

Aus dem Fächerverbund für Infektiologie, Pneumologie
und Intensivmedizin der Charité – Universitätsmedizin Berlin

Eingereicht über das Institut für Tierpathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Experimentelle Bakteriophagen-Therapie bei Infektionen
von Lungenmodellen mit *Pseudomonas aeruginosa***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Moritz Vollgraf
Tierarzt aus Dortmund

Berlin 2024
Journal-Nr.: 4446

Fächerverbund für Infektiologie, Pneumologie und Intensivmedizin der
Charité – Universitätsmedizin Berlin

Eingereicht über das Institut für Tierpathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Experimentelle Bakteriophagen-Therapie bei Infektionen von
Lungenmodellen mit *Pseudomonas aeruginosa***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Moritz Vollgraf

Tierarzt aus Dortmund

Berlin 2024

Journal-Nr.: 4446

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Achim Gruber, Ph.D. (Cornell Univ.)
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Martin Witzernath
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Bäumer

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

mice, animal models, pseudomonas aeruginosa, experimental infection, lungs,
cell culture, bacteriophages, therapy

Tag der Promotion: 22.05.2024

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-254-1

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2024

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2024 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für meine Familie

Inhalt

Tabellen	V
Abbildungen	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
2. Literatur	3
2.1. Pneumonie	3
2.1.1. Aufbau der Lunge und ihre Abwehrmechanismen	3
2.1.2. Die nosokomiale Pneumonie des Menschen	6
2.2. Multiresistente Erreger	7
2.2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
2.2.2. Virulenzfaktoren	9
2.2.3. Resistenzsituation und Therapie.....	11
2.3. Bakteriophagen	13
2.3.1. Vermehrungszyklus.....	14
2.3.2. Phagentherapie.....	16
2.4. Arbeitshypothese, Ziele und experimentelle Strategie des Dissertationsprojektes.....	20
3. Material und Methoden	21
3.1. Material	21
3.1.1. Bakterien	21
3.1.2. Phagen und Referenzlösung.....	22
3.1.3. Verbrauchsmaterialien	23
3.1.4. Reagenzien und Nährmedien	25
3.1.5. Kits	26
3.1.6. Antikörper.....	27
3.1.7. Geräte	28
3.1.8. Software und Online-Dienste	30

3.2. Methoden	30
3.2.1. Anzucht von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
3.2.2. Phagentiterbestimmung (Double-Agar-Overlay)	31
3.2.3. Herstellung von Phagenlysat	31
3.2.4. Aerosolierung	32
3.2.5. <i>In-vitro</i> -A549 Zellinfektionsmodell	33
3.2.6. <i>Ex-vivo</i> -Experimente an humanem Lungengewebe	34
3.2.7. Modell der murinen Pseudomonadenpneumonie	38
3.2.8. Bestimmung der Erregerlast	44
3.2.9. Blutverarbeitung	44
3.2.10. Bestimmung von Phagentitern aus Lungen-, Milz- und BAL-Proben.....	45
3.2.11. Ermittlung der pulmonalvaskulären Permeabilität.....	45
3.2.12. Quantifizierung der Zytokine in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit und im Blut.....	46
3.2.13. Durchflusszytometrische Analyse	46
3.2.14. Histologische Untersuchungen	48
3.2.15. Auswertung und Darstellung der Ergebnisse.....	48
4. Ergebnisse	51
4.1. Die Aerosolierung des Phagencocktails führt zu einem Titerverlust von durchschnittlich 15,65 %	51
4.2. Die Phagen zeigen weder einen additiven noch protektiven Effekt auf die LDH- Freisetzung aus A549 Zellen	52
4.3. Effekte der Phagenbehandlung auf die Infektion mit <i>P. aeruginosa</i> im <i>ex vivo</i> humanen Lungengewebe Modell	53
4.3.1. Eine einmalige Behandlung des Lungengewebes mit den Einzelphagen JG005 und JG024 in der hohen Dosis führt zur Reduktion des bakteriellen Wachstums	53
4.3.2. Eine einmalige Behandlung des Lungengewebes mit dem Phagencocktail führt zur Reduktion des bakteriellen Wachstums in Abhängigkeit von Dosis und Zeit	55
4.3.3. Die Phagentiter der einzelnen Phagen bleiben im Lungengewebe über 24 Stunden stabil und erhöhen sich bei vorhandenen Bakterien.....	57

4.3.4.	Die Phagentiter des Phagencocktails bleiben im Lungengewebe über 24 Stunden stabil und erhöhen sich bei vorhandenen Bakterien.....	59
4.3.5.	Die Behandlung mit den einzelnen Phagen führt zu einer erhöhten Ausschüttung des Zytokins IL-1 β in mit PA74 infiziertem humanem Lungengewebe.....	61
4.3.6.	Die IL-1 β Freisetzung nach Phagencocktail-Behandlung ist abhängig vom Infektionsstamm	63
4.4.	Modell der murinen Pseudomonadenpneumonie	65
4.4.1.	Die Phagenbehandlung zeigt keinen Effekt auf Körpergewichtsveränderungen	65
4.4.2.	Die Hypothermie der infizierten Tiere wird durch die Phagenapplikation sechs Stunden nach Behandlung verbessert.....	66
4.4.3.	Die bakterielle Last wird durch die Phagenbehandlung 12 Stunden <i>p.i.</i> reduziert	67
4.4.4.	Phagen sind nachweisbar in allen untersuchten Proben	68
4.4.5.	Die Phagenbehandlung hat keinen Einfluss auf die Lungengefäßpermeabilität	69
4.4.6.	Der Anteil polymorphkerniger Leukozyten in der bronchioalveolären Lavage ist bei scheininfizierten und phagenbehandelten Tieren zu allen Zeitpunkten erhöht.....	70
4.4.7.	Nach Phagenbehandlung kommt es zu keiner systemischen Erhöhung der Leukozyten infolge der Infektion	73
4.4.8.	Die Applikation des Phagencocktails nach Infektion beeinflusst die Zytokinkonzentrationen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit.....	76
4.4.9.	Die Applikation des Phagencocktails führt zu lokal erhöhten Werten von GM-CSF 12 Stunden nach der Scheininfektion in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit.....	78
4.4.10.	Die Verabreichung des Phagencocktails beeinflusst die systemischen Zytokinkonzentrationen	80
4.4.11.	Die Verabreichung des Phagencocktails führt 24 Stunden <i>post infectionem</i> zu einer erhöhten systemischen Konzentration von GM-CSF	82
4.4.12.	Die Applikation des Phagencocktails konnte den Grad der Entzündung und die Ödembildung infolge der Infektion mit <i>P. aeruginosa</i> nicht verringern	83

4.4.13. Scheininfizierte Tiere weisen minimal bis geringgradig neutrophile alveoläre sowie perivaskuläre und peribronchiale Infiltrate unabhängig von der Behandlungsgruppe auf	85
5. Diskussion	87
6. Zusammenfassung.....	95
7. Summary	97
8. Literaturverzeichnis	99
Vorab-Publikationen	XI
Befangenheitserklärung/Interessenskonflikt	XII
Finanzierungsquellen	XIII
Danksagung.....	XIV
Selbstständigkeitserklärung	XV

Tabellen

Tabelle 1: Details der verwendeten Phagenzubereitungen.....	23
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	23
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Narkosemittel und Antikoagulantien	25
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Reagenzien und Nährmedien.....	25
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Kits.....	26
Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Antikörper	27
Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Geräte.....	28
Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Software und Online-Dienste.....	30
Tabelle 9: Versuchsgruppen Aerosolierung	32
Tabelle 10: Versuchsgruppen <i>In-vitro</i> -A549 Zellinfektionsmodell	34
Tabelle 11: Versuchsgruppen des <i>Ex-vivo</i> -Lungeninfektionsmodells	36
Tabelle 12: Versuchsgruppen der tierexperimentellen Untersuchungen	38
Tabelle 13: Handlungsanweisung zur klinischen Beurteilung von Versuchstieren	41

Abbildungen

Abbildung 1: Vermehrungszyklus der Bakteriophagen	16
Abbildung 2: Schematischer Versuchsablauf der <i>P. aeruginosa</i> Infektion des humanen Lungengewebes im <i>Ex-vivo</i> -Modell.....	36
Abbildung 3: Versuchsablauf der tierexperimentellen Untersuchungen.....	39
Abbildung 4: Exemplarische Differenzierung und Quantifizierung von Lungenzellen	47
Abbildung 5: Phagentiter nach Aerosolierung mittels Mesh Vernebler	51
Abbildung 6: Zytotoxische Wirkung des Phagencocktails und des Bakteriums PA74 auf A549 Zellen.....	52
Abbildung 7: Bakterienlast im <i>Ex-vivo</i> -Lungenmodell über einen Zeitraum von 24 Stunden nach Applikation der drei Einzelphagen	54
Abbildung 8: Bakterienlast im <i>Ex-vivo</i> -Lungenmodell über einen Zeitraum von 24 Stunden nach Applikation des Phagencocktails	56
Abbildung 9: Phagentiter im <i>Ex-vivo</i> -Lungenmodell über einen Zeitraum von 24 Stunden nach Applikation der Einzelphagen	58
Abbildung 10: Phagentiter im <i>Ex-vivo</i> -Lungenmodell über einen Zeitraum von 24 Stunden nach Applikation des Phagencocktails.....	60
Abbildung 11: IL-1 β Freisetzung im <i>Ex-vivo</i> -Lungenmodell im Zeitraum von 24 Stunden nach Applikation der drei Einzelphagen.....	62
Abbildung 12: IL-1 β Freisetzung im <i>Ex-vivo</i> -Lungenmodell im Zeitraum von 24 Stunden nach Applikation des Phagencocktails.....	64
Abbildung 13: Zeitlicher Verlauf des Körpergewichts in % bezogen auf das Ursprungsgewicht im murinen Pneumoniemodell.....	65
Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der Körpertemperatur in °C im murinen Pneumoniemodell.....	66
Abbildung 15: Bakterienlast in der Lunge und der bronchoalveolären Lavage im murinen Pneumoniemodell	67
Abbildung 16: Phagentiter in der Lunge, bronchoalveolären Lavageflüssigkeit und Milz im murinen Pneumoniemodell	68
Abbildung 17: Pulmonalvaskuläre Permeabilität im murinen Pneumoniemodell	69
Abbildung 18: Leukozytenpopulationen in der bronchoalveolären Lavage im murinen Pneumoniemodell	71
Abbildung 19: Leukozytenpopulationen und Hämatokrit im Blut im murinen Pneumoniemodell	74

Abbildung 20: Konzentrationen von Zytokinen im Alveolarraum im murinen Pneumoniemodell	77
Abbildung 21: Konzentrationen von Chemokinen und Wachstumsfaktoren im Alveolarraum im murinen Pneumoniemodell.....	79
Abbildung 22: Systemische Konzentrationen von Zytokinen im murinen Pneumoniemodell	81
Abbildung 23: Systemische Konzentrationen von Chemokinen und Wachstumsfaktoren im murinen Pneumoniemodell.....	82
Abbildung 24: Semiquantitative Bewertung der histopathologischen Veränderungen im murinen Pneumoniemodell	84
Abbildung 25: Histopathologischer Vergleich der beiden scheininfizierten Gruppen im murinen Pneumoniemodell	85

Abkürzungsverzeichnis

<i>ADP</i>	<i>Adenosindiphosphat</i>
<i>AMP</i>	<i>antimikrobielle Peptide</i>
<i>BAL</i>	<i>bronchoalveoläre Lavage</i>
<i>CF</i>	<i>Mukoviszidose (cystic fibrosis)</i>
<i>COPD</i>	<i>chronisch obstruktive Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary disease)</i>
<i>CSF</i>	<i>koloniestimulierende Faktoren (colony-stimulating factors)</i>
<i>DC</i>	<i>dendritische Zellen (dendritic cells)</i>
<i>ELISA</i>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<i>FACS</i>	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
<i>HAP</i>	<i>nosokomiale Pneumonie (hospital-acquired pneumonia)</i>
<i>HSA</i>	<i>humanes Serumalbumin</i>
<i>i.p.</i>	<i>intraperitoneal</i>
<i>i.t.</i>	<i>intratracheal</i>
<i>i.v.</i>	<i>intravenös</i>
<i>IFN</i>	<i>Interferon</i>
<i>Ig</i>	<i>Immunglobulin</i>
<i>IL</i>	<i>Interleukin</i>
<i>ILC</i>	<i>angeborene lymphatische Immunzellen (innate lymphoid cells)</i>
<i>KbE</i>	<i>koloniebildende Einheit</i>
<i>LDH</i>	<i>Laktatdehydrogenase</i>
<i>LOD</i>	<i>Nachweisgrenze (limit of detection)</i>

<i>LPS</i>	<i>Lipopolysaccharid</i>
<i>MOI</i>	<i>Multiplizität der Infektion</i>
<i>MSA</i>	<i>murines Serumalbumin</i>
<i>NK</i>	<i>natürliche Killerzellen</i>
<i>OD</i>	<i>Optische Dichte</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>p.i.</i>	<i>post infectionem</i>
<i>PA70</i>	<i>klinisches Isolat von P. aeruginosa, DSM 107570</i>
<i>PA74</i>	<i>klinisches Isolat von P. aeruginosa, DSM 107574</i>
<i>PFU</i>	<i>Plaque-bildende Einheiten (plaque-forming unit)</i>
<i>PMN</i>	<i>polymorphkernige Leukozyten (polymorphonuclear leukocytes)</i>
<i>proIL-1β</i>	<i>Vorläuferform von IL-1β</i>
<i>RBC</i>	<i>rote Blutkörperchen (red blood cells)</i>
<i>SD</i>	<i>Standardabweichung (standard deviation)</i>
<i>Softagar</i>	<i>niedrigschmelzender Agar</i>
<i>TMB</i>	<i>Tetramethylbenzidin</i>
<i>TNF</i>	<i>Tumornekrosefaktor</i>
<i>TSB</i>	<i>Trypticase Soja-Boullion</i>

1. Einleitung

Angesichts des Auftretens von immer mehr multiresistenten Bakterien (Unempfindlichkeit gegenüber mehreren Antibiotikaklassen) und der zunehmenden Unwirksamkeit bestehender Medikamente besteht ein Bedarf an neuen Behandlungsmöglichkeiten. Ein Beispiel dieser Bakterien ist *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), ein gramnegatives Bakterium, das für eine Reihe nosokomialer Infektionen, insbesondere Pneumonien, und den rasanten Erwerb von multiplen Resistenzen bekannt ist (Pang et al. 2019). Infektionen mit diesem Erreger führen bei Patienten und Patientinnen mit Mukoviszidose, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung oder immungeschwächten Personen oft zu Krankheitsverläufen mit einer hohen Mortalität (Winstanley et al. 2016; Garcia-Nuñez et al. 2017; Wunderink und Waterer 2017). Eine vielversprechende mögliche Alternative oder zusätzliche Therapieform sind die Bakteriophagen, kurz Phagen. Bakteriophagen sind Viren, die nur Bakterienzellen infizieren, diese lysieren und sich so vermehren. Schon vor über 100 Jahren, kurz nach der Entdeckung dieser Partikel durch Frederick Twort und Felix d'Herelle, wurden Phagen als potenzielle Therapieform für die Behandlung von bakteriellen Infektionen getestet (Twort 1915; D'herelle 1917). Da die Phagen andere Mechanismen als Antibiotika benutzen, um Bakterien zu infizieren und sie abzutöten, wirken die Antibiotikaresistenzmechanismen der Bakterien nicht gegen die Phagen. Phagen können daher theoretisch gegen antibiotikaresistente bakterielle Infektionen eingesetzt werden (Loc-Carrillo und Abedon 2011). Da die Bakteriophagentherapie aber lediglich in Osteuropa bzw. den Staaten der ehemaligen Sowjetunion (speziell in Georgien und Polen) empirisch an Patienten und Patientinnen fortgeführt wurde, verfügen nur diese Länder heutzutage über eine große praktische Erfahrung im therapeutischen Einsatz von Bakteriophagen (Schmidt 2019). Um diese Therapieform auch in Deutschland in breiter Form durchführen zu können, fehlt es derzeit an der offiziellen Zulassung durch die entsprechenden Behörden, da u. a. notwendige Studien zu Wirksamkeit und vor allem Sicherheit fehlen (Cafilisch et al. 2019), insbesondere in Bezug auf Infektionen hervorgerufen durch gramnegative Bakterien mit dem Risiko einer Endotoxämie (Dickson und Lehmann 2019). An dieser Stelle soll dieses Dissertationsprojekt einen wichtigen Beitrag leisten: Obwohl allgemein anerkannt ist, dass Phagen in der Lage sind (antibiotikaresistente) Bakterien unter Laborbedingungen zu lysieren, so ist nur wenig darüber bekannt, welche Immunreaktionen Phagen im Zielgewebe, wie beispielsweise der Lunge, auslösen können. Kenntnis darüber ist jedoch essenziell, um die Sicherheit der Phagentherapie beurteilen und sie auch am Menschen einsetzen zu können. Ziel dieses Promotionsvorhabens war es, die Sicherheit und Verträglichkeit eines Bakteriophagencocktails in der Behandlung gegen eine Lungeninfektion mit *P. aeruginosa* präklinisch zu evaluieren. Im Rahmen des vorliegenden Dissertationsprojektes wurden daher die Bakteriophagen gegen *P. aeruginosa* *in vivo* im murinen Pneumonie-Modell

und *ex vivo* im Lungengewebekultur-Modell untersucht. Es wurden histologische (Färbung und mikroskopische Beurteilung), mikrobiologische (Anzucht und Auszählung von Bakterien und Phagen) und molekularbiologische Techniken wie *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) und Durchflusszytometrie (engl.: *Fluorescence Activated Cell Sorting*, FACS) angewendet. Dieses Promotionsvorhaben ist Teil des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten Verbundprojekts Phage4Cure, dessen langfristiges Ziel es ist, Bakteriophagen als Arzneimittel zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen zu etablieren und ihre arzneimittelrechtliche Zulassung zu erreichen.

2. Literatur

2.1. Pneumonie

2.1.1. Aufbau der Lunge und ihre Abwehrmechanismen

Die Lunge gehört zum Atmungssystem und hat im Wesentlichen die Aufgabe, das Blut mit Sauerstoff zu versorgen und Kohlendioxid abzuführen (Chaudhry und Bordoni 2022). Die Atmungsorgane lassen sich in einen oberen und einen unteren Respirationstrakt aufteilen. Der obere Trakt umfasst die Nase, die Nasenhöhlen, die Nasennebenhöhlen, den Rachen und den oberen Teil des Kehlkopfes bis zu den Stimmlippen. Zum unteren Respirationstrakt werden der untere Teil des Kehlkopfes, die Luftröhre, die Bronchien, die Bronchiolen und die Alveolen gezählt (Gilroy et al. 2008). Die Lunge des Menschen ist paarig angelegt. Die linke Lunge besteht aus zwei Lappen (*Lobi*): dem linken Oberlappen und dem linken Unterlappen. Hingegen besteht die rechte Lungenseite aus dem rechten Oberlappen, dem rechten Mittellappen und dem rechten Unterlappen, somit also aus drei Lappen (Chaudhry und Bordoni 2022). Die Lunge der Maus besteht ebenfalls aus insgesamt fünf Lappen, wobei hier nur ein Lappen auf der linken Seite und die restlichen vier Lappen auf der rechten Seite zu finden sind (Irvin und Bates 2003). Die Hauptbronchien der beiden Lungenpaare verbinden diese mit der Trachea. Die sogenannte Bifurkation ist der erste von 23 Verzweigungspunkten der sich verzweigenden Atemwege des unteren Atmungstraktes (Gilroy et al. 2008). Die oberen Verzweigungen fungieren lediglich als Luftkanäle, um die Luft über die *Bronchioli respiratorii* zu den *Ducti alveolares* und den Alveolen zu bringen, in denen der Gasaustausch stattfindet (Patwa und Shah 2015). Laut Irvin und Bates könnte sich der kleinere Durchmesser der Alveolen und die dünnere Blut-Luft-Schranke der Mäuse verglichen mit denen des Menschen auf den Gasaustausch auswirken (Irvin und Bates 2003). Da die Lunge das größte Kontaktorgan unseres Körpers zur atmosphärischen Umwelt ist, benötigt sie ein stark ausgeprägtes und effizientes Abwehr- und Reinigungssystem. Die eingeatmeten Schadstoffe wie Bakterien, Viren oder andere inhalative Noxen müssen bei einer täglichen Durchströmung der Lunge von bis zu 15.000 bis 20.000 Liter eliminiert werden. Dafür hat der Körper mehrere verschiedene Abwehrmechanismen entwickelt (Costabel und Kroegel 1988). Im Folgenden wird auf die für diese Arbeit relevanten Mechanismen genauer eingegangen.

➤ **Physikalische Abwehrmechanismen und antimikrobielle Peptide**

Der obere Atemtrakt und die Verzweigungen der Atemwege stellen eine wichtige physikalische Barriere dar, die verhindert, dass Partikel größer als 5 µm in die unteren Atemwege gelangen können. Weiterhin sind die Atemwege mit einer mukoziliären Schicht ausgekleidet. Diese

enthält Muzine, die Mikroorganismen binden. Durch Husten- und Niesreflex oder durch Zilienbewegungen der Epithelzellen können Partikel oder infizierter Mukus wieder aus den Atemwegen entfernt werden (Widdicombe 1995; Zhang et al. 2000). Dieser Fluss des Mukus wird als mukoziliärer Transport bezeichnet (Nicod 2005). Partikel kleiner als 5 µm können diese Abwehrmechanismen jedoch umgehen und so in die unteren Atemwege gelangen. Dazu gehören auch die meisten Bakterien einschließlich Mykobakterien, daher sind zusätzliche Abwehrmechanismen erforderlich. Eine Vielzahl an antimikrobiellen Peptiden (AMP) wird von den Zellen der oberen und unteren Atemwege produziert. Zu diesen gehören unter anderem: Lysozym, Komplement, Immunglobulin (Ig) A und G (IgA und IgG), Fibronectin, Lactoferrin, Transferrin, Lipopolysaccharid (LPS)-bindendes Protein, Defensine, Cathelicidine und Collectine (Zhang et al. 2000). Die IgA können nicht nur Toxine und Viren neutralisieren, sondern auch Bakterien daran hindern, durch das Epithel zu gelangen (Underdown und Schiff 1986). Die AMP können direkt antimikrobiell auf die Mikroorganismen wirken, indem sie die Zellmembranen der Mikroorganismen zerstören oder sie können indirekt regulatorisch auf das Immunsystem einwirken (Yang et al. 2002; Guaní-Guerra et al. 2010).

➤ **Reaktion des angeborenen Immunsystems**

Das angeborene Immunsystem stellt die nächste Barrierestufe der Lunge dar, falls die vorherigen Abwehrmechanismen überwunden werden konnten. Dazu zählen die Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, angeborene lymphatische Immunzellen (*innate lymphoid cells*, ILC) inklusive der natürlichen Killerzellen (NK) und dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DC) sowie das humorale Komplementsystem (Hartl et al. 2018). Makrophagen, Monozyten und neutrophile Granulozyten verfügen über die Fähigkeit, Keime zu phagozytieren und werden daher auch als Phagozyten bezeichnet. Die Abwehr von Parasiten übernehmen die eosinophilen und basophilen Granulozyten. Sie spielen außerdem bei der Steuerung von allergischen Reaktionen eine wichtige Rolle (Rink et al. 2012). NK haben die Aufgabe, entartete Zellen wie Tumorzellen zu erkennen und zu eliminieren (Claus et al. 2009). DC haben die Funktion, Antigene an T-Zellen zu präsentieren. Damit haben sie eine besondere Bedeutung für die Aktivierung des erworbenen Immunsystems (Rink et al. 2012).

➤ **Reaktion des erworbenen Immunsystems**

Sollte das angeborene Immunsystem nicht in der Lage sein, das Pathogen erfolgreich zu bekämpfen, dann entwickelt sich im peripheren lymphatischen Gewebe die adaptive Immunantwort. Dies dauert allerdings einige Tage, da die T- und B-Lymphozyten ihrem spezifischen Antigen begegnen müssen, um sich dann zu vermehren und sich zu Effektorzellen zu differenzieren (Murphy und Weaver 2018). Der Name der Lymphozyten wird ihrem Ort der

Reifung im Thymus oder Knochenmark (engl.: *Bone marrow*) zugeordnet, wobei die B-Lymphozyten ursprünglich nach der *Bursa Fabricii* der Vögel benannt wurden (Ribatti et al. 2006).

➤ **Zytokine**

Als Zytokine werden Signalmoleküle bezeichnet, welche von Zellen sowohl des angeborenen als auch erworbenen Immunsystems gebildet werden und auf andere Zellen aktivierend oder hemmend wirken. Zytokine können auf die Zellen wirken, die sie absondern (autokrine Wirkung), auf nahe gelegene Zellen (parakrine Wirkung) oder auf weit entfernte Zellen (endokrine Wirkung; Zhang und An 2007). Zytokine lassen sich in Interleukine (IL), Interferone (IFN), Tumornekrosefaktoren (TNF), Chemokine und koloniestimulierende Faktoren (*colony-stimulating factors*, CSF) einteilen (Borish und Steinke 2003). Bei der pulmonalen Abwehr gehören laut Zhang et al. TNF- α , IL-10, IL-12 und IFN- γ zu den wichtigsten Zytokinen (Zhang et al. 2000).

TNF- α gilt als Vermittler der Reaktion des Wirts auf eine Infektion. Da es sehr schnell nach Stimulierung produziert wird, wird es auch als Alarm-Zytokin bezeichnet (Zhang et al. 2000). LPS, eine Zellwandkomponente von gramnegativen Bakterien, induziert eine starke TNF- α Ausschüttung von Alveolarmakrophagen (Mukhopadhyay et al. 2006). Laut Zhang et al. deuten diverse Studien daraufhin, dass diese TNF- α Ausschüttung von Alveolarmakrophagen ein wichtiger proximaler Mediator bei der Rekrutierung von polymorphkernigen Leukozyten (*polymorphonuclear leukocytes*, PMN) in der Lunge sein könnte. Des Weiteren ist die TNF- α Reaktion weitestgehend auf das betroffene Areal beschränkt (Zhang et al. 2000).

IL-10 ist ein wichtiger Immunregulator, der eine stark antiinflammatorische Wirkung hat und die exzessiven Typ-1-T-Helferzelle und CD8+-T-Zell-Reaktionen (meist ausgelöst durch die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN- γ) hemmt. Dadurch verhindert IL-10 Gewebeschäden, die im Rahmen von Infektionen durch eine zu starke inflammatorische Reaktion auftreten können (Couper et al. 2008). Außerdem senkt IL-10 direkt die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen und ist wie TNF- α weitestgehend auf ein Kompartiment beschränkt (Zhang et al. 2000).

IL-12 ist ein heterodimeres proinflammatorisches Zytokin, welchem eine wichtige Rolle bei der pulmonalen Wirtsabwehr zukommt (Zhang et al. 2000). Es regt die Produktion von IFN- γ an, fördert die Differenzierung von T-Helferzellen und stellt ein Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunantwort dar. Als Reaktion auf Pathogene während einer Infektion wird IL-12 von dendritischen Zellen und Phagozyten produziert (Trinchieri 2003).

IFN- γ (ursprünglich Makrophagen-aktivierender Faktor genannt) stimuliert Makrophagen und führt dadurch zu direkten antimikrobiellen und antitumoralen Prozessen sowie zur Hochregulierung von Antigenverarbeitungs- und -präsentationswegen (Schroder et al. 2004). Es ist wie TNF- α und IL-10 vor allem auf das Areal beschränkt, indem es produziert wurde, primär gebildet von T-Zellen oder NK-Zellen (Zhang et al. 2000). Des Weiteren lockt IFN- γ Leukozyten an und steuert das Wachstum und Differenzierung diverser Zellen (Mach et al. 1996).

Zudem ist IL-1 β als zentraler Botenstoff an akuten und chronischen Entzündungen und dadurch auch an der Pneumonie beteiligt (Kolb et al. 2001). IL-1 β wird aus seiner Vorläuferform (proIL-1 β) synthetisiert, indem durch ein spezifisches IL-1 β -umwandelndes Enzym (ICE oder Caspase-1) oder durch Proteasen wie Matrix-Metalloprotease-9 (MMP-9 oder Gelatinase B) proIL-1 β gespalten wird (Lappalainen et al. 2005). Es wird primär von Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Monozyten und Makrophagen, produziert und sezerniert, doch auch andere Zelltypen, wie Fibroblasten und Endothelzellen, produzieren es bei Zellschädigung durch Infektion, Invasion oder Entzündung (Zhang und An 2007; Lopez-Castejon und Brough 2011). Über die Bindung an Interleukin-1 Rezeptoren wirkt IL-1 β über verschiedene Wege auf entzündungsfördernde Prozesse (Dinarello 2009).

2.1.2. Die nosokomiale Pneumonie des Menschen

Bei einer Pneumonie handelt es sich um eine entzündliche Erkrankung der unteren Atemwege. Durch Viren, Bakterien, Pilze oder andere inhalative Noxen kann es zur Infektion des Lungengewebes kommen (Hisatomi et al. 2006; Musher et al. 2017). Dabei besteht die Möglichkeit eines akuten oder chronischen Verlaufs und die Infektion kann sich auf den interstitiellen oder alveolären Bereich der Lunge beziehen. Die Entzündung zeichnet sich durch eine Verdichtung des Gewebes aus, wodurch es zur Verminderung des Gasaustausches kommt (McGavin und Zachary 2009).

➤ Epidemiologie

Nosokomiale Infektionen sind eine der häufigsten Komplikationen bei Krankenhausaufenthalten und führen zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität (Aranaz-Andrés et al. 2008; Geffers et al. 2008). Laut einer amerikanischen Studie treten die Lungenentzündungen mit einem Anteil von 21,8 % an allen nosokomialen Infektionen am häufigsten auf (Magill et al. 2014). Auch die deutsche nationale Prävalenzstudie von 2011 kommt auf einen Anteil von 21,7 % Pneumonien (Nationales Referenzzentrum Für Surveillance Von Nosokomialen Infektionen 2011). Laut Gastmeier und Geffers traten im Jahr 2006 in Deutschland ca. 400.000

bis 600.000 nosokomiale Infektionen auf (Gastmeier und Geffers 2008). Daraus resultieren ca. 86.000 bis 130.000 nosokomiale Pneumonien (Nationales Referenzzentrum Für Surveillance Von Nosokomialen Infektionen 2011). Laut Cassini et al. versterben in Europa pro Jahr ca. 27.000 Menschen an einer nosokomialen Pneumonie (*hospital-acquired pneumonia*, HAP; Cassini et al. 2016). Sollten Inzidenz und Letalität gleichermaßen in Europa verteilt sein, so resultieren daraus laut Dalhoff et al. ca. 4.300 Todesfälle in Deutschland pro Jahr verursacht durch HAP (Dalhoff et al. 2018).

➤ **Erreger**

In den meisten Fällen sind Bakterien als Erreger für HAP verantwortlich, selten auch Pilze oder Viren (Dalhoff et al. 2018). In vielen Fällen kommt es zu einer polymikrobiellen bakteriellen Infektion. Infektionen mit aeroben und fakultativ anaeroben gramnegativen Stäbchenbakterien, wie z. B. *P. aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* oder *Acinetobacter baumannii*, kommen am häufigsten vor (Dalhoff et al. 2018). *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae* sind unter den grampositiven Erregern die häufigsten Vertreter (Dalhoff et al. 2018).

2.2. Multiresistente Erreger

Antibiotikaresistente Bakterienstämme treten immer häufiger auf, und einige sind gegen mehrere Antibiotika und Chemotherapeutika resistent geworden, was als Multiresistenz bezeichnet wird. Es gibt sogar einige Stämme, die gegen alle allgemein verfügbaren Wirkstoffe resistent geworden sind (Nikaido 2009). Der grampositive methicillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) gehört zu den bekanntesten multiresistenten Erregern. Er ist nicht nur, wie der Name sagt, gegen Methicillin resistent, sondern in den meisten Fällen auch gegen Aminoglykoside, Chloramphenicol, Lincosamide, Makrolide und Tetracyclin (De Lencastre et al. 2007). Erst in den letzten Jahren sind jedoch immer mehr „panresistente“ gramnegative Stämme aufgetreten, insbesondere von *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii*, gegen die es fast keine Wirkstoffe gibt (Nikaido 2009). Angesichts des häufigeren Vorkommens multiresistenter Bakterien stellen diese eine große Bedrohung der öffentlichen Gesundheit dar, weil nicht nur aktuelle Behandlungsmöglichkeiten versagen, sondern die Entwicklung neuer Behandlungstherapieformen nur langsam voranschreitet (Cerceo et al. 2016). In der Regel werden multiresistente Erreger mit nosokomialen Infektionen in Verbindung gebracht (Van Duin und Paterson 2020). Da sie eine zunehmende Verschlechterung der Morbidität und Mortalität und zunehmende Behandlungsschwierigkeiten verursachen und so auch erhebliche wirtschaftliche Auswirkungen auf die Gesundheitssysteme haben, stellen sie

nicht nur auf gesundheitlicher Ebene ein großes Problem der Gesellschaft dar (Cerceo et al. 2016). Diverse Risikofaktoren, wie z. B. Hospitalisation, invasive Beatmung, Antibiotikaeinnahme, Diabetes mellitus oder eine Immunschwäche begünstigen Infektionen mit multiresistenten Erregern (Oesterlee et al. 2017). In einer Literaturübersicht beschreiben Dalhoff et al. verschiedene Studien, die belegen, dass eine vorangegangene *intravenöse (i.v.)* Antibiotikatherapie innerhalb der letzten 90 Tage als wichtigster Risikofaktor für die Infektion mit multiresistenten Erregern gilt (Dalhoff et al. 2018).

2.2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa ist ein gramnegatives, aerobes, nicht sporenbildendes Stäbchen, das eine Vielzahl von Infektionen sowohl bei immunkompetenten als auch bei immungeschwächten Wirten verursachen kann (Kerr und Snelling 2009). Seine Behandlung stellt für die moderne Medizin eine große Herausforderung dar, da es über extreme Vielseitigkeit, Antibiotikaresistenz und ein breites Spektrum an dynamischen Abwehrmechanismen verfügt (Mulcahy et al. 2014). Außerdem gehört es zur Kategorie „kritisch“ auf der Prioritätenliste der Weltgesundheitsorganisation (WHO) für bakterielle Krankheitserreger, für die die Erforschung und Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten dringend erforderlich ist (Tacconelli et al. 2018; Botelho et al. 2019). *P. aeruginosa* ist in der Umwelt weit verbreitet, insbesondere im Süßwasser. Im Krankenhaus ist es vor allem im Trinkwasser, an Atemtherapiegeräten, an Endoskopen und an Endoskopwaschanlagen zu finden (Kerr und Snelling 2009; Mulcahy et al. 2014). Häufig treten Infektionen mit *P. aeruginosa* bei Personen mit geschwächtem Immunsystem auf (Parker et al. 2008; Gellatly und Hancock 2013), z. B. bei Mukoviszidose (*cystic fibrosis*, CF), Bronchiektasen, Neutropenie, Verbrennungen, Tumoren, erworbenes Immunschwächesyndrom (AIDS), Organtransplantationen, unkontrolliertem Diabetes mellitus und Einweisungen in die Intensivstation (Mulcahy et al. 2014). Dabei ist eine *P. aeruginosa* Infektion gerade bei Personen mit z. B. chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) oder CF mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden (Winstanley et al. 2016; Garcia-Nuñez et al. 2017; Wunderink und Waterer 2017). Durch die Fähigkeit des Bakteriums Biofilme zu bilden, sind außerdem Patienten und Patientinnen gefährdet, die mit Hilfe von invasiven Geräten, z. B. Dauerkathetern oder Endotrachealtuben behandelt werden müssen (Mulcahy et al. 2014). Die Biofilme bestehen aus einer dicken Schleimschicht aus polymeren extrazellulären Substanzen, welche das Bakterium vor Umwelteinflüssen schützt und so das Überleben verlängert (Drenkard 2003). Der Großteil dieser extrazellulären Matrix von *P. aeruginosa*, also der Teil des Gewebes, der zwischen den Zellen liegt, besteht aus dem Kapselpolysaccharid Alginate und zwei aggregierten Polysacchariden (Mann und Wozniak 2012). Die Biofilme von *P. aeruginosa*

zeichnen sich durch ein komplexes Netzwerk von Kanälen aus (Stoodley et al. 1994), welche für den Transport von Nährstoffen, Sauerstoff und Abfallprodukten zuständig sind (Davey und O'toole 2000). Die Biofilme sind sehr widerstandsfähig gegenüber Desinfektionsmitteln, Antibiotika und dem Immunsystem des Wirtes. Daher ist eine Therapie oft schwierig und dies kann zu chronischen Infektionen führen (Lee und Yoon 2017), so werden häufig Biofilme bei Patienten und Patientinnen mit chronischen Lungeninfektionen, chronischen Wundinfektionen und chronischer Rhinosinusitis festgestellt (Römling und Balsalobre 2012). Da die Behandlung chronischer Infektionen mit Biofilmen sich äußerst schwierig darstellt, ist zum einen eine Prävention der Besiedlung durch ausgeprägte Hygienemaßnahmen erforderlich und zum anderen stellt sich dem Gesundheitswesen die Konsequenz, nach neuen Therapieformen zu suchen, welche Biofilme bekämpfen können.

2.2.2. Virulenzfaktoren

Die Infektion mit *P. aeruginosa* besteht aus drei Phasen: der bakteriellen Adhäsion und Kolonisierung, lokalen Invasion und der disseminierten systemischen Erkrankung (Strateva und Mitov 2011). Dafür verfügt *P. aeruginosa* über eine Vielzahl an zellassozierten und extrazellulären Virulenzfaktoren, welche zur Pathogenese beitragen (Jurado-Martín et al. 2021). Außerdem besitzt *P. aeruginosa* Signalmechanismen, die als *Quorum Sensing* (QS) bekannt sind, die Produktion verschiedener Virulenzfaktoren steuern und die Immunantwort des Wirts manipulieren (Rumbaugh et al. 2000). Im Folgenden wird auf die wichtigsten Virulenzfaktoren eingegangen.

➤ **Adhäsion und Kolonisierung**

An der Zelloberfläche von *P. aeruginosa* befinden sich sogenannte Pili (auch Fimbrien genannt), die eine wichtige Rolle für die Motilität und Pathogenität des Bakteriums spielen (Craig et al. 2004). Sie sind an der ersten Adhäsion beteiligt, indem sie an spezifische Galaktose-, Mannose- oder Sialinsäure-haltige Rezeptoren auf Epithelzellen binden (Strateva und Mitov 2011). Pili vom Typ IV sind einziehbar, haarähnliche, fadenförmige Zellanhänge, die polar angeordnet sind (Jurado-Martín et al. 2021). Wichtige Aufgaben dieser sind z. B. Oberflächenmotilität, DNA-Aufnahme und Adhäsion an Wirtszellen (Craig et al. 2004). Außerdem verfügt *P. aeruginosa* über ein einzelnes polares Flagellum, welches für die Motilität und Chemotaxis entscheidend ist (Haiko und Westerlund-Wikström 2013). Flagellen gelten als wichtiger Virulenzfaktor, da sie neben der bakteriellen Motilität auch eine wichtige Rolle bei der Kolonisierung, der Penetration der Schleimhaut, der Adhäsion an oder Invasion von Epithelzellen spielen (Duan et al. 2013). So wird angenommen, dass Muzin ein wichtiges Ziel

für die Adhäsion von *P. aeruginosa* durch das Flagellum ist, da das Lungenepithel eine dicke Schleimschicht enthält (Haiko und Westerlund-Wikström 2013).

➤ **Lokale Invasion**

Damit *P. aeruginosa* in die Wirtszellen eindringen kann, benötigt es extrazelluläre Enzyme und Toxine. Das Bakterium produziert mehrere extrazelluläre Proteasen, darunter LasA-Elastase, LasB-Elastase und alkalische Protease, welche dazu beitragen, die physikalische Barriere der Wirtszellen zu durchbrechen und so ins Gewebe zu gelangen (Strateva und Mitov 2011). Die Elastasen sind ein Hauptfaktor für die Virulenz während einer akuten Infektion, da Elastin ein wichtiger Bestandteil des menschlichen Lungengewebes sowie der Blutgefäße ist (Strateva und Mitov 2011). Des Weiteren produziert *P. aeruginosa* drei weitere lösliche Proteine, die an der Invasion beteiligt sind: ein Zytotoxin und zwei Hämolsine, welche durch ihre zytotoxische Wirkung auf eukaryotische Zellen zur Invasion beitragen (Strateva und Mitov 2011).

➤ **Disseminierte systemische Erkrankung**

Durch dieselben zellassozierten und extrazellulären Virulenzfaktoren der Invasion gelangen die Bakterienzellen in die Blutbahn und es kommt zur Ausbreitung, ausgehend von den lokalen Herden (Strateva und Mitov 2011). Einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* ist LPS, welches ein integraler Bestandteil der meisten gramnegativen Bakterien ist (Huszczynski et al. 2019). Gramnegative Bakterien verfügen über zwei Membranen, die durch das periplasmatische Milieu getrennt sind (Silhavy et al. 2010). Die äußere Membran fast aller gramnegativen Bakterien besteht aus einer asymmetrischen Doppelmembran. Diese enthält eine innere Phospholipid-Seite, welche das Eindringen schädlicher Substanzen verhindert und eine äußere LPS-Seite (Montor et al. 2009; Remans et al. 2010; Pang et al. 2019). LPS lässt sich in drei verschiedene Domänen einteilen und zwar Lipid A, Kern-Oligosaccharid und O-Antigen, welche sowohl unterschiedliche als auch sich überschneidende Funktionen in der bakteriellen Physiologie haben (Huszczynski et al. 2019). Hauptaufgabe des LPS ist es, eine physikalische Barriere aufzubauen, welche das Bakterium vor der Abwehr des Wirts schützt, und Interaktionen mit den Rezeptoren der Wirtszellen einzugehen, wie z. B. dem Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) oder Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Rezeptor (King et al. 2009). Außerdem verursacht es aufgrund des enthaltenen Lipids A in LPS eine endotoxische Wirkung, wodurch es zu Gewebeschäden kommt (King et al. 2009), und es vermittelt die üblichen pathologischen Aspekte einer gramnegativen Septikämie, z. B. Fieber und Hypotonie (Strateva und Mitov 2011). Zusätzlich lässt es im Tiermodell die parazelluläre Permeabilität des Atemwegsepithels ansteigen (Eutamene et al. 2005) und trägt zur Antibiotikaresistenz und Biofilmbildung bei (Huszczynski et al. 2019). Laut Strateva und Mitov

wird angenommen, dass auch Exotoxin A von *P. aeruginosa* die Ausbreitung der Infektion erleichtert (Strateva und Mitov 2011). Exotoxin A ist der toxischste Virulenzfaktor von *P. aeruginosa*, welcher über das Typ II Sekretionssystem sezerniert wird (Javanmardi et al. 2019). Das Toxin ist eine Adenosindiphosphat-Ribosyltransferase, kurz ADP-Ribosyltransferase (Liu 1974), die aus einer A-Domäne mit enzymatischer Aktivität und einer B-Domäne als zellbindender Untereinheit besteht (Odumosu et al. 2010). Durch Bindung über den CD91 Rezeptor gelangt das Exotoxin A in das Innere der Wirtszelle und unterliegt dort Konformationsänderungen, wodurch seine nekrotisierende Wirkung aktiviert wird (Michalska und Wolf 2015). Es gelangt über das endoplasmatische Retikulum ins Zytosol und inaktiviert dort durch seine ADP-ribosylierende Wirkung den eukaryotischen Elongationsfaktor 2 (eEF-2; Michalska und Wolf 2015). Dadurch wird die Proteinbiosynthese gestoppt, die Apoptose der Wirtszelle eingeleitet und sie stirbt unwiderruflich ab (Michalska und Wolf 2015). Generell stehen *P. aeruginosa* fünf der sechs bei gramnegativen Bakterien charakterisierten Sekretionstypen zur Verfügung, welche es ihm ermöglichen eine sehr breite Palette von Exoproteinen, vor allem Toxine und hydrolytische Enzyme, zu produzieren (Bleves et al. 2010). Da das Typ III Sekretionssystem für die Ausschaltung und Zerstörung des Immunsystems des Wirts zuständig ist, gilt es als wichtigstes Sekretionssystem (Anantharajah et al. 2016).

2.2.3. Resistenzsituation und Therapie

Wie bereits beschrieben stellt die Therapie von *P. aeruginosa* Infektionen eine große Herausforderung dar, unter anderem dadurch, dass das Bakterium resistent gegenüber vielen der verfügbaren Antibiotika ist (Lister et al. 2009). Als resistent werden Bakterien bezeichnet, die widerstandsfähig gegenüber schädlichen Einflüssen der Umwelt und Bekämpfungsmitteln, vor allem den Antibiotika, sind. Dennoch ist die Antibiotikatherapie nach wie vor das Mittel der Wahl bei der Bekämpfung von *P. aeruginosa* Infektionen, doch es gibt bereits viele Fälle, in denen diese Therapie ineffizient war (Nathwani et al. 2014; Jernigan et al. 2020). Außerdem wird durch einen nicht kalkulierten Einsatz von Antibiotika während der Behandlung von *P. aeruginosa* die Resistenzsituation immer weiter verschlechtert (Hirsch und Tam 2010). Dadurch, dass die meisten eingesetzten Antibiotikaklassen sowohl bei der Behandlung von Infektionen beim Menschen als auch im Veterinärbereich eingesetzt werden, führt dies zu einem kumulativen Selektionsdruck auf die Mikroorganismen und damit zu einer geringeren Wirksamkeit der antimikrobiellen Behandlungen im Human-, Veterinär- und Umweltbereich (Palma et al. 2020). Die Antibiotikaresistenz tierischen Ursprungs trägt in erheblichem Maße zur Antibiotikaresistenz bei und in interdisziplinärer Abstimmung müssen Maßnahmen

ergriffen werden, um diesem Problem zu begegnen. Dazu gehören die Vermeidung einer übermäßigen Anwendung von Antibiotika und die Verbesserung der Hygienebedingungen und Infektionskontrollplänen sowohl in Human- als auch Veterinärmedizin (Palma et al. 2020). Ein weiteres Problem ist die mangelnde Entwicklung neuer Medikamente durch die pharmazeutische Industrie aufgrund geringer wirtschaftlicher Anreize und schwierigen regulatorischen Anforderungen (Ventola 2015). Die ausgeprägte intrinsische Resistenz von *P. aeruginosa* gegen viele Antibiotika wie Ampicillin, Cotrimoxazol und Cephalosporinen der dritten Generation wurde in den letzten Jahren durch eine erworbene Antibiotikaresistenz gegenüber Piperacillin, Ceftazidim, Cefepim, Fluorchinolonen, Aminoglykosiden und Carbapenemen weltweit erweitert (Dalhoff et al. 2018). Das hohe Maß an intrinsischer Resistenz gegenüber vielen Antibiotika ist auf eine eingeschränkte Durchlässigkeit der äußeren Membran, die Hochregulierung von Effluxmechanismen und die Produktion von Antibiotika inaktivierenden Enzymen wie Betalaktamasen zurückzuführen (Breidenstein et al. 2011). Des Weiteren kann *P. aeruginosa* durch Mutationen oder durch horizontalen Gentransfer Resistenzgene erwerben (Munita und Arias 2016) und durch Bildung von Biofilmen oder Persisterzellen adaptiv eine Resistenz erzeugen (Taylor et al. 2014). Die multitoleranten Persisterzellen können sich im Biofilm bilden und als diese dem Zelltod durch Antibiotika entgehen. Durch diese Zellen bekommen Patienten und Patientinnen mit CF rezidivierende Infektionen (Mulcahy et al. 2010). Durch die Möglichkeit der adaptiven Resistenzbildung können oft, insbesondere bei Personen mit Erkrankungen der Lunge und langfristiger Besiedlung mit *P. aeruginosa*, mukoide Kulturvarianten mit sich ändernden Resistenzmerkmalen nachgewiesen werden. Hierbei kann außer Colistin keine Antibiotikagruppe in der gezielten Therapie als zuverlässig wirksam betrachtet werden (Dalhoff et al. 2018). Doch selbst Colistin-resistente Stämme wurden bereits in Australien, Dänemark, dem Vereinigten Königreich und anderen Ländern beschrieben (Denton et al. 2002; Johansen et al. 2008). Da die Entwicklung neuer Antibiotika sehr begrenzt und zeitaufwändig ist, hat die Erforschung von neuartigen therapeutischen Ansätzen zur Behandlung von *P. aeruginosa* in den letzten 10 Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen (Pang et al. 2019). Diese neuartigen Strategien können entweder einzeln oder in Kombination mit der konventionellen Antibiotikatherapie durchgeführt werden (Pang et al. 2019), darunter die Hemmung von Quorum Sensing, bakteriellen Lektinen und Effluxpumpen, sowie die Anwendung von Phagentherapie, Kombinationstherapie aus Lactoferrin und Hypothiocyanit, antimikrobiellen Peptiden, Probiotika, Impfungen, Nanopartikeln, Eisenchelaten und traditionellen Pflanzenarzneimitteln (Chatterjee et al. 2016). Unter diesen alternativen Methoden spielt die Phagentherapie eine besondere Rolle. Sie wird zum einen seit mehreren Jahrzehnten zur Behandlung von Infektionen beim Menschen in osteuropäischen Ländern wie Georgien, Polen und Russland erfolgreich praktiziert (Abedon et al. 2011) und sie hat gegenüber der Antibiotikatherapie

mehrere Vorteile: Die Vermehrung der Bakteriophagen findet lokal am Infektionsort statt, die Bakteriophagen sind jeweils nur auf ein Bakterium spezialisiert und zerstören dadurch nicht die Darmflora der behandelten Personen und sie können antibiotikaresistente Bakterien wirksam abtöten (Chatterjee et al. 2016). Ein weiterer großer Vorteil der Phagentherapie gegenüber Antibiotika ist ihre Wirksamkeit gegen Biofilme (Chatterjee et al. 2016) und mehrere Studien deuten darauf hin (Cafora et al. 2019; Lin et al. 2020), dass eine Therapie auf der Grundlage von lytischen Phagen und Biofilmabbauern für die Behandlung von Lungeninfektionen gerade bei Patienten und Patientinnen mit CF vielversprechend sein könnte (Martínez-Gallardo et al. 2022).

2.3. Bakteriophagen

Unter Bakteriophagen oder kurz Phagen versteht man Viren, die nur Bakterienzellen infizieren und sich so vermehren. Sie sind die am häufigsten vorkommenden Organismen auf der Welt und ein allgegenwärtiges Merkmal der prokaryotischen Existenz (Clokier et al. 2011). Ihre Zahl in den Ökosystemen wird auf mehr als 10^{31} geschätzt (Brives und Pourraz 2020). Generell ist zu betonen, dass Viren keinen eigenen Stoffwechsel haben und daher zur Reproduktion auf einen geeigneten Wirt angewiesen sind (Ackermann 2009). Daher sind sie überall dort zu finden, wo es auch Bakterien gibt (Brives und Pourraz 2020). Da diese hochspezialisierten Viren auf spezifische Wirtsstrukturen angewiesen sind, verfügen sie über ein sehr enges Wirtsspektrum (Van Regenmortel 1990). Die Bakteriophagen bestehen aus einem Nukleinsäuregenomkern, welcher von einer Hülle aus phagenkodierten Kapsidproteinen umhüllt ist, die das genetische Material schützen und seine Übertragung in die nächste Wirtszelle vermitteln (Kasman und Porter 2022). Meistens besitzen die Phagen eine Kopf- und eine Schwanzstruktur (96 % der Phagen verfügen über eine Schwanzstruktur) und taxonomisch werden sie nach ihrem Genomaufbau, ihrer Morphologie und ihrem Wirt eingeteilt (Ackermann 2009). Auf Genom-Ebene findet man Phagen mit doppelsträngiger DNA, einzelsträngiger DNA, einzelsträngiger RNA und doppelsträngiger RNA (Mcgrath und Sinderen 2007). Dabei kommen die Phagen mit doppelsträngiger DNA am meisten vor und mit doppelsträngiger RNA nur sehr selten (Ackermann 2009). Die Phagen mit Kopfschwanzstruktur werden unter der Klasse *Caudoviricetes* zusammengefasst (Turner et al. 2021). Die *Pseudomonas* affinen Bakteriophagen dieser Arbeit gehören alle dieser Klasse an und werden den Gattungen *Pakpunavirus* (JG005), *Pbunavirus* (JG024) oder der Familie *Schitoviridae* (BHZ17) zugeordnet (International Committee on Taxonomy of Viruses 2021). Eubakterielle Phagen haben alle denkbaren Lebensräume besiedelt, und sie kommen in über 150 Wirtsgattungen vor, unter ihnen Anaerobier, Endosporenbildner, Actinomyceten, Cyanobakterien, Mykoplasmen und Spirochäten (Ackermann 2009). Neben den eubakteriellen Phagen gibt es

auch die Archaeenviren, welche wie der Name schon sagt Archaeen infizieren (Ackermann 2009). Das erste Mal wurden die Bakteriophagen und ihre Wirkung durch Twort im Jahr 1915 und Félix Hubert d'Hérelle im Jahr 1917 unabhängig voneinander beschrieben (Twort 1915; D'herelle 1917). D'Hérelle verdanken die Bakteriophagen ihren Namen und er erkannte auch deren potenzielle Bedeutung für die Behandlung von bakteriellen Infektionen (D'herelle 1926). Die Phagentherapie entwickelte sich schnell in Europa und den Vereinigten Staaten, doch ging sie ab den 1940er Jahren stark zurück, vor allem wegen des Aufschwungs der Antibiotika (Brives und Pourraz 2020). Dennoch wird sie seit mehreren Jahrzehnten erfolgreich zur Behandlung von Infektionen beim Menschen in osteuropäischen Ländern wie Georgien, Polen und Russland angewendet (Schmidt 2019).

2.3.1. Vermehrungszyklus

Phagen können in Bakterien zwei unterschiedliche Lebenszyklen durchlaufen, einen lytischen und einen lysogenen Zyklus. Während des lytischen Zyklus replizieren sich die Phagen in der Bakterienzelle und setzen durch Zelllyse dieser neue Phagenpartikel frei (Du Toit 2017). Bei dem lysogenen Replikationszyklus persistieren die Genome in ihren Wirten als integrierte Prophagen oder als Plasmide und vermehren sich so bei jeder Zellteilung mit. Die Fähigkeit zur Lysogenese ist bei mehreren Phagenfamilien vorhanden (Ackermann 2009). Zu therapeutischen Zwecken und so auch in der vorliegenden Arbeit werden nur Phagen verwendet, welche sich lytisch vermehren, denn lysogene Phagen können zur Übertragung von Genen auf den bakteriellen Wirt führen und dessen Virulenz durch lysogene Umwandlungs- oder Transduktionsmechanismen erhöhen oder Virulenzfaktoren oder Antibiotikaresistenzgene von Prophagenomen auf die Wirtsbakterien übertragen (Nobrega et al. 2015; Pelfrene et al. 2016). Durch zufällige Kollisionen zwischen Phagen und Wirt, die durch Brownsche Bewegung, Dispersion, Diffusion oder Strömung verursacht werden, kommt es zum Erstkontakt (Bertozzi Silva et al. 2016). Nach dem Erstkontakt bindet der Phage vorerst reversibel an bakterielle Oberflächenkomponenten, was dem Phagen dazu dient, sich in der Nähe der Zelloberfläche zu halten, während er nach einem spezifischen Rezeptor sucht (Garen und Puck 1951; Garen und Kozloff 1959). Danach kann es zu einer irreversiblen spezifischen Verbindung zwischen bakteriellem Rezeptor und Phagen kommen. Dieser Schritt löst Konformationsänderungen aus, die die Injektion des genetischen Materials des Phagen in die bakterielle Wirtszelle ermöglichen (Bertozzi Silva et al. 2016). Laut Bertozzi Silva et al. handelt es sich bei den bakteriellen Oberflächenrezeptoren, an denen sich die Bakteriophagen binden können, um Proteine, Polysaccharide, Lipopolysaccharide (LPS) und Kohlenhydrateinheiten (Bertozzi Silva et al. 2016). LPS ist einer der häufigsten Rezeptoren für Phagen bei gramnegativen Bakterien wie *P. aeruginosa* (Dowah und Clokie 2018). Weitere

Rezeptoren sind äußere Membranproteine, Pili und Geißeln (Sørensen et al. 2011). Die Fähigkeit, seinen Wirt effektiv zu infizieren, kann ein Phage verlieren, wenn die Rezeptoren für das rezeptorbindende Protein des Phagen unzugänglich oder nicht komplementär werden (Bertozzi Silva et al. 2016). Dieser Prozess wird Injektions- oder Adsorptionsphase genannt. Danach erfolgt laut Garen und Kozloff beim lytischen Vermehrungszyklus (Abbildung 1) die Latenzphase. In dieser Phase kommt es zu Transkription, Translation und am Ende Replikation der Virusnukleinsäure. In der sogenannten Produktionsphase werden alle Virusbestandteile gebildet. Daraufhin folgt die Reifungsphase. Während dieser erfolgt der Zusammenbau zu reifen Phagen. Schlussendlich werden die ausgereiften Phagen freigesetzt, indem im Bakterium Lysine gebildet werden, welche die bakterielle Mureinzellwand auflösen (Garen und Kozloff 1959). Lysine greifen eine der vier Hauptbindungen im Peptidoglykan der Bakterienzellwand an (Young 1992; Fischetti 2005). Die Anzahl der freigesetzten neuen Phagenpartikel pro Bakterium wird unter dem Begriff *burst size* beschrieben. Zum Beispiel ergibt eine 70-fache *burst size* durchschnittlich 70 Phagenpartikel pro infiziertem Bakterium (Ellis und Delbrück 1939).

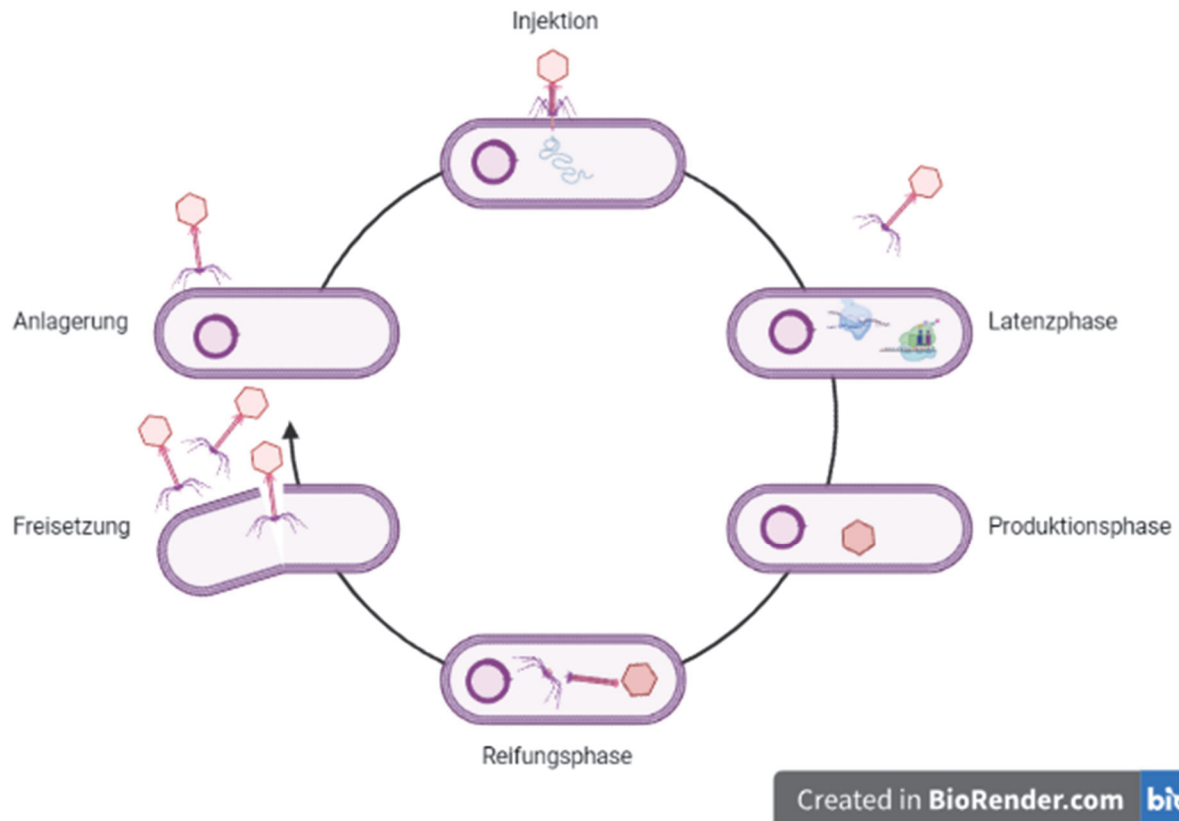


Abbildung 1: Vermehrungszyklus der Bakteriophagen: Laut Garen und Kozloff dockt beim lytischen Vermehrungszyklus ein Phage mit den Enden seines Schwanzes an die passenden Rezeptormoleküle der Oberfläche des Wirtsbakteriums an und injiziert danach seine Nukleinsäure in die Wirtszelle und es kommt zur Latenzphase. In dieser Phase kommt es zu Transkription, Translation und am Ende Replikation der Virusnukleinsäure. In der sogenannten Produktionsphase werden alle Virusbestandteile gebildet. Daraufhin folgt die Reifungsphase, in der der Zusammenbau zu reifen Phagen stattfindet. Schlussendlich werden die fertigen Phagen freigesetzt, indem im Bakterium Lysozym gebildet wird, welches die bakterielle Mureinzellwand auflöst (Garen und Kozloff 1959). Diese Abbildung wurde mit Hilfe von BioRender.com erstellt.

2.3.2. Phagentherapie

Wie bereits erwähnt ist ein großer Vorteil von Bakteriophagen ihr enges Wirtsspektrum: Sie infizieren und lysieren typischerweise nur „ihre“ spezifischen Wirte, für deren Oberflächenmoleküle sie über entsprechende Bindungsrezeptoren verfügen (Loc-Carrillo und Abedon 2011). Dadurch, dass die Vermehrung der Bakteriophagen lokal am Infektionsort stattfindet und die Phagen sehr spezifisch sind, zerstören sie im Idealfall nicht die Darmflora der behandelten Personen, und sie können antibiotikaresistente Bakterien wirksam abtöten (Chatterjee et al. 2016). Da die Phagen andere Mechanismen als Antibiotika benutzen, um Bakterien zu infizieren und sie abzutöten, wirken die Antibiotikaresistenzmechanismen der Bakterien nicht gegen die Phagen. Die Phagen können daher gegen antibiotikaresistente bakterielle Infektionen eingesetzt werden (Loc-Carrillo und Abedon 2011). Des Weiteren können Phagen die Wirksamkeit von Antibiotika unterstützen, indem sie die Auflösung von

Biofilmen erleichtern, welche eine Antibiotikatherapie verhindern (Chaudhry et al. 2017). Manche Phagen sind in der Lage, auch in die Matrix von Biofilmen einzudringen und dort Bakterienzellen zu infizieren. Es kommt zu lokalen Erhöhungen der Phagenpopulation, die sich innerhalb des Biofilms ausbreiten. Dort exprimieren sie depolymerisierende Enzyme, welche die extrazelluläre Matrix der Biofilme von innen abbauen (Harper et al. 2014). Außerdem zeigten Harper et al., dass auch persistierende Zellen im Biofilm von Bakteriophagen infiziert werden können. Obwohl sich Bakteriophagen nicht in inaktiven Zellen vermehren und diese zerstören können, können sie in diesen Bakterien verbleiben, bis sie reaktiviert werden und eine produktive Infektion auslösen (Harper et al. 2014). Diese biofilmpenetrierenden Eigenschaften machen Phagen vor allem für den Einsatz bei Fremdkörper- und Atemwegsinfektionen interessant (Curtin und Donlan 2006; Fong et al. 2017; Kwiatek et al. 2017). Zusätzlich zu der pharmakodynamischen Synergie zwischen Antibiotika und Phagen gibt es eine evolutionäre Synergie: Die Phagenbehandlung führt zu einem evolutionären Kompromiss, bei dem die Entwicklung der bakteriellen Resistenz gegen den Phagenangriff den Mechanismus der Effluxpumpe verändert, was zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Medikamenten aus verschiedenen Antibiotikaklassen führt (Chan et al. 2016). Außerdem können Bakterien, die erfolgreich mit lytischen Phagen infiziert wurden, ihre Lebensfähigkeit nicht wiedererlangen. Im Gegensatz dazu sind bestimmte Antibiotika wie z. B. Tetracyclin bakterio-statisch und können infolgedessen eine Resistenzentwicklung der Bakterien leichter ermöglichen (Loc-Carrillo und Abedon 2011). Da Bakteriophagen einzig ihre spezifischen Wirtsbakterien infizieren können, ist die Lyse selbstlimitierend. Die Phagen replizieren sich nur solange ihr Wirt verfügbar ist und es findet eine Art Selbstdosierung statt (Loc-Carrillo und Abedon 2011).

Die Phagentherapie hat aber auch einige Nachteile. So werden wie bei bakteriziden Antibiotika Endotoxine aus gramnegativen Bakterienzellen freigesetzt, wenn sie von den Phagen lysiert werden (Dufour et al. 2017). Durch die potenziell massive Freisetzung von bakteriellen Endotoxinen durch die bakterielle Lyse, die auch bei der Herstellung von potenziellen „Therapie-Phagen“ vorkommt, ist es erforderlich, die Endotoxine bestmöglich zu entfernen (aufgereinigte Phagen), um relevante toxischen Nebenwirkungen zu minimieren (Chan et al. 2013). Außerdem sind Phagen nicht dazu fähig, in eukaryotische Zellen zu gelangen. Deswegen sind sie weniger effektiv gegen intrazelluläre Bakterien wie zum Beispiel *Mycobacterium tuberculosis* oder intrazellulär-persistierende Klone von extrazellulären Bakterien, wie zum Beispiel *Acinetobacter baumannii* (Sulakvelidze et al. 2001). Des Weiteren ist es möglich, dass das humane Immunsystem Phagen als Antigene erkennt und so phagenneutralisierende Antikörper bildet (Lusiak-Szelachowska et al. 2014). Auch die Gefahr einer Anaphylaxie aufgrund einer extremen Immunreaktion durch die Administration der Phagen ist nicht gänzlich ausgeschlossen (Sulakvelidze et al. 2001). So gibt es den nicht klaren Fall eines

zweijährigen Jungen mit *P. aeruginosa*-Bakteriämie, bei dem die Phagentherapie aufgrund einer anaphylaxiebedingten Dekompensation unterbrochen werden musste. Diese wurde zwar auf eine fortschreitende Herzinsuffizienz zurückgeführt, doch konnte eine Endotoxin-freisetzung als beitragender Faktor nicht ausgeschlossen werden. Es kam kurz nach wieder aufgenommenener Phagentherapie zur klinischen Verbesserung des Patienten (Duplessis et al. 2018). Ein weiteres Hindernis der Phagentherapie ist die Resistenzbildung der Bakterien gegen Bakteriophagen. Die Phagenresistenzbildung kommt häufig vor, ähnlich wie die Resistenz gegen Antibiotika, wobei es erhebliche Unterschiede gibt (Labrie et al. 2010). Um dieses Problem zu lösen, besteht der vielversprechende Ansatz eines Phagencocktails, der aus Phagen besteht, welche mehrere unterschiedliche bakterielle Rezeptoren eines oder mehrerer Zielbakterien ansprechen, um die Entwicklung einer Phagenresistenz zu vermindern (Vaitekenas et al. 2021).

Wie bereits beschrieben wurden Bakteriophagen bereits kurze Zeit nach deren Entdeckung zu Therapiezwecken eingesetzt (D'herelle 1931), doch außer im osteuropäischen Raum wurde der Phagentherapie ab den 1940er Jahren wenig Beachtung geschenkt (Brives und Pourraz 2020). In den letzten Jahren rückte die Phagentherapie aber immer mehr in den Mittelpunkt der Forschung aufgrund der immer größer werdenden Antibiotikakrise. Bakteriophagen werden zurzeit bereits im Rahmen von Studien gegen eine Reihe von Erregern eingesetzt, bei denen eine herkömmliche Therapie mit Antibiotika nicht mehr wirksam ist (Gómez-Ochoa et al. 2022). Als Beispiel wäre hier *Staphylococcus aureus* zu nennen (Takemura-Uchiyama et al. 2014). Außerdem werden laut Brives und Pourraz in Frankreich und Belgien immer mehr Patienten und Patientinnen mit Phagen behandelt (Jennes et al. 2017; Ferry et al. 2018a; Ferry et al. 2018b; Djebara et al. 2019; Brives und Pourraz 2020). Eine weitere sehr bekannte Fallstudie und dazu ein veröffentlichtes Buch kommen aus Amerika. Tom Patterson hatte sich auf einer Reise mit einem multiresistenten *Acinetobacter baumannii* Stamm infiziert und ihm konnte das Leben mit Hilfe der Phagentherapie gerettet werden (Strathdee und Patterson 2019). Es gibt bereits mehrere solcher Fallstudien, in denen Bakteriophagen Menschen helfen konnten, bei denen Antibiotika versagten. Auch in der Veterinärmedizin wurden schon diverse Anwendungsmöglichkeiten erprobt. So wurde laut Loponte et al. bei Nutztieren die Wirksamkeit der Phagentherapie *in vitro* und *in vivo* umfassend untersucht (Smith und Huggins 1983; Sklar und Joerger 2001; Huff et al. 2002; Huff et al. 2003; Fiorentin et al. 2005; Gill et al. 2006), insbesondere bei Zoonosen und Krankheiten, die mit wirtschaftlichen Verlusten verbunden sind (z. B. Mastitis; Loponte et al. 2021). Die hier aufgeführten Fallstudien in der Human- und Veterinärmedizin zeigen das Potential der Phagentherapie auf, doch, obwohl bisher keine eindeutigen unerwünschten Wirkungen durch die Phagen aufgetreten sind, bedarf es Studien zu Wirksamkeit und vor allem Sicherheit (Cafilisch et al. 2019). Diese Studien sind auch die Bedingung für eine offizielle Zulassung durch die entsprechenden europäischen

Behörden, um diese Therapieform auch bei uns in Europa in breiter Form durchführen zu können (Caflisch et al. 2019), insbesondere in Bezug auf Infektionen hervorgerufen durch gramnegative Bakterien mit dem Risiko einer Endotoxämie (Dickson und Lehmann 2019). Auch Erkrankte mit CF könnten stark von der Entwicklung von Phagenpräparaten profitieren, denn chronische Atemwegsinfektionen, die hauptsächlich durch *P. aeruginosa* verursacht werden, gelten als schwerwiegende Komplikation bei diesen Patienten und Patientinnen (Martínez-Gallardo et al. 2022). Aktuell gibt es keine Heilung für CF und die Langzeitbehandlung gegen bakterielle Infektionen erfolgt mit inhalativen Antibiotika oder Antibiotikakombinationen (Chirgwin et al. 2019). Diese Langzeitantibiotikatherapie führt allerdings oft zur Entstehung von multiresistenten Bakterien (Hraiech et al. 2015).

Die vorliegende Arbeit ist in das vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderte Verbundprojekt „Phage4Cure“ (<https://phage4cure.de/de/>) eingebettet. Für dieses Projekt haben sich die Verbundpartner das Ziel gesetzt, einen inhalierbaren Wirkstoff aus Phagen gegen *P. aeruginosa* herzustellen, der den internationalen Qualitätsstandards für Arzneimittel entspricht. Anschließend soll der Wirkstoff auf seine Sicherheit und Verträglichkeit präklinisch und klinisch untersucht werden.

Die dazu notwendigen Schritte wurden von den Projektpartnern Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin (ITEM), Charité – Universitätsmedizin Berlin: Fächerverbund für Infektiologie, Pneumologie und Intensivmedizin und Charité Research Organisation GmbH (CRO) ihrer Expertise gemäß durchgeführt: Die Auswahl und Charakterisierung der Phagen erfolgte an der DSMZ durch die Arbeitsgruppe von Frau Dr. Rohde. Der Herstellungsprozess nach internationalen Qualitätsstandards wurde durch die Arbeitsgruppe von Prof. Ziehr am Fraunhofer ITEM in Braunschweig durchgeführt. Die präklinische Testung hinsichtlich Sicherheit, Verträglichkeit und Wirksamkeit erfolgte im Rahmen dieser Arbeit im Fächerverbund für Infektiologie, Pneumologie und Intensivmedizin an der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Zudem wurden Toxizitätsuntersuchungen an der Ratte im Fraunhofer ITEM Hannover durchgeführt. Nach behördlicher Genehmigung sollen erste klinische Untersuchungen an Probanden und Probandinnen unter Leitung der Charité Research Organisation GmbH erfolgen. Diese umfassen die inhalative Applikation des Phagencocktails mittels Vernebler (Phage4Cure).

2.4. Arbeitshypothese, Ziele und experimentelle Strategie des Dissertationsprojektes

Die therapeutische Anwendung in osteuropäischen Staaten (Schmidt 2019), diverse Einzelfallbeispiele (Takemura-Uchiyama et al. 2014; Jennes et al. 2017; Ferry et al. 2018a; Ferry et al. 2018b; Djebara et al. 2019; Strathdee und Patterson 2019) und auch die bisher erfolgten Anwendungen im veterinärmedizinischen Sektor (Smith und Huggins 1983; Sklar und Joerger 2001; Huff et al. 2002; Huff et al. 2003; Fiorentin et al. 2005; Gill et al. 2006) lassen erwarten, dass die Bakteriophagentherapie als alleinige oder als zusätzliche Therapieform in Kombination mit Antibiotika dabei helfen könnte, die Antibiotikakrise zu überwinden (Lin et al. 2017). Zum aktuellen Zeitpunkt fehlen jedoch Studien zu Wirksamkeit und vor allem Sicherheit, um diese Therapieform auch bei uns in Deutschland in breiter Form durchführen zu können. In diesem Dissertationsprojekt sollte daher experimentell die Hypothese geprüft werden, dass der hergestellte Phagencocktail nicht nur wirksam gegen *P. aeruginosa* ist, sondern auch sicher und verträglich am Modellorganismus angewendet werden kann. Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war es Daten zu generieren, um eine klinische Studie am Menschen durchführen zu können.

Dazu wurden zunächst die Phagen einzeln sowie auch der Phagencocktail mittels eines Verneblers aerosoliert, um nachteilige Effekte dieses für die spätere klinische Studie Prozesses auszuschließen. Zudem wurde ein *In-vitro*-A549 Zellinfektionsmodell verwendet, um zytotoxische Effekte der Phagen auf humane Lungenzellen auszuschließen. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie handelt es sich um humane adenokarzinomatöse alveolare Basalepithelzellen.

Außerdem wurde ein *ex vivo* humanes Lungeninfektionsmodell verwendet. In diesem wurden nicht nur die Effektivität und Stabilität der Phagen überprüft, sondern auch die IL-1 β Ausschüttung der Lungen auf den Kontakt mit *P. aeruginosa* und Phagen.

Des Weiteren war zielführend, therapeutische Eigenschaften sowie Reaktionen des Immunsystems auf die Phagen in einem murinen *In-vivo*-Infektionsmodell zu untersuchen. Dazu wurden Mäuse mit *P. aeruginosa* infiziert, um sie so an einer Pneumonie erkranken zu lassen. Ein Teil der Tiere wurde mit dem Phagencocktail behandelt, der andere Teil wurde mit einem Placebo behandelt und diente so als Kontrollgruppe. Zusätzlich wurden Mäuse untersucht, die scheininfiziert wurden und entweder mit dem Phagencocktail oder mit einem Placebo behandelt wurden. Es wurde die klinische Entwicklung der Pneumonie zwischen den Gruppen verglichen. Daneben konnte sowohl die Reduktion der Erregerlast als auch die Stabilität der Phagen im Organismus Maus überprüft werden. Des Weiteren wurden die Lungengefäßpermeabilität, wichtige Indikatoren für pulmonale und systemische Entzündungen sowie ausgewählte mögliche unerwünschte Nebenwirkungen der Phagen untersucht und histologische Analysen der Gewebe durchgeführt.

3. Material und Methoden

Die Experimente dieser Arbeit wurden alle nach etablierten Protokollen der Arbeitsgruppe Witzenrath oder Kooperationspartnern durchgeführt. Die Protokolle wurden an die Erfordernisse der beschriebenen experimentellen Untersuchungen angepasst.

3.1. Material

3.1.1. Bakterien

➤ *Pseudomonas aeruginosa*

Für alle Versuche dieser präklinischen Studie wurden zwei klinische Isolate von *P. aeruginosa*, DSM 107570 (PA70) und DSM 107574 (PA74), verwendet. Beide Isolate wurden von mit *P. aeruginosa* infizierten Patienten und Patientinnen gewonnen und sind nachweislich gegen mindestens eine Antibiotikaklasse resistent (Hornischer et al. 2018) und empfindlich gegenüber allen drei verschiedenen Phagen im Cocktail. Die Überprüfung der Phagenempfindlichkeit erfolgte durch Mitarbeitende der DSMZ. Des Weiteren wurden drei *P. aeruginosa* Stämme (PAO1, PA14, CH3549) benutzt, um bei den Aerosolierungsexperimenten die Phagentiter zu bestimmen. Da der Bakteriophage JG024 auch PAO1 lysiert, wurden die Versuche getrennt mit mehreren Reinigungsschritten durchgeführt, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Alle klinischen Isolate u. a. DSM 107570 (ZG5003493), DSM 107574 (F2029) und CH3459 wurden von Prof. S. Häußler (TWINCORE, Zentrum für Experimentelle und Klinische Infektionsforschung, Hannover, Deutschland und Department of Clinical Microbiology, Copenhagen University Hospital-Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark) dem Konsortium zur Verfügung gestellt. Alle anderen Isolate wurden durch die Mitarbeitenden der DSMZ bereitgestellt.

➤ *Nährlösung*

Um die Bakterien anzüchten zu können, wurde eine Nährlösung benötigt. Dazu wurde Trypticase Soja-Boullion (TSB) hergestellt, indem 30 g „trypticase soy broth“ Pulver (BD Biosciences, Heidelberg) in einem Liter destillierten Wasser aufgelöst wurde. Die entstandene Flüssigkeit wurde mittels eines Magnetrührers verrührt, bis sie klar und goldbraun war. Diese wurde für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Danach wurde die Flüssigkeit bei 4 °C gekühlt gelagert bis zur weiteren Verwendung.

3.1.2. Phagen und Referenzlösung

Im Rahmen des Phage4Cure-Verbundprojekts wurden die drei in dieser Studie verwendeten Phagen JG005, JG024 und BHZ17 von der Arbeitsgruppe von Dr. Rohde aus der DSMZ Braunschweig identifiziert und charakterisiert. Diese drei Phagen wurden für die präklinischen Untersuchungen von der Arbeitsgruppe von Prof. Ziehr des Fraunhofer ITEM nach Standards der guten Herstellungspraxis zum Zweck Forschung und Entwicklung hergestellt. Für die verschiedenen experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit wurden Phagen aus unterschiedlichen Herstellungsstufen mit unterschiedlichem Aufreinigungsgrad und n Titer verwendet. Der Titer wird in Plaque-bildenden Einheiten (plaque-forming unit, PFU)/ml angegeben. Für die A549 *In-vitro*-Experimente wurde Phagenlysat von JG005, JG024 und BHZ17 verwendet, welches in unserem Labor hergestellt wurde (Tabelle 1). Für *in vitro* und *Ex-vivo*-Experimente wurden aufgereinigte Phagen mit manuell zugesetztem humanem Serumalbumin (HSA)) aus der Herstellungsstufe „ScUP2“ vom Fraunhofer ITEM zur Verfügung gestellt und verwendet (Tabelle 1). Der Zusatz von 0,25 % HSA war aus produktionstechnischen Gründen notwendig. In den Aerosolierungsexperimenten wurden zum Vergleich der Stabilität auch die „ScUP2“ Phagen ohne HSA-Zusatz aerosolisiert. Für alle Tierversuche wurden Phagen aus der Herstellungsstufe "Referenzmaterial (Ref-1)" verwendet, welchem bereits während der Produktion HSA zugesetzt wurde (Tabelle 1). Technisch war es nicht möglich, alle Endotoxine aus dem Phagenprodukt zu filtern, sodass ca. 7916 Endotoxine pro ml Phagenprodukt vorhanden waren. Außerdem wurde die Rekonstitutionslösung als Kontrolllösung „Placebo“ in den Placebogruppen der *In-vivo*-Mausstudie verwendet. Die Zusammensetzung dieser entsprach der des abgefüllten „Phagen Testproduktes“ (154 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,5 und 0,25 % HSA).

Tabelle 1: Details der verwendeten Phagenzubereitungen

Phagenzubereitungen	Phagentiter (PFU/ml)	Details	Verwendungszweck
JG005 JG024 BHZ17	$\sim 1 \times 10^{10}$	Lysate ohne HSA	<i>In-vitro</i> -A549 Modell
JG005 JG024 BHZ17	$\sim 6,41 \times 10^9$ $\sim 5,32 \times 10^9$ $\sim 1,05 \times 10^{10}$ (gemäß Übergabeprotokoll ITEM; vor HSA-Zugabe)	154 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7.5 + 0,25 % HSA (manuell)	Aerosolierungsexperiment <i>In-vitro</i> -A549 Modell <i>Ex-vivo</i> -Experimente an humanen Lungengewebe
JG005 JG024 BHZ17	$\sim 1,05 \times 10^{10}$ $\sim 1,18 \times 10^{10}$ $\sim 1,96 \times 10^{10}$ (gemäß Übergabeprotokoll ITEM)	154 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7.5, 0,25 % HSA	<i>In-vivo</i> -Mausmodell

3.1.3. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
bakteriologische Petrischalen	Corning (Corning, NY, USA)
Columbia-Agarplatten mit 5 % Schafsblut	BD Biosciences (Heidelberg)
Handschuhe	B. Braun (Melsungen)
Impfösen (1/10 µl)	Sarstedt (Nümbrecht)
BIOSPHERE®-Filterspitze 10	Avantor (Radnor, PA, USA)
BIOSPHERE®-Filterspitze 100	Avantor (Radnor, PA, USA)
Kanüle 18 G	B. Braun (Melsungen)
Kanüle 20 G	B. Braun (Melsungen)
Kanüle 26 G	B. Braun (Melsungen)
Kanüle 27 G	BD (Heidelberg)
ClearLine®-Filterspitzen (200 µl)	Kisker Biotech (Steinfurt)
ClearLine®-Filterspitzen (1000 µl)	Kisker Biotech (Steinfurt)

Tabelle 2 fortgeführt:

Wattestäbchen	Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH (Hamburg)
Corning™ Zellkultur-Behandlungsflaschen	Corning (Corning, NY, USA)
Kryoröhrchen (1 ml)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Küvetten	Sarstedt (Nümbrecht)
EDTA-Röhrchen	KABE LABORTECHNIK GmbH (Nümbrecht-Elsenroth)
Einbettungs-Kassette	Rotilabo, Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Falcon® 12-well Clear Flat Bottom TC- treated Multiwell Zellkulturplatte	BD (Heidelberg)
Falcon® 48-well Clear Flat Bottom TC- treated Multiwell Cell Culture Plate	BD (Heidelberg)
Falcon® 96-well Clear Flat Bottom TC- treated Multiwell Cell Culture Plate	BD (Heidelberg)
gentleMACS™ M Röhrchen	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Pipettenspitze (0,1-10 µl)	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitze (0,5-20 µl)	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitze (1000 µl)	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitze (200 µl)	Sarstedt (Nümbrecht)
<i>Pseudomonas</i> C-N Selektiv-Agar	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Reagenzröhrchen (0,5/1,5/2,0 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zentrifugenröhrchen (15/50 ml)	Corning (Corning, NY, USA)
Serologische Pipetten (2/5/10/25 ml)	Corning (Corning, NY, USA)
Einwegskalpell	FEATHER® Safety Razor Co. Ltd. (Osaka, Japan)
Spin-X® Zentrifugenröhrchen-Filter	Corning (Corning, NY, USA)
Spritzen (1 ml)	B. Braun (Melsungen)
Spritzen (2/5/10 ml)	BD (Heidelberg)
Spritzenfilter Rotilabo 0,22 und 0,45 Mikrometer	Carl Roth GmbH + CO. KG (Karlsruhe)
Urinbecher (100 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Narkosemittel und Antikoagulantien

Bezeichnung	Hersteller
Heparin 25000 I.E., 5 ml	B. Braun (Melsungen)
Ketamin (100 mg/ml)	CP-Pharma (Burgdorf)
Xylazin 2 %	CP-Pharma (Burgdorf)
Isofluran	CP-Pharma (Burgdorf)

3.1.4. Reagenzien und Nährmedien

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Reagenzien und Nährmedien

Bezeichnung	Hersteller
10 % Tween 20	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Absolutes Ethanol	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
CountBright™ „Absolute Counting Beads“	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Trichlormethan/Chloroform	Carl Roth GmbH + CO. KG (Karlsruhe)
Difco™ Agar, technisch	BD Biosciences (Heidelberg)
Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung (1 × PBS)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
FACSFlow™	BD (Heidelberg)
FACS™ Shutdown-Lösung	BD (Heidelberg)
Formaldehyd-Lösung, gepuffert (4 %)	AppliChem (Darmstadt)
Gibco™ DMEM, hohe Glukose, ohne Glutamin	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Gibco™ L-Glutamin (200 mM)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Gibco™ Trypsin-EDTA (0,05 %), phenolrot	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Glycerin ≥ 99,7 %, p.a., höchste Qualität, synthetisch, wasserfrei	Carl Roth GmbH + CO. KG (Karlsruhe)
Human-Albumin (HSA) 20 %	CSL Behring (King of Prussia, PA, USA)

Tabelle 4 fortgeführt:

Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
0,9 % NaCl	B. Braun (Melsungen)
Formaldehyd 37 %, methanolfrei	Carl Roth GmbH + CO. KG (Karlsruhe)
RBC-Lysepuffer 10X	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
RPMI-1640 Medium	Merck (Darmstadt)
Thilo tears Augengel	Alcon Pharma GmbH (Freiburg im Breisgau)
TRizol™-Reagenz	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Trypanblau-Lösung, 0,4 %, T8154, 100 ml	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
„trypticase soy broth“ Pulver	BD Biosciences (Heidelberg)
UltraPure™ LMP Agarose	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

3.1.5. Kits

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Kits

Bezeichnung	Hersteller
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche Holding (Basel, Schweiz)
Human IL-1 β ELISA Ready-SET-Go! (2 nd Generation)	eBioscience (Frankfurt)
LEGENDplex™ Mouse Anti-Virus Response Panel (13-plex)	BioLegend (San Diego, CA, USA)
Mouse Albumin ELISA Kit	Bethyl Laboratories (Montgomery, AL, USA)

3.1.6. Antikörper

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Antikörper

Antikörper	Klon	Fluorochrom	Konzentration	Hersteller
aCD16/32	2.4G2	-	0,5 mg/ml	BD (Heidelberg)
CD11b	M1/70	PE-Cy7	0,2 mg/ml	eBioscience (Frankfurt)
CD11c	HL3	APC	0,2 mg/ml	BD (Heidelberg)
CD45	30-F11	FITC	0,5 mg/ml	BD (Heidelberg)
F4/80	BM8	PE	0,2 mg/ml	eBioscience (Frankfurt)
Ly6C	HK1.4	BV510	0,1 mg/ml	BioLegend (San Diego, USA)
Ly6G	1A8	PerCP-Cy5.5	0,2 mg/ml	BD (Heidelberg)
MHCII	M5/114.15.2	APC	0,2 mg/ml	eBioscience (Frankfurt)
Siglec F	E50-2440	BV421	0,5 mg/ml	BD (Heidelberg)

3.1.7. Geräte

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Geräte

Bezeichnung	Spezifikation	Hersteller
Analytische Waage	Sartorius, MC 5(-OCE)	Sartorius AG (Göttingen)
Autoklav	Tuttnauer Systec 2540 EL	Systec GmbH (Wettenberg)
Inkubator	Heraeus Typ BB 6220 O2	Kendro Laboratory Products (Osterode)
Durchflusszytometer	BD FACSCanto II™	BD (Heidelberg)
Galaxy-Mini-Zentrifuge		VWR International GmbH (Darmstadt)
Gefrierschrank -80 °C		Engmann Kühlsysteme (Mannheim)
Kulturröhrchen	mit Schraubkappe Kalk-Natron-Glas, 12 ml, Höhe: 100 mm	DWK Life Sciences (Wertheim)
Heizblock		Kleinfeld Labortechnik (Gehrden)
Homogenisator	gentleMACS™ Dissociator	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Laryngoskop	HSE Intubation Laryngoscope	Hugo Sachs Elektronik (March)
Brutschrank TH 30		Edmund Bühler (Bodelshausen)
Kühlschrank 4 °C/ Gefrierschrank -20 °C	Liebherr Profi line	Engmann Kühlsysteme (Mannheim)
Magnetrührer	Thermo Scientific™ Variomag Mono Direkt	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Mehrkanal-Pipetten	10 µl / 100 µl / 300 µl	Eppendorf (Hamburg)
Photometer	Multiskan™ Mikrotiterplatten-Photometer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

Tabelle 7 fortgeführt:

Photometer	Scanning Spectrophotometer, Uvikon XL	BioTek Instruments (Winooski, VT, USA)
Pipettboy	Stripettor Ultra	Corning (Corning, NY, USA)
Pipetten	10 µl / 100 µl / 200 µl / 1000 µl	Eppendorf (Hamburg)
Rotlichtlampe	Bosotherm 4000	Bosch + Sohn GmbH (Jungingen)
Thermometer	BAT-12 Microprobe Thermometer	Physitemp Instruments, Inc. (Clifton, NJ, USA)
Vernebler	M-neb® mobile mesh nebulizer MN-300/9	NEBU-TEC (Elsenfeld)
Vortexer	Vortex-Genie 2® Model G- 560E	Scientific Industries, Inc. (Bohemia, NY, USA)
Wasserbad	WBT-6	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Zählkammer	Neubauer-Zählkammer bright- line	LO-Laboroptik GmbH (Friedrichsdorf)
Zentrifuge Heraeus	Biofuge fresco	Kendro Laboratory Products (Hanau)

3.1.8. Software und Online-Dienste

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Software und Online-Dienste

Bezeichnung	Hersteller
BioRender	BioRender (Toronto, Kanada)
EndNote 20	Clarivate Analytics (Philadelphia, PA, USA)
FACS Diva Software	BD (Heidelberg)
GraphPad Prism, Version 9	GraphPad Software (San Diego, CA, USA)
Legendplex calculations	Qognit Inc. (San Carlos, CA, USA)
Office 365	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
Windows 10	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
WinRead Anthos	Anthos Mikrosysteme GmbH (Krefeld)

3.2. Methoden

3.2.1. Anzucht von *Pseudomonas aeruginosa*

Die Bakterien wurden mittels einer Einmal-Impföse (Sarstedt, Nümbrecht) auf Columbia Blutagarplatten mit 5 % Schafblut (BD Biosciences, Heidelberg) ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ im Wärmeschrank inkubiert. Danach wurden 2 – 3 Einzelkolonien mittels steriler Wattestäbchen in 20 ml TSB-Nährlösung (BD Biosciences, Heidelberg) eingerührt. Durch photometrische Bestimmung (Photometer, BioTek Instruments, Winooski, USA) der Optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm wurde die Anzahl der Pseudomonaden in der Nährlösung bestimmt und kontrolliert. Die Initial OD_{600nm} sollte bei 0,05 – 0,07 liegen. Die Nährlösung wurde bei 37 °C und 220 Umdrehungen pro Minute im Schüttler für ungefähr zwei Stunden inkubiert, bis die finale OD_{600nm} von 0,5 – 0,7 erreicht war. Danach wurde das Volumen gemessen und die Flüssigkeit wurde für 10 Minuten bei 2009 x g ohne Bremse in die Zentrifuge gestellt. Nun wurde die Überstandflüssigkeit vorsichtig abgenommen und das Volumen der restlichen Suspension gemessen. Mittels der finalen OD und den gemessenen Volumina wurde die Bakterienkonzentration bestimmt. Dabei entspricht eine OD_{600nm} von 1,0 einer Bakterienkonzentration von 1 x 10⁹ koloniebildenden Einheiten pro Milliliter (KbE/ml). Die Bakterienzellen wurden in erforderlicher Menge Dulbeccos phosphatgepufferter Kochsalzlösung (1 × PBS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in mehreren Zwischenschritten verdünnt, um die erwünschte Infektionsdosis zu erhalten. Zur Überprüfung

der richtigen Verdünnung wurde die Bakterienflüssigkeit weiter diluiert und diese auf Blutagarplatten ausplattiert. Die Kolonien wurden nach 24 Stunden Inkubationszeit ausgezählt.

3.2.2. Phagentiterbestimmung (Double-Agar-Overlay)

Zunächst wurde niedrigschmelzender Agar (=Softagar) hergestellt. Hierfür wurde TSB, analog wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, als Medium für das Wachstum der Zielbakterien verwendet, dem zusätzlich 5 mM MgSO₄ und 0,7 % Agar zugesetzt wurden. Dieses wurde 20 Minuten lang bei 121 °C im Autoklaven sterilisiert. Dann wurden 4 ml Aliquote in Kulturröhrchen (DWK Life Sciences, Wertheim) hergestellt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Für die Bestimmung der Phagentiter wurde je nach Experimentaufbau einer der Bakterienstämme verwendet. Die Bakterien wurden bei 37 °C und 220 Umdrehungen pro Minute etwa 1,5 Stunden lang gezüchtet, bis sie die frühe logarithmische Phase erreichten (OD_{600nm} = 0,2 – 0,3). Nach Erreichen der gewünschten optischen Dichte wurden die Soft-Agar-Röhrchen aus dem Kühlschrank genommen und im Wasserbad/ Heizblock bei mindestens 110 °C für mindestens 10 Minuten geschmolzen. Danach wurden sie auf 48 °C heruntergekühlt und 10 Minuten lang äquilibriert. Kurz vor der Durchführung des Overlays wurde die Phagensuspension in 1:10 Schritten in SM-Puffer verdünnt. Dann wurden 100 µl der Bakterienkultur und 100 µl der Phagenverdünnung in jedes Softagarröhrchen gegeben. Die Röhrchen wurden mindestens 10-mal mit beiden Händen gerollt und vorsichtig auf die Bottomagarplatte gegossen. Die Agarplatten wurden verschlossen. Nach dem Abkühlen der Platten wurde sichergestellt, dass sich der Softagar verfestigt hatte. Die Agarplatten wurden über Nacht in den Inkubator gestellt. Dann konnten die PFU/ml gezählt und zusätzlich der Phagentiter des Stammes berechnet werden:

$$\text{Titer (PFU/ml)} = n (\text{Plaques}) \times 10 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

3.2.3. Herstellung von Phagenlysat

Zunächst wurde ein Agar-Overlay wie in 3.2.2. beschrieben mit dem gewünschten Phagen durchgeführt. Dabei sollte eine optimale Konzentration von PFU auf den Agarplatten erreicht werden, die zu einer 95 – 98 %igen Lyse des Bakterienrasens führt. Diese lag je nach Phagentyp und Plaquegröße bei 10³ – 10⁵ PFU. Dann wurden 3 ml Salz-Magnesium-Puffer (SM-Puffer, 0,1 M NaCl, 8 mM MgSO₄, 50 mM Tris-HCl, pH 7.2–7.5, im Weiteren auch Phagenpuffer genannt) auf die Agarplatten gegeben, um das Ablösen der weichen Agarschicht mit einer Impföse zu erleichtern. Die Agarplatten wurden in eine Schräglage gebracht, damit

sich die Flüssigkeit an einer Seite der Platte sammelt, und es wurden weitere 1 ml SM-Puffer hinzugefügt. Die Platten wurden für 20 bis 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden Softagar und der zugegebene Puffer in einem 50 ml Falcon aufgefangen (für 45 ml fertiges Phagenlysate wurden bis zu 30 Agarplatten benötigt). Dann wurde die Flüssigkeit bei 3345 x g 15 Minuten lang zentrifugiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Filtration. Dazu wurde der Überstand in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Um verbliebende intrazelluläre Phagen freizusetzen, wurden fünf Tropfen Chloroform (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) zur Zellyse hinzugefügt. Nach einminütiger Inkubation erfolgte die stufenweise Filtration mit 0,8 µm, 0,45 µm und 0,22 µm Filtern.

3.2.4. Aerosolierung

Es wurden Vorversuche zur Aerosolisierung der Phagen mittels eines handelsüblichen „Mesh Verneblers“ der Firma NebuTec (M-neb® mobile mesh nebulizer MN-300/9) durchgeführt. Das System nutzt eine vibrierende Membran (mesh), um ein Aerosol zu bilden. Das System verfügt über zwei Membranen mit unterschiedlichen Porengrößen (4 µm und 6 µm). Es wurden die drei Phagen jeweils einzeln (ScUp2) aerosolisiert und die Titer vor und nach der Aerosolierung auf den nachfolgenden Referenzstämmen (JG005 auf PA01, JG024 auf PA14 und BHZ17 auf CH3549) bestimmt (jeweils n = 3; Tabelle 9). Da JG024 auch PaO1 lysiert, wurden die Versuche mit mehreren Reinigungsschritten getrennt voneinander durchgeführt, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

Für die Aerosolierungsexperimente mit dem kombinierten Phagencocktail wurde der M-neb® Dose Plus verwendet und der Gesamttiter auf PA74 bestimmt.

Die gemessenen Titer nach der Aerosolierung wurden zu den Titern vor Aerosolierung in Relation gesetzt. So konnte der Titerverlust, der bei der Aerosolierung entstanden ist, berechnet werden. Dabei wurden die Einzelphagen mittels 6 µm Membran aerosolisiert, da durch die größere Porengröße der Membran ein geringerer Titerverlust erwartet wurde und zunächst die generelle „Aerosolierungstauglichkeit“ der drei Phagen getestet werden sollte. Im Hinblick auf die klinische Studie wurde der Phagencocktail mit der 4 µm Membran aerosolisiert, da durch die kleineren Aerosoltröpfchen die Phagen bei der Anwendung an Patienten und Patientinnen theoretisch tiefer in die Atemwege deponiert werden können.

Tabelle 9: Versuchsgruppen Aerosolierung

A: Phagen nicht aerosolisiert (JG005, JG024, BHZ17 oder Phagencocktail + 0,25 % HSA)
B: Phagen aerosolisiert (JG005, JG024, BHZ17 oder Phagencocktail + 0,25 % HSA)

3.2.5. *In-vitro*-A549 Zellinfektionsmodell

Um die direkte Reaktion von Alveolarepithelzellen auf Phagenlysat und aufgereinigte Phagen sowie auf eine Phagenbehandlung von mit *Pseudomonas* infizierten Lungenepithelzellen zu bestimmen, wurde ein *In-vitro*-Modell mit A549-Zellen verwendet. Die Zellen wurden mit PA74 mit einer Multiplizität der Infektion, kurz MOI), von 1 oder MOI 10 infiziert und entweder mit Phagenlysat oder aufgereinigten Phagen (ScUp2) mit 0,25 % HSA, jeweils gemischt als Cocktail, behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen entweder nur mit Phagenlysat oder nur mit aufgereinigten Phagen stimuliert. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37 °C wurde die Laktatdehydrogenase (LDH) Aktivität als Maß für eine mögliche Zellschädigung gemessen.

➤ **Zellgewinnung und Infektion**

Die A549-Zelllinie wurde in Corning™ Zellkulturflaschen (Corning, Corning, USA) in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) bei 37 °C mit 5 % CO₂ im Brutschrank angezchtet. Die Zellen wurden mit einer 1 %igen Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, mit DMEM gewaschen, gezählt und in 48-Well-Zellkulturplatten mit DMEM (5 × 10⁴ Zellen/well, 200 µl/well, Stock 2,5 × 10⁵/ml) resuspendiert und bei 37 °C mit 5 % CO₂ bebrütet, bis sie einen konfluenten Monolayer bildeten (1 – 2 Tage).

Es wurden zwei Bakterienkulturen mit 1 × 10⁷ KbE/ml und 1 × 10⁶ KbE/ml von PA74 hergestellt. Sobald die Zellen die gewünschte Konfluenz erreicht hatten (~10⁵ Zellen/well), wurden sie mit PBS gewaschen und 200 µl neues DMEM in jedes Well gegeben. Dann wurden in jedes Well entsprechend Belegungsplan Bakterien zugegeben (für MOI 1: 100 µl von 1 × 10⁶ KbE/ml; für MOI 10: 100 µl von 1 × 10⁷ KbE/ml). Direkt im Anschluss wurden 100 µl der Stimulanzen zugegeben (SM-Puffer + 0,25 % HSA, Phagenlysat-Cocktail oder aufgereinigter Phagencocktail + 0,25 % HSA; Tabelle 10). Um einen hohen Effekt zu erreichen, wurden die Phagen jeweils unverdünnt eingesetzt, d. h. Phagenlysat ca. 10¹⁰ PFU/ml und aufgereinigte Phagen ca. 10⁹ PFU/ml. Jede Versuchsbedingung wurde als Triplikat durchgeführt und der Versuch insgesamt 4-mal wiederholt.

Tabelle 10: Versuchsgruppen *In-vitro*-A549 Zellinfektionsmodell

A: aufgereinigter Cocktail
B: Phagenlysat Cocktail
C: PA74 MOI 1 + SM-Puffer
D: PA74 MOI 1 + aufgereinigter Cocktail
E: PA74 MOI 1 + Lysat Cocktail
F: PA74 MOI 10 + SM-Puffer
G: PA74 MOI 10 + aufgereinigter Cocktail
H: Phagenlysat-Cocktail + PA74 MOI 10 + Lysat Cocktail

➤ **Bestimmung der Laktatdehydrogenasefreisetzung**

Zur Bestimmung der Laktatdehydrogenasefreisetzung (LDH-Freisetzung) wurde das Cytotoxicity Detection Kit (Roche Holding, Basel, Schweiz) nach Herstellerangaben verwendet. Die Versuche wurden in 48-well Platten durchgeführt. Sechs der Wells mit Zellen wurden weder infiziert noch stimuliert. Diese wurden als niedrige und hohe Kontrolle verwendet. Die totale LDH-Freisetzung aus den Zellen wurde durch Zugabe von 2 % Triton-X erzielt und auf 100 % eingestellt. Die LDH-Freisetzung aus unstimulierten Zellen wurde als niedrige Kontrolle verwendet und auf 0 % gesetzt. Die LDH-Freisetzung unter allen anderen Bedingungen wurde mit diesen beiden Kontrollen in Beziehung gesetzt. Der Überstand jedes Wells wurde in das entsprechende Zentrifugenröhrchen pipettiert. Daraufhin wurde der Überstand bei 4 °C bei 400 x g 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde eine 1:5-Verdünnung mit DMEM durchgeführt. Kurz vor der Verwendung wurde die Reaktionsmischung nach Herstellerangaben gemischt. Dann wurden 50 µl der Probe und 50 µl der Reaktionsmischung in jedes Well einer 96-Well-Platte gegeben. Die Platte wurde 30 Minuten lang im Dunkeln inkubiert. Die Platte wurde bei OD_{450nm} im Anthos ht2 Mikroplattenphotometer (Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld) mit der zugehörigen Software (WinRead Anthos) gemessen und die LDH-Freisetzung bestimmt.

3.2.6. *Ex-vivo*-Experimente an humanem Lungengewebe

Um die Experimente am menschlichen Lungenmaterial durchzuführen, wurden unveränderte Lungenabschnitte von Patienten und Patientinnen verwendet, die sich zuvor einer Lungenteilentfernung unterziehen mussten. Die Personen hatten schriftlich ihre Einwilligung zur Nutzung ihres Lungengewebes gegeben. Die Studie erhielt die Genehmigung der Ethikkommission der Charité Berlin (Ethikvotum: EA2/079/13). Es wurden *Ex-vivo*-Studien an menschlichen Lungengewebeschnitten durchgeführt, wobei sowohl beide klinischen *Pseudomonas* Isolate

als auch die aufgereinigten Phagen (ScUP2) verwendet wurden. Neben der Applikation von SM-Puffer als Kontrolle wurde als Positivkontrolle das Antibiotikum Imipenem verwendet. Die auf Eis gelagerten Lungenschnitte wurden mit einem Skalpell (Einwegskalpell, FEATHER® Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan) in kleine Stücke von ungefähr gleicher Größe geschnitten. Die Lungenstücke wurden dann in 12-Well-Platten (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg; KERN 440-33N, Laborpräzisionswaage, Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern) mit 2 ml RPMI-1640 (PAA Laboratories GmbH, Österreich) eingewogen. Um Blut- und Medikamentenreste auszuwaschen, wurden sie vor der Weiterverarbeitung über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ bebrütet. Zunächst wurden bei dem klinischen Isolat PA74 alle Phagen einzeln getestet. Anschließend wurde der Phagencocktail in beiden Pseudomonas-Isolaten getestet. In allen Fällen wurden Phagenlösungen mit einem Zusatz von 0,25 % HSA verwendet. Ein Schema des Ablaufes von Infektion und Stimulation ist in Abbildung 2 dargestellt. Die daraus resultierenden Versuchsgruppen sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

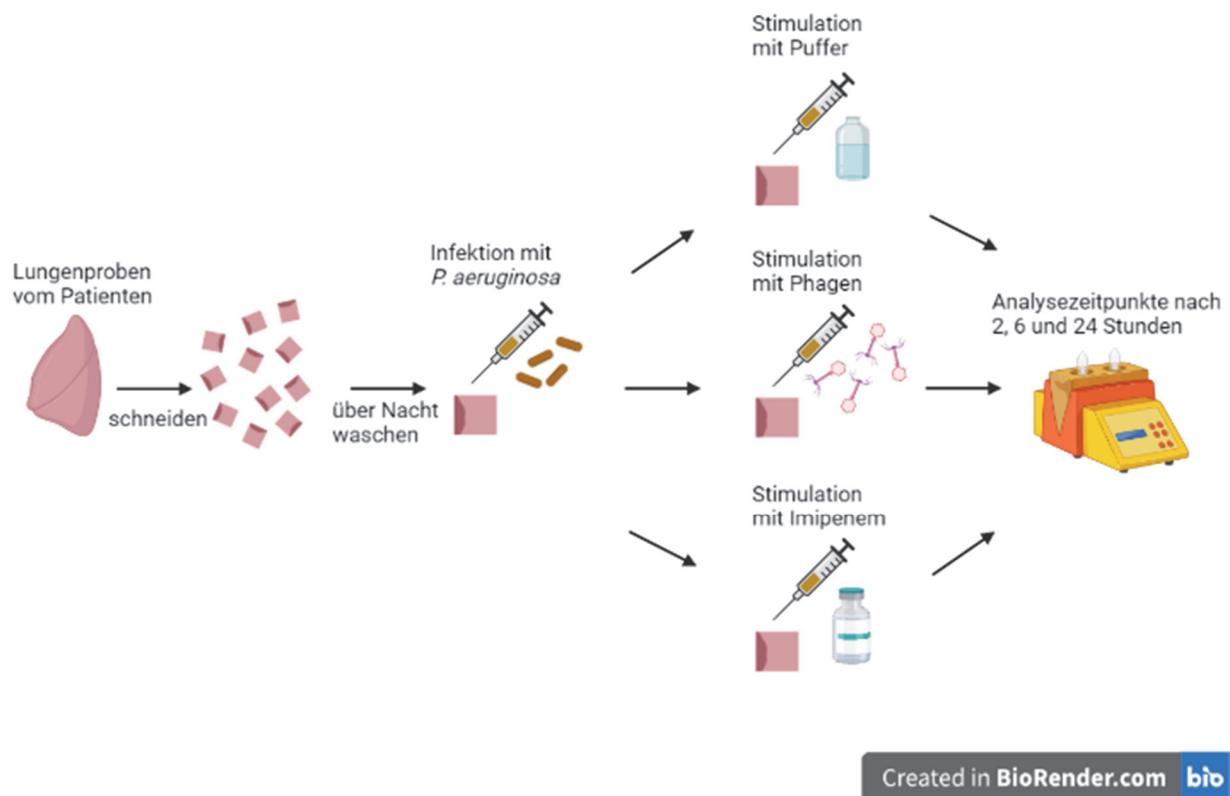


Abbildung 2: Schematischer Versuchsablauf der *P. aeruginosa* Infektion des humanen Lungengewebes im *Ex-vivo*-Modell: 30 Minuten nach Infektion mit *P. aeruginosa* erfolgte die Stimulation mit Puffer (SM-Puffer + 0,25 % HSA), Phagen als Cocktail (MOI 3, MOI 3000) oder einzeln (MOI 1, MOI 1000) oder Imipenem (2,5 mg/100 μ l). Die Phagenpräparate enthielten jeweils einen Zusatz von 0,25 % HSA. Zwei, sechs und 24 Stunden nach der Behandlung wurden die Gewebeprobe homogenisiert und die KbE und PFU gemessen. Die Überstände wurden ebenfalls zu allen Zeitpunkten entnommen und für weitere Analysen eingefroren. Diese Abbildung wurde mit Hilfe von BioRender.com erstellt.

Tabelle 11: Versuchsgruppen des *Ex-vivo*-Lungeninfektionsmodells

A: <i>P. aeruginosa</i> + SM-Puffer + 0,25 % HSA
B: <i>P. aeruginosa</i> + Phage (JG005, JG024, BHZ17 oder Phagencocktail + 0,25 % HSA)
C: <i>P. aeruginosa</i> + Imipenem
D: Phage (JG005, JG024, BHZ17 oder Phagencocktail + 0,25 % HSA)

➤ **Infektion des humanen Lungengewebes mit *Pseudomonas aeruginosa***

Nach erfolgter Inkubation wurden die Lungenstücke in eine neue 12-well Platte mit jeweils 2 ml frischem RPMI-Medium überführt. Danach wurden 220 μ l Bakterienlösung (1×10^4 KbE/ml) in jedes Well gegeben, um so eine Endkonzentration von $\sim 1 \times 10^3$ KbE/ml zu erhalten. Nun wurden mittels steriler 1 ml Spritze und 26 G Kanüle 300 μ l der Bakterienlösung in die

Lungenstücke injiziert. Dabei wurde dreimal in das Lungengewebe gestochen und jeweils 100 µl injiziert. Nach 30 Minuten Inkubationszeit bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde ein Stück entnommen und die Erregerlast, wie im unteren Abschnitt beschrieben, bestimmt (Infektionskontrolle).

➤ **Stimulation mit Bakteriophagen**

Nach 30-minütiger Inkubationszeit wurden die verschiedenen Stimuli in die Lungenstücke injiziert. Jeweils 100 µl SM-Puffer, einzelne Phagen (MOI 1, MOI 1000, jeweils bezogen auf die eingesetzte Infektionsdosis) oder Imipenem (25 mg/ml) wurden in eine Spritze aufgezogen und zusätzlich 200 µl RMPi aus dem Well aufgezogen. Dann wurde dasselbe Verfahren wie bei den Bakterien durchgeführt. Bei den Experimenten mit dem Phagencocktail wurden 300 µl (100 µl pro Phagen) direkt aufgezogen, um einen additiven Effekt der Phagen zu erhalten (MOI 3, MOI 3000, jeweils bezogen auf die eingesetzte Infektionsdosis). Die Lungenstücke wurden erneut bei 37 °C und 5 % CO₂ bebrütet. Zwei, sechs und 24 Stunden nach der Behandlung wurden die Lungenproben aus den entsprechenden Wells entnommen, homogenisiert (gentleMACS™ Dissociator, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) und die Erregerlast bestimmt. Die Überstände wurden aus den Wells entnommen und mit Filtrerröhrchen (Spin-X® Centrifuge Tube Filters, Corning, Corning) filtriert, um die Bakterien zu entfernen. Die Überstände wurden für weitere Analysen bei – 80 °C eingefroren. Das verbleibende Homogenat wurde ebenfalls filtriert, um die Phagentiter zu bestimmen. Zusätzliche Lungenproben, die nur mit Phagen injiziert wurden, dienten als Kontrollen für die Phagenstabilität und -effekte in der Lunge ohne bakteriellen Wirt.

➤ **Bestimmung der Erregerlast im humanen Lungengewebe**

Zur Bestimmung der Erregerlast wurden die homogenisierten Lungenstücke in PBS verdünnt, auf Blutagarplatten mit 5 % Schafsblut ausgestrichen und 18 Stunden lang bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Durch Auszählen der KbE auf den Platten und unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe und des Gewichts der Lungenstücke wurde die bakterielle Last pro g Lungengewebe berechnet.

➤ **Bestimmung der Phagentiter im humanen Lungengewebe**

Das gefilterte Lungenhomogenat wurde seriell in 96-Well-Platten verdünnt. Auf eine Agarplatte (Trypticase Soja Agar, TSA) wurden 4 ml Softagar mit 100 µl vorkultiviertem PA74 bei OD_{600nm} = 0,1 – 0,2 aufgetragen, um einen gleichmäßigen Bakterienfilm zu erhalten. Die Platten wurden etwa 20 Minuten lang getrocknet. Dann wurden 4 µl jeder Phagenverdünnung in dreifacher

Ausfertigung auf die bedeckte Agarplatte aufgetragen und 18 Stunden lang bei 37 °C und 5 % CO₂ bebrütet. Danach wurden die Phagenplaques auf den Platten gezählt und der mittlere Phagentiter pro Probe unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe und des Gewebegewichts bestimmt.

➤ **Quantifizierung des Zytokins IL-1 beta in den Überständen des humanen Lungengewebes**

Mittels ELISA der Firma BD Bioscience wurde das Zytokin IL-1 β bestimmt. Dazu wurden die tiefgefrorenen Überstände langsam auf Eis aufgetaut und der ELISA gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden alle Medien nach Protokoll hergestellt und benutzt. Bei 450 nm wurde die OD im Anthos ht2 Mikroplatten Photometer (Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld) mit zugehöriger Software (WinRead Anthos) gemessen. Unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe und des Gewichts der Lungenstücke wurde die Ausschüttung von IL-1 β in pg pro g Lungengewebe berechnet. Für Proben, die unterhalb der Nachweisgrenze (*limit of detection*, LOD) lagen, wurde der Wert des LOD geteilt durch Wurzel zwei (LOD/ $\sqrt{2}$) verwendet (Croghan und Egeghy 2003).

3.2.7. Modell der murinen Pseudomonadenpneumonie

➤ **Versuchstiere**

In den Versuchen wurden Mäuse im Alter von 9 – 11 Wochen und einem Gewicht von 17 – 22,5 g verwendet. Es wurden ausschließlich weibliche Wildtyp Mäuse des Stammes C57BL/6N von Charles River Laboratories (Niederlassung Sulzfeld) verwendet.

➤ **Versuchsgruppen und Versuchsaufbau**

Bei den tierexperimentellen Untersuchungen an Mäusen wurden folgende Versuchsgruppen gebildet und Entnahmezeitpunkte festgelegt (Tabelle 12):

Tabelle 12: Versuchsgruppen der tierexperimentellen Untersuchungen

Infektion mit:	Behandlung mit:	Entnahmezeitpunkte <i>p.i.</i> [h]:
PBS	Placebo	12, 24, 48
PBS	Phagencocktail	12, 24, 48
<i>P. aeruginosa</i>	Placebo	12, 24, 48
<i>P. aeruginosa</i>	Phagencocktail	12, 24, 48

Die Mäuse wurden transnasal via Tröpfcheninfektion mit $2,5 \times 10^7$ KbE von PA74 infiziert oder mit PBS scheininfiziert. Sechs Stunden *p.i.* wurden die Mäuse entweder mit der Rekonstitutionslösung (Placebo) oder dem Phagenscocktail behandelt. Zwölf, 24 und 48 Stunden *p.i.* wurden Mäuse präpariert und analysiert. Darüber hinaus wurden alle 12 Stunden klinische Parameter, wie Lungenentzündungssymptome, Körpertemperatur und Gewicht aufgezeichnet. Mäuse, die mit PBS scheininfiziert und mit Placebo oder dem Phagenscocktail behandelt wurden, dienten als Kontrollen (Abb. 3).

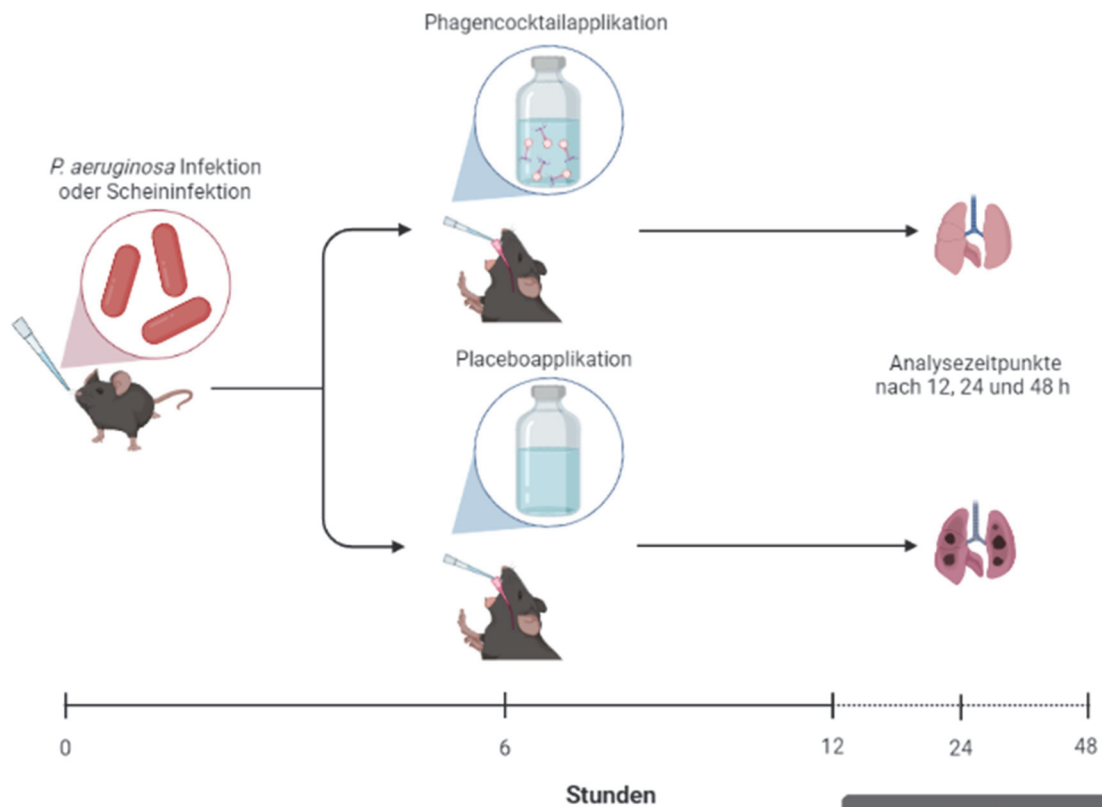


Abbildung 3: Versuchsablauf der tierexperimentellen Untersuchungen: Die Mäuse wurden transnasal via Tröpfcheninfektion mit $2,5 \times 10^7$ KbE von PA74 infiziert oder mit PBS scheininfiziert. Sechs Stunden *p.i.* wurden die Mäuse entweder mit der Rekonstitutionslösung (Placebo) oder dem Phagenscocktail behandelt. Zwölf, 24 und 48 Stunden *p.i.* wurden die Mäuse präpariert und analysiert. Diese Abbildung wurde mit Hilfe von BioRender.com erstellt.

Die murinen *In-vivo*-Untersuchungen waren Teil des Versuchsvorhaben A 0024/21, welches vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (LaGeSo) genehmigt wurde.

➤ **Tierhaltung**

Die Mäuse wurden während der Versuchszeit in spezifiziert pathogenfreien, geschlossenen und individuell belüfteten Käfigen (individually ventilated cages, IVC; Typ II-L, EHERT, Emmendingen) mit Standardeinstreu in Gruppen gehalten. Den Tieren wurden Wasser und pelletiertes Futter *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Die verschiedenen Infektionsgruppen wurden voneinander getrennt in separaten Käfigen gehalten. Sie wurden in einem klimatisierten Raum bei einer durchschnittlichen Raumtemperatur von 21 °C +/- 1 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 55 % +/- 5 % gehalten. Die Tiere erhielten 12 Stunden pro Tag künstliches Licht. Nachdem die Tiere im Versuchstierhaus angekommen waren, erhielten sie eine mindestens fünftägige Eingewöhnungszeit, bevor die ersten Versuche durchgeführt wurden.

➤ **Infektion der Mäuse mit *Pseudomonas aeruginosa***

Vor der Infektion wurde jedes Tier einer adspektorischen Untersuchung unterzogen, gewogen und die Rektaltemperatur gemessen. Dann wurde eine Mischung aus 93,75 mg/kg Ketamin (Ketamin 100 mg/ml, CP-Pharma, Burgdorf) und 15 mg/kg Xylazin (Xylavet, CP-Pharma, Burgdorf), bezogen auf das Körpergewicht der Tiere und verdünnt mit isotonischer Kochsalzlösung (Natriumchloridlösung, 0,9 % B. Braun, Melsungen), *intraperitoneal (i.p.)* injiziert, um die Tiere zu narkotisieren. Nach erfolgreicher Narkose wurde ein Augengel (Thilo-Tears, Alcon Pharma GmbH) auf die Hornhaut der Tiere gegeben, um sie vor Austrocknung zu schützen. Sobald die erforderliche Narkosetiefe erreicht war, wurden die Tiere in speziellen Haltevorrichtungen an den Schneidezähnen aufgehängt. Die Bakterien wurden wie unter 3.2.1 beschrieben gezüchtet und in PBS verdünnt. Vorversuche mit verschiedenen Bakterienkonzentrationen ergaben eine optimale Infektionsdosis von $2,5 \times 10^7$ KbE PA74 pro Maus. Daher wurden die Mäuse tröpfchenweise *intranasal* mit *P. aeruginosa* in einer Infektionsdosis von insgesamt $2,5 \times 10^7$ KbE in 20 µl infiziert. Scheininfizierte Mäuse erhielten 20 µl PBS. Während der Aufwachphase unter Rotlicht wurden die Mäuse beobachtet.

➤ **Vorbereitung der Phagen und Rekonstitutionslösung**

Da wie bereits beschrieben die Phagen aus Gründen der Titerstabilität 0,25 % HSA enthielten, wurde der Rekonstitutionslösung (Placebo) vor der Behandlung der Tiere ebenfalls 0,25 % HSA zugesetzt. Die einzelnen Phagen wurden zu gleichen Teilen vor der Behandlung der Tiere gemischt.

➤ **Behandlung mit Bakteriophagen**

Sechs Stunden nach der Infektion wurden die Tiere mit Isofluran narkotisiert. Zu diesem Zweck wurden sie in eine dafür vorgesehene Narkosekammer gesetzt, die mit Isofluran geflutet wurde. Sobald die erforderliche Narkosetiefe erreicht war, wurden die Tiere auf dem Rücken liegend in eine spezielle Fixiervorrichtung gelegt und fixiert. Außerdem wurde ihnen eine kleine Maske auf die Nase gesetzt, um die gewünschte Narkosetiefe zu erhalten. Dann wurden die Mäuse transoral intubiert und *intratracheal (i.t.)* 50 µl der Rekonstitutionslösung (Placebo) oder dem Phagencocktail injiziert. In diesem Fall entsprechen 50 µl des Phagencocktails etwa 7×10^8 PFU/Maus. Die transorale Intubation und intratracheale Applikation wurden von erfahrenen Tierexperimentatoren durchgeführt.

➤ **Untersuchung des klinischen Verlaufs der Pseudomonas Pneumonie**

Körpergewicht und -temperatur wurden ab dem Zeitpunkt der Infektion in 12-Stunden-Intervallen wiederholt gemessen und dokumentiert. Für die Beurteilung des Gesundheitszustandes der Tiere wurden klar definierte Handlungsanweisungen herangezogen. Diese wurden in Zusammenarbeit mit den Tierschutzbeauftragten der Charité, Mitarbeitenden der Arbeitsgruppe Witzenrath sowie Mitarbeitenden des LAGeSo erarbeitet und basieren auf den „Empfehlungen des Arbeitskreises Berliner Tierschutzbeauftragter für die vorzeitige Tötung erheblich leidender Versuchstiere“ (Tabelle 13).

Tabelle 13: Handlungsanweisung zur klinischen Beurteilung von Versuchstieren

Score Sheet - Antrag Registriernummer: A 0024/21– Belastungsgrad: maximal mittel								
Tiernummer:				Ausgangsgewicht in [g]:				
Versuchsbeginn Datum / Uhrzeit:				Zeit nach Versuchsbeginn (Zeit <i>p.i.</i>)				
Klinische Beobachtungsparameter			Kat.					
I Ernährungszustand / Körpergewicht in [g]								
Body Condition Score <i>(Ullman-Culleré und Foltz 1999)</i>								
> 5 % ≤ 10 % Gewichtsverlust*			A					
> 10 ≤ 20 % Gewichtsverlust* und/oder BC 2 <i>(Ullman-Culleré und Foltz 1999)</i>			B					
> 20 % Gewichtsverlust* und/oder BC 1 <i>(Ullman-Culleré und Foltz 1999)</i>			C					
II Verhalten in der Gruppe / Aktivität / Körpertemperatur in [°C]								

➤ **Präparation der Mäuse**

Vor der Sektion wurden die Körpertemperatur, das Gewicht und der klinische Zustand der Maus erhoben und dokumentiert. Anschließend wurde dem Tier eine Mischung aus 200 mg/kg Körpergewicht Ketamin und 20 mg/kg Körpergewicht Xylazin, verdünnt in isotoner Kochsalzlösung *i.p.* injiziert. Nach Feststellung einer ausreichenden Narkosetiefe durch Prüfung des Bauchhaut- und Zwischenzehenreflexes wurde das Operationsgebiet mit Ethanol (70 %) aufgereinigt und das Tier in Rückenlage auf einer Styroporunterlage fixiert. Dann wurde ein medianer Hautschnitt vorgenommen, um die Luftröhre freizulegen. Die Luftröhre wurde unterhalb des Kehlkopfes eröffnet und eine Trachealkanüle (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) eingeführt, die mittels Ligatur fixiert wurde. Die Beatmung erfolgte durch ein Kleinnager-Beatmungsgerät (MiniVent, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) mit einem Atemzugvolumen von 150 µl und 150 Atemzügen pro Minute. Es erfolgte eine mediane Laparotomie und die Eröffnung des Zwerchfells. Danach wurde eine 1:1 verdünnte Mischung aus Heparin (5.000 I.E./ml, B. Braun, Melsungen) und isotoner Kochsalzlösung (50 µl) in die rechte Herzkammer appliziert. Das Blut wurde durch Punktion der linken *Vena cava caudalis* mit einer 27-G-Kanüle (BD Microlance™ 3, 27 G, BD Bioscience, Heidelberg) entnommen. Der schnelle Blutentzug führte zum sofortigen Herz-Kreislaufstillstand. *Post mortem* wurde das *Diaphragma* vollständig von der Thoraxwand abgelöst und das Sternum medial eröffnet. Die Thoraxhälften wurden seitlich abgespreizt und fixiert. Der Thymus wurde entfernt und die Lunge gespült, um das Blut aus den pulmonalen Gefäßen zu entfernen.

➤ **Durchführung der bronchoalveolären Lavage**

Als nächstes wurden die Lungen zweimal mit 800 µl eiskaltem PBS, dem ein Proteaseinhibitor (1 Tablette Complete™ Mini, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, gelöst in 10 ml kaltem PBS) zugesetzt wurde, langsam und gleichmäßig gespült. Das Volumen der erhaltenen bronchoalveolären Lavage (BAL) wurde bestimmt und anschließend wurde die BAL auf Eis gelagert, um später weiterverarbeitet zu werden. Anschließend wurde die BAL bei 470 x g für 5 Minuten bei einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden abpipettiert und separat bei einer Temperatur von -80 °C eingefroren, bis sie weiterverarbeitet wurden. Die gewonnenen Zellpellets wurden für die durchflusszytometrische Analyse weiterverarbeitet.

➤ **Durchführung der Organentnahme**

Lunge, Milz, Leber, Herz und Thymus wurden unter Schonung der jeweiligen Gewebeteile entfernt. Nach der Entnahme wurden Milz und Lunge in MACS-Röhrchen, die mit 1 ml PBS gefüllt waren, auf Eis gekühlt bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Der *lobus accessorius* der

Lunge wurde separat entnommen, sofort in Trizol lysiert und bei -80 °C gelagert. Leber, Herz und Thymus wurden ebenfalls bei -80 °C gelagert.

3.2.8. Bestimmung der Erregerlast

➤ *Bakterienlast der bronchoalveolären Lavage*

Um die bakterielle Last der BAL zu bestimmen, wurden jeweils 50 µl unverdünnt und mit PBS verdünnt von 1:10, 1:100 und 1:1.000 auf Blutagarplatten ausgestrichen und ca. 18 Stunden lang bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Daraufhin wurden die KbE auf den Platten ausgezählt und die Bakterienlast wurde unter Berücksichtigung der verwendeten Probenmenge und der jeweiligen Verdünnungsstufe berechnet.

➤ *Bakterienlast der Milz und Lunge*

Die auf Eis gelagerte Milz und Lunge wurden anschließend homogenisiert. Von den resultierenden Suspensionen wurden jeweils 50 µl unverdünnt und im Falle des Lungenhomogenats zusätzlich in Verdünnungen von 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000 und 1:100.000 auf Blutagarplatten ausgestrichen und ca. 18 Stunden lang bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Anzahl der Bakterien in Milz und Lunge wurde durch die Berücksichtigung der verwendeten Probenmenge und der Verdünnungsstufe durch Auszählen der KbE ermittelt.

3.2.9. Blutverarbeitung

Nach der Blutentnahme wurde das Blut in EDTA-Röhrchen überführt. Die Leukozyten- und Thrombozytenzahl im Blut sowie weitere Blutparameter, wie Hämatokrit, wurden sofort mit einem Scil Vet abc™ Animal Blood Counter (Scil Animal Care Company GmbH) bestimmt. Zur Bestimmung der bakteriellen Last im Blut wurden 50 µl unverdünntes Blut auf Blutagarplatten ausgestrichen und ca. 18 Stunden lang bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Daraufhin wurden die KbE ausgezählt und die Bakterienlast wurde unter Berücksichtigung der verwendeten Probenmenge und der jeweiligen Verdünnungsstufe berechnet. Das verbleibende Blut wurde bei 1600 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma abpipettiert und in einem 0,5 ml Eppendorf-Röhrchen bei -80 °C gelagert.

3.2.10. Bestimmung von Phagentitern aus Lungen-, Milz- und BAL-Proben

Nachdem Lungen-, Milz- und BAL-Proben zur Bestimmung der bakteriellen Last verwendet worden waren, wurden sie mit Filtrerröhrchen filtriert, um Bakterien zu entfernen. Dann wurden die Proben in 96-Well-Platten seriell verdünnt. Auf die Bottomagarplatten wurden 4 ml Softagar mit je 100 µl eines vorkultivierten PA74 bei einer $OD_{600nm} = 0,1 - 0,2$ aufgetragen, um einen gleichmäßigen Bakterienfilm zu erhalten. Die Platten wurden etwa 20 Minuten lang getrocknet. Dann wurden 4 µl jeder seriellen Verdünnung der jeweiligen Probe in Triplikaten auf eine mit Softagar bedeckte Agarplatte aufgetragen und ca. 18 Stunden lang bei 37 °C und 5 % CO₂ bebrütet. Danach wurden die Phagenplaques auf den Platten gezählt, der Mittelwert aus den Triplikaten gebildet und der Phagentiter pro Probe unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufen bestimmt.

3.2.11. Ermittlung der pulmonalvaskulären Permeabilität

Um die pulmonale Gefäßpermeabilität zu bestimmen, wurde murines Serumalbumin (MSA) mittels ELISA (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA) in BALF und Plasma in geeigneten Verdünnungen quantifiziert. Die Proben, die bei -80 °C gelagert worden waren, wurden auf Eis aufgetaut und unverzüglich verarbeitet. Alle Schritte wurden gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Da die Platten im ELISA-Kit bereits vorbeschichtet waren, wurden die Proben und Standards im ersten Schritt in geeigneter Verdünnung direkt auf die 96-Well-Platte pipettiert. Nach einer Stunde Inkubation wurde die Platte viermal mit Waschpuffer gewaschen und der Detektionsantikörper aufgetragen. Die Platte wurde eine Stunde lang inkubiert und viermal gewaschen. Nun wurde HRP-Lösung A aufgetragen, und nach 30 Minuten Inkubationszeit wurde die Platte erneut viermal gewaschen. Nach diesen Waschsritten wurde das Enzymsubstrat Tetramethylbenzidin Flüssigsubstrat (TMB) aufgetragen. Nach dem Farbumschlag wurde die Reaktion mit 2 molarer Schwefelsäure gestoppt. Die OD wurde bei 450 nm im Anthos ht2 Mikroplattenphotometer (Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld) mit zugehöriger Software (WinRead Anthos) gemessen. Die Auswertung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers und unter Berücksichtigung der verwendeten Verdünnungen. Alle Proben und Standards wurden als Duplikate gemessen, und die erhaltenen Werte wurden anschließend gemittelt. Das MSA-BALF/Plasma-Verhältnis, das eine Abschätzung des Ausmaßes der Schädigung der alveolokapillären Barrierefunktion ermöglicht, wurde berechnet (Berger et al. 2018).

3.2.12. Quantifizierung der Zytokine in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit und im Blut

Zur Quantifizierung von Zytokinen in BALF und Plasma wurde das LEGENDplex™ Mouse Anti-Virus Response Panel (13-plex) von Biolegend (San Diego, USA) verwendet. Dieses Panel ermöglicht die gleichzeitige Quantifizierung von 13 Chemo- und Zytokinen der Maus, diese sind IFN- γ , CXCL1 (KC), TNF- α , CCL2 (MCP-1), IL-12p70, CCL5 (RANTES), IL-1 β , CXCL10 (IP-10), GM-CSF, IL-10, IFN- β , IFN- α , IL-6. Für die Verwendung im LEGENDplex™ Mouse Anti-Virus Response Panel wurden die BAL- und Plasmaprobe langsam auf Eis aufgetaut. Alle BAL-Proben wurden unverdünnt aufgetragen bzw. bei Bedarf 1:10 verdünnt. Plasmaprobe wurden in einer Verdünnung von 1:2 und, falls erforderlich, bis zu 1:100 aufgetragen. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die abschließende Messung der Proben wurde im BD FACSCanto II™ durchgeführt. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte unter Berücksichtigung aller Verdünnungsschritte mithilfe der Datenanalyse-Software von Biolegend. Für Proben, die unterhalb der Nachweisgrenze lagen, wurde der Wert des LOD geteilt durch Wurzel zwei ($LOD/\sqrt{2}$) verwendet (Croghan und Egeghy 2003).

3.2.13. Durchflusszytometrische Analyse

Die gewonnenen Zellpellets aus BAL 1 und BAL 2 wurden gepoolt und in 120 μ l FACS-Puffer (1x PBS + 0,1 % BSA) suspendiert. Falls die Proben aufgrund von Erythrozyten eine rote Verfärbung aufwiesen, wurde ein rote Blutkörperchen (*red blood cell*, RBC) Lyseschritt durchgeführt. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die isolierten BALF-Zellen mit anti-CD16/32 (BD, Heidelberg) für 5 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Färbung der Oberfläche der Zellen mit den monoklonalen Antikörpern: anti-CD11c (HL3; BD, Heidelberg), anti-CD11b (M1/70; eBioscience, Frankfurt), anti-CD45 (30-F11; BD, Heidelberg), anti-Ly6C (HK1.4; BioLegend, USA), anti-Ly6G (1A8; BD, Heidelberg), anti-MHCII (M6/114.15.2; eBioscience, Frankfurt), anti-F4/80 (BM8; eBioscience, Frankfurt) und anti-SiglecF (E50-2440; BD, Heidelberg). Anschließend wurden die Proben mit 1 ml 1 \times PBS bei 470 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets wurden entweder in 150 μ l 2 % Formaldehydlösung für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln oder in 150 μ l 1 % Formaldehydlösung über Nacht bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach jeweiliger Inkubationszeit wurde 2 ml FACS-Puffer zu den Zellen dazu gegeben, woraufhin sie bei 470 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert wurden. Daraufhin erfolgte ein erneuter Waschschrift der Zellen mit 2 ml FACS-Puffer und anschließend wurden die Zellen in 100 μ l FACS-Puffer suspendiert. Die Zellzahl wurde mit CountBright™ Absolute Counting Beads (Thermo Fisher Scientific, USA) bestimmt.

Dazu wurden 50 µl der 1:10 verdünnten Beads zu den Zellen gegeben. Die Leukozyten wurden mittels Durchflusszytometrie mit dem FACSCanto II Gerät (BD, Heidelberg) quantifiziert. Die Abbildung 4 zeigt die einzelnen Zellpopulationen anhand ihrer Oberflächenmarker.

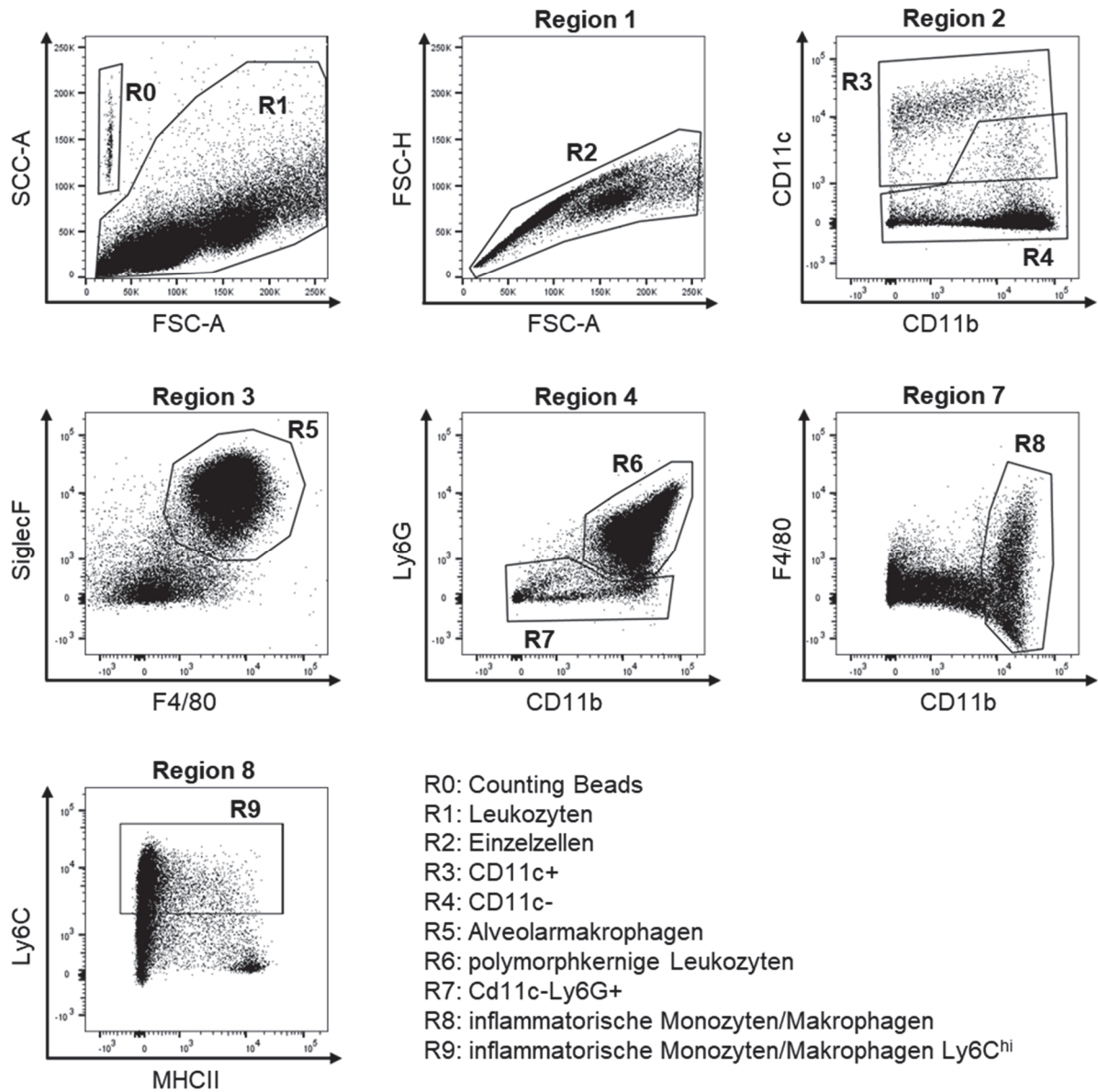


Abbildung 4: Exemplarische Differenzierung und Quantifizierung von Lungenzellen: Charakterisierung der einzelnen Leukozyten-Populationen in der murinen bronchoalveolären Lavage anhand ihrer Oberflächenmarker. Die Zellen wurden außerdem mit Hilfe der *Counting Beads* gezählt. Als Beispiel sind hier die Zellen von einem infizierten, mit Phagen behandelten Tier dargestellt. Abkürzungen: A: Areal, FSC: Vorwärtsstreulicht, H: Höhe, R: Region, SSC: Seitwärtsstreulicht.

3.2.14. Histologische Untersuchungen

Für die histopathologische Untersuchung wurden getrennte Versuchsgruppen analysiert. Nach der finalen Blutentnahme und Euthanasie der Tiere wie unter Abschnitt 3.2.7. beschrieben, wurden die Lungen zusammen mit Herz und Thymus vorsichtig entnommen, in histologische Einbettkassetten (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) eingelegt und in einer 4 %igen Formaldehydlösung fixiert. Zum Schutz der Lungen für die histologischen Untersuchungen wurden sie nicht, wie in Abschnitt 3.2.7 beschrieben, gespült oder lavagiert. Zusätzlich wurden in den histologischen Versuchsgruppen weitere Organe der Tiere (Leber, Darm und beide Nieren) auch in 4 %iger Formaldehydlösung fixiert sowie in Paraffin eingebettet und aufbewahrt. Das Blut der Tiere wurde, wie unter Abschnitt 3.2.9. beschrieben, weiterverarbeitet, das Differentialblutbild analysiert und das Plasma zur Bestimmung von Zytokinen verwendet. Die weitere Aufarbeitung der Lungen nach histologischen Standards erfolgte am Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin. Die histopathologischen Untersuchungen wurden von Frau Judith Bushe und Frau Anne Voss durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte mit Hämalaun-Eosin (H & E) gefärbt. Die Veränderungen in den Lungen wurden anhand spezifischer Parameter, einschließlich des Entzündungsgrades, der Neutrophileninfiltration, des Auftretens von Pleuritis und Steatitis, auf einer Skala von 0 (nicht vorhanden) bis 4 (massiv) von geschulten Tierpathologen, die gegenüber den Studiengruppen verblindet waren, bewertet (Dietert et al. 2017).

3.2.15. Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Die statistische Analyse aller Daten wurde mit dem Grafik- und Statistikprogramm GraphPad Prism 9.0 (Graph Pad Software Incorporated, San Diego, Kalifornien, USA) durchgeführt. Eine statistische Signifikanz wurde bei *P*-Werten unter 0,05 angenommen. Die Daten wurden als Streudiagramme bzw. Kurvendiagramme mit arithmetischem Mittel \pm Standardabweichung (*standard deviation*, SD) oder als Boxplots mit Einzelwerten, Median, Quartilen und mit Whiskern vom Minimum bis zum Maximum (Spannweite) angegeben.

Die Daten der Aerosolierungsversuche wurden logarithmiert. Die Daten der aerosolisierten Gruppen wurden jeweils mit denen der nicht aerosolisierten Gruppen mit Hilfe eines unpaarigen *t*-Testes verglichen. Der Kruskal-Wallis Test sowie die Korrektur nach Dunn für multiple Vergleiche diente im A549 Infektionsmodell zum Vergleich ausgewählter Gruppen untereinander. Die Daten der Bakterienlast sowie der Phagentiter im *Ex-vivo*-Lungeninfektionsmodell wurden nach der Formel $Y = Y + 1$ modifiziert und anschließend logarithmiert. Mit Hilfe der *two-way* ANOVA mit Dunnett's *multiple comparisons* Test wurde die behandelte

Gruppe jeweils mit der infizierten und mit Puffer behandelten Gruppe zu den einzelnen Zeitpunkten verglichen (Bakterienlast und IL-1 β Messung). Bei der Analyse der Phagentiter diente der *two-way ANOVA*/ Tukey's *multiple comparisons* Test für den Vergleich innerhalb einer Gruppe über den gesamten Zeitverlauf.

Die Auswertung der Körpertemperatur- und Körpergewichtsdaten der Tiere wurde mit einer *repeated measures Mixed-effects* Analyse sowie dem Tukey's *multiple comparisons* Test für den Vergleich aller Gruppen untereinander zum jeweils gleichen Zeitpunkt durchgeführt. Die Daten der bakteriellen Last in der Lunge und BALF der Mäuse im *In-vivo*-Modell wurden nach der Formel $Y = Y + 1$ modifiziert und anschließend logarithmiert. Mit Hilfe eines unpaarigen *two-tailed* t-Testes wurden die Gruppen miteinander zum jeweils gleichen Zeitpunkt verglichen. Die Daten der Phagentiter im *in vivo* murinen Pneumonie Modell wurden ebenfalls logarithmiert. Die *one-way ANOVA* mit Šidák's *multiple comparisons* Test wurde zum Vergleich innerhalb einer Gruppe über den gesamten Zeitraum von 48 Stunden durchgeführt. Alle weiteren Daten wurden mit Hilfe der *two-way ANOVA* mit Tukey's *multiple comparisons* Test für den Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen zum jeweiligen Zeitpunkt verglichen. Bei der statistischen Auswertung dieser Arbeit haben die Statistiker der FU Berlin (Statistische Beratungseinheit/fu:stat) Hilfestellung gegeben.

4. Ergebnisse

4.1. Die Aerosolierung des Phagencocktails führt zu einem Titerverlust von durchschnittlich 15,65 %

Abbildung 5 zeigt die absoluten Titer-Ergebnisse der nicht aerosoliereten und aerosoliereten Phagen (Phagencocktail und einzelne Phagen). In keinem Experiment zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Ursprungstitern und den Titern der entsprechenden Phagen nach Aerosolierung (Abb. 5). Zur besseren Beurteilung der Ergebnisse wurden die nicht aerosoliereten Titer und die dazu entsprechenden aerosoliereten Phagentiter ins Verhältnis gesetzt und so der Titerverlust in % bestimmt. Dabei zeigten die Einzelphagen JG005 und JG024 durchschnittlich einen Titerverlust von ca. 25 % nach Aerosolierung mittels 6 µm Membran auf. Der Phage BHZ17 blieb stabil. Der Phagencocktail zeigte nach Aerosolierung mittels 4 µm Membran einen Titerverlust von 15,65 %. Wie bereits beschrieben wurde den aufgereinigten Phagen 0,25 % HSA zugesetzt. Es konnte bei der Aerosolierung keine erhöhte Schaumbildung beobachtet werden.

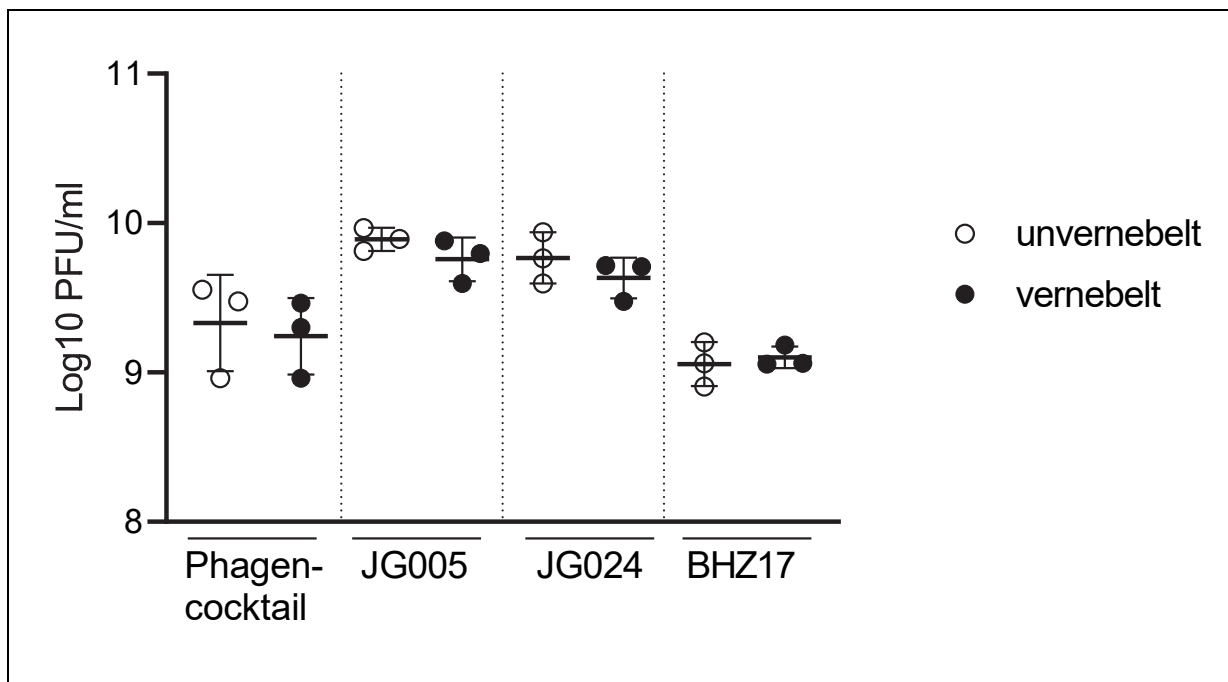


Abbildung 5: Phagentiter nach Aerosolierung mittels Mesh Vernebler: 3 ml der jeweiligen Phagen wurden mit Hilfe des Verneblers aerosolieret (n = 3). Der Phagencocktail wurde mit einer Membran mit 4 µm großen Poren aerosolieret und die Einzelphagen mit einer Membran mit 6 µm großen Poren. Die Daten der aerosoliereten Gruppen wurden jeweils mit denen der nicht aerosoliereten Gruppen mit Hilfe eines unpaarigen t-Testes verglichen. Die Daten sind angegeben als Streudiagramm mit Mittelwert ± SD. Abkürzungen: PFU: Plaque-bildende Einheit.

4.2. Die Phagen zeigen weder einen additiven noch protektiven Effekt auf die LDH-Freisetzung aus A549 Zellen

Es konnte keine erhöhte LDH-Freisetzung bei Zellen beobachtet werden, die ausschließlich mit dem Phagencocktail stimuliert wurden, im Vergleich zwischen Phagenlysat und aufgereinigten Phagen (Abb. 6). Bei einer MOI von 1 und 10 führte die Infektion von A549-Zellen mit *P. aeruginosa* zu einer messbaren LDH-Freisetzung. Im Vergleich zur Applikation von Phagenpuffer (SM-Puffer) auf infizierte Zellen, führte die Applikation des Phagencocktails, unabhängig davon, ob die Phagen aufgereinigt waren oder nicht, weder zu einer höheren noch zu einer geringeren LDH-Freisetzung. Es zeigte sich jedoch eine Tendenz hin zu einer geringeren Freisetzung (Abb. 6).

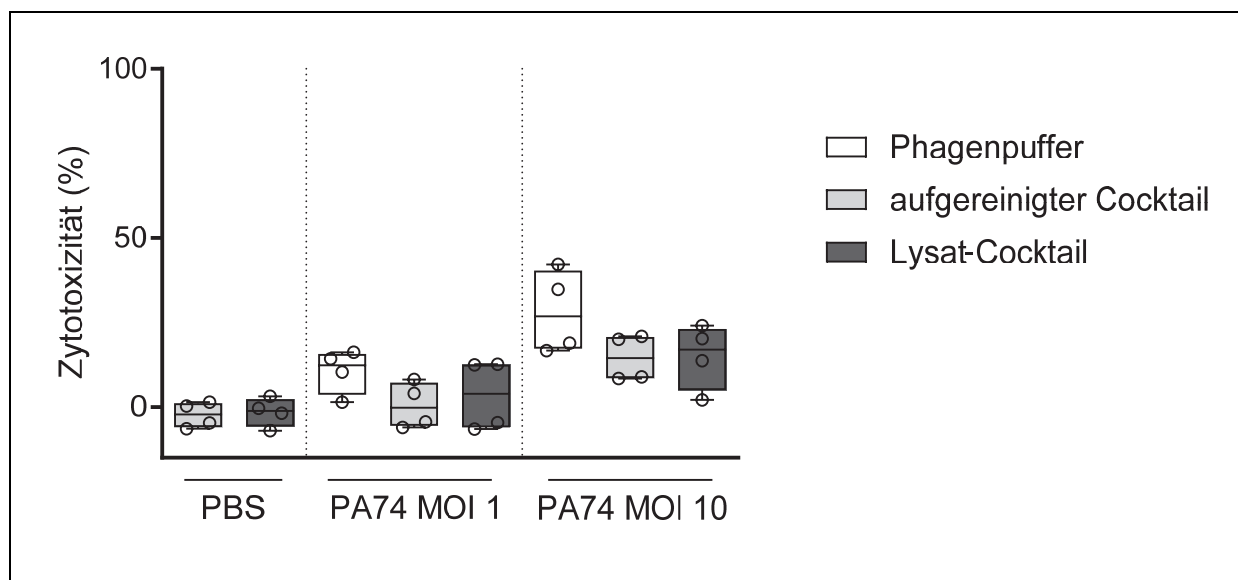


Abbildung 6: Zytotoxische Wirkung des Phagencocktails und des Bakteriums PA74 auf A549 Zellen: Die Zellen wurden mit PA74 infiziert und entweder mit Phagenlysat oder aufgereinigten Phagen behandelt, jeweils gemischt als Cocktail. Außerdem wurden die Zellen nur entweder mit aufgereinigten Phagen oder mit Phagenlysat stimuliert. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37 °C wurde die LDH-Freisetzung als Maß für eine mögliche Zellschädigung gemessen (n = 4). Der Kruskal-Wallis Test mit Dunn's multiple comparisons diente zum Vergleich ausgewählter Gruppen untereinander (Gruppenvergleiche durch vertikale, gestrichelte Linien getrennt). Die Daten sind angegeben als Boxplots mit Einzelwerten, Median, Quartilen und mit Whiskern vom Minimum bis zum Maximum (Spannweite). Abkürzungen: LDH: Laktatdehydrogenase, PA74: klinisches Isolat von *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 107574), MOI: Multiplizität der Infektion.

4.3. Effekte der Phagenbehandlung auf die Infektion mit *P. aeruginosa* im *Ex-vivo*-humanen Lungengewebemodell

4.3.1. Eine einmalige Behandlung des Lungengewebes mit den Einzelphagen JG005 und JG024 in der hohen Dosis führt zur Reduktion des bakteriellen Wachstums

Das Wachstum von PA74 im humanen Lungengewebe wurde zu allen untersuchten Zeitpunkten nach der Inokulation nachgewiesen (Abb. 7). Eine einmalige Behandlung mit dem Phagen JG005 (MOI 1000) führte zu allen Zeitpunkten zu einer signifikant geringeren Bakterienzahl mit einer Reduktion der Bakterienzellzahl von über einer log Stufe (Abb. 7A). Sechs und 24 Stunden nach der Applikation von JG024 (MOI 1000) kam es zu einer signifikant geringeren Bakterienzahl (Abb. 7B). Hingegen hatte die Applikation von JG005 oder JG024 bei MOI 1 (Abb. 7A und 7B) oder Bhz17 in beiden Dosierungen keine Auswirkung auf das Bakterienwachstum (Abb. 7C). Die Applikation von Imipenem führte zu einer vollständigen Hemmung des bakteriellen Wachstums (Abb. 7).

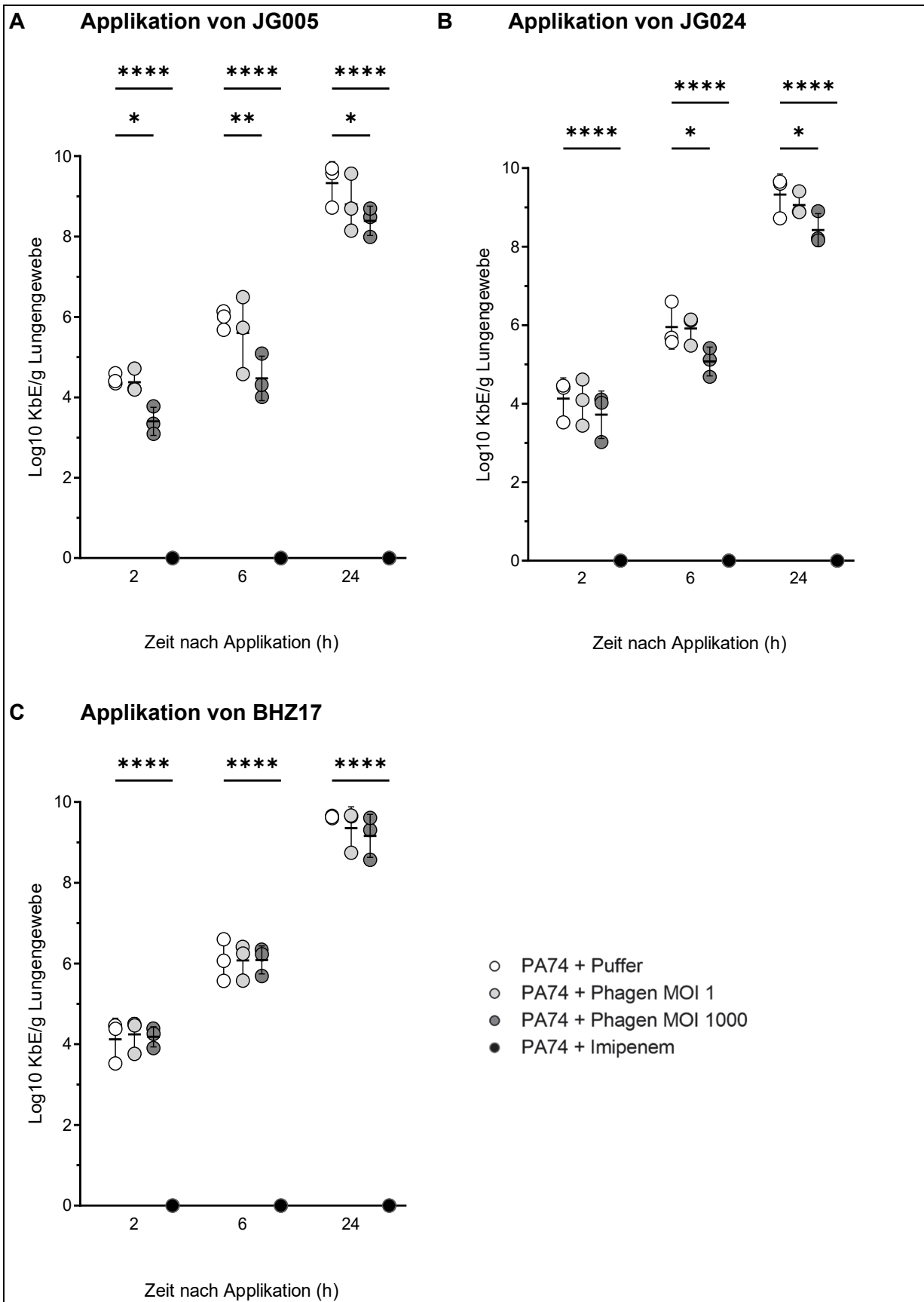


Abbildung 7: Bakterienlast im Ex-vivo-Lungenmodell über einen Zeitraum von 24 Stunden nach Applikation der drei Einzelphagen: 30 Minuten nach PA74 Inokulation erfolgte eine Stimulation durch Puffer (SM-Puffer + 0,25 % HSA), Phage (MOI 1, MOI 1000) oder Imipenem (2,5 mg/100 µl). Zwei, sechs und 24 Stunden nach der Behandlung wurden die Gewebeprobe

der KbE bestimmt. **A:** Applikation von JG005, **B:** Applikation von JG0024, **C:** Applikation von BHZ17. **A – C:** n = 3, Jeder Phage wurde in drei unabhängigen Experimenten getestet; gemeinsame Kontrollen (SM-Puffer und Imipenem) wurden in einem Experiment mit JG005 und JG024 bzw. in zwei Experimenten mit JG024 und BHZ17 verwendet; Die Daten sind angegeben als Streudiagramm mit Mittelwert \pm SD und wurden analysiert mittels *two-way ANOVA/ Dunnett's multiple comparisons* Test für die Vergleiche zwischen den behandelten Gruppen und der mit Puffer behandelten Gruppe (Kontrolle) zu den entsprechenden Zeitpunkten (* p < 0,05, ** p < 0,01 und **** p < 0,0001). Abkürzungen: HSA: humanes Serumalbumin, KbE: koloniebildende Einheit, MOI: Multiplizität der Infektion, PA74: klinisches Isolat von *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 107574).

4.3.2. Eine einmalige Behandlung des Lungengewebes mit dem Phagencocktail führt zur Reduktion des bakteriellen Wachstums in Abhängigkeit von Dosis und Zeit

Um die Wirksamkeit des Phagencocktails umfassender zu charakterisieren, wurden Lungengewebsstücke neben PA74 auch mit einem zweiten klinischen Isolat (PA70) stimuliert und mit dem Phagencocktail behandelt. Die Infektion von menschlichem Lungengewebe mit PA74 (Abb. 8A) bzw. PA70 (Abb. 8B) führte zu allen untersuchten Zeitpunkten zu bakteriellem Wachstum. Die Applikation des Phagencocktails mit einer MOI von 3000 führte zu allen Zeitpunkten nach der Behandlung in PA74 sowie sechs und 24 Stunden in PA70-stimulierten Lungen zu einer signifikant geringeren Bakterienzahl (Abb. 8). Hingegen führte die Applikation von weniger Phagen (MOI 3) nur zu einer Reduktion des bakteriellen Wachstums 24 Stunden nach der Behandlung in PA70-stimulierten Lungen (Abb. 8B). Die Anwendung von Imipenem führte zu einer vollständigen Hemmung des bakteriellen Zellwachstums (Abb. 8).

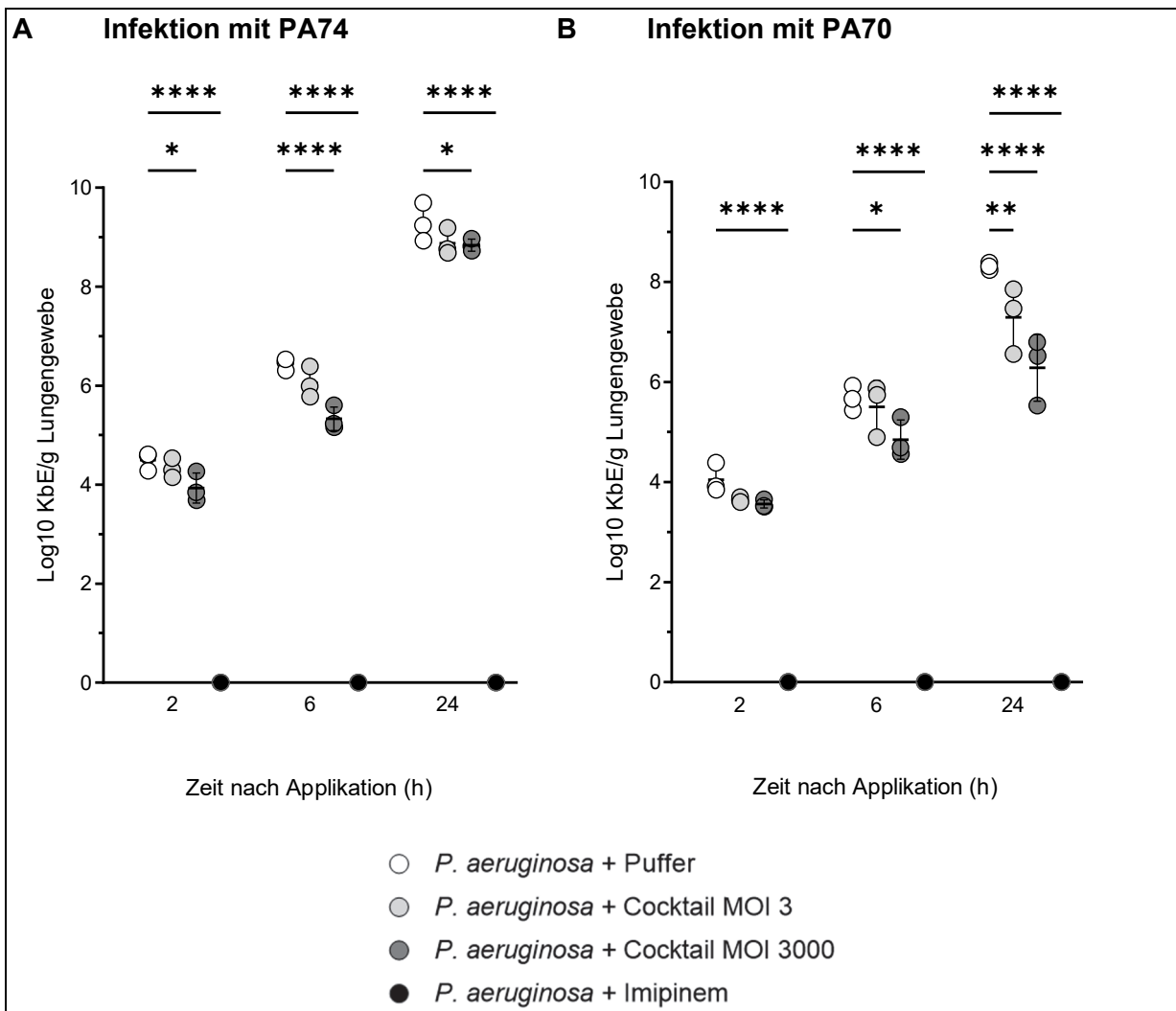


Abbildung 8: Bakterienlast im Ex-vivo-Lungenmodell über einen Zeitraum von 24 Stunden nach Applikation des Phagencocktails: 30 Minuten nach PA74 bzw. PA70 Inokulation erfolgte eine Stimulation des Lungengewebes durch Puffer (SM-Puffer + 0,25 % HSA), Phagencocktail (MOI 3, MOI 3000) oder Imipinem (2,5 mg/100 µl; jeweils n = 3). Zwei, sechs und 24 Stunden nach der Behandlung wurden die Gewebeproben homogenisiert und die Anzahl der KbE bestimmt. **A:** Inokulation mit PA74, **B:** Inokulation mit PA70. **A – B:** Die Daten sind angegeben als Streudiagramm mit Mittelwert ± SD und wurden analysiert mittels *two-way ANOVA*/Dunnett's *multiple comparisons* Test für die Vergleiche zwischen den behandelten Gruppen und der mit Puffer behandelten Gruppe (Kontrolle) zu den entsprechenden Zeitpunkten (* p < 0,05, ** p < 0,01 und **** p < 0,0001). Abkürzungen: HSA: humanes Serumalbumin, KbE: koloniebildende Einheit, MOI: Multiplizität der Infektion, PA74: klinisches Isolat von *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 107574), PA70: klinisches Isolat von *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 107574), *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*.

4.3.3. Die Phagentiter der einzelnen Phagen bleiben im Lungengewebe über 24 Stunden stabil und erhöhen sich bei vorhandenen Bakterien

Die Analyse der Phagentiter zeigte das Vorhandensein aller drei Einzelphagen im menschlichen Lungengewebe in beiden Dosen (MOI 1 und MOI 1000) zu allen Zeitpunkten (Abb. 9). Die Titer der einzelnen Phagen blieben zwei bzw. sechs Stunden nach der Behandlung stabil, stiegen jedoch 24 Stunden nach der Applikation im Vergleich mit den Titern der frühen Zeitpunkte bei beiden Dosierungen bei allen drei Einzelphagen an (Abb. 9). Dabei zeigte der Titer von JG024 bei beiden Dosierungen mit über 5 (MOI 1) bzw. über 3 (MOI 1000) log Stufen (Abb. 9B) die höchste Zunahme. Dagegen blieben die Titer der einzelnen Phagen in nicht infizierten Proben über die Zeit stabil (Abb. 9). So blieb der Titer der nicht infizierten Proben mit JG005 bei ca. 5×10^5 PFU/ml (Abb. 9A), mit JG024 bei ca. 1×10^6 PFU/ml (Abb. 9B) und mit BHZ17 bei ca. 1×10^5 PFU/ml (Abb. 9C).

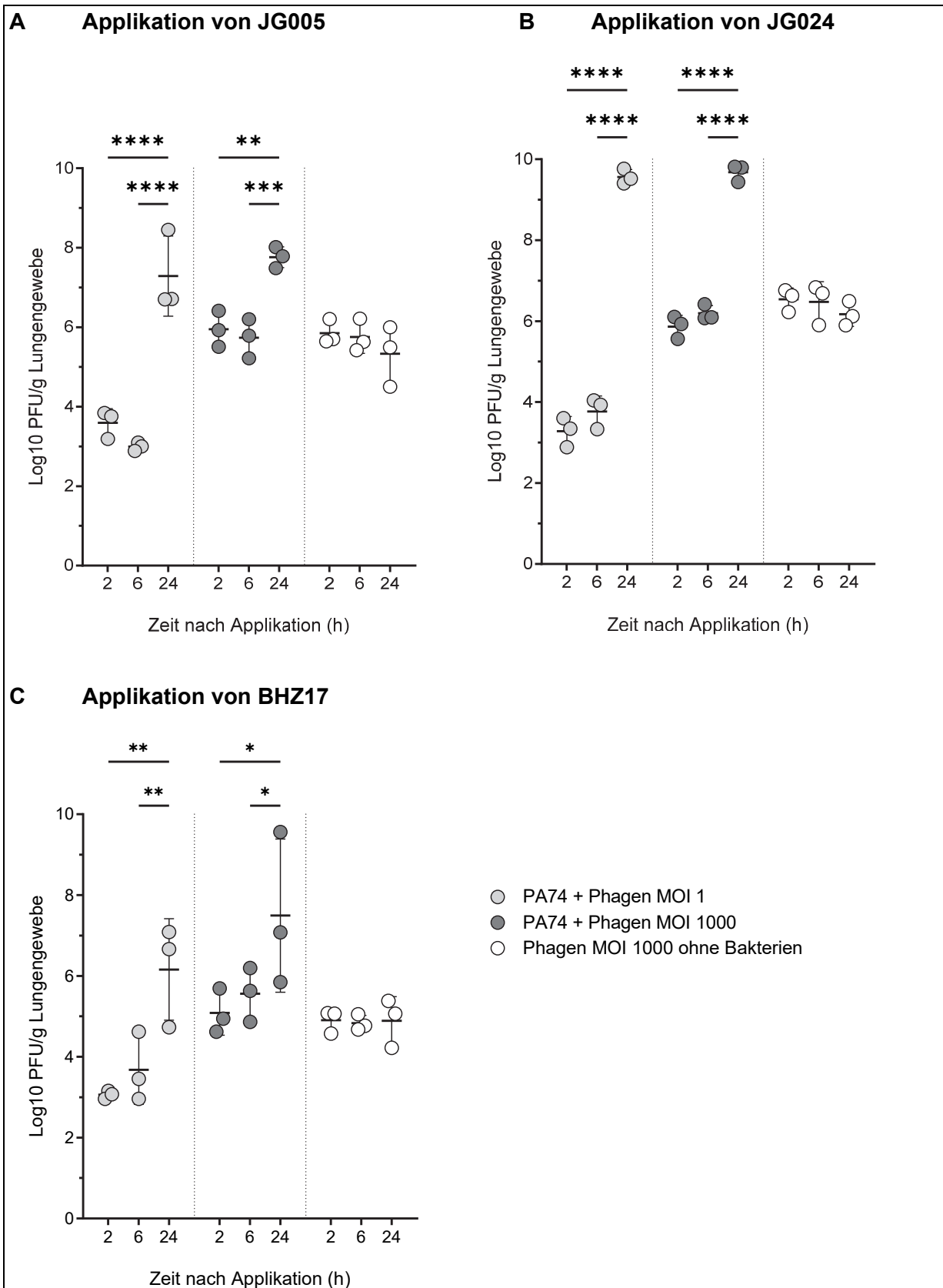
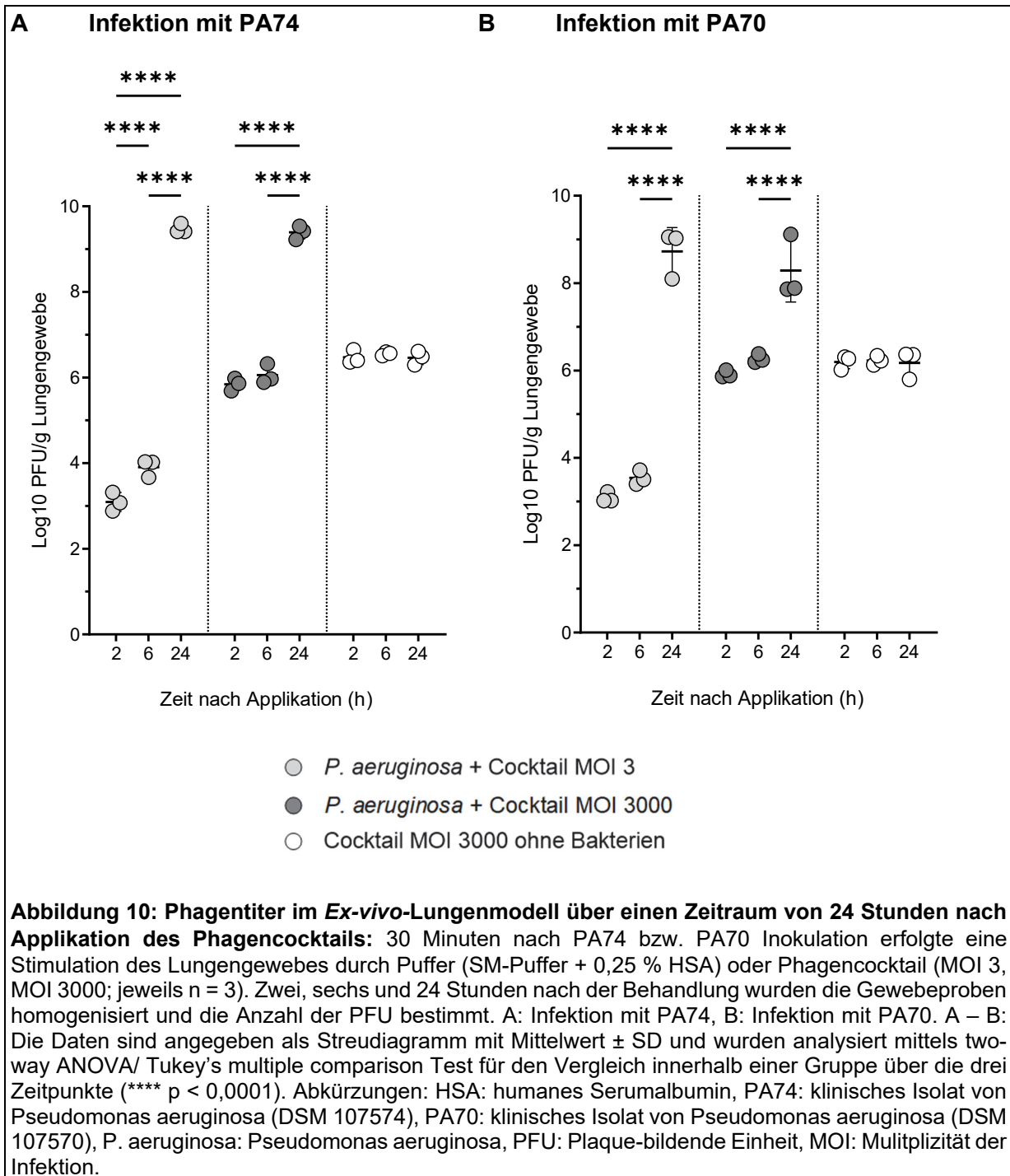


Abbildung 9: Phagentiter im *Ex-vivo*-Lungenmodell über einen Zeitraum von 24 Stunden nach Applikation der Einzelphagen: Dreißig Minuten nach PA74 Inokulation erfolgte eine Stimulation durch Puffer (SM-Puffer + 0,25 % HSA) oder Phage (MOI 1, MOI 1000; jeweils n = 3). Zwei, sechs und 24 Stunden nach der Behandlung wurden die Gewebeproben homogenisiert und die Anzahl der PFU

bestimmt. **A:** Applikation von JG005, **B:** Applikation von JG0024, **C:** Applikation von BHZ17. **A – C:** Die Daten sind angegeben als Streudiagramm mit Mittelwert \pm SD und wurden analysiert mittels *two-way ANOVA/ Tukey's multiple comparisons* Test für den Vergleich innerhalb einer Gruppe über die drei Zeitpunkte (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$). Abkürzungen: HSA: humanes Serumalbumin, MOI: Multiplizität der Infektion, PA74: klinisches Isolat von *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 107574), *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*, PFU: Plaque-bildende Einheit.

4.3.4. Die Phagentiter des Phagencocktails bleiben im Lungengewebe über 24 Stunden stabil und erhöhen sich bei vorhandenen Bakterien

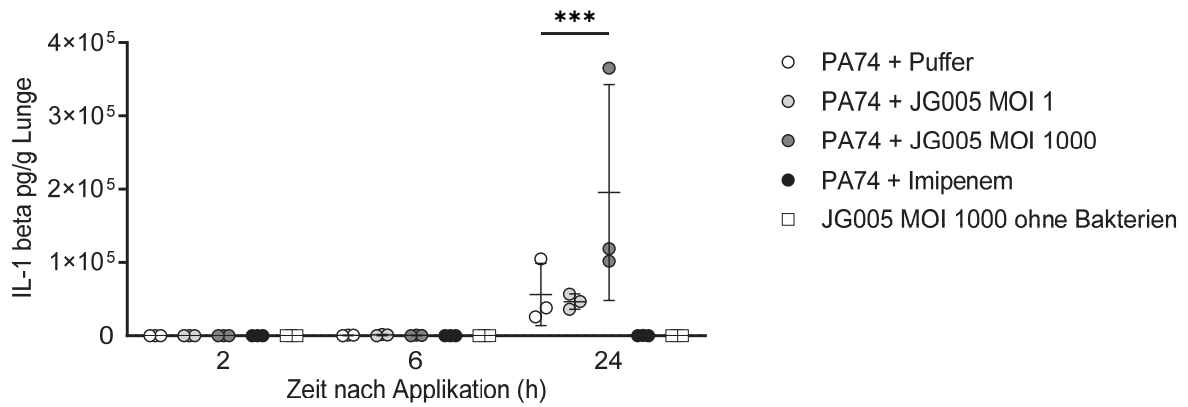
Ebenso wie die Titer der einzeln getesteten Phagen blieben die Titer des Phagencocktails in PA74 und PA70 infizierten Lungenproben zwei bzw. sechs Stunden nach der Behandlung stabil, stiegen jedoch 24 Stunden nach der Applikation im Vergleich mit den Titern der frühen Zeitpunkte bei beiden Dosierungen (MOI 3 und 3000) an (Abb. 10A, B) sowie im Vergleich zwischen zwei und sechs Stunden in PA74 infizierten und mit MOI 3 behandelten Proben (Abb. 10A). Die Zunahme der Phagentiter in mit PA70 infizierten Lungen war mit einem absoluten Anstieg von über 5 log Stufen (MOI 3) bzw. über 2 log Stufen (MOI 3000) nach 24 Stunden zwar niedriger als die Zunahmen in mit PA74 infizierte Lungen, dennoch zeigten sich auch hier signifikante Ergebnisse (Abb. 10B). Die Titer des Cocktails in nicht infiziertem Gewebe blieben über den Zeitverlauf stabil (Abb. 10A, B).



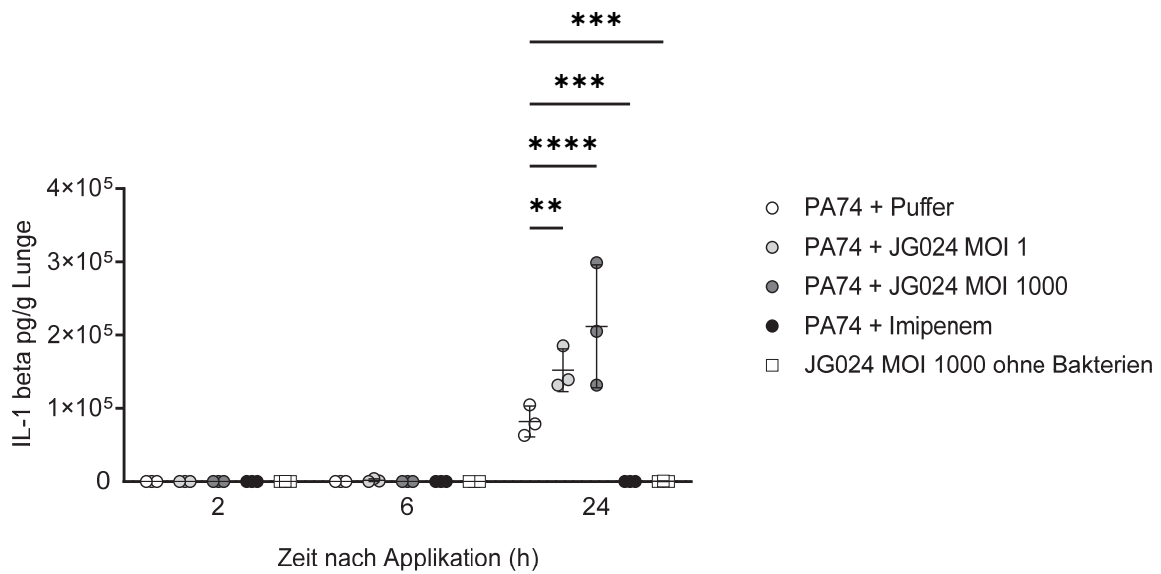
4.3.5. Die Behandlung mit den einzelnen Phagen führt zu einer erhöhten Ausschüttung des Zytokins IL-1 β in mit PA74 infiziertem humanem Lungengewebe

Die Messung des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β in infiziertem menschlichen Lungengewebe zeigte bei allen Versuchsgruppen zu den Zeitpunkten zwei und sechs Stunden keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zwischen infizierten, Puffer behandelten und infizierten, mit Phagen oder Imipenem behandelten Gruppen (Abb. 11A, B, C). Auch die alleinige Applikation von Phagen führte zu diesen Zeitpunkten zu keinem Unterschied im Vergleich mit der infizierten und Puffer behandelten Gruppe. Erst nach 24 Stunden konnten Unterschiede festgestellt werden und dort zeigten sich auch die höchsten messbaren IL-1 β Werte. Dabei wurden jeweils die niedrigsten Werte in nicht infizierten, mit Phagen behandelten sowie in infizierten und mit Antibiotikum behandelten Proben gemessen (signifikanter Unterschied zu der jeweiligen Kontrollgruppe PA74 + Puffer, außer in den Experimenten mit JG005; Abb. 11A, B, C). In den mit JG005 MOI 1000 behandelten Lungen waren die IL-1 β Werte 24 Stunden nach Behandlung verglichen mit den Puffer-behandelten Kontrollen erhöht (Abb. 11A). Auch in mit JG024 behandeltem, infiziertem Lungengewebe konnten 24 Stunden nach der Behandlung mit MOI 1 und 1000 signifikant erhöhte IL-1 β Werte festgestellt werden (Abb. 11B), während mit Bhz17 behandelte Lungen keine erhöhten Werte aufwiesen (Abb. 11C).

A Applikation von JG005



B Applikation von JG024



C Applikation von BHZ17

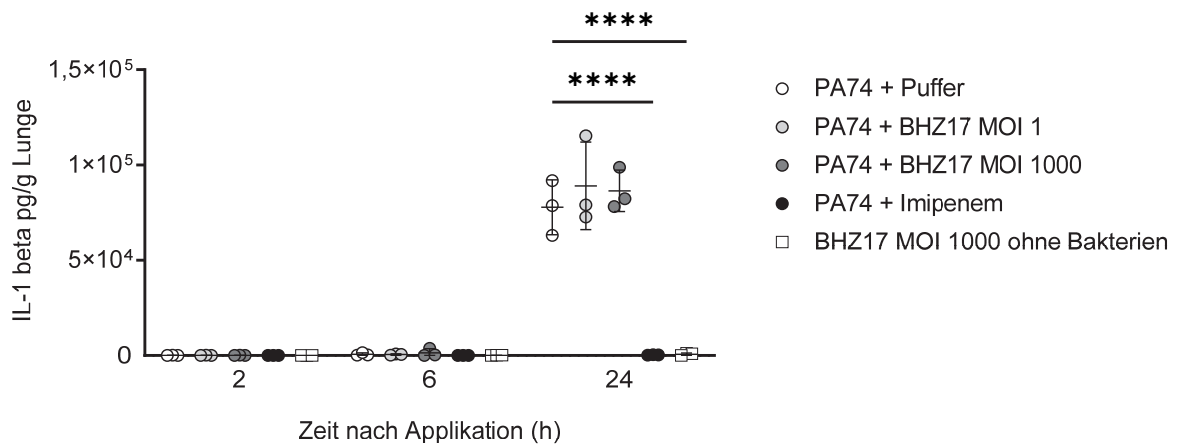


Abbildung 11: IL-1 β Freisetzung im *Ex-vivo*-Lungenmodell im Zeitraum von 24 Stunden nach Applikation der drei Einzelphagen: 30 Minuten nach PA74 Infektion erfolgte eine Stimulation durch

Puffer (SM-Puffer + 0,25 % HSA), Einzelphagen (MOI 1, MOI 1000) oder Imipenem (2,5 mg/100 µl). Zwei, sechs und 24 Stunden nach der Behandlung wurden die Überstände aus den Wells entnommen und für weitere Untersuchungen aufbewahrt. Die Überstände wurden anschließend zur Bestimmung von IL-1 β benutzt. A: Applikation von JG005, B: Applikation von JG024, C: Applikation von BHZ17. A – C: n = 3, jeder Phage wurde in drei unabhängigen Experimenten getestet; gemeinsame Kontrollen (SM-Puffer und Imipenem) wurden in einem Experiment mit JG005 und JG024 bzw. in zwei Experimenten mit JG024 und BHZ17 verwendet; Die Daten sind angegeben als Streudiagramm mit Mittelwert \pm SD und wurden analysiert mittels *two-way ANOVA*/Dunnett's *multiple comparisons* Test für die Vergleiche zwischen den behandelten Gruppen und der mit Puffer behandelten Gruppe (Kontrolle) zu den entsprechenden Zeitpunkten (** p < 0,01, *** p < 0,001 und **** p < 0,0001). Abkürzungen: HSA: humanes Serumalbumin, MOI: Multiplizität der Infektion, PA74: klinisches Isolat von *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 107574).

4.3.6. Die IL-1 β Freisetzung nach Phagencocktail-Behandlung ist abhängig vom Infektionsstamm

Auch bei den mit dem Phagencocktail behandelten Lungenstücken zeigte die Messung des Zytokins IL-1 β zu den Zeitpunkten zwei und sechs Stunden keine messbaren Unterschiede durch die Infektion oder die Behandlung mit Phagencocktail oder Imipenem (Abb. 12A, B). Erst nach 24 Stunden zeigen sich Unterschiede. Dabei wurden jeweils die niedrigsten Werte in nicht infizierten, mit Phagen behandelten sowie in infizierten und mit Antibiotikum behandelten Proben gemessen, welche signifikant zu der mit Puffer behandelten Kontrollgruppe waren (Abb. 12A, B). Die Applikation des Phagencocktails (MOI 3000) führte in den mit PA74 infizierten Lungenproben zu einem Anstieg der IL-1 β Werte 24 Stunden nach der Behandlung verglichen mit den Puffer-behandelten Proben zum gleichen Zeitpunkt (Abb. 12A). In PA70-infizierten Lungen konnte im Gegensatz dazu 24 Stunden nach der Anwendung des Phagencocktails (MOI 3 und 3000) weniger IL-1 β Freisetzung im Vergleich mit der Kontrolle beobachtet werden (Abb. 12B).

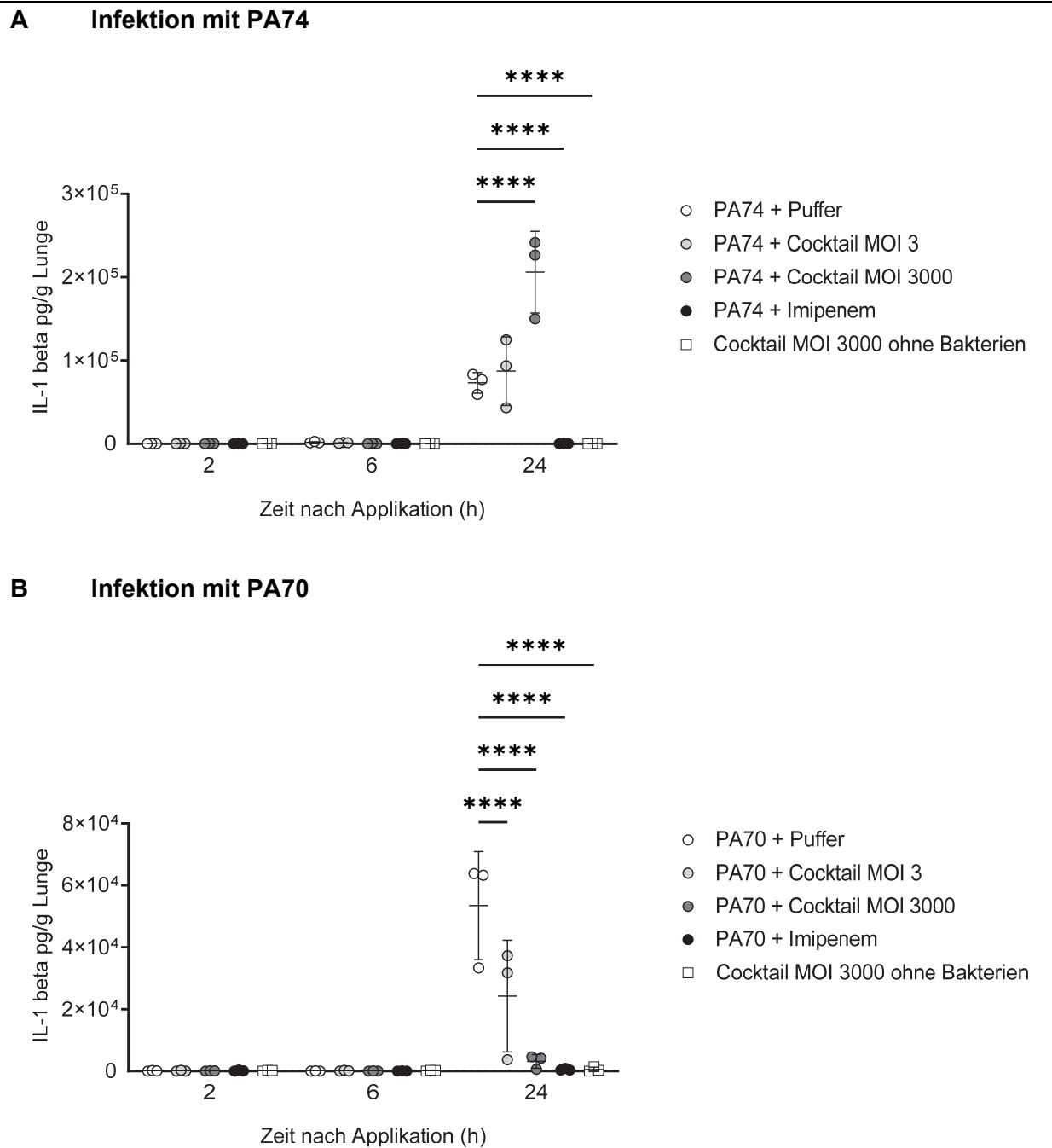


Abbildung 12: IL-1 β Freisetzung im Ex-vivo-Lungenmodell im Zeitraum von 24 Stunden nach Applikation des Phagencocktails: 30 Minuten nach PA74/PA70 Infektion erfolgte eine Stimulation durch Puffer (SM-Puffer + 0,25 % HSA), Phagencocktail (MOI 3, MOI 3000) oder Imipenem (2,5 mg/100 μ l; jeweils n = 3). Zwei, sechs und 24 Stunden nach der Behandlung wurden die Überstände aus den Wells entnommen und anschließend zur Bestimmung von IL-1 β benutzt. **A:** Infektion mit PA74, **B:** Infektion mit PA70. **A – B:** Die Daten sind angegeben als Streudiagramm mit Mittelwert \pm SD und wurden analysiert mittels *two-way ANOVA/ Dunnnett's multiple comparisons* Test für die Vergleiche zwischen den behandelten Gruppen und der mit Puffer behandelten Gruppe (Kontrolle) zu den entsprechenden Zeitpunkten (**** p < 0,0001). Abkürzungen: HSA: humanes Serumalbumin, MOI: Multiplizität der Infektion, PA70: klinisches Isolat von *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 107570).

4.4. Modell der murinen Pseudomonadenpneumonie

4.4.1. Die Phagenbehandlung zeigt keinen Effekt auf Körpergewichtsveränderungen

Die transnasale Infektion mit PA74 führte 12 Stunden *p.i.* zu klinischen Zeichen einer Lungenentzündung, wie Abnahme des Körpergewichts im Laufe der Zeit (Abb. 13). Uninfizierte PBS-Kontrollmäuse behielten ihr Körpergewicht unabhängig von der Phagen- oder Pufferbehandlung bei (Abb. 13). Die Phagenapplikation hatte dabei keinen negativen Einfluss auf das Körpergewicht der scheininfizierten Mäuse (Abb. 13). Hingegen gab es signifikante Unterschiede zu jedem Untersuchungszeitpunkt ab 12 Stunden zwischen den mit Puffer behandelten PBS-Mäusen und der mit Puffer behandelten infizierten Gruppe (Abb. 13). Die Analyse der Körpergewichtsveränderungen ergab keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen nach Phagenapplikation (Abb. 13). Zudem wurden nach der Phagenapplikation keine unerwünschten Nebenwirkungen beobachtet, unabhängig davon, ob die Tiere infiziert waren oder nicht. Tiere, welche die vordefinierten humanen Endpunkte erreichten, wurden euthanasiert (n = 3, alle aus der PA74- und Placebogruppe).

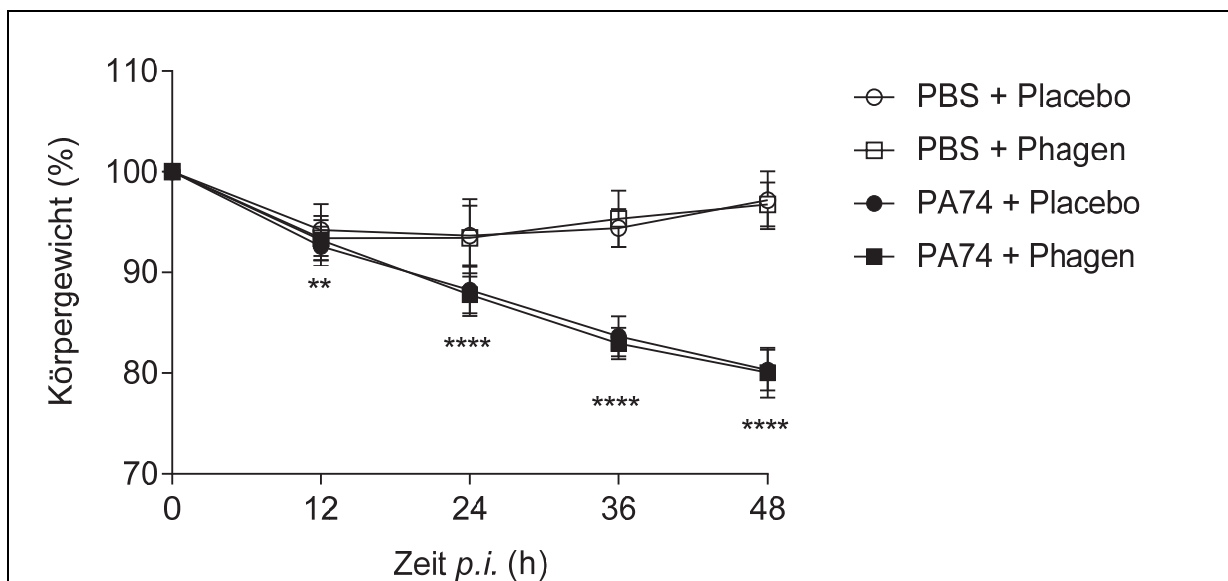


Abbildung 13: Zeitlicher Verlauf des Körpergewichts in % bezogen auf das Ursprungsgewicht im murinen Pneumoniemodell: Die Mäuse wurden transnasal durch Tröpfcheninfektion mit $2,5 \times 10^7$ KBE von PA74 infiziert (n = 13 – 14, pro Gruppe und Analysezeitpunkt) oder mit PBS scheininfiziert (n = 7 – 8, pro Gruppe und Analysezeitpunkt). Sechs Stunden *p.i.* wurden die Mäuse entweder mit der Rekonstitutionslösung (Placebo) oder dem Phagencocktail behandelt. Zwölf Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden *p.i.* wurden die Mäuse analysiert. Die Daten sind als Kurvendiagramm für alle untersuchten Mäuse zusammen dargestellt mit Mittelwert \pm SD und wurden mittels *repeated measures mixed-effects* Analyse mit Tukey's *multiple comparison* Test für den Vergleich der Gruppen untereinander zum jeweils entsprechenden Zeitpunkt untersucht. * gibt die Signifikanz des Vergleiches zwischen der scheininfizierten und Placebo behandelten Gruppe und der PA74 infizierten und Placebo behandelten Gruppe an (** p < 0,01 und **** p < 0,0001). Abkürzungen: PA74: klinisches Isolat von *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 107574), *p.i.*: *post infectionem*.

4.4.2. Die Hypothermie der infizierten Tiere wird durch die Phagenapplikation sechs Stunden nach Behandlung verbessert

Die transnasale Applikation von PBS hatte keinen Einfluss auf den Verlauf der Körpertemperatur der Mäuse. Auch die Phagenapplikation hatte keinen Effekt auf die Körpertemperatur der scheininfizierten Mäuse (Abb. 14). Die Infektion mit PA74 führte sowohl in der Placebo- als auch der Phagen-Gruppe zu einer im Mausmodell typischen Hypothermie als klinisches Zeichen der Lungenentzündung 12 Stunden *p.i.*, wobei die Temperatur 24 Stunden *p.i.* in den Kontrolltieren wieder anstieg, über den kompletten Untersuchungszeitraum aber unterhalb der PBS-Tiere blieb. So zeigten sich im Vergleich mit scheininfizierten und Placebo-behandelten Tieren zu allen Untersuchungszeitpunkten Unterschiede in der Körpertemperatur (Abb. 14). Die Phagenapplikation reduzierte den Temperaturverlust der Mäuse infolge der Infektion mit PA74 12 Stunden *p.i.* signifikant (Abb. 14).

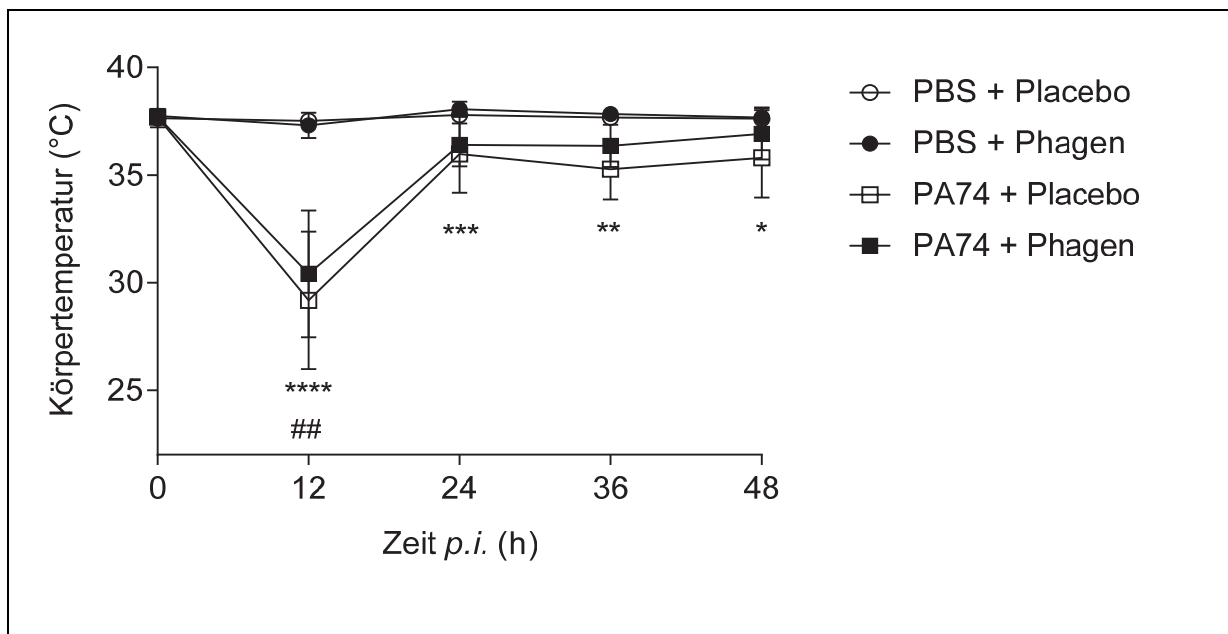


Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der Körpertemperatur in °C im murinen Pneumoniemodell: Die Mäuse wurden transnasal durch Tröpfcheninfektion mit $2,5 \times 10^7$ KbE von PA74 infiziert ($n = 13 - 14$, pro Gruppe und Analysezeitpunkt) oder mit PBS scheininfiziert ($n = 7 - 8$, pro Gruppe und Analysezeitpunkt). Sechs Stunden *p.i.* wurden die Mäuse entweder mit der Rekonstitutionslösung (Placebo) oder dem Phagencocktail behandelt. Zwölf Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden *p.i.* erfolgten die Analysen. Die Daten sind als Kurvendiagramm für alle untersuchten Mäuse zusammen dargestellt mit Mittelwert \pm SD und wurden mittels repeated measures *mixed-effects* Analyse mit Tukey's *multiple comparisons* Test für den Vergleich der Gruppen untereinander zum jeweils entsprechenden Zeitpunkt untersucht. * gibt die Signifikanz des Vergleiches zwischen der scheininfizierten und Placebo behandelten Gruppe und der PA74 infizierten und Placebo behandelten Gruppe an. # gibt die Signifikanz des Vergleiches zwischen der PA74 infizierten und Placebo behandelten Gruppe und der PA74 infizierten und Phagen behandelten Gruppe an (* $p < 0,05$, **/## $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$). Abkürzungen: PA74: klinisches Isolat von *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 107574), *p.i.*: *post infectionem*.

4.4.3. Die bakterielle Last wird durch die Phagenbehandlung 12 Stunden *p.i.* reduziert

Die transnasale Infektion mit PA74 führte zu allen Untersuchungszeitpunkten *p.i.* zu messbaren Keimzahlen im Lungengewebe (Abb. 15A) und in der BAL (Abb. 15B). Zwölf Stunden nach der Infektion konnten die höchsten Werte gemessen werden, bis zu $\sim 10^7$ KbE/ml Lunge bzw. $\sim 10^5$ KbE/ml BAL. Die *i.t.* Verabreichung des Phagencocktails sechs Stunden *p.i.* führte im Vergleich mit der Placeboapplikation zu weniger Bakterien in der Lunge und BAL nach 12 Stunden, während nach 24 und 48 Stunden *p.i.* keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden (Abb. 15A, B). Zum Zeitpunkt 48 Stunden *p.i.* konnten in Lunge und BAL tendenziell weniger Bakterien in der Phagen-behandelten Gruppe nachgewiesen werden (Abb. 15A, B) Die Milzen der untersuchten Tiere wiesen zu keinem Untersuchungszeitpunkt und in keiner Gruppe Bakterien auf.

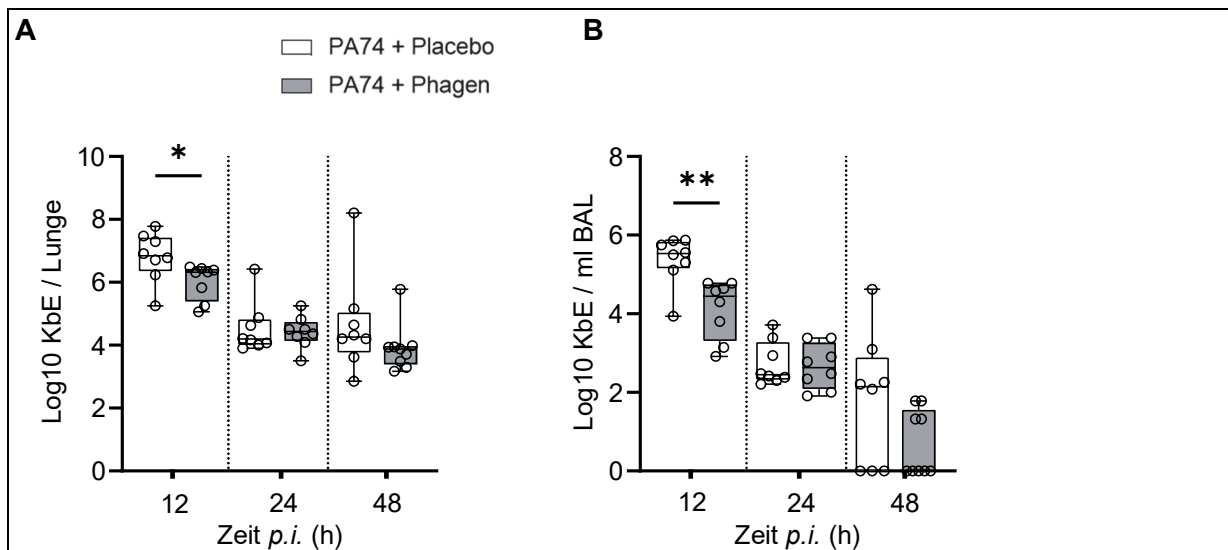


Abbildung 15: Bakterienlast in der Lunge und der bronchoalveolären Lavage im murinen Pneumoniemodell: Die Mäuse wurden transnasal durch Tröpfcheninfektion mit $2,5 \times 10^7$ KbE von PA74 infiziert oder mit PBS scheininfiziert. Sechs Stunden *p.i.* wurden die Mäuse entweder mit der Rekonstitutionslösung (Placebo) oder dem Phagencocktail behandelt. Zwölf Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden *p.i.* wurden die Mäuse analysiert. **A:** Bakterienlast in der Lunge, **B:** Bakterienlast in der bronchoalveolären Lavage, **A – B:** Mit Hilfe eines unpaarigen t-Testes wurden die Gruppen ($n = 8 - 9$) untereinander zum jeweils entsprechenden Zeitpunkt verglichen (* $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$). Die Daten sind angegeben als Boxplots mit Einzelwerten, Median, Quartilen und mit Whiskern vom Minimum bis zum Maximum (Spannweite). Abkürzungen: KbE: koloniebildende Einheit, BAL: bronchoalveoläre Lavage, PA74: klinisches Isolat von *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 107574), *p.i.*: *post infectionem*.

4.4.4. Phagen sind nachweisbar in allen untersuchten Proben

Vermehrungsfähige Phagen konnten zu allen Zeitpunkten sowohl bei *P. aeruginosa* als auch bei scheininfizierten Mäusen, die Phagen erhalten hatten, in allen beprobten Organen, einschließlich BAL, Lunge und systemisch in der Milz, nachgewiesen werden (Abb. 16A, B, C). Die Titer erreichten stabile Werte von bis zu 10^8 PFU/ml im Lungengewebe (Abb. 16A) und in der BAL (Abb. 16B), während systemisch in der Milz niedrigere Werte von maximal 10^4 PFU/ml nachgewiesen werden konnten (Abb. 16C). Im Zeitverlauf zeigte sich kein Unterschied innerhalb der Gruppen.

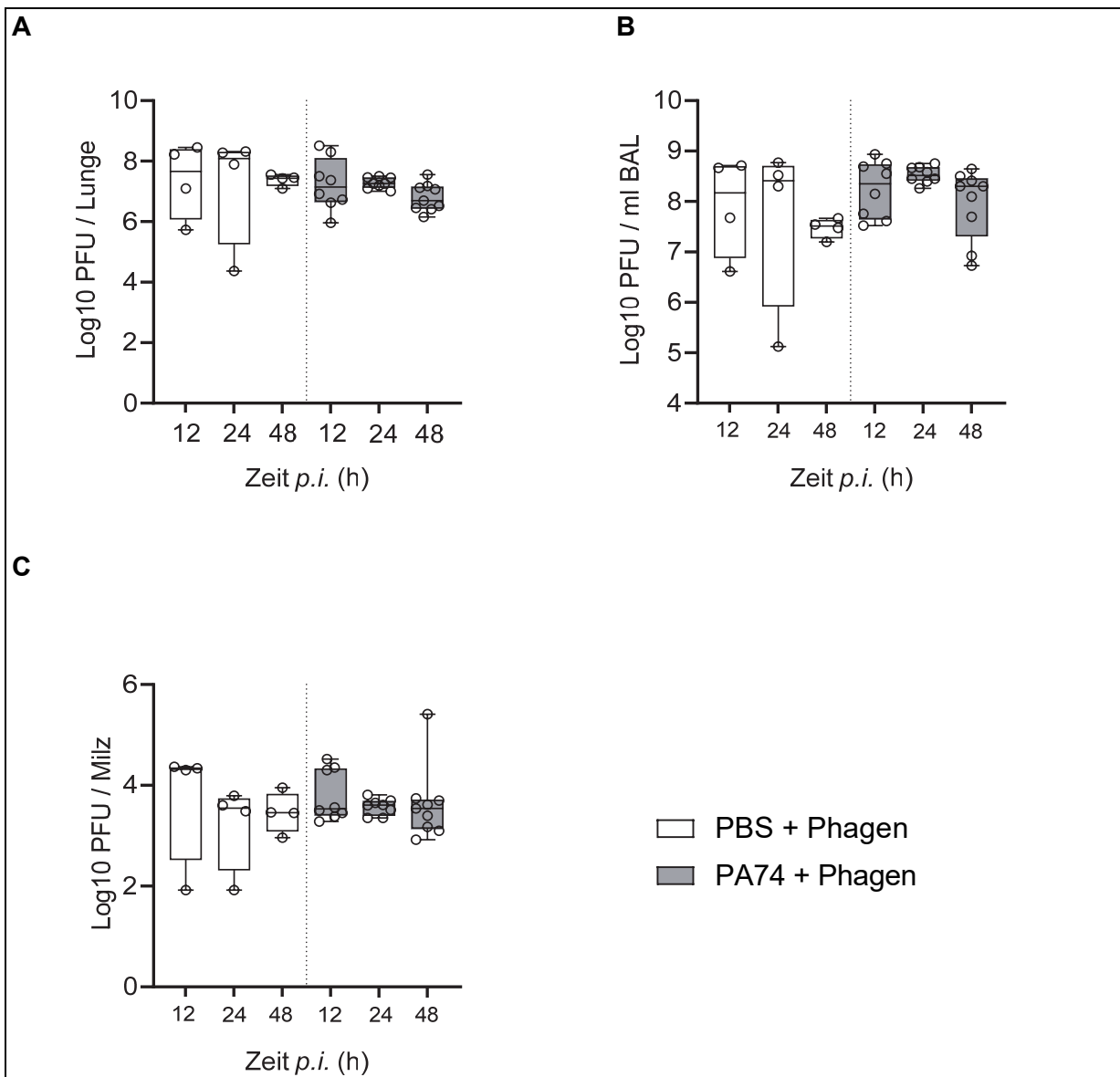


Abbildung 16: Phagentiter in der Lunge, bronchoalveolären Lavageflüssigkeit und Milz im murinen Pneumoniemodell: Die Mäuse wurden transnasal durch Tröpfcheninfektion mit $2,5 \times 10^7$ KbE von PA74 infiziert oder mit PBS scheininfiziert. Sechs Stunden *p.i.* wurden die Mäuse entweder mit der Rekonstitutionslösung (Placebo) oder dem Phagencocktail behandelt. Zwölf Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden *p.i.* wurden die Mäuse analysiert. **A:** PFU in der Lunge, **B:** PFU in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit, **C:** PFU in der Milz, **A – C:** Die Daten wurden mittels *one-way* ANOVA mit Šidák's

multiple comparison Test zum Vergleich innerhalb einer Gruppe über den Zeitraum von 48 Stunden analysiert (scheininfiziert n = 4 und PA74 infiziert n = 8 – 9). Die Daten sind angegeben als Boxplots mit Einzelwerten, Median, Quartilen und mit Whiskern vom Minimum bis zum Maximum (Spannweite). Abkürzungen: BAL: bronchoalveoläre Lavage PA74: klinisches Isolat von *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 107574), PFU: Plaque-bildende Einheit, *p.i.*: *post infectionem*.

4.4.5. Die Phagenbehandlung hat keinen Einfluss auf die Lungengefäßpermeabilität

Infizierte Mäuse zeigten 12, 24 und 48 Stunden nach der Infektion einen Anstieg der Lungengefäßpermeabilität infolge der bakteriellen Infektion, während bei scheininfizierten Tieren keine erhöhte Lungenpermeabilität festgestellt werden konnte. Es wurden keine Unterschiede zwischen der Verabreichung des Phagencocktails und des Placebos festgestellt unabhängig davon, ob die Tiere mit *Pseudomonas* infiziert oder scheininfiziert waren.

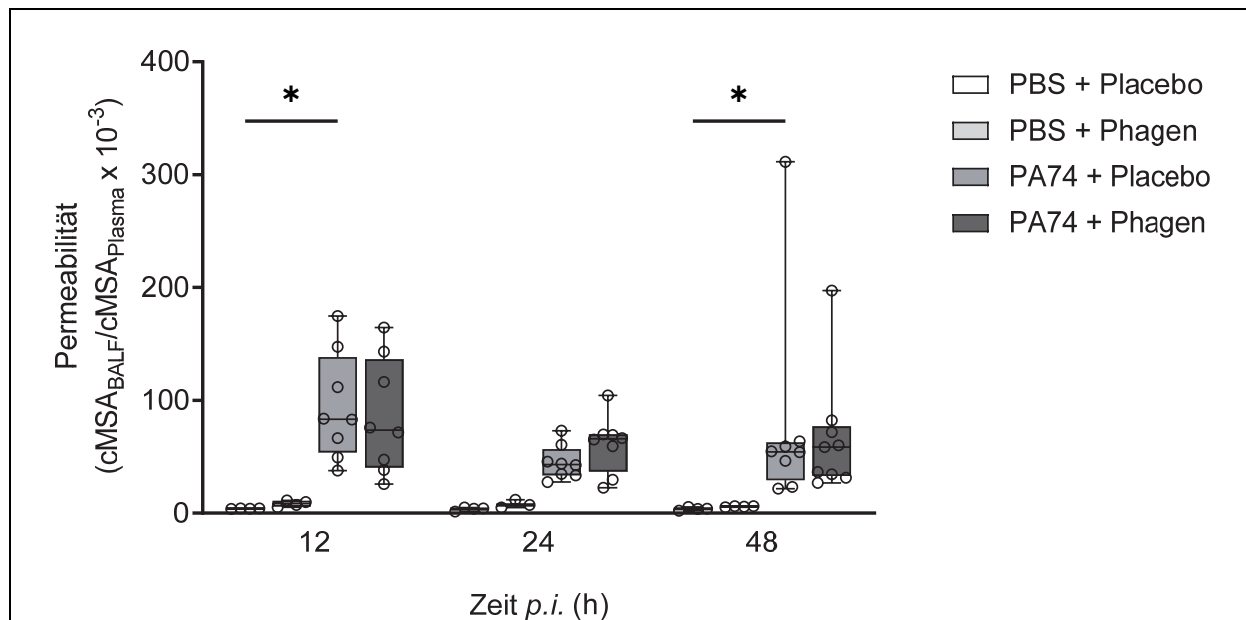
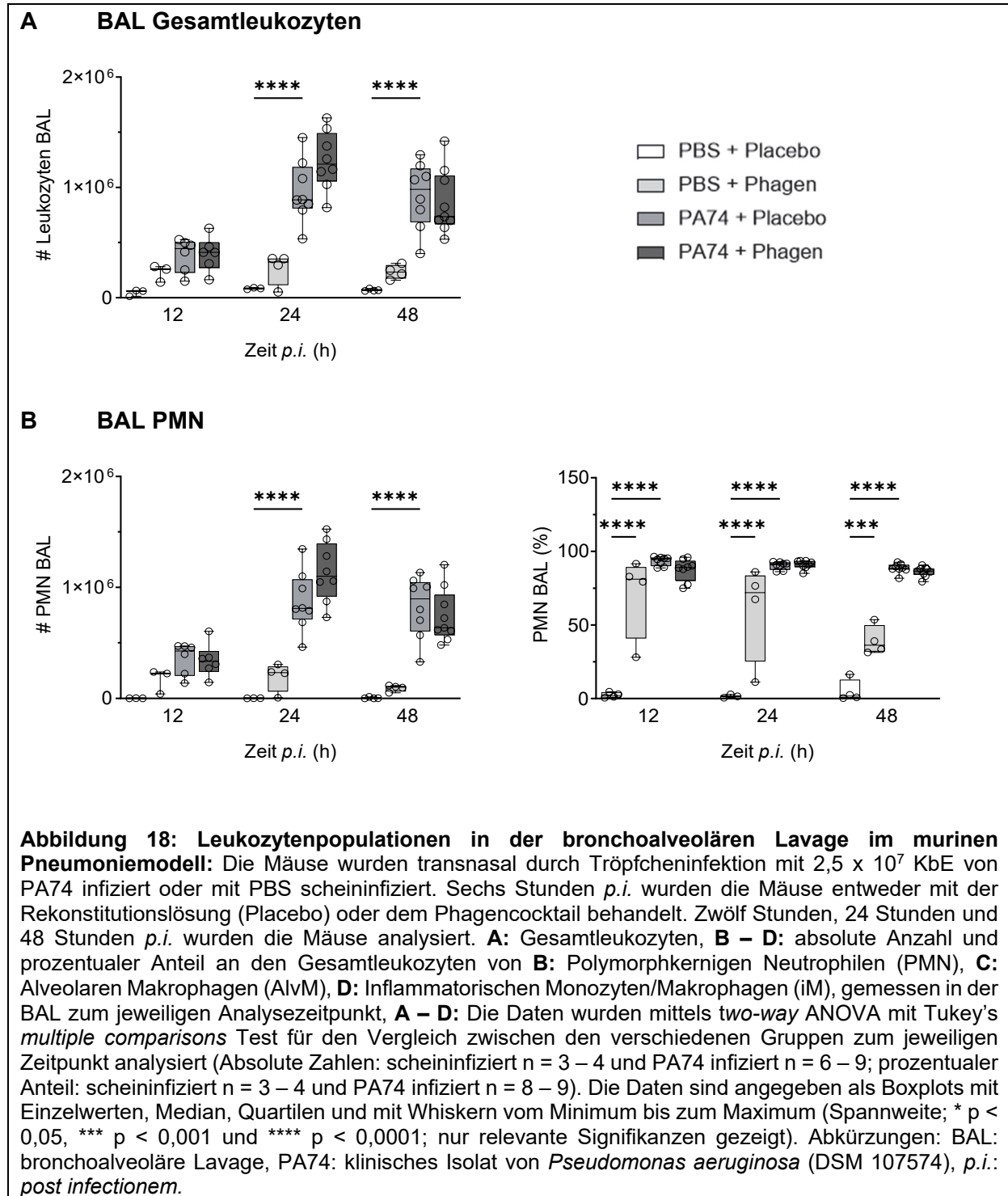
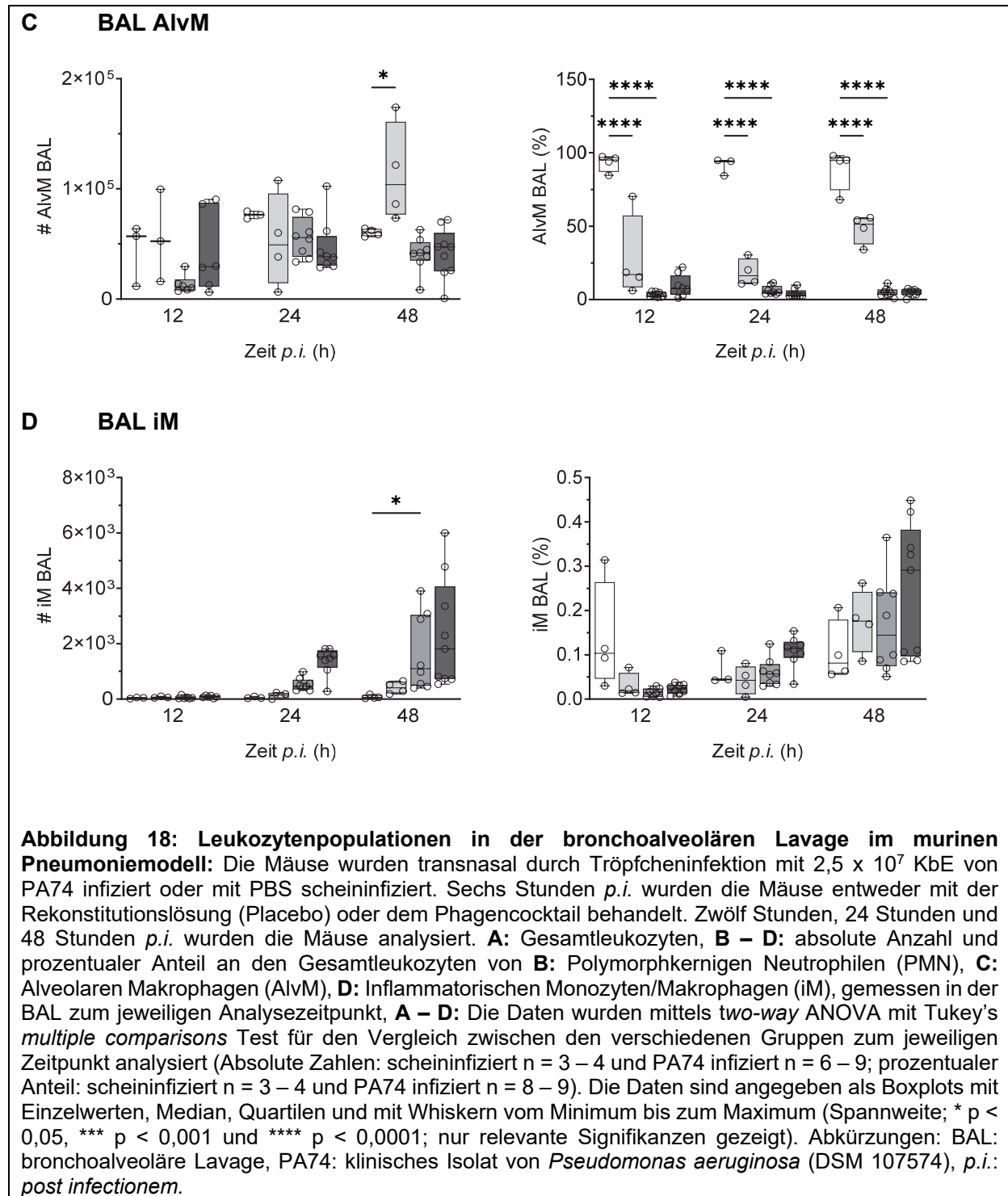


Abbildung 17: Pulmonalvaskuläre Permeabilität im murinen Pneumoniemodell: Die Mäuse wurden transnasal durch Tröpfcheninfektion mit $2,5 \times 10^7$ KbE von PA74 infiziert oder mit PBS scheininfiziert. Sechs Stunden *p.i.* wurden die Mäuse entweder mit der Rekonstitutionslösung (Placebo) oder dem Phagencocktail behandelt. Zwölf Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden *p.i.* wurden die Mäuse analysiert. Die Daten wurden mittels *two-way ANOVA* mit Tukey's *multiple comparisons* Test für den Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen zum entsprechenden Zeitpunkt analysiert (scheininfiziert n = 3 – 4 und PA74 infiziert n = 8 – 9). Die Daten sind angegeben als Boxplots mit Einzelwerten, Median, Quartilen und mit Whiskern vom Minimum bis zum Maximum (Spannweite; * $p < 0,05$; nur relevante Signifikanzen gezeigt). Abkürzungen: BALF: bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit, cMSA: Konzentration des murinen Serumalbumin, PA74: klinisches Isolat von *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 107574), *p.i.*: *post infectionem*.

4.4.6. Der Anteil polymorphkerniger Leukozyten in der bronchioalveolären Lavage ist bei scheininfizierten und phagenbehandelten Tieren zu allen Zeitpunkten erhöht

Die Gesamtzahl der Leukozyten in der BAL stieg in den infizierten Gruppen 12 Stunden *p.i.* an, ab dem 24 Stunden Zeitpunkt konnte ein signifikanter Unterschied zu der scheininfizierten Puffer-behandelten Gruppe festgestellt werden (Abb. 18A). Die Phagen hatten keinen Einfluss auf die Gesamtleukozytenzahl (Abb. 18A). Die dominierenden Zellen unter diesen Leukozyten waren PMN, die zu allen Zeitpunkten bei den infizierten und pufferbehandelten Tieren erhöht waren, jedoch ohne Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen zu keinem der Untersuchungszeitpunkte (Abb. 18B). Der Prozentsatz der PMN war hingegen bei scheininfizierten und phagenbehandelten Tieren zu allen Zeitpunkten erhöht im Vergleich mit scheininfizierten Placebo-behandelten Tieren (Abb. 18B). Der Prozentsatz der alveolären Makrophagen war bei scheininfizierten und phagenbehandelten Tieren und bei mit PA74 infizierten Mäusen im Vergleich mit scheininfizierten und placebobehandelten Tieren zu allen Zeitpunkten reduziert (Abb. 18C). Die Gesamtzahl der Alveolarmakrophagen blieb stabil ohne Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Bei scheininfizierten Tieren nahm ihre Gesamtzahl in der Phagengruppe 48 Stunden *p.i.* zu (Abb. 18C). Die inflammatorischen Monozyten/Makrophagen waren in der infizierten und Puffer-behandelten Gruppe nach 48 Stunden erhöht. Hingegen gab es keinen Unterschied zwischen den Gruppen im Vergleich der Prozentanteile von inflammatorischen Monozyten/Makrophagen zu keinem der Untersuchungszeitpunkte (Abb. 18D).





4.4.7. Nach Phagenbehandlung kommt es zu keiner systemischen Erhöhung der Leukozyten infolge der Infektion

Verglichen mit den infizierten und Placebo-behandelten Tieren zeigten die infizierten und mit Phagen behandelten Mäuse nach 24 Stunden *p.i.* einen erhöhten Hämatokrit-Wert (Abb. 19A). Außerdem zeigte sich 48 Stunden *p.i.* ein erhöhter Hämatokrit-Wert bei der infizierten Placebogruppe im Vergleich mit der scheininfizierten Placebogruppe (Abb. 19A). Die Gesamtzahl der Leukozyten im Blut blieb nach der Infektion und der intratrachealen Behandlung in allen Gruppen weitgehend unverändert (Abb. 19B). Allerdings wiesen 24 Stunden *p.i.* infizierte und mit Placebo behandelte Tiere höhere Gesamtleukozytenzahlen auf als scheininfizierte und mit Placebo behandelte sowie infizierte und mit Phagen behandelte Mäuse (Abb. 19B). Bei den infizierten Mäusen wurde unabhängig von der Behandlung eine höhere relative Anzahl von neutrophilen Granulozyten im Blut gemessen (24 und 48 Stunden *p.i.*; Abb. 19C). Gleichzeitig war die relative Lymphozytenzahl verringert (zusätzlich noch 12 Stunden *p.i.*), die Gesamtzahl der Lymphozyten blieb bei allen Gruppen und Zeitpunkten unverändert (Abb. 19D). Die relative Anzahl der Monozyten nahm bei mit *P. aeruginosa* infizierten Tieren zu jedem Zeitpunkt zu und 24 Stunden *p.i.* nahm auch die absolute Monozyten Anzahl bei der infizierten Gruppe zu (Abb. 19E). Insgesamt wurden beim Vergleich der Leukozyten, Lymphozyten, Neutrophilen Granulozyten und Monozyten von Phagen-behandelten und unbehandelten scheininfizierten Tieren keine Unterschiede festgestellt.

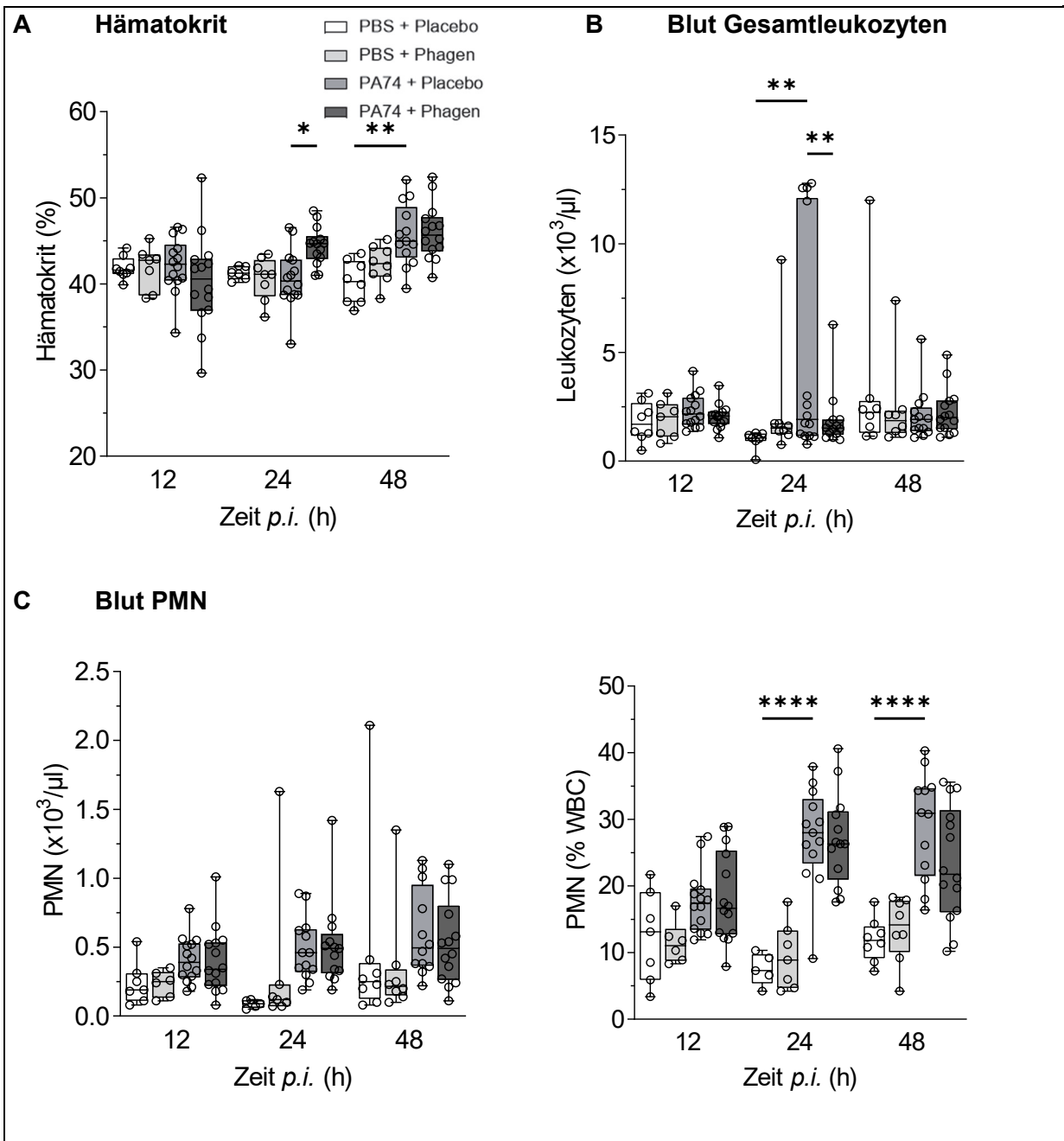


Abbildung 19: Leukozytenpopulationen und Hämatokrit im Blut im murinen Pneumoniemodell: Die Mäuse wurden transnasal durch Tröpfcheninfektion mit $2,5 \times 10^7$ KbE von PA74 infiziert oder mit PBS scheininfiziert. Sechs Stunden p.i. wurden die Mäuse entweder mit der Rekonstitutionslösung (Placebo) oder dem Phagencocktail behandelt. Zwölf Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden p.i. erfolgten die Analysen. **A:** Hämatokrit, **B:** Gesamtleukozyten, **C – E:** absolute Anzahl und prozentualer Anteil an den Gesamtleukozyten von **C:** Polymorphkernigen Neutrophilen (PMNs), **D:** Lymphozyten, **E:** Monozyten, gemessen im Blut zum jeweiligen Analysezeitpunkt, **A – E:** Die Daten wurden mittels *two way ANOVA* mit Tukey's *multiple comparisons* Test für den Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen zum jeweiligen Zeitpunkt analysiert (Absolute Zahlen: scheininfiziert n = 5 – 8 und PA74 infiziert n = 13 – 14; prozentualer Anteil an Leukozyten: scheininfiziert n = 5 – 8 und PA74 infiziert n = 12 – 14). Die Daten sind angegeben als Boxplots mit Einzelwerten, Median, Quartilen und mit Whiskern vom Minimum bis zum Maximum (Spannweite; * p < 0,05, ** p < 0,01 und **** p < 0,0001; nur relevante Signifikanzen gezeigt). Abkürzungen: PA74: klinisches Isolat von *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 107574), p.i.: *post infectionem*, WBC: Leukozyten (white blood cells).

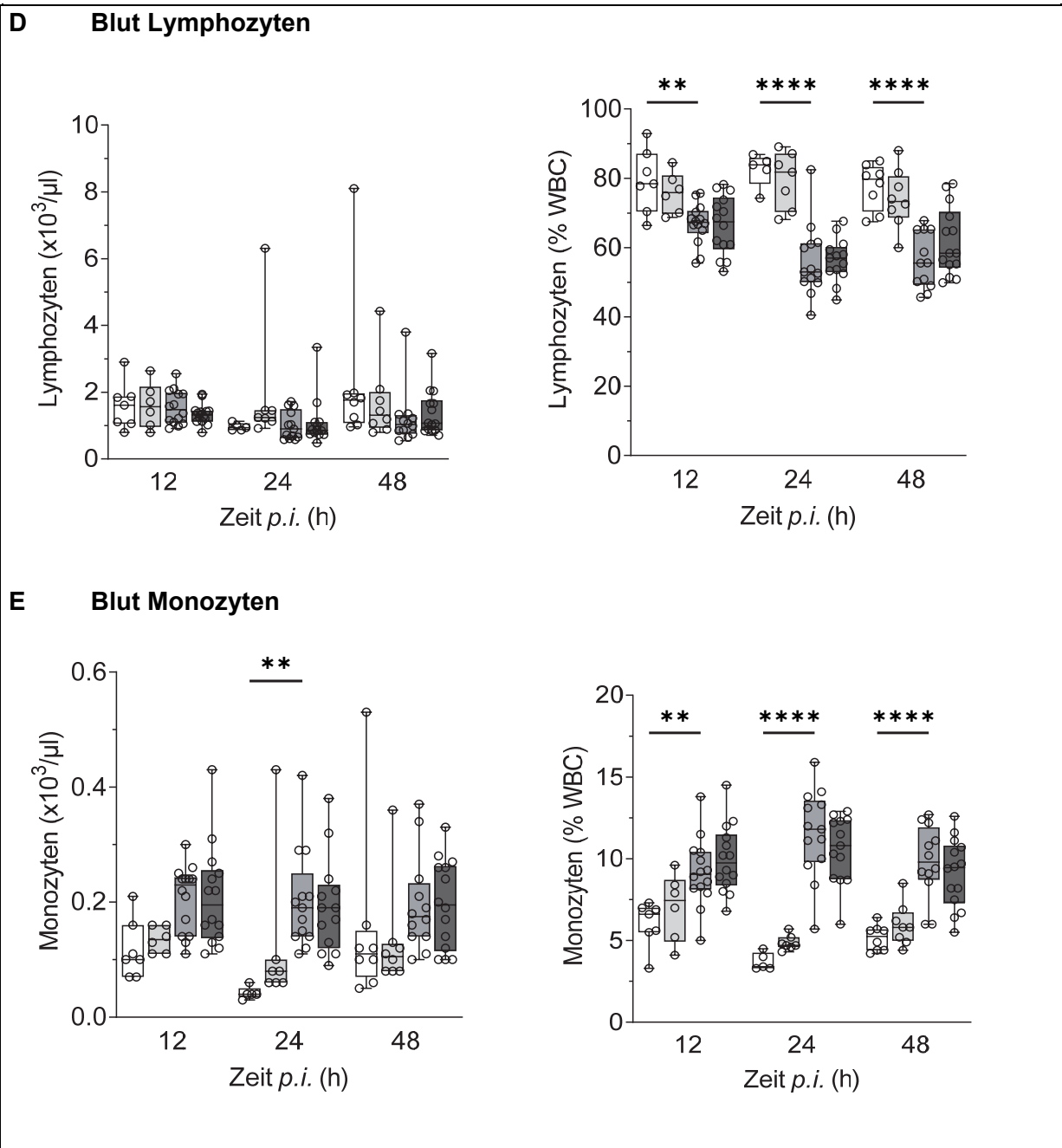


Abbildung 19: Leukozytenpopulationen und Hämatokrit im Blut im murinen Pneumoniemodell: Die Mäuse wurden transnasal durch Tröpfcheninfektion mit $2,5 \times 10^7$ KbE von PA74 infiziert oder mit PBS scheininfiziert. Sechs Stunden *p.i.* wurden die Mäuse entweder mit der Rekonstitutionslösung (Placebo) oder dem Phagencocktail behandelt. Zwölf Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden *p.i.* erfolgten die Analysen. **A:** Hämatokrit, **B:** Gesamtleukozyten, **C – E:** absolute Anzahl und prozentualer Anteil an den Gesamtleukozyten von **C:** Polymorphkernigen Neutrophilen (PMNs), **D:** Lymphozyten, **E:** Monozyten, gemessen im Blut zum jeweiligen Analysezeitpunkt, **A – E:** Die Daten wurden mittels *two way ANOVA* mit Tukey's *multiple comparisons* Test für den Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen zum jeweiligen Zeitpunkt analysiert (Absolute Zahlen: scheininfiziert $n = 5 - 8$ und PA74 infiziert $n = 13 - 14$; prozentualer Anteil an Leukozyten: scheininfiziert $n = 5 - 8$ und PA74 infiziert $n = 12 - 14$). Die Daten sind angegeben als Boxplots mit Einzelwerten, Median, Quartilen und mit Whiskern vom Minimum bis zum Maximum (Spannweite; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und **** $p < 0,0001$; nur relevante Signifikanzen gezeigt). Abkürzungen: PA74: klinisches Isolat von *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 107574), *p.i.:* *post infectionem*, WBC: Leukozyten (white blood cells).

4.4.8. Die Applikation des Phagencocktails nach Infektion beeinflusst die Zytokin-konzentrationen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

Es kam nicht zu einer lokalen Erhöhung der Zytokine in der BALF nach Scheininfektion mit anschließender Placeboapplikation (Abb. 20). Dagegen führte die Phagenapplikation bei scheininfizierten Tieren zu erhöhten Werten von TNF- α 12 Stunden nach der Infektion (Abb. 20). Auch IL-6 wies 12 und 24 Stunden *p.i.* bei scheininfizierten und Phagen behandelten Tieren im Vergleich mit scheininfizierten und Placebo behandelten Tieren tendenziell erhöhte Werte in der BALF auf (Abb. 20). Achtundvierzig Stunden *p.i.* zeigten sich erhöhte Zytokin-Level von IL-12p70 in der mit Phagen behandelten infizierten Gruppe im Vergleich zur infizierten Placebogruppe (Abb. 20). Die Verabreichung des Phagencocktails führte zu einer verringerten Konzentration von IL-1 β 12 Stunden *p.i.* auf lokaler Ebene, dieser Unterschied war zu späteren Zeitpunkten nicht messbar (Abb. 20). Zusammenfassend konnten lokal sowohl erhöhte als auch erniedrigte Zytokinkonzentrationen nach Phagenbehandlung gemessen werden. Die Infektion mit *P. aeruginosa* führte bei IL-6, IL-1 β , TNF- α und IL-10 zu erhöhten Ausschüttungen nach 12 Stunden *p.i.* und bei IL-12p70 zu erhöhten Ausschüttungen nach 48 Stunden *p.i.* im Vergleich zur scheininfizierten Placebogruppe (Abb. 20). Tendenziell konnte bei IL-6, IL-1 β und IFN- γ zu allen Untersuchungszeitpunkten eine Erhöhung der Zytokine durch die Infektion mit PA74 beobachtet werden (Abb. 20). Bei IFN- γ konnte in keiner Gruppe über den Behandlungszeitraum ein signifikanter Unterschied erkannt werden (Abb. 20).

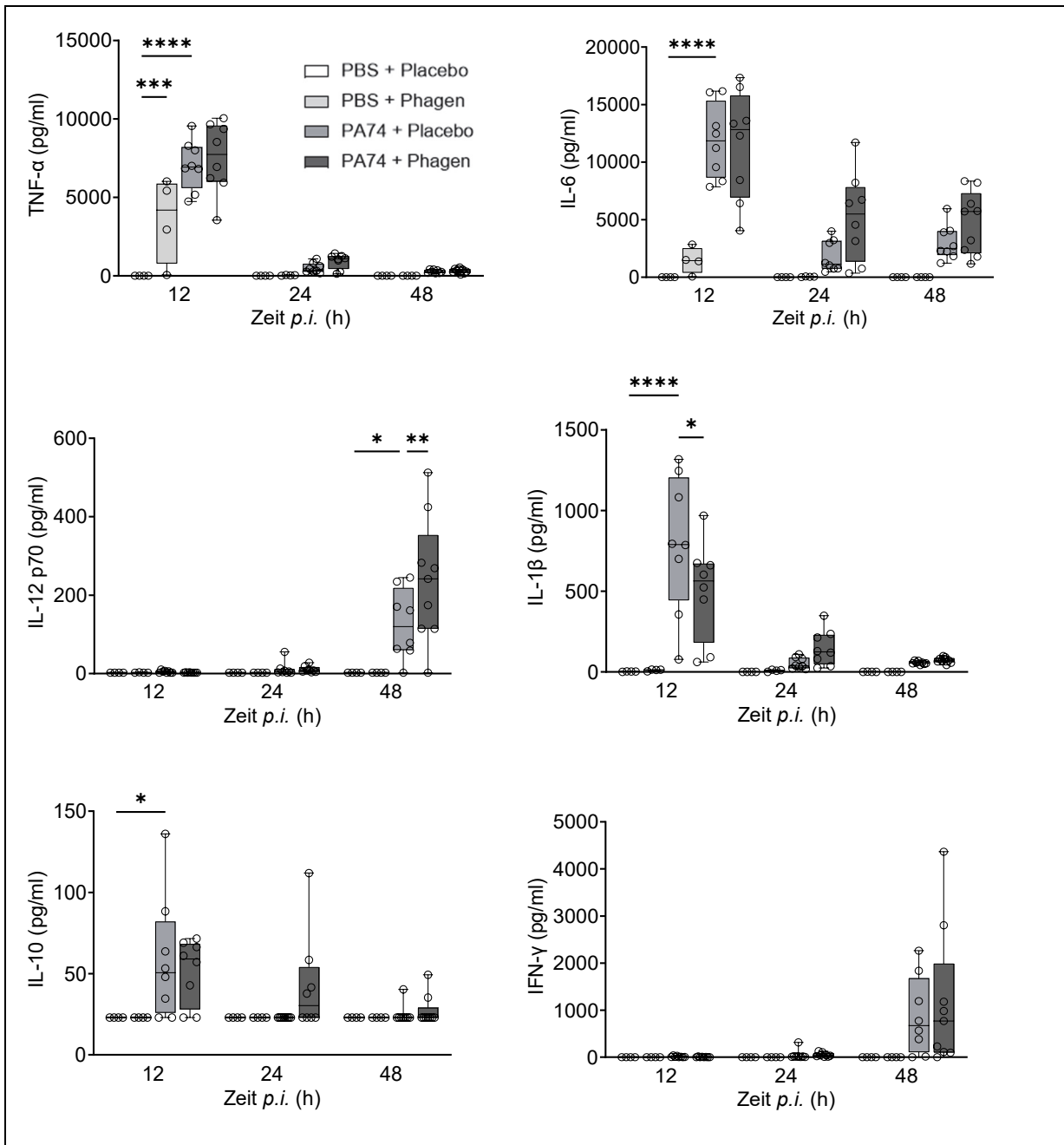


Abbildung 20: Konzentrationen von Zytokinen im Alveolarraum im murinen Pneumoniemodell:

Die Mäuse wurden transnasal durch Tröpfcheninfektion mit $2,5 \times 10^7$ KbE von PA74 infiziert oder mit PBS scheininfiziert. Sechs Stunden *p.i.* wurden die Mäuse entweder mit der Rekonstitutionslösung (Placebo) oder dem Phagencocktail behandelt. Zwölf Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden *p.i.* wurden die Mäuse analysiert. Die Daten sind angegeben als Boxplots mit Einzelwerten, Median, Quartilen und mit Whiskern vom Minimum bis zum Maximum (Spannweite) und wurden analysiert mittels *two-way* ANOVA mit Tukey's *multiple comparisons* Test für den Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen zum jeweiligen Zeitpunkt (scheininfiziert $n = 4$ und PA74 infiziert $n = 8 - 9$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$; nur relevante Signifikanzen gezeigt). Abkürzungen: PA74: klinisches Isolat von *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 107574), *p.i.*: *post infectionem*.

4.4.9. Die Applikation des Phagencocktails führt zu lokal erhöhten Werten von GM-CSF 12 Stunden nach der Scheininfektion in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

Veränderungen zeigten sich ebenfalls bei der Analyse von Chemokinen und Wachstumsfaktoren. Wie auch beim Zytokin TNF- α im vorherigen Abschnitt beschrieben, führte die Phagenapplikation bei scheininfizierten Tieren zu erhöhten Werten von GM-CSF 12 Stunden nach der Infektion (Abb. 21). Auch die Chemokine CXCL1, CXCL10, CCL2 und CCL5 wiesen bei scheininfizierten und phagenbehandelten Tieren im Vergleich mit scheininfizierten und Placebo behandelten Tieren tendenziell erhöhte Werte in der BALF auf (Abb. 21). Durch die Infektion mit *P. aeruginosa* erreichten GM-CSF und CXCL1 erhöhte Werte nach 12 Stunden *p.i.* und CCL2, CCL5 und CXCL10 erreichten erhöhte Chemokin Level nach 48 Stunden *p.i.* verglichen mit der scheininfizierten Placebogruppe (Abb. 21). Auch 24 Stunden *p.i.* waren erhöhte Werte von CCL5 bei der infizierten Placebogruppe im Vergleich mit der scheininfizierten Placebogruppe messbar (Abb. 21).

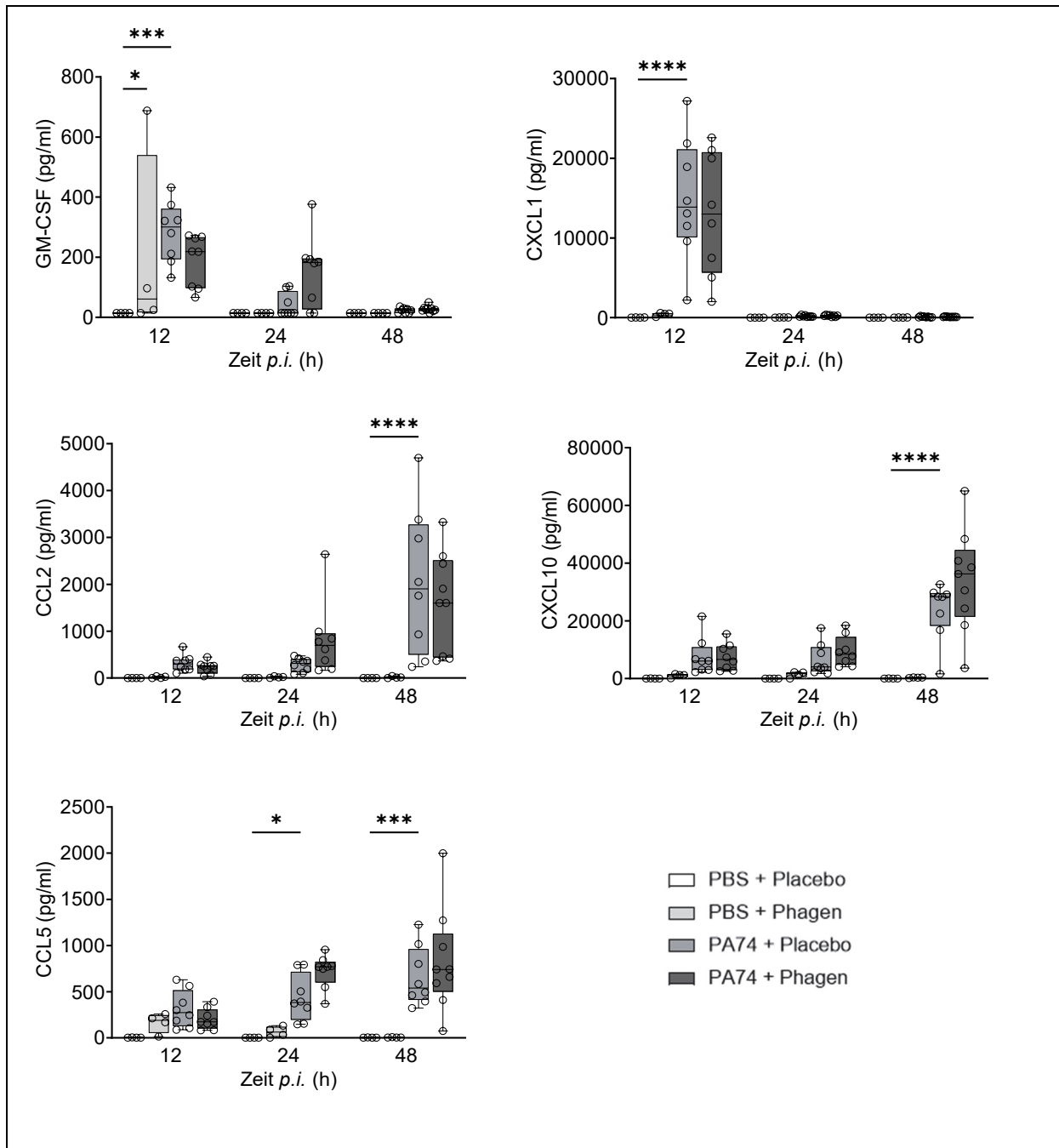


Abbildung 21: Konzentrationen von Chemokinen und Wachstumsfaktoren im Alveolarraum im murinen Pneumoniemodell: Die Mäuse wurden transnasal durch Tröpfcheninfektion mit $2,5 \times 10^7$ KBE von PA74 infiziert oder mit PBS scheininfiziert. Sechs Stunden *p.i.* wurden die Mäuse entweder mit der Rekonstitutionslösung (Placebo) oder dem Phagencocktail behandelt. Zwölf Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden *p.i.* erfolgten die Analysen. Die Daten sind angegeben als Boxplots mit Einzelwerten, Median, Quartilen und mit Whiskern vom Minimum bis zum Maximum (Spannweite) und wurden analysiert mittels *two-way ANOVA* mit Tukey's *multiple comparisons* Test für den Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen zum jeweiligen Zeitpunkt (scheininfiziert $n = 4$ und PA74 infiziert $n = 8 - 9$; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$; nur relevante Signifikanzen gezeigt). Abkürzungen: PA74: klinisches Isolat von *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 107574), *p.i.*: *post infectionem*.

4.4.10. Die Verabreichung des Phagenscocktails beeinflusst die systemischen Zytokin-konzentrationen

Eine lokale Entzündung in der Lunge kann häufig zu einer Ausbreitung von Bakterien und Entzündungsreaktionen im Körper führen. Daher wurden zusätzlich Zytokine und Chemokine im Plasma bestimmt, um die systemischen Effekte zu analysieren (Abb. 22 und 23). Die Infektion mit *P. aeruginosa* führte 12 Stunden *p.i.* zu erhöhten Werten von IL-1 β und TNF- α und 48 h *p.i.* zu erhöhten Werten von IFN- γ (Abb. 22). Die Verabreichung des Phagenscocktails führte systemisch, wie auch lokal, zu einer verringerten Konzentration von IL-1 β zum Zeitpunkt 12 Stunden *p.i.* (Abb. 22). Ein systemischer Anstieg der Zytokine IFN- α , IFN- γ und IL-12p70 wurde in der infizierten und mit Phagen behandelten Gruppe im Vergleich zur infizierten Placebogruppe 48 Stunden *p.i.* im Plasma gemessen (Abb. 22).

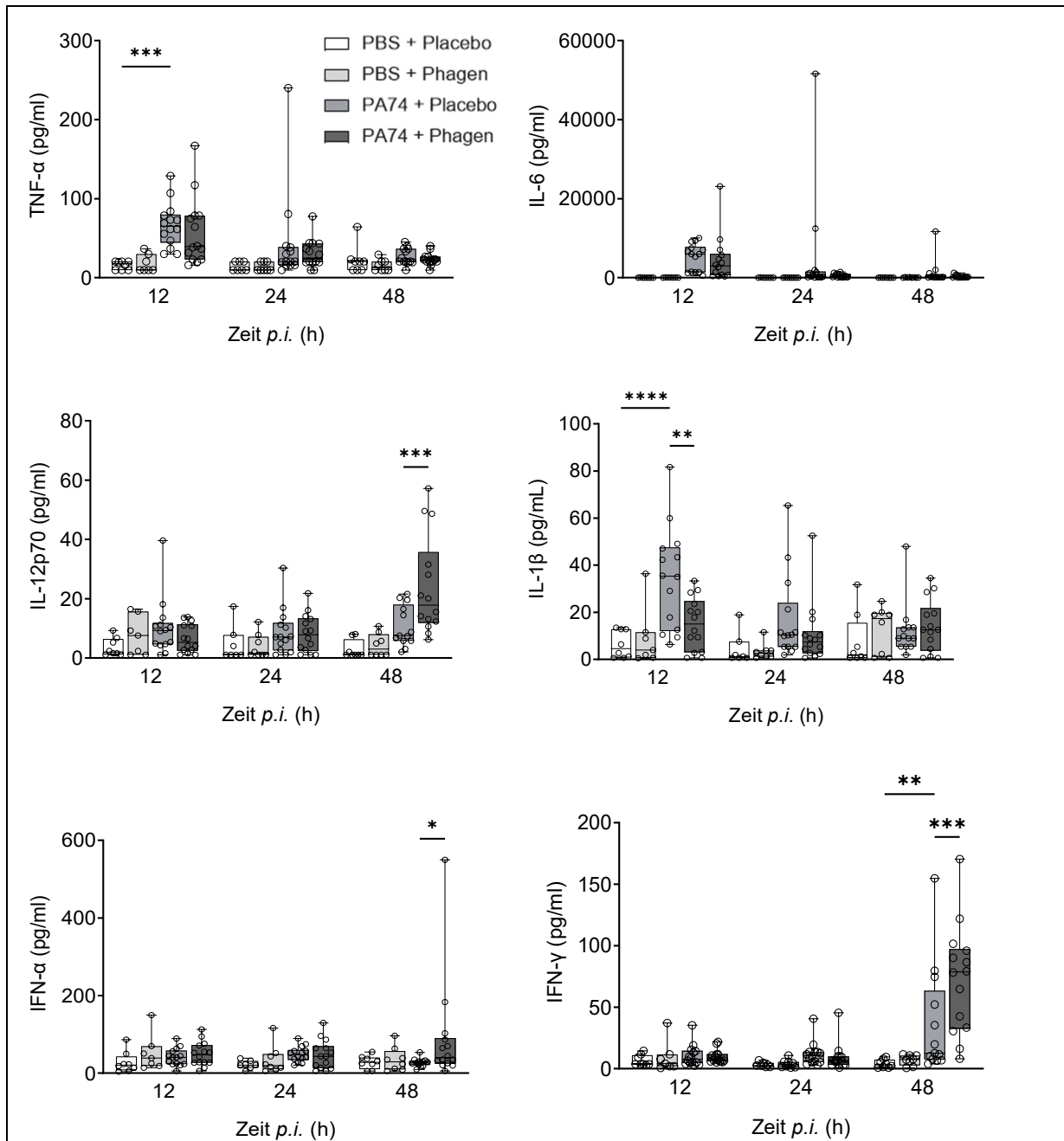


Abbildung 22: Systemische Konzentrationen von Zytokinen im murinen Pneumoniemodell: Die Mäuse wurden transnasal durch Tröpfcheninfektion mit $2,5 \times 10^7$ KBE von PA74 infiziert oder mit PBS scheininfiziert. Sechs Stunden *p.i.* wurden die Mäuse entweder mit der Rekonstitutionslösung (Placebo) oder dem Phagencocktail behandelt. Zwölf Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden *p.i.* wurden die Mäuse analysiert. Die Daten wurden mittels *two-way ANOVA* mit Tukey's *multiple comparison* Test für den Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen zum jeweils passenden Zeitpunkt analysiert (scheininfiziert $n = 7 - 8$ und PA74 infiziert $n = 13 - 14$). Die Daten sind angegeben als Boxplots mit Einzelwerten, Median, Quartilen und Whiskern vom Minimum bis zum Maximum (Spannweite; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$; nur relevante Signifikanzen gezeigt). Abkürzungen: PA74: klinisches Isolat von *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 107574), *p.i.*: *post infectionem*.

4.4.11. Die Verabreichung des Phagencocktails führt 24 Stunden *post infectionem* zu einer erhöhten systemischen Konzentration von GM-CSF

Die Infektion mit *P. aeruginosa* führte auch systemisch zu Veränderungen der Konzentrationen von Chemokinen und Wachstumsfaktoren (Abb. 23). So waren erhöhte Konzentrationen von CXCL1, CCL5 und CXCL10 12 Stunden *p.i.* in der infizierten Placebogruppe verglichen mit der scheininfizierten Placebogruppe zu beobachten (Abb. 23). Zusätzlich waren die CCL5 Werte auch 24 Stunden *p.i.* bei der infizierten Placebogruppe erhöht (Abb. 23). Durch die Verabreichung des Phagencocktails kam es 24 Stunden *p.i.* in der mit *Pseudomonas* infizierten Gruppe zu einer erhöhten Konzentration von GM-CSF im Vergleich zur nicht Phagen behandelten infizierten Gruppe (Abb. 23).

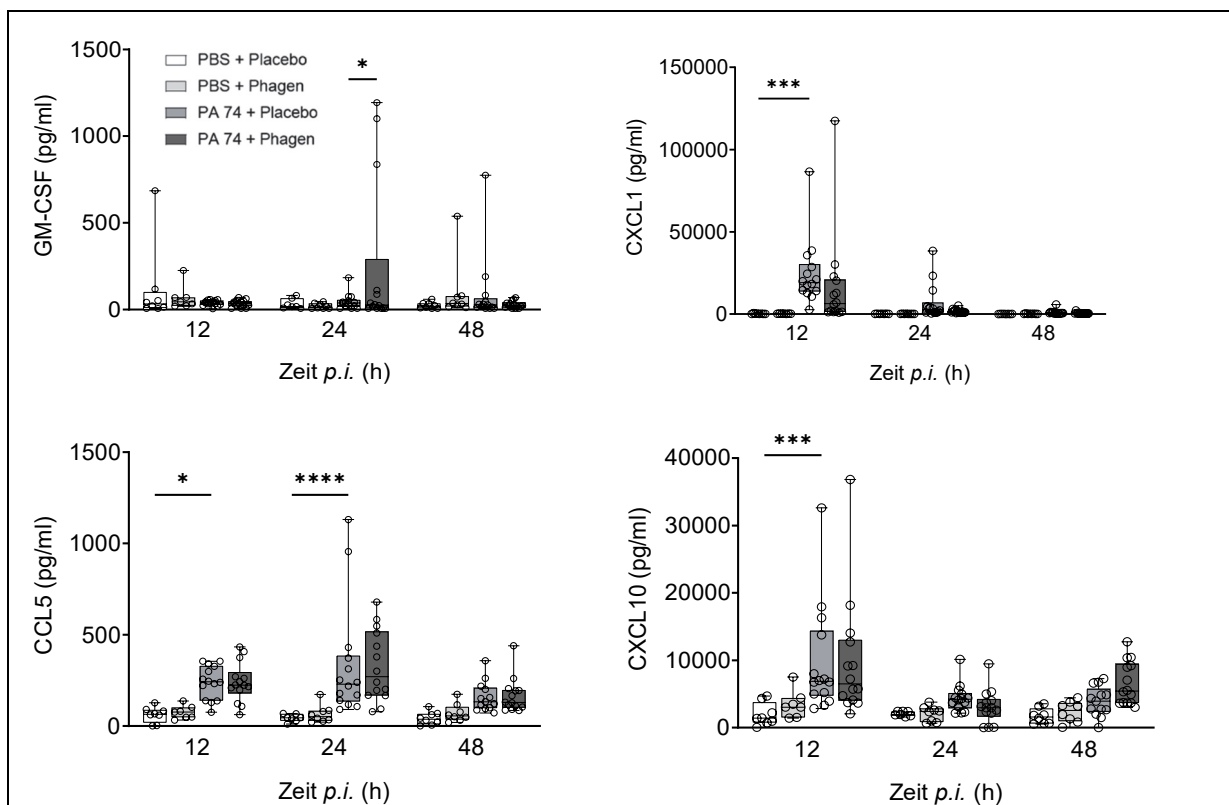


Abbildung 23: Systemische Konzentrationen von Chemokinen und Wachstumsfaktoren im murinen Pneumoniemodell: Die Mäuse wurden transnasal durch Tröpfcheninfektion mit $2,5 \times 10^7$ KbE von PA74 infiziert oder mit PBS scheininfiziert. Sechs Stunden *p.i.* wurden die Mäuse entweder mit der Rekonstitutionslösung (Placebo) oder dem Phagencocktail behandelt. Zwölf Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden *p.i.* wurden die Mäuse analysiert. Die Daten wurden mittels *two-way* ANOVA mit Tukey's *multiple comparison* Test für den Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen zum jeweils passenden Zeitpunkt analysiert (scheininfiziert $n = 7 - 8$ und PA74 infiziert $n = 13 - 14$). Die Daten sind angegeben als Boxplots mit Einzelwerten, Median, Quartilen und mit Whiskern vom Minimum bis zum Maximum (Spannweite; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$; nur relevante Signifikanzen gezeigt). Abkürzungen: KbE: koloniebildende Einheit, PA74: klinisches Isolat von *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 107574), *p.i.*: *post infectionem*, Konz.: Konzentration.

4.4.12. Die Applikation des Phagencocktails konnte den Grad der Entzündung und die Ödembildung infolge der Infektion mit *P. aeruginosa* nicht verringern

Die histopathologische Aufarbeitung nach Standardprotokollen und die semiquantitative Bewertung der Proben erfolgten am Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin und wurden von Judith Bushe und Anne Voss durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten typische Veränderungen in den infizierten Lungen, die bei einer *P. aeruginosa*-Infektion zu erwarten sind, einschließlich einer Bronchopneumonie mit assoziierter Pleuritiskomponente sowie eines proteinreichen, alveolären Ödems und eines perivaskulären Ödems (Abb. 26) bei allen Tieren. Zu allen untersuchten Zeitpunkten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf Grad der Entzündung und Ödembildung zwischen der mit *P. aeruginosa* und Phagen behandelten Gruppe im Vergleich zur mit *P. aeruginosa* und Placebo behandelten Gruppe (Abb. 26).

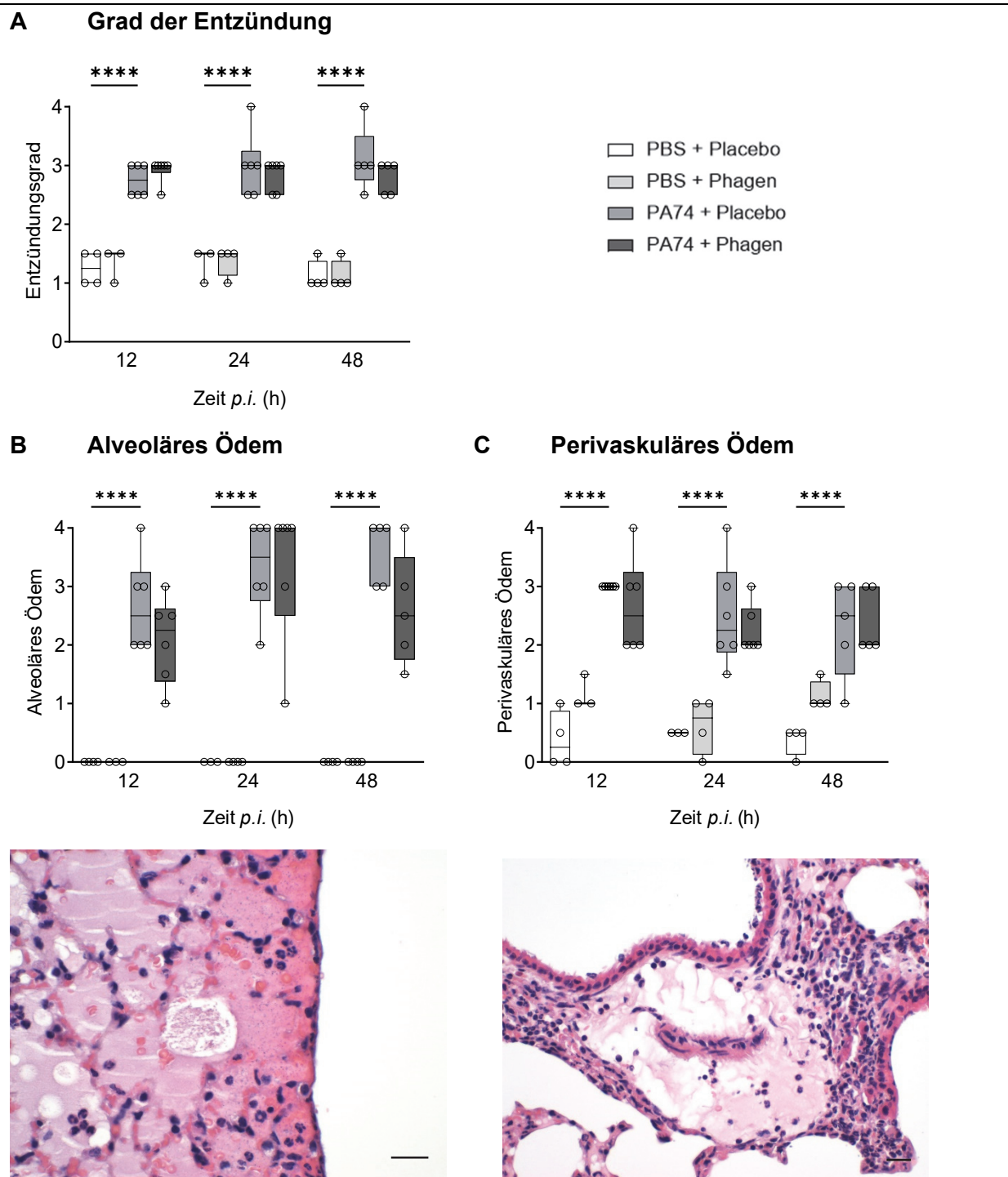


Abbildung 24: Semiquantitative Bewertung der histopathologischen Veränderungen im murinen Pneumoniemodell: Die Mäuse wurden transnasal durch Tröpfcheninfektion mit $2,5 \times 10^7$ KbE von PA74 infiziert oder mit PBS scheininfiziert. Sechs Stunden *p.i.* wurden die Mäuse entweder mit der Rekonstitutionslösung (Placebo) oder dem Phagencocktail behandelt. Zwölf Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden *p.i.* wurden die Mäuse analysiert. **A:** Entzündungs-Score, **B:** Alveolarödem-Score (Graph und histologische Aufnahme), **C:** Score perivaskuläres Ödem (Graph und histologische Aufnahme). Die histologischen Aufnahmen wurden von Judith Bushe angefertigt; **A** und **B:** Repräsentative Lungengewebsbilder, H&E gefärbt, bei verschiedenen Vergrößerungen (Originalaufnahmen: links 600- und rechts 400-fach vergrößert) lichtmikroskopiert, der Maßstabsbalken entspricht jeweils 20 μ m. **A, B, C:** Die Daten wurden mittels *two-way* ANOVA mit Tukey's *multiple comparisons* Test für den Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen zum jeweiligen Zeitpunkt analysiert (scheininfiziert $n = 3 - 4$ und PA74 infiziert $n = 5 - 6$). Die Daten sind angegeben als Boxplots mit Einzelwerten, Median, Quartilen und Whiskern vom Minimum bis zum Maximum (Spannweite; **** $p < 0,0001$; nur relevante Signifikanzen gezeigt). Abkürzungen: KbE: koloniebildende Einheit, PA74: klinisches Isolat von *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 107574), *p.i.*: *post infectionem*.

4.4.13. Scheininfizierte Tiere weisen minimal bis geringgradig neutrophile alveoläre sowie perivaskuläre und peribronchiale Infiltrate unabhängig von der Behandlungsgruppe auf

In den Kontrollgruppen zeigten alle Tiere typische Veränderungen, wie sie im Zusammenhang mit der intranasalen Verabreichung von Flüssigkeit (PBS) nachweisbar sind. Die Tiere der scheininfizierten und mit dem Phagencocktail behandelten Gruppe und, in geringerem Maße auch die Tiere der scheininfizierten und mit Placebo behandelten Gruppe wiesen unabhängig vom Versuchszeitpunkt zusätzlich minimale bis geringgradige neutrophile alveoläre sowie perivaskuläre und peribronchiale Infiltrate auf (Abb. 27).

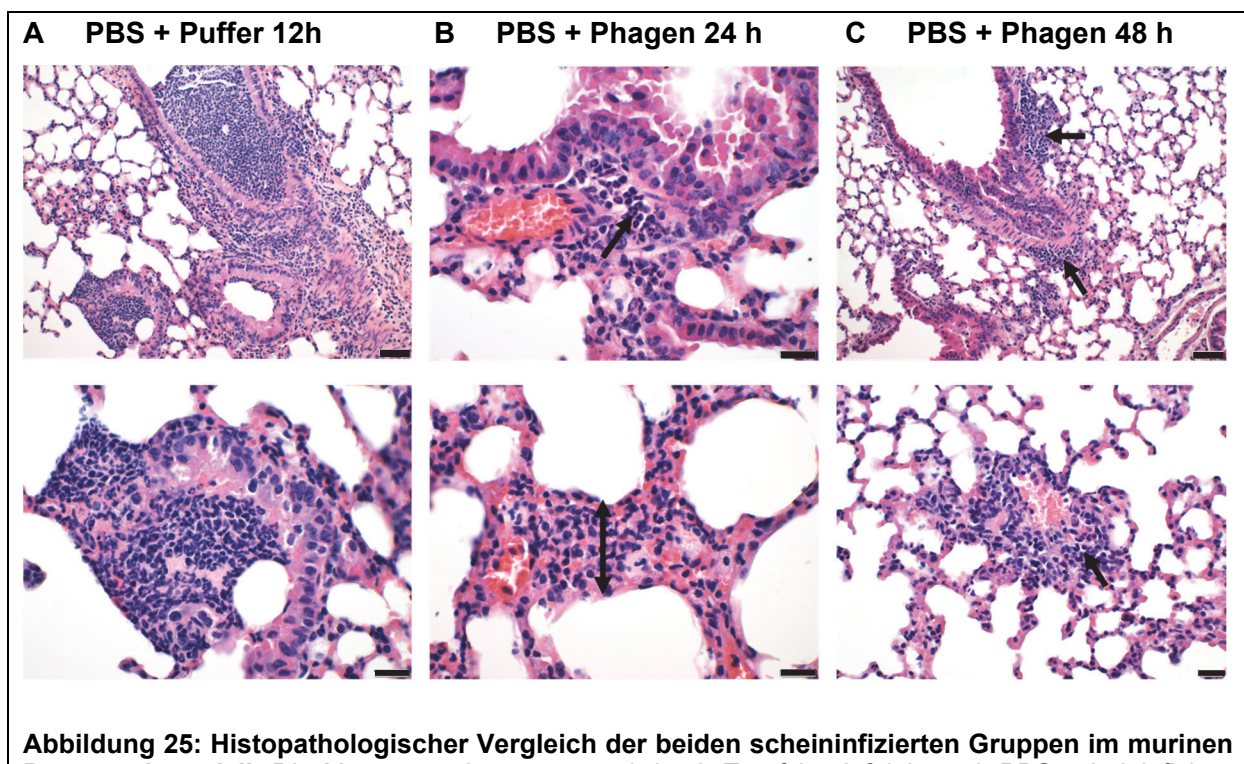


Abbildung 25: Histopathologischer Vergleich der beiden scheininfizierten Gruppen im murinen Pneumoniemodell: Die Mäuse wurden transnasal durch Tröpfcheninfektion mit PBS scheininfiziert. Sechs Stunden *p.i.* wurden die Mäuse entweder mit der Rekonstitutionslösung (Placebo) oder dem Phagencocktail behandelt. Zwölf Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden *p.i.* wurden die Mäuse analysiert. **A – C:** Ausgewählte Lungengewebsbilder, H&E gefärbt, bei verschiedenen Vergrößerungen (Bilder oben links und rechts: Originalvergrößerung 200-fach und der Maßstabsbalken entspricht jeweils 50 μm ; Bild oben mittig, Bilder unten links und unten mittig: Originalvergrößerung 600-fach und der Maßstabsbalken entspricht jeweils 20 μm ; Bild unten rechts: Originalvergrößerung 400-fach und der Maßstabsbalken entspricht jeweils 20 μm) lichtmikroskopiert, der Maßstabsbalken entspricht jeweils 20 μm ($n = 3 - 4$). Die histologischen Aufnahmen wurden von Judith Bushe angefertigt, **A:** PBS + Puffer 12h (fokal begrenztes Areal mit eitriger Bronchitis und beginnender eitriger Pneumonie, Rest der Lunge unverändert), **B:** PBS + Phagen 24 Stunden (multifokal über das Parenchym verteilte Areale mit interstitieller Infiltration durch neutrophile Granulozyten (unten) sowie peribronchiale Infiltration durch Neutrophile (oben)), **C:** PBS + Phagen 48 Stunden ((oben) peribronchiale, neutrophile und lymphozytäre Infiltrate, (unten) geringgradiger, perivaskuläre Lymphozytenmanschetten). Abkürzungen: *p.i.*: *post infectionem*.

5. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Wirksamkeit und Sicherheit von Bakteriophagen zur Bekämpfung von Infektionen durch *P. aeruginosa* in ausgewählten Aspekten experimentell zu untersuchen, um mehr Erkenntnisse über Bakteriophagen als Behandlungsmöglichkeit gegen immer häufiger auftretende, multiresistente Bakterien zu gewinnen. Dazu wurden *In-vitro*-Experimente sowie Analysen im *Ex-vivo*-Modell mit isoliertem humanem Lungengewebe und im *In-vivo*-Mausmodell durchgeführt.

Die verwendeten Phagen wurden vom Konsortium des Phage4Cure Projektes ausgewählt. Dazu suchte die Arbeitsgruppe von Frau Dr. Rohde des Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH die Phagen mittels eines *P. aeruginosa* Testpanels unter anderem anhand ihrer Wirtsabdeckung aus, um durch Kombination der Phagen eine möglichst hohe Abdeckung klinischer respiratorischer *P. aeruginosa* Isolate zu erreichen. Es wurden vom Konsortium drei Phagen ausgewählt. Von den drei identifizierten Phagen sind JG005 und JG024 (Garbe et al. 2010; Selezska et al. 2012) bereits veröffentlicht. BHZ17 wurde neu isoliert. Die in dieser Studie verwendeten *P. aeruginosa* Stämme wurden ausgesucht, da sie gegenüber allen drei Phagen suszeptibel sind.

Vorteil eines Phagencocktails ist es, verschiedene Stämme eines Bakteriums abzudecken und so ein breiteres Wirkspektrum zu erhalten (Abedon et al. 2021). Im Fall des Phagencocktails der vorliegenden Studie könnten Patienten und Patientinnen, die an einer Lungeninfektion mit *P. aeruginosa* leiden, der inhalierbare Wirkstoff aus den Bakteriophagen zugeführt werden, ohne dass erst ein passender Bakteriophage gesucht werden müsste. Allerdings bietet ein fest zusammengestellter Phagencocktail weniger Flexibilität als eine Phagenbank, eine Sammlung von verschiedenen Bakteriophagen, mit deren Hilfe eine personalisierte Phagentherapie möglich wäre (Chan et al. 2013). Obwohl eine potenzielle Konkurrenz zwischen den verschiedenen Phagen eines Phagencocktails um einen spezifischen Rezeptor (Bertozzi Silva et al. 2016) bestehen könnte, ist dies nicht unbedingt von Nachteil. Im besten Fall können einer oder mehrere Phagen des Cocktails den aus der erkrankten Person isolierten Stamm infizieren und so zur Bakterienlastreduzierung führen.

Eine vollständige Abdeckung klinischer Pseudomonas-Stämme durch den Cocktail ist jedoch nicht gegeben, so dass es in der späteren klinischen Anwendung der Phagen zu unwirksamen Therapien gegen Pseudomonas-Stämme kommen könnte. Eine weitere Möglichkeit, das therapeutische Potential der Phagen zu erweitern, wäre der synergistische Einsatz mit Antibiotika, was durch Lin et al. bereits gezeigt wurde (Lin et al. 2021). Duplessis et al. konnten ebenfalls nachweisen, dass die kombinierte Therapie von Phagen und Antibiotika zu einem größeren Behandlungserfolg führt, als die jeweiligen einzeln eingesetzten Komponenten

(Duplessis et al. 2021). Außerdem zeigen verschiedene Studien, dass phagenresistente Bakterien wieder sensibel gegenüber Antibiotika werden können (Engeman et al. 2021; Menon et al. 2022). Zukünftige Arbeiten sollten prüfen, ob Phagen in der klinischen Anwendung gut in Kombination mit Antibiotika eingesetzt werden könnten, um einen größtmöglichen Behandlungserfolg zu erzielen.

Zur Vorbereitung einer klinischen Studie wurden die drei Phagen gemeinsam mit einem handelsüblichen Vernebler aerosolisiert, um zu untersuchen, ob es zu einem Aktivitätsverlust der aufgereinigten Phagen durch die Aerosolierung kommt. Dies ist wichtig, da die Phagen zur lokalen Behandlung der *P. aeruginosa* Lungeninfektion inhaliert werden sollen. Der gleiche Ansatz einer lokalen Behandlung wurde auch in der *In-vivo*-Studie dieser Arbeit gewählt, da so die Phagen direkt an den Ort gebracht werden, an dem sie wirken sollen und der First-Pass-Effekt bei minimaler Verringerung der Bioverfügbarkeit vermieden wird (Zhang et al. 2021). Im Gegensatz zur systemischen Therapieroute (Arumugam et al. 2022) kommt es so zu einem potenziell schnelleren Wirkeintritt am Zielort. Laut Leung et al. beeinflusst die morphologische Struktur der Phagen den Titerverlust nach Aerosolierung (Leung et al. 2019). Die Ergebnisse der Aerosolierungsexperimente der hier vorliegenden Studie zeigten, dass der Großteil der Phagen nach Aerosolierung aktiv war und lassen folglich vermuten, dass die einzelnen Phagen des Phagencocktails und auch der zusammengestellte Phagencocktail dazu geeignet sind, aerosolisiert und damit von Patienten und Patientinnen inhaliert zu werden.

Um die Zelltoxizität der Phagen, besonders der in der Phagenlösung befindlichen Endotoxine der Bakterien, vorab zu testen, wurde ein *In-vitro*-Zellversuch mit A549 Zellen durchgeführt (Wang und Quinn 2010). Die Experimente mit dieser Zelllinie als Vorversuch zu den Hauptexperimenten zeigten, dass PA74 infizierte Zellen nach Phagenbehandlung keine erhöhten LDH-Werte aufwiesen. Des Weiteren führte die alleinige Applikation des Phagencocktails (aufgereinigt oder Lysat) zu keiner Freisetzung von LDH. Aus diesem Ergebnis lässt sich ableiten, dass die verwendeten Phagen per se nicht zu einer Zellschädigung mittels LDH-Freisetzung *in vitro* beitragen bzw. die durch die *P. aeruginosa* ausgelöste Zellschädigung nicht verstärken. Auch in der Arbeit von Chang et al. zeigten sich keine toxischen Wirkungen durch die Phagenapplikation auf A549 Zellen (Chang et al. 2018).

Um die Interaktionen zwischen Pathogen und Wirt in der Lunge im ursprünglichen, dreidimensionalen Gewebe zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein *Ex-vivo*-humanes Lungenmodell verwendet (Hocke et al. 2017). Großer Vorteil dieses Modells ist es, nicht auf einzelne Zelltypen zurückgreifen zu müssen, sondern die Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Zellen in ihrem erhaltenen ursprünglichen Gewebe beobachten zu können (Szymanski et al. 2012). Jedoch hat dieses Modell auch einige Einschränkungen. Zum einen stammen die Lungenstücke pro Experiment von verschiedenen Patientinnen und Patienten.

Das bedeutet, dass es eine gewisse Diversität der verwendeten Lungenproben hinsichtlich Alter, Vorerkrankungen, Rauchverhalten und verschiedenen anderen Faktoren gibt (Hocke et al. 2017). Diese Faktoren könnten in einem Zellmodell ausgeschlossen werden. Da die Lungenstücke aus der Lunge entfernt wurden und im Experiment in einer nicht bewegten Flüssigkeit schwimmen, besteht keine Versorgung der Lungenstücke mit Blut. Daher kommt es nicht zur Einwanderung von Immunzellen und zum Zustrom von Mediatoren wie Zytokinen. Durch den nicht vorhandenen Blutstrom wird ebenfalls die Sauerstoffzufuhr und der Gasaustausch gehemmt und es kann unabhängig von der Stimulation der Zellen zum Zelltod kommen (Middleton et al. 2003). Des Weiteren erfolgten die Infektion und Behandlung der Lungenstücke nicht über natürliche Wege, sondern die Bakterien und auch die Phagen werden direkt in das Gewebe injiziert. Im *In-vivo*-Mausmodell hingegen wird der natürliche Infektionsweg so gut wie möglich nachgeahmt, indem die Bakterien transnasal via Tröpfcheninfektion appliziert werden. So gelangen die Bakterien über Nasengänge und Bronchien zu den Alveolen.

Im *Ex-vivo*-Lungenmodell kam es je nach Dosis zur Hemmung des bakteriellen Wachstums sowohl durch die Einzelphagen JG005 und JG024 als auch durch den Phagencocktail. Der Phage BHZ17 konnte keine Hemmung des bakteriellen Wachstums im *Ex-vivo*-Lungenmodell auslösen. Alle drei Phagen zeigten jedoch die generelle Fähigkeit, den Bakterienstamm PA74 zu lysieren, wie durch die Phagentiterbestimmung im *Ex-vivo*-Lungenmodell gezeigt werden konnte. Die Imipenem Anwendung führte zu einer vollständigen Hemmung des bakteriellen Wachstums. Imipenem ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Carbapeneme und dessen bakterizide Wirkung basiert auf der irreversiblen Inhibition von Penicillin-bindenden Proteinen (Clissold et al. 1987). Die Antibiotikagruppe diente hier jedoch nur als Positivkontrolle und stand nicht im direkten Vergleich mit den Phagengruppen. Vielmehr sollte anhand dieser Gruppe die maximale Bakterienlastreduzierung und mögliche Effekte dieser auf das Lungengewebe bzw. die Zellen gezeigt werden.

Im *Ex-vivo*-Lungenmodell kam es zu erhöhten Ausschüttungen von IL-1 β in der mit Phagen behandelten und mit PA74 infizierten Gruppe nach 24 Stunden. Im Gegensatz dazu kam es zu erniedrigten Werten von IL-1 β in der mit Phagen behandelten und mit PA70 infizierten Gruppe nach 24 Stunden. Die unterschiedlichen Ergebnisse der IL-1 β Ausschüttung im *Ex-vivo*-Lungenmodell bezogen auf die beiden *Pseudomonas* Stämme lassen sich vermutlich auf die verschiedene Bakterienlastreduzierung durch die Phagen zurückführen. Dadurch, dass der Phagencocktail den Stamm PA70 tendenziell stärker als den Stamm PA74 reduziert hat, könnten die niedrigeren IL-1 β Konzentrationen nach 24 Stunden bei der mit Phagen behandelten Gruppe der PA70-infizierten Lungenstücke erklärt werden. Die Ergebnisse der Einzelphagen unterstützen diese Hypothese nicht. Die Phagen JG005 und JG024 konnten die Bakterienlast stärker reduzieren als der Phage BHZ17. Die IL-1 β Ausschüttung bei den erst

genannten beiden Phagen war bei den mit Phagen behandelten Gruppen erhöht, hingegen war bei den mit BHZ17 behandelten Gruppen keine erhöhte IL-1 β Ausschüttung zu erkennen. Obwohl die mit Phagen behandelten Gruppen teilweise mehr IL-1 β Ausschüttung aufwiesen als die mit Placebo behandelten Gruppen, ist nicht davon auszugehen, dass die Phagen *per se* eine Ausschüttung induzieren, da die nur mit Phagen behandelten Gruppen keine erhöhte IL-1 β Ausschüttung, im Vergleich zum Kontrollmedium nach 0 Stunden, zeigten. Ebenfalls könnten unterschiedliche bakterielle Faktoren, die bei der Lyse der verschiedenen Stämme freigesetzt werden, der Grund für die Ergebnisse sein (Subedi et al. 2018). Die biologische Relevanz der unterschiedlichen IL-1 β -Werte, die nach der Applikation der Phagen in mit PA74 und PA70 infizierten Lungenproben beobachtet wurden, wurde nicht weiter untersucht.

Um die Wissenslücken durch die Limitationen des *Ex-vivo*-Modells zu schließen, wurden weiterführende *In-vivo*-Versuche im Mausmodell durchgeführt. Die Maus als Tiermodell ist eines der am häufigsten verwendeten und untersuchten Modelle zur Erforschung und Entwicklung von Therapiemöglichkeiten von Pneumonien.

Zwar gibt es weit mehr Gemeinsamkeiten als Unterschiede beim Vergleich zwischen der Lungenentzündung beim Menschen und der Maus, da es sich im Grunde bei beiden Organismen um den gleichen Prozess in der Lunge handelt (Mizgerd und Skerrett 2008), dennoch gibt es durch Unterschiede auch in diesem Modell Limitationen. Ein sehr wichtiger versuchsrelevanter Unterschied zwischen dem Organismus Mensch und der Maus ist die Thermoregulation als Reaktion auf eine Infektion (Gordon 1993). Im Gegensatz zu der menschlichen hyperthermischen Reaktion auf eine Infektion, reguliert das Nagetier Maus seine Körpertemperatur nach unten, um so eine verbesserte Überlebenschance zu kreieren, da dies die Widerstandsfähigkeit gegen die Infektion erhöht und die Genesung verbessert (Gordon 1993). Darüber hinaus, wie bereits im Literaturteil beschrieben, unterscheiden sich die Atemwege anatomisch von denen des Menschen und können so die Ablagerung und Ausscheidung von eingeatmeten oder aspirierten Mikroorganismen beeinflussen (Irvin und Bates 2003). Des Weiteren gibt es Unterschiede in den Entzündungs- und Immunreaktionen von Mäusen und Menschen, die sich auf die pulmonale Abwehr auswirken können (Mizgerd und Skerrett 2008). Daher können die Ergebnisse dieser Experimente nicht gänzlich auf den Menschen übertragen werden (Mizgerd und Skerrett 2008). Nichtsdestotrotz sind Mausmodelle ein sehr nützliches Instrument, um die Behandlung der Pneumonie weiter zu untersuchen (Arrazuria et al. 2022).

Im *In-vivo*-Mausmodell konnte eine Reduktion der Erregerlast in der BAL und der Lunge nach 12 Stunden und tendenziell auch nach 48 Stunden beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigen die generelle Fähigkeit des Bakteriophagencocktails, den klinischen PA74 in der Maus zu lysieren. Im direkten Vergleich mit publizierten Ergebnissen anderer Autoren, die ebenfalls

murine *P. aeruginosa* Lungen Infektionsmodelle mit nachfolgender Phagenbehandlung verwendet haben, zeigte sich jedoch eine geringere Reduktion der bakteriellen Last im hier verwendeten Modell (Alemayehu et al. 2012; Pabary et al. 2016; Roach et al. 2017; Dufour et al. 2019). Dies könnte auf Unterschiede im Versuchsaufbau zurückzuführen sein. So sind Infektionszeitpunkt, Infektionsdosis und der ausgewählte *Pseudomonas* Stamm entscheidende Variablen. Alemayehu et al. haben in ihrer Studie die Wirkung eines Phagencocktails in der murinen Lunge gegen *P. aeruginosa* untersucht. Dabei wurden die Tiere mit einer Infektionsdosis von $1 \times 10^7 - 2 \times 10^7$ KbE infiziert und die Phagen 2 Stunden *p.i.* appliziert (Alemayehu et al. 2012). In einer Studie von Roach et al. beschreiben die Autoren ebenfalls die Effekte der Behandlung mit einem Phagencocktail in der murinen Lunge gegen *P. aeruginosa* mit der Infektionsdosis von 1×10^7 KbE und einer Phagenapplikation 2 Stunden nach Infektion (Roach et al. 2017). In dieser hier vorliegenden Arbeit wurde bewusst ein späterer Zeitpunkt der Behandlung (sechs Stunden *p.i.*) gewählt, um die Effekte der Phagen auf ein bereits stimuliertes Immunsystem zu untersuchen (Wienhold et al. 2021) und so der Behandlung von Patientinnen und Patienten näherzukommen. Die spätere Applikation der Phagen könnte dazu geführt haben, dass die Bakterien sich stärker vermehren, mehr Biofilm oder Mukus bilden und/oder tiefer in das Lungengewebe eindringen konnten. Dadurch waren sie für die Phagen eventuell schwerer zu erreichen, was das abweichende Behandlungsergebnis in dieser Studie im Vergleich zu den beiden anderen Studien erklären könnte (Alemayehu et al. 2012; Roach et al. 2017). Mehrere *In-vivo*-Mausmodell Studien beschreiben (Morello et al. 2011; Pabary et al. 2016; Jeon und Yong 2019), dass die Wirksamkeit vom Zeitpunkt der Verabreichung der Behandlung abhängt, wobei die Wirksamkeit größer ist, wenn die Phagen in den ersten Stunden in hoher Konzentration verabreicht werden (Martínez-Gallardo et al. 2022). Andere Studien benutzten eine höhere Phagendosis, um die Tiere zu behandeln (Pabary et al. 2016; Dufour et al. 2019). Dies war in dieser Studie nicht möglich, da der aufgereinigte Phagencocktail aus technischen Gründen einen niedrigeren Titer hatte als die verwendeten Phagen der anderen beiden Studien (Pabary et al. 2016; Dufour et al. 2019). In dem Mausmodell dieser Studie wurde unter den gegebenen Bedingungen die höchstmögliche Phagendosis verwendet. Auch die Literaturübersicht von Martínez-Gallardo et al. zeigt, dass die Wirksamkeit der Phagentherapie bei verschiedenen Infektionsmodellen vom Zeitpunkt und der Dosis abhängt (Martínez-Gallardo et al. 2022). Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten aber auch auf verschiedene Eigenschaften der zur Infektion verwendeten *P. aeruginosa* Stämme in den Studien zurückzuführen sein (Pugashetti et al. 1982). Des Weiteren ist die niedrige Erregerlastreduzierung nach einmaliger Applikation im Mausmodell dadurch zu relativieren, dass Patienten und Patientinnen die Phagen mehrfach mittels Vernebler appliziert bekommen können, um so möglichst viele Phagen in Kontakt mit den Bakterien zu bringen. Der Ansatz der mehrmaligen Phagenapplikation konnte im *In-vivo*-Mausmodell nicht durchgeführt werden,

da die Tiere zur Applikation der Phagen in Narkose gelegt werden und dieser Prozess aus Tierschutzgründen nicht mehrfach in kurzer Zeit wiederholbar ist (Wienhold et al. 2021). Außerdem werden die späteren Patienten und Patientinnen die Phagen aktiv inhalieren, die Mäuse haben hingegen in der hier vorliegenden Studie die Phagen als Tropfen intratracheal appliziert bekommen. Vermutlich können die Phagen durch die feinere Partikelgröße durch das Inhalieren tiefer in die humane Lunge vordringen (Brain et al. 1976).

Weiterhin wurde in dieser Arbeit in einem ersten Vorversuch getestet, ob sich während der Durchführung des *In-vivo*-Modells eine Resistenz gegen die Phagen gebildet hat oder ein bereits vorhandener resistenter Stamm innerhalb des Bakterienkryostocks vorhanden war. Dazu wurden 10 Klone von PA74 aus der Lunge einer mit Phagen behandelten Maus der *In-vivo*-Versuche nach 48 Stunden mit den drei Einzelphagen (JG005, JG024 und BHZ17) auf Sensibilität getestet. Alle 10 Klone waren weiterhin gegen alle drei Phagen sensibel (Ergebnisse nicht gezeigt). Diese Ergebnisse veranschaulichen, dass eine Resistenzbildung der Bakterien gegenüber dem Phagencocktail innerhalb des Untersuchungszeitraum nicht gegeben war. Die Resistenzbildung als Ursache für die niedrige Erregerlastreduzierung erscheint dadurch unwahrscheinlich.

Die erhöhten Ausschüttungen der Zytokine TNF- α und GM-CSF 12 Stunden *p.i.* in der BALF in der scheininfizierten, mit Phagen behandelten Gruppe im Vergleich zu der scheininfizierten Placebo Gruppe könnten durch unterschiedliche Mechanismen erklärt werden. Zum einen besteht die Möglichkeit der Reaktion des Immunsystems der Maus auf die Phagen selbst (Van Belleghem et al. 2018). Zum anderen könnte das Immunsystem durch die Endotoxine, welche sich im Phagen-Produkt befinden, stimuliert werden. Wie bereits beschrieben induziert LPS, eine Zellwandkomponente von gramnegativen Bakterien, eine starke TNF- α Ausschüttung von Alveolar-Makrophagen (Mukhopadhyay et al. 2006). Diese Beobachtung würde auch mit den oben beschriebenen Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit übereinstimmen. Die erhöhte Ausschüttung führte klinisch zu keiner erkennbaren nachteiligen Auswirkung und war zu späteren Zeitpunkten nicht mehr nachweisbar. Die Erhöhung einiger Zytokine sowohl auf lokaler als auch systemischer Ebene im Vergleich zwischen der infizierten, mit Phagen behandelten Gruppe und der infizierten, mit Placebo behandelten Gruppe könnte zusätzlich durch die Stimulierung des Immunsystems durch Endotoxine, welche durch das Absterben der Bakterienzellen durch die Phagen freigesetzt werden, erklärt werden (Dufour et al. 2017). Zusammenfassend werden durch die Applikation der Phagen unterschiedliche Signalwege angesprochen und es kommt so zu einer teilweise erhöhten oder verringerten Ausschüttung von Zytokinen. Die biologische Relevanz dieses Ergebnisses bleibt jedoch unklar.

Zu den Ergebnissen der Zytokin-Auswertung passen auch die erhöhten Anteile der PMN an den Gesamtleukozyten in der BALF zwischen der scheininfizierten, mit Phagen behandelten

Gruppe und der scheininfizierten mit Placebo behandelten Gruppe. Auch diese Ergebnisse zeigen, dass die Applikation der Lösung des Phagencocktails eine gewisse lokale Immunreaktion hervorruft. Die lokale Immunreaktion wird weiterhin durch die Ergebnisse der histopathologischen Auswertung bestätigt. Dort zeigten die scheininfizierten und mit Phagen behandelten Tiere minimale bis geringgradige neutrophile, alveoläre sowie perivaskuläre und peribronchiale Infiltrate. Die Tiere der scheininfizierten Placebo-behandelten Gruppe zeigten diese Veränderungen ebenfalls, aber in einem geringeren Maße. Bei beiden Gruppen wurden klinisch keine erkennbaren Auswirkungen festgestellt. Die verringerte Gesamtleukozytenanzahl im Blut 24 Stunden *p.i.* deutet darauf hin, dass die Phagen auf systemischer Ebene in der Lage waren, die Immunreaktion zu verringern. Hier ist jedoch zu beachten, dass diese Ergebnisse auch an einer vergleichbaren systemischen Inflammation bei gleichzeitig mehr pulmonaler Extravasation liegen könnten.

Die meisten der vergleichbaren Studien verfügen über keine Placebo-behandelte Gruppe, um nur den Effekt der Phagen ohne Bakterien zu betrachten (Sulakvelidze et al. 2001). Das murine *P. aeruginosa* Infektionsmodell von Debarbieux et al. verfügt hingegen ebenfalls über eine Placebo-behandelte Gruppe. Dort werden die Zytokine IL-6 und TNF- α in der BALF nach der alleinigen Phagenapplikation 24 Stunden *p.i.* nicht vermehrt ausgeschüttet. Durch Behandlung der *P. aeruginosa* Infektion mit den Phagen kommt es bei Debarbieux et al. 24 Stunden *p.i.* zu signifikant reduzierten Ausschüttungen dieser beiden Zytokine (Debarbieux et al. 2010). Auch in unserem Modell sind keine erhöhten IL-6 und TNF- α Werte nach 24 Stunden aufgetreten. In unserem Versuch kam es zu erhöhten Werten von IL-6 und TNF- α 12 Stunden *p.i.*, da beide Zytokine eine rasche Immunantwort auslösen. Demnach wäre es möglich, dass die beschriebenen Veränderungen durchaus auftraten, jedoch aufgrund der späteren Analysezeitpunkte bei Debarbieux et al. nicht detektiert wurden. Ähnliche Ergebnisse zu der hier vorliegenden Arbeit zeigt jedoch die Studie im Mausmodell der *P. aeruginosa*-Lungenentzündung von Yang et al., welche aber wiederum keine uninfizierte Phagengruppe aufweist. Dort kam es sowohl lokal, als auch systemisch zur Reduktion und teilweise Erhöhung der verschiedenen Zytokine (Yang et al. 2021). Wie auch in dieser Arbeit waren bei Yang et al. die IL-1 β Werte durch die Phagenbehandlung sowohl auf der lokalen als auch der systemischen Ebene reduziert. Yang et al. konnten zudem eine systemische Reduktion von TNF- α und IFN- γ 24 Stunden *p.i.* erkennen. Diese Ergebnisse konnten in der hier vorliegenden Arbeit nicht repliziert werden, was wiederum an der höheren Behandlungsdosis in der Arbeit von Yang et al. liegen könnte. Des Weiteren konnten Yang et al., im Gegensatz zu der hier vorliegenden Arbeit, erhöhte lokale IFN- γ Konzentrationen in der Lunge 24 Stunden *p.i.* feststellen (Yang et al. 2021). Laut den Autoren könnte dies an einer lokalen Aktivierung von T-Zellen liegen, welche IFN- γ produzieren, um phagozytierende Zellen bei der Bekämpfung der bakteriellen

Infektion zu unterstützen. Dies sehen Yang et al. als einen weiteren Vorteil der Phagenbehandlung (Yang et al. 2021). Schlussendlich bestätigen die Ergebnisse der hier genannten Studien unsere Erkenntnisse, dass durch die Applikation der Phagen unterschiedliche Signalwege angesprochen werden und es je nach Versuchsaufbau zu verschiedenen Ausschüttungen von Zytokinen kommt. Dieser Effekt war biologisch messbar, jedoch konnte keine mit ihm verbundene klinische Reaktion detektiert werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die Applikation des hier gewählten Phagencocktails zu einer Reduktion der bakteriellen Last in BAL und Lunge zu frühen Analysezeitpunkten im Mausmodell und Modell der humanen Lunge führte. Die gemessenen Effekte auf die Immunreaktion im Sinne erhöhter Zytokinausschüttung waren mit keiner klinischen Beeinträchtigung der Tiere verbunden. Insgesamt konnten klinisch keine unerwünschten Wirkungen des Phagencocktails beobachtet werden. Der Einsatz von Bakteriophagen als Therapieoption bei Patienten und Patientinnen mit chronischer Pseudomonasinfektion könnte ein vielversprechender Ansatz zur Verbesserung der klinischen Symptomatik sein.

6. Zusammenfassung

Experimentelle Bakteriophagen-Therapie bei Infektionen von Lungenmodellen mit *Pseudomonas aeruginosa*

Moritz Vollgraf

Die zunehmende Unwirksamkeit gängiger Medikamente gegenüber immer mehr auftretende multiresistente Bakterien erhöht den Bedarf an neuen Behandlungsmöglichkeiten. Das gram-negative Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* ist ein Beispiel dieser Bakterien, welches für verschiedene nosokomiale Infektionen, insbesondere für Pneumonien, und den rasanten Erwerb von multiplen Resistenzen bekannt ist. Eine vielversprechende mögliche Alternative oder Ergänzung zu herkömmlichen Therapien sind Bakteriophagen, auch bekannt als Phagen. Diese Viren infizieren ausschließlich Bakterienzellen, vermehren sich in ihnen und lysieren sie. Obwohl allgemein anerkannt ist, dass Phagen unter Laborbedingungen in der Lage sind, (antibiotikaresistente) Bakterien zu lysieren, gibt es noch wenig Wissen darüber, welche Immunreaktionen sie im Zielgewebe, wie z. B. der Lunge, auslösen. Die Kenntnis darüber ist jedoch von entscheidender Bedeutung, um die Sicherheit der Phagentherapie beurteilen und sie erfolgreich beim Menschen einsetzen zu können. Das Ziel dieses Promotionsvorhabens war es, in ausgewählten Aspekten die Sicherheit und Verträglichkeit eines Bakteriophagencocktails in der Behandlung gegen eine Lungeninfektion mit *P. aeruginosa* präklinisch zu evaluieren. Dafür wurden die Bakteriophagen gegen *P. aeruginosa ex vivo* in einem Lungengewebekultur-Modell und *in vivo* in einem murinen Pneumonie-Modell untersucht.

Die Applikation der Einzelphagen JG005 und JG024 und eines Phagencocktails, bestehend aus JG005, JG024 und BHZ17, führten im *Ex-vivo*-Lungeninfektionsmodell zur Hemmung des bakteriellen Wachstums. Dieses Ergebnis konnte nur mit der MOI von 1000 oder höher erzielt werden. Der Einzelphage BHZ17 war bei keiner Dosierung in der Lage, die bakterielle Last in den Lungenstücken zu reduzieren. Die Applikation des Phagencocktails führte bei den mit DSM 107574, einem klinischen Isolat von *Pseudomonas aeruginosa*, infizierten Lungenstücken zu einer Erhöhung und bei den mit DSM 107570, einem weiteren klinischen Isolat von *Pseudomonas aeruginosa*, infizierten Lungenstücken zu einer Erniedrigung der IL-1 β Ausschüttung.

Durch die Applikation des Phagencocktails konnten keine negativen Einflüsse auf das klinische Bild der Versuchstiere beobachtet werden. Die Phagentherapie führte zu einem verbesserten Körpertemperaturverlauf der infizierten Mäuse und zu weniger Bakterienlast 12 Stunden *p.i.* in der Lunge und BALF der infizierten Mäuse. Auf die Lungengefäßpermeabilität hatte die Behandlung mit Phagen keinen Einfluss. Mit Hilfe der Phagen konnte die systemische

Erhöhung der Leukozytenanzahl durch die Infektion verhindert werden. Auf lokaler Ebene betrachtet, erhöhte die Behandlung mit Phagen den Prozentsatz polymorphkerniger Leukozyten in der bronchioalveolären Lavageflüssigkeit bei scheininfizierten Tieren zu allen Untersuchungszeitpunkten. Die Befunde der lokalen Immunreaktion wurden weiterhin durch die Ergebnisse der histopathologischen Auswertung bestätigt. Dort zeigten die scheininfizierten phagenbehandelten und placebobehandelten Tiere minimale bis geringgradige neutrophile alveoläre sowie perivaskuläre und peribronchiale Infiltrate. Die histopathologische Untersuchung zeigte außerdem keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf Grad der Pneumonie und Ödembildung zwischen der *P. aeruginosa*-infizierten und phagenbehandelten Gruppe im Vergleich zu der *P. aeruginosa*-infizierten und Placebo behandelten Gruppe. Durch die Applikation der Phagen kam es teilweise zur Verringerung und teilweise zur Erhöhung von Zytokinen auf lokaler und auf systemischer Ebene. TNF- α und GM-CSF waren in scheininfizierten mit Phagen behandelten Tieren 12 Stunden *p.i.* auf lokaler Ebene erhöht. Die Applikation der Phagen führte zu einer Reduktion der IL-1 β Ausschüttung 12 Stunden *p.i.* auf lokaler und systemischer Ebene in den mit *P. aeruginosa* infizierten Tieren.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen die Fähigkeit der Phagen, Bakterienlast zu reduzieren, und damit ihr Potenzial als mögliches Therapeutikum. Trotz des Auftretens von leichten Immunreaktionen in den verschiedenen Modellen konnten keine klinisch sichtbaren unerwünschten Wirkungen im Mausmodell beobachtet werden. Die vorliegende experimentelle Studie unterstützt die Entwicklung eines Cocktails von Bakteriophagen für die klinische Therapie von *P. aeruginosa* Infektionen der Lunge.

7. Summary

Experimental bacteriophage therapy for infections by lung models caused by *Pseudomonas aeruginosa*

Moritz Vollgraf

The emergence of multidrug-resistant bacteria and the increasing ineffectiveness of current drugs have created a need for new treatment options. An example of such a bacterium is *Pseudomonas aeruginosa*, a Gram-negative bacterium known to cause several nosocomial infections, particularly pneumonia, and to rapidly acquire multiple resistance. A promising potential alternative or adjunct to conventional therapies are bacteriophages, also known as phages. These viruses only infect bacterial cells, lyse them, and replicate in the process. Although it is generally accepted that phages can lyse (antibiotic-resistant) bacteria under laboratory conditions, little is known about the immune response they can induce in target tissues such as the lungs. However, understanding this is crucial for assessing the safety of phage therapy and for its successful use in humans. The aim of this doctoral thesis was to preclinically evaluate the safety and tolerability of a bacteriophage cocktail in the treatment of pulmonary infection with *P. aeruginosa* in selected aspects. The bacteriophages were evaluated against *P. aeruginosa* *ex vivo* in a lung tissue culture model and *in vivo* in a murine pneumonia model.

Application of the single phages JG005 and JG024 and a phage cocktail of JG005, JG024 and BHZ17 resulted in inhibition of bacterial growth in the *ex vivo* lung infection model. This result was only achieved at an MOI of 1000 or higher. The single phage BHZ17 was unable to reduce the bacterial load in the lung samples at any dose. Application of the phage cocktail led to an increase in IL-1 β release in the lung samples infected with DSM 107574, clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*, and to a decrease in the lung samples infected with DSM 107570, another clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*.

The phage cocktail did not have negative effects on the clinical picture of the experimental animals, but the phages did lead to an improvement in the body temperature of the infected mice. Furthermore, phage treatment resulted in fewer bacteria in the lungs and BALF at 12 hours *p.i.* of the infected mice. There was no effect of phage treatment on pulmonary vascular permeability. Phages prevented the systemic increase in leukocytes caused by the infection. At the local level, phage treatment increased the percentage of polymorphonuclear leukocytes in bronchioalveolar lavage fluid in sham-infected animals at all study time points. The findings of local immune response were further supported by the results of histopathological evaluation. Both sham-infected phage-treated and placebo-treated animals developed minimal to low-

grade neutrophilic alveolar, perivascular and peribronchial infiltrates. The histopathological examination also showed no significant differences in the degree of pneumonia and edema formation between the *P. aeruginosa*-infected and phage-treated group compared to the *P. aeruginosa*-infected and placebo-treated group. Phage administration resulted in partial reduction and partial increase of cytokines at local and systemic levels. TNF- α and GM-CSF were increased at the local level 12 hours *p.i.* in sham-infected phage-treated animals. Application of phages led to a reduction in IL-1 β release 12 hours *p.i.* at local and systemic levels in *P. aeruginosa*-infected animals.

The results of this study confirm the ability of phages to reduce bacteria burden and thus their potential as a possible therapeutic agent. Despite the occurrence of slight immune responses in the different models, no clinically visible adverse effects were observed in the mouse model. The present study has strengthened the approach of developing a cocktail of bacteriophages for the clinical therapy of lung infections caused by *P. aeruginosa*.

8. Literaturverzeichnis

Abedon S. T., Danis-Wlodarczyk K. M. und Wozniak D. J. (2021):

Phage cocktail development for bacteriophage therapy: toward improving spectrum of activity breadth and depth.

Pharmaceuticals (Basel) 14: 1019.

Abedon S. T., Kuhl S. J., Blasdel B. G. und Kutter E. M. (2011):

Phage treatment of human infections.

Bacteriophage 1: 66-85.

Ackermann H. W. (2009):

Phage classification and characterization.

Methods Mol Biol 501: 127-140.

Alemayehu D., Casey P. G., McAuliffe O., Guinane C. M., Martin J. G., Shanahan F., Coffey A., Ross R. P., Hill C. und Klugman K. P. (2012):

Bacteriophages ϕ MR299-2 and ϕ NH-4 can eliminate *Pseudomonas aeruginosa* in the murine lung and on cystic fibrosis lung airway cells.

mBio 3: e00029-00012.

Anantharajah A., Mingeot-Leclercq M.-P. und Van Bambeke F. (2016):

Targeting the type three secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*.

Trends in Pharmacological Sciences 37: 734-749.

Aranaz-Andrés J. M., Aibar-Remón C., Vitaller-Murillo J., Ruiz-López P., Limón-Ramírez R. und Terol-García E. (2008):

Incidence of adverse events related to health care in Spain: results of the Spanish National Study of Adverse Events.

Journal of Epidemiology and Community Health 62: 1022-1029.

Arrazuria R., Kerscher B., Huber K. E., Hoover J. L., Lundberg C. V., Hansen J. U., Sordello S., Renard S., Aranzana-Climent V., Hughes D., Gribbon P., Friberg L. E. und Bekeredjian-Ding I. (2022):

Expert workshop summary: advancing toward a standardized murine model to evaluate treatments for antimicrobial resistance lung infections.

Frontiers in Microbiology 13: 988725.

Arumugam S. N., Manohar P., Sukumaran S., Sadagopan S., Loh B., Leptihn S. und Nachimuthu R. (2022):

Antibacterial efficacy of lytic phages against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections in bacteraemia mice models.

BMC Microbiology 22: 187.

Berger S., Goekeri C., Gupta S. K., Vera J., Dietert K., Behrendt U., Lienau J., Wienhold S. M., Gruber A. D., Suttorp N., Witzernath M. und Nouailles G. (2018):

Delay in antibiotic therapy results in fatal disease outcome in murine pneumococcal pneumonia.

Critical Care 22: 287.

Bertozzi Silva J., Storms Z. und Sauvageau D. (2016):

Host receptors for bacteriophage adsorption.

Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters 363: fnw002.

Bleves S., Viarre V., Salacha R., Michel G. P. F., Filloux A. und Voulhoux R. (2010):

Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: a wealth of pathogenic weapons.

International Journal of Medical Microbiology 300: 534-543.

Borish L. C. und Steinke J. W. (2003):

2. Cytokines and chemokines.

Journal of Allergy and Clinical Immunology 111: 460-475.

Botelho J., Grosso F. und Peixe L. (2019):

Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*—mechanisms, epidemiology and evolution.

Drug Resistance Updates 44: 100640.

Brain J. D., Knudson D. E., Sorokin S. P. und Davis M. A. (1976):

Pulmonary distribution of particles given by intratracheal instillation or by aerosol inhalation.

Environmental Research 11: 13-33.

Breidenstein E. B., de la Fuente-Núñez C. und Hancock R. E. (2011):

Pseudomonas aeruginosa: all roads lead to resistance.

Trends in Microbiology 19: 419-426.

Brives C. und Pourraz J. (2020):

Phage therapy as a potential solution in the fight against AMR: obstacles and possible futures.
Palgrave Communications 6: 100.

Caflich K. M., Suh G. A. und Patel R. (2019):

Biological challenges of phage therapy and proposed solutions: a literature review.
Expert Review of Anti-Infective Therapy 17: 1011-1041.

Cafora M., Deflorian G., Forti F., Ferrari L., Binelli G., Briani F., Ghisotti D. und Pistocchi A.
(2019):

Phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections in a cystic fibrosis zebrafish
model.
Scientific Reports 9: 1-10.

Cassini A., Plachouras D., Eckmanns T., Abu Sin M., Blank H.-P., Ducomble T., Haller S.,
Harder T., Klingeberg A., Sixtensson M., Velasco E., Weiß B., Kramarz P., Monnet D. L.,
Kretzschmar M. E. und Suetens C. (2016):

Burden of six healthcare-associated infections on European population health: estimating
incidence-based disability-adjusted life years through a population prevalence-based
modelling study.
PLOS Medicine 13: e1002150.

Cerceo E., Deitelzweig S. B., Sherman B. M. und Amin A. N. (2016):

Multidrug-resistant gram-negative bacterial infections in the hospital setting: overview,
implications for clinical practice, and emerging treatment options.
Microbial Drug Resistance 22: 412-431.

Chan B. K., Abedon S. T. und Loc-Carrillo C. (2013):

Phage cocktails and the future of phage therapy.
Future Microbiology 8: 769-783.

Chan B. K., Siström M., Wertz J. E., Kortright K. E., Narayan D. und Turner P. E. (2016):

Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*.
Scientific Reports 6: 1-8.

Chang R. Y. K., Chen K., Wang J., Wallin M., Britton W., Morales S., Kutter E., Li J. und Chan H. K. (2018):

Proof-of-principle study in a murine lung infection model of antipseudomonal activity of phage PEV20 in a dry-powder formulation.

Antimicrob Agents Chemother 62: e01714-17.

Chatterjee M., Anju C. P., Biswas L., Anil Kumar V., Gopi Mohan C. und Biswas R. (2016):

Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options.

International Journal of Medical Microbiology 306: 48-58.

Chaudhry R. und Bordoni B. (2022):

Anatomy, thorax, lungs.

StatPearls. Treasure Island (FL),

StatPearls Publishing LLC.

Chaudhry W. N., Concepcion-Acevedo J., Park T., Andleeb S., Bull J. J. und Levin B. R.

(2017):

Synergy and order effects of antibiotics and phages in killing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms.

PLOS ONE 12: e0168615.

Chirgwin M. E., Dedloff M. R., Holban A. M. und Gestal M. C. (2019):

Novel therapeutic strategies applied to *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis.

Materials 12: 4093.

Claus M., Greil J. und Watzl C. (2009):

Comprehensive analysis of NK cell function in whole blood samples.

Journal of Immunological Methods 341: 154-164.

Clissold S. P., Todd P. A. und Campoli-Richards D. M. (1987):

Imipenem/cilastatin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy.

Drugs 33: 183-241.

Clokic M. R., Millard A. D., Letarov A. V. und Heaphy S. (2011):

Phages in nature.

Bacteriophage 1: 31-45.

Costabel U. und Kroegel C. (1988):

Die Lunge und ihre Abwehrmechanismen.

AIDS und Lunge, Heidelberg, Steinkopff.

Couper K. N., Blount D. G. und Riley E. M. (2008):

IL-10: the master regulator of immunity to infection.

The Journal of Immunology 180: 5771-5777.

Craig L., Pique M. E. und Tainer J. A. (2004):

Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity.

Nature Reviews Microbiology 2: 363-378.

Croghan C. und Egeghy P. P. (2003):

Methods of dealing with values below the limit of detection using SAS.

Presented at Southeastern SAS User Group, St. Petersburg, FL, September 22-24, 2003.

Curtin J. J. und Donlan R. M. (2006):

Using bacteriophages to reduce formation of catheter-associated biofilms by *Staphylococcus epidermidis*.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy 50: 1268-1275.

D'Herelle (1917):

Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques.

Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences; Vol. 165, 373-375.

D'Herelle (1926):

The bacteriophage and its behavior

Baltimore, Williams & Wilkins Company.

D'Herelle F. (1931):

Bacteriophage as a treatment in acute medical and surgical infections.

Bulletin of the New York Academy of Medicine 7: 329-348.

Dalhoff K., Abele-Horn M., Andreas S., Deja M., Ewig S., Gastmeier P., Gatermann S., Gerlach H., Grabein B., Heußel C. P., 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., Schreier D., Schütte H., Seifert H., Spies C., Welte T., Unter Mitwirkung der folgenden Wissenschaftlichen Fachgesellschaften und Institutionen: Deutsche Gesellschaft für C., Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin e. V., Deutsche Gesellschaft für Internistische Intensivmedizin und N., Deutsche Sepsis-Gesellschaft e. V. und und Robert K.-I. (2018): Epidemiologie, Diagnostik und Therapie erwachsener Patienten mit nosokomialer Pneumonie – Update 2017. *Pneumologie* 72: 15-63.

Davey M. E. und O'toole G. A. (2000): Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64: 847-867.

De Lencastre H., Oliveira D. und Tomasz A. (2007): Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. *Current Opinion in Microbiology* 10: 428-435.

Debarbieux L., Leduc D., Maura D., Morello E., Criscuolo A., Grossi O., Balloy V. und Touqui L. (2010): Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *The Journal of Infectious Diseases* 201: 1096-1104.

Denton M., Kerr K., Mooney L., Keer V., Rajgopal A., Brownlee K., Arundel P. und Conway S. (2002): Transmission of colistin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* between patients attending a pediatric cystic fibrosis center. *Pediatric Pulmonology* 34: 257-261.

Dickson K. und Lehmann C. (2019): Inflammatory response to different toxins in experimental sepsis models. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 4341.

Dietert K., Gutbier B., Wienhold S. M., Reppe K., Jiang X., Yao L., Chaput C., Naujoks J., Brack M., Kupke A., Peteranderl C., Becker S., von Lachner C., Baal N., Slevogt H., Hocke A. C., Witzenrath M., Opitz B., Herold S., Hackstein H., Sander L. E., Suttorp N. und Gruber A. D. (2017):

Spectrum of pathogen- and model-specific histopathologies in mouse models of acute pneumonia.

PLOS ONE 12: e0188251.

Dinarelo C. A. (2009):

Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family.

Annual Review of Immunology 27: 519-550.

Djebara S., Maussen C., De Vos D., Merabishvili M., Damanet B., Pang K. W., De Leenheer P., Strachinaru I., Soentjens P. und Pirnay J.-P. (2019):

Processing phage therapy requests in a Brussels military hospital: lessons identified.

Viruses 11: 265.

Dowah A. S. A. und Clokie M. R. J. (2018):

Review of the nature, diversity and structure of bacteriophage receptor binding proteins that target gram-positive bacteria.

Biophysical Reviews 10: 535-542.

Drenkard E. (2003):

Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms.

Microbes and Infection 5: 1213-1219.

Du Toit A. (2017):

The language of phages.

Nature Reviews Microbiology 15: 135-135.

Duan Q., Zhou M., Zhu L. und Zhu G. (2013):

Flagella and bacterial pathogenicity.

Journal of Basic Microbiology 53: 1-8.

- Dufour N., Delattre R., Chevallereau A., Ricard J.-D. und Debarbieux L. (2019):
Phage therapy of pneumonia is not associated with an overstimulation of the inflammatory response compared to antibiotic treatment in mice.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 63: e00379-00319.
- Dufour N., Delattre R., Ricard J.-D. und Debarbieux L. (2017):
The lysis of pathogenic *Escherichia coli* by bacteriophages releases less endotoxin than by β -lactams.
Clinical Infectious Diseases 64: 1582-1588.
- Duplessis C., Biswas B., Hanisch B., Perkins M., Henry M., Quinones J., Wolfe D., Estrella L. und Hamilton T. (2018):
Refractory *Pseudomonas* bacteremia in a 2-year-old sterilized by bacteriophage therapy.
Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society 7: 253-256.
- Duplessis C., Warawa J. M., Lawrenz M. B., Henry M. und Biswas B. (2021):
Successful intratracheal treatment of phage and antibiotic combination therapy of a multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* murine model.
Antibiotics (Basel) 10: 946.
- Ellis E. L. und Delbrück M. (1939):
The growth of bacteriophage.
Journal of General Physiology 22: 365-384.
- Engeman E., Freyberger H. R., Corey B. W., Ward A. M., He Y., Nikolich M. P., Filippov A. A., Tyner S. D. und Jacobs A. C. (2021):
Synergistic killing and re-sensitization of *Pseudomonas aeruginosa* to antibiotics by phage-antibiotic combination treatment.
Pharmaceuticals (Basel) 14: 184.
- Eutamene H., Theodorou V., Schmidlin F., Tondereau V., Garcia-Villar R., Salvador-Cartier C., Chovet M., Bertrand C. und Bueno L. (2005):
LPS-induced lung inflammation is linked to increased epithelial permeability: role of MLCK.
European Respiratory Journal 25: 789-796.

Ferry T., Boucher F., Fevre C., Perpoint T., Chateau J., Petitjean C., Josse J., Chidiac C., L'hostis G. und Leboucher G. (2018a):

Innovations for the treatment of a complex bone and joint infection due to XDR *Pseudomonas aeruginosa* including local application of a selected cocktail of bacteriophages.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy 73: 2901-2903.

Ferry T., Leboucher G., Fevre C., Herry Y., Conrad A., Josse J., Batailler C., Chidiac C., Medina M. und Lustig S. (2018b):

Salvage debridement, antibiotics and implant retention ("DAIR") with local injection of a selected cocktail of bacteriophages: is it an option for an elderly patient with relapsing *Staphylococcus aureus* prosthetic-joint infection?

Open Forum Infectious Diseases, Oxford University Press US.

Fiorentin L., Vieira N. D. und Barioni Jr W. (2005):

Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella Enteritidis* PT4 in caecal contents of broilers.

Avian Pathology 34: 258-263.

Fischetti V. A. (2005):

Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives.

Trends in Microbiology 13: 491-496.

Fong S. A., Drilling A., Morales S., Cornet M. E., Woodworth B. A., Fokkens W. J., Psaltis A. J., Vreugde S. und Wormald P. J. (2017):

Activity of bacteriophages in removing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronic rhinosinusitis patients.

Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 7: 418.

Ganeshan K. und Chawla A. (2017):

Warming the mouse to model human diseases.

Nature Reviews Endocrinology 13: 458-465.

Garbe J., Wesche A., Bunk B., Kazmierczak M., Selezska K., Rohde C., Sikorski J., Rohde M., Jahn D. und Schobert M. (2010):

Characterization of JG024, a *Pseudomonas aeruginosa* PB1-like broad host range phage under simulated infection conditions.

BMC Microbiology 10: 301.

Garcia-Nuñez M., Marti S., Puig C., Perez-Brocal V., Millares L., Santos S., Ardanuy C., Moya A., Liñares J. und Monsó E. (2017):

Bronchial microbiome, PA biofilm-forming capacity and exacerbation in severe COPD patients colonized by *P. aeruginosa*.

Future Microbiology 12: 379-392.

Garen A. und Kozloff L. M. (1959):

The initiation of bacteriophage infection,.

The Viruses. W. M. Stanley. New York., F. M. Burnet. 2: 203-233.

Garen A. und Puck T. T. (1951):

The first two steps of the invasion of host cells by bacterial viruses. II.

The Journal of Experimental Medicine 94: 177.

Gastmeier P. und Geffers C. (2008):

Nosokomiale Infektionen in Deutschland: Wie viele gibt es wirklich?

Deutsche Medizinische Wochenschrift 133: 1111-1115.

Geffers C., Sohr D. und Gastmeier P. (2008):

Mortality attributable to hospital-acquired infections among surgical patients.

Infection Control and Hospital Epidemiology 29: 1167-1170.

Gellatly S. L. und Hancock R. E. (2013):

Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses.

Pathogens and Disease 67: 159-173.

Gill J., Pacan J., Carson M., Leslie K., Griffiths M. und Sabour P. (2006):

Efficacy and pharmacokinetics of bacteriophage therapy in treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in lactating dairy cattle.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy 50: 2912-2918.

Gilroy A. M., MacPherson B. R. und Ross L. M. (2008):

Atlas of anatomy.

Stuttgart, Thieme.

Gómez-Ochoa S. A., Pitton M., Valente L. G., Sosa Vesga C. D., Largo J., Quiroga-Centeno A. C., Hernández Vargas J. A., Trujillo-Cáceres S. J., Muka T., Cameron D. R. und Que Y. A. (2022):

Efficacy of phage therapy in preclinical models of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis.

Lancet Microbe 3: e956-e968.

Gordon C. J. (1993):

Temperature Regulation in Laboratory Rodents.

Cambridge, Cambridge University Press.

Guaní-Guerra E., Santos-Mendoza T., Lugo-Reyes S. O. und Terán L. M. (2010):

Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease.

Clinical Immunology 135: 1-11.

Gutbier B., Neuhaus A. K., Reppe K., Ehrler C., Santel A., Kaufmann J., Scholz M., Weissmann N., Morawietz L., Mitchell T. J., Aliberti S., Hippenstiel S., Suttorp N. und Witzernath M. (2018):

Prognostic and pathogenic role of angiotensin-1 and -2 in pneumonia.

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 198: 220-231.

Haiko J. und Westerlund-Wikström B. (2013):

The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence.

Biology 2: 1242-1267.

Harper D. R., Parracho H. M., Walker J., Sharp R., Hughes G., Werthén M., Lehman S. und Morales S. (2014):

Bacteriophages and biofilms.

Antibiotics 3: 270-284.

Hartl D., Tirouvanziam R., Laval J., Greene C. M., Habel D., Sharma L., Yildirim A., Dela Cruz C. S. und Hogaboam C. M. (2018):

Innate immunity of the lung: from basic mechanisms to translational medicine.

Journal of Innate Immunity 10: 487-501.

Hirsch E. B. und Tam V. H. (2010):

Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes.

Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research 10: 441-451.

Hisatomi K., Ishii H., Hashiguchi K., Seki M., Ide M., Sugiyama K., Ishimoto H., Nakayama S.,

Mukae H. und Kohno S. (2006):

Interstitial pneumonia caused by inhalation of fumes of nickel and chrome.

Respirology 11: 814-817.

Hocke A. C., Suttorp N. und Hippenstiel S. (2017):

Human lung ex vivo infection models.

Cell and Tissue Research 367: 511-524.

Hornischer K., Khaledi A., Pohl S., Schniederjans M., Pezoldt L., Casilag F.,

Muthukumarasamy U., Bruchmann S., Thöming J., Kordes A. und Häussler S. (2018):

BACTOME—a reference database to explore the sequence- and gene expression-variation landscape of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates.

Nucleic Acids Research 47: D716-D720.

Hraiech S., Brégeon F. und Rolain J.-M. (2015):

Bacteriophage-based therapy in cystic fibrosis-associated *Pseudomonas aeruginosa* infections: rationale and current status.

Drug Design, Development and Therapy 9: 3653.

Huff W., Huff G., Rath N., Balog J. und Donoghue A. (2003):

Evaluation of aerosol spray and intramuscular injection of bacteriophage to treat an *Escherichia coli* respiratory infection.

Poultry Science 82: 1108-1112.

Huff W., Huff G., Rath N., Balog J., Xie H., Moore Jr P. und Donoghue A. (2002):

Prevention of *Escherichia coli* respiratory infection in broiler chickens with bacteriophage (SPR02).

Poultry Science 81: 437-441.

- Huszczynski S. M., Lam J. S. und Khursigara C. M. (2019):
The role of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in bacterial pathogenesis and physiology.
Pathogens 9: 6.
- International Committee on Taxonomy of Viruses. (2021).
Virus taxonomy.
Retrieved 08.01.2023, from <https://ictv.global/taxonomy>.
- Irvin C. G. und Bates J. H. (2003):
Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size.
Respiratory Research 4: 4.
- Javanmardi F., Emami A., Pirbonyeh N., Keshavarzi A. und Rajaei M. (2019):
A systematic review and meta-analysis on exo-toxins prevalence in hospital acquired *Pseudomonas aeruginosa* isolates.
Infection, Genetics and Evolution 75: 104037.
- Jennes S., Merabishvili M., Soentjens P., Pang K. W., Rose T., Keersebilck E., Soete O., François P.-M., Teodorescu S., Verween G., Verbeken G., De Vos D. und Pirnay J.-P. (2017):
Use of bacteriophages in the treatment of colistin-only-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* septicaemia in a patient with acute kidney injury—a case report.
Critical Care 21: 129.
- Jeon J. und Yong D. (2019):
Two novel bacteriophages improve survival in galleria mellonella infection and mouse acute pneumonia models infected with extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*.
Applied and Environmental Microbiology 85: e02900-18.
- Jernigan J. A., Hatfield K. M., Wolford H., Nelson R. E., Olubajo B., Reddy S. C., McCarthy N., Paul P., McDonald L. C. und Kallen A. (2020):
Multidrug-resistant bacterial infections in US hospitalized patients, 2012–2017.
New England Journal of Medicine 382: 1309-1319.

- Johansen H. K., Moskowitz S. M., Ciofu O., Pressler T. und Høiby N. (2008):
Spread of colistin resistant non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* among chronically infected danish cystic fibrosis patients.
Journal of Cystic Fibrosis 7: 391-397.
- Jurado-Martín I., Sainz-Mejías M. und McClean S. (2021):
Pseudomonas aeruginosa: an audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors.
International Journal of Molecular Sciences 22: 3128.
- Kasman L. und Porter L. (2022, 26.09.2022).
Bacteriophages.
Retrieved 21.11.2022.
- Kerr K. G. und Snelling A. M. (2009):
Pseudomonas aeruginosa: a formidable and ever-present adversary.
Journal of Hospital Infection 73: 338-344.
- King J. D., Kocíncová D., Westman E. L. und Lam J. S. (2009):
Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*.
Innate immunity 15: 261-312.
- Kolb M., Margetts P. J., Anthony D. C., Pitossi F. und Gauldie J. (2001):
Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis.
The Journal of Clinical Investigation 107: 1529-1536.
- Kwiatek M., Parasion S., Rutyna P., Mizak L., Gryko R., Niemcewicz M., Olender A. und Lobočka M. (2017):
Isolation of bacteriophages and their application to control *Pseudomonas aeruginosa* in planktonic and biofilm models.
Research in Microbiology 168: 194-207.
- Labrie S. J., Samson J. E. und Moineau S. (2010):
Bacteriophage resistance mechanisms.
Nature Reviews Microbiology 8: 317-327.

- Lappalainen U., Whitsett J. A., Wert S. E., Tichelaar J. W. und Bry K. (2005):
Interleukin-1beta causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodeling in the adult murine lung.
American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 32: 311-318.
- Lee K. und Yoon S. S. (2017):
Pseudomonas aeruginosa biofilm, a programmed bacterial life for fitness.
Journal of Microbiology and Biotechnology 27: 1053-1064.
- Leung S. S. Y., Carrigy N. B., Vehring R., Finlay W. H., Morales S., Carter E. A., Britton W. J., Kutter E. und Chan H. K. (2019):
Jet nebulization of bacteriophages with different tail morphologies - structural effects.
International Journal of Pharmaceutics 554: 322-326.
- Lin D. M., Koskella B. und Lin H. C. (2017):
Phage therapy: an alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance.
World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics 8: 162-173.
- Lin Y., Quan D., Chang R. Y. K., Chow M. Y. T., Wang Y., Li M., Morales S., Britton W. J., Kutter E., Li J. und Chan H. K. (2021):
Synergistic activity of phage PEV20-ciprofloxacin combination powder formulation-a proof-of-principle study in a P. aeruginosa lung infection model.
European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 158: 166-171.
- Lin Y. W., Chang R. Y., Rao G. G., Jermain B., Han M. L., Zhao J. X., Chen K., Wang J. P., Barr J. J., Schooley R. T., Kutter E., Chan H. K. und Li J. (2020):
Pharmacokinetics/pharmacodynamics of antipseudomonal bacteriophage therapy in rats: a proof-of-concept study.
Clinical Microbiology and Infection 26: 1229-1235.
- Lister P. D., Wolter D. J. und Hanson N. D. (2009):
Antibacterial-resistant Pseudomonas aeruginosa: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms.
Clinical Microbiology Reviews 22: 582-610.

Liu P. V. (1974):

Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*.
The Journal of Infectious Diseases 130 Suppl: 94-99.

Loc-Carrillo C. und Abedon S. T. (2011):

Pros and cons of phage therapy.
Bacteriophage 1: 111-114.

Lopez-Castejon G. und Brough D. (2011):

Understanding the mechanism of IL-1 β secretion.
Cytokine & Growth Factor Reviews 22: 189-195.

Loponte R., Pagnini U., Iovane G. und Pisanelli G. (2021):

Phage therapy in veterinary medicine.
Antibiotics (Basel) 10: 421.

Lusiak-Szelachowska M., Zaczek M., Weber-Dabrowska B., Miedzybrodzki R., Klak M.,
Fortuna W., Letkiewicz S., Rogoz P., Szufnarowski K., Jonczyk-Matysiak E., Owczarek B. und
Gorski A. (2014):

Phage neutralization by sera of patients receiving phage therapy.
Viral Immunology 27: 295-304.

Mach B., Steimle V., Martinez-Soria E. und Reith W. (1996):

Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease.
Annual Review of Immunology 14: 301-331.

Magill S. S., Edwards J. R., Bamberg W., Beldavs Z. G., Dumyati G., Kainer M. A., Lynfield R.,
Maloney M., McAllister-Hollod L., Nadle J., Ray S. M., Thompson D. L., Wilson L. E. und Fridkin
S. K. (2014):

Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections.
The New England Journal of Medicine 370: 1198-1208.

Mann E. E. und Wozniak D. J. (2012):

Pseudomonas biofilm matrix composition and niche biology.
Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews 36: 893-916.

- Martínez-Gallardo M. J., Villicaña C., Yocupicio-Monroy M., Alcaraz-Estrada S. L. und León-Félix J. (2022):
Current knowledge in the use of bacteriophages to combat infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis.
Folia Microbiologica 68: 1-16.
- McGavin D. M. und Zachary J. F. (2009):
Pathologie der Haustiere : allgemeine, spezielle und funktionelle Veterinärpathologie
München, Urban & Fischer, Elsevier.
- McGrath S. und Sinderen D. v. (2007):
Bacteriophage: genetics and molecular biology.
Caister Academic Press.
- Menon N. D., Penziner S., Montaña E. T., Zurich R., Pride D. T., Nair B. G., Kumar G. B. und Nizet V. (2022):
Increased innate immune susceptibility in hyperpigmented bacteriophage-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 66: e0023922.
- Michalska M. und Wolf P. (2015):
Pseudomonas exotoxin A: optimized by evolution for effective killing.
Frontiers in Microbiology 6: 963.
- Middleton A. M., Keig P. und Wilson R. (2003):
In vitro models of infection I—human respiratory tissue organ culture.
Haemophilus influenzae Protocols. M. A. Herbert, D. W. Hood and E. R. Moxon. Totowa, NJ, Humana Press: 277-295.
- Mizgerd J. P. und Skerrett S. J. (2008):
Animal models of human pneumonia.
American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 294: L387-398.

Montor W. R., Huang J., Hu Y., Hainsworth E., Lynch S., Kronish J. W., Ordonez C. L., Logvinenko T., Lory S. und LaBaer J. (2009):
Genome-wide study of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein immunogenicity using self-assembling protein microarrays.
Infection and Immunity 77: 4877-4886.

Morello E., Sausseureau E., Maura D., Huerre M., Touqui L. und Debarbieux L. (2011):
Pulmonary bacteriophage therapy on *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strains: first steps towards treatment and prevention.
PLOS ONE 6: e16963.

Mukhopadhyay S., Hoidal J. R. und Mukherjee T. K. (2006):
Role of TNF α in pulmonary pathophysiology.
Respiratory Research 7: 125.

Mulcahy L. R., Burns J. L., Lory S. und Lewis K. (2010):
Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis.
Journal of Bacteriology 192: 6191-6199.

Mulcahy L. R., Isabella V. M. und Lewis K. (2014):
Pseudomonas aeruginosa biofilms in disease.
Microbial Ecology 68: 1-12.

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 T. C., Hoppe J., Suttorp N. und Witzenrath M. (2020):
Neutralizing complement C5a protects mice with pneumococcal pulmonary sepsis.
Anesthesiology 132: 795-807.

Munita J. M. und Arias C. A. (2016):
Mechanisms of antibiotic resistance.
Microbiology Spectrum 4: 10.

Murphy K. und Weaver C. (2018):

Die Dynamik der angeborenen und adaptiven Immunantwort.

Janeway Immunologie. K. Murphy and C. Weaver. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 581-639.

Musher D. M., Abers M. S. und Bartlett J. G. (2017):

Evolving understanding of the causes of pneumonia in adults, with special attention to the role of pneumococcus.

Clinical Infectious Diseases 65: 1736-1744.

Nathwani D., Raman G., Sulham K., Gavaghan M. und Menon V. (2014):

Clinical and economic consequences of hospital-acquired resistant and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a systematic review and meta-analysis.

Antimicrobial Resistance and Infection Control 3: 1-16.

Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen. (2011).

Deutsche Nationale Punkt-Prävalenzstudie zu nosokomialen Infektionen und Antibiotikaaanwendung. Abschlussbericht.

Retrieved 10.06.2022, from <https://www.nrz-hygiene.de/fileadmin/nrz/download/PPS-Abschlussbericht-Stand05-08-2013final.pdf>.

Nicod L. P. (2005):

Lung defences: an overview.

European Respiratory Review 14: 45-50.

Nikaido H. (2009):

Multidrug resistance in bacteria.

Annual Review of Biochemistry 78: 119-146.

Nobrega F. L., Costa A. R., Kluskens L. D. und Azeredo J. (2015):

Revisiting phage therapy: new applications for old resources.

Trends in Microbiology 23: 185-191.

Odumosu O., Nicholas D., Yano H. und Langridge W. (2010):

AB toxins: a paradigm switch from deadly to desirable.

Toxins (Basel) 2: 1612-1645.

Oesterlee U., Holt S. K., Schneitler S. und Randerath W. (2017):

Nosokomiale Pneumonie.

Thoraxchirurgie für den Allgemein- und Viszeralchirurgen: 233-242.

Pabary R., Singh C., Morales S., Bush A., Alshafi K., Bilton D., Alton E. W., Smithyman A. und Davies J. C. (2016):

Antipseudomonal bacteriophage reduces infective burden and inflammatory response in murine lung.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy 60: 744-751.

Palma E., Tilocca B. und Roncada P. (2020):

Antimicrobial resistance in veterinary medicine: an overview.

International Journal of Molecular Sciences 21: 1914.

Pang Z., Raudonis R., Glick B. R., Lin T. J. und Cheng Z. (2019):

Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies.

Biotechnology Advances 37: 177-192.

Parker C. M., Kutsogiannis J., Muscedere J., Cook D., Dodek P., Day A. G., Heyland D. K. und

Group C. C. C. T. (2008):

Ventilator-associated pneumonia caused by multidrug-resistant organisms or *Pseudomonas aeruginosa*: prevalence, incidence, risk factors, and outcomes.

Journal of Critical Care 23: 18-26.

Patwa A. und Shah A. (2015):

Anatomy and physiology of respiratory system relevant to anaesthesia.

Indian Journal of Anaesthesia 59: 533-541.

Pelfrene E., Willebrand E., Cavaleiro Sanches A., Sebris Z. und Cavaleri M. (2016):

Bacteriophage therapy: a regulatory perspective.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy 71: 2071-2074.

Pugashetti B. K., Metzger H. M., Vadas L. und Feingold D. S. (1982):

Phenotypic differences among clinically isolated mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains.

Journal of Clinical Microbiology 16: 686-691.

- Remans K., Vercammen K., Bodilis J. und Cornelis P. (2010):
Genome-wide analysis and literature-based survey of lipoproteins in *Pseudomonas aeruginosa*.
Microbiology (Reading) 156: 2597-2607.
- Ribatti D., Crivellato E. und Vacca A. (2006):
The contribution of Bruce Glick to the definition of the role played by the bursa of Fabricius in the development of the B cell lineage.
Clinical and Experimental Immunology 145: 1-4.
- Rink L., Kruse A. und Haase H. (2012):
Immunologie für Einsteiger. Springer.
- Roach D. R., Leung C. Y., Henry M., Morello E., Singh D., Di Santo J. P., Weitz J. S. und Debarbieux L. (2017):
Synergy between the host immune system and bacteriophage is essential for successful phage therapy against an acute respiratory pathogen.
Cell Host & Microbe 22: 38-47: e34.
- Römling U. und Balsalobre C. (2012):
Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies.
Journal of Internal Medicine 272: 541-561.
- Rumbaugh K. P., Griswold J. A. und Hamood A. N. (2000):
The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*.
Microbes and Infection 2: 1721-1731.
- Schmidt C. (2019):
Phage therapy's latest makeover.
Nature Biotechnology 37: 581-587.
- Schroder K., Hertzog P. J., Ravasi T. und Hume D. A. (2004):
Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions.
Journal of Leukocyte Biology 75: 163-189.

Selezska K., Kazmierczak M., Müsken M., Garbe J., Schobert M., Häussler S., Wiehlmann L., Rohde C. und Sikorski J. (2012):

Pseudomonas aeruginosa population structure revisited under environmental focus: impact of water quality and phage pressure.

Environmental Microbiology 14: 1952-1967.

Silhavy T. J., Kahne D. und Walker S. (2010):

The bacterial cell envelope.

Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2: a000414.

Sklar I. B. und Joerger R. D. (2001):

Attempts to utilize bacteriophage to combat *Salmonella Enterica* serovar *entemtidis* infection in chickens.

Journal of Food Safety 21: 15-29.

Smith H. W. und Huggins M. (1983):

Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs.

Microbiology 129: 2659-2675.

Sørensen M. C. H., van Alphen L. B., Harboe A., Li J., Christensen B. B., Szymanski C. M. und Brøndsted L. (2011):

Bacteriophage F336 recognizes the capsular phosphoramidate modification of *Campylobacter jejuni* NCTC11168.

Journal of Bacteriology 193: 6742-6749.

Stoodley P., DeBeer D. und Lewandowski Z. (1994):

Liquid flow in biofilm systems.

Applied and Environmental Microbiology 60: 2711-2716.

Strateva T. und Mitov I. (2011):

Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections.

Annals of Microbiology 61: 717-732.

Strathdee S. und Patterson T. (2019):

The perfect predator.

Hachette Books.

Subedi D., Vijay A. K., Kohli G. S., Rice S. A. und Willcox M. (2018):

Comparative genomics of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from different geographic sites.

Scientific Reports 8: 15668.

Sulakvelidze A., Alavidze Z. und Morris J. G., Jr. (2001):

Bacteriophage therapy.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45: 649-659.

Szymanski K. V., Toennies M., Becher A., Fatykhova D., N'Guessan P. D., Gutbier B., Klauschen F., Neuschaefer-Rube F., Schneider P., Rueckert J., Neudecker J., Bauer T. T., Dalhoff K., Drömann D., Gruber A. D., Kershaw O., Temmesfeld-Wollbrueck B., Suttorp N., Hippenstiel S. und Hocke A. C. (2012):

Streptococcus pneumoniae-induced regulation of cyclooxygenase-2 in human lung tissue.

European Respiratory Journal 40: 1458-1467.

Tacconelli E., Carrara E., Savoldi A., Harbarth S., Mendelson M., Monnet D. L., Pulcini C., Kahlmeter G., Kluytmans J. und Carmeli Y. (2018):

Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis.

The Lancet Infectious Diseases 18: 318-327.

Takemura-Uchiyama I., Uchiyama J., Osanai M., Morimoto N., Asagiri T., Ujihara T., Daibata M., Sugiura T. und Matsuzaki S. (2014):

Experimental phage therapy against lethal lung-derived septicemia caused by *Staphylococcus aureus* in mice.

Microbes and Infection 16: 512-517.

Taylor P. K., Yeung A. T. und Hancock R. E. (2014):

Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: towards the development of novel anti-biofilm therapies.

Journal of Biotechnology 191: 121-130.

Trinchieri G. (2003):

Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity.

Nature Reviews Immunology 3: 133-146.

Turner D., Kropinski A. M. und Adriaenssens E. M. (2021):

A roadmap for genome-based phage taxonomy.

Viruses 13: 506.

Twort F. W. (1915):

An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses.

The Lancet 186: 1241-1243.

Ullman-Culleré M. H. und Foltz C. J. (1999):

Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice.

Laboratory Animal Science 49: 319-323.

Underdown B. J. und Schiff J. M. (1986):

Immunoglobulin A: strategic defense initiative at the mucosal surface.

Annual Review of Immunology 4: 389-417.

Vaitekenas A., Tai A. S., Ramsay J. P., Stick S. M. und Kicic A. (2021):

Pseudomonas aeruginosa resistance to bacteriophages and its prevention by strategic therapeutic cocktail formulation.

Antibiotics (Basel) 10: 145.

Van Belleghem J. D., Dąbrowska K., Vaneechoutte M., Barr J. J. und Bollyky P. L. (2018):

Interactions between bacteriophage, bacteria, and the mammalian immune system.

Viruses 11: 10.

van Duin D. und Paterson D. L. (2020):

Multidrug-resistant bacteria in the community: an update.

Infectious Disease Clinics of North America 34: 709-722.

Van Regenmortel M. H. (1990):

Virus species, a much overlooked but essential concept in virus classification.

Intervirology 31: 241-254.

Ventola C. L. (2015):

The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats.

Pharmacy and Therapeutics 40: 277-283.

Wang X. und Quinn P. J. (2010):

Endotoxins: lipopolysaccharides of gram-negative bacteria.

Subcellular Biochemistry 53: 3-25.

Widdicombe J. (1995):

Relationships among the composition of mucus, epithelial lining liquid, and adhesion of microorganisms.

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 151: 2088-2092.

Wienhold S. M., Brack M. C., Nouailles G., Krishnamoorthy G., Korf I. H. E., Seitz C., Wienecke S., Dietert K., Gurtner C., Kershaw O., Gruber A. D., Ross A., Ziehr H., Rohde M., Neudecker J., Lienau J., Suttorp N., Hippenstiel S., Hocke A. C., Rohde C. und Witzenrath M. (2021):

Preclinical assessment of bacteriophage therapy against experimental acinetobacter baumannii lung Infection.

Viruses 14: 33.

Winstanley C., O'Brien S. und Brockhurst M. A. (2016):

Pseudomonas aeruginosa evolutionary adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections.

Trends in Microbiology 24: 327-337.

Wunderink R. G. und Waterer G. (2017):

Advances in the causes and management of community acquired pneumonia in adults.

The BMJ 358: j2471.

Yang D., Biragyn A., Kwak L. W. und Oppenheim J. J. (2002):

Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal.

Trends in Immunology 23: 291-296.

Yang X., Haque A., Matsuzaki S., Matsumoto T. und Nakamura S. (2021):

The efficacy of phage therapy in a murine model of Pseudomonas aeruginosa pneumonia and sepsis.

Frontiers in Microbiology 12: 682255.

Young R. (1992):

Bacteriophage lysis: mechanism and regulation.

Microbiological Reviews 56: 430-481.

Zhang J.-M. und An J. (2007):

Cytokines, inflammation, and pain.

International Anesthesiology Clinics 45: 27-37.

Zhang P., Summer W. R., Bagby G. J. und Nelson S. (2000):

Innate immunity and pulmonary host defense.

Immunological Reviews 173: 39-51.

Zhang Y., Meng B., Wei X., Li Y., Wang X., Zheng Y., Wang C., Cui L. und Zhao X. (2021):

Evaluation of phage therapy for pulmonary infection of mouse by liquid aerosol-exposure

Pseudomonas aeruginosa.

Infection and Drug Resistance 14: 4457-4469.

Vorab-Publikationen

Teile dieser Arbeit sind Bestandteil der Unterlagen zur Beantragung der klinischen Studie beim Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM; u. a. Briefing Book, Investigator´s Brochure, Study Protocol), die über das Clinical Trials Information System (CTIS) der EMA (European Medicines Agency) eingereicht und dort veröffentlicht werden.

Vortrag: Phage4Cure – *ex vivo* and *in vivo* efficacy testing of a phage cocktail against *Pseudomonas aeruginosa*

Markus C. Brack, Moritz Vollgraf, Geraldine Nouailles, Imke Korf, Sarah Wienecke, Antonia Dannheim, Holger Ziehr, Judith Bushe, Anne Voss, Achim D. Gruber, Andreas C. Hocke, Stefan Hippenstiel, Mario Tönnies, Jasmin Lienau, Manfred Rohde, Christine Rohde, Sandra-Maria Wienhold, Martin Witzernath

62. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. (DGP)
Leipzig, 25.05.2022 – 28.05.2022

Vortrag: Insights from the German study Phage4Cure

Markus C. Brack, Moritz Vollgraf, Geraldine Nouailles, Imke Korf, Sarah Wienecke, Antonia Dannheim, Holger Ziehr, Judith Bushe, Anne Voss, Achim D. Gruber, Andreas C. Hocke, Stefan Hippenstiel, Mario Tönnies, Jasmin Lienau, Manfred Rohde, Christine Rohde, Sandra-Maria Wienhold, Martin Witzernath

DZIF-Tagung „Bacteriophages in Science and Clinical Use – First Strategic DZIF Meeting to promote Translational Research in the Field of Bacteriophages“, Frankfurt am Main, 11.07.2022 – 12.07.2022

Poster: A phage cocktail against *Pseudomonas aeruginosa* lung infection: results from experimental studies

Markus C. Brack, Moritz Vollgraf, Geraldine Nouailles, Imke Korf, Sarah Wienecke, Antonia Dannheim, Holger Ziehr, Judith Bushe, Anne Voss, Achim D. Gruber, Andreas C. Hocke, Stefan Hippenstiel, Mario Toennies, Jasmin Lienau, Manfred Rohde, Christine Rohde, Sandra-Maria Wienhold, Martin Witzernath

ERS (European Respiratory Society) International Congress 2022, Barcelona, 04.09.2022 – 06.09.2022

Befangenheitserklärung/Interessenskonflikt

Im Rahmen dieser Arbeit bestehen keine Interessenskonflikte durch Zuwendungen Dritter.

Finanzierungsquellen

Das Dissertationsprojekt wurde im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Projektes „Phage4Cure“ durchgeführt (Förderkennzeichen: Phage4Cure 16GW0141, Projektleitung Martin Witzenrath) und durch ein Promotionsstipendium der Charité - Universitätsmedizin Berlin für Moritz Vollgraf unterstützt.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Martin Witzenthalm bedanken, der mir das Thema und die notwendige Infrastruktur zur Verfügung gestellt hat und mich mit hervorragender wissenschaftlicher Beratung und Förderung unterstützt hat.

Ich möchte auch Herrn Univ.-Prof. Dr. Achim Gruber für seine Unterstützung und wissenschaftliche Förderung danken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Sandra-Maria Wienhold für die Einarbeitung, die hervorragende Betreuung und die enorme Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Doktorarbeit. Von der Planung und Durchführung der Experimente bis zur Durchsicht dieser Dissertation hat sie mich stets begleitet und geleitet. Auch Markus Brack möchte ich für die nahtlose Übernahme meiner Betreuung, der singenden Nacharbeit und der stets helfenden Hand danken.

Mein weiterer Dank gilt Dr. Birgitt Gutbier für ihre veterinärmedizinische Expertise und Beratung bei jeglichen aufkommenden Fragen und den technischen Assistentinnen Silke Dusatko, Ulrike Behrendt und Denise Barthel für ihre Hilfe im gesamten Laboralltag. Ganz besonders möchte ich mich dabei bei Silke Dusatko für die ständige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente bedanken.

Auch möchte ich meinen Dank an Judith Bushe und Anne Voss für ihre Unterstützung bei der Herstellung und für die Beurteilung der histologischen Präparate im Rahmen dieser Arbeit aussprechen.

Ebenfalls gilt mein Dank Prof. Dr. Andreas Hocke, Dr. Diana Fatykhova und Katharina Hellwig für die Bereitstellung der humanen Lungenproben.

Des Weiteren möchte ich dem gesamten Phage4Cure-Team Danke sagen, ohne die mein Dissertationsprojekt nicht möglich gewesen wäre.

Großer Dank gilt allen Doktoranden, die mich auf dem Weg begleitet haben, durch sie ist die Zeit der Doktorarbeit fast wie ein zweites Mal studieren geworden. Besonders möchte ich dabei Magdalena Bürkle für die großartige Zusammenarbeit im Team Phage und Jo Bagli für die Unterstützung am Wochenende danken.

Meiner Familie, insbesondere Günter, Heike, Mimi und Merle, meinen Freunden und Angelique Wolter danke ich ganz besonders, da sie mich stets unterstützt und ermutigt haben.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

San Cristóbal de las Casas, den 22.05.2024

Moritz Vollgraf



9 783967 292541

mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-254-1