgte zunächst die zuvor beschriebene klinische Evaluation. Im Anschluss wurden die Tiere mit 160 mg/kg KM Ketamin und 75 mg/kg KM Xylazin in einem Gesamtvolumen von circa 200 µl per i.p.-Injektion tief narkotisiert. Die ausreichende Narkosetiefe wurde u.a. durch Überprüfung des Interdigitalreflexes getestet. Danach wurde das Fell der Mäuse mit Ethanol (70 %) befeuchtet und die Tiere auf einer Präparationsunterlage aus Styropor mit mehreren Nadeln fixiert. Die nachfolgende Präparation erfolgte nach einem modifizierten, Arbeitsgruppen-internen Standardprotokoll (90).

## MATERIAL UND METHODEN

Mit einer Schere erfolgte ein zervikaler, medianer Hautschnitt auf Höhe der Trachea, der bis submandibulär erweitert wurde. Im Anschluss wurden die muskulären Weichteile stumpf präpariert, um die Trachea mit umgebender, prätrachealer Muskulatur darzustellen. Die prätracheale Muskulatur wurde mit einer feinen Schere eröffnet und die dargestellte Trachea mit einer feinen Pinzette untertunnelt. Mit einem feinen Faden wurde eine Ligatur vorbereitet. Nach Eröffnung der Trachea auf halber Länge mittels eines kleinen horizontalen Schnitts zwischen die Ringknorpel mit einer feinen Schere wurden die Tiere durch diese Öffnung mit einer Trachealkanüle (Durchmesser 0,8 mm, Länge 15 mm) intubiert. Während der gesamten Präparation wurden die Mäuse mit einem Beatmungsgerät für Kleinnager bei einer eingestellten Atemfrequenz von  $150 \text{ min}^{-1}$  und einem Tidalvolumen von  $150 \mu\text{l}$  ventiliert. Mit der Präparationsschere erfolgte eine mediane Laparotomie mit Eröffnung des gesamten Abdomens bis unter den *Processus xyphoideus*. Zur besseren Darstellung wurden links und rechts Flankenschnitte zur Entlastung gesetzt. Durch Injektion von  $50 \mu\text{l}$  Heparin (25 000 IE in 10 ml NaCl) in den linken Ventrikel mit einer Kanüle (27  $\frac{3}{4}$  G) wurde das Blut antikoaguliert. Das Darmpaket inklusive Milz wurden nach extraperitoneal verlagert, um die großen Bauchgefäße freizulegen. Im Anschluss wurden die Mäuse durch finalen Blutentzug mit derselben Kanüle aus der *V. renalis sin.* bzw. *V. cava caudalis* getötet und das entnommene, heparinisierte Blut wurde in einem 1,5 ml Eppendorfer Reaktionsgefäß aufgefangen. Nach suprahepatischer Durchtrennung der Bauchgefäße und des Oesophagus wurde das Diaphragma vorsichtig eröffnet und etwaige Verklebungen der Pleura mit einer Pinzette vorsichtig gelöst. Anschließend erfolgte die vollständige Eröffnung des Thorax mittels medianer Thorakotomie. Die Thorax-Hälften wurden durch Fixierung mit Nadeln an der Präparationsunterlage offengehalten.

Die Lungen wurden gewebeschonend präpariert, im Anschluss erfolgte die Durchführung der bronchoalveolären Lavage (BAL) nach vollständiger Darstellung der Lunge. Für die Lavage wurde das Beatmungsgerät von der Trachealkanüle diskonnektiert und das Bronchialsystem über diese mit einer 1 ml Spritze mit  $800 \mu\text{l}$  mit gekühltem PBS (versetzt mit Proteaseinhibitor *completeMini*, 1 Tablette auf 10 ml) zweimal langsam gespült. Beide BAL-Proben wurden in je ein trübes FACS-Röhrchen als BAL 1 und BAL 2 aufgefangen und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Nach Materialentnahme für die Quantifizierung der Bakterienlast wurden die BAL-Proben bei  $1\,500 \text{ rpm}$  5 Minuten bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Die Überstände wurden im Anschluss abgenommen, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für später folgende Analysen (murines Albumin, Zytokine) bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  asserviert.

Danach erfolgte die gleichmäßige Spülung des pulmonalen Gefäßsystems durch Injektion von circa 5 bis 10 ml gekühlten PBS mit einer Kanüle (26 G) in den rechten Ventrikel. Für die weiteren Untersuchungen wurde die Lunge aufgeteilt: Für die Analyse der Leukozyten-Populationen wurde der linke Lungenlappen verwendet, aus den verbliebenen Anteilen wurde die bakterielle Last bestimmt. Die übrigen Organe (Thymus, Herz, Leber, Nieren) wurden entnommen, in 1,5 ml

## MATERIAL UND METHODEN

Reaktionsgefäßen sicher verschlossen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  asserviert. Nach Abschluss der Präparation wurden die Kadaver für 20 Minuten bei  $134^{\circ}\text{C}$  autoklaviert und danach fachgerecht entsorgt.

### 5.3.4.9 Quantifizierung der Bakterienlast

#### Bakterienlast in Blut und bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit

Aus dem Blut bzw. der ersten Bronchiallavage (BAL 1) wurden  $10\ \mu\text{l}$  entnommen und damit eine Verdünnungsreihe in PBS im Verhältnis 1:10 mit den Stufen  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  und  $10^{-7}$  durchgeführt. Anschließend wurden  $10\ \mu\text{l}$  der unverdünnten Probe bzw. je  $50\ \mu\text{l}$  pro Verdünnungsstufe auf eine halbe Blutagarplatte ausgebracht, über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert und am nächsten Tag die KbE ausgezählt.

#### Bakterienlast in Lungen- und Milzhomogenat

Die unter 5.3.4.8 beschriebenen Anteile der Lunge bzw. die gesamte Milz wurden jeweils mit dem Gewebhomogenisator zerkleinert (Programm „Protein 1.01“). Dabei wurde das Organ in ein MACS M Homogenisator-Röhrchen in 1 ml PBS, versetzt mit Proteaseinhibitor, gegeben und circa 1 ml Homogenat hergestellt. Damit wurde anschließend eine Verdünnungsreihe in PBS im Verhältnis 1:10 mit den Stufen  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  und  $10^{-7}$  durchgeführt. Anschließend wurden  $10\ \mu\text{l}$  des unverdünnten Homogenats bzw. je  $50\ \mu\text{l}$  pro Verdünnungsstufe auf eine halbe Blutagarplatte ausgebracht, über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert und am nächsten Tag die KbE ausgezählt.

### 5.3.4.10 Herstellung von Zellkulturmedium für den Lungenverdau

Für die Zellisolation zur durchflusszytometrischen Analyse mittels Lungenverdau wurde komplementiertes Zellkulturmedium (engl. *complemented Roswell Park Medical Institute cell culture medium* oder cRPMI) verwendet. Zur Komplementierung wurde das Medium mit  $0,2\ \text{mM}$  L-Glutamin,  $10\ \text{U/ml}$  Penicillin/Streptomycin,  $10\ \text{nM}$  HEPES-Puffer,  $0,05\ \text{mM}$   $\beta$ -Mercaptoethanol und  $10\ \%$  fetalem Kälberserum (zuvor 30 Minuten bei  $56^{\circ}\text{C}$  hitzeinaktiviert) versetzt und sterilfiltriert.

## MATERIAL UND METHODEN

### 5.3.4.11 Quantifizierung der Gesamtleukozytenzahl und Differenzierung der Leukozytenpopulationen in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit, Lungenhomogenat und Blut

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl und verschiedenen Leukozytenpopulationen der pulmonalen Proben (BAL und Lungenhomogenat) erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die Zellzahlen und prozentualen Anteile der verschiedenen Populationen des Blutes wurden mit einem Zellcoulter für Tierproben bestimmt.

#### 5.3.4.11.1 Leukozytenzahl und -differenzierung in bronchoalveolärer Lavage und Lungenhomogenat mittels Durchflusszytometrie

##### *Grundprinzip der Durchflusszytometrie (93)*

Bei dieser Methode werden die Zellen mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern markiert, die spezifische Epitope binden und gleichzeitig mit unterschiedlichen Fluorochromen assoziiert sind. Während der Durchflusszytometrie wird ein Flüssigkeitsstrom der Einzelzellsuspension erzeugt, der durch mehrere Laser-Strahlen geleitet wird. Die Unterbrechung der Laserstrahlen wird von den Fotodetektoren des Geräts registriert, die Dauer der Unterbrechung (engl. *forward scatter*, FSC) und die Streuung des Lichts (engl. *side scatter*, SSC) lassen dabei Rückschlüsse auf die Größe und Zusammensetzung der jeweiligen Zellen zu. Die Antikörper-gebundenen Fluorochrome werden jeweils durch verschiedene Laser angeregt und können anhand ihrer spezifischen Emissionsspektren ebenfalls zugeordnet werden, womit die Präsenz verschiedener Antigene auf den Zellen nachgewiesen wird. Aus der Gesamtheit von Zellgröße, -granularität und spezifischer Kombinationen verschiedener Oberflächenantigene können mittels eines Computergestützten virtuellen Sortierungsverfahrens (engl. *Gating*) die einzelnen, vorhandenen Zellpopulationen dargestellt und quantifiziert werden. Für die Charakterisierung der verschiedenen Leukozytenpopulationen wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt.

##### *Probenverarbeitung: Bronchoalveoläre Lavage*

In den BAL-Proben lagen die Zellen als Einzelzellen vor und konnten nach einmaliger Zentrifugation der Flüssigkeit in Form sedimentierter Zellen (Zellpellets) am Boden der Reaktionsröhrchen direkt entnommen und weiterverwendet werden. Nach Abnahme des Überstands wurden die Zellen in ca. 50 µl Flüssigkeit zunächst belassen, anschließend wurden die Pellets aus BAL 1 und BAL 2 pro Tier vereint und auf 120 µl Gesamtvolumen mit FACS Puffer (1 x PBS + 0,2 % BSA) aufgefüllt.

## MATERIAL UND METHODEN

### *Probenverarbeitung: Einzelzellisolation aus der Lunge*

Die unter 5.3.4.8 beschriebenen Lungenanteile wurden zur Analyse mittels Durchflusszytometrie verwendet. Die Lungenanteile wurden zunächst grob mit einer Organschere zerkleinert. Anschließend wurden diese in 6 ml einer Enzymlösung (bestehend aus cRPMI versetzt mit 1 537 IU/Maus Kollagenase II und 6 000 IU/Maus DNase 1) für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, um die Einzelzellen aus dem Gewebeverband heraus zu lösen. Die Gewebestückchen wurden danach mit dem Konus einer 2 ml-Spritze durch ein feines Zellsieb (Maschengröße 70 µm) gerieben und der Verdauprozess mit vorgewärmtem cRPMI abgestoppt, indem die Zellsuspension auf ein Gesamtvolumen von 40 ml aufgefüllt wurde. Die Lungenzellen wurden im Anschluss bei 1 500 rpm zentrifugiert, um ein Zellpellet zu generieren, der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde danach mit FACS-Puffer resuspendiert und auf ein Gesamtvolumen von 500 µl eingestellt.

### *Antikörperfärbung und Fixierung der Einzelzellen*

Aus den vorbereiteten BAL- und Lungen-Proben wurden 100 µl zur Messung in je ein klares FACS-Röhrchen überführt. Die Einzelzellsuspensionen wurden mit 10 µl einer anti-CD16/CD32-Mischung (bestehend aus 1 µl anti-CD16/CD32 und 9 µl FACS Puffer) zur Blockade der F<sub>c</sub>-Rezeptoren auf den vorhandenen Phagozyten versetzt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Dadurch sollte eine unspezifische Markierung der Makrophagen über das F<sub>c</sub>-Ende der monoklonalen Antikörper durch den *scavenger receptor* verhindert werden. Anschließend wurden alle zu färbenden Proben mit 20 µl der Antikörpermischung (*Stain innate*, s. 5.1.7) versetzt und 20 Minuten im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Zusätzlich wurde pro Experiment ein Röhrchen für eine ungefärbte Kontrolle (*unstained*) mit insgesamt 100 µl (zusammengesetzt zu gleichen Teilen aus allen Lungenproben des jeweiligen Experiments) vorbereitet. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Proben mit PBS aufgefüllt und erneut bei 1 500 rpm 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen.

Nach diesem Waschschrift erfolgte die Fixierung der Zellen. Die entstandenen Zellpellets wurden mittels Vortexer vorsichtig resuspendiert, mit 150 µl einer Formaldehydlösung (PBS mit 2 % Formaldehyd) versetzt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. In einem letzten Waschschrift in FACS-Puffer (bei 1 500 rpm für 5 Minuten bei 4 °C) wurde die Fixierlösung entfernt und das Zellpellet mit 100 µl FACS-Puffer resuspendiert. Sämtliche Proben wurden bei mittlerer Messgeschwindigkeit am Durchflusszytometer gemessen.

## MATERIAL UND METHODEN

### *Differenzierung und Zählung der Leukozyten-Populationen mittels Durchflusszytometrie (Gating Strategie)*

Zur Darstellung und Auswertung der Leukozyten-Populationen wurde das Programm BD FACSDiva™ (Version 6.0) verwendet. Leukozyten wurden anhand ihrer Oberflächenantigene als CD45<sup>+</sup> Zellen definiert, die weitere Zuordnung zu den einzelnen Leukozyten-Subpopulationen erfolgte anhand verschiedener Antigenexpressionsmuster und wird in Abbildung 7 dargestellt.

Die Berechnung der tatsächlichen Gesamtzellzahl wurde mit Hilfe kommerziell erhältlicher, standardisiert kalibrierter Partikel (engl. *counting beads*) durchgeführt (94). Diese lassen sich im Durchflusszytometer anhand ihrer geringen Größe und bei gleichzeitig hoher seitlicher Lichtstreuung (SSC) eindeutig charakterisieren und dienen zur Quantifizierung der durch das Durchflusszytometer tatsächlich gemessenen Partikel. Zur Berechnung wird die ursprüngliche *bead*-Konzentration, wie in der jeweiligen Charge angegeben (z. B.  $0,53 \times 10^5$  *beads*/50  $\mu$ l), zunächst mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert um die Anzahl an *beads* zu erhalten, die in die Probe jeweils zugegeben werden. Der verwendete Verdünnungsfaktor (*dilution factor*  $DF_{beads}$ ) richtet sich nach der zu erwartenden Zellzahl, die in der BAL typischerweise geringer ist als in der Lunge (für BAL wurden die *beads* im Verhältnis 1:10, für die Lungenzellen im Verhältnis 1:2 eingesetzt). Daraus ließ sich die Anzahl theoretisch zugegebener *counting beads* berechnen:

$$\text{Anzahl zugegebener beads in } 50 \mu\text{l} = \frac{\text{bead Konzentration in } 50 \mu\text{l}_{\text{Charge}}}{DF_{beads}}$$

Die Berechnung der Zellzahlen erfolgte über die Berechnung eines *bead factor* ( $F_{beads}$ ):

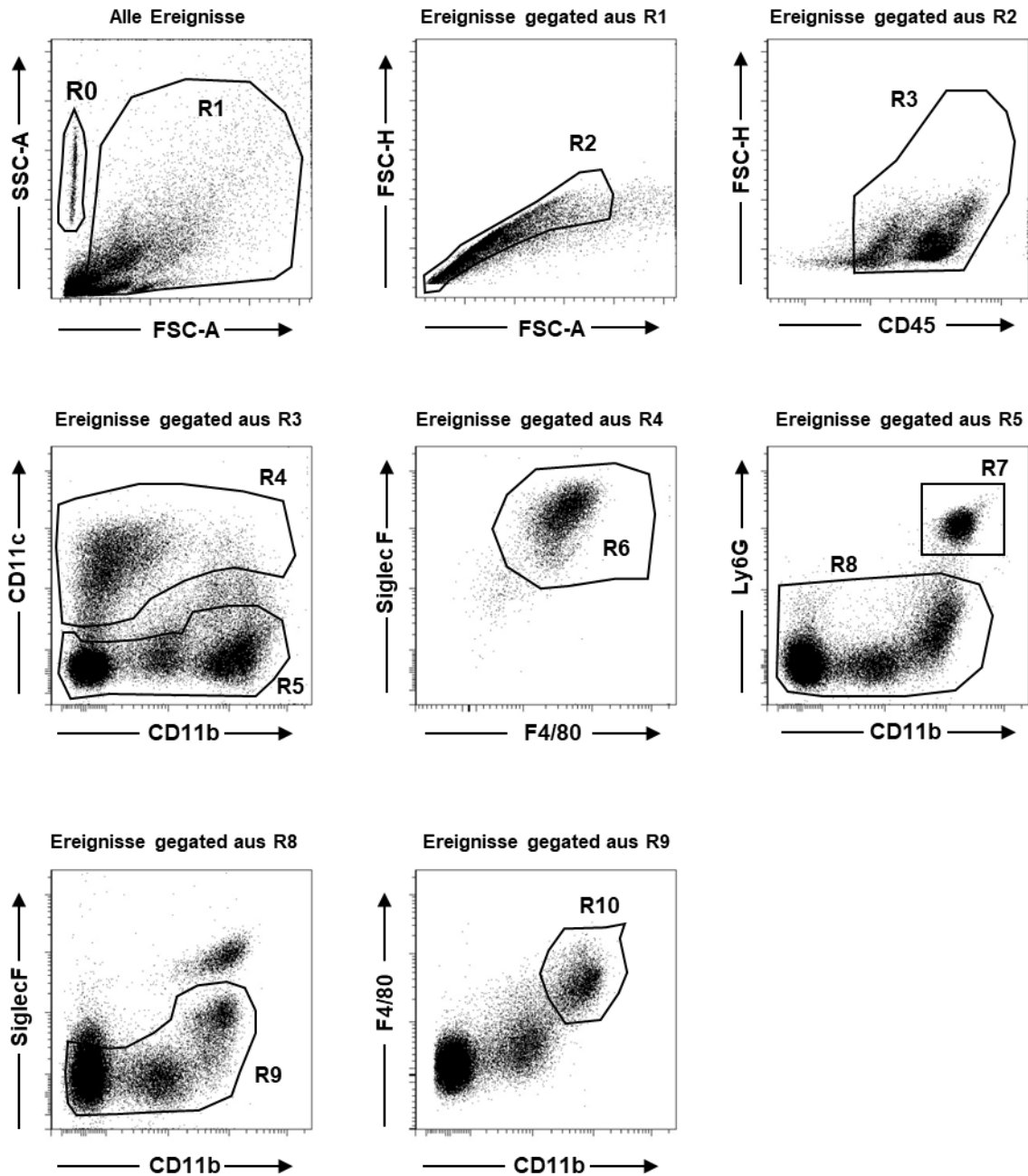
$$\frac{\text{Anzahl zugegebener beads}}{\text{Anzahl gemessener beads}} = F_{beads}$$

Die Gesamtzellzahlen im eingesetzten Zellpellet wurden anhand der im Gerät gemessenen Leukozyten, des *bead* Faktors und des Gesamtverdünnungsfaktors der Probe ( $DF_{Organ}$ , 1,2 für BAL und 5 für Lungenzellen) berechnet:

$$\text{Gesamtzellzahl}_{\text{Leukozyten}} = \text{Gesamtzellzahl}_{\text{Messung}} \times F_{beads} \times DF_{Organ}$$



## MATERIAL UND METHODEN



R0: Counting beads

R1: Entfernung des Zelldebris

R2: Singlets (Einzelevents)

R3: CD45+ Zellen (**Leukozyten**)

R4: CD45+ CD11c+ Leukozyten

R6: CD45+ CD11c+ SiglecF+ (**Alveolarmakrophagen**)

R5: CD45+ CD11c- Leukozyten

R7: CD45+ CD11c- CD11b+ Ly6G+ (**Neutrophile Granulozyten**)

R8: CD45+ CD11c- CD11b+ Ly6G- Leukozyten

R9: CD45+ CD11c- CD11b+ Ly6G- SiglecF- Leukozyten

R10: CD45+ CD11c- CD11b+ Ly6G- SiglecF- F4/80+ (**inflammatorische Makrophagen**)

**Abbildung 7.** Darstellung der Gating-Strategie zur Identifizierung der Leukozytenpopulationen mittels Durchflusszytometrie nach (1,78)

### 5.3.4.11.2 Leukozytenzahl und -differenzierung im Blut

Es wurden 95 µl Vollblut in ein EDTA-Gefäß (Microvette, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt; die Probe wurde im Anschluss 20-mal in der Hand zügig invertiert, um eine ausreichende Durchmischung des Blutes mit EDTA zu gewährleisten. Aus 12 µl dieser Probe wurde mit einem vollautomatischen Coulter-Zähler (Scil Vet abc) für die veterinärmedizinische Routineanwendung ein kleines Blutbild erstellt: Mit Hilfe des Programmes *scil ViP* (Version 2.1.21.160708) erfolgte dabei eine quantitative und qualitative Auflistung der zellulären Bestandteile und des Hämoglobingehaltes des Blutes. Im Anschluss erfolgte die manuelle Berechnung/Korrektur der Zellpopulationen anhand der prozentualen Angaben des Geräts.

### 5.3.4.12 Untersuchung der Permeabilität im pulmonalen Gefäßsystem

Zur Beurteilung der alveolokapillären Barriere wurde die Konzentration des murinen Serumalbumins im Plasma mit der Konzentration in der BAL-Flüssigkeit verglichen.

Diese Konzentrationen wurden mithilfe eines Sandwich-ELISA in Plasma und BAL nach Hersteller-Protokoll bestimmt. Die Plasma-Proben wurden jeweils im Verhältnis 1:200.000 und 1:500.000 verdünnt, die BAL-Proben infizierter Tiere im Verhältnis 1:5 000, 1:10 000 und 1:20 000, die BAL-Proben scheininfizierter Tiere im Verhältnis 1:1 000, 1:5 000 und 1:10 000. Die Messung von Proben und Standards erfolgte stets in Duplikaten. Zur exakten Konzentrationsbestimmung wurden die Messwerte der einer Standardkurve zum Vergleich herangezogen. Im Anschluss wurde der Quotient aus gemessenem BAL- und Plasma-Wert gebildet und zur besseren Darstellung mit 1 000 multipliziert.

### 5.3.4.13 Bestimmung der Konzentrationen verschiedener Zytokine und Chemokine in BAL und Plasma

Es wurden die Konzentrationen von insgesamt 12 verschiedenen Zytokinen bzw. Chemokinen in BAL und Plasma bestimmt, um Veränderungen des Sekretionsmusters unter Phagentherapie zu erfassen. Diese Untersuchungen wurden mittels eines Multiplex-Immunoassays nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei konnten durch eine Kombination der Funktionsprinzipien von *Sandwich*-ELISA und Durchflusszytometrie verschiedene Zytokine in einer Probe parallel gemessen werden. IL-1 $\beta$  wurde mit einem Einzelkit gemessen.

Dazu wurden auf eine spezielle, geschwärzte 96-Well-Platte zunächst 50 µl der *magnetic beads* gegeben und diese Platte im Anschluss auf einem Platten-Magneten befestigt. Die *beads* wurden danach mit 150 µl einer eigens mitgelieferten Waschpufferlösung dreimal gewaschen.

Eine Mischung aus Standards wurde durch Zugabe von 50 µl eines *sample buffers* rekonstituiert. Für die BAL-Proben wurde PBS mit 0,5 % entfettetem BSA verwendet, für die Plasma-Proben

## MATERIAL UND METHODEN

der mitgelieferte *Universal Assay Buffer*. Die Standards wurden auf ein Gesamt-Volumen von 250 µl aufgefüllt, im Anschluss wurde eine 6-stufige Verdünnungsreihe mit Schritten im Verhältnis 1:4 durchgeführt, um insgesamt 7 Standardverdünnungen zu erhalten.

Danach wurden 50 µl der Standards bzw. der jeweiligen Proben zugegeben und die Platte auf einem Schüttler bei 500 rpm für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurden die *beads* erneut dreimal gewaschen, 25 µl des Detektions-Antikörpers in jedes Well aufgetragen und für weitere 30 Minuten bei 500 rpm inkubiert. Es folgten 3 erneute Waschschrte. Danach wurden 50 µl des Reagenz Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE) zugegeben und für 30 Minuten inkubiert. Nach einem finalen 3-fachen Waschen wurden 120 µl des ebenfalls mitgelieferten *Reading Buffers* zugegeben und die Platte für 5 Minuten inkubiert, im Anschluss wurden die Platten mit einem speziellen Plattenlesegerät und mithilfe der Bioplex Software Version 4.2.2 analysiert.

### 5.3.4.14 Histologische und immunhistochemische Untersuchungen

Zur Erfassung histologischer Veränderungen der Lunge im Rahmen der Phagentherapie wurden eigene Versuchsreihen durchgeführt. Der Ablauf der Infektion sowie der Applikation der Bakteriophagen entsprach dem der zuvor durchgeführten Experimente. Die Präparation entsprach dem beschriebenen Prozedere mit folgenden Änderungen: Auf eine maschinelle Beatmung wurde verzichtet, stattdessen wurde die Trachea sublaryngeal nach finaler Atemaktion ligiert, um einen Kollaps der Atemwege nach Eröffnung des Thorax zu vermeiden. Die Präparation der Lunge erfolgte besonders schonend, um keine Strukturen zu verletzen. Nach Entnahme der Lunge wurde diese zusammen mit dem Herz in Einbettkassetten verbracht und sofort waagrecht in 4 % Formaldehydlösung (gepuffert bei pH 7,0 zur histologischen Anwendung) für 24 bis 48 Stunden fixiert. Darüber hinaus wurde mit Leber, Nieren und Thymus nach Entnahme auf dieselbe Weise verfahren.

Die histopathologische Weiterverarbeitung der Organe erfolgte nach dem histologischen Standardprotokoll am Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin. Dieses Protokoll umfasste die Einbettung in Paraffin und die Anfertigung von Schnitten mit einer Schichtdicke von 2 µm. Diese wurden im Anschluss nach schrittweiser Entwachsung mit Xylen und Rehydratisierung über absteigende Ethanolreihen mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt.

Zusätzliche Untersuchungen der histologischen Lungen-Schnitte erfolgten zur immunhistochemischen Darstellung von Bakterienstrukturen mittels eines spezifischen Antikörpers, welche nach einem etablierten Protokoll durchgeführt wurde. Dazu erfolgte eine Wiederherstellung der durch Formaldehyd quervernetzten Protein-Antigene durch Erhitzen in Zitronensäure (10 mM, pH 6,0) in einer Mikrowelle bei 600 W über 12 Minuten (*antigen retrieval*). Die Schnitte wurden über Nacht bei 4 °C mit einem zur Verfügung gestellten Kaninchen-

## MATERIAL UND METHODEN

Antikörper gegen *A. baumannii* (1:100, zur Verfügung gestellt von José Ramos-Vivas (95)) inkubiert, ein unspezifischer Kaninchen-Antikörper wurde hierbei als Negativkontrolle genutzt. Die Schnitte wurden mit einem Sekundärantikörper gegen Kaninchen-Antikörper (Spezies: Ziege) für 30 Minuten inkubiert, welcher mit alkalischer Phosphatase konjugiert war. Zur Farbdarstellung Antikörper-gebundener *A. baumannii*-Strukturen wurde als Substrat der alkalischen Phosphatase Neufuchsin verwendet, die Gegenfärbung zellulärer Strukturen in diesen Schnitten erfolgte durch Hämatoxylin (1).

Die abschließende pathologische Begutachtung wurde verblindet durch zertifizierte Tierärzt:innen der Tierpathologie der FU Berlin durchgeführt. Die Bewertung erfolgte anhand verschiedener Kriterien anhand eines semiquantitativen Punktesystems und wurde nach publizierten Protokollen durchgeführt (2). Dabei wurden u.a. Ausbreitungsmuster und –grad der Entzündung, betroffener Anteil der Lunge sowie Vorhandensein bestimmter histopathologischer Entzündungsmerkmale, wie Nekrosen, Ödembildung und Pleuritis, beurteilt.

### 5.3.5 Experimente mit humanem Lungengewebe *ex vivo* (96)

#### 5.3.5.1 Aufbereitung des humanen Lungengewebes

Das OP-Resektat wurde mit einem Skalpell in Stücke mit 120 bis 150 mg Gewicht geschnitten und anschließend in frischem Zellkultur-Medium (RPMI) über Nacht bei 37 °C inkubiert, um etwaige Rückstände von Medikamenten (z. B. Steroide, Antibiotika) zu entfernen.

#### 5.3.5.2 Infektion des humanen Lungengewebes mit *A. baumannii*

Die Bakterien wurden wie unter 5.3.3 beschrieben angezüchtet, zur Infektion wurde eine Infektionsdosis von  $1 \times 10^4$  KbE/ml verwendet. Die Lungenstücke wurden in eine 12-Well-Platte mit 2 ml frischem Zellkultur-Medium pro Well umgebettet. Im Anschluss wurden pro Lungenstück 220 µl der Bakterien-Lösung in die Zellkultur-Flüssigkeit pipettiert und durch gleichmäßig kreisende Bewegungen gemischt, um eine Verdünnung 1:10 und damit eine finale Infektionskonzentration von  $1 \times 10^3$  KbE/ml zu erreichen. Anschließend wurden mit einer 1 ml - Spritze mit Kanüle (26 G) 300 µl aufgenommen und an drei verschiedenen Stellen jeweils 100 µl in das Lungengewebe injiziert. Danach wurde das Lungengewebe bei 37 °C inkubiert.

#### 5.3.5.3 Applikation der Phagen-Lösung, Endpunkte und Probenverarbeitung

Nach 30 Minuten wurden jeweils Phagen-Lösung, Lösungsmittel-Kontrolle oder Imipenem (25 mg/ml, aufgelöst in 10 ml steriler Kochsalzlösung) als Positiv-Kontrolle injiziert. Zur Phagen-Behandlung wurde eine neue Lösung mit einem höheren Titer und höherem Endotoxingehalt (circa  $5 \times 10^9$  PFU/ml und 8 000 EU/ml) verwendet. Analog zu den *in vivo* Experimenten wurde

## MATERIAL UND METHODEN

für die Lösungsmittel-Kontrolle die unter 5.2.2 genannte Pufferlösung entsprechend mit 8 000 EU/ml frisch angesetzt und verwendet. Zur Applikation wurden 100 µl der jeweiligen Testsubstanz und zusätzlich 200 µl Medium aus dem jeweiligen Well mit einer Spritze aufgezogen und wie unter 5.3.5.2 beschrieben in das Lungengewebe injiziert. Nach 2, 4 bzw. 6 Stunden weiterer Inkubation wurden die Lungenproben entnommen, homogenisiert und analog zu den *in vivo* Experimenten zur Bestimmung der bakteriellen Last aufbereitet. Zusätzlich wurde der Zellkulturüberstand der jeweiligen Wells zur späteren Analyse von Zytokinen zunächst in flüssigem Stickstoff und anschließend bei -80 °C asserviert.

### 5.3.5.4 Zytokinmessungen von IL1 $\beta$ und IL-8 im humanen Lungengewebe

Die Bestimmung der Konzentrationen von IL-1 $\beta$  und IL-8, welche aus den humanen Lungengewebe-Stücken freigesetzt wurden, erfolgte mittels ELISA nach Herstellerangaben. Die Messung der Proben wurden analog zu dem unter 5.3.4.12 geschildertem Prinzip eines Sandwich ELISAs durchgeführt, wobei nur die Konzentrationen im Zellkulturmedium bestimmt wurden. Anschließend wurden die Gesamtzytokinproduktion pro g Lungengewebe und Mediumvolumen (2,2 ml) berechnet. Die Messung erfolgte ebenfalls in Duplikaten, die Proben wurden dabei im Verhältnis 1:1 000 (nicht infiziert) oder 1:10 000 bzw. 1:50 000 (infiziert) verdünnt.

### 5.3.6 Statistische Datenanalyse

Die erhobenen Daten wurden mit dem Statistik- und Graphikprogramm GraphPad Prism (Version 9.0) ausgewertet.

Die Messwerte von Körpertemperatur, Körpergewicht wurden als Kurvendiagramme mit arithmetischem Mittelwert (*mean*)  $\pm$  Standardabweichung (*standard deviation*, SD) dargestellt.

Die bakterielle Last wurde als Streudiagramme mit Mittelwert (*mean*)  $\pm$  Standardabweichung, alle übrigen Parameter als Boxplots mit Einzelwerten, Median, Quartilen und mit Whiskern vom Minimum bis zum Maximum (Spannweite) angegeben. Zur Analyse der bakteriellen Last im Mausmodell und im Modell der humanen Lunge wurde für sämtliche Werte die Logarithmierung nach der Formel  $y = \log(\text{KbE} + 1)$  vorgenommen, um aufgrund der möglichen Streuung der Messwerte eine annähernde Normalverteilung herzustellen, die anschließende statistische Analyse erfolgte mittels *Student's t-test*. Die statistischen Analysen von Körpertemperatur und -gewicht, des klinischen Scores, der Permeabilität, der Zellpopulationen sowie der Zytokinkonzentrationen der tierexperimentellen Daten erfolgten mittels zweifacher Varianzanalyse (*Two way analysis of variance*, ANOVA) mit anschließender *post-hoc* Analyse mittels *Tukey's Multiple Comparison Test* für Mehrfachvergleiche bzw. im Rahmen der Etablierung für die bakterielle Last mittels Two way ANOVA und *Šídák's multiple comparisons test* zur *post-hoc* Analyse. Daten zu Zytokinen im Modell der humanen Lunge wurden mittels

## MATERIAL UND METHODEN

*Mann-Whitney u-test* verglichen. Für sämtliche Zytokin-Analysen mittels ELISA oder Multiplex-Assay wurden Werte der Proben, die unterhalb der Assay-Nachweisgrenze lagen, mit der Formel  $x = \text{lower limit of detection (LOD)} / \sqrt{2}$  berechnet (97).

Ein  $p$ -Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant angenommen.

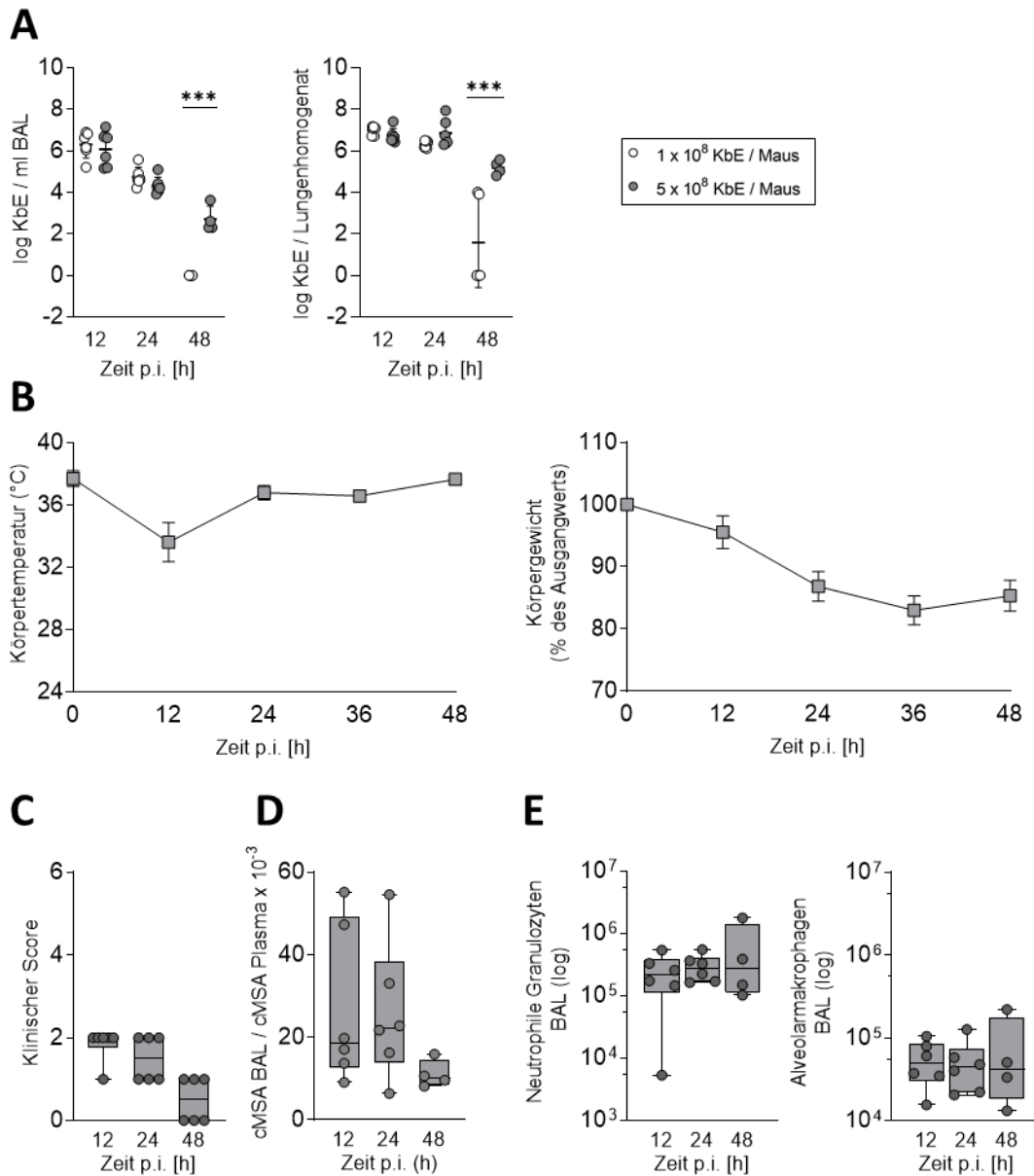
## 6 ERGEBNISSE

### 6.1 Die Infektion mit $5 \times 10^8$ KbE *A. baumannii* RUH 2037 resultierte in einer klinisch apparenten Infektion der Lunge im Mausmodell

Für die therapeutischen Experimente mit Phagen wurde zunächst ein in der Literatur beschriebenes Infektionsmodell mit *A. baumannii* mit Modifikationen etabliert (86), wobei zwei verschiedene Infektionsdosierungen ( $1 \times 10^8$  und  $5 \times 10^8$  KbE/Maus) getestet wurden. Die bakterielle Last wurde als Hauptkriterium zur Beurteilung der Erregermanifestation in BAL und Lungengewebe gewählt (Abbildung 8A). In der BAL war die Bakterienzahl insgesamt niedriger und zum 48 Stunden-Zeitpunkt nur noch vereinzelt Bakterien nachweisbar, zwischen beiden Dosierungen jedoch vergleichbar hoch. Im Lungengewebe zeigte sich hingegen über den Beobachtungszeitraum eine insgesamt um circa zwei Logstufen höhere Zahl nachweisbarer Bakterien mit einer maximalen Ausprägung zwischen 12 und 24 Stunden und einer beginnenden Reduktion nach 48 Stunden. Die höhere Dosierung ergab hier bis 48 Stunden *post infectionem* eine ausreichend hohe Bakterienlast im Lungengewebe, die geeignet war für nachfolgende Therapieversuche. Alle nachfolgenden *in vivo* Experimente wurden demnach mit der Infektionsdosis von  $\sim 5 \times 10^8$  KbE / Maus durchgeführt.

Die intranasale Infektion mit dieser Dosis führte zur Ausbildung einer insgesamt milden und selbstlimitierenden Lungeninfektion. Zur Beurteilung des klinischen Verlaufes wurden Körpertemperatur und Körpergewicht zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten gemessen sowie ein klinisches Punktesystem (*Score*) vergeben. Nach 12 Stunden zeigten sich bei allen Tieren sichtbare Krankheitszeichen mit transienter Hypothermie, Gewichtsverlust (Abbildung 8B) und erhöhtem klinischen *Score*, welche zu späteren Zeitpunkten geringer waren (Abbildung 8C). Im Rahmen der Infektion kam es des Weiteren zu einer Störung der alveolokapillären Barriere, erkennbar am erhöhten Permeabilitätsindex (Abbildung 8D), begleitet von einer Immunzellrekrutierung in den Alveolarraum (Abbildung 8E).

## ERGEBNISSE



**Abbildung 8. Etablierung eines murinen *A. baumannii* Infektionsmodells.** Mäuse wurden mit *A. baumannii* RUH-2037 transnasal infiziert und nach 12, 24 und 48 h analysiert. Bakterielle Last im Rahmen der Etablierung in bronchoalveolärer Lavage (BAL) und im Homogenat der halben, lavagierten und entbluteten Lunge nach Infektion mit 1 x 10<sup>8</sup> bzw. 5 x 10<sup>8</sup> KbE/Maus im direkten Vergleich (A). Rektale Körpertemperatur und Körpergewicht (B), sowie klinische Krankheitszeichen dargestellt nach Punktesystem (Klinischer Score, C), Permeabilitätsindex als Verhältnis von alveolärer Konzentration von MSA zu plasmatischer Konzentration (D) und absolute Zellzahlen von neutrophilen Granulozyten und Alveolarmakrophagen der BAL in Tieren infiziert mit 5 x 10<sup>8</sup> KbE/Maus (E). Werte dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung für bakterielle Last, Temperatur und Gewicht. KbE dargestellt nach Transformation und Logarithmierung ( $y = \log(KbE + 1)$ ) und getestet mittels 2-Way-ANOVA und Šidák's multiple comparisons test. Klinischer Score, Permeabilität und Zellzahlen dargestellt als Boxplots mit Einzelwerten, Median, Quartilen und mit Whiskern von Minimum bis Maximum (Spannweite). \* stellt signifikante Unterschiede dar mit \*\*\*  $p < 0,001$ .  $n = 4-6$ , KbE = Koloniebildende Einheiten, p.i. = post infectionem, MSA = murines Serumalbumin, BAL = Bronchoalveoläre Lavage.



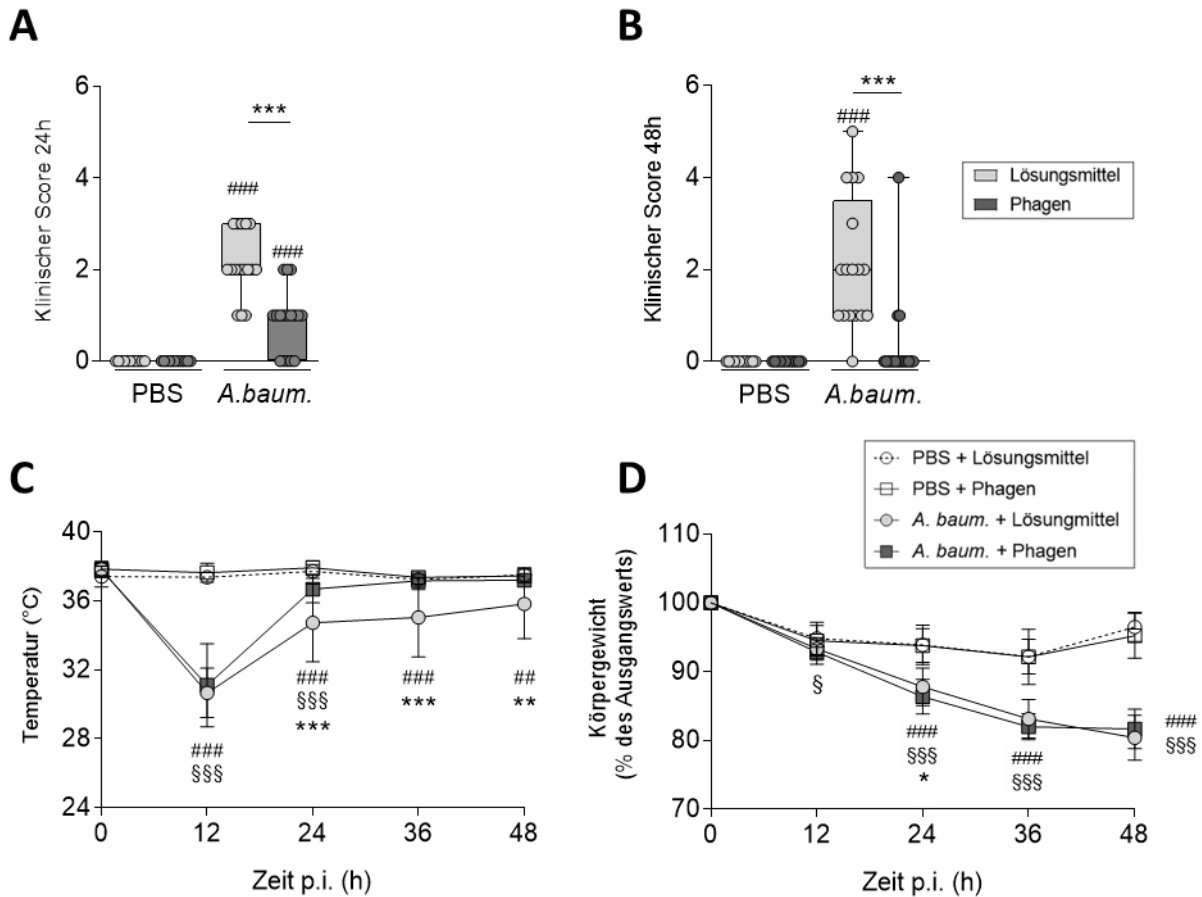
### 6.2 Die Applikation des Phagen *vB\_AbaM\_Acibel004* führte zu einer Besserung des klinischen Verlaufes der *A. baumannii* Infektion

Die einmalige, intratracheale Applikation des Phagen *vB\_AbaM\_Acibel004* bewirkte eine Verbesserung des Krankheitsverlaufes der infizierten Tiere.

Nach Phagen-Applikation wiesen die Tiere der infizierten Kohorte zu beiden Versuchsendpunkten einen niedrigeren klinischen *Score*-Wert auf als die mit Lösungsmittel behandelten Tiere, wobei die Phagen-behandelten Tiere nach 24 Stunden noch Krankheitsanzeichen zeigten (Abbildung 9A). Nach 48 Stunden wiesen nur noch vereinzelte Tiere aus dieser Gruppe einen erhöhten *Score*-Wert auf (Abbildung 9B). Die scheininfizierten Tiere zeigten zu keinem der beiden Untersuchungszeitpunkte einen veränderten klinischen *Score* (Abbildung 9A, B). 12 Stunden nach Infektion mit *A. baumannii* kam es bei allen Tieren zu einem Abfall der Körpertemperatur, zwischen den infizierten Gruppen bestand kein Unterschied (Abbildung 9C). 24 Stunden *post infectionem* (12 Stunden nach Applikation des Phagen bzw. des Lösungsmittels) kam es bei der Phagen-therapierten Gruppe zu einer schnelleren Normalisierung der Körpertemperatur, dieser Unterschied bestand auch 48 Stunden *post infectionem*. Bei den scheininfizierten Mäusen wurde in keiner der beiden Behandlungsgruppen eine Abnahme der Körpertemperatur festgestellt.

Darüber hinaus kam es im Verlauf der Infektion mit *A. baumannii* bei allen Tieren zu einer Abnahme des Körpergewichts, welches bis zum Ende des Experiments kontinuierlich auf circa 80 % des Ausgangsgewichts gesunken war (Abbildung 9D). Nach 24 Stunden zeigte die Phagengruppe hierbei einen geringgradig höheren Gewichtsverlust als die Lösungsmittelgruppe, zu den übrigen Zeitpunkten bestand zwischen den beiden Behandlungsgruppen kein Unterschied mehr. Die scheininfizierten Tiere verloren ebenfalls Gewicht, allerdings in geringerem Ausmaß und ohne Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen. Gegen Ende des Experiments nahm das Gewicht der scheininfizierten Kohorte bereits wieder zu.

## ERGEBNISSE



**Abbildung 9. Klinischer Verlauf der *A. baumannii*-Lungeninfektion nach Phagentherapie.** Mäuse wurden transnasal mit  $5 \times 10^8$  KbE *A. baumannii* RUH 2037 infiziert und erhielten 12 h p.i. eine einmalige intratracheale Applikation des Phagen vB\_AbaM\_Acibel004 (25  $\mu$ l mit ca.  $1,25 \times 10^5$  PFU/Maus). Klinische Krankheitszeichen sind dargestellt nach Punktesystem (klinischer Score) 24 (A) und 48 Stunden p.i. (B), rektale Körpertemperatur (C) und Körpergewicht (D). Körpertemperatur und -gewichtskurven aller Tiere, die zu den Untersuchungszeitpunkten 24 Stunden ( $n = 11-12$  für scheininfizierte Gruppen,  $n = 16-17$  für *A. baumannii*-infizierte Gruppen) und 48 Stunden *post infectionem* ( $n = 12$  für scheininfizierte Gruppen,  $n = 17$  für *A. baumannii*-infizierte Gruppen) analysiert wurden, sind gemeinsam dargestellt, es wurden separate Gruppen für die Histopathologie durchgeführt. Die Abbildungen zum klinischen Score beinhalten 3 Tiere, die aufgrund humaner Endpunkte euthanasiert wurden. Werte sind dargestellt als Boxplots mit Einzelwerten, Median, Quartilen und mit Whiskern von Minimum bis Maximum (Spannweite) für klinischen Score oder als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung für Körpertemperatur und -gewicht. Daten wurden getestet mittels 2-Way-ANOVA und *Tukey's multiple comparisons test*. #/\*/§ stellt signifikante Unterschiede dar, # Vergleich PBS + Lösungsmittel vs. *A. baumannii* + Lösungsmittel, \* *A. baumannii* + Lösungsmittel vs. *A. baumannii* + Phagen und (nur für Temperatur und Gewicht) § Vergleich PBS + Phagen vs. *A. baumannii* + Phagen. \*/§  $P < 0,05$ , ##/§§/\*\*  $p < 0,01$ , ###/§§§/\*\*\*  $p < 0,001$ . KbE = Koloniebildende Einheit, p.i. = post infectionem, PFU = plaque-forming units (Plaquetbildende Einheiten) (1).

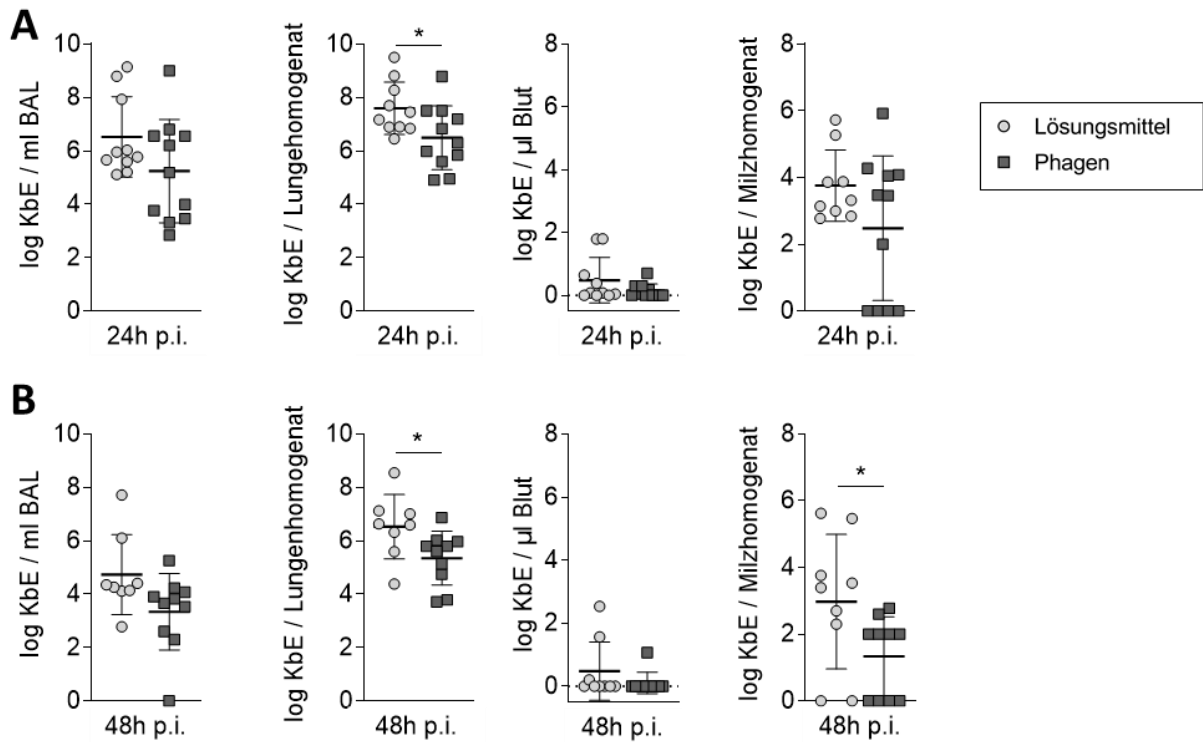
## ERGEBNISSE

### 6.3 Die einmalige intratracheale Applikation von *vB\_AbaM\_Acibel004* bewirkte eine Reduktion der pulmonalen bakteriellen Last von *A. baumannii*

Im Verlauf der *A. baumannii*-Infektion konnten in beiden Behandlungsgruppen, sowohl 24 Stunden p.i. (entsprechend 12 Stunden nach Therapie, Abbildung 10A) als auch 48 Stunden p.i. (Abbildung 10B) in der BAL Erreger nachgewiesen werden, wobei in der Phagen-behandelten Gruppe eine tendenziell geringere Bakterienlast beobachtet werden konnte. Im Lungengewebe hingegen zeigte sich sowohl 24 als auch 48 Stunden p.i. in der Phagen-Gruppe eine signifikant reduzierte bakterielle Last.

Neben der lokalen Erregermanifestation wurde der Erreger auch in der Zirkulation nachgewiesen. So zeigte sich bei insgesamt 15 von 40 untersuchten infizierten Tieren eine geringgradige Bakteriämie, wobei zwischen den beiden Behandlungsgruppen kein Unterschied detektiert wurde. Ein weiterer Indikator für die Beurteilung eines Verlaufes mit Bakteriämie ist der Nachweis von Bakterien in der Milz. *A. Baumannii* konnte zu beiden Untersuchungszeitpunkten in homogenisiertem Milzgewebe nachgewiesen werden, wobei sich 48 Stunden nach Infektion eine reduzierte Erregerlast im Vergleich zum 24-Stundenzeitpunkt zeigte. Die Phagen-therapierte Gruppe wies 48 Stunden p.i. eine signifikant geringere Bakterienlast auf.

## ERGEBNISSE



**Abbildung 10. Bakterielle Last von *A. baumannii* nach einmaliger intratrachealer Phagenapplikation.** Einzelkolonien von *A. baumannii* quantifiziert in BAL, homogenisiertem Lungengewebe, Blut und homogenisiertem Milzgewebe nach Inkubation auf Blutagar. KbE dargestellt als Einzelwerte mit Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung nach Transformation und Logarithmierung ( $y=\log(\text{KbE}+1)$ ) und getestet mittels *Student's t-test*.  $n = 9-11$  (24 h p.i.);  $n = 8-10$  (48 h p.i.) pro Gruppe,  $*p<0,05$ . KbE = Koloniebildende Einheit, BAL = Bronchoalveoläre Lavage (1).

## ERGEBNISSE

6.4 Die einmalige intratracheale Applikation von vB\_AbaM\_Acibel004 führte zu einer geringeren Ausbreitung der Entzündung in die Lungenperipherie und einer reduzierten immunhistochemischen Detektion von *A. baumannii* mittels Histopathologie

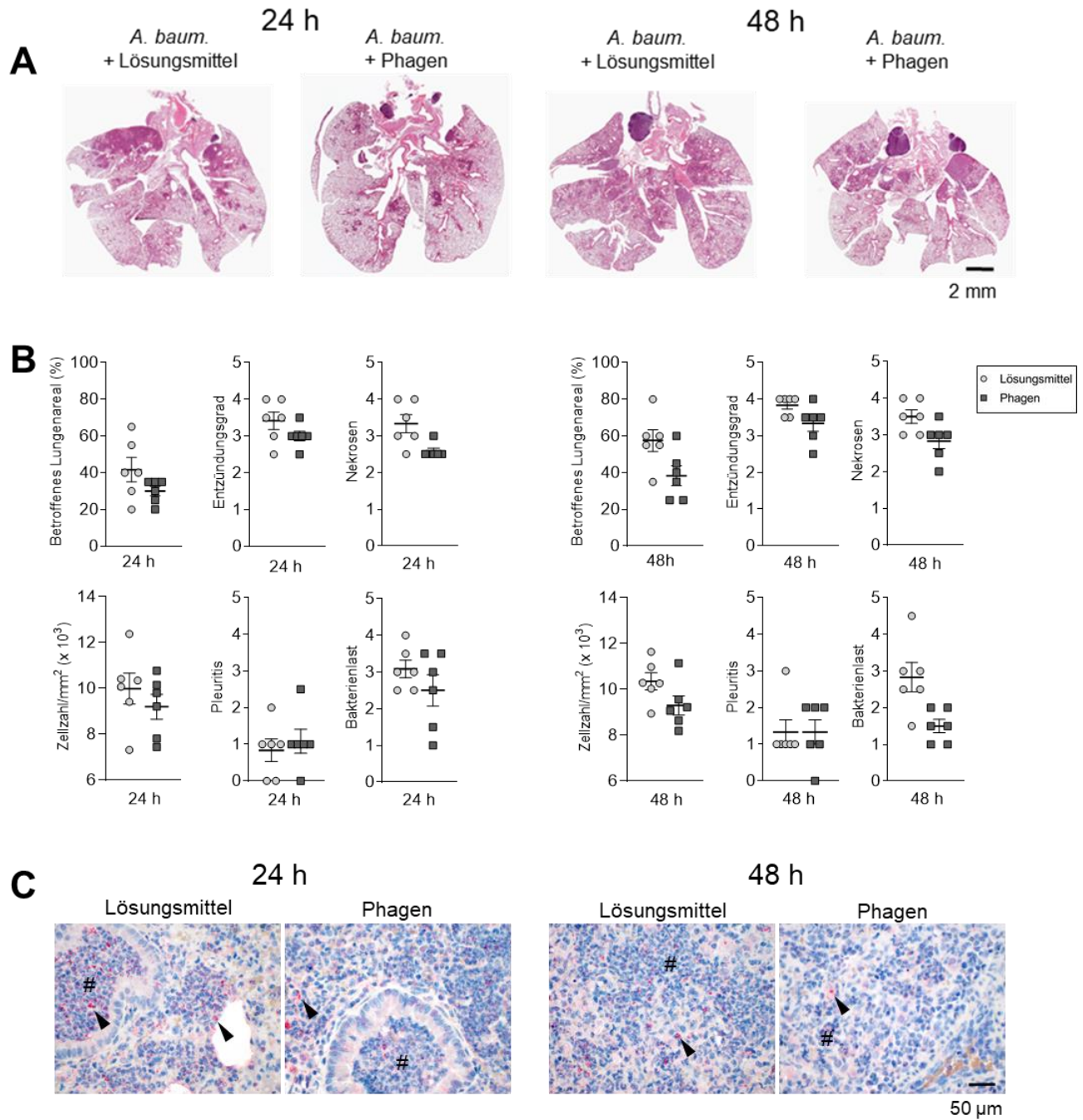
Es wurden histopathologische Untersuchungen der entnommenen Organe durchgeführt, welche in Formaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet und im Anschluss mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt wurden. Die Auswertung im Rahmen dieser Arbeit konzentrierte sich auf Veränderungen in der Lunge (Abbildung 11A). Zusätzlich erfolgte zur histologischen Darstellung der bakteriellen Last die immunhistochemische Anfärbung von Bakterienstrukturen unter Verwendung eines gegen *A. baumannii* spezifischen Antikörpers in separaten Lungenschnitten. Die Beurteilung erfolgte verblindet durch Fachtierärzt:innen für Pathologie aus dem Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin mittels Vergabe semiquantitativer Scores (Abbildung 11B).

Die Infektion mit *A. baumannii* RUH 2037 führte, wie bereits im Rahmen der Etablierung festgestellt und teilveröffentlicht (2), in allen infizierten Gruppen zur Ausbildung einer mittel- bis hochgradig ausgeprägten Bronchopneumonie (Abbildung 11A, B). Das Ausbreitungsmuster folgte von hilär den großen pulmonalen Leitungsbahnen (Bronchien und Pulmonalarterien) mit Ausbildung von Gewebnekrosen und begleitender Pleuritis. Nach 24 Stunden war die Ausbreitung der Läsion in der Phagengruppe insgesamt geringer, auch die Intensität der Entzündung war weniger stark ausgeprägt als nach Lösungsmittel-Applikation. In den betroffenen Arealen der Phagengruppe war die mikroskopisch gezählte Zellzahl geringgradig reduziert, die begleitende Pleuritis war jedoch stärker ausgeprägt. Nach 48 Stunden wiesen die Tiere mit Phagen-Applikation ebenfalls eine geringere Ausbreitung der betroffenen Areale in die Peripherie, geringere Ausprägung der Entzündung insgesamt und eine verringerte Zellzahl auf. Ein Tier der infizierten Kohorte wies trotz Phagen-Applikation eine hochgradige Ausbreitung der Entzündung in die Peripherie auf.

In den Lungenschnitten der Tiere nach Lösungsmittel-Applikation waren hierbei zu beiden Zeitpunkten immunhistochemisch mehr Bakterienstrukturen erkennbar als nach der einmaligen Applikation der Phagen (Abbildung 11C).

Nebenbefundlich wurden in den übrigen Organen aller Gruppen unspezifische Veränderungen in Milz (erhöhte Apoptoserate) und Leber festgestellt, wobei in den infizierten und mit Phagen behandelten Tieren häufiger Nekrosen dokumentiert wurden. Diese Veränderungen wurden am ehesten im Rahmen einer Hintergrundinfektion mit *Helicobacter* spp. gewertet.

## ERGEBNISSE

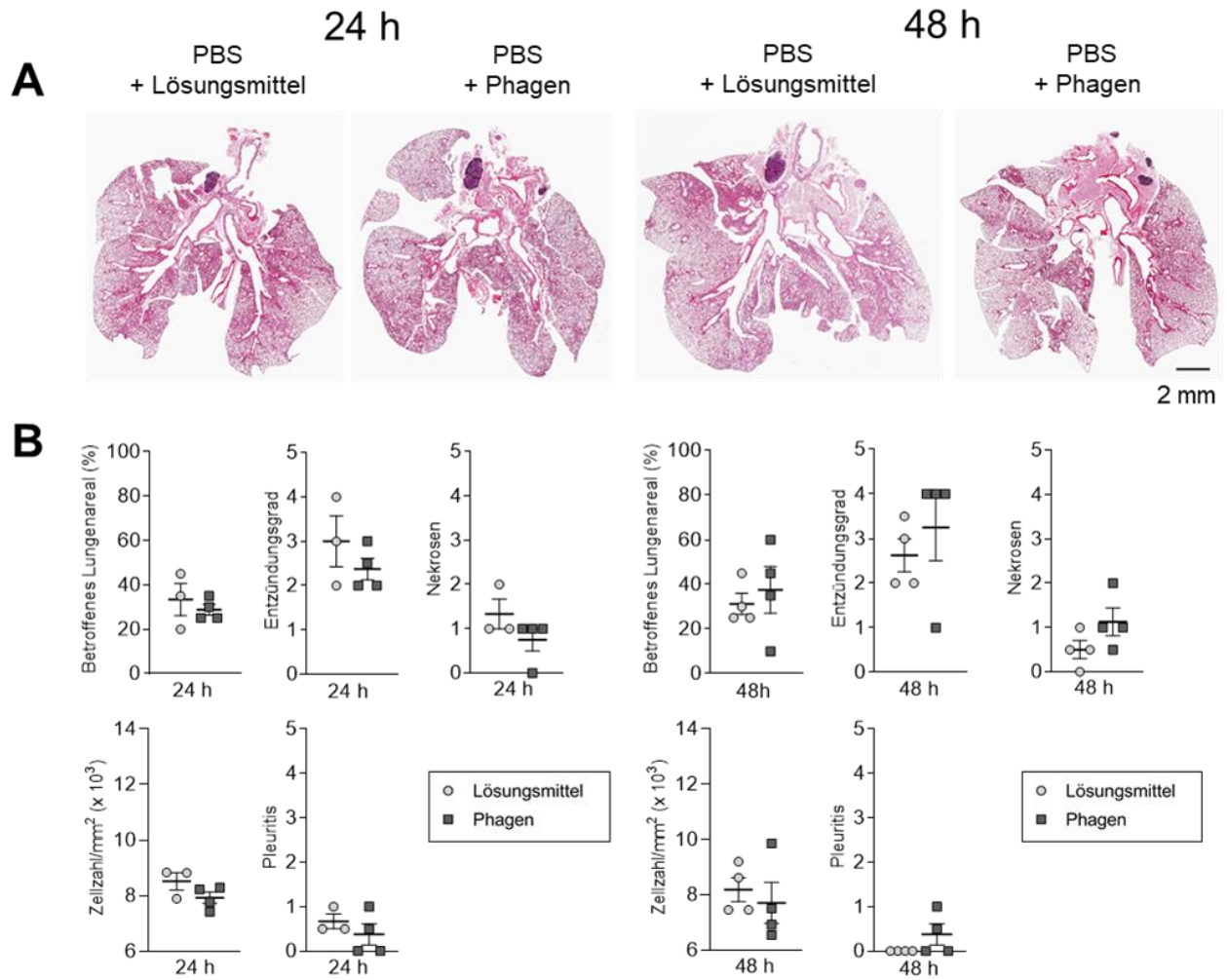


**Abbildung 11. Lungenhistopathologie der murinen *A. baumannii* Pneumonie nach Applikation von Lösungsmittel oder Phage.** Repräsentative Übersichtsschnittbilder von Formaldehyd-fixierten, in Paraffin eingebetteten und mit Hämatoxylin-Eosin angefärbten Lungen nach 24 h bzw. 48 h *post infectionem* (A). Zellzahl/mm<sup>2</sup>, entzündete Fläche/Gesamtfläche der Lunge (%), sowie semiquantitativer Score zur Beurteilung verschiedener histopathologischer Kriterien (0=nicht vorhanden, 1=minimal, 2=geringgradig, 3=mittelgradig, 4-5=hochgradig). Werte sind dargestellt als Einzelwerte mit Mittelwert ± Standardabweichung (B). Detailaufnahmen der Immunhistochemiefärbung von *A. baumannii* zur Visualisierung von Bakterienstrukturen, angefärbt mittels Neufuchsin, Gewebe gegengefärbt mit Hämatoxylin (C). # bezeichnen Akkumulationen neutrophiler Granulozyten, Pfeile weisen auf angefärbte Bakterienstrukturen von *A. baumannii*, n = 6 (1).

## ERGEBNISSE

Der pathologische Befund in der scheininfizierten Kohorte ergab das Bild einer meist geringgradig bis teils hochgradig ausgeprägten interstitiellen Pneumonie (Abbildung 12). Das Schädigungsmuster der betroffenen Areale zeigte ebenfalls eine Ausbreitung von hilär an den großen pulmonalen Leitungsbahnen entlang in die Peripherie. Das vorherrschende Zellbild war dominiert von Makrophagen, daneben waren neutrophilen Granulozyten und Zellnekrosen erkennbar. Dieses Bild entsprach dem zu erwartenden Befund nach Flüssigkeitsapplikation in die Lungen, ein Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen war zu keinem der beiden Analysezeitpunkte erkennbar.

## ERGEBNISSE



**Abbildung 12. Lungenhistopathologie der Scheininfektion mit PBS nach Applikation von Lösungsmittel oder Phagen.** Repräsentative Übersichtsschnittbilder von Formaldehyd-fixierten, in Paraffin eingebetteten und mit Hämatoxylin-Eosin angefärbten Lungen nach 24 h bzw. 48 h *post infectionem* (A). Zellzahl/mm<sup>2</sup>, entzündete Fläche/Gesamtfläche der Lunge (%), sowie semiquantitativer Score zur Beurteilung verschiedener histopathologischer Kriterien (0=nicht vorhanden, 1=minimal, 2=geringgradig, 3=mittelgradig, 4-5=hochgradig) Werte sind dargestellt als Einzelwerte mit Mittelwert ± Standardabweichung (B), n = 3-4 (1).

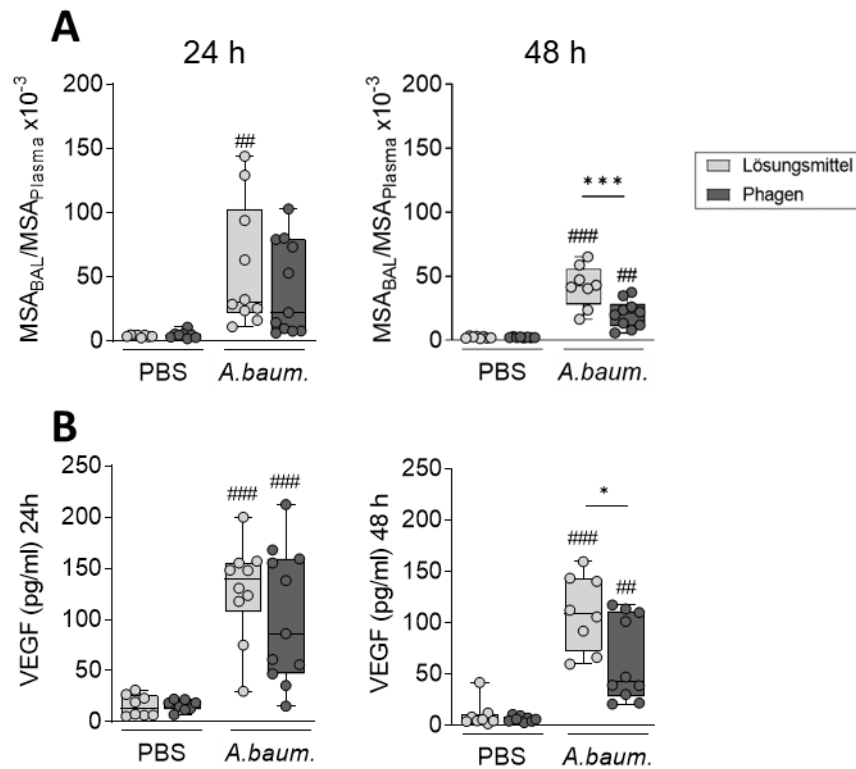


6.5 Die einmalige intratracheale Applikation von *vB\_AbaM\_Acibel004* war mit einer geringeren alveolokapillären Permeabilität im Rahmen der Infektion mit *A. baumannii* assoziiert

Als Maß einer erhöhten Permeabilität zwischen dem kapillären und dem alveolaren Kompartiment der Lunge im Rahmen der Infektion mit *A. baumannii* und der Phagentherapie wurden die Konzentrationen murinen Serumalbumins (MSA) in der BAL und im Plasma gemessen und das Verhältnis gebildet. Zusätzlich wurde die Konzentration des vaskulär endothelialen Wachstumsfaktors (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) in der BAL bestimmt, dessen gesteigerte lokale Produktion ebenfalls mit einer Störung der alveolokapillären Barrierefunktion korreliert (46, 84).

Bei den infizierten Tieren kam es im Vergleich zu den scheininfizierten Tieren zu beiden Zeitpunkten zu einem signifikanten Anstieg der alveolokapillären Permeabilität, wobei die Permeabilität nach 48 Stunden wieder geringer ausgeprägt war (Abbildung 13A). In den mit Phagen behandelten, infizierten Tieren war die Permeabilität insgesamt niedriger als in der Lösungsmittel-Gruppe. Vierundzwanzig Stunden *post infectionem* war dieser Unterschied im Trend erkennbar, nach 48 Stunden erreichte dieser Unterschied statistische Signifikanz. Übereinstimmend damit war die Konzentration von VEGF in der BAL der infizierten Versuchstiere erhöht (Abbildung 13B). Auch hier zeigte sich 24 Stunden *post infectionem* bereits eine im Trend geringere Sekretion in der Phagen-Gruppe, die nach 48 Stunden statistisch signifikant war. Bei den scheininfizierten Tieren kam es weder beim alveolären Permeabilitätsindex noch bei der Konzentration von VEGF im alveolären Kompartiment zu einem Anstieg, zwischen den beiden Behandlungsgruppen bestand zu beiden Untersuchungszeitpunkten kein Unterschied.

## ERGEBNISSE



**Abbildung 13. Permeabilitätsindex murinen Serumalbumins (MSA) und Konzentration von VEGF in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BAL).** Dargestellt sind der Permeabilitätsindex als Verhältnis von alveolärer Konzentration von MSA zu plasmatischer Konzentration 24 h und 48 h *post infectionem* (A) und Konzentration von VEGF in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit 24 und 48h *post infectionem* (B). Werte sind dargestellt als Boxplots mit Einzelwerten, Median, Quartilen und mit Whiskern von Minimum bis Maximum (Spannweite) und getestet mittels 2-Way-ANOVA und *Tukey's multiple comparisons test*. n = 8 für scheininfizierte Gruppen bzw. n = 8-11 für *A. baumannii*-infizierte Gruppen # Vergleich PBS + Lösungsmittel vs. *A. baumannii* + Lösungsmittel, # vs. Entsprechend behandelte PBS-Gruppe \* wie angegeben, \*  $P < 0,05$ , ##  $P < 0,01$ , ###/\*\*\*  $P < 0,001$  (1).

## ERGEBNISSE

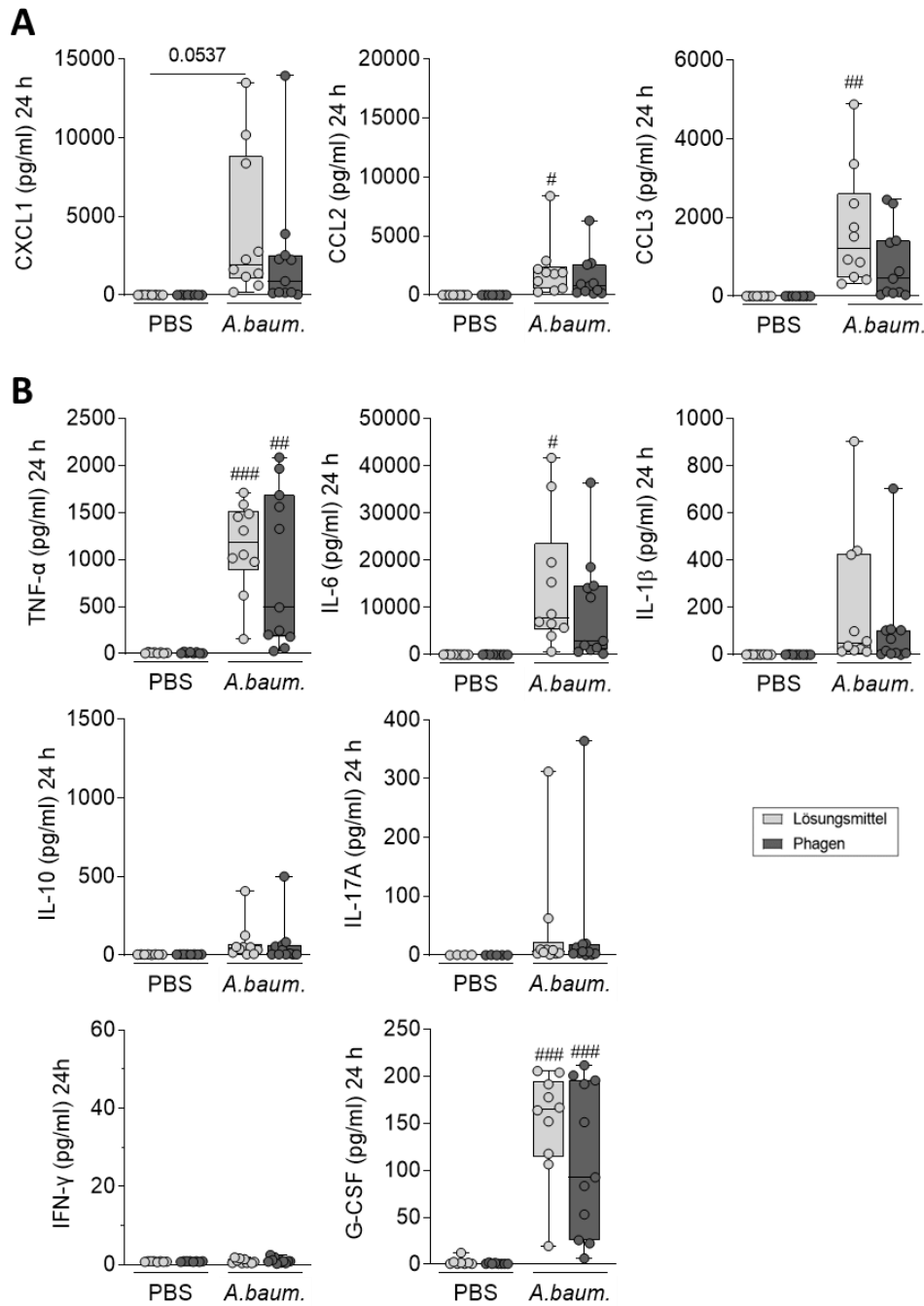
### 6.6 Die einmalige intratracheale Applikation von *vB\_AbaM\_Acibel004* führte zu einer verringerten Sekretion von CCL2 in BAL und G-CSF BAL und Plasma

Mittels Multiplex-ELISA wurden die Konzentrationen verschiedener Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren in BAL und Plasma bestimmt (Abbildungen 14-17). Im Rahmen der Infektion mit *A. baumannii* kam es in beiden Behandlungsgruppen zu lokal erhöht messbaren Konzentrationen verschiedener proinflammatorischer Mediatoren in der BAL innerhalb von 24 Stunden (Abbildung 14).

Die Konzentrationen der gemessenen Chemokine CXCL1, CCL2 und CCL3 waren im Vergleich mit den scheininfizierten Tieren erhöht, wobei diese Erhöhung bei CXCL1 nicht signifikant war (Abbildung 14A). Die Werte der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-6 zeigten ebenfalls eine signifikante Erhöhung im Vergleich mit den scheininfizierten Kontrolltieren, wobei die Konzentration des frühinflammatorischen Zytokin IL-1 $\beta$  nicht statistisch signifikant erhöht war. Die Konzentrationen des proinflammatorischen Zytokins IL-17A und des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 sowie von Interferon- $\gamma$  waren knapp über der Nachweisgrenze messbar, diese Erhöhungen waren im Vergleich zur Scheininfektion nicht signifikant. Im Rahmen der Infektion kam es ebenfalls zu einer lokal erhöhten Sekretion des Wachstumsfaktors G-CSF (Abbildung 14B). Sämtliche Mediatoren waren in den scheininfizierten Tieren nur knapp über der Nachweisgrenze messbar.

Für alle gemessenen Mediatoren konnte zum Zeitpunkt 24 Stunden p.i. kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen festgestellt werden, weder in der infizierten noch in der scheininfizierten Kohorte.

## ERGEBNISSE



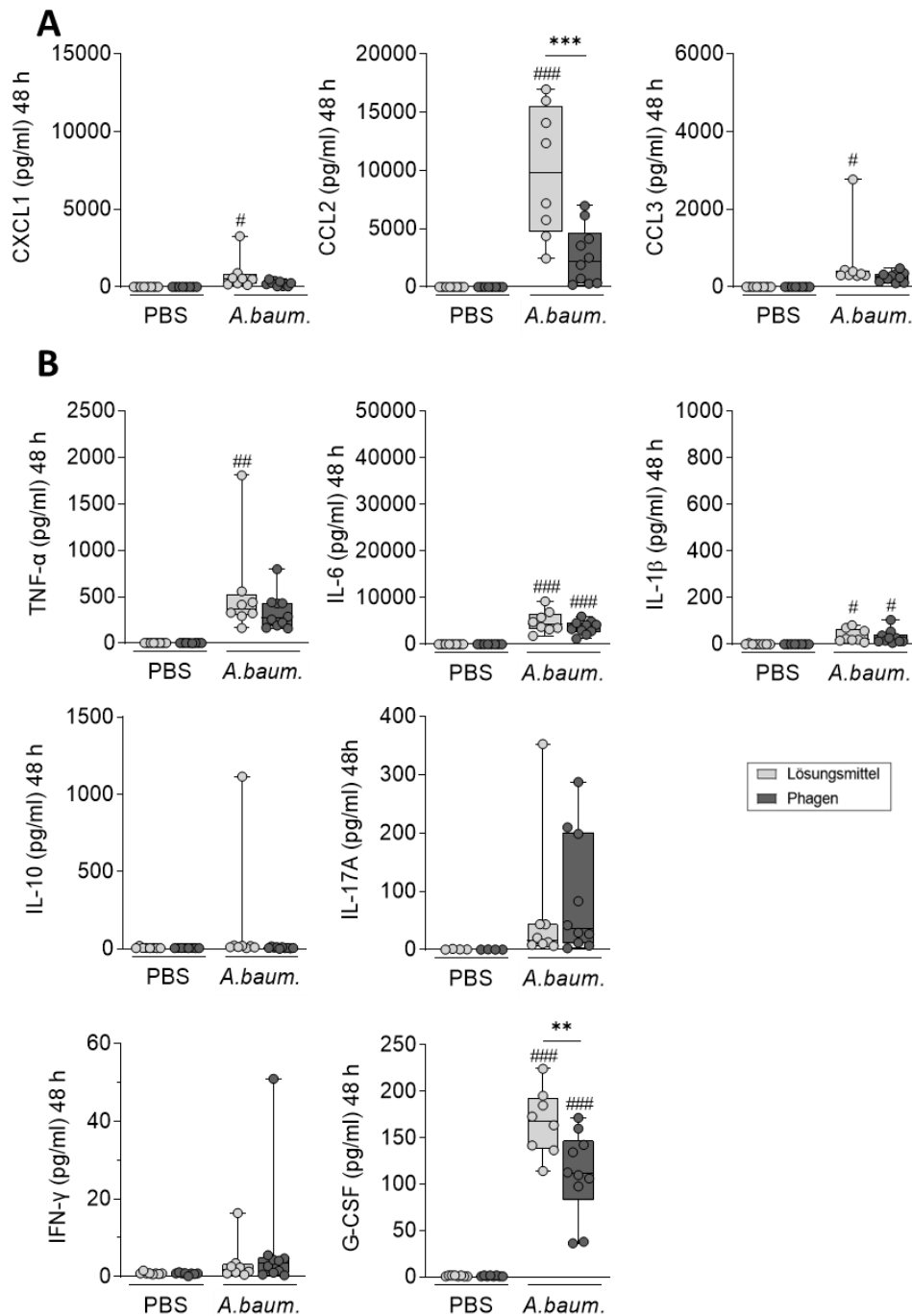
**Abbildung 14. Konzentrationen proinflammatorischer Mediatoren in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit in der murinen *A. baumannii* Pneumonie nach Applikation von Lösungsmittel oder Phage, 24 h post infectionem.**

Gemessen wurden verschiedene Chemokine (A), verschiedene Zytokine Interferon- $\gamma$  und Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor G-CSF (B) mittels Multiplex-ELISA. Werte sind dargestellt als Boxplots mit Einzelwerten, Median, Quartilen und mit Whiskern von Minimum bis Maximum (Spannweite) und getestet mittels 2-Way-ANOVA und Tukey's multiple comparisons test.  $n = 8$  für scheininfizierte Kontrollen (bzw.  $n = 4-5$  für IL-17A),  $n = 10-11$  für *A. baumannii*-infizierte Gruppen, # Unterschied zwischen *A. baumannii*-infizierter Gruppe vs. korrespondierende scheininfizierte Kontrolle. # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$  (1).

## ERGEBNISSE

Nach 48 Stunden zeigten sich für die meisten Mediatoren insgesamt geringere Konzentrationen, wobei die Sekretion mit Ausnahme von IL-10, IL-17A und IFN- $\gamma$  im Vergleich zu den scheininfizierten Tieren weiterhin signifikant erhöht war (Abbildung 15). Beim Chemokin CCL2 hingegen kam es zu einer erhöhten Sekretion nach 48 Stunden, wobei die Konzentration in der mit Lösungsmittel behandelten Gruppe signifikant höher war als die Konzentration in der Phagengruppe (Abbildung 15A). Für den Wachstumsfaktor G-CSF konnte eine im Vergleich mit den 24-Stunden-Werten weitgehend konstante Konzentration gemessen werden, wobei die Sekretion bei den Phagentieren geringer war (Abbildung 15B). In der scheininfizierten Kohorte waren auch zum 48-Stunden-Zeitpunkt für alle untersuchten Mediatoren keine erhöhten Konzentrationen messbar, sie lagen um die Nachweisgrenze der Assays. Mit Ausnahme der beiden erwähnten Mediatoren CCL2 und G-CSF konnten keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen festgestellt werden.

## ERGEBNISSE



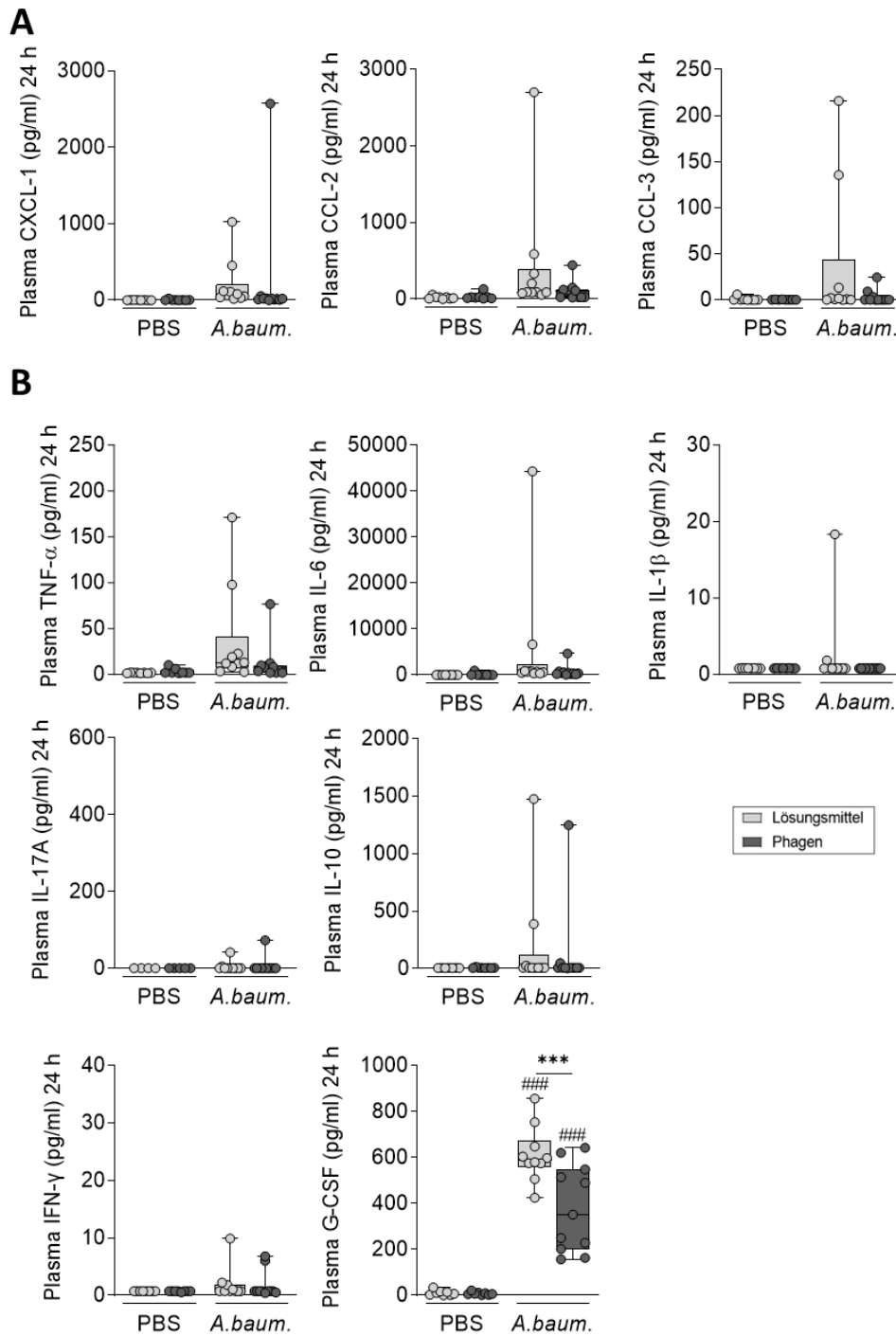
**Abbildung 15. Konzentrationen proinflammatorischer Mediatoren in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit in der murinen *A. baumannii* Pneumonie nach Applikation von Lösungsmittel oder Phage, 48 post infectionem.** Gemessen wurden verschiedene Chemokine (A), proinflammatorischer verschiedene Zytokine Interferon- $\gamma$  und Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor G-CSF (B) mittels Multiplex-ELISA. Werte sind dargestellt als Boxplots mit Einzelwerten, Median, Quartilen und mit Whiskern von Minimum bis Maximum (Spannweite) und getestet mittels 2-Way-ANOVA und *Tukey's multiple comparisons test*.  $n = 8$  für scheininfizierte Kontrollen (bzw.  $n = 4$  für IL-17A),  $n = 8-10$  für *A. baumannii*-infizierte Gruppen, # Unterschied zwischen *A. baumannii*-infizierter Gruppe vs. korrespondierende scheininfizierte Kontrolle und \* Unterschied zwischen *A. baumannii* + Lösungsmittel vs. *A. baumannii* + Phage. # $P < 0,05$ , ### $P < 0,01$ , ###\* $P < 0,001$  (1).

## ERGEBNISSE

Im Blutplasma waren die beschriebenen Mediatoren mit Ausnahme von G-CSF in geringeren Konzentrationen messbar als in der BAL.

Nach 24 Stunden waren die Werte nur vereinzelt in der infizierten Kohorte erhöht, die Werte der scheininfizierten Kohorte befanden sich im Bereich der Nachweisgrenze (Abbildung 16). Lediglich bei G-CSF kam es im Rahmen der Infektion zu einem signifikanten systemischen Anstieg der Plasmakonzentration, wobei der Anstieg in der Phagenkohorte signifikant geringer war. Für die übrigen Mediatoren bestand zwischen den beiden Behandlungsgruppen kein Unterschied.

## ERGEBNISSE



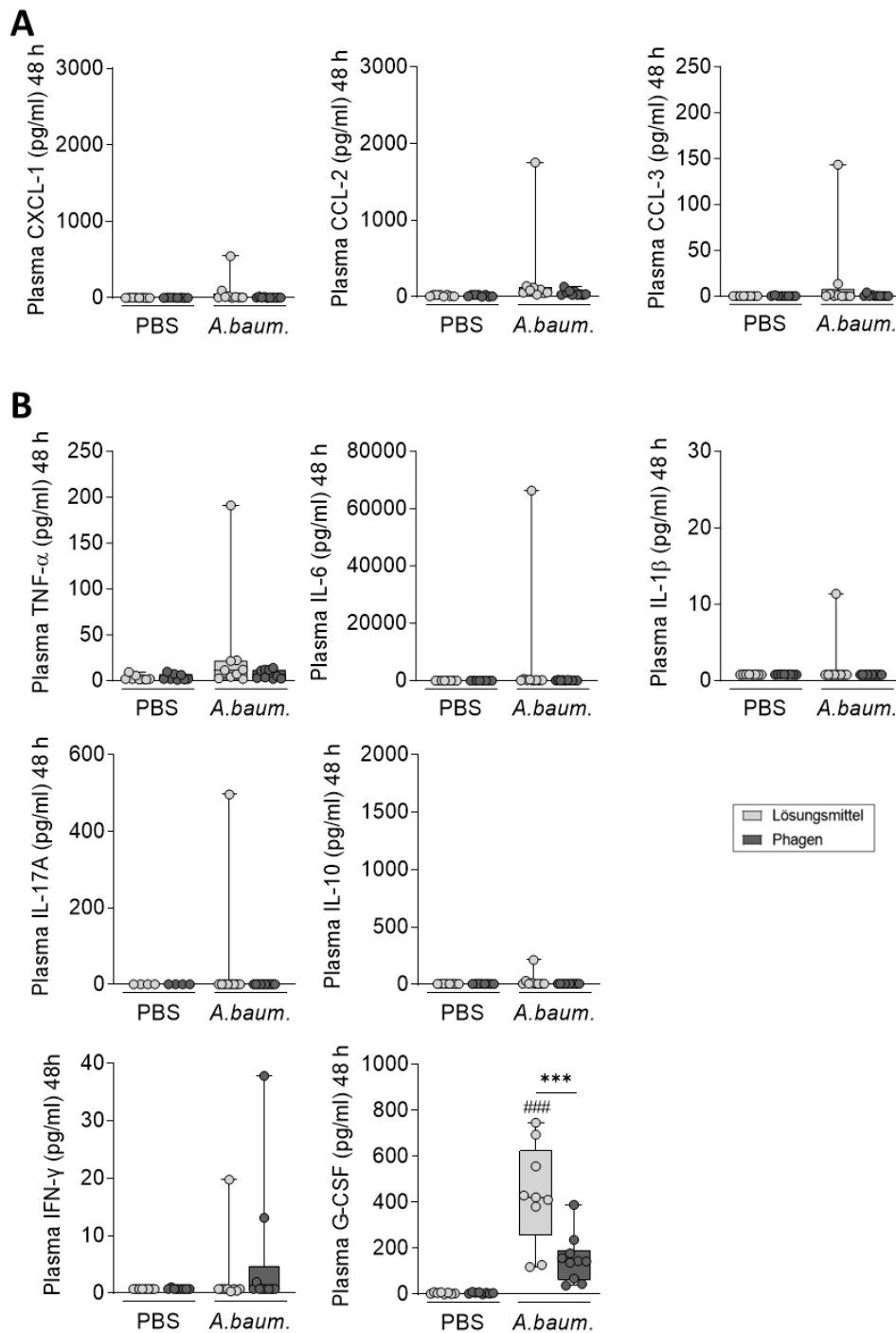
**Abbildung 16. Verschiedene proinflammatorische Mediatoren gemessen in Blutplasma in der murinen *A. baumannii* Pneumonie nach Applikation von Lösungsmittel oder Phage, 24 h *post infectionem*.** Gemessen wurden verschiedene Chemokine (A), proinflammatorischer verschiedene Zytokine Interferon- $\gamma$  und Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor G-CSF (B) mittels Multiplex-ELISA. Werte sind dargestellt als Boxplots mit Einzelwerten, Median, Quartilen und mit Whiskern von Minimum bis Maximum (Spannweite) und getestet mittels 2-Way-ANOVA und *Tukey's multiple comparisons test*.  $n = 7-8$  für scheininfizierte Kontrolle (bzw.  $n = 4-5$  für IL-17A),  $n = 10-11$  für *A. baumannii*-infizierte Gruppen, # Unterschied zwischen *A. baumannii*-infizierter Gruppe vs. korrespondierende scheininfizierte Kontrolle und \* Unterschied zwischen *A. baumannii* + Lösungsmittel vs. *A. baumannii* + Phage. ###/\*\*\* $P < 0,001(1)$ .



## ERGEBNISSE

Nach 48 Stunden zeigte sich im Plasma ein nahezu identisches Bild (Abbildung 17). Insgesamt waren die Konzentrationen der Mediatoren auch im Plasma geringer als nach 24 Stunden. Die Konzentrationen von G-CSF waren weiterhin im Vergleich zur Scheininfektion erhöht mit signifikant geringerer Sekretion in der Phagen-Gruppe. Für die übrigen Mediatoren bestanden keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen.

## ERGEBNISSE



**Abbildung 17. Verschiedene proinflammatorische Mediatoren gemessen in Blutplasma in der murinen *A. baumannii* Pneumonie nach Applikation von Lösungsmittel oder Phage, 48 h *post infectionem*.** Gemessen wurden verschiedene Chemokine (A), proinflammatorischer verschiedene Zytokine Interferon- $\gamma$  und Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor G-CSF (B) mittels Multiplex-ELISA. Werte sind dargestellt als Boxplots mit Einzelwerten, Median, Quartilen und mit Whiskern von Minimum bis Maximum (Spannweite) und getestet mittels 2-Way-ANOVA und *Tukey's multiple comparisons test*.  $n = 8$  für scheininfizierte Kontrolle (bzw.  $n = 4$  für IL-17A),  $n = 9-10$  für *A. baumannii*-infizierte Gruppen, # Unterschied zwischen *A. baumannii*-infizierter Gruppe vs. korrespondierende scheininfizierte Kontrolle und \* Unterschied zwischen *A. baumannii* + Lösungsmittel vs. *A. baumannii* + Phage darstellt. ###/\*\*\*  $P < 0,001$  (1).

### 6.7 Die quantitative und qualitative Charakterisierung der Leukozytenpopulationen in BAL, Lunge und Blut zeigte nach Phagenapplikation keine Unterschiede

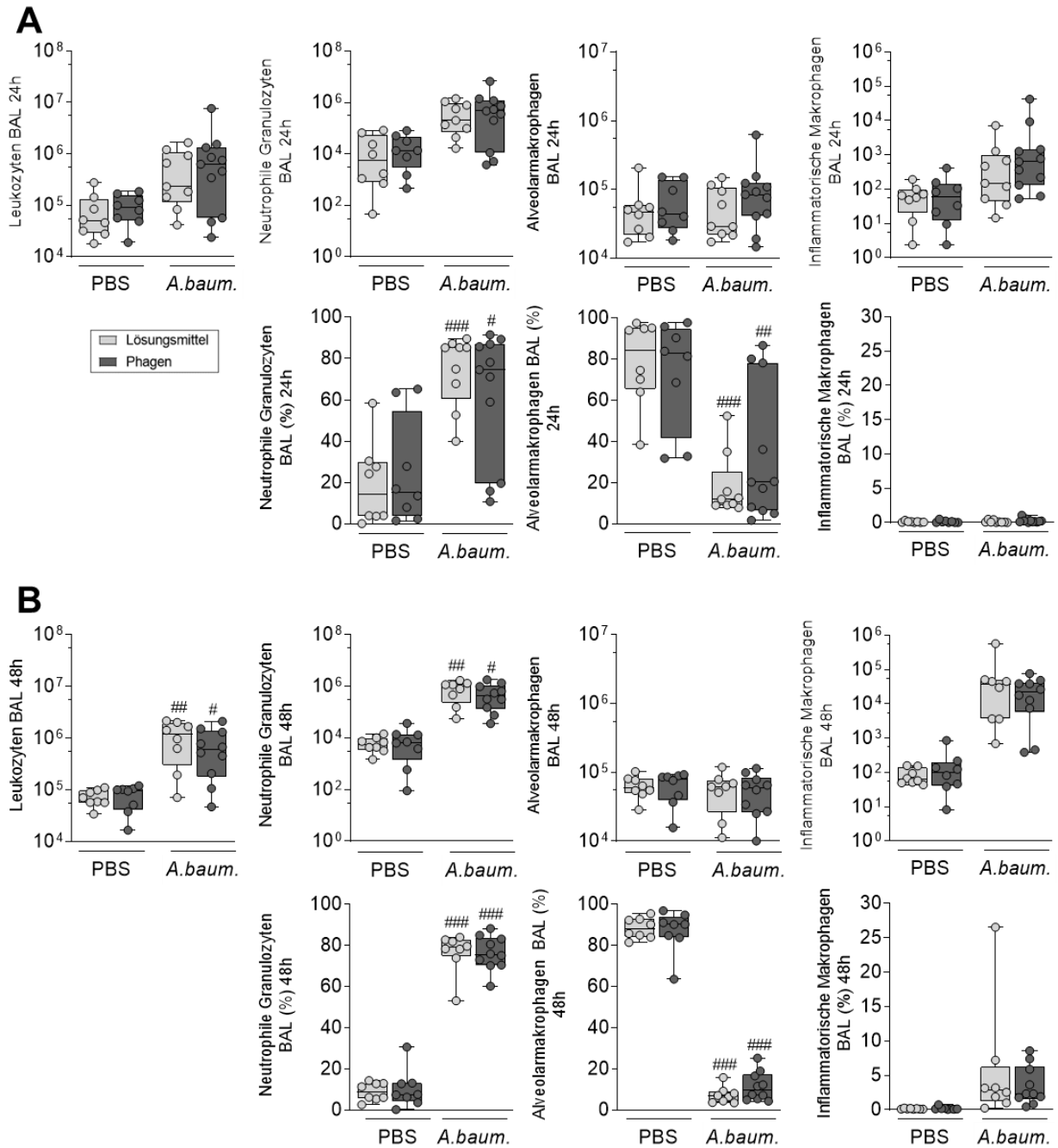
Die einzelnen Leukozytenpopulationen in der Lunge wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dabei wurden in Suspension gebrachte Einzelzellen charakterisiert und sowohl der Alveolarraum durch Untersuchung der BAL als auch gewebständige Leukozyten der Lunge betrachtet, die aus enzymatisch aufgeschlossenem Lungengewebe isoliert wurden. Die Analyse der Blut-Leukozyten erfolgte aus EDTA-Blut mit Hilfe eines vollautomatischen Zellcounters für den veterinärmedizinischen Gebrauch.

#### 6.7.1 Leukozytenpopulation in BAL und Lungengewebe

Nach 24 Stunden kam es in der infizierten Kohorte erwartungsgemäß zu einer pulmonalen Rekrutierung von Leukozyten mit Übertritt in den Alveolarraum (Abbildung 18A). Diese setzte sich nach 48 Stunden fort, so dass die Gesamtleukozytenzahl im Vergleich zur scheininfizierten Kohorte statistisch signifikant erhöht war (Abbildung 18B). Zu beiden Zeitpunkten waren die neutrophilen Granulozyten sowohl absolut als auch relativ die dominierende Leukozytenpopulation, ihr relativer Anteil verringerte sich nach 48 Stunden in den scheininfizierten Tieren. Parallel dazu zeigte sich eine relative Abnahme der Alveolarmakrophagen über den Zeitverlauf, deren Gesamtzahl aber insgesamt konstant blieb. Zusätzlich kam es zu einer Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut und Aktivierung von Gewebemakrophagen, welche im Alveolarraum als inflammatorische Makrophagen (F4/80<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup>) detektiert wurden. Deren Zahl nahm nach 48 Stunden noch weiter zu, wobei die Unterschiede zu den korrespondierenden, scheininfizierten Gruppen statistisch nicht signifikant waren.

In der scheininfizierten Kohorte wurde das Zellbild dominiert von Alveolarmakrophagen, deren absolute und relative Zahlen zu beiden Zeitpunkten stabil waren. Die Phagen-Applikation selbst hatte keinen Effekt auf die Zellzahlen und das Zellbild, unabhängig von der Infektion.

## ERGEBNISSE

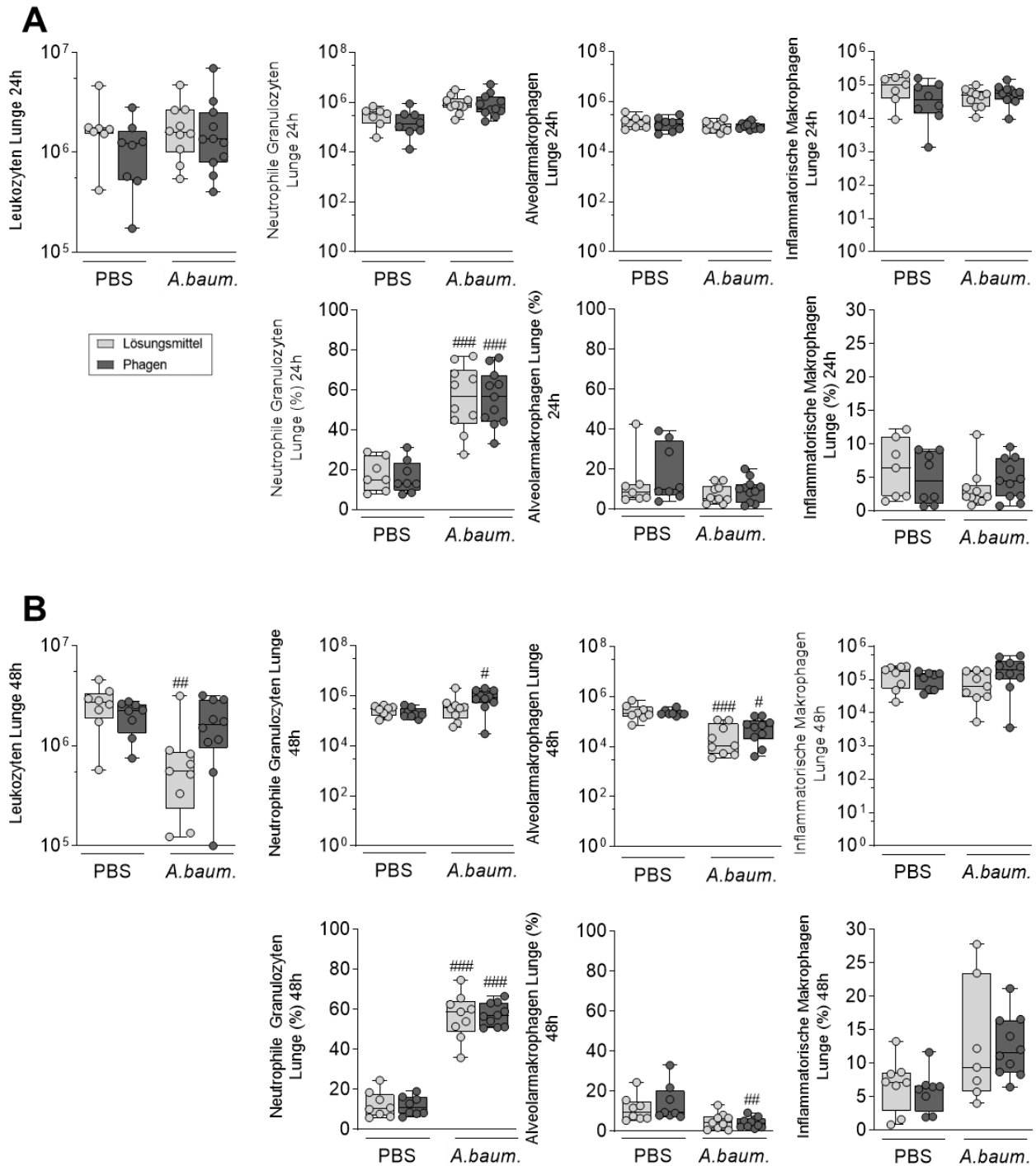


**Abbildung 18. Leukozytenpopulationen in bronchoalveolärer Lavage (BAL) in der murinen *A. baumannii* Pneumonie nach Applikation von Lösungsmittel oder Phage.** Werte sind dargestellt als Boxplots mit Einzelwerten, Median, Quartilen und mit Whiskern von Minimum bis Maximum (Spannweite) und getestet mittels 2-Way-ANOVA und *Tukey's multiple comparisons test*. n = 8 für scheininfizierte Kontrolle, n = 8-11 für *A. baumannii*-infizierte Gruppen, # repräsentiert signifikante Unterschiede zwischen *A. baumannii*-infizierter Gruppe vs. korrespondierende scheininfizierte Kontrolle. # P<0,05 ##P<0,01 ###P<0,001 (1).

## ERGEBNISSE

Die Analyse der Lungengewebsständigen Leukozyten ergab insgesamt ein ähnliches Bild. Bezüglich der absoluten Gesamtzellzahl zeigte sich nach 24 Stunden zwischen scheininfizierter und infizierter Kohorte kein Unterschied, ebenso wenig zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen (Abbildung 19A). Nach 48 Stunden zeigte sich eine signifikant geringere Gesamtzellzahl in den infizierten und mit Lösungsmittel behandelten Tieren im Vergleich zur korrespondierenden, scheininfizierten Gruppe (Abbildung 19B). Die dominierenden Zellen nach Infektion waren ebenfalls zu beiden Zeitpunkten neutrophile Granulozyten, wobei der relative Anteil zu beiden Zeitpunkten und die absolute Zellzahl nur nach 48 Stunden in der infizierten und mit Phagen behandelten Gruppe im Vergleich zur scheininfizierten Gruppe erhöht war. Die absolute Zahl der Alveolarmakrophagen war bei den infizierten Tieren im Lungengewebe im Vergleich zur Scheininfektion nach 48 Stunden reduziert, ein Unterschied im prozentualen Anteil war nur zwischen der scheininfizierten und infizierten Phagenkohorte erkennbar. Bei den inflammatorischen Makrophagen zeigte sich nach 48 Stunden ein im Trend erhöhter prozentualer Anteil im Vergleich zur Scheininfektion. Darüber hinaus konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

## ERGEBNISSE



**Abbildung 19. Leukozytenpopulationen in homogenisiertem Lungengewebe in der murinen *A. baumannii* Pneumonie nach Applikation von Lösungsmittel oder Phage.** Werte sind dargestellt als Boxplots mit Einzelwerten, Median, Quartilen und mit Whiskern von Minimum bis Maximum (Spannweite) und getestet mittels 2-Way-ANOVA und *Tukey's multiple comparisons test*.  $n = 7-8$  für scheininfizierte Kontrolle,  $n = 9-11$  für *A. baumannii*-infizierte Gruppen, #repräsentiert signifikante Unterschiede zwischen *A. baumannii*-infizierter Gruppe vs. korrespondierende scheininfizierte Kontrolle. #  $P < 0,05$  ##  $P < 0,01$  ###  $P < 0,001$  (1).

## ERGEBNISSE

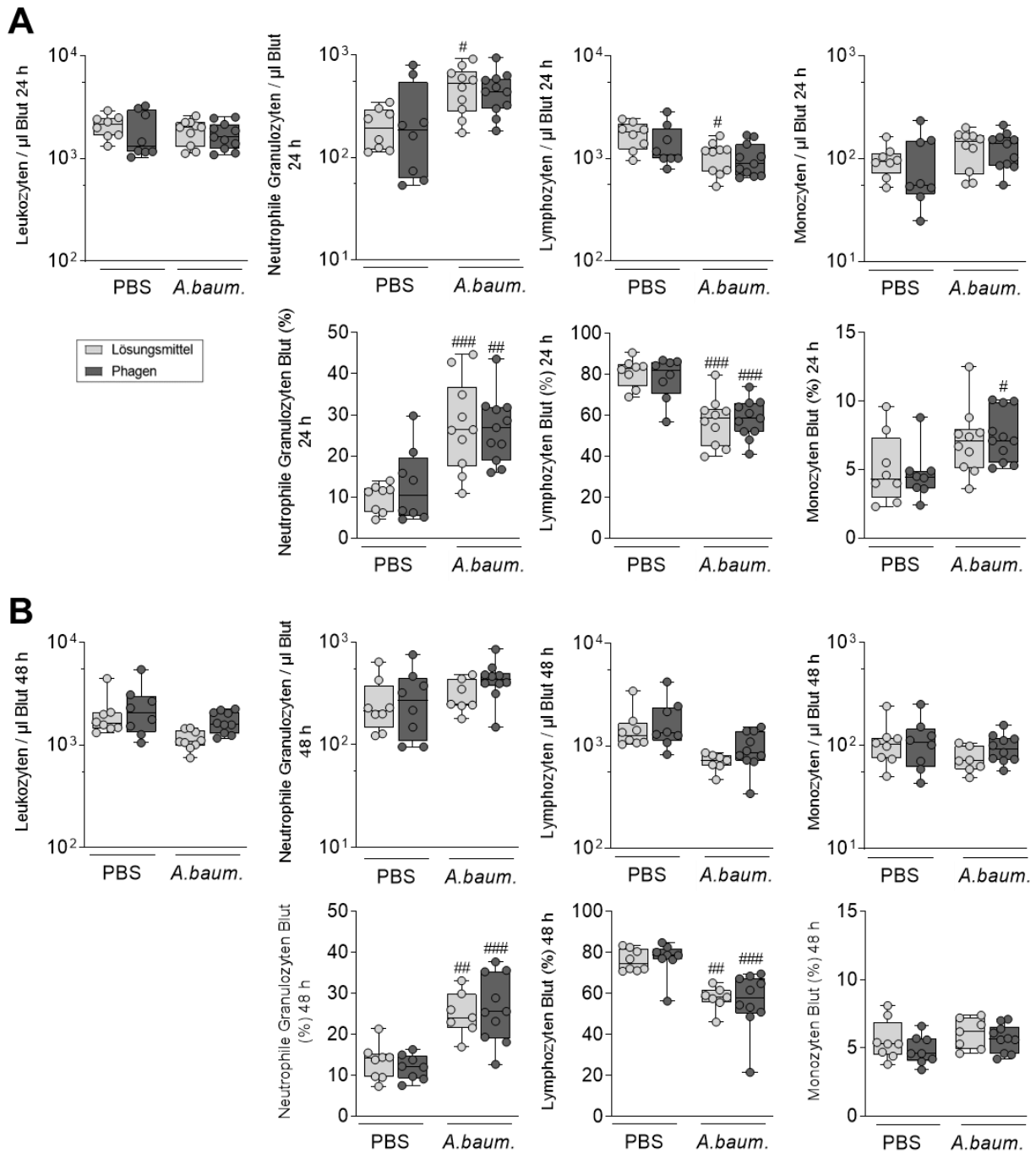
### 6.7.2 Leukozytenpopulationen im Blut

In der Zirkulation zeigten sich im Rahmen der Infektion zu beiden Zeitpunkten unveränderte Gesamtleukozytenzahlen. Im Vergleich mit den scheininfizierten Tieren konnten eine höhere absolute Zahl in der mit Lösungsmittel behandelten Gruppe nach 24 Stunden, sowie ein höherer prozentualer Anteil neutrophiler Granulozyten in beiden Behandlungsgruppen zu beiden Untersuchungszeitpunkten nach Infektion bestimmt werden (Abbildung 20A, B).

Häufigster Zelltyp, sowohl absolut als auch prozentual, waren Lymphozyten. In der Verteilung der Zellpopulationen kam es erwartungsgemäß im Rahmen der Infektion zu einer Verminderung der Lymphozyten zugunsten der neutrophilen Granulozyten. So war die absolute Zahl der Lymphozyten nach 24 Stunden in der mit Lösungsmittel behandelten Gruppe im Vergleich zur Scheininfektion vermindert, ihr prozentualer Anteil in beiden Behandlungsgruppen zu beiden Untersuchungszeitpunkten verringert.

Die Analyse der Blutmonozyten zeigte bei den infizierten und mit Phagen behandelten Tieren im Vergleich zur korrespondierenden, scheininfizierten Gruppe eine signifikant höhere absolute Zellzahl (Abbildung 20A), ansonsten gab es zu keinem Zeitpunkt Unterschiede in der absoluten Zellzahl oder in der relativen Verteilung. Insgesamt gab es auch im Blut keine Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen, weder bei den infizierten noch bei den scheininfizierten Versuchstieren.

## ERGEBNISSE



**Abbildung 20. Leukozytenpopulationen im Blut in der murinen *A. baumannii* Pneumonie nach Applikation von Lösungsmittel oder Phage.** Werte sind dargestellt als Boxplots mit Einzelwerten, Median, Quartilen und mit Whiskern von Minimum bis Maximum (Spannweite) und getestet mittels 2-Way-ANOVA und *Tukey's multiple comparisons test*.  $n = 8$  für scheininfizierte Kontrolle,  $n = 7-11$  für *A. baumannii*-infizierte Gruppen, # repräsentiert signifikante Unterschiede zwischen *A. baumannii*-infizierter Gruppe vs. korrespondierende scheininfizierte Kontrolle. #  $P < 0,05$  ##  $P < 0,01$  ###  $P < 0,001$  (1).



## ERGEBNISSE

6.8 Die einmalige Applikation von vB\_Aba\_Acibel004 führte zu einer vorübergehenden Reduktion der bakteriellen Last nach Infektion im *ex vivo* Modell humanen Lungengewebes ohne gesteigerte Freisetzung von IL-1 $\beta$  und IL-8

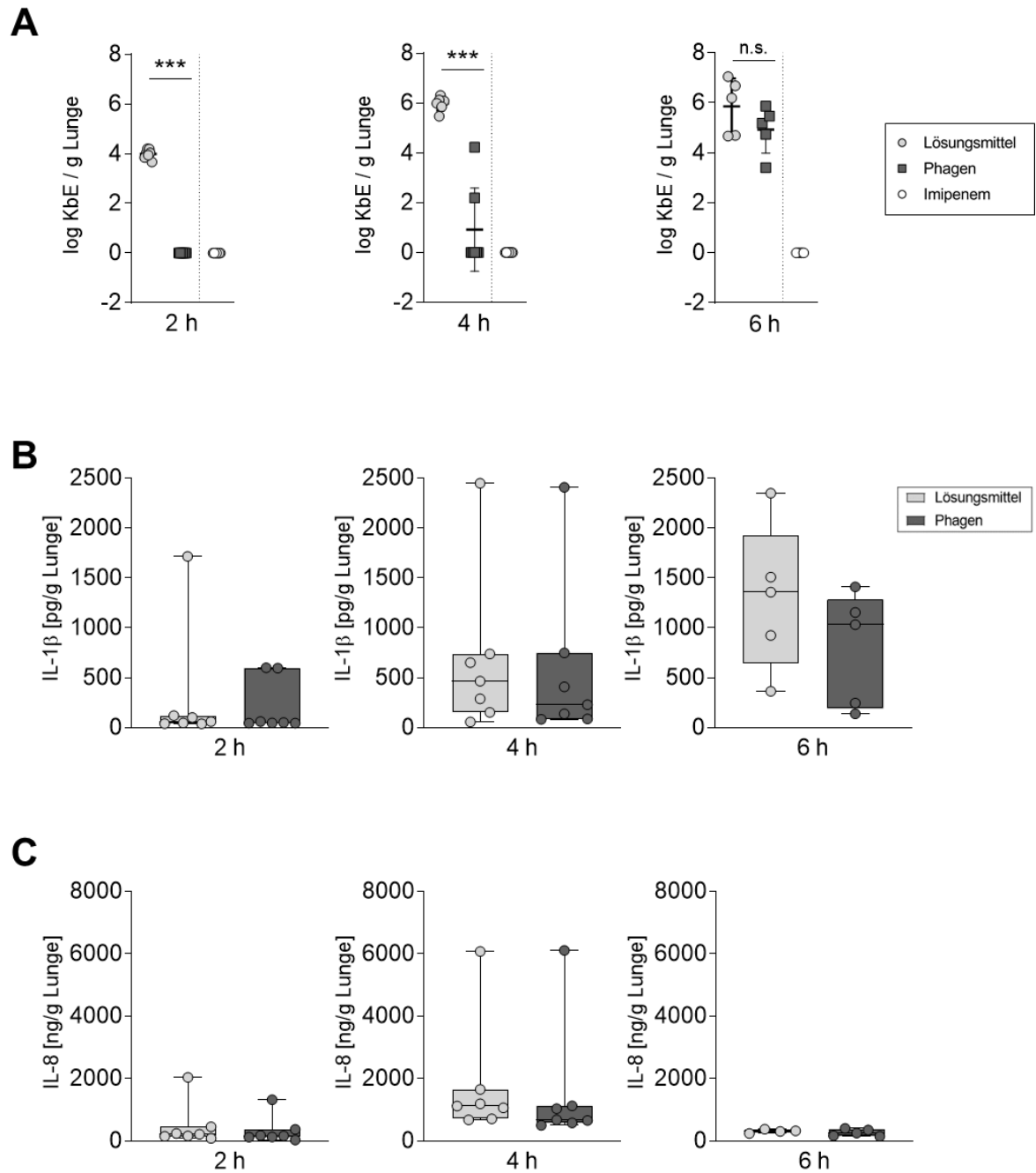
Die Wirksamkeit einer einmaligen Applikation von Phagen wurde in einem *ex vivo* Modell der humanen Lunge untersucht. Neben Effekten auf das bakterielle Wachstum in der dreidimensionalen Struktur wurde die inflammatorische Reaktion humanen Gewebes durch Messung inflammatorischer Zytokine beurteilt (Abbildung 21).

Das Wachstum von *A. baumannii* wurde nach der einmaligen Behandlung (30 Minuten p.i.) 2, 4 und 6 Stunden nach Applikation bestimmt (Abbildung 21A). Hierbei zeigte sich ein Wachstum zu allen Zeitpunkten nach Injektion der Lösungsmittelkontrolle, wobei die Bakterienzahl im Vergleich zwischen 2 und 4 Stunden um zwei Logstufen zunahm, nach 6 Stunden war sie nahezu unverändert. Die einmalige Applikation der Phagen-Lösung reduzierte das Wachstum des Bakteriums effektiv 2 und 4 Stunden nach Applikation. Während nach 4 Stunden in zwei Lungen zunehmendes Wachstum detektiert werden konnte, konnte 6 Stunden nach Applikation ein Wachstum in allen mit Phagen behandelten Proben gemessen werden. Dieses war im Trend geringer als nach der Behandlung mit Lösungsmittel.

Die Konzentration der proinflammatorischen Mediatoren IL-1 $\beta$  und IL-8 wurden zu allen Analysezeitpunkten aus dem Zellkulturüberstand mittels ELISA gemessen. Für IL-1 $\beta$  kam es im Rahmen der Stimulation mit *A. baumannii* mit anschließender Behandlung nach 2 Stunden zu einem geringgradigen Anstieg der Konzentration in beiden Behandlungsgruppen (Abbildung 21B). Dieser Anstieg setzte sich insgesamt über den Untersuchungszeitraum fort und zeigte nach 6 Stunden fast eine Verdreifachung. Auch wenn im Trend nach 6 Stunden bei den mit Phagen behandelten Proben eine etwas geringere Konzentration erkennbar war, so bestand zwischen den beiden Behandlungsgruppen kein signifikanter Unterschied.

Die Konzentrationen von IL-8 waren nach 2 Stunden ebenfalls geringgradig erhöht (Abbildung 21C). Nach 4 Stunden waren die Werte im direkten Vergleich knapp doppelt so hoch, erreichten in den nach 6 Stunden gemessenen Proben aber bereits wieder ein ähnlich niedriges Niveau wie die Proben zum 2 Stunden-Zeitpunkt, wobei in der Lösungsmittelgruppe ein Messwert aufgrund eines technischen Fehlers nicht auswertbar war. Insgesamt zeigten sich hier ebenfalls zwischen den beiden Behandlungsgruppen keine Unterschiede.

## ERGEBNISSE



**Abbildung 21. Bakterielle Last von *A. baumannii* und Sekretion proinflammatorischer Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-8 nach einmaliger Phagenapplikation im *ex vivo* Modell humanen Lungengewebes.** Koloniebildende Einheiten (KbE) dargestellt als Einzelwerte mit Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung nach Transformation und Logarithmierung ( $y=\log(\text{KbE}+1)$ ) und getestet mittels *Student's t-test*. Zytokinkonzentrationswerte angegeben als Boxplots mit Einzelwerten, Median, Quartilen und mit Whiskern von Minimum bis Maximum (Spannweite) und getestet mittels *Mann-Whitney u-test*.  $n = 7$  (2 h und 4 h) bzw. ,4-5 (6 h) pro Gruppe, \*\*\* $P < 0,001$  (1).

## 7 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde der therapeutische Einsatz eines vorab charakterisierten Bakteriophagen gegen ein klinisches *A. baumannii*-Isolat in zwei Pneumoniemodellen untersucht. Dabei wurden Effektivität und etwaige unerwünschte immunologische Wirkungen in immunkompetenten Mäusen *in vivo* sowie in humanem Lungengewebe *ex vivo* untersucht. In beiden Ansätzen konnte durch die einmalige Gabe des Phagen eine signifikante Reduktion der Bakterienlast gezeigt werden. Im Versuchstier führte die Phagen-Behandlung zu einer deutlichen Verbesserung des klinischen Verlaufes, die direkte Applikation in die Lunge zeigte weder *in vivo* noch *ex vivo* unmittelbar detektierbare, proinflammatorische Effekte.

### 7.1 Vergleich mit anderen präklinischen Modellen

Der Einsatz immunkompetenter Mäuse in Untersuchungen zur Effektivität der Phagentherapie gegen *A. baumannii*, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurde in der Literatur bislang nicht beschrieben. Vergleichbare Studien verwendeten aufgrund der generell geringen Pathogenität von *A. baumannii* für gesunde Tiere ausschließlich Modelle mit Mäusen, in denen durch mehrfache Applikation des Zytostatikums Cyclophosphamid ein neutropener Immunstatus induziert wurde. Die darauffolgende Infektion mit *A. baumannii* zeigte in diesen Modellen regelhaft einen schweren, meist letalen Verlauf (80–82). Der Fokus dieser Studien lag entsprechend primär auf dem verbesserten Überleben im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Arbeit von Jeon *et al.* beispielsweise erhielten weibliche C57BL/6 Mäuse zwei vorbereitende Injektionen Cyclophosphamid und wurden dann intranasal mit  $1 \times 10^9$  KbE eines Carbapenem-resistenten *A. baumannii*-Isolates infiziert. Nach 30 Minuten wurde über dieselbe Route ein zuvor isolierter und charakterisierter Phage in verschiedenen Dosierungen bzw. eine Lösungsmittel-Kontrolle appliziert und die Überlebensrate über 12 Tage dokumentiert. Die Autor:innen konnten hierbei eine dosisabhängige Reduktion der Mortalität beobachten, während die Tiere der Kontrollgruppe bereits nach 3 Tagen euthanasiert werden mussten. Des Weiteren wurde eine Reduktion der bakteriellen Last von circa drei Logstufen am ersten bzw. sechs Logstufen am dritten Tag *post infectionem* festgestellt (82). Ziel der vorliegenden Arbeit hingegen war nicht nur die Untersuchung der generellen Effektivität mit dem Fokus auf eine Reduktion der bakteriellen Last, sondern auch auf mögliche, proinflammatorische Effekte. Dafür ist ein intaktes Immunsystem notwendig. Die Induktion einer Immunsuppression durch Cyclophosphamid führt zu einer Reduktion der wichtigsten Immunzellen, die zur Abwehr extrazellulärer Bakterien nötig sind (vorwiegend neutrophile Granulozyten und inflammatorische Monozyten) und deren Beurteilung im Kontext der Phagentherapie bei akuter Infektion relevant ist (23, 98–101). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen haben Roach *et al.* die besondere Bedeutung des intakten

## DISKUSSION

Immunsystems in der Effektivität der Phagentherapie am Beispiel der pulmonalen *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) Infektion beschrieben (102): Mäuse, deren angeborene Immunantwort durch einen vollständigen *knockout* des Gens für das Signalwegprotein MyD88 kompromittiert wurde, zeigten eine hohe Letalität durch die Infektion. In diesen Tieren war die lytische Aktivität der Phagen allein nicht ausreichend für eine effektive Erregerelimination und konnte den Verlauf im Vergleich zur Applikation von PBS nicht signifikant verbessern. Das Phänomen wurde als „Immunsystem-Phagen-Synergismus“ (*immunophage synergy*) bezeichnet und unterstreicht die Bedeutung des Immunsystems beim erfolgreichen Einsatz von Bakteriophagen.

Darüber hinaus stellt Neutropenie keinen häufigen Risikofaktor für die Infektion mit *A. baumannii* dar (23, 103). Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit die Verwendung immunkompetenter Tiere einem möglicherweise schwereren klinischen Verlauf vorgezogen. Das verwendete Infektionsmodell der *A. baumannii*-Pneumonie wurde nach einem publizierten Protokoll von Knapp *et al.* etabliert und resultierte in der Ausbildung einer selbstlimitierenden Pneumonie, wodurch der dort beschriebene Verlauf abgebildet werden konnte (86): dort wurde die Bedeutung des *Toll-like receptor-2* (TLR-2) in der Immunantwort gegen *A. baumannii* in einem entsprechenden Pneumoniemodell untersucht. Dabei kam es nach Infektion zu einem kurzfristigen Anstieg der bakteriellen Last in der Lunge mit einem spontanen graduellen Rückgang der Bakterienzahl über die Zeit. Im Vergleich zu der beschriebenen Publikation wurden in der vorliegenden Arbeit einige Modifikationen vorgenommen: Zum einen wurde das Volumen der eingesetzten Bakterien-Lösung verringert (20  $\mu$ l anstelle von 50  $\mu$ l), um die Belastung der Tiere durch die zweifache pulmonale Flüssigkeitsapplikation (intranasale Infektion und intratracheale Behandlung) zu reduzieren. Zum anderen musste, um vergleichbare Effekte zu erzielen, eine höhere Bakterienkonzentration ( $5 \times 10^8$  anstatt der beschriebenen  $1 \times 10^8$  KbE) verwendet werden, um primär das geringere Verteilungsvolumen in den unteren Atemwegen auszugleichen. Die resultierende Pneumonie in der vorliegenden Arbeit war für die infizierten Tiere nicht letal, demzufolge wurden auch keine Unterschiede im Überleben beobachtet. Einen Nachteil dieses selbstlimitierenden Modells stellte die rasche Elimination des Erregers dar, welche auch ohne weitere Intervention oder Therapie stattfand. Aus diesem Grund musste eine entsprechende Infektionsdosis eingesetzt werden, um eine über den Versuchszeitraum ausreichend hohe pulmonale Bakterienzahl sicherzustellen und um Unterschiede durch die intratracheale Phagenapplikation detektierbar zu machen.

Ein weiterer Unterschied zu vergleichbaren Studien besteht in der Wahl des Applikationszeitpunkts der Phagen-Lösung. In den bisher beschriebenen Studien wurden die Phagen entweder kurz vor, gleichzeitig oder nach einem kurzen Zeitintervall (30 Minuten bis maximal 4 h) nach Infektion appliziert (80–82). Während in diesen Arbeiten präventive Effekte beispielsweise auf die Erregermanifestation im Fokus standen, sollte in der vorliegenden Arbeit

## DISKUSSION

die spätere klinische Anwendung bestmöglich simuliert werden. Der therapeutische Einsatz der Phagen-Lösung erfolgte daher nach Ausbildung klinischer Zeichen, um Einflüsse der Phagentherapie auf eine bereits ausgebildete Immunantwort feststellen zu können. Diese sollten neben der Rekrutierung von Immunzellen eine manifestierte pulmonal-vaskuläre Barriestörung beinhalten, was in entsprechenden Etablierungsexperimenten vorab eruiert wurde. Dementsprechend war der Applikationszeitpunkt mit 12 Stunden p.i. im Vergleich zur Literatur deutlich später gewählt.

Übereinstimmend mit einigen publizierten Arbeiten wurde die Phagen-Lösung lokal appliziert. In den meisten Arbeiten wurde eine intranasale Applikation der Lösung beschrieben, ein Großteil der Bakterien-Phagen-Interaktion spielte sich demnach vermutlich im Bereich des Nasopharynx der Tiere ab. In der vorliegenden Arbeit wurde für das Tiermodell die intratracheale Applikation der Phagen-Lösung nach orotrachealer Intubation bevorzugt. Zusätzlich zur direkten, intratrachealen Applikation erfolgte der Einsatz eines speziellen Verneblers, um eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Lösung im Alveolarraum zu ermöglichen. Diese Applikationsart entspricht am ehesten der späteren klinischen Anwendung, auch wenn die Frage, ob sie der systemischen zu bevorzugen ist, bislang noch nicht endgültig geklärt ist. So beschreibt eine Arbeit zur Phagentherapie bei pulmonaler Infektion mit *Burkholderia cenocepacia* im direkten Vergleich eine höhere Effektivität der systemischen Anwendung (104), während eine weitere Arbeit das Gegenteil beschreibt (105). Eine Studie aus dem Jahr 2021 wiederum konnte bei Beatmungsassoziierter Pneumonie mit *S. aureus* keinen Unterschied in der Effektivität der einzelnen Applikationswege feststellen (106). Gegen eine systemische Applikation sprechen beispielsweise die mögliche Induktion neutralisierender Antikörper gegen die eingesetzten Phagen bei wiederholter Gabe (107) sowie eine höhere Rate systemischer unerwünschter Nebenwirkungen, verursacht durch das verbliebene LPS in der Phagen-Lösung (108).

Selbst die eher spät durchgeführte Phagenapplikation in der vorliegenden Arbeit konnte den klinischen Verlauf noch verbessern, bemessen an klinischem Score und Temperatur. Diese hier verwendeten klinischen Verlaufparameter wurden in vergleichbaren Arbeiten bislang nur unregelmäßig beschrieben (81, 82, 84, 86, 104, 106), weshalb ein direkter Vergleich schwierig ist. Eine ähnliche Verbesserung des klinischen Verlaufes nach Therapie mit Phagen-Komponenten konnte aber beispielsweise von Doehn *et al.* beobachtet werden (89, 109): Im murinen Pneumoniemodell mit *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) erhielten die Tiere eine einmalige intratracheale Applikation des Phagenlysin CPL-1, wodurch das Auftreten einer Hypothermie verhindert werden konnte. Der Hauptunterschied zur vorliegenden Arbeit ist, neben dem Einsatz eines vollständigen Phagen, die Verwendung eines gramnegativen Erregers mit einem abweichenden Infektionsverlauf. Während es in der Arbeit von Doehn *et al.* bei der Infektion mit *S. pneumoniae* typischerweise verzögert zum Beginn der Krankheitssymptomatik mit Hypothermie kam (ab ca. 36-48 Stunden p.i.), wiesen die Tiere in der vorliegenden Arbeit bei

## DISKUSSION

der Infektion mit *A. baumannii* einen frühen Abfall der Temperatur auf. Pathophysiologischer Hintergrund stellt bei ersterem die beginnende invasive Infektion durch *S. pneumoniae* dar, während bei *A. baumannii* die frühe Stimulation mit dem Endotoxin der gramnegativen Erreger für eine rasche Immunreaktion mit Hypothermie sorgt (110). Analog zur generellen Prävention der Hypothermie in der Arbeit von Doehn *et al.* durch die Phagenlysine, war die intratracheale Applikation der Phagen in der vorliegenden Arbeit mit einer früheren Normalisierung der Körpertemperatur assoziiert und ist am ehesten auf eine frühe lokale Reduktion der Bakterien im Alveolarraum zurückzuführen.

In den histologischen Untersuchungen zeigte sich das Bild einer zentral betonten Bronchopneumonie verursacht durch *A. baumannii* (2). Nach Behandlung mit dem Bakteriophagen konnte ein geringer ausgeprägtes Schädigungsmuster mit geringerer Inflammation dargestellt werden. Es konnten jedoch keine unterschiedlichen Gesamtzellzahlen festgestellt werden, weder in der Zellzählung im Rahmen der histologischen Untersuchungen noch in den unabhängig durchgeführten Experimenten mit quantitativer Bestimmung mittels Durchflusszytometrie oder auf systemischer Ebene in der Zirkulation mittels Zellcoulter.

### 7.2 Reduktion der bakteriellen Last durch die Phagenapplikation

#### 7.2.1 Reduktion im *in vivo* Modell

Die direkte, einmalige Applikation der Phagen-Lösung konnte eine Reduktion der bakteriellen Last auch bei verzögertem Therapiebeginn um eine Log-Stufe erzielen. Dies wurde mittels zweier voneinander unabhängiger Methoden nachgewiesen, durch direkte Auszählung Koloniebildender Einheiten und mittels immunhistochemische Färbung gegen *Acinetobacter* in der Histopathologie. Auch wenn hier keine vollständige Elimination der Bakterien erreicht werden konnte, so war die Reduktion durch eine einmalige Gabe dennoch ausreichend, um den klinischen Verlauf zu verbessern. Das Ausmaß der Reduktion deckt sich mit vergleichbaren Studien, in denen eine einmalige Applikation der Phagen auch zu keiner vollständigen Eradikation führte (111–114). Als Erklärung kommt in Betracht, dass das zufällige, räumliche Aufeinandertreffen von Phagen und Bakterium, welches die Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Infektion und Lyse ist, nicht ausreichend erfolgte. Die begrenzte Reduktion könnte demnach durch die komplexe Anatomie der Lunge und die Struktur des Alveolarraums bedingt sein, die das Aufeinandertreffen behindern kann. Zusätzlich könnten pathophysiologische Veränderungen im Rahmen der Infektion, wie die unzureichende Ventilation entzündeter Lungenareale nach der Ausbildung eines alveolären Ödems eine Begegnung von Bakterien und Phagen erschweren, da diese zunächst Flüssigkeit und Zelldetritus überwinden müssen. Auch wenn häufig auf das Konzept der eigenständigen Replikation der Phagen am Ort der Infektion (engl. *auto-dosing*) verwiesen wird (67, 115), so ist auch in diesem Kontext die Präsenz von suszeptiblen Bakterien und der direkte Kontakt zwischen

## DISKUSSION

Phagen und diesen erforderlich. Die vollständige Elimination durch eine einmalige Anwendung wäre, auch unter der Berücksichtigung des *Auto-dosings*, aufgrund der zuvor genannten Einschränkungen, eher unwahrscheinlich. Analog zur Antibiotikabehandlung könnte eine effektivere Verringerung der Bakteriendichte durch die repetitive Applikation der Phagen-Lösung gelingen, wie es z. B. bei den übrigen Antiinfektiva in der klinischen Praxis durchgeführt wird. Selbst in vergleichbaren Arbeiten, bei denen die Effektivität von Antibiotika untersucht wurden, gelingt in der Regel keine vollständige Eradikation nach einer einmaligen Anwendung (84), dasselbe gilt für Kombinationstherapien von Phagen oder Phagenlysinen mit Antibiotika (89, 106, 109, 112). Allerdings ist aufgrund der intratrachealen Applikation mittels Intubation eine wiederholte Applikation in diesem Modell nur schwer durchführbar. Selbst unter optimalen Bedingungen bleibt die Intubation technisch anspruchsvoll und führt häufig zu einer mehr oder weniger schweren Irritation der *Glottis*, die potenziell zu beeinträchtigenden Schwellungen und vegetativen Reizungen führen kann. Eine mögliche Alternative dazu wäre die nasale Inhalation mittels spezieller Geräte für Kleinnager (engl. *nose only inhalation*, NOI). Diese ist wiederum mit anderen Schwierigkeiten verbunden und umfasst Faktoren wie zusätzlichen Stress für die Versuchstiere bei der notwendigen Fixierung in den Inhalationssystemen oder der Verlust von Phagen durch Aerosol-Deposition im Totraum des Inhalationssystems und in den oberen Atemwegen. Zusätzlich könnte die bakterizide Wirkung der Phagen durch die Verwendung eines höheren Phagentiters in der applizierten Lösung verbessert werden. Eine solche Erhöhung wiederum ist technisch limitiert und bedarf weiterer Optimierungen des Herstellungs- und Aufreinigungsprozesses (71).

### 7.2.2 Reduktion im humanen *ex vivo* Modell

In dieser Arbeit wurde erstmals die Reduktion der bakteriellen Last durch Phagen in einem *ex vivo* Modell der humanen Lunge demonstriert. Bedingt durch Besonderheiten des Modells (direkte Injektion der Bakterien und Phagen in das Lungengewebe, fehlende zusätzliche Rekrutierung von Immunzellen) wurden hier andere Zeitintervalle gewählt (96), eine direkte Adaptation des murinen Modells war nicht möglich. Der Fokus der *ex vivo* Untersuchungen lag primär auf möglichen, frühen proinflammatorischen Effekten des Phagen-Wirt-Systems in humanem Gewebe, weshalb das Modell auf kürzere Zeitintervalle angepasst wurde. Die transiente Reduktion der Bakterien unterhalb der Nachweisgrenze nach 2 Stunden sowie der erneute Nachweis von Bakterien nach 4 und 6 Stunden erklären sich am ehesten mit dem Wachstum von Bakterien aus Gewebsarealen, die von den Phagen initial nicht erreicht wurden. Die vollständige Reduktion nach 2 bzw. teilweise vollständige Reduktion nach 4 Stunden ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die eventuell in der Probe verbliebenen Bakterien nicht erfasst wurden. Ursächlich kämen die gleichen Faktoren wie im *in vivo* Modell in Frage, wie die

## DISKUSSION

komplexe dreidimensionale Mikroanatomie der Lunge oder Inaktivierung der Phagen durch niedrigen Gewebe-pH bzw. Phagozytose durch Alveolarmakrophagen, die ein effektives *auto-dosing* der Phagen verhindert haben könnten. Als alternative Erklärung für das erneute Wachstum käme theoretisch die Selektion Phagen-persistenter bzw. -resistenter Klone in Betracht (116, 117). Bei den persistenten Bakterien kommt es zu einer transienten, meist metabolischen Adaption, welche die Klone gegenüber bakteriziden Agenzien (so auch Phagen) unempfindlich macht. Dem kann die Modifikation spezieller Oberflächenstrukturen, wie z. B. des LOS zugrunde liegen, wie es für *A. baumannii* auch als Resistenzmechanismus bei der Therapie mit Colistin beschrieben wurde (118). Daneben käme eine verstärkte Expression diverser Enzyme in Frage, wie der bakteriellen Kommunikation (engl. *Quorum sensing*) oder des bakteriellen Immunsystems (CRISPR/cas), welche beispielsweise durch epigenetische Veränderungen vorgenommen werden (119–121). Im Gegensatz dazu kommt es bei einer Resistenz zu einer genetisch fixierten Veränderung im Rahmen einer oder mehrerer Mutationen im Genom, welche die Bakterien dauerhaft gegen einen Phagen unempfindlich machen würden. Beides erscheint in dieser Modellkonstellation aufgrund des kurzen Untersuchungszeitraums unwahrscheinlich, da die beschriebenen Veränderungen nach deutlich längeren Untersuchungszeiträumen festgestellt wurden (122, 123), diese waren aber nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Diese Fragen zum Ausmaß der Reduktion, der Phagen-Verteilung oder dem Auftreten persistenter bzw. resistenter *A. baumannii* Klone könnten künftig in weiteren Untersuchungen adressiert werden, beispielsweise durch Ausplattieren des gesamten Gewebehomogenats untersucht werden, die auch mit einer Bestimmung der Phagen-Konzentration im Gewebe kombiniert werden und die weitere Testung isolierter Bakterienkolonien auf Persistenz oder Resistenz einschließen sollten.

### 7.3 Keine Anzeichen proinflammatorischer Reaktionen nach Phagentherapie

Mögliche proinflammatorische Effekte der pulmonalen Phagenanwendung bei gramnegativen Erregern wie *A. baumannii* sind einer der Hauptgründe für Bedenken bezüglich einer Anwendung von Phagen in der klinischen Praxis. Diese könnten beispielsweise über die verstärkte Freisetzung von Endotoxin nach der Phagen-vermittelten Lyse verursacht werden (124) und ein Lungenödem im Rahmen der Pneumonie zusätzlich verstärken (125). In der vorliegenden Arbeit konnte kein nachteiliger Einfluss durch die Applikation von Bakteriophagen auf den Verlauf der Infektion im verwendeten Modell festgestellt werden. Darin bestätigen die Ergebnisse bisherige Studien, in denen der klinische Verlauf bzw. die Überlebensrate der Tiere durch die pulmonale Phagenapplikation nicht verschlechtert wird (80–82, 111). Insbesondere kam es in der vorliegenden Arbeit durch die intratracheale Applikation der Phagen-Lösung zu keiner Verstärkung der pulmonal-vaskulären Barrierestörung. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch



## DISKUSSION

Dufour *et al.*, wobei dort die inhalative Phagenapplikation mit einer konventionellen Antibiotikatherapie in der Pneumonie mit *E. coli* verglichen wurde und das Ausmaß der Lungenödemformation über Bestimmung des Lungengewichts (engl. *wet to dry ratio*) quantifiziert wurde (111). Dieselben Autor:innen konnten in einer anderen Arbeit zusätzlich zeigen, dass die freigesetzte Menge von Endotoxin durch Phagenlyse geringer ausfällt als nach Gabe eines Betalaktamantibiotikums und eher vergleichbar mit der freigesetzten Menge nach Applikation von Aminoglykosiden ist (126).

Auch auf der Ebene lokaler und systemisch sezernierter proinflammatorischer Mediatoren ließ sich in dieser Arbeit keine weitere Steigerung nach Phagenapplikation feststellen, weder im Rahmen der Infektion mit *A. baumannii* noch durch die intratracheale Applikation der eingesetzten Phagen-Lösung *per se*. Für das Chemokin CCL2 beispielsweise wurde sogar eine geringere Sekretion bei den infizierten und therapierten Tieren gemessen, möglicherweise als Ausdruck einer beschleunigten Immunabwehr. Auch zeigten sämtliche scheininfizierte Tiere, die Phagen erhalten hatten, keinerlei Veränderungen im klinischen Verhalten noch in der Sekretion proinflammatorischer Mediatoren. Dies steht in gewissem Widerspruch zu der bereits zitierten Arbeit von Prazak *et al.* (112), in der nach intravenöser Phagenapplikation gegen *S. aureus* eine vermehrte Freisetzung von IL-1 $\beta$  in nicht infizierten Tieren festgestellt wurde. Ähnliche Effekte wurden in einer anderen Arbeit an isolierten peripheren Blutzellen *in vitro* berichtet (127). Im Modell der vorliegenden Arbeit konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Die widersprüchlichen Ergebnisse in der zitierten Arbeit könnten auf die verwendeten Phagen-Wirtssysteme, den unterschiedlichen Modellorganismus (Ratte) oder auf die systemische Exposition durch intravenöse Applikation der Phagen-Lösung zurückzuführen sein. Vor diesem Hintergrund erscheint eine lokale Applikation tatsächlich von Vorteil, auch wenn die statistisch signifikante Erhöhung in den zitierten Arbeiten von IL-1 $\beta$  nicht automatisch auf eine biologische Relevanz schließen lässt, sondern stets im Kontext weiterer klinischer Veränderungen bewertet werden muss. Untermauert wird der potenzielle Vorteil der lokalen Applikation durch eine nachfolgende Arbeit derselben Autor:innen. Dort wurden in einem sehr ähnlichen Modell diese Unterschiede weiter charakterisiert und gezeigt, dass die inhalative Phagen-Applikation im direkten Vergleich zur intravenösen Gabe eine geringe Freisetzung von IL-1 $\beta$  zur Folge hat (106). Als weiteren Näherungsschritt zur Situation im Menschen und vor demselben Hintergrund wurde im Rahmen dieser Arbeit die Phagen-Anwendung zusätzlich an humanem Gewebe untersucht. Hier zeigten sich ebenfalls keine gesteigerten Konzentrationen der früh sezernierten Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-8. Vergleichbare Untersuchungen zur Phagentherapie an humanem Lungengewebe wurden bislang in der Literatur nicht beschrieben, was einen direkten Vergleich oder eine Einordnung erschweren. Eine Studie hat die Stimulation einer immortalisierten Alveolarepithelzelllinie untersucht und konnte dabei keine erhöhte Zytotoxizität feststellen, welche

## DISKUSSION

mittels Trypanblau-Färbung in der Mikroskopie untersucht wurde, proinflammatorische Mediatoren wurden dabei nicht gemessen (83). Vorteil des verwendeten Modells der humanen Lunge ist die direkte Verwendung primären humanen Gewebes im natürlichen Zellverband, dessen unmittelbare Reaktionen der Situation im Patienten ähneln und daher eine zuverlässige Näherung über etwaige unerwünschte Sofortreaktionen zulässt (96, 128). Eine Einschränkung dieses Modells ist die fehlende Rekrutierung von Immunzellen, so dass hier bestenfalls vorhandene, ortsständige Immunzellen (Alveolarmakrophagen, Mastzellen) miterfasst wurden. Die zum Teil mangelnde Sekretion der Zytokine (vor allem der Kontrollgruppen) kann darüber hinaus zumindest teilweise auf eine schlechte Stimulierbarkeit des Lungengewebes zurückzuführen sein, die modellbedingt einer interindividuellen Varianz zwischen den verschiedenen Patientenspendern unterliegt und auch stark von der Qualität der gewonnenen Proben abhängt. Künftige Untersuchungen sollten eine wiederholte Applikation der Phagen-Lösung sowie die Untersuchung späterer Zeitpunkte beinhalten. Darüber hinaus sollte auch eine mikroskopische Untersuchung des humanen Lungengewebes erfolgen, um zytotoxische Effekte auszuschließen.

### 7.4 Künftige Ansätze und Ausblick

Nach der erfolgreichen Demonstration der Phagenbehandlung in zwei unterschiedlichen experimentellen Modellen in der vorliegenden Arbeit sind in Zukunft weitere Schritte notwendig, um eine Etablierung der Phagentherapie in der klinischen Praxis auf absehbare Zeit zu ermöglichen.

So müssen ähnliche Experimente auf andere Erreger ausgeweitet werden, die eine besonders hohe Relevanz im Bereich der multiresistenten Lungeninfektionen haben, um weitere experimentelle Evidenz für den Einsatz zu schaffen. Zu nennen wären weitere Vertreter der typischen ESKAPE-Erreger, wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* und *S. aureus*. Darüber hinaus sollten Untersuchungen eine verträgliche, repetitive pulmonale Applikation der Phagen-Lösung beinhalten, um die Effektivität der bakteriellen Elimination weiter zu steigern. Für eine zusätzliche Erhöhung der Effektivität kommt auch die kombinierte Gabe mit verschiedenen Antibiotika in Frage: Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass durch Zusatz von Phagen in bestimmten Konstellationen die Sensibilität von multiresistenten Erregern gegen bestimmte Substanzen wieder hergestellt werden kann (129–132). Hintergrund sind vermutlich Veränderungen auf Genexpressionsebene oder Anpassungen im Metabolismus der bakteriellen Zellwand, die gegen den Phagenbefall schützen sollen, aber gleichzeitig die Empfindlichkeit gegen bestimmte Antibiotika erhöhen. Umgekehrt gibt es auch Hinweise darauf, dass sublethale Antibiotika-Konzentrationen bei gleichzeitiger Exposition mit Phagen zu einer gesteigerten Produktion und Freisetzung von Virionen führen. Dieses Wechselspiel wurde mit dem Terminus „Phagen-Antibiotika-Synergismus“ (PAS) beschrieben (133). Gleichzeitig können bestimmte Kombinationen im Gegensatz dazu die Phageninfektion hemmen, wie z. B. Inhibitoren der bakteriellen Proteinbiosynthese (wie Aminoglykoside), die den Replikationszyklus der Phagen unterbrechen (134).

Neben der rein experimentellen Evidenz müssen zwingend kontrollierte klinische Studien an gesunden Probanden und im Anschluss an Patienten durchgeführt werden, bevor eine offizielle Zulassung der Phagentherapie denkbar ist. In den vergangenen Jahren wurden bereits einige solcher Studien zu verschiedenen Infektionen durchgeführt und beinhalten Phagentherapie im Rahmen von Otitis media (135), infektiöser Diarrhoe (73), infizierter Verbrennungswunden (74) und Harnwegsinfektionen (75). Auch wenn nur die erstgenannte eine höhere Effektivität im Vergleich zu Kontrollbehandlung zeigen konnte, so konnten durch diese Studien insgesamt wichtige Erkenntnisse gewonnen werden, die für die Konzeption künftiger Phagenstudien herangezogen werden können. Als Beispiel wäre hier die Studie *PhagoBurn* zu nennen (74). Dabei handelte es sich um eine der ersten randomisierten Phase 1/2-Studien zum klinischen Einsatz von Phagen in Westeuropa. Untersucht wurde die Applikation eines Phagen-Cocktails bestehend aus zwölf Phagen bei Verbrennungswunden im direkten Vergleich zur

## DISKUSSION

Standardbehandlung. Diese Studie musste vorzeitig abgebrochen werden, u.a. aufgrund einer geringen Stabilität des Phagenpräparates, die mit einem Titerverlust einherging. Diese Problematik weist auf die Wichtigkeit der Phagenaufreinigung und Lagerung hin, die in Zukunft weiter optimiert werden müssen (71). Neben einer Verbesserung des klassischen Prozederes, der Herstellung einer Phagen-Lösung aus einer Bakterienkultur mit anschließender Aufreinigung von bakteriellen Bestandteilen, käme zukünftig die Herstellung synthetischer oder gentechnisch modifizierter Phagen über bakterienfreie Replikationssysteme in Frage, wobei entsprechend keine bakteriellen Lyseprodukte mehr anfallen würden (136).

Über diese rein praktischen Fragen hinaus existieren zusätzliche Herausforderungen, die sich auf die offizielle Zulassung von Phagen auf nationaler und internationaler (europäischer) Ebene, den arzneimittelrechtlichen Status von Phagenpräparaten sowie möglichen Patentschutz beziehen (137).

### 7.5 Künftige Rolle der Phagentherapie

Trotz der inzwischen mehr als einhundertjährigen Geschichte der Phagentherapie ist es noch ein weiter Weg bis in die angewandte Praxis. Auch wenn Phagen einen grundsätzlich vielversprechenden Ansatz gegen Infektionen mit multiresistenten Erregern darstellen, so werden sie auf absehbare Zeit die Antibiotikabehandlung vermutlich nicht ersetzen können. Nach heutigem Stand ist noch immer deutlich mehr zuverlässige Evidenz notwendig, um Phagen guten Gewissens auf breiter Basis einsetzen zu können. Ebenfalls ist die Herstellung von Phagenpräparaten, die arzneimittelrechtlichen Standards genügen bislang noch sehr aufwändig und kostenintensiv. Zusätzlich bedarf es für einen praxisnahen Einsatz einer passenden Infrastruktur. Dazu zählen beispielsweise der Aufbau entsprechender Phagenbanken, adäquat ausgestatteter Labore zur Vorabdiagnostik, wie Suszeptibilitätsprüfungen von Phagen und Bakterien, sowie die Involvierung pharmazeutischer Unternehmen. Die Erfahrungen der Antibiotikaresistenzkrise legen zudem nahe, dass der Einsatz von Phagen nicht unkontrolliert erfolgen darf, um das zusätzliche Auftreten von Phagen-resistenten Erregern nicht zu begünstigen. Ihr Einsatz könnte daher, beispielsweise im Rahmen einer ergänzenden Behandlung bei therapieresistenter chronischer Infektion in spezialisierten Zentren erfolgen. Mit dem Abschluss dieser Arbeit sollte ein Beitrag zu diesem gesamten Prozess geleistet werden. Die praktischen Erfahrungen, die gewonnen wurden, konnten mit dazu beitragen, die erste klinische Studie zur Phagentherapie gegen chronische Lungeninfektionen in Deutschland vorzubereiten und auf den Weg zu bringen (71).

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Wienhold S-M, Brack MC, Nouailles G, Krishnamoorthy G, Korf IHE, Seitz C, Wienecke S, Dietert K, Gurtner C, Kershaw O, Gruber AD, Ross A, Ziehr H, Rohde M, Neudecker J, Lienau J, Suttorp N, Hippenstiel S, Hocke AC, Rohde C, Witzenrath M. Preclinical Assessment of Bacteriophage Therapy against Experimental *Acinetobacter baumannii* Lung Infection. *Viruses* 2021; 14(1). doi: 10.3390/v14010033.
2. Dietert K, Gutbier B, Wienhold SM, Reppe K, Jiang X, Yao L, Chaput C, Naujoks J, Brack M, Kupke A, Peteranderl C, Becker S, Lachner C von, Baal N, Slevogt H, Hocke AC, Witzenrath M, Opitz B, Herold S, Hackstein H, Sander LE, Suttorp N, Gruber AD. Spectrum of pathogen- and model-specific histopathologies in mouse models of acute pneumonia. *PLoS One* 2017; 12(11):e0188251. doi: 10.1371/journal.pone.0188251.
3. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect Dis* 2018; 18(11):1191–210. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30310-4.
4. Centers of Disease Control and Prevention. Achievements in Public Health, 1900-1999: Control of infectious diseases. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)* 1999; 48(29):621–48 [Stand: 26.05.2023]. Verfügbar unter: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm4829a1.htm>.
5. Sakai T, Morimoto Y. The History of Infectious Diseases and Medicine. *Pathogens* 2022; 11(10). doi: 10.3390/pathogens11101147.
6. Fleming A. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol* 1929; 10(3):226–36.
7. Mohr KI. History of Antibiotics Research. *Curr Top Microbiol Immunol* 2016; 398:237–72. doi: 10.1007/82\_2016\_499.
8. Nicolaou KC, Rigol S. A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. *J Antibiot (Tokyo)* 2018; 71(2):153–84. doi: 10.1038/ja.2017.62.
9. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* 2022; 399(10325):629–55. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
10. BEIGELMAN PM, RANTZ LA. The clinical importance of coagulase-positive, penicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 1950; 242(10):353–8. doi: 10.1056/NEJM195003092421002.

## LITERATURVERZEICHNIS

11. Rammelkamp CH, Maxon T. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the Action of Penicillin. *Experimental Biology and Medicine* 1942; 51(3):386–9. doi: 10.3181/00379727-51-13986.
12. Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol* 2019; 51:72–80. doi: 10.1016/j.mib.2019.10.008.
13. Organization WH. Antimicrobial Resistance. Global Report on Surveillance: Global Report on Surveillance. Geneva: World Health Organization; 2014. Verfügbar unter: <http://gbv.ebib.com/patron/FullRecord.aspx?p=1741841>.
14. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, Ouellette M, Outterson K, Patel J, Cavalieri M, Cox EM, Houchens CR, Grayson ML, Hansen P, Singh N, Theuretzbacher U, Magrini N. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 2018; 18(3):318–27. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3.
15. Abele-Horn M, Pantke E, Eckmanns T. Wege zum fachgerechten und verantwortungsvollen Umgang mit Antibiotika. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2018; 61(5):572–9. doi: 10.1007/s00103-018-2723-1.
16. Tenhagen B-A, Werner N, Käsbohrer A, Kreienbrock L. Übertragungswege resistenter Bakterien zwischen Tieren und Menschen und deren Bedeutung – Antibiotikaresistenz im One-Health-Kontext. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2018; 61(5):515–21. doi: 10.1007/s00103-018-2717-z.
17. Lübbert C, Baars C, Dayakar A, Lippmann N, Rodloff AC, Kinzig M, Sörgel F. Environmental pollution with antimicrobial agents from bulk drug manufacturing industries in Hyderabad, South India, is associated with dissemination of extended-spectrum beta-lactamase and carbapenemase-producing pathogens. *Infection* 2017; 45(4):479–91. doi: 10.1007/s15010-017-1007-2.
18. Wiklund S, Fagerberg I, Örtqvist Å, Vading M, Giske CG, Broliden K, Tammelin A. Knowledge and understanding of antibiotic resistance and the risk of becoming a carrier when travelling abroad: a qualitative study of Swedish travellers. *Scand J Public Health* 2015; 43(3):302–8. doi: 10.1177/1403494815571788.
19. Kennedy K, Collignon P. Colonisation with *Escherichia coli* resistant to "critically important" antibiotics: a high risk for international travellers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29(12):1501–6. doi: 10.1007/s10096-010-1031-y.
20. Gaarslev K, Stenderup J. Changes during travel in the composition and antibiotic resistance pattern of the intestinal Enterobacteriaceae flora: results from a study of mecillinam

## LITERATURVERZEICHNIS

- prophylaxis against travellers' diarrhoea. *Curr Med Res Opin* 1985; 9(6):384–7. doi: 10.1185/03007998509109608.
21. Meyer E, Gastmeier P, Kola A, Schwab F. Pet animals and foreign travel are risk factors for colonisation with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Infection* 2012; 40(6):685–7. doi: 10.1007/s15010-012-0324-8.
  22. Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis* 2008; 197(8):1079–81. doi: 10.1086/533452.
  23. Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B. Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges. *Clinical microbiology reviews* 2017; 30(1):409–47. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27974412/>.
  24. Robert Koch Institut. Epidemiologisches Bulletin Nr. 32/2013: *Acinetobacter baumannii* - ein Krankenhauskeim mit beunruhigendem Entwicklungspotenzial. *Epidemiologisches Bulletin* 2013; (32):295–9.
  25. Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence* 2012; 3(3):243–50. doi: 10.4161/viru.19700.
  26. Higgins PG, Hagen RM, Podbielski A, Frickmann H, Warnke P. Molecular Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolated from War-Injured Patients from the Eastern Ukraine. *Antibiotics (Basel)* 2020; 9(9). doi: 10.3390/antibiotics9090579.
  27. Chung DR, Song J-H, Kim SH, Thamlikitkul V, Huang S-G, Wang H, So TM-K, Yasin RMD, Hsueh P-R, Carlos CC, Hsu LY, Buntaran L, Lalitha MK, Kim MJ, Choi JY, Kim SI, Ko KS, Kang C-I, Peck KR. High prevalence of multidrug-resistant nonfermenters in hospital-acquired pneumonia in Asia. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184(12):1409–17. doi: 10.1164/rccm.201102-0349OC.
  28. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net): Annual Epidemiological Report 2021. ECDC 2022.
  29. Obara M, Nakae T. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Antimicrob Chemother* 1991; 28(6):791–800. doi: 10.1093/jac/28.6.791.
  30. Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59(6):1210–5. doi: 10.1093/jac/dkl509.
  31. European Committee On Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Expected Resistant Phenotypes Version 1.1 March 2022; 2022. Verfügbar unter:

## LITERATURVERZEICHNIS

[https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Expert\\_Rules/2022/Expected\\_Resistant\\_Phenotypes\\_v1.1\\_20220325.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Expert_Rules/2022/Expected_Resistant_Phenotypes_v1.1_20220325.pdf).

32. McGann P, Courvalin P, Snestrud E, Clifford RJ, Yoon E-J, Onmus-Leone F, Ong AC, Kwak YI, Grillot-Courvalin C, Lesho E, Waterman PE. Amplification of aminoglycoside resistance gene *aphA1* in *Acinetobacter baumannii* results in tobramycin therapy failure. *mBio* 2014; 5(2):e00915. doi: 10.1128/mBio.00915-14.
33. Vincent J-L, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, Moreno R, Lipman J, Gomersall C, Sakr Y, Reinhart K. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* 2009; 302(21):2323–9. doi: 10.1001/jama.2009.1754.
34. Shojaei L, Mohammadi M, Beigmohammadi M-T, Doomanlou M, Abdollahi A, Feizabadi MM, Khalili H. Clinical response and outcome of pneumonia due to multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in critically ill patients. *Iran J Microbiol* 2016; 8(5):288–97.
35. Ewig S, Kolditz M, Pletz M, Altiner A, Albrich W, Drömann D, Flick H, Gatermann S, Krüger S, Nehls W, Panning M, Rademacher J, Rohde G, Rupp J, Schaaf B, Heppner H-J, Krause R, Ott S, Welte T, Witzernath M. Behandlung von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie – Update 2021. *Pneumologie* 2021; 75(9):665–729. doi: 10.1055/a-1497-0693.
36. Dalhoff K, Abele-Horn M, Andreas S, Deja M, Ewig S, Gastmeier P, Gatermann S, Gerlach H, Grabein B, Heußel CP, Höffken G, Kolditz M, Kramme E, Kühl H, Lange C, Mayer K, Nachtigall I, Panning M, Pletz M, Rath P-M, Rohde G, Rosseau S, Schaaf B, Schreiter D, Schütte H, Seifert H, Spies C, Welte T. Epidemiologie, Diagnostik und Therapie erwachsener Patienten mit nosokomialer Pneumonie – Update 2017. *Pneumologie* 2018; 72(1):15–63. doi: 10.1055/s-0043-121734.
37. Jones RN. Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. *Clin Infect Dis* 2010; 51 Suppl 1:S81-7. doi: 10.1086/653053.
38. Kummer W, Drenckhahn D, Benninghoff A, Hrsg. Benninghoff Lehrbuch Anatomie: Kapitel 6 Atmungssystem [S. 271 und 276]. 17. Aufl. München: Elsevier; 2008. (AnatomieBd. 1).
39. Blaser, John Bennett, Raphael Dolin, Martin J., Hrsg. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases - Electronic. Available from: Elsevier eBooks+, (9th Edition). Elsevier - OHCE, 2019.: Chapter 72 Sepsis and Septic Shock. 19. Aufl.
40. Ye D, Shan J, Huang Y, Li J, Li C, Liu X, He W, Li Y, Mao P. A gloves-associated outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit in Guangdong, China. *BMC Infect Dis* 2015; 15:179. doi: 10.1186/s12879-015-0917-9.



## LITERATURVERZEICHNIS

41. McDonald LC, Banerjee SN, Jarvis WR. Seasonal variation of Acinetobacter infections: 1987-1996. Nosocomial Infections Surveillance System. *Clin Infect Dis* 1999; 29(5):1133–7. doi: 10.1086/313441.
42. Geisinger E, Huo W, Hernandez-Bird J, Isberg RR. Acinetobacter baumannii: Envelope Determinants That Control Drug Resistance, Virulence, and Surface Variability. *Annu Rev Microbiol* 2019; 73:481–506. doi: 10.1146/annurev-micro-020518-115714.
43. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388(6640):394–7. doi: 10.1038/41131.
44. Medzhitov R, Janeway C. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol* 2000; 8(10):452–6. doi: 10.1016/s0966-842x(00)01845-x.
45. Hennessy EJ, Parker AE, O'Neill LAJ. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9(4):293–307. doi: 10.1038/nrd3203.
46. Broermann A, Winderlich M, Block H, Frye M, Rossaint J, Zarbock A, Cagna G, Linnepe R, Schulte D, Nottebaum AF, Vestweber D. Dissociation of VE-PTP from VE-cadherin is required for leukocyte extravasation and for VEGF-induced vascular permeability in vivo. *J Exp Med* 2011; 208(12):2393–401. doi: 10.1084/jem.20110525.
47. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche J-D, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent J-L, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315(8):801–10. doi: 10.1001/jama.2016.0287.
48. Pogue JM, Lee J, Marchaim D, Yee V, Zhao JJ, Chopra T, Lephart P, Kaye KS. Incidence of and risk factors for colistin-associated nephrotoxicity in a large academic health system. *Clin Infect Dis* 2011; 53(9):879–84. doi: 10.1093/cid/cir611.
49. Theuretzbacher U, van Bambeke F, Cantón R, Giske CG, Mouton JW, Nation RL, Paul M, Turnidge JD, Kahlmeter G. Reviving old antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70(8):2177–81. doi: 10.1093/jac/dkv157.
50. O'Neill Jea. VACCINES AND ALTERNATIVE APPROACHES: REDUCING OUR DEPENDENCE ON ANTIMICROBIALS; 2016 [Stand: 27.06.2023]. Verfügbar unter: [https://amr-review.org/sites/default/files/Vaccines%20and%20alternatives\\_v4\\_LR.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/Vaccines%20and%20alternatives_v4_LR.pdf).
51. Walesch S, Birkelbach J, Jézéquel G, Haeckl FPJ, Hegemann JD, Hesterkamp T, Hirsch AKH, Hammann P, Müller R. Fighting antibiotic resistance-strategies and (pre)clinical

## LITERATURVERZEICHNIS

- developments to find new antibacterials. *EMBO Rep* 2023; 24(1):e56033. doi: 10.15252/embr.202256033.
52. Young R, Gill JJ. *MICROBIOLOGY*. Phage therapy redux--What is to be done? *Science* 2015; 350(6265):1163–4. doi: 10.1126/science.aad6791.
53. D'Herelle F. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. 1917. *Res Microbiol* 2007; 158(7):553–4. doi: 10.1016/j.resmic.2007.07.005.
54. Twort FW. AN INVESTIGATION ON THE NATURE OF ULTRA-MICROSCOPIC VIRUSES. *The Lancet* 1915; 186(4814):1241–3. doi: 10.1016/S0140-6736(01)20383-3.
55. Suttle CA. Marine viruses--major players in the global ecosystem. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5(10):801–12. doi: 10.1038/nrmicro1750.
56. Campbell A. The future of bacteriophage biology. *Nat Rev Genet* 2003; 4(6):471–7. doi: 10.1038/nrg1089.
57. Nobrega FL, Vlot M, Jonge PA de, Dreesens LL, Beaumont HJE, Lavigne R, Dutilh BE, Brouns SJJ. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nat Rev Microbiol* 2018; 16(12):760–73. doi: 10.1038/s41579-018-0070-8.
58. Batinovic S, Wassef F, Knowler SA, Rice DTF, Stanton CR, Rose J, Tucci J, Nittami T, Vinh A, Drummond GR, Sobey CG, Chan HT, Seviour RJ, Petrovski S, Franks AE. Bacteriophages in Natural and Artificial Environments. *Pathogens* 2019; 8(3). doi: 10.3390/pathogens8030100.
59. Brady A, Felipe-Ruiz A, Del Gallego Sol F, Marina A, Quiles-Puchalt N, Penadés JR. Molecular Basis of Lysis-Lysogeny Decisions in Gram-Positive Phages. *Annu Rev Microbiol* 2021; 75:563–81. doi: 10.1146/annurev-micro-033121-020757.
60. Penadés JR, Chen J, Quiles-Puchalt N, Carpena N, Novick RP. Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes. *Curr Opin Microbiol* 2015; 23:171–8. doi: 10.1016/j.mib.2014.11.019.
61. Colavecchio A, Cadieux B, Lo A, Goodridge LD. Bacteriophages Contribute to the Spread of Antibiotic Resistance Genes among Foodborne Pathogens of the Enterobacteriaceae Family - A Review. *Front Microbiol* 2017; 8:1108. doi: 10.3389/fmicb.2017.01108.
62. Lin DM, Koskella B, Lin HC. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2017; 8(3):162–73. doi: 10.4292/wjgpt.v8.i3.162.

## LITERATURVERZEICHNIS

63. Petrovic Fabijan A, Iredell J, Danis-Wlodarczyk K, Kebriaei R, Abedon ST. Translating phage therapy into the clinic: Recent accomplishments but continuing challenges. *PLoS Biol* 2023; 21(5):e3002119. doi: 10.1371/journal.pbio.3002119.
64. Gorski A, Weber-Dabrowska B, Miedzybrodzki R, Borysowski J. A historical overview of the therapeutic use of bacteriophages; 2023 [Stand: 28.06.2023]. Verfügbar unter: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/presentation/presentation-historical-overview-therapeutic-use-bacteriophages-andrzej-gorski\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/presentation/presentation-historical-overview-therapeutic-use-bacteriophages-andrzej-gorski_en.pdf).
65. Duckworth DH. "Who discovered bacteriophage?". *Bacteriol Rev* 1976; 40(4):793–802. doi: 10.1128/br.40.4.793-802.1976.
66. Łusiak-Szelachowska M, Międzybrodzki R, Drulis-Kawa Z, Cater K, Knežević P, Winogradow C, Amaro K, Jończyk-Matysiak E, Weber-Dąbrowska B, Rękas J, Górski A. Bacteriophages and antibiotic interactions in clinical practice: what we have learned so far. *J Biomed Sci* 2022; 29(1):23. doi: 10.1186/s12929-022-00806-1.
67. Loc-Carrillo C, Abedon ST. Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage* 2011; 1(2):111–4. doi: 10.4161/bact.1.2.14590.
68. Minot S, Sinha R, Chen J, Li H, Keilbaugh SA, Wu GD, Lewis JD, Bushman FD. The human gut virome: inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome Res* 2011; 21(10):1616–25. doi: 10.1101/gr.122705.111.
69. Reyes A, Haynes M, Hanson N, Angly FE, Heath AC, Rohwer F, Gordon JI. Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature* 2010; 466(7304):334–8. doi: 10.1038/nature09199.
70. Wienhold S-M, Lienau J, Witzentrath M. Towards Inhaled Phage Therapy in Western Europe. *Viruses* 2019; 11(3). doi: 10.3390/v11030295.
71. Willy C, Bugert JJ, Classen AY, Deng L, Düchting A, Gross J, Hammerl JA, Korf IHE, Kühn C, Lieberknecht-Jouy S, Rohde C, Rupp M, Vehreschild MJGT, Vogeke K, Wienecke S, Witzentrath M, Würstle S, Ziehr H, Moelling K, Broecker F. Phage Therapy in Germany-Update 2023. *Viruses* 2023; 15(2). doi: 10.3390/v15020588.
72. Liu D, van Belleghem JD, Vries CR de, Burgener E, Chen Q, Manasherob R, Aronson JR, Amanatullah DF, Tamma PD, Suh GA. The Safety and Toxicity of Phage Therapy: A Review of Animal and Clinical Studies. *Viruses* 2021; 13(7). doi: 10.3390/v13071268.
73. Sarker SA, Sultana S, Reuteler G, Moine D, Descombes P, Charton F, Bourdin G, McCallin S, Ngom-Bru C, Neville T, Akter M, Huq S, Qadri F, Talukdar K, Kassam M, Delley M, Loiseau C, Deng Y, El Aidy S, Berger B, Brüssow H. Oral Phage Therapy of Acute Bacterial Diarrhea

## LITERATURVERZEICHNIS

- With Two Coliphage Preparations: A Randomized Trial in Children From Bangladesh. *EBioMedicine* 2016; 4:124–37. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.12.023.
74. Jault P, Leclerc T, Jennes S, Pirnay JP, Que Y-A, Resch G, Rousseau AF, Ravat F, Carsin H, Le Floch R, Schaal JV, Soler C, Fevre C, Arnaud I, Bretaudeau L, Gabard J. Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *Lancet Infect Dis* 2019; 19(1):35–45. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30482-1.
75. Leitner L, Ujmajuridze A, Chanishvili N, Goderdzishvili M, Chkonia I, Rigvava S, Chkhotua A, Changashvili G, McCallin S, Schneider MP, Liechti MD, Mehnert U, Bachmann LM, Sybesma W, Kessler TM. Intravesical bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Lancet Infect Dis* 2021; 21(3):427–36. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30330-3.
76. ClinicalTrials.gov; 2023 [Stand: 26.06.2023]. Verfügbar unter: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05616221>.
77. Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, Hernandez-Morales A, Lancaster J, Lessor L, Barr JJ, Reed SL, Rohwer F, Benler S, Segall AM, Taplitz R, Smith DM, Kerr K, Kumaraswamy M, Nizet V, Lin L, McCauley MD, Strathdee SA, Benson CA, Pope RK, Leroux BM, Picel AC, Mateczun AJ, Cilwa KE, Regeimbal JM, Estrella LA, Wolfe DM, Henry MS, Quinones J, Salka S, Bishop-Lilly KA, Young R, Hamilton T. Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails To Treat a Patient with a Disseminated Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61(10). doi: 10.1128/aac.00954-17.
78. Law N, Logan C, Yung G, Furr C-LL, Lehman SM, Morales S, Rosas F, Gaidamaka A, Bilinsky I, Grint P, Schooley RT, Aslam S. Successful adjunctive use of bacteriophage therapy for treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in a cystic fibrosis patient. *Infection* 2019; 47(4):665–8. doi: 10.1007/s15010-019-01319-0.
79. Djebara S, Maussen C, Vos D de, Merabishvili M, Damanet B, Pang KW, Leenheer P de, Strachinaru I, Soentjens P, Pirnay J-P. Processing Phage Therapy Requests in a Brussels Military Hospital: Lessons Identified. *Viruses* 2019; 11(3). doi: 10.3390/v11030265.
80. Cha K, Oh HK, Jang JY, Jo Y, Kim WK, Ha GU, Ko KS, Myung H. Characterization of Two Novel Bacteriophages Infecting Multidrug-Resistant (MDR) *Acinetobacter baumannii* and Evaluation of Their Therapeutic Efficacy in Vivo. *Front Microbiol* 2018; 9:696. doi: 10.3389/fmicb.2018.00696.

## LITERATURVERZEICHNIS

81. Hua Y, Luo T, Yang Y, Dong D, Wang R, Wang Y, Xu M, Guo X, Hu F, He P. Phage Therapy as a Promising New Treatment for Lung Infection Caused by Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Mice. *Front Microbiol* 2017; 8:2659. doi: 10.3389/fmicb.2017.02659.
82. Jeon J, Ryu C-M, Lee J-Y, Park J-H, Yong D, Lee K. In Vivo Application of Bacteriophage as a Potential Therapeutic Agent To Control OXA-66-Like Carbapenemase-Producing *Acinetobacter baumannii* Strains Belonging to Sequence Type 357. *Appl Environ Microbiol* 2016; 82(14):4200–8. doi: 10.1128/AEM.00526-16.
83. Wintachai P, Surachat K, Chaimaha G, Septama AW, Smith DR. Isolation and Characterization of a Phageocytovirus Infecting Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in A549 Alveolar Epithelial Cells. *Viruses* 2022; 14(11). doi: 10.3390/v14112561.
84. Berger S, Goekeri C, Gupta SK, Vera J, Dietert K, Behrendt U, Lienau J, Wienhold S-M, Gruber AD, Suttorp N, Witzernath M, Nouailles G. Delay in antibiotic therapy results in fatal disease outcome in murine pneumococcal pneumonia. *Crit Care* 2018; 22(1):287. doi: 10.1186/s13054-018-2224-5.
85. Dijkshoorn L, Aucken H, Gerner-Smidt P, Janssen P, Kaufmann ME, Garaizar J, Ursing J, Pitt TL. Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *J Clin Microbiol* 1996; 34(6):1519–25. doi: 10.1128/jcm.34.6.1519-1525.1996.
86. Knapp S, Wieland CW, Florquin S, Pantophlet R, Dijkshoorn L, Tshimbalanga N, Akira S, van der Poll T. Differential roles of CD14 and toll-like receptors 4 and 2 in murine *Acinetobacter* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173(1):122–9. doi: 10.1164/rccm.200505-730OC.
87. Reimer LC, Sarda Carbasse J, Podstawka A, Overmann J. *Acinetobacter baumannii* Bouvet and Grimont 1986; 2020.
88. Merabishvili M, Vandenheuvel D, Kropinski AM, Mast J, Vos D de, Verbeken G, Noben J-P, Lavigne R, Vaneechoutte M, Pirnay J-P. Characterization of newly isolated lytic bacteriophages active against *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One* 2014; 9(8):e104853. doi: 10.1371/journal.pone.0104853.
89. Doehn J-M. Therapie der murinen Pneumokokken-Pneumonie mit lytischem Bakteriophagenenzym Cpl-1: Charité - Universitätsmedizin Berlin; 2014.
90. Radünzel P. Einfluss des Lipopeptides MALP-2 auf den Verlauf der sekundären Pneumokokkenpneumonie nach Influenzavirusinfektion im murinen Modell: Charité - Universitätsmedizin Berlin; 2018.

## LITERATURVERZEICHNIS

91. Costa DL, Lehmann JR, Harold WM, Drew RT. Transoral tracheal intubation of rodents using a fiberoptic laryngoscope. *Lab Anim Sci* 1986; 36(3):256–61.
92. Müller-Redetzky H, Kellermann U, Wienhold S-M, Gutbier B, Lienau J, Hellwig K, Reppe K, Letsiou E, Tschernig T, Scholz M, Ahnert P, Maasch C, Hoehlig K, Klussmann S, Vater A, Firsching TC, Hoppe J, Suttorp N, Witzenrath M. Neutralizing Complement C5a Protects Mice with Pneumococcal Pulmonary Sepsis. *Anesthesiology* 2020; 132(4):795–807. doi: 10.1097/ALN.0000000000003149.
93. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol* 2017; 37(2):163–76. doi: 10.3109/07388551.2015.1128876.
94. Thermo Fisher Scientific. CountBright and CountBright Plus Absolute Counting Beads Product Information Sheet (Pub.No. MAN0018850 A.0).
95. Lázaro-Díez M, Navascués-Lejarza T, Remuzgo-Martínez S, Navas J, Icardo JM, Acosta F, Martínez-Martínez L, Ramos-Vivas J. *Acinetobacter baumannii* and *A. pittii* clinical isolates lack adherence and cytotoxicity to lung epithelial cells in vitro. *Microbes Infect* 2016; 18(9):559–64. doi: 10.1016/j.micinf.2016.05.002.
96. Szymanski KV, Toennies M, Becher A, Fatykhova D, N'Guessan PD, Gutbier B, Klauschen F, Neuschaefer-Rube F, Schneider P, Rueckert J, Neudecker J, Bauer TT, Dalhoff K, Drömann D, Gruber AD, Kershaw O, Temmesfeld-Wollbrueck B, Suttorp N, Hippenstiel S, Hocke AC. *Streptococcus pneumoniae*-induced regulation of cyclooxygenase-2 in human lung tissue. *Eur Respir J* 2012; 40(6):1458–67. doi: 10.1183/09031936.00186911.
97. Croghan C, Egeghy PP. Methods of dealing with values below the limit of detection using sas.: Presented at the Southeastern SAS User Group, St. Petersburg, FL, USA, 22-24 September 2020; 2020 [Stand: 26.06.2023]. Verfügbar unter: <https://analytics.ncsu.edu/sesug/2003/SD08-Croghan.pdf>.
98. van Faassen H, KuoLee R, Harris G, Zhao X, Conlan JW, Chen W. Neutrophils play an important role in host resistance to respiratory infection with *Acinetobacter baumannii* in mice. *Infect Immun* 2007; 75(12):5597–608. doi: 10.1128/IAI.00762-07.
99. Qiu H, KuoLee R, Harris G, Chen W. High susceptibility to respiratory *Acinetobacter baumannii* infection in A/J mice is associated with a delay in early pulmonary recruitment of neutrophils. *Microbes Infect* 2009; 11(12):946–55. doi: 10.1016/j.micinf.2009.06.003.
100. Breslow JM, Meissler JJ, Hartzell RR, Spence PB, Truant A, Gaughan J, Eisenstein TK. Innate immune responses to systemic *Acinetobacter baumannii* infection in mice: neutrophils, but not interleukin-17, mediate host resistance. *Infect Immun* 2011; 79(8):3317–27. doi: 10.1128/IAI.00069-11.

## LITERATURVERZEICHNIS

101. Hood MI, Uzhachenko R, Boyd K, Skaar EP, Ivanova AV. Loss of mitochondrial protein Fus1 augments host resistance to *Acinetobacter baumannii* infection. *Infect Immun* 2013; 81(12):4461–9. doi: 10.1128/IAI.00771-13.
102. Roach DR, Leung CY, Henry M, Morello E, Singh D, Di Santo JP, Weitz JS, Debarbieux L. Synergy between the Host Immune System and Bacteriophage Is Essential for Successful Phage Therapy against an Acute Respiratory Pathogen. *Cell Host Microbe* 2017; 22(1):38-47.e4. doi: 10.1016/j.chom.2017.06.018.
103. Freire MP, Oliveira Garcia D de, Garcia CP, Campagnari Bueno MF, Camargo CH, Kono Magri ASG, Francisco GR, Reghini R, Vieira MF, Ibrahim KY, Rossi F, Hajjar L, Levin AS, Hoff PM, Pierrotti LC, Abdala E. Bloodstream infection caused by extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in cancer patients: high mortality associated with delayed treatment rather than with the degree of neutropenia. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22(4):352–8. doi: 10.1016/j.cmi.2015.12.010.
104. Carmody LA, Gill JJ, Summer EJ, Sajjan US, Gonzalez CF, Young RF, LiPuma JJ. Efficacy of bacteriophage therapy in a model of *Burkholderia cenocepacia* pulmonary infection. *J Infect Dis* 2010; 201(2):264–71. doi: 10.1086/649227.
105. Semler DD, Goudie AD, Finlay WH, Dennis JJ. Aerosol phage therapy efficacy in *Burkholderia cenocepacia* complex respiratory infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58(7):4005–13. doi: 10.1128/aac.02388-13.
106. Prazak J, Valente LG, Iten M, Federer L, Grandgirard D, Soto S, Resch G, Leib SL, Jakob SM, Haenggi M, Cameron DR, Que Y-A. Benefits of Aerosolized Phages for the Treatment of Pneumonia Due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: An Experimental Study in Rats. *J Infect Dis* 2021; 225(8):1452–9. doi: 10.1093/infdis/jiab112.
107. Hodyra-Stefaniak K, Kaźmierczak Z, Majewska J, Sillankorva S, Miernikiewicz P, Międzybrodzki R, Górski A, Azeredo J, Lavigne R, Lecion D, Nowak S, Harhala M, Waśko P, Owczarek B, Gembara K, Dąbrowska K. Natural and Induced Antibodies Against Phages in Humans: Induction Kinetics and Immunogenicity for Structural Proteins of PB1-Related Phages. *Phage (New Rochelle)* 2020; 1(2):91–9. doi: 10.1089/phage.2020.0004.
108. Biswas B, Adhya S, Washart P, Paul B, Trostel AN, Powell B, Carlton R, Merrill CR. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Immun* 2002; 70(1):204–10. doi: 10.1128/iai.70.1.204-210.2002.
109. Doehn JM, Fischer K, Reppe K, Gutbier B, Tschernig T, Hocke AC, Fischetti VA, Löffler J, Suttorp N, Hippenstiel S, Witzentrath M. Delivery of the endolysin Cpl-1 by inhalation

## LITERATURVERZEICHNIS

- rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68(9):2111–7. doi: 10.1093/jac/dkt131.
110. Gordon CJ. *Temperature Regulation in Laboratory Rodents*: Cambridge University Press; 2009.
111. Dufour N, Delattre R, Chevallereau A, Ricard J-D, Debarbieux L. Phage Therapy of Pneumonia Is Not Associated with an Overstimulation of the Inflammatory Response Compared to Antibiotic Treatment in Mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2019; 63(8). doi: 10.1128/aac.00379-19.
112. Prazak J, Iten M, Cameron DR, Save J, Grandgirard D, Resch G, Goepfert C, Leib SL, Takala J, Jakob SM, Que Y-A, Haenggi M. Bacteriophages Improve Outcomes in Experimental *Staphylococcus aureus* Ventilator-associated Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2019; 200(9):1126–33. doi: 10.1164/rccm.201812-2372OC.
113. Agarwal R, Johnson CT, Imhoff BR, Donlan RM, McCarty NA, García AJ. Inhaled bacteriophage-loaded polymeric microparticles ameliorate acute lung infections. *Nat Biomed Eng* 2018; 2(11):841–9. doi: 10.1038/s41551-018-0263-5.
114. Chhibber S, Kaur S, Kumari S. Therapeutic potential of bacteriophage in treating *Klebsiella pneumoniae* B5055-mediated lobar pneumonia in mice. *J Med Microbiol* 2008; 57(Pt 12):1508–13. doi: 10.1099/jmm.0.2008/002873-0.
115. Abedon ST, Thomas-Abedon C. Phage therapy pharmacology. *Curr Pharm Biotechnol* 2010; 11(1):28–47. doi: 10.2174/138920110790725410.
116. Abedon ST. Ecology and Evolutionary Biology of Hindering Phage Therapy: The Phage Tolerance vs. Phage Resistance of Bacterial Biofilms. *Antibiotics (Basel)* 2023; 12(2). doi: 10.3390/antibiotics12020245.
117. Bull JJ, Vegge CS, Schmerer M, Chaudhry WN, Levin BR. Phenotypic resistance and the dynamics of bacterial escape from phage control. *PLoS One* 2014; 9(4):e94690. doi: 10.1371/journal.pone.0094690.
118. Novović K, Jovčić B. Colistin Resistance in *Acinetobacter baumannii*: Molecular Mechanisms and Epidemiology. *Antibiotics (Basel)* 2023; 12(3). doi: 10.3390/antibiotics12030516.
119. Ste Croix M de, Vacca I, Kwun MJ, Ralph JD, Bentley SD, Haigh R, Croucher NJ, Oggioni MR. Phase-variable methylation and epigenetic regulation by type I restriction-modification systems. *FEMS Microbiol Rev* 2017; 41(Supp\_1):S3-S15. doi: 10.1093/femsre/fux025.



## LITERATURVERZEICHNIS

120. Luthe T, Keuer L, Thormann K, Frunzke J. Bacterial multicellular behavior in antiviral defense. *Curr Opin Microbiol* 2023; 74:102314. doi: 10.1016/j.mib.2023.102314.
121. Bernheim A, Sorek R. The pan-immune system of bacteria: antiviral defence as a community resource. *Nat Rev Microbiol* 2020; 18(2):113–9. doi: 10.1038/s41579-019-0278-2.
122. Oechslin F. Resistance Development to Bacteriophages Occurring during Bacteriophage Therapy. *Viruses* 2018; 10(7). doi: 10.3390/v10070351.
123. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8(5):317–27. doi: 10.1038/nrmicro2315.
124. Viertel TM, Ritter K, Horz H-P. Viruses versus bacteria—novel approaches to phage therapy as a tool against multidrug-resistant pathogens. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69(9):2326–36. doi: 10.1093/jac/dku173.
125. Perros F, Lambrecht BN, Hammad H. TLR4 signalling in pulmonary stromal cells is critical for inflammation and immunity in the airways. *Respir Res* 2011; 12(1):125. doi: 10.1186/1465-9921-12-125.
126. Dufour N, Delattre R, Ricard J-D, Debarbieux L. The Lysis of Pathogenic *Escherichia coli* by Bacteriophages Releases Less Endotoxin Than by  $\beta$ -Lactams. *Clin Infect Dis* 2017; 64(11):1582–8. doi: 10.1093/cid/cix184.
127. van Belleghem JD, Clement F, Merabishvili M, Lavigne R, Vaneechoutte M. Pro- and anti-inflammatory responses of peripheral blood mononuclear cells induced by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* phages. *Sci Rep* 2017; 7(1):8004. doi: 10.1038/s41598-017-08336-9.
128. Zscheppang K, Berg J, Hedtrich S, Verheyen L, Wagner DE, Suttorp N, Hippenstiel S, Hocke AC. Human Pulmonary 3D Models For Translational Research. *Biotechnol J* 2018; 13(1). doi: 10.1002/biot.201700341.
129. Mangalea MR, Duerkop BA. Fitness Trade-Offs Resulting from Bacteriophage Resistance Potentiate Synergistic Antibacterial Strategies. *Infect Immun* 2020; 88(7). doi: 10.1128/iai.00926-19.
130. Engeman E, Freyberger HR, Corey BW, Ward AM, He Y, Nikolich MP, Filippov AA, Tyner SD, Jacobs AC. Synergistic Killing and Re-Sensitization of *Pseudomonas aeruginosa* to Antibiotics by Phage-Antibiotic Combination Treatment. *Pharmaceuticals (Basel)* 2021; 14(3). doi: 10.3390/ph14030184.

## LITERATURVERZEICHNIS

131. Wang X, Loh B, Gordillo Altamirano F, Yu Y, Hua X, Leptihn S. Colistin-phage combinations decrease antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* via changes in envelope architecture. *Emerg Microbes Infect* 2021; 10(1):2205–19. doi: 10.1080/22221751.2021.2002671.
132. Gordillo Altamirano F, Forsyth JH, Patwa R, Kostoulias X, Trim M, Subedi D, Archer SK, Morris FC, Oliveira C, Kielty L, Korneev D, O'Bryan MK, Lithgow TJ, Peleg AY, Barr JJ. Bacteriophage-resistant *Acinetobacter baumannii* are resensitized to antimicrobials. *Nat Microbiol* 2021; 6(2):157–61. doi: 10.1038/s41564-020-00830-7.
133. Comeau AM, Tétart F, Trojet SN, Prère M-F, Krisch HM. Phage-Antibiotic Synergy (PAS): beta-lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth. *PLoS One* 2007; 2(8):e799. doi: 10.1371/journal.pone.0000799.
134. Zuo P, Yu P, Alvarez PJJ. Aminoglycosides Antagonize Bacteriophage Proliferation, Attenuating Phage Suppression of Bacterial Growth, Biofilm Formation, and Antibiotic Resistance. *Appl Environ Microbiol* 2021; 87(15):e0046821. doi: 10.1128/AEM.00468-21.
135. Wright A, Hawkins CH, Anggård EE, Harper DR. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clin Otolaryngol* 2009; 34(4):349–57. doi: 10.1111/j.1749-4486.2009.01973.x.
136. Mitsunaka S, Yamazaki K, Pramono AK, Ikeuchi M, Kitao T, Ohara N, Kubori T, Nagai H, Ando H. Synthetic engineering and biological containment of bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2022; 119(48):e2206739119. doi: 10.1073/pnas.2206739119.
137. Furfaro LL, Payne MS, Chang BJ. Bacteriophage Therapy: Clinical Trials and Regulatory Hurdles. *Front Cell Infect Microbiol* 2018; 8:376. doi: 10.3389/fcimb.2018.00376.
138. Petrick A. In situ Phänotypisierung von Makrophagen in akuten Entzündungsreaktionen: Freie Universität Berlin; 2022.

## 9 ANHANG

### 9.1 Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung

#### Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Markus Brack, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Bakteriophagen-Therapie gegen *Acinetobacter baumannii*: Experimentelle Evaluation in zwei präklinischen Modellen“ („Bacteriophage therapy against *Acinetobacter baumannii*: Experimental evaluation in two preclinical models“) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

---

Datum

---

Unterschrift

## Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

### **Markus Brack hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:**

**Publikation 1:** Sandra-Maria Wienhold\*, Markus C. Brack\*, Geraldine Nouailles, Gopinath Krishnamoorthy, Imke H. E. Korf, Claudius Seitz, Sarah Wienecke, Kristina Dietert, Corinne Gurtner, Olivia Kershaw, Achim D. Gruber, Anton Ross, Holger Ziehr, Manfred Rohde, Jens Neudecker, Jasmin Lienau, Norbert Suttorp, Stefan Hippenstiel, Andreas C. Hocke, Christine Rohde, Martin Witzernath, Preclinical Assessment of Bacteriophage Therapy against Experimental *Acinetobacter baumannii* Lung Infection. *Viruses*, 2022, 14(1):33; \*gleicher Anteil

Beitrag im Einzelnen: Durchführung sämtlicher Tierstudien und Experimente mit humanem Lungengewebe (supervidiert durch Frau Dr. Sandra-Maria Wienhold); Erhebung und Zusammenstellung der aus den Tierversuchen und Versuchen mit humanem Lungengewebe gewonnenen Daten in den Abbildungen 1-4 (ausgenommen histologische Bilder in 1B und 2B/D) und Tabelle 1-2, sowie im Supplement Tabellen S3, S4 und Abbildungen S3-S6; Probenerhebung der Materialien aus Abbildungen 1B, 2B und 2D; Statistische Auswertung Abbildungen 1-4 sowie Supplement Tabellen S3, S4 und Abbildungen S3-S6 (supervidiert durch Frau Dr. Jasmin Lienau und Frau Dr. Sandra-Maria Wienhold); Erstellung der Graphen Abbildungen 1-4 (ausgenommen histologische Bilder in 1B und 2B/D) und Tabelle 1-2, sowie im Supplement Tabellen S3, S4 und Abbildungen S3-S6. Erstellung des Manuskripts;

**Publikation 2:** Kristina Dietert, Birgitt Gutbier, Sandra M. Wienhold, Katrin Reppe, Xiaohui Jiang, Ling Yao, Catherine Chaput, Jan Naujoks, Markus Brack, Alexandra Kupke, Christin Peteranderl, Stephan Becker, Carolin von Lachner, Nelli Baal, Hortense Slevogt, Andreas C. Hocke, Martin Witzernath, Bastian Opitz, Susanne Herold, Holger Hackstein, Leif E. Sander, Norbert Suttorp, Achim D. Gruber. Spectrum of pathogen- and model-specific histopathologies in mouse models of acute pneumonia, *PLOS One*, 2017 12(11):e0188251;

Beitrag im Einzelnen: Durchführung Tierstudie im *Acinetobacter baumannii* Infektionsmodell, Probenerhebung der Materialien aus Abbildung 4

---

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## 9.2 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## 9.3 Publikationsliste

### Originalarbeiten

Publikation: Sandra-Maria Wienhold\*, Markus C. Brack\*, Geraldine Nouailles, Gopinath Krishnamoorthy, Imke H. E. Korf, Claudius Seitz, Sarah Wienecke, Kristina Dietert, Corinne Gurtner, Olivia Kershaw, Achim D. Gruber, Anton Ross, Holger Ziehr, Manfred Rohde, Jens Neudecker, Jasmin Lienau, Norbert Suttorp, Stefan Hippenstiel, Andreas C. Hocke, Christine Rohde, Martin Witzentrath. Preclinical Assessment of Bacteriophage Therapy against Experimental *Acinetobacter baumannii* Lung Infection. *Viruses* 2022, 14(1):33; <https://doi.org/10.3390/v14010033> (1) \*gleicher Anteil

Publikation: Kristina Dietert, Birgitt Gutbier, Sandra M. Wienhold, Katrin Reppe, Xiaohui Jiang, Ling Yao, Catherine Chaput, Jan Naujoks, Markus Brack, Alexandra Kupke, Christin Peteranderl, Stephan Becker, Carolin von Lachner, Nelli Baal, Hortense Slevogt, Andreas C. Hocke, Martin Witzentrath, Bastian Opitz, Susanne Herold, Holger Hackstein, Leif E. Sander, Norbert Suttorp, Achim D. Gruber. Spectrum of pathogen- and model-specific histopathologies in mouse models of acute pneumonia. 2017; 12(11):e0188251. doi: 10.1371/journal.pone.0188251 (2)

### Poster/Vorträge

Poster: *Conference on Centennial Celebration of Bacteriophage Paris, 2017*

Titel: "Intratracheal application of lytic phages against *Acinetobacter baumannii* in an in vivo mouse lung model", Wienhold SM, Brack M, Nouailles-Kursar G, Suttorp N, Seitz C, Ross A, Ziehr H, Rohde C, Witzentrath M

Vortrag: *Centennial Celebration of Bacteriophage Research, Tbilisi, Georgien, 2017*

Titel: "Human Phage Application in Germany: new approaches", Christine Rohde, Sandra-Maria Wienhold, Markus Brack, Maia Merabishvili, Claudius Seitz, Anton Ross, Holger Ziehr, Johannes Wittmann, Manfred Rohde, Jörg Overmann, Martin Witzentrath

Poster: *Gemeinsame Jahrestagung der DGI/DZIF Hamburg, 2017*

Titel: "Intratracheal application of a lytic phage against *Acinetobacter baumannii* pneumonia in mice", Wienhold SM, Brack M, Nouailles G, Suttorp N, Seitz C, Ross A, Ziehr H, Dietert K, Gruber AD, Rohde M, Rohde C, Witzentrath M

Poster: *1st German Phage Symposium* Hohenheim, 2017

Titel: "Intratracheal application of a lytic phage against *Acinetobacter baumannii* pneumonia in mice", Wienhold SM, Brack M, Nouailles G, Suttorp N, Seitz C, Ross A, Ziehr H, Dietert K, Gruber AD, Rohde M, Rohde C, Witzernath M

und einmal in Teilen im Vortrag: "Bacteriophage therapy in lung infections", Witzernath M

Vortrag: *Herbsttagung der Sektionen Zellbiologie und Infektiologie und Tuberkulose der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V.* Gießen, 2017

Titel: "Therapeutic intratracheal application of a lytic phage against *Acinetobacter baumannii* lung infection in mice", Wienhold SM, Brack M, Nouailles G, Seitz C, Ross A, Ziehr H, Gurtner C, Dietert K, Gruber AD, Rohde M, Suttorp N, Rohde C, Witzernath M

Vortrag: *59. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V.* Dresden (einmal „Best of Herbsttagung der Sektionen Zellbiologie und Infektiologie“, einmal „Freie Vorträge der Sektion Zellbiologie“ und einmal in Teilen in der Session „Therapie der Zukunft“), 2018

Titel: „Therapeutic intratracheal application of a lytic phage against *Acinetobacter baumannii* lung infection in mice“, Wienhold SM, Brack M, Nouailles G, Seitz C, Ross A, Ziehr H, Gurtner C, Dietert K, Gruber AD, Rohde M, Suttorp N, Rohde C, Witzernath M (Best of Herbsttagung und Freier Vortrag),

Titel: „Therapie der Zukunft: Bakteriophagen“, Wienhold SM

Poster: *38. International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine* Brüssel (POSTER), 2018

Titel: "Phage-based therapy against *Acinetobacter baumannii* lung infection in mice" Wienhold SM, Brack M, Rohde C, Nouailles G, Seitz C, Ross A, Ziehr H, Dietert K, Gurtner C, Kershaw O, Gruber AD, Rohde M, Suttorp N, Witzernath M

Poster: *ATS Conference 2018 der American Thoracic Society* San Diego, 2018

Titel: „Intratracheal phage therapy against *Acinetobacter baumannii* lung infection in mice" Wienhold SM\*, Brack M\*, Rohde C, Nouailles G, Seitz C, Ross A, Ziehr H<sup>3</sup>, Dietert K, Gurtner C, Kershaw O, Gruber AD, Rohde M, Suttorp N, Witzernath M

Poster: *ERS International Congress 2018*, Paris, 2018

Titel: "Therapeutic intratracheal phage application against *Acinetobacter baumannii* lung infection in mice", S. M. Wienhold, M. Brack, G. Nouailles, C. Seitz, A. Ross, H. Ziehr, K. Dietert, C. Gurtner, O. Kershaw, A. D. Gruber, M. Rohde, N. Suttorp, C. Rohde, M. Witzernath

## Publikationsliste

Vortrag: 16<sup>th</sup> Medical Biodefense Conference 2018, München, 2018

Titel: "Intratracheal phage application against *Acinetobacter baumannii* lung infection", Wienhold SM\*, Brack MC\*, Nouailles G, Seitz C, Ross A, Ziehr H, Dietert K, Gurtner C, Kershaw O, Gruber AD, Hocke AC, Hippenstiel S, Neudecker J, Rohde M, Suttorp N, Rohde C, Witzentrath M

Vortrag: North Regio Day on Infection VIII, 2018, Braunschweig

Titel: "Phage application against *Acinetobacter baumannii* lung infection" Wienhold SM\*, Brack MC\*, Nouailles G, Seitz C, Ross A, Ziehr H, Dietert K, Kershaw O, Gruber AD, Hocke AC, Hippenstiel S, Neudecker J, Rohde M, Suttorp N, Rohde C, Witzentrath M

Poster: DZL Annual Meeting 2020, Travemünde, 2019

Titel: "Experimental phage application against *Acinetobacter baumannii* lung infection" Sandra-Maria Wienhold, Markus C. Brack, Geraldine Nouailles, Claudius Seitz, Anton Ross, Holger Ziehr, Kristina Dietert, Olivia Kershaw, Achim D. Gruber, Andreas C. Hocke, Stefan Hippenstiel, Jens Neudecker, Manfred Rohde, Norbert Suttorp, Christine Rohde, and Martin Witzentrath

### Arbeiten Dritter

*Proben, die im Rahmen der vorliegenden Dissertation generiert wurden (histologisch aufbereitetes Lungengewebe), wurden in der Arbeit von Frau Petrick weiter charakterisiert.*

Dissertation: Anne Petrick. In situ Phänotypisierung von Makrophagen in akuten Entzündungsreaktionen. FU Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin. 2022; <http://dx.doi.org/10.17169/refubium-32872> (138)



## 9.4 Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die tatkräftige Unterstützung zahlreicher Personen niemals möglich gewesen.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Martin Witzenrath für die Vergabe dieses faszinierenden Dissertationsthemas und die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Labor durchzuführen, danken.

Weiterer Dank gilt meiner Zweitbetreuerin Frau Dr.-Ing. Geraldine Nouailles-Kursar, die stets ein offenes Ohr für Sorgen und Probleme hatte und auch in schwierigen Phasen für den nötigen „Motivations-Schub“ sorgen konnte. Mein Dank gilt auch Frau Dr. Jasmin Lienau, die durch ihre langjährige Erfahrung und ihr geübtes Auge wertvolle Hilfestellungen bei der Korrektur der Dissertationsschrift leistete.

Zum Gelingen der experimentellen Phase dieser Arbeit hat die die Unterstützung eines großen Laborteams beigetragen. Darunter besonders zu nennen sind Frau Dr. Birgitt Gutbier und Frau Dr. Katrin Reppe, die durch die Leitung der versuchsbezogenen Tierhaltung stets für jede Art von Problem Ansprechpartnerinnen waren und auch wertvolle technische Unterstützung geleistet haben, insbesondere beim Erlernen der anspruchsvollen Intubation der Tiere. Auch für die Unterstützung durch die technischen Laborassistentinnen Frau Ulrike Behrendt, Frau Silke Dusatko und Frau Denise Barthel, insbesondere bei der Durchführung der ELISA für die Proben aus den Experimenten in der humanen Lunge, möchte ich mich sehr herzlich bedanken. Zu guter Letzt danke ich dem übrigen Laborteam der AG Witzenrath, AG Hocke und AG Opitz für ihre Rücksichtnahme und Verständnis speziell bei unseren teils exzessiven Hygiene- und Desinfektionsmaßnahmen.

An dieser Stelle geht mein herzlichster Dank an Frau Dr. Sandra-Maria Wienhold, die die beste Betreuung einer experimentellen Arbeit geleistet hat, die man sich nur wünschen kann. Ich möchte ihr sehr herzlich für ihre Unterstützung und die gemeinsame Arbeit auf Augenhöhe danken.

Meiner Familie danke ich für ihre unermüdliche und liebevolle Unterstützung während der gesamten Zeit dieser experimentellen Doktorarbeit.

Ein abschließender Dank gilt der Jürgen Manchot Stiftung in Düsseldorf, ohne deren großzügiges Doktorandenstipendium diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

## 9.5 Bescheinigung des akkreditierten Statistikers



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie (iBikE)

Direktor: Prof. Dr. Geraldine Rauch

Name, Vorname: Brack, Markus

Emailadresse: [REDACTED]

Matrikelnummer: [REDACTED]

PromotionsbetreuerIn: Prof. Dr. Martin Witzentrath

Promotionsinstitution/Klinik: Fächerverbund Infektiologie,

Pneumologie und Intensivmedizin

Postanschrift:  
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin  
Besucheranschrift:  
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin  
Tel. +49 (0)30 450 562171  
geraldine.rauch@charite.de  
<https://biometrie.charite.de/>



### Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Herr Markus Brack innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und Klinische Epidemiologie (iBikE) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 04.10.2018
- Termin 2: 03.02.2023

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Graphische Darstellung mittels Boxplots und Dotplots statt Barplots
- Statistisches Testen: Möglichkeit von Äquivalenz-Test zur Testung von Gleichheit, Two-Way-(repeated-measures)-Anova und Rangverfahren bei nicht äquidistanten Messungen

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum: 10.02.2023



Name des Beraters: [REDACTED]

Unterschrift BeraterIn, Institutsstempel