Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Therapie der murinen Pneumokokken-Pneumonie mit lytischem Bakteriophagenenzym Cpl-1

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jan-Moritz Doehn

aus Hamburg

Datum der Promotion: 22.06.2014

INHALSVERZEICHNIS

1 ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY 6
1.1 Zusammenfassung 6
1.2 Summary 9
2 EINLEITUNG 12
2.1 Die Lunge 12
2.2 Pulmonale Immunmechanismen 13
2.3 Die ambulant erworbene Pneumonie des Menschen 14
2.4 Streptococcus pneumoniae 18
2.5 Bakteriophagen 23
2.6 Phagenlysin Cpl-1 25
3 FRAGESTELLUNG 31
4 MATERIAL UND METHODEN 33
4.1 Versuchstiere 33
4.2 Bakterien 33
4.3 Cpl-1 33
4.4 Material 34
4.5 Methoden 37
4.5.1 Tierhaltung 37
4.5.2 Cpl-1 Applikation 37
4.5.3 Anzucht von Streptococcus pneumoniae 40
4.5.4 *In-vivo* Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* 42
4.6 Invasive Messverfahren 43
4.6.1 Lungenfunktionsmessung 43
4.6.2 Ermittlung des mittleren arteriellen Blutdrucks 44
4.6.3 Bronchoalveoläre Lavage (BAL) 45
4.7 Approximative Sterblichkeitsanalyse 45
4.8 Multiplex-Analyse der Zytokinproteinexpression 46
4.9 Bestimmung der Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten 48
4.10 Paraffinfixierung und Hämatoxylin/Eosin-Färbung 49

4.11 Statistische Datenanalyse 50

5 ERGEBNISSE 52

5.1 Die intraperitoneale Behandlung mit Cpl-1, Amoxicillin oder einer Kombinationstherapie aus beiden Substanzen verringerte die Bakterienlast im Lungengewebe 52

5.2 Die intraperitoneale Behandlung mit Cpl-1, Amoxicillin oder der Kombinationstherapie verhinderte die Translokation von Bakterien ins Blut 53

5.3 Die intraperitoneale Applikation von Cpl-1 reduzierte die Einschränkung des pulmonalen Gasaustausches im Verlauf einer Pneumokokken-Pneumonie 55

5.4 Die intraperitoneale Behandlung mit Cpl-1 reduzierte den Abfall der dynamischen Lungencompliance im Verlauf einer Streptokokken-Pneumonie 57

5.5 Die intraperitoneale Behandlung mit Cpl-1 führte zu einem Rückgang der Entzündungsreaktion im Lungengewebe 58

5.6 Die intraperitoneale Behandlung mit Cpl-1 verhinderte einen septischen Verlauf der Pneumokokken-Pneumonie 61

5.7 Nach intraperitonealer Behandlung mit Cpl-1 zeigte sich weder systemisch noch pulmonal eine erhöhte inflammatorische Reaktion 63

5.8 Einfluss der Cpl-1 bzw. Amoxicillin Gabe auf die Körpermasse und Körpertemperatur der Tiere während der Pneumokokken-Pneumonie 68

5.9 Die intraperitoneale Behandlung mit Cpl-1 oder Amoxicillin reduzierte die Sterblichkeit in Abhängigkeit vom Therapiebeginn 70

5.10 Die intratracheale Behandlung mit Cpl-1 reduzierte die Erregerlast im Lungengewebe 71

5.11 Die intratracheale Behandlung mit Cpl-1 reduzierte die Translokation von Bakterien in Blut und Milz 72

5.12 Die histologische Untersuchung zeigte einen Rückgang der Pneumonie in der mit Cpl-1 behandelten Gruppe 73

5.13 Nach intratrachealer Behandlung mit Cpl-1 zeigte sich keine pulmonale erhöhte inflammatorische Reaktion 76

5.14 Einfluss der intratrachealen Behandlung mit Cpl-1 auf Körpermasse und Körpertemperatur während der Pneumokokkenpneumonie 78

5.15 Die intratracheale Cpl-1-Behandlung reduzierte die Sterblichkeit bei der murinen Pneumokokken-Pneumonie 79

6 DISKUSSION 81

6.1 Intraperitoneal appliziertes Cpl-1 wirkt im Mausmodell einer letalen Pneumokokken-Pneumonie entgegen und ist Amoxicillin nicht unterlegen 83

6.2 Cpl-1 ist der Amoxicillin-Behandlung auch bei verzögerter Applikation 48 Stunden nach Infektion nicht unterlegen 86

6.3 Cpl-1 verringert die Bakterienlast im Lungengewebe bei schwerer Pneumokokken-Pneumonie 87

6.4 Cpl-1 und Amoxicillin haben *in-vivo* einen synergistischen Effekt 88

6.5 Die Behandlung mit Cpl-1 reduziert die pulmonale, funktionelle Beeinträchtigung während der schweren Pneumokokken-Pneumonie 90

6.6 Die intraperitoneale Behandlung mit Cpl-1 wirkt dem septischen Verlauf der Pneumokokken-Pneumonie entgegen 91

6.7 Nach der Applikation von Cpl-1 kommt es zu keinem Zytokinsturm im Verlauf der murinen Pneumokokken-Pneumonie 93

6.8 Die intratracheale Applikation von Cpl-1 ermöglicht eine Reduktion der Gesamtdosis bei gleich bleibend hoher Effektivität 95

6.9 Ausblick 96

7 LITERATURVERZEICHNIS 103

8 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG 123

9 LEBENSLAUF 126

10 PUBLIKATIONEN 127

11 DANKSAGUNG 129

12 ANHANG 131

12.1 Abkürzungsverzeichnis 131

12.2 Tabellenverzeichnis 134

12.3 Abbildungsverzeichnis 134

1 Zusammenfassung / Summary

1.1 Zusammenfassung

HINTERGRUND: Die ambulant erworbene Pneumonie (*community-acquired pneumonia,* CAP) ist eine der am häufigsten registrierten Infektionskrankheiten weltweit. Sie hat eine Inzidenz von ca. 1% und zeigt eine hohe Morbidität und Mortalität. Der mit Abstand häufigste Erreger der CAP ist *S.pneumoniae*. In den letzten Jahren nahmen die Resistenzraten von *S. pneumoniae* gegenüber verfügbaren Antibiotika deutlich zu, wodurch die Notwendigkeit stieg, alternative Therapiestrategien zu untersuchen. Das kürzlich isolierte und aufgereinigte Bakteriophagenenzym Cpl-1 lysiert *S. pneumoniae* schnell und hoch spezifisch. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des therapeutischen Potenzials von Cpl-1 bei der schweren Pneumokokkenpneumonie.

METHODEN: C57Bl/6 Mäuse wurden transnasal mit *S. pneumoniae* infiziert. 24 Stunden nach der Infektion erfolgten entweder insgesamt sechs intraperitoneale (i.p.) Injektionen von Cpl-1 im Abstand von jeweils 12 Stunden oder eine einmalige intratracheale Applikation von Cpl-1.

ERGEBNISSE: Zum Zeitpunkt des Therapiebeginns 24 Stunden nach Infektion zeigten die Tiere gemessen am klinischen Erscheinungsbild (Gewichtsverlust, erhöhte Atemarbeit), an der Lungencompliance, an der paO_2/FiO_2-Ratio, dem Zytokinprofil und den morphologischen Veränderungen der Lungen das Bild einer schweren Pneumokokken-Pneumonie. Die i.p. Applikation von Cpl-1 führte zu einer deutlichen Reduktion der pulmonalen Bakterienlast und verhinderte die Ausbildung einer Bakteriämie, sowie einer systemischen Hypotonie. Bei Penicillin-sensiblen Pneumokokken zeigte Cpl-1 eine vergleichbare anti-mikrobielle Wirksamkeit wie Amoxicillin. Nebenwirkungen oder allergische Reaktionen wurden nach der repetitiven Gabe von Cpl-1 nicht beobachtet. Die mit Cpl-1 behandelten Mäuse überlebten eine sonst tödlich verlaufende Pneumonie und erholten sich rasch. Die Lyse der Bakterien durch Cpl-1 verursachte *in-vivo* keine messbar erhöhte pro-inflammatorische Reaktion.

Hierauf aufbauend wurde das therapeutische Potential einer einmaligen intratrachealen (i.t.) Applikation von Cpl-1 untersucht. Auch durch einmalige i.t. Applikation von Cpl-1 wurde die Bakterienlast im Lungengewebe deutlich reduziert und eine Bakteriämie weitgehend verhindert. Die meisten Cpl-1 behandelten Tiere erholten sich rasch, und es

kam in der Folge zu einer von 0% auf 80% erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit im Vergleich zur Placebo-therapierten Kontrollgruppe. Im Gegensatz zur systemischen Cpl-1 Applikation verursachte die lokale Cpl-1 Gabe bei Pneumonie eine Erhöhung der pulmonalen Inflammation. Bei der einmaligen i.t. Applikation konnte die Gesamtdosis von Cpl-1 gegenüber der repetitiven intraperitonealen Applikation deutlich reduziert werden.

SCHLUSSFOLGERUNG: Die Applikation des lytischen Bakteriophagenenzyms Cpl-1 könnte eine neue, vielversprechende Option für die Behandlung der Pneumokokken-Pneumonie darstellen.

1.2 Summary

OBJECTIVES: Community-acquired pneumonia is a potentially life-threatening infectious disease with significant morbidity and mortality. *Streptococcus pneumoniae* is a facultative pathogenic microorganism of the human respiratory tract and the most prevalent cause of community-acquired pneumonia. Despite of the availability of antibiotics and pneumococcal vaccines, the mortality caused by *S. pneumoniae* remains high. Therefore, there is high medical need for alternative treatment strategies. In this context, the use of purified bacteriophage endolysins has been proposed. Endolysins are enzymes which are produced in phage-infected bacterial cells. Interestingly, endolysins are capable of lysing the bacterial cell wall from inside as well as externally (as purified recombinant proteins). This unique capacity makes endolysins potential antibacterial agents. The recently purified bacteriophage endolysin Cpl-1 rapidly and specifically kills pneumococci on contact. Neither resistance nor side effects have been observed after application of Cpl-1 in different animal models of infectious diseases. Therefore, the aim of this study was to determine the therapeutic potential of Cpl-1 in a mouse model of severe pneumococcal pneumonia.

METHODS: Female C57Bl/6 mice were transnasally infected with pneumococci. When severe pneumonia was established 24h after infection, mice were treated repeatedly with intraperitoneal injections of Cpl-1 or amoxicillin. In a second approach, Cpl-1 was applied once as an aerosolized agent.

RESULTS: Judged from clinical appearance, decreased body weight and morphologic changes in the lungs, mice suffered from severe pneumonia at the onset of therapy. Intraperitoneal Cpl-1 injections efficiently reduced pulmonary bacterial counts, averted bacteremia, and led to rapid resolution of pulmonary inflammation. Further, systemic Cpl-1 application prevented reduction of dynamic lung compliance and Pao2/Fio2 ratio, systemic hypotension, lactate increase and inflammatory response, as determined by multiplex cytokine assay, in the course of pneumonia. Cpl-1 treatment led to a highly significant reduction in mortality compared to controls. Notably, treatment of pneumonia due to penicillin-susceptible *S. pneumoniae* with Cpl-1 or amoxicillin was comparably effective.

Moreover, not only repeated intraperitoneal applications, but also a single therapeutic application of aerosolised Cpl-1 via the airways given 24 hours after infection was sufficient to rescue mice from fatal pneumococcal pneumonia. Lung bacterial load was

reduced and bacteremia was almost completely omitted. Most mice treated with i.t. Cpl-1 recovered rapidly, and survival increased from 0% to 80% as compared to placebo treated mice. In contrast to systemic Cpl-1, i.t. Cpl-1 application increased local pulmonary inflammation. The Cpl-1 dose applied could be reduced relevantly by using a single i.t. treatment protocol as compared to repetitive i.p. application.

CONCLUSIONS: Administration of Cpl-1 may offer a new therapeutic perspective for the treatment of pneumococcal lung infection.

2 Einleitung

2.1 Die Lunge

Die Lunge liegt im Thorax beidseits des Mediastinums in einer serösen Pleurahöhle (1) (2). Die Lungenatmung dient dem Austausch von Sauerstoff (O_2) und Kohlenstoffdioxid (CO_2) zwischen dem Organismus und der Umwelt. Sie ist auch an der Regulation des Säure-Basen-Haushaltes des Organismus beteiligt (1). Für den Gasaustausch verfügt die Lunge über ein sich fein verzweigendes System von luftleitenden und gasaustauschenden Atemwegen und Lungengefäßen. Ausgehend von der Trachea verzweigt sich der Bronchialbaum in intrapulmonale Bronchien, *Bronchiolen*, *Bronchioli terminales* und schließlich in *Bronchioli respiratorii*. Die *Bronchioli respiratorii* enden über die Alveolargänge (*Ductus alveolares*) in den Alveolen (*Saccus alveolaris*) und dienen als Verbindungsstück von luftleitenden und gasaustauschenden Teilen der Lunge. Sie werden von einem feinen Kapillarnetz aus Gefäßen der *A. pulmonalis* und *V. pulmonalis* umgeben (2). Das Alveolarepithel setzt sich zu 95% aus Pneumozyten Typ I- und zu 5% aus Typ II-Zellen zusammen (3). Die Pneumozyten Typ II sind u.a. Produzenten von Surfactantproteinen und Stammzellen der Typ I-Zellen (4). Benachbarte Alveolen sind über eine dünne Wand, das *Septum interalveolare*, welches sich aus Bindegewebe und Kapillaren zusammensetzt, verbunden. Der Gasaustausch findet durch Diffusion an der Blut-Luft-Schranke zwischen Alveolarluft und Kapillarblut statt. Die Blut-Luft-Schranke ist 0,3-0,7 µm breit und wird aus dem Alveolarepithel, dem Kapillarendothel und den miteinander verbundenen Basalmembranen gebildet (2). Die Kapazität des Gasaustausches wird wesentlich durch die Breite der Diffusionsstrecke, der Differenz zwischen den Partialdrücken der Gase in Blut und Alveolarluft und der zur Verfügung stehenden Größe der Austauschfläche bestimmt (5). Die apikale Fläche der Alveolen bildet zusammengefasst die größte epitheliale Oberfläche des menschlichen Körpers (1).

Diese Oberfläche muss sich ständig mit eindringenden anorganischen wie auch organischen Luftpartikeln (beispielsweise Bakterien) auseinander setzen(7). In der Lunge findet sich deshalb ein komplexes Abwehrsystem aus anatomischen, mechanischen und immunologischen Barrieren (6). Am zellulären immunologischen

Schutz der Lunge sind verschiedene pulmonale ständige Zellpopulationen wie Alveolarmakrophagen, dendritische Zellen, Epithelzellen und Fibroblasten (8), sowie einwandernde polymorphonukleäre Leukozyten, Monozyten und Lymphozyten beteiligt (9). Werden die Schutzmechanismen der Lunge durchbrochen, kann eine funktionelle Beeinträchtigung resultieren (8).

2.2 Pulmonale Immunmechanismen

Die frühe pulmonale Immunantwort ist für die Abwehr von eindringenden Partikeln und die Balance der Entzündungsreaktion essentiell (10).

In die Atemwege eindringende Pathogene können von Immunzellen anhand von Pathogen spezifischen Strukturen, „*pathogen associated molecular patterns*“ (PAMPs) als wirtsfremd erkannt werden (9). Dabei erfolgt die frühe Immunreaktion auf Pathogene auch durch Stimulierung verschiedener, evolutionär konservierter „*pattern recognition receptors*“ (PRRs). Zu den PRRs gehören intrazelluläre Proteine wie RIG-I-ähnliche Proteine (RLRs) oder *NOD-like receptors* und Oberflächen-ständige Rezeptoren wie die bei Säugern zwölf Mitglieder zählende Familie der „*Toll-like*“-Rezeptoren (TLRs) (11), auf die im Folgenden näher eingegangen wird. TLRs erkennen unterschiedliche Bakterienbestandteile. Von *S. pneumoniae* wird beispielweise Peptidoglykan (PG) und Teichonsäure (in Interaktion mit CD14) überTLR-2 (12) (13), nicht methylierte CpGs (als Bestandteile der bakteriellen Desoxyribonukleinsäure) über TLR-9(14) und Pneumolysin (möglicherweise) über TLR-4 erkannt (15) (16).

Durch die Aktivierung von TLRs werden komplexe intrazelluläre Signalkaskaden in Gang gesetzt, die über Adaptermoleküle wie „*myeloid differentiation primary-response protein 88*“ (MyD88) zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führen (16) (17). Ein zentraler pro-inflammatorischer Transkriptionsfaktor ist der „*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*“(NF-κB). Gemeinsame Endstrecke der Signalkaskaden zur Aktivierung dieses Faktors ist der IκBα-Kinase-Komplex (IKK), der zur Phosphorylierung von inhibitorischen κB-Proteinen (IκBα) und damit zur Freisetzung von NF-κB führt (11). NF-κB reguliert die Transkription verschiedener Gene, die u.a. für Mediatoren, die an der Regulation der Immunantwort beteiligt sind, kodieren. Zu diesen Mediatoren gehören Zytokine. Zur Familie der Zytokine werden über 100 Proteine und Polypeptide, die von verschiedenen Zelltypen synthetisiert werden, gezählt (17). Frühe inflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL)-1, IL-6 und Tumor-Nekrose-Faktor α

(TNFα) führen u.a. zur Immunzellrekrutierung, die wiederum durch die Bildung von chemotaktischen Botenstoffen weitere Zellpopulationen wie polymorphonukleare Leukozyten zum Infektionsort leiten (10) (18). Zu diesen Signalproteinen gehören Chemokine, die anhand unterschiedlicher Cysteinreste am Amino-Terminus klassifiziert werden (17). Die intakte Immunantwort ist von essentieller Bedeutung zur Eindämmung der bakteriellen Infektion (19). Gleichzeitig kann eine andauernde und unkontrollierte Immunantwort aber auch zu einer pulmonalen Gewebsschädigung führen (9).
Nachfolgend soll auf die Pneumonie als mögliche Folge eines Versagens der pulmonalen Schutzbarriere eingegangen werden.

2.3 Die ambulant erworbene Pneumonie des Menschen

Eine Pneumonie wird als ambulant erworbene Pneumonie (*engl.*:*community-acquired pneumonia* [CAP]) klassifiziert, wenn die Infektion ambulant, d. h. im privaten oder beruflichen Umfeld erworben wurde (20).

Epidemiologie und Ätiologie der ambulant erworbenen Pneumonie

Die ambulant erworbene Pneumonie (*community acquired pneumonia; CAP*) ist die häufigste Infektionskrankheit weltweit (21). Sie ist mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden (22) (23). Tiefe Atemwegsinfektionen (*lower respiratory tract infections; LRTI*) einschließlich der CAP stehen an vierter Stelle der häufigsten Todesursachen weltweit und stellen mit 1,8 Millionen Opfern jährlich die häufigste Todesursache bei Kindern unter fünf Jahren in Entwicklungsländern dar (24).
Die Sterblichkeit der CAP ist bei ambulant behandelten Patienten gering (<2%), liegt jedoch bei stationär behandelten Patienten in Deutschland bei 14% (25) und bei intensivmedizinisch behandelten Patienten bei bis zu 50% (26). In Deutschland beträgt die Inzidenz der CAP zwischen 3,7-10,1 pro 1000 Einwohner und entspricht somit ca. 400.000- 680.000 Behandlungsfällen pro Jahr (25) (27). Eine stationäre Versorgung ist bei 20% und eine intensivmedizinische Behandlung bei 2% der CAP-Patienten erforderlich (25).
Zu befürchten ist, dass die Inzidenz der ambulant erworbenen Pneumonie zukünftig weiter steigen wird. Wesentliche Gründe sind die Zunahme von prädisponierenden

Krankheiten, der ansteigende Anteil sowohl älterer Menschen als auch solcher Patienten mit Immunschwächekrankheiten bzw. immunsuppressiver Therapie (28).
Die Ätiologie der CAP wird von vielen Faktoren beeinflusst und selbst unter Studienbedingungen gelingt nur in maximal 60% der Fälle eine definitive Erregerbestimmung (20). *Streptococcus pneumoniae* (in ca. 30 – 50% aller Fälle) wird als häufigster nachgewiesener Erreger der CAP beschrieben. Weitere, verbreitete Pathogene der CAP sind *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* (jeweils ca. 10%) und *Legionella pneumophila* (ca. 3 – 5%). Die Bedeutung von Viren (vor allem Influenza A/B) als CAP-Erreger ist nicht endgültig geklärt (29) (20).

Therapie und Prävention der ambulant erworbenen Pneumonie

Die initiale Therapie der CAP erfolgt in der Regel empirisch unter Einbeziehung spezifischer Risikofaktoren und demographischer, epidemiologischer sowie klinischer Konstellationen (30). Zur Stratifikation des Schweregrades der CAP können klinische Scores dienen, wie z.B. der CRB-65 Score (C = Bewusstseinstrübung (*Confusion*); R = Atemfrequenz (*Respiratory rate*) ≥ 30/min; B = systolischer Blutdruck (*Blood pressure*) <90 mmHg systolisch bzw. <60 mmHg diastolisch; Alter ≥ 65 Jahre) (31).
Für die Therapie der CAP bei Patienten mit niedrigem Risikowert sind gemäß der deutschen Leitlinie zur Behandlung der ambulant erworbenen Pneumonie Amoxicillin / Clavulansäure oder Sultamicillin Mittel der ersten Wahl. Alternativ können respiratorisch wirksame Fluorchinolone wie Moxifloxacin oder Levofloxacin gegeben werden (30). Die Therapiedauer sollte bis zu 7-10 Tage betragen (30).
Gefährdeten Personen empfiehlt die ständige Impfkommission am Robert Koch Institut (STIKO) die Influenza- und Pneumokokken-Impfung (20). Zur Prävention von invasiven Pneumokokken-Infektionen steht ein 23-valenter Polysaccharidimpfstoff (Peumovax®23) zur Verfügung. Die Wirksamkeit der Impfung von Erwachsenen ist allerdings umstritten. Eine Metaanalyse von *Huss* et al. konnte zeigen, dass die Impfung die Inzidenz der Pneumokokken-Bakteriämie zwar reduziert (OR 0,26) (32), es gibt jedoch keine Evidenz für die klinische Effektivität gegen Pneumonien. Darüber hinaus ist die Immunogenität nach der Impfung bei Patienten mit Komorbiditäten und Immunsuppression abgeschwächt (33). Anders sieht es bei der präventiven Impfung von Kindern mit einem Protein-Polysaccharid-Konjugatimpfstoff (Synflorix-10® bzw. Prevenar-13®) aus. Große prospektive Studien belegen den Erfolg von

Konjugatimpfstoffen gegen Pneumokokken-Infektionen (34). In Ländern mit routinemäßiger Impfung von Kleinkindern wurde ein Rückgang invasiver Pneumokokken-Infektionen bei Kindern um bis zu 75% verzeichnet, und bei nicht geimpften Erwachsenen um etwa 29% (Herdprotektionseffekt) (34) (35). Gleichzeitig wurde allerdings die Selektion von nicht im Impfschema abgedeckten Serotypen beobachtet (36). Klinische Studien verzeichnen, dass es mit zunehmender Impfung bei Kindern einen Wechsel in der Häufigkeit der Serotypen bei invasiven Erkrankungen gibt (z.B. Serotyp 19A) (36–38). Dieses „*Replacement*“-Phänomen könnte die Impferfolge zukünftig reduzieren (38).

Im Rahmen von Influenza-Erkrankungen kommt es gehäuft zu Sekundärinfektionen mit Pneumokokken. Die STIKO empfiehlt für den Kreis der gefährdeten Personen zusätzlich zur Pneumokokken-Impfung eine saisonale Influenza-Impfung. Studien belegen den Rückgang der Sekundärinfektionen mit Pneumokokken nach Influenza-Impfung eindrücklich (39).

Die Kosten zur Behandlung der CAP sind hoch. Schätzungen zufolge betragen die jährlich entstehenden Belastungen in den USA mehr als zehn Milliarden Dollar alleine in der Gruppe der 18 – 64 jährigen Bevölkerung (40). Damit stellt die CAP einen bedeutenden sozioökonomischen Faktor für das Gesundheitssystem dar.

Die Pneumokokken-Pneumonie

Streptococcus pneumoniae (S. pneumoniae) ist der häufigste Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie (9) (25).

Im Nasopharynx des Menschen gehören Pneumokokken zur transienten Standortflora. Die Erreger werden durch Tröpfcheninfektion beim Husten, Niesen oder Sprechen von kolonisierten Personen übertragen. Man geht davon aus, dass etwa 5% der Erwachsenen und ca. 50% der Kinder mit *S. pneumoniae* kolonisiert sind (41). Eine Kolonisation kann Wochen bis Monate andauern, führt allerdings nur selten zur Ausbildung einer Infektion (42).

Kommt es zur Ausbreitung des Erregers, kann dies in unterschiedlichen klinischen Manifestationen resultieren. So ist *S. pneumoniae* auch der häufigste Erreger der eitrigen Meningitis (43). Typisch, aber oft weniger gravierend sind außerdem Pneumokokken-Infektionen der Nasennebenhöhlen, Mittelohren und Bronchien (23). Infektionen der Lunge sind durch respiratorische Symptome (Husten, purulenter

Auswurf, Dyspnoe, Tachypnoe), Fieber, Zyanose sowie Pleuraschmerzen gekennzeichnet (20). Stark ausgeprägte Symptome findet man häufiger bei jüngeren als bei älteren Patienten (20).
Die pathogene Wirkung des Erregers hängt neben der Virulenz des Stammes auch von dem Immunstatus des Wirts ab (44). Obwohl eine Pneumokokken-Infektion in jedem Alter auftreten kann, sind ältere Menschen (> 65. Lebensjahr) und Kinder (< 2. Lebensjahr) überproportional häufig betroffen (45). Ein erhöhtes Risiko besteht ferner bei HIV-Infektionen (46), neurologischen Erkrankungen (Schlaganfall, Epilepsie, Demenz), chronisch-obstruktiver Bronchitis (COPD) und Lungenemphysem, Lebererkrankungen (Zirrhose und Hepatitis), Diabetes mellitus, Asplenie (*overwhelming pneumococcal sepsis syndrom*), Alkoholismus (45) und Nikotinabusus (44). Defizite im Komplementsystem erhöhen ebenfalls das Risiko für Pneumokokken-Infektion (47).

Eine weitere Manifestation der Infektion mit *S. pneumoniae* ist die Bakteriämie. Sie gilt als Komplikation einer schweren Pneumokokken-Pneumonie, kann aber auch isoliert auftreten und wird dann als primäre Bakteriämie bezeichnet. Die Pneumokokken-Pneumonie verläuft in 20 – 30 % bakteriämisch und hat eine Mortalität von bis zu 20%(48) (49). Eine Sepsis liegt vor, wenn aus physiologisch sterilen Kompartimenten Erreger isoliert wurden oder eine Infektion klinisch vermutet wird und die Infektion zu einem „*systemic Inflammatory Response Syndrome*“ (SIRS), das anhand von mindestens zwei der folgenden Kriterien nachgewiesen wurde, führt: Hypo- oder Hyperthermie, Tachykardie, Tachypnoe und Leukozytose oder Leukopenie (50). Die Definition der schweren Sepsis ist an das Vorliegen von Organdysfunktionen geknüpft (schwere Sepsis = Infektion + SIRS + Organdysfunktionen). Der septische Schock ist definiert als Sepsis plus eine therapieresistente Hypotension oder Hypoperfusion trotz adäquater Flüssigkeitstherapie (51). Die Sterblichkeit durch septisches Lungenversagen blieb in den letzten beiden Jahrzehnten unverändert zwischen 35% und 45% (52). Als prognostisch günstiger Faktor gilt die rasche Sanierung des septischen Fokus (53) (54).

Bei etwa 30% der Sepsis-Patienten kommt es zur Ausbildung eines „*acute respiratory distress syndrome*“ (ARDS) (5). Dies ist eine lebensbedrohliche Manifestation der akuten Lungenschädigung unterschiedlicher Ätiologie. Bei einem Drittel der Patienten wird die Lungenschädigung durch eine Pneumonie verursacht (55).

Die seit 2011 gültige „Berliner Definition“ des ARDS unterscheidet anhand des Oxygenierungs-Quotient (Horovitz-Quotient) zwischen drei Ausprägungsgraden (mild, moderat und schwer) des ARDS (56). Histopathologisch findet sich in der akuten Phase der bakteriell bedingten Lungenparenchymschädigung ein diffuses neutrophiles Infiltrat der Alveolen, zunächst als Zeichen einer kapillären Durchlässigkeit mit erhöhter Permeabilität an alveolokapillären Membranen, und ein konsekutiv proteinreiches Ödem im Alveolarraum (19). Gleichzeitig kommt es auf molekularer Ebene zur Ausschüttung von Zytokinen/Chemokinen, oxidativem Stress und zur Freisetzung von Proteasen und in der Folge, mit bedingt durch den Abbau des Surfactantproteins, zur Atelektasenbildung (19). Die diffuse Atelektasen- sowie Lungeninfiltratbildung führt zu einer verminderten Compliance (68). Die Blutgasanalyse zeigt in Folge der Ventilations- und Perfusionsstörung an den alveolären Kapillaren eine Hypoxämie und im späteren Verlauf, wenn der Erkrankung nicht entgegen gewirkt wird, eine respiratorische Globalinsuffizienz. Radiologisch finden sich beim ARDS diffuse, beidseitige pulmonale Infiltrate, die nicht durch kardiale Ursachen erklärbar sind (56).

2.4 Streptococcus pneumoniae

S. pneumoniae wurde im Jahre 1881 von Louis Pasteur (Frankreich) und George Miller Sternberg (USA) unabhängig voneinander entdeckt und ist medizinhistorisch ein bedeutender Erreger (60). Griffith nutzte 1928 bekapselte und unbekapselte Stämme zum Nachweis der genetischen Transformation (57). Aufbauend auf diese Arbeit konnten 1944 Oswald T. Avery und Mitarbeiter mit Experimenten an Pneumokokken entscheidende Hinweise zur Identifizierung von Desoxyribonukleinsäure (DNA) als Träger der Erbinformation liefern (58). Studien mit Pneumokokken-Polysaccariden dienten weiterhin zur Entwicklung des Konzepts der aktiven Impfung (59).

Die Art *Streptococcus pneumonia* gehört zur Gattung *Streptococcus* innerhalb der Familie der *Streptococcaceae*. *S. pneumoniae* ist ein extrazelluläres, humanpathogenes Bakterium und verursacht sowohl leicht als auch schwer verlaufende Pneumonien (42). Im Gewebspräparat stellen sich *S. pneumoniae* als unbewegliche und gram-positive, ovale bis lanzettenförmige Diplokokken dar (siehe Abbildung 1).

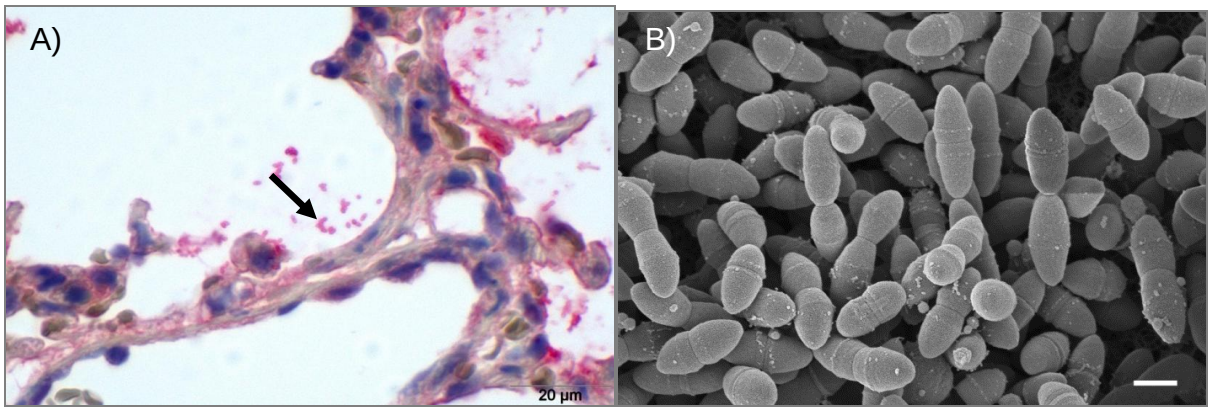


Abbildung 1: **Darstellung von *Streptococcus pneumoniae* (A) immunhistochemisch und (B) elektronenmikroskopisch.** (A) Der Pfeil deutet auf Pneumokokken (rot) in der Alveole einer Mauslunge. Quelle: Jan-M. Doehn in Zusammenarbeit mit Olivia Kershaw. (B) Maßstabsbalken entspricht 500 nm. Quelle: Muhsin Özel, Gudrun Holland, Rolf Reissbrodt (Robert-Koch-Institut)

Das Bakterium zählt zu den α-hämolysierenden Streptokokken, ist katalase-negativ und im Gegensatz zu anderen vergrünenden Streptokokken optochin-empfindlich und gallelöslich (60).

Fast alle klinisch relevanten Pneumokokken-Stämme sind bekapselt. Die Kapsel besteht aus Polysacchariden, die im Zytosol synthetisiert werden und an der Außenfläche der Zellwand kovalent verankert sind. Kolonien von bekapselten Stämmen zeigen makroskopisch eine schleimige, helle Oberfläche (s-Form; engl. *smooth*) (60).

Da Endolysine (siehe Kapitel 1.6) spezifisch an der Zellwand von Bakterien wirken, soll im Folgenden der Aufbau der Zellwand von *S. pneumoniae* kurz beschrieben werden.

Die Zellwand von *S. pneumoniae* besteht hauptsächlich aus Peptidoglykan(PG). Das Makromolekül PG (auch als Murein bezeichnet) besteht aus linearen Polysaccharidketten, N-Acetylglucosamin und N- Acetylmuraminsäure (ß-1,4 Bindung), die durch kurze Peptide quervernetzt sind, Zellwandpolysaccharid, Teichonsäure, Lipoteichonsäure und Zellwandpolysaccharid (siehe Abbildung 2).

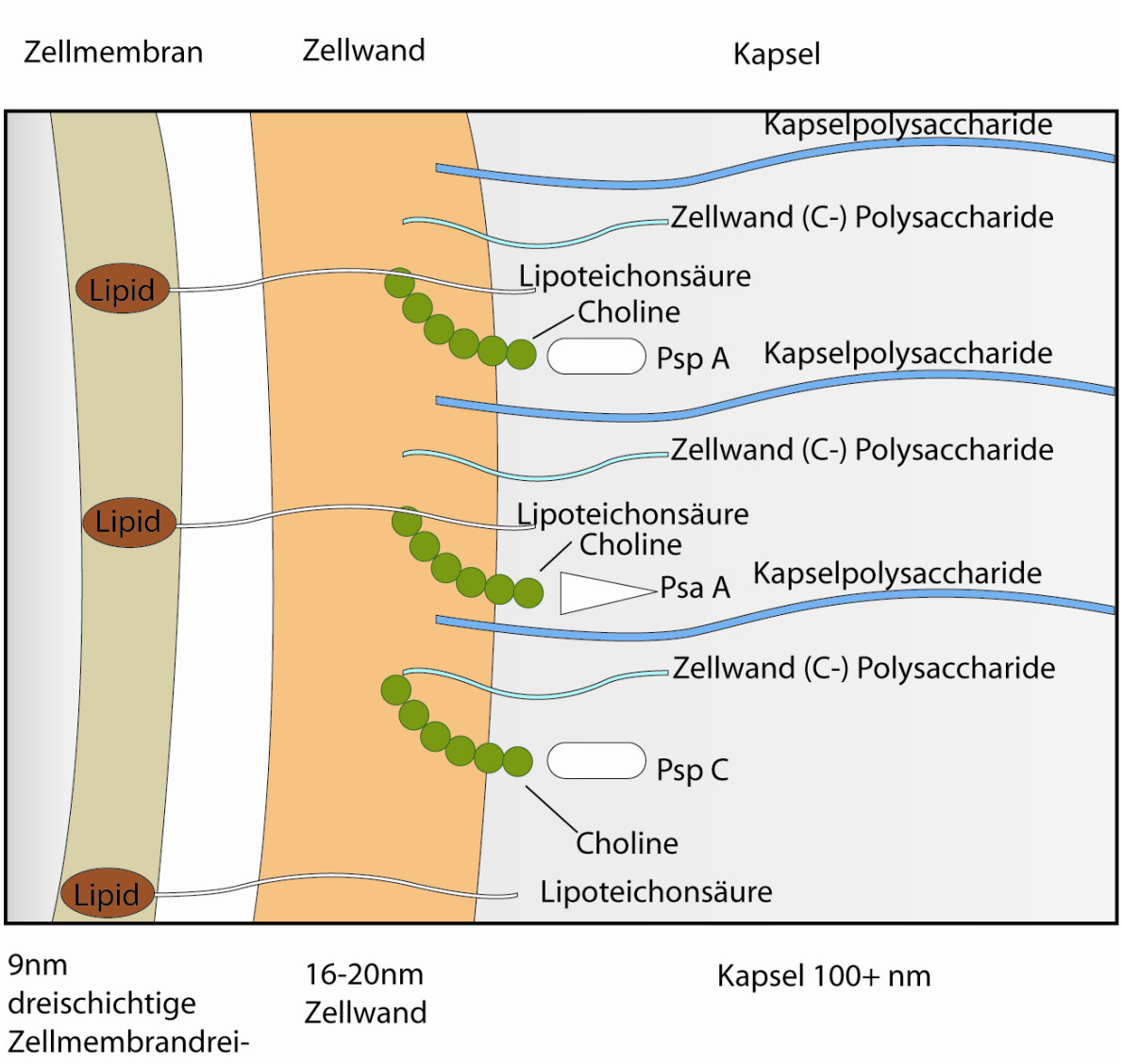


Abbildung 2: **Schematische Darstellung der Zellwand und Kapsel von Streptococcus pneumoniae.** Zu den cholinbindenden Proteinen (ChoP) gehören u.a. PspA = *pneumococcal surface protein A*, PsaA = *pneumococcal surface adhesin A* und LytA = *autolysine A*. Modifiziert nach (60).

Phosphorylcholin, ein Bestandteil der Zellwandpolysaccharide, dient als Anker für cholinbindende Proteine (ChoP). Die starke Quervernetzung des Peptidoglykans verleiht der Zelle Festigkeit und verhindert, dass sie aufgrund ihres hohen innerosmotischen Druckes (ungefähr 300-500 kPa) birst (61).

Ähnlichkeiten bei den Antigeneigenschaften der Kapselpolysaccharide ermöglichen die Einteilung von Pneumokokken in 19 Serogruppen, die jeweils zwei bis fünf verwandte Serotypen enthalten (dänische Klassifikation). Aktuell sind 92 Pneumokokken-

Serotypen bekannt. Die klinische Bedeutung der unterschiedlichen Serotypen variiert stark (62). Studien zeigten, dass bei Individuen älter als 5 Jahre die Serotypen 1, 3, 6, 14, 19 und 23 von führender Bedeutung bei invasiven Infektionen sind. Bei Menschen jünger als 5 Jahre sind häufig die Serotypen 3, 6, 14, 19 und 23 (63) Auslöser einer invasiven Pneumokokken-Infektion.

Bei der Besiedlung des Wirtes ist *S. pneumoniae* auf Mechanismen zur Anhaftung an die Wirtszellen und Umgehung der Immunantwort angewiesen. Eine Vielzahl von Pathogenitätsfaktoren wurde bei *S. pneumoniae* beschrieben, u.a. Hyaluronsäure, Neuraminidase A/B, pneumococcal surface protein A (PspA),*pneumococcal surface adhesin A* (PsaA), Polysaccharidkapsel, *autolysine A* (LytA) und das Endotoxin Pneumolysin (64). Einige dieser Faktoren sind für diese Arbeit von besonderer Bedeutung und sollen deshalb näher beschrieben werden.
Die das Bakterium umgebende Polysaccharidkapsel gilt als sehr bedeutender Pathogenitätsfaktor (41). Sie erschwert die Opsonierung des Erregers durch das alternative Komplementsystem sowie die Phagozytose durch polymorphonukleäre Leukozyten (64). Die Kapselstärke des Erregers wird erst bei enger Interaktion oder Invasion von Wirtszellen reduziert (65). Autolysin A gehört zur Gruppe der cholinbindenden Proteine und ist ein bakterieneigenes Enzym, das spezifische Bindungen (N-Acetylmuramoyl-L-Alanine) im Peptidoglykan der Bakterienwand spaltet. Während der Infektion führt die Aktivierung des Proteins zur Freisetzung von Zellwandbestandteilen und Verstärkung der Entzündungsreaktion (66). Pneumolysin gilt als wichtiges Pneumokokken-Toxin. Das 52kDa große Protein kommt in allen klinisch relevanten Pneumokokken-Stämmen vor. Vom Bakterium freigesetzt führt es zur Schädigung von Phagozyten und Epithelzellen und in hohen Konzentrationen zur pulmonalen Vasokonstriktion (67) (68).

Resistenzen von *Streptococcus pneumoniae*

Weltweit haben sich Resistenzen von *S. pneumoniae* gegenüber gängigen Antibiotika entwickelt. Während zu Beginn der Antibiotikatherapie alle klinischen Isolate von *S. pneumoniae* penicillin-sensibel waren, werden inzwischen zunehmend penicillin-resistente *S. pneumoniae* (PRSP; minimale Hemmkonzentration [MHK] ≥2 mg/l) bzw. Pneumokokken mit abgeschwächter Empfindlichkeit (intermediäre; [MHK] 0,1-1mg/l)

gegen Penicillin bei Patienten isoliert (70). Die ersten Beschreibungen von vereinzelt Penicillin-intermediär empfindlichen *S. pneumoniae*-Stämmen kamen 1967 aus Australien und Papua Neuguinea. 1977 wurde dann erstmals aus Südafrika von Penicillin-hochresistenten Stämmen berichtet (69). Daten von Resistenz-Surveillance-Studien aus den USA zeigten zwischen 1979 und 1987 eine Inzidenz von 4% bis 5% für PRSP-Pneumokokken. Zu Beginn der 1990er Jahre lag die Rate bereits bei 20% und im Winter 1999/2000 waren 34,1% der Pneumokokkenstämme intermediär empfindlich und 16% resistent gegen Penicillin (70).

Gleichzeitig wurde eine Resistenzentwicklung von *S. pneumoniae* gegenüber anderen Antibiotikaklassen, insbesondere bei Makroliden (71) (72), aber auch bei Tetracyclinen, Fluorochinolonen(73) und selbst Oxazolidinone (74) beobachtet. Darüber hinaus verbreiten sich weltweit *S. pneumoniae*-Stämme (insbesondere Serotypen 6A, 6B, 9V, 14, 19F, 23F), die Resistenzen gegenüber Penicillin G und mindestens zwei weitere Antibiotikaklassen aufweisen (75), sog. *multidrug-resistant mutants* (MDRSP). In den USA und in Japan sollen 20% bis 30% der klinisch isolierten Stämme *multidrug-resistant* sein (76).

Bei der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen Pneumokokken-Stämmen gibt es erhebliche internationale Unterschiede. Während in Deutschland weniger als 5% der klinisch isolierten Pneumokokken-Stämme als Penicillin-resistent eingestuft werden, sind es in den USA 20% (72) und in Spanien 50% (77).

Die Behandlung der ambulant erworbenen Pneumonie wird durch die rapide Zunahme von antibiotikaresistenten *S. pneumoniae* Stämmen der CAP erschwert. Nicht eindeutig geklärt ist die Auswirkung einer Penicillin-Resistenz auf den Krankheitsverlauf bei CAP-Patienten (78) (79). Für Makrolid- und Fluorochinolonresistenzen von *S. pneumoniae* gibt es Hinweise auf eine klinische Relevanz bei respiratorischen Infektionen (80) (81).

Antibiotika können auch zu Resistenzen bei anderen Bakterienarten führen. Diese wiederrum können Auslöser von schwer zu behandelnden Infektionskrankheiten sein. In der Literatur wird in diesem Zusammenhang auch der Begriff „Kollateralschaden“ verwendet (82).

Aufgrund der gestiegenen internationalen Mobilität und dem teilweise immer noch unvorsichtigen Einsatz von Antibiotika ist mit einer weiteren Zunahme der Resistenzbildung und Verbreitung von resistenten Erregern zu rechnen (83).

Gleichzeitig sind die Neuzulassungen von Antibiotika und Anti-Infektiva in den letzten Jahren stark rückläufig (84).
Eine Alternative zur Antibiotika-Therapie könnte die antimikrobielle Therapie mit Phagen oder Phagenbestandteilen darstellen (85), auf die im Folgenden detailliert eingegangen wird.

2.5 Bakteriophagen

Bakteriophagen (Phagen) sind bakterienspezifische Viren mit einer Größe von 2 nm bis 200 nm. Sie sind obligat intrazelluläre Erreger und enthalten als Genom entweder Einzelstrang- oder Doppelstrang-DNA bzw.-RNA (86). Die meisten Bakteriophagen sind für den jeweiligen Wirt hoch spezifisch. Diese Wirtsspezifität dient neben dem Genom und der Morphologie der taxonomischen Einteilung von Phagen (87). Die bakterizide Wirkung von Phagen wurde von Frederick Twort (1915) und dem Kanadier Félix Hubert d`Hérelle (1917) beschrieben (88). Phagen kommen in unterschiedlichen Habitaten auf der Erde vor und ihre Gesamtpopulation wird auf $>10^{30}$ geschätzt (89).

<u>Phagenvermehrung und Phagen-Therapie</u>

Phagen besitzen keinen eigenen Stoffwechsel und sind bei der Reproduktion auf den Proteinbiosyntheseapparat der Wirtszelle angewiesen.

Die Phagenvermehrung kann in fünf Abschnitte gegliedert werden:

- Adsorption an der Zellwand der Wirtszelle,
- Injektion des genetischen Materials des Phagen,
- Replikation viraler Gene und Bestandteile,
- Zusammenfügen der reifen Hüllenproteine und des genetischen Materials,
- Lysierung der Wirtszelle und Freisetzung der fertigen Viruspartikel.

Der beschriebene Vermehrungszyklus wird als „lytischer Zyklus“ bezeichnet und findet in kurzem zeitlichem Abstand statt (88). Virulente Phagen können nur diesen lytischen Zyklus durchlaufen. Hingegen kann es bei temperenten Phagen zu einem alternativen Entwicklungsschritt kommen. Im temperenten Vermehrungszyklus kommt es nach der Injektion des genetischen Materials zunächst nicht zur Bildung von Phagen (86). Vielmehr wird das reprimierte Phagengenom (Prophage) bei jeder Zellteilung lediglich

mit dupliziert. Erst zu einem späteren Zeitpunkt werden Phagen gebildet und freigesetzt (90).

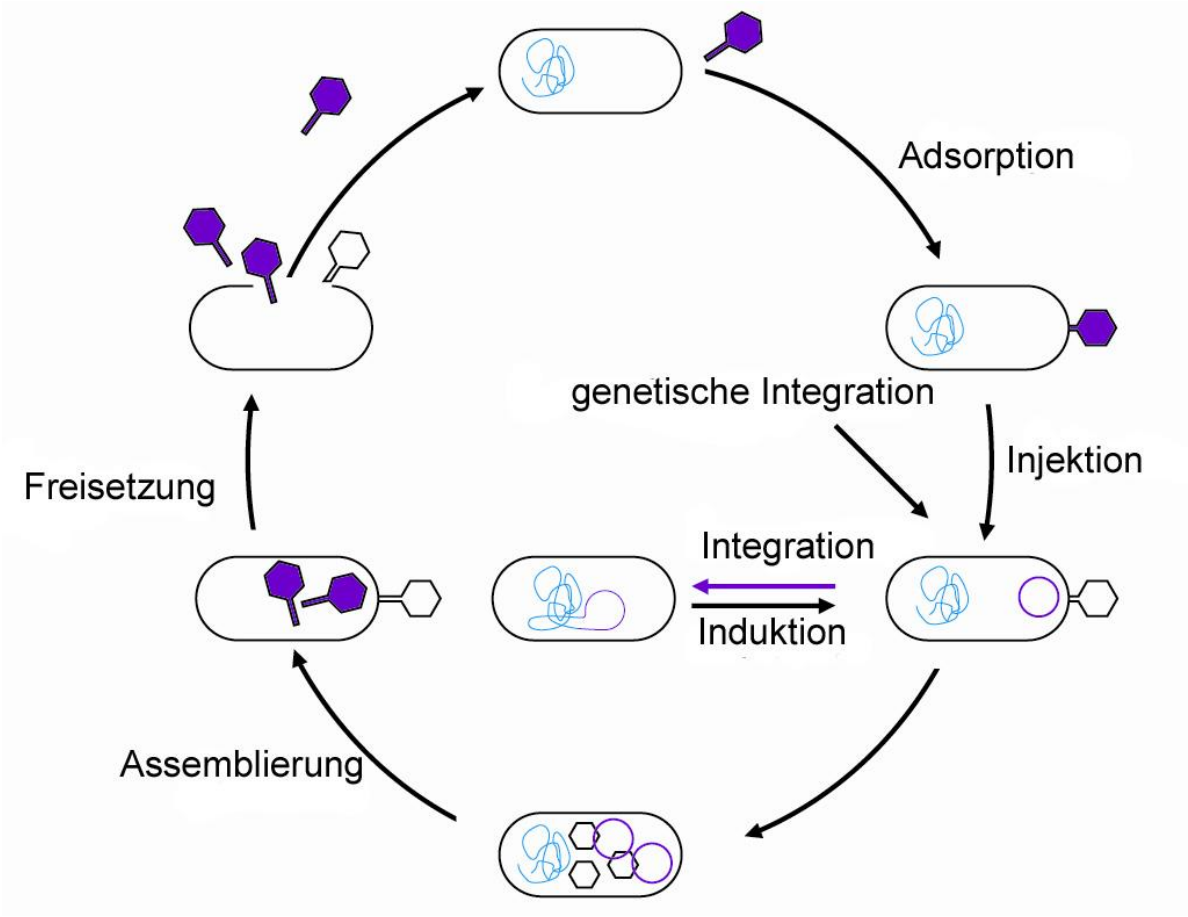


Abbildung 3: **Schematische Darstellung der Phagenvermehrung** modifiziert nach (86)**.**

Zur Lyse der Zellwand am Ende des Replikationszykluses verwenden viele Phagen mit doppelsträngiger DNA spezifische Enzyme, sogenannte Lysine oder Endolysine. Lysine sind im Phagengenom kodierte hochaktive Proteine, die in der späten Phase der Phagenreplikation synthetisiert werden und im Zytoplasma der Wirtszelle akkumulieren. Endolysine können (mit wenigen Ausnahmen) die Zytoplasmamembran nicht durchdringen (91). Um an ihr Substrat, das in der Zellwand befindliche Peptidoglykan zu gelangen, müssen zuvor von einem anderen phagenkodierten Enzym, dem so genannten Holin, Poren in der Zytoplasmamembran gebildet werden (92). Endolysine bestehen gewöhnlich aus einer C-terminal gelegenen, wirtsspezifischen Zellwandbindedomäne „*cell wall binding domain*“(CBD) und einer am N-Terminus gelegenen „*catalytic activity domain*“(CAD*)* (61). Kommt es zu einer Bindung der CBD

an ihr Substrat in der Zellwand der Wirtszelle richtet sich die CAD aus und beginnt mit der Hydrolyse spezifischer Verbindungen im Peptidoglycan (61) (93). Die CADs werden anhand ihrer Angriffspunkte in der Zellwand als Muramidasen, N-Acteyl-Glucosaminidasen, Amidasen oder Endopeptidasen klassifiziert (94). Phagenlysine und wirtseigene Autolysine ähneln sich bei der katalytischen Aktivität und der Substratspezifität (66, 95).

Der Einsatz von Phagen als Antiinfektiva wurde bereits 1919 von *Felix d`Hèrelle* vorgeschlagen (88). Durch die Entdeckung von Antibiotika Anfang der 1940er Jahre verlor die Phagen-Therapie jedoch in Westeuropa und den USA an Bedeutung. Mit der steigenden Rate an Antibiotika-Resistenzen wuchs allerdings auch wieder das Interesse an dieser Art der antimikrobiellen Behandlung (96). Die amerikanische Behörde für Lebensmittel- und Arzneimittelsicherheit (FDA) hat im Jahr 2006 Phagen bei der Lebensmittelkontrolle und 2007 eine klinische Testung der Phagen-Therapie bei chronisch infizierten Wunden am Fuß zugelassen (86) (97). Obwohl die Therapie mit Phagen in experimentellen Studien vielversprechende Ergebnisse zeigte (88) (98), gibt es auch gewichtige Nachteile, die ihren Nutzen als alternative antimikrobielle Substanz einschränken: (I) Die Pharmakokinetik bei der Phagen-Therapie ist aufgrund der Replikation von Phagen wesentlich komplizierter als bei chemischen Substanzen, (II) Bakterien können vielseitige Resistenzen gegenüber Phagen-Infektionen entwickeln, und (III) Phagen können zur Übertragung von Genen führen, die beispielsweise Endotoxine oder Antibiotika-Resistenzen kodieren (88).

Um diese Probleme beim Einsatz von intakten Phagen zu umgehen, wurde im Jahre 2001 von Fischetti et al. die Verwendung von aufgereinigten Phagenlysinen vorgeschlagen (85) (99).

2.6 Phagenlysin Cpl-1

Phagenlysine führen zur raschen Lyse von sensiblen Gram-positiven Bakterien, wenn sie von außen zugegeben werden. Sie werden deshalb auch als Exolysine bezeichnet und eignen sich möglicherweise als antimikrobielle Substanzen (61). Von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit ist das Endolysin des 1981 von der Arbeitsgruppe um Ernesto Garcia erstmals beschriebenen pneumokokken-spezifischen Phagen Cp-1 (Complutense Phage) (100).

Complutense ist eine Volksgruppe aus der Region um Alcalá de Henares in Spanien. In dieser Region wurde der Phage erstmalig isoliert. Cp-1 ist ein lytischer Phage aus der Familie der Podoviridae, dessen lineare doppelsträngige DNA vollständig sequenziert ist (101) (102). Morphologische Untersuchungen zeigen, dass der Phage aus einem hexagonalen, irregulären Kapsid (Ø 60 nm) und einem kurzen dicken Schwanz von 20 nm Länge und 15 nm Breite besteht. Am Schwanz befinden sich sechs endständige Fasern (siehe Abbildung 4) (103). Ernesto Garcia und Kollegen wiesen das Gen „*cpl*“ für das phageneigene Lysin Cpl-1 nach. Durch Klonierung und Expression in *Escherichia coli* gelang die rekombinante Herstellung des Proteins. Das Enzym Cpl-1 (339 Aminosäuren) hat ein molekulares Gewicht von 39kDa und gehört zur Familie der cholinbindenden Proteine (102, 104). Es spaltet im Peptidoglykan von *S. pneumoniae* die Glykosidbindung zwischen N-acetylmuramoyl-(β1,4)-N-acetylglucosamine und wird als Muramidase klassifiziert (105). Die dreidimensionale Kristallstruktur des modularen Endolysins Cpl-1 und die Substrat-Bindung wurden im Detail untersucht (106). Die C-terminal gelegene cholinbindende Domäne besteht aus sechs ähnlichen cholinbindenden Wiederholungen (p1-p6) mit einer Haarnadelkonformation und einem 16 Aminosäuren langen Ende am C-Terminus. Die ersten vier Wiederholungen stellen zwei kanonische Cholin-Bindungsstellen dar, analog zur Struktur bei anderen CBPs, wie C-LytA. Ein im N-terminalen Bereich befindliches katalytisches Zentrum zeigt eine irreguläre $(\beta/\alpha)_5\beta_3$ Fassformation und katalysiert die Spaltung des Peptidoglykans (106). Die höchste Enzymaktivität liegt bei einem pH-Wert von 4 bis 5. Bei einem pH-Wert von unter 3 und über 8 zeigt sich keine Aktivität mehr. Die Enzymaktivität von Cpl-1 bleibt stabil während einer Lagerung von mehr als 6 Monaten bei 4°C, für wenigstens 3 Wochen bei 37°C und 30 min bei 45°C. Die Halbwertszeit im Plasma von Mäusen beträgt 20,5min (107) (108).

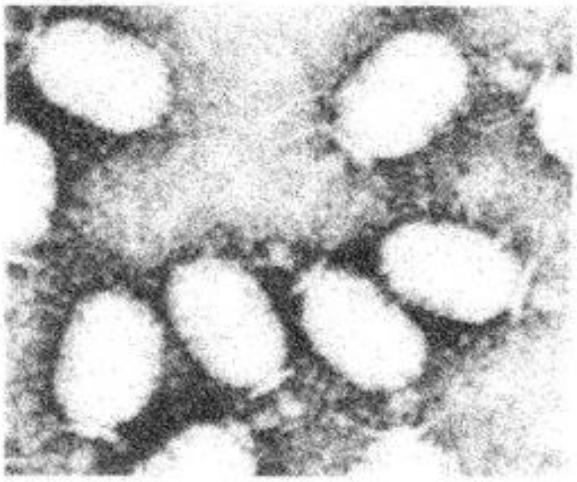


Abbildung 4: **Elektronmikroskopische Aufnahme des Phagen CP-1** (100)**.**

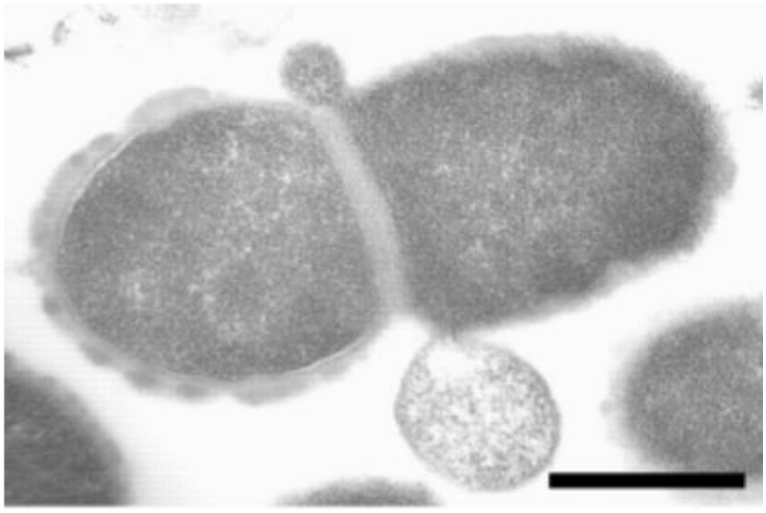


Abbildung 5: **Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Streptococcus pneumoniae* 1 Minute nach der Exposition mit dem lytischen Phagenenzym Pal.** Maßstabsbalken: 0,5 µm (99).

Toxische oder allergische Reaktionen konnten bei Mäusen auch nach der Applikation von hohen Dosen Cpl-1 und vorheriger Sensibilisierung (bis zu 4 mg Cpl-1 i.v./ Studienzeitraum vier Wochen) nicht beobachtet werden (107).
Resistenzen gegen Cpl-1 bilden sich auch nach wiederholter Exposition (über 40 Zyklen) von Bakterien mit geringer Konzentration des Lysins nicht aus (99).
Nach Applikation des 39kDa großen Enzyms Cpl-1 kommt es zur Antikörperbildung bei Mäusen. Deren Einfluss auf die Enzymaktivität wurde *in-vitro* und *in-vivo* untersucht. Die Präinkubation von Cpl-1 mit hyperimmunem Anti-Cpl-1 Kaninchenserum (für 10-60min) verringerte die Enzymaktivität leicht gegenüber der Inkubation mit nicht immunisierendem Kaninchenserum (107). Im murinen Pneumokokken-Bakteriämie- und Pneumokokken-Sepsis-Modell konnte kein Unterschied hinsichtlich Effektivität bei der Cpl-1 Behandlung zwischen Cpl-1 sensibilisierten Mäusen (Anti-Cpl-1 IgG Titer 1:10) und nativen Mäusen festgestellt werden (108).
Cpl-1 ist für *S. pneumoniae* spezifisch und lysiert *in-vitro* verschiedene Stämme. Die Zugabe von Cpl-1 (100 µg/ml) zu einer Suspension mit 10^8 „colony forming units“ (CFU) aus 19 verschiedenen Pneumokokken-Stämmen führte innerhalb von 30 Sekunden zu einer Reduktion der CFU von *S. pneumoniae* um 2,8 bis 4,5 $\log_{10}$ Einheiten gegenüber der unbehandelten Kontrollsuspension. Cpl-1 lysiert häufige klinisch isolierte

Serogruppen, hoch penicillin-resistente Stämme (Sp^{9}-3, Sp^{14}-3, Sp^{23}-1) sowie autolysindefiziente (Lyt 4-4) und unbekapselte Stämme (R36A, R6) (107).

Bedingt durch seine cholinbindende Domäne hat das Endolysin eine hohe Substratspezifität für Streptokokken der Gruppe A. Gleichwohl konnte ebenfalls eine - wenn auch sehr viel geringere - Aktivität gegenüber Streptokokken der Gruppen C und E gemessen werden. Keine Aktivität (oder nur geringe Aktivität wie bei *Streptococcus oralis*, *mitis* und *gordonii*) war gegenüber Streptokokken der Gruppen B, D, F, G, L und N sowie anderen Bakterienarten (*Escherichia coli*, *Neisseria lactamicus*, *Pseudomonas aeruginosa* oder *Pseudomonas gingivalis*) messbar (107).

In Kombination mit einem herkömmlichen Antibiotikum zeigten sich synergistische Effekte. Cpl-1 und Gentamycin wiesen einen synergistischen Effekt bei der Lyse von *S. pneumoniae* mit absteigender minimaler Hemmkonzentration (MHK) des Erregers gegen Penicillin auf. Cpl-1 und Penicillin zeigten Synergien gegen einen stark penicillin-resistenten Pneumokokken-Stamm (105). Ebenso konnte *in-vitro* und in einem murinen Sepsis-Modell ein synergistischer Effekt von Cpl-1 und Pal, ein von einem anderen *S. pneumoniae* spezifischen Phagen (Dp-1) kodiertes Endolysin, gezeigt werden (108).

Das therapeutische Potenzial von Cpl-1 bei Pneumokokken-Infektionen wurde in Tiermodellen für humane Infektionskrankheiten untersucht. Die Studien unterscheiden sich hinsichtlich der eingesetzten Dosen von Cpl-1, Therapiebeginn und Applikationsart (siehe Tabelle 1).

Löffler et al. zeigten, dass Cpl-1 bei der Dekolonisation von *S. pneumoniae* im Nasopharynxraum der Maus effektiv ist (107). Des Weiteren wurde Cpl-1 als anti-mikrobielle Substanz bei einer Bakteriämie eingesetzt und führte hier zu einem deutlichen Überlebensvorteil im Vergleich zu unbehandelten Tieren (107). Für ein Pneumokokken-Sepsis-Modell wurden Mäuse intraperitoneal mit dem β-Lactam antibiotikaresistenten Pneumokokken-Stamm 6B infiziert. *Jado* et al. zeigten in dieser Studie, dass eine frühzeitige Behandlung mit Cpl-1 (1h und 2h nach Infektion) zu einem signifikant höheren Überleben im Vergleich zur Kontrollgruppe führte (108). Der kontinuierliche Einsatz von Cpl-1 mittels i.v. Infusion in einer Studie von *Entenza* et al. am Endokarditis-Modell führte zu einer deutlichen Reduktion der Bakterienlast an der infizierten Herzklappe (> 4 log10 CFU/g) und einer Pneumokokken-Elimination aus dem Blut (109).

Tabelle 1: **Übersicht über unterschiedliche Cpl-1 Applikationen in Infektionsmodellen**

Tiermodell	**Serotyp, Dosis, Applikationsort**	**Dosis Cpl-1**	**Zeitpunkt d. Behandlung**	**Referenzen**
Kolonisation; Maus	Serotyp 14 1x 10^7 CFU i.n.	1000 µg i.o.; i.n.	5h nach Kolonisation	*Loeffler J.M.* et al. (2003)(107)
Bakteriämie; Maus	Serotyp. 14 3x 10^8 CFU i.v.	2000 µg i.v.	1h nach Infektion	*Loeffler J.M.* et al.(2003)(107)
Sepsis; Maus	Serotyp 6B MDRSP 5x 10^7 CFU i.p	200 µg i.p.	1h nach Infektion	*Jado I.* et al. (2003)(108)
Endokarditis; Ratte	Serotyp WB 4 MDRSP 1x10^7 CFU i.v.	Bolus von 250 mg/kg KM i.v., dann 250 mg/kg KM/h über 6 h.	16h nach Infektion	*Entenza J.M. et* al.(2005)(109)
Meningitis; Ratte	Serotyp 3 5,7x10^5 CFU i.c.	20 mg/kg KM i.c. oder 200 mg/kg KM i.c	18h nach Infektion	*Grandgirard D. et* al.(2008)(110)
Otitis media; Maus	Serotyp 19F 1x 10^6 CFU i.n.	2x 1000 µg in 8h i.n.	72h nach Kolonisation	*McCullers J.A. et* al.(2007)(111)

i.c. = intrazisternal, i.n. = intranasal, i.o. = intraoral, i.v. = intravenös, MDRSP = multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae mutant,* CFU = *Colony forming Units*.

Der kontinuierliche Einsatz von Cpl-1 mittels i.v. Infusion in einer Studie von *Entenza* et al. am Endokarditis-Modell führte zu einer deutlichen Reduktion der Bakterienlast an der infizierten Herzklappe (> 4 log10 CFU/g) und Pneumokokken-Elimination aus dem Blut (109). Im Meningitis-Modell in der Ratte verminderte die intrathekale Applikation von Cpl-1 die Anzahl der koloniebildenden Einheiten von *S. pneumoniae* bis unter die Nachweisgrenze (< 1 x 10^3 CFU/ml) für einen Beobachtungszeitraum von 2h (110).
In einem Otitis media Modell in der Maus, welches eine nicht invasive, biolumineszente Bildgebung verwendete, entwickelten 80% der Mäuse, welche mit *S. pneumoniae* kolonisiert und mit Influenza infiziert waren, eine Mittelohrentzündung. Die Behandlung

mit Cpl-1 vor der Influenzainfektion verhinderte bei allen getesteten Tieren die Ausbildung einer *Otitis media* (111).

3 Fragestellung

Die Rate der antibiotikaresistenten Stämme von *S. pneumoniae* hat in den vergangenen Jahren stetig zugenommen. Nach der Impfung gegen *S. pneumoniae* wurde eine Zunahme von nicht durch den Impfstoff abgedeckten Serotypen beobachtet. Angesichts dieser Entwicklung wurde die Therapie mit hochaktiven, pneumokokken-spezifischen Enzymen vorgeschlagen. Diese lytischen Phagenenzyme sind hochspezifisch für *S. pneumoniae,* führen zu einer raschen Lyse des Erregers und wirken *in-vitro* synergistisch in Kombination mit Penicillin und / oder Gentamycin. Cpl-1, ein lytisches Enzym des Phagen Cp-1, wurde bereits erfolgreich im Tiermodell bei der Therapie der Pneumokokken verursachten Bakteriämie, Sepsis, Meningitis und Endokarditis sowie zur Keimreduktion im Nasopharynxraum eingesetzt. Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse und der großen klinischen Bedeutung der Pneumonie wurde bisher das therapeutische Potenzial von Pneumokokken-spezifischen Bakteriophagen-Enzymen bei der Pneumokokken-Pneumonie nicht untersucht.
Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die experimentelle Evaluation eines möglichen therapeutischen Nutzens von Cpl-1 bei der Pneumonie im Vergleich zu Amoxicillin.

Dabei sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Welchen Einfluss hat die systemische oder intrapulmonale Gabe von Cpl-1 auf den klinischen Verlauf und das Überleben bei der schweren Pneumokokken-Pneumonie?
- Kann eine Reduktion der Bakterienlast in verschiedenen Organsystemen durch Cpl-1 Applikation erreicht werden?
- Wie beeinflusst die Gabe von Cpl-1 die Lungenfunktion im Verlauf der Pneumonie?
- Welchen Einfluss hat die systemische oder intrapulmonale Gabe von Cpl-1 auf die Pneumokokken-induzierte Entzündungsreaktion?
- Wie beeinflusst die systemische oder intrapulmonale Cpl-1 Applikation die Lungenfunktion im Verlauf der Pneumonie?
- Kann die Effizienz einer wirksamen, etablierten Antibiotikatherapie der Pneumonie durch zusätzliche systemische Gabe von Cpl-1 verbessert werden?

4 Material und Methoden

4.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden weibliche Mäuse des Stammes C57Black/6NCrl (C57Bl/6) eingesetzt. Die Mäuse wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) gezüchtet und von dort bezogen. Für die Versuche wurden Tiere im Alter zwischen 8-12 Wochen und mit einem Körpergewicht von 16-20 g eingesetzt.

4.2 Bakterien

Die murine Pneumonie wurde durch *Streptococcus pneumoniae* vom Serotyp 3 (Stamm NCTC7978) induziert.

4.3 Cpl-1

In dieser Arbeit wurde Cpl-1 als rekombinant hergestelltes Protein verwendet. Cpl-1 exprimierende *Escherichia Coli* DH5α(pJML6) wurden wie folgt hergestellt. Der Cpl-1 kodierende Abschnitt wurde aus der Phagen-DNA von Cp-1 mittels Restriktionsenzymen (Restriktionsenden Xbal und HindIII) isoliert. Für die PCR wurden Primer (gemäß Gen Bank Sequenznummer Z47794) eingesetzt. Die replizierte DNA wurde subkloniert (Restriktionsenden Xbal und HindIII) in den Vektor pJML6, welcher auf der Konstruktion pIN- IIIA beruht und einen doppelten Promoter enthält. Die Inkubation von *E. coli* DH5α und Vektor pJML6 erfolgte in Luria-Bertani Nährmedium, versetzt mit Ampicillin(100mg/l) bei 37°C für 24 Stunden unter Bewegung. Als Induktor diente 0,4mM Isopropyl1-β-D-Thiogalactopyranoside. Es folgte eine Zentrifugation und Aufschluss der Zellwand mittels French Press. Zur Entfernung der Zelltrümmer erfolgte erneut eine Zentrifugation (100000g, für 1h bei 4°C). Zur Aufreinigung des Cpl-1 wurde eine Affinitätschromatographie mit DEAE-Zellulose Säule (8 x 2,5cm) durchgeführt. Zum Waschen wurden dreimal Natrium-Phosphat-Puffer-Gemische (20 mM, pH 6.0) mit 1,5 M NaCl verwendet. Der gleiche Puffer mit 2 % Choline wurde zur Elution von Cpl-1 verwendet. Lagerung und Aktivitätsmessung erfolgten in Enzym-Puffer-Gemisch (50 mM Phosphate Puffe [pH 7.0], 1 mM Dithiothreitol und 1 mM EDTA). Die Aktivitätsmessung des Enzyms erfolgte durch Exposition unterschiedlicher Verdünnungsstufen (jeweils doppelte Verdünnung) von Cpl-1 mit sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen *S. pneumoniae* Serogruppen 14

(Stamm DCC 1490). Nach 15 Minuten Inkubationszeit in einer Mikrotiter-Platte wurde das Ergebnis abgelesen. Der reziproke Wert der höchsten Verdünnung, welche zur Reduktion der optischen Dichte um die Hälfte (ausgehend von einer optischen Dichte von 0,5) führte, wurde als Enzymaktivität definiert und in Units pro Milliliter gemessen. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Cpl-1 wurde von der Arbeitsgruppe um *Vincent Fischetti,* Rockefeller Universität, New York, USA hergestellt und bezogen (107).

4.4 Material

Tabelle 2: **Reagenzien**

Reagenz	Hersteller
Beatmungsgas (100% O_2)	Technische Gase (Charité, Berlin)
Bioplex™Plex Zytokine Reagent Kit	BioRad Laboratories GmbH (München)
Braunol® (Povidon-Jod-Lösung)	BRAUN AG (Melsungen)
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
FCS (Foetal Calf Serum Gold)	PAA Laboratories GmbH (Österreich)
Glycerol	Merck (Darmstadt)
Ketavet®(100mg/ml)	Pfizer Pharmacia (Karlsruhe)
Liquemin®(Heparin-NaCl 5000I.E./ml)	Hoffmann-La Roche AG (Grenzach-Wyhlen)
Natrium-Chlorid-Lösung (0,9%)	BRAUN AG (Melsungen)
PBS (Phosphat Buffered Saline) (Dulbecco's PBS (1x))	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Protease-Inhibitor complete™ Mini	Roche Diagnostics GmbH (Prenzberg)
Rompun 2%®(Xylazinhydrochlorid 20mg/ml)	Bayer Vital GmbH (Leverkusen)
THY (Todd Hewitt-Bouillion)	BD Biosciences (Heidelberg)
Yeast-Extrakt (Hefeextrakt 0,5%)	BD Biosciences (Heidelberg)

Tabelle 3: **Apparatur Lungenfunktionsmessung**

Typenbezeichung	Hersteller
Differenz-Druckaufnehmer (Differential pressure Transducer Validyne DP45-14)	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Druckaufnehmer (Pressure Transducer MPX Typ 399/2 und P75 Typ 379)	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Messmodule (CFBA,TAM-A, VCM, TCM)	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Peristaltikpumpe (Reglo-Analog, IsmatecSA)	ISMATEC (Schweiz)
Software (Pulmodyn)	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Unterdruckkammer (Isolates Lung, size 1, Typ 839)	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)

Tabelle 4: **Allgemeine Geräte und Technik**

Geräte	Hersteller
Autoklav (tuttnauer Systec 2540EL)	Systec GmbH Labor-Systemtechnik (Wettenberg)
Beatmungsgerät MiniVent Type 845	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Bioplex™ Millipore	BioRad Laboratories GmbH (München)
Blutdruckmessgerät Hellige	Servomed (Neunkirchen)
Brutschrank (Heraeus, Typ BB6220 O_2)	Kendro Laboratory Products (Hanau)
Druckmess-Set, 1fach REF ST-33B	Smiths Medical Deutschland (Kirchseeon)
Elektrophorese-Netzgerät PowerPac 200	BioRad Laboratories GmbH (München)
Fiberoptik Laryngoskop für Kleinnager	Welch Allyn GmbH & Co.KG (Jungingen)
IKA®-Schüttler MTS 2	IKA Werke (Staufen)
Kaltlichtquelle Flexilux 600 longlife	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Kühlschrank 4°C (Liebherr Profi line)	Engmann Kühlsysteme (Mannheim)
Magnetrührer (Variomag Electronicrührer Mono)	H+P Labortechnik GmbH (Oberschleißheim)

Mikroskop Laborlux 12	Ernst Leitz Wetzlar GmbH (Wetzlar)
Mikroskop Stemi DV 4	Carl Zeiss Microlmaging GmbH (Göttingen)
Neubauer Zählkammer (Bright-Line)	LO-Laboroptik GmbH (Friedrichsdorf)
Photometer (UVIKON$_{xs}$)	Bio-Tek Instruments (USA)
Radiometer ABL 700 Serie	Radiometer (Willich)
Rektalsonde (physitemp Model BAT-12)	Physitemp Instruments Inc. (USA)
Schüttelwasserbad GFL Typ 1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel)
Sicherheitsarbeitsbank (Heraeus Sorvall,Typ HS 12)	Kendro Laboratory Products (Hanau)
Surgivet Isotec 4	Johnson Rd. (Wisconsin, USA)
Vacusafe comfort	IBS, Integra Biosiences (Schweiz)
Vortexer (Vortex-2-Genie)	Scientific Industries (USA)
Waage (Model CS200)	Ohaus Corporation (USA) über VWR
Zentrifuge Heraeus (Biofuge fresco)	Kendro Laboratory Products (Hanau)
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Kendro Laboratory Products (Hanau)

Tabelle 5: **Fertigmaterial**

Bezeichnung	Hersteller
BD Falcon™ 5ml Polypropylen Round-BottomTube	BD Biosciences (Heidelberg)
BD Falcon™ 5ml Polystyrene Round-BottomTube	BD Biosciences (Heidelberg)
BD TrucountTM Tubes	BD Biosciences (Heidelberg)
Blutagarplatten (Columbia mit 5% Schafblut)	BD Biosciences (Heidelberg)
Cryo Tube TM Vials	Nunc A/S (Dänemark)
Cuvettes No. 67.742	Sarstedt (Nümbrecht)
Einmal Impfschlingen (farblos, 1µl)	Nunc (Wiesbaden)
Falcon Blue MaxTM Jr. (15ml)	BD Biosciences (Heidelberg)
Falcon Blue MaxTM (50ml)	BD Biosciences (Heidelberg)
Gebrauchsfertige Filtereinheit FP 30/0,45 CA-S	Schleicher&Schuell GmbH (Dassel)
Handschuhe DermaClean	Ansell Healthcare Europe (Belgien)

Kanülen BD MicrolanceTM 3 (27G)	BD Biosciences (Heidelberg)
Kapillarblutentnahmesystem (rot, Häma)	Kabe Labortechnik (Nümbrecht-Elsenroth)
Pipetten (Eppendorf Research)	Eppendorf (Hamburg)
Präparationsbesteck	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg)
Reaktionsgefäß (1ml/1,5ml)	Eppendorf (Hamburg)
Serologische Pipetten Falcon (2ml/5ml/25ml)	BD Biosciences (Heidelberg)
Spritzen BD Discardit TM II (2ml)	BD Biosciences (Heidelberg)
Spritzen BD PlastipackTM (1ml)	BD Biosciences (Heidelberg)

4.5 Methoden

4.5.1 Tierhaltung

Die Tierhaltung erfolgte während der Versuche unter spezifisch-pathogenfreien Bedingungen in einem „*individually ventilated cage*“ (IVC)-Haltungssystem (Typ II-L, EHRET, Emmendingen, Deutschland). Die Besatzdichte entsprach den EU-Richtlinien. Neben der Standardeinstreu (FS 14 Fichte) waren die Käfige mit sterilisiertem Zellstoff als Nestbaumaterial ausgestattet. Pelletiertes Futter und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Die Raumtemperatur lag bei 20-24°C, die relative Luftfeuchtigkeit bei 45-65%. Der Wechsel zwischen Hell- und Dunkelphase erfolgte alle 12h. Alle Personen, die die Tiere beaufsichtigten oder tierexperimentell tätig waren, hatten vorher die hierfür nötige Qualifikation erworben und erhielten daraufhin die Genehmigung für den Umgang mit Versuchstieren durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) Berlin.

4.5.2 Cpl-1 Applikation

Studiendesign

Zur Bestimmung der nötigen Behandlungsdosis für die intraperitoneale bzw. intratracheale Cpl-1 Applikation wurden C57Bl/6 Mäuse wie unter 3.9 beschrieben infiziert und in jeweils drei Gruppen eingeteilt, denen unterschiedliche Konzentrationen von Cpl-1appliziert wurden:

- Intraperitoneale (i.p) Applikation: 0,01mg, 0,1mg oder 1mg Cpl-1 in 30 µl 0,9%iger NaCl-Lösung pro Tier und Applikation (sechsmalige Applikation)

- Intratracheale (i.t.) Applikation: 100 U, 500 U oder 1000 U Cpl-1 in 25 µl 0,9%iger NaCl-Lösung pro Tier (einmalige Applikation)

Parallel wurde eine Placebo-Kontrollgruppe mitgeführt, die entsprechende sterile 0,9%ige NaCl-Lösung gleichen Volumens erhielt. Die Behandlung begann 24h nach der Infektion und erfolgte bei i.p. Applikation alle 12h. Das klinische Monitoring der Tiere mit Erfassung von Körpertemperatur und Körpergewicht erfolgte 24h nach der Pneumokokken-Infektion alle 12h über max. 10 Tage. Nach Behandlung mit Cpl-1 in einer Konzentration von 1 mg i.p. bzw. 100 U i.t. zeigte sich ein deutlich besserer klinischer Verlauf und in der Folge eine hohe Überlebensrate der Tiere, so dass diese Konzentration für die weiteren Versuche gewählt wurden.

Die folgenden Abbildungen 6 und 7 geben das Therapieschema in der jeweiligen Behandlungsgrupppe wieder. Im Folgenden wird bezeichnet (I) als Therapiegruppe die infizierten und anti-mikrobiell behandelten Tiere und (II) als Kontrollgruppe die infizierten und mit Lösungsmittel behandelten Tiere. Die nicht infizierte Kontrollgruppe schließt die jeweilige mit Cpl-1, Amoxicillin oder Lösungsmittel behandelten Gruppen mit ein.

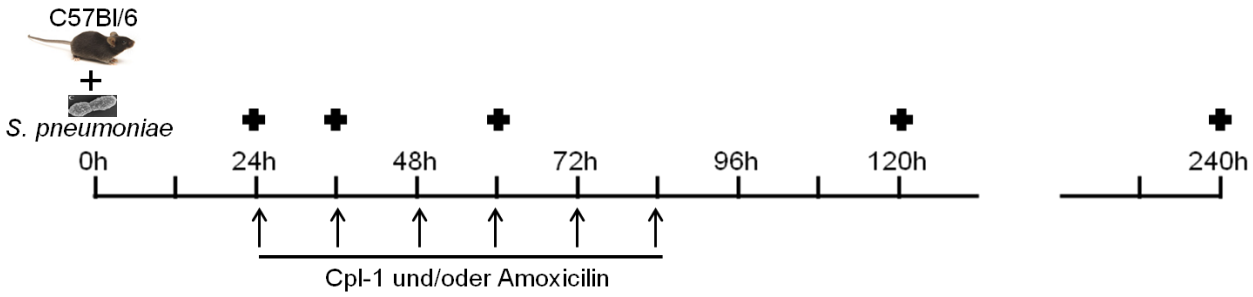


Abbildung 6: **Therapieschema intraperitonal Cpl-1/Amoxicillin Applikation.**

Die Kreuze zeigen die Analysezeitpunkte an:

24h Kontrollgruppe: CFU, Histologie, Zytokine, Lungenfunktion Oxygenierungsindex, mittlerer arterieller Blutdruck

- 30h TherapiegruppeTherapiegruppe: Zytokine

36h Kontrollgruppe:CFU, Histologie, Zytokine, Lungenfunktion Oxygenierungsindex, mittlerer arteriller Blutdruck

Therapiegruppe: CFU, Histologie, Zytokine, Lungenfunktion, Oxygenierungsindex, mittlerer arterieller Blutdruck

60h <u>nicht infizierte Kontrollgruppe:</u> Histologie, Zytokine, Lungenfunktion Oxygenierungsindex, mittlerer arterieller Blutdruck
<u>Kontrollgruppe:</u> CFU, Histologie, Zytokine, Lungenfunktion Oxygenierungsindex, mittlerer arterieller Blutdruck
<u>Therapiegruppe:</u> CFU, Histologie, Zytokine, Lungenfunktion, Oxygenierungsindex, mittlerer arterieller Blutdruck

120h <u>Therapiegruppe:</u> CFU, Histologie, Zytokine,Lungenfunktion, Oxygenierungsindex, mittlerer arterieller Blutdruck

- 240h <u>Therapiegruppe:</u> Histologie, Lungenfunktion

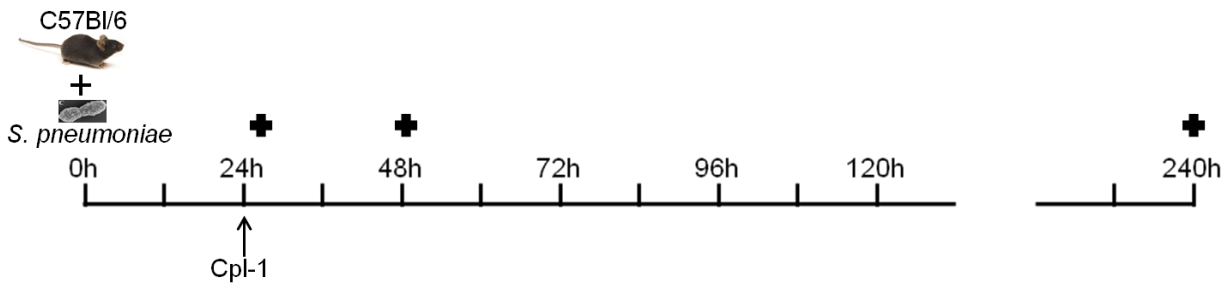


Abbildung 7: **Therapieschema intratracheale Cpl-1 Applikation.**

- 25h <u>Kontrollgruppe:</u> CFU, Histologie, Zytokine
  <u>Therapiegruppe:</u> CFU, Histologie, Zytokine,
- 48h <u>Kontrollgruppe</u>: CFU, Histologie, Zytokine
  <u>Therapiegruppe:</u> CFU Histologie, Zytokine, CFU
  <u>nicht infizierte Kontrollgruppe:</u> Histologie, Zytokine

72h <u>Kontrollgruppe:</u> CFU, Histologie, Zytokine
<u>TherapiegruppeTherapiegruppe:</u> CFU, Histologie, Zytokine

- 240h <u>Therapiegruppe:</u> Histologie

<u>Intraperitoneale Applikation</u>

Für die intraperitoneale Appliaktion wurden die Tiere unter der *laminar flow bench* aus dem Käfig genommen, die vorgesehene Injektionsstelle (rechter unterer Bauchquadrant) mit 70% Ethanol desinfiziert und eine sterile Cpl-1-, Amoxicillin- oder 0,9%ige Natriumchlorid-Lösung (jeweils 30 µl) appliziert.

Intratracheale Applikation von Cpl-1

Für die intratracheale Applikation von Cpl-1 bzw. 0,9%iger NaCl-Lösung wurden die Tiere mit Isofluran für wenige Minuten tief sedert. Hierzu wurden die Tiere in eine „Beatmungsbox“ gelegt. Die Box war über Schläuche mit einem Isofluran Verdampfer, über den die Zufuhr des Narkosegases reguliert wurde, verbunden. Der durchsichtige Deckel der Box ermöglichte eine Beobachtung der Tiere. Sobald das Toleranzstadium der Narkose erreicht wurde, erfolgte die Fixierung des Tieres in Rückenlage auf einer um einen Winkel von ca. 90° verstellbaren, flachen Unterlage. Zur indirekten Ausleuchtung der Luftröhre wurde waagerecht zum Kehlkopf des Tieres eine Kaltlichtquelle verwendet. Die Intubation erfolgte mit einem speziellen Laryngoskop für Kleinnager (Welch Allyn GmbH & CO KG, Jungingen). Als Tubus diente der vordere Teil einer 24G-Venenverweilkanüle. Zur Überprüfung der endotrachealen Tubuslage wurden sowohl die indirekte Beleuchtung als auch Veränderungen der Atmungsmechanik beurteilt. Zur Applikation der jeweiligen Lösung wurde ein Mikrosprayer in die Kanüle eingeführt. Hierdurch entstand bei der Applikation ein Aerosol, was zur homogenen Verteilung der Substanz im Lungengewebe diente. Die Gasnarkose wurde während der Intubation mit einem Nasenaufsatz fortgeführt. Nach Applikation von 25 µl Cpl-1- oder Kontrolllösung erfolgte die Extubation und Entfernung des Laryngoskops aus dem Maulbereich. Während der Aufwachphase wurde das Tier in der „Beatmungsbox“ überwacht und die Umgebungsluft mit Sauerstoff angereichert.

4.5.3 Anzucht von Streptococcus pneumoniae

Ansatz eines Arbeitsstockes

Bakterien der Gattung *Streptococcus pneumoniae* des Serotypes 3 (Stamm NCTC 7978) wurden auf Columbia Blutagarplatten (5% Schafsblut-Zusatz) mittels steriler Einwegöse als Verdünnungsausstrich ausgesät und für 10h bei 37°C und 5% CO_2-Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurde aus zwei bis drei einzeln gewachsenen Kolonien ein Zweitausstrich auf die gleiche Weise angefertigt. Nach einer erneuten Inkubationszeit von 10 Stunden wurden sämtliche Einzelkolonien mit einem sterilen Wattetupfer von der Agarplatte abgenommen und in ein Kryoröhrchen mit Einfriermedium (1,5 ml; 80% THY, 5% YEAST+ 20% Glycerol) überführt. Dieser Arbeitsstock wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Herstellung des Erregernährmediums

Für das Erregernährmedium wurden 30g Bacto™ Todd Hewitt-Bouillon (THY) und 5g Bacto™ Yeast-Extrakt in 1000 ml Aqua dest. gelöst. Das Medium wurde anschließend in Glasflaschen autoklaviert (115°C für 15min) und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Für die Anzucht von *S. pneumoniae* wurde diesem Nährmedium steril gefiltertes (Filtereinheit 30/0,45) fetales Kälberserum (FCS) in einem Verhältnis von 1:10 zugesetzt. Das verwendete FCS wurde zuvor bei 56°C für 30min hitzeinaktiviert und aliquotiert bei -20°C gelagert.

Anzucht

Die Erreger wurden mit einer sterilen Plastiköse aus dem Arbeitsstock auf Columbia Blutagarplatten (5% Schafblut) als Verdünnungsausstrich verbracht und anschließend für 8-10 Stunden im Brutschrank (37°C; 5% CO_2) inkubiert. Einzeln gewachsene Kolonien wurden anschließend von den Platten entnommen und in 20 ml Nährmedium (siehe Punkt 3.5.3) überimpft. Durch Bestimmung der optischen Dichte der Bakteriensuspension mittels Photometer wurde die Zunahme der Erregerkonzentration kontrolliert. Zur Ermittlung der Erregerkonzentration wurde die Extinktion der Erregersuspension bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen steriles Nährmedium als Referenz gemessen. Dabei entspricht eine Veränderung der OD von 0,1 einer Konzentration von $1x10^8$ CFU / ml Nährmedium.

Für die Anzucht wurden in die 20 ml Nährmedium so viel CFU überimpft, bis eine OD von 0,03-0,04 erreicht war. Bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase (OD von 0,3-0,33) wurde die Kokken-Suspension bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert. Die erste OD-Messung zur Kontrolle der Wachstumsgeschwindigkeit erfolgte dabei nach zwei Stunden. Nach Ermittlung des Volumens der Kokken-Lösung wurde die Anzucht durch Zentrifugation (3100 U / min für 10 min) unterbrochen. Der Überstand wurde entsorgt und anhand der zuvor gemessenen OD und des Volumens des Überstandes wurde durch Verdünnung mit PBS eine Lösung mit einer Konzentration von $1x10^9$ CFU / ml hergestellt. Ausgehend von dieser Lösung wurde durch weitere Verdünnungsschritte die für den Versuch nötige Infektionsdosis von $1x10^6$ bzw. $5x10^5$ CFU / ml eingestellt. Zur Kontrolle der Erregerkonzentration in der Infektionslösung

wurde ein mehrfach verdünnter Teil der Lösung auf Blutagarplatten ausgestrichen und später mit dem errechneten Sollwert verglichen. Vor der Infektion wurde die Kokken-Lösung im Verhältnis 1:1mit steriler Hyaluronidase gemischt. Jedes zu infizierende Tier erhielt jeweils 10 µl der Infektionslösung pro Nasenloch appliziert (20 µl / Tier). Den Tieren der nicht infizierten Kontrollgruppe wurden 10 µl PBS pro Nasenloch verabreicht.

Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) wurden mittels Makrodilutionsverfahren (5 ml) in modifizierter Weise nach DIN 58940-BD bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurde, statt der in der Norm vorgesehenen Müller Hinton Bouillon, ein Nährmedium aus Todd-Hewitt +0,5% Yeast und 10% FCS verwendet. Ermittelt wurde die MHK für Penicillin, Amoxicillin, Cefotoxin und Cpl-1. Die Anzucht von *S. pneumoniae* erfolgte wie unter Punkt 3.5 beschrieben. Die verwendeten Antibiotika bzw. das Cpl-1 wurden durch mehrfache Verdünnung (jeweils um den Faktor zwei) von 128 µg/ml auf eine Konzentration von 0,0075 µg/ml eingestellt. Zu den jeweiligen Verdünnungsstufen des Antibiotikums (jeweils 5 ml) wurden 50 µl Keimsuspension (Konzentration von 3 x 10^8 *Cfu*/ml) gegeben. Die Inkubation erfolgte für 20- 24h bei 37°C und 5% CO_2. Die Auswertung wurde durch zwei unabhängige Untersucher durchgeführt. Dabei wurde als MHK die niedrigste Konzentration angesehen, bei der keine Trübung der Bouillon festzustellen war.

4.5.4 *In-vivo* Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*

Vor der Infektion wurden die Tiere unter der Sterilbank aus dem Käfig genommen und markiert, und Körpergewicht sowie rektale Körpertemperatur wurden gemessen und dokumentiert. Anschließend erfolgte eine Analgosedierung durch intraperitoneale Injektion von 60 µl einer Mischung aus isotoner Kochsalzlösung, 90 mg / kg KM Ketamin und15 mg / kg KM Xylazin. Sobald die Tiere ausreichend sediert waren, wurden sie unter der Sterilbank in einer speziellen Vorrichtung senkrecht positioniert. In dieser Position erfolgte bei den zu infizierenden Tieren mit einer Pipette die intranasale Gabe von 10 µl Erregersuspension pro Nasenloch. Bei den Tieren der nicht infizierten Kontrollgruppe wurden in der gleichen Weise 10 µl PBS pro Nasenloch appliziert. Die Zuteilung der Tiere zu der jeweiligen Versuchsgruppe erfolgte zufällig. Im Anschluss an die Infektion wurden die Tiere zurück in ihre Käfige gesetzt, regelmäßig überwacht und nach dem Erwachen in die versuchsbezogene Tierhaltung zurückgebracht.

4.6 Invasive Messverfahren

4.6.1 Lungenfunktionsmessung

Die Lungenfunktionsmessung wurde am offenen Mausthorax durchgeführt. Hierfür wurden die Tiere mit einem Gemisch aus 100 mg / kg KM Ketamin und 20 mg / kg KM Xylazin i.p. tief narkotisiert, das Operationsgebiet mit Braunol® gereinigt und die Maus in Rückenlage in einer speziellen Perfusionskammer (Typ 839, Firma Hugo Sachs Elektronik, March Hugstetten, Deutschland) aus Plexiglas, die im weiteren als künstlicher Thorax diente, fixiert. Die Kammer war so gestaltet, dass sie sowohl eine Überdruck- als auch Unterdruckventilation wie auch eine Perfusion der Lunge über einen Rechtsherzkatheter ermöglichte. Nach der Fixation des Tieres und Tracheotomie erfolgte die Intubation über eine Trachealkanüle mit anschließender maschineller Beatmung (Inspirations-Expirationsverhältnis 1:1, 90 Atemzüge/min, 21% Sauerstoff). Nun wurden eine mediane Laparotomie, Anlage seitlicher Entlastungsschnitte, Ligierung der *A. lienalis* mit Entnahme der Milz, punktuelle Eröffnung des Diaphragmas und intrakardiale Heparinisierung (50 µl Heparin 2500 I. E.) vorgenommen. Anschließend wurde die *V. renalis sinister* für die finale Blutentnahme aufgesucht, punktiert und Blut zur weiteren Untersuchung gewonnen. Das Blut wurde bei 4000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert und das gewonnene Plasma bei -80°C eingefroren. Durch die Punktion der Vene kam es zu einer raschen Entblutung und Tod des Tieres. Vor der Entnahme der Leber wurde die Gallenblase entfernt und verworfen. Nach vollständiger Entfernung des Zwerchfells wurde der Thorax median aufgeschnitten, Verklebungen oder Verwachsungen zwischen Lunge und Thoraxwand gelöst und der vollständig aufgeklappte Thorax mit Nadeln fixiert. Am offenen Thorax wurde der Thymus entfernt, eine Ligatur um die *A. pulmonalis* gelegt sowie das Herz an der Spitze und im Bereich der rechten Herzkammer mittels Inzision eröffnet. Durch die Inzision wurde ein Katheter in die rechte Herzkammer eingeführt, in die *A. pulmonalis* vorgeschoben und dort mit der bereits gelegten Ligatur fixiert. Die Perfusion der Lunge erfolgte für 5min mit steriler und auf 37°C angewärmter 0,9%iger Kochsalzlösung (Flussgeschwindigkeit: 1ml/min). Während der Perfusionsphase wurde die Kammer verschlossen und eine Unterdruckbeatmung (-4,5 zu -9,0 cm H_20) bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Messung von pulmonaler Resistenz und dynamischer Compliance erfolgte eine Minute nach Beginn der Unterdruckbeatmung. Nach der Perfusionsphase und Beendigung der Unterdruckbeatmung erfolgte die Entnahme aller Lungenflügel. Die

Proben wurden entweder nach Entnahme zur späteren Analyse bei -80°C gelagert oder direkt zur Bestimmung der Keimlast, wie unter Punkt 3.13 beschrieben, bei 4°C homogenisiert.

4.6.2 Ermittlung des mittleren arteriellen Blutdrucks

Die Blutdruckermittlung und arterielle Blutentnahme erfolgten zum Zeitpunkt 24 h, 36 h, 60h und 120h nach Infektion in der Therapiegruppe mit systemsicher Cpl-1 Applikation bzw. zum Zeitpunkt 60h nach Scheininfektion der nicht infizierten Tiere der Kontrollgruppe. Zum jeweiligen Versuchsendpunkt wurden die Tiere mittels i.p. Injektion einer in steriler, isotoner Kochsalzlösung verdünnten Mischung aus 90 mg/kg KM Ketamin und 15 mg/kg KM Xylazin (Volumen 60 µl) analgosediert und das Operationsgebiet mit Braunol gereinigt. Nach Eintritt einer ausreichenden Sedierung erfolgte die Tracheotomie, Intubation mit einer Trachealkanüle und nachfolgende Ventilation. Die Beatmung wurde mit 100% O_2 (FiO_2=1), einer Frequenz von 150 Atemzügen/min und einem Atemzugvolumen von 150 µl durchgeführt. Im nächsten Schritt wurde mit Hilfe eines Stereo-Zoom Mikroskopes die linke *A. carotis* freipräpariert und mit zwei Ligaturen versorgt, von der eine in der Gefäßmitte platziert wurde und die andere möglichst weit kranial. Die kranial gelegene Ligatur wurde verschlossen, während die zweite offen blieb. Nun wurde das kaudale Ende des Gefäßes mit einer Klemme verschlossen. Es folgten im oberen Drittel des dargestellten Gefäßes eine Inzision und Platzierung eines mit Heparin gefüllten Katheters, der an einen Druckaufnehmer angeschlossen war. Der Katheter wurde mit der kaudalen offenen Ligatur im Gefäß fixiert. Nach Entfernung der Klemme und Bluteinstrom erfolgte über eine mit dem Druckaufnehmer verbundene Messeinheit die Registrierung des mittleren arteriellen Blutdruckes. Nach Abschluss der Messung wurde der Katheter vom Druckaufnehmer getrennt. Anschließend wurde mittels einer an den Katheter aufgesteckten Spritze Blut entnommen. Unmittelbar nach der Blutentnahme wurde eine Blutgasanalyse und Bestimmung der Laktatkonzentration im Radiometer ABL durchgeführt. Das nicht für die Bestimmung benötigte Blut wurde zentrifugiert (10 min bei 4°C und 4000 rpm) und der Überstand bei -80°C eingefroren. Nach der Blutentnahme wurden unter fortlaufender Beatmung Milz und Leber entnommen und ebenfalls bei -80°C asserviert. Nach Platzierung eines Rechtsherzkatheters und fünf minütiger Spülung mit 0,9%iger NaCl-Lösung wurde die Lunge entnommen und zur späteren Untersuchung ebenfalls bei -80°C gelagert.

4.6.3 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Für die BAL wurde nach Ende der Perfusionsphase der Tubus von der Ventilation diskonnektiert und eine 1 ml Spritze direkt auf den Tubus aufgesetzt. Es folgten zwei gleichmäßige Spülungen mit jeweils 800 µl eiskaltem PBS (plus complete™ Mini, 1 Tbl./10ml) zur Gewinnung der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF). Die gewonnenen Flüssigkeiten beider Spülvorgänge (BALF1 und BALF2) wurden in 5 ml-Polypropylen Tubes überführt und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Zur Bestimmung der Bakterienlast in der BALF wurden 10 µl der Probe pur und in Verdünnungen von 1:10, 1:100, 1:1.000 und 1:10.000 auf Blutagarplatten ausgestrichen. Im Anschluss wurde die BALF zentrifugiert (2200 rpm, 10min, 4°C), der Überstand der BALF1 wurde bis zur weiteren Analyse (Zytokin Assay) bei -80°C bis gelagert.

4.7 Approximative Sterblichkeitsanalyse

In dieser Versuchsreihe wurde Cpl-1, Amoxicillin oder Cpl-1+Amoxicillin unter sterilen Bedingungen in 0,9% NaCl gelöst und jeweils zum Zeitpunkt 24h, 36h, 48h, 60h, 72h und 84h *post infectionem (p.i.)* intraperitoneal appliziert. Vor der Applikation wurde die Punktionsstelle mit 70%igem Alkohol desinfiziert. Die Kontrollgruppe erhielt zeitgleich 30 µl sterile 0,9%ige NaCl-Lösung intraperitoneal. Der klinische Zustand der Tiere wurde bis zum Zeitpunkt 240h *p.i.* alle 12h beobachtet und dokumentiert. Ferner wurden Körpergewicht und Körpertemperatur erfasst.

Die Beurteilung des Gesundheitszustandes der Tiere erfolgte gemäß Tab. 6. Bei Versuchsabbruch fand eine Euthanasie mittels i.p. Injektion einer in isotoner Kochsalzlösung verdünnten Mischung aus 360mg/kgKM Ketamin und 60 mg/kgKM Xylazine (Volumen 800 µl) statt. Die Tierkadaver wurden autoklaviert und in den Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité fachgerecht entsorgt.

Das Vorgehen wurde vor Beginn der Experimente im Detail mit der Tierschutzbeauftragten der Charité und der Tierschutzbehörde im Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) Berlin abgestimmt.

Tabelle 6: **Handlungsanweisungen zur klinischen Beurteilung von infizierten Tieren**

Tier isoliert sich	A
Struppiges Fell	A
Verstärkte Atmung	A
Tier vermeidet Bewegung	A
Teilnahmslosigkeit	A
Keuchen	B
Krämpfe, Torkeln, Apathie	B
Schmerzen (gekrümmte Haltung, Laufen auf Zehenspitzen)	B
Blässe (Augen, Ohren)	B
Schmerzen beim Anfassen	B
Bauch hart oder gespannt	B
Hautfalten bleiben stehen	B
Abnahme von mehr als 20% der Körpermasse	C

A:Das Tier weiter beobachten; B: In Kombination mit Schmerzen oder Blässe das Tier unverzüglich einschläfern; C: Das Tier unverzüglich einschläfern.

4.8 Multiplex-Analyse der Zytokinproteinexpression

Aufreinigung der Lungenproben

Zur Bestimmung von Zytokinen aus Lungengewebe wurde zunächst der zelluläre Anteil entfernt. Hierzu wurden die Lungenproben in gefrorenem Zustand geteilt, gewogen und anschließend in einer mit kleinen Keramikkugeln gefüllten Eppendorf-Tube verbracht. Die Zerkleinerung des Gewebes erfolgt in einer speziellen Zentrifuge (FastPrep®) bei 300 rpm für 30 sec. Anschließend wurden die Proben zweimal zentrifugiert und jeweils der Überstand abpipettiert. Die Proteinkonzentrationsbestimmung im Überstand erfolgt mittels Proteinbestimmung nach Bradford.

Allgemeines zur Methode

Die Multiplex-Protein-Analyse ermöglicht es, simultan mehrere Zytokine in einer Probe zu bestimmen und zu quantifizieren. Zur Detektion der Zytokine werden Antikörper verwendet, die an Polystyrenkügelchen (Beads) gekoppelt sind. An Hand der eigenen Fluoreszenz der Kügelchen können die jeweiligen Zytokine/Chemokine im Durchflusszytometer (Bio-Plex Array Reader) identifiziert werden. Die Quantifizierung der jeweiligen Zytokine erfolgt mittels eines zweiten Antikörpers. Der biotinylierte Antikörper bindet an ein anderes Epitop des Zytokins. Diese Bindung wird über Phycoerythrin(PE)-gekoppeltes Streptavidin quantifiziert. Durch Vergleich der Intensität der PE-Fluoreszenz mit aus Standardkonzentrationen abgeleiteten Kurven lässt sich die Konzentration des vorhandenen Zytokins/ Chemokins in der untersuchten Probe bestimmen (Quantität).
Der Bio-Plex Array Reader verwendet zur Messung der verschiedenen Beads einen roten Laser (635 nm) und misst mittels grünem Laser (532 nm) die PE-vermittelte Emission der jeweiligen Beads.

Durchführung

Es wurden acht Zytokine (IL-1β, IL-6, IL-10, G-CSF, KC, MCP-1, MIP-1α und Inferferon γ) im Plasma- und im Lungengewebe, und IL-1β, IL-6 in der BALF bestimmt.
Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerprotokoll (*Bio-Plex*™ Cytokine Assay, BD). Die Zytokinstandards wurden für 2-3 min gründlich durchmischt und anschließend in 50 µl sterilem Aqua dest. aufgelöst. Nach einer 30-minütigen Lagerung auf Eis wurden 450 µl standard diluent hinzugefügt. Für eine Standardkurve wurde die im Kit enthaltene Stocklösung (500 ng/ml) in standard diluent auf folgende Konzentrationen verdünnt: 32.000 pg/ml; 16.000 pg/ml; 8.000 pg/ml; 2.000 pg/ml; 500 pg/ml; 125 pg/ml; 31,5 pg/ml; 7,8 pg/ml und 1,95 pg/ml. Die Serumproben wurden mit Serum Diluent und die Lungenhomogenate mit Sample Diluent so lange verdünnt, bis ein Proteingehalt von 100 µg/µl erreicht war. Die Vertiefungen einer 96-Loch *Bio-Plex*™ flat-bottom Platte wurden mit 100 µl Assay Buffer A befeuchtet und anschließend mittels Vakuumabsauggerät (Sog 1-2 mmHg) durch einen Filter am Boden abgesaugt. Die Mikropartikellösung wurde für 2-3 min aufgeschüttelt. 240 µl der Lösungen wurden mit 5760 µl Assay Buffer A gemischt und jeweils 50 µl in jedes Loch gegeben. Es folgten zwei Waschschritte mit jeweils 100 µl Wash Buffer A, wobei der Filter im Boden der Platte ein Ausschwemmen der Kügelchen verhinderte. Nun wurden in jedes Loch (well)

50 µl der Standardverdünnung und 50 µl der zu messenden Probe gegeben. Das unbehandelte Medium diente als Negativkontrolle. Die Platte wurde mit Alufolie abgedeckt und bei Raumtemperatur für 1 min bei 1000 rpm und dann für 90 min bei 300 rpm auf einer Rüttelplatte inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein dreimaliges Waschen mit 100 µl Wash Puffer A wie oben beschrieben. Der Zytokindetektionsantikörperansatz wurde in 288 µl Antibody Diluent aufgelöst. Es wurden 25 µl pro Loch dazu gegeben. Die Platten wurden wie oben beschrieben inkubiert und danach gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurden die Streptavidin-PE-Moleküle 1:100 mit Assay Buffer A verdünnt und jeweils 50 µl pro Loch aufgetragen. Die Platte wurde wie oben beschrieben für 10-30 min inkubiert und anschließend gewaschen. Zuletzt wurden in jedes Loch 125 µl Assay Buffer A gegeben. Die Proben wurden bis zur Messung im Kühlschrank aufbewahrt. Vor der Messung wurden die Platten nochmals 30 Sekunden bei 1100 rpm geschüttelt.

Auswertung

Die einzelnen Standardkurven der verschiedenen Zytokine wurden automatisch berechnet. Mit Hilfe der Standardkurven wurden die Zytokinkonzentrationen in den Proben ermittelt. Dabei musste der jeweilige Verdünnungsfaktor der Probe dem Programm vorgegeben werden, für Plasma 1:4 und Lunge 1:10. Die Messung der Proben erfolgte im *Bio-Plex Array Reader.*

4.9 Bestimmung der Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten

Es wurden die Bakterienkonzentrationen in Lunge, Blut, Leber und Milz bestimmt. Dazu wurden die entnommenen Organe zunächst grob mittels Präparierschere zerkleinert und anschließend durch ein Zellsieb BD Falcon™ (100 µm) gepresst. Die zerkleinerten Gewebeproben wurden in 20 ml PBS aufgenommen. 10 µl Suspension bzw. 5 µl des Blutes wurden unverdünnt sowie in einer Verdünnung mit steriler PBS-Lösung von 1:10, 1:100 und 1:1000 auf Blutagarplatten (Columbia plus 5% Schafsblut) aufgetragen. Das Organhomogenat aus der Milz wurde pur und in verschiedenen Verdünnungen ausgestrichen. Die BALF (10 µl) und das Blut (5 µl) wurden pur und ebenfalls in den Verdünnungen von 1:10, 1:100, 1:1.000 und 1:10.000 ausgestrichen. Die Platten wurden für 16h im Brutschrank (37°C, 5% CO2) inkubiert. Die *CFU* wurden unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung bestimmt. Um eine möglichst genau

Auszählung zu ermöglichen, wurden nur Verdünnungsschritte ausgewertet, bei denen sich weniger als 50 *CFU* / Platte zeigten.

4.10 Paraffinfixierung und Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Für die Histologie wurden die Lungen (wie unter Punkt 3.10.1) beschrieben präpariert und frei von Blut gespült. Anschließend wurden die Lungen mit Trachea und Herz von der Thoraxwand frei präpariert und zur Fixation für 15 min intratracheal mit 4% Paraformaldehyd (pH 7,3, Druck: 15 cmH_2O) instilliert. Danach wurde die *Trachea* Lungen-nah mit einer Ligatur verschlossen. Zur weiteren Fixierung wurden die Lungen für 22-24h bei 4°C in gepufferter 4%iger Paraformaldehydlösung gelagert. Anschließend erfolgte die Lagerung der Proben in PBS bei 4°C bis zur weiteren Bearbeitung. Für die Histologie wurden die fünf Lungenflügel einzeln in Paraffin eingebettet. Dazu wurden die Organe über eine aufsteigende Alkoholreihe (45min 50% Ethanol; 45min 95% Ethanol; 2,25h 100% Ethanol; 2,25h Intermedium) entwässert und anschließend in Paraffin für 2h bei 65°C inkubiert und mit einer Paraffingießstation in eine Form eingebettet. Nach dem Aushärten des Paraffins auf einer Eisplatte wurden die Blöcke bis zur Herstellung der Schnitte bei 4°C gelagert. Pro Lungenflügel wurden Serienschnitte mit 2µm Stärke mittels eines Serienschnittmikrotoms angefertigt und auf Objektträger überführt.

Die Hämatoxylin/Eosin (H&E)-Färbung erfolgte zur Darstellung zellulärer Bestandteile und wurde durchgeführt, um histopathologische Veränderungen in der Mauslunge während der Pneumonie bzw. Behandlung beurteilen zu können. In dieser Färbung erscheinen Zellkerne, grampositive Bakterien und Knorpelsubstanz blau, Cytoplasma, Kollagenfasern und Erythrozyten rot. Für die Färbung wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert (3 x 5 min) und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (Rotihistol: Ethanol 1:2 für 1min; Ethanol absolut für 2 x 5min; kurz schwenken in Ethanol absolut, 96% Ethanol, 80% Ethanol und 40% Ethanol) bewässert. Nach 5-minütigem Spülen in Aqua dest. erfolgte die Färbung durch Hämatoxylin für 10min. Das Gewebe wurde anschließend unter laufendem Wasser (10min) von überschüssigem Farbstoff gereinigt und für 2min in Aqua dest. inkubiert. Die Schnitte wurden nun mit 80%igem Ethanol behandelt, bevor die Färbung mit Eosin für 10min erfolgte. Nach der Gegenfärbung mit Eosin wurden die Gewebsschnitte abermals mit Wasser gespült und für 2min in A. dest. gelegt. Es folgte eine Entwässerung mittels aufsteigender

Alkoholreihe (2 x 2min in 96% Ethanol und 3 x 2 min in 100% Ethanol). Die Serienschnitte der verschiedenen Lungenlappen wurden unter einem Lichtmikroskop (Zeiss, Jena) von Herrn Prof. Dr. Tschernig, Institut für Anatomie, Zellbiologie und Entwicklungsbiologie, Universität des Saarlandes, hinsichtlich der Entzündungsreaktion begutachtet und mittels Digitalkamera dokumentiert.

4.11 Statistische Datenanalyse

Die Anwendung statistischer Testverfahren ermöglicht es, die Wahrscheinlichkeit der zufälligen Verteilung der Ergebnisse einzuschätzen. Für die hier verwendeten Tests wurde ein signifikanter Unterschied bei einer Fehlerwahrscheinlichkeit von $p<0,05$ angenommen, wobei jeweils das genaue Signifikanzniveau als p-Wert angegeben wurde. Die Auswertung wurde mit GraphPad Prism® 4.0 (Graph Pad Software Incorporated, San Diego, California, USA) durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. Gruppenvergleiche wurden mit dem Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Die Überlebenskurven wurden mit Kaplan-Meier dargestellt und mit einem log- rank Test analysiert.

5 Ergebnisse

5.1 Die intraperitoneale Behandlung mit Cpl-1, Amoxicillin oder einer Kombinationstherapie aus beiden Substanzen verringerte die Bakterienlast im Lungengewebe

In der vorliegenden Arbeit wurde die anti-mikrobielle Wirkung von Cpl-1, Amoxicillin und einer Kombinationsbehandlung aus beiden Substanzen in einem murinen Pneumonie-Modell getestet. Die Tiere wurden mit einer letalen Dosis von $1x10^6$ CFU/Tier penicillin-sensiblen *S. pneumoniae* infiziert. 24h *post infectionem* (p. i.) wurde mit der intraperitonealen Behandlung mit Kontrolllösung (0,9%ige NaCl-Lösung), Cpl-1, Amoxicillin oder Cpl-1 und Amoxicillin begonnen. Die Bakterienlast pro Lunge wurde in der Kontrollgruppe 24h, 36h und 60h nach Infektion bestimmt. In den Gruppen mit anti-mikrobieller Behandlung erfolgte zusätzlich eine Untersuchung 120h nach Infektion.

In der mit Cpl-1 behandelten Gruppe kam es zwölf Stunden nach der ersten Applikation zu einer signifikanten Reduktion der Bakterienlast (siehe Abb. 7) im Vergleich zur infizierten Kontrollgruppe (36h p. i.) ($p<0,01$) und zum Therapiebeginn (24h p. i.) ($p<0,05$).

Die Kombinationstherapie aus Amoxicillin und Cpl-1 führte zu einer vergleichbaren Reduktion der Bakterienlast 36h p. i. ($p<0,01$) (bzw. 24h p. i. ($p<0,01$). In der alleine mit Amoxicillin behandelten Gruppe zeigte sich eine Reduktion der Bakterienlast um eine logarithmische Einheit im Vergleich zur Kontrollgruppe 36h p. i. ($p<0,01$). Die Bakterienlast im Lungengewebe der anti-mikrobiell behandelten Mäuse war 60h nach Infektion im Mittel um vier logarithmische Einheiten geringer im Vergleich zu den Kontrolltieren ($p<0,01$) zu diesem Zeitpunkt, wobei die gleichzeitig mit Amoxicillin und Cpl-1 behandelten Tiere zu diesem Zeitpunkt eine signifikant geringere Bakterienlast im Vergleich zur jeweiligen Monotherapie (Cpl-1 $p<0,05$; Amoxicillin $p<0,01$) aufwiesen. Im weiteren Beobachtungszeitraum bis 120h nach Infektion zeigte sich in den mit Cpl-1 alleine oder in Kombination antimikrobiell behandelten Gruppen weiterhin eine signifikante Reduktion der Bakterienanzahl im Lungengewebe im Vergleich zum Zeitpunkt 24h nach Infektion ($p<0,01$) (siehe Abb. 7).

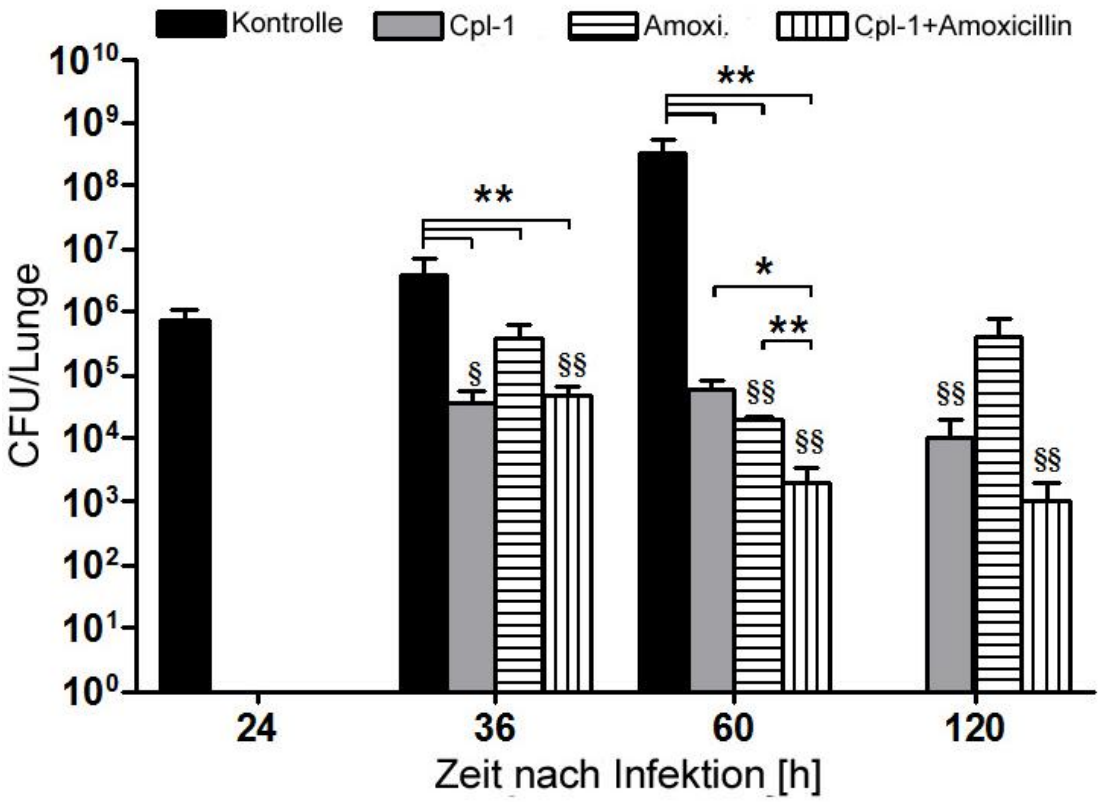


Abbildung 8: **Bakterienlast im Lungengewebe.** C57Bl/6 Mäuse wurden intranasal mit 1x10^6 CFU/Tier *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) infiziert. Nach 24h erfolgten bis zu sechs (120h Gruppen) i.p. Applikationen von Kontrolllösung, 1 mg Cpl-1, 0,4 mg Amoxicillin oder Cpl-1 und Amoxicillin in Kombination im Abstand von 12h. In der Kontrollgruppe erfolgte die Bestimmung der Bakterienlast 24h, 36h und 60h und in den Therapiegruppen zu den Zeitpunkten 36h, 60h und 120h nach Infektion. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM (n=6-7 pro Gruppe) angegeben. *p<0,05; **p<0,01 zwischen den angezeigten Gruppen; §p<0,05; §§p<0,01 im Vergleich zum 24h Wert der Kontrollgruppe. CFU = Colony forming units.

5.2 Die intraperitoneale Behandlung mit Cpl-1, Amoxicillin oder der Kombinationstherapie verhinderte die Translokation von Bakterien ins Blut

C57Bl/6 Mäuse wurden mit 1x10^6 CFU/Tier *S. pneumoniae* infiziert. 24h nach Infektion erfolgte im Abstand von 12h die intraperitoneale Applikation von Cpl-1, Amoxicillin oder einer Kombination beider Substanzen. Die Bakterienlast pro µl Blut wurde in der Kontrollgruppe 24h, 36h und 60h nach Infektion bestimmt. In den Gruppen mit anti-mikrobieller Behandlung erfolgte zusätzlich eine Untersuchung 120h nach Infektion. In

der Kontrollgruppe waren ab dem Zeitpunkt 36h nach Infektion bei allen Tieren Bakterien im Blut nachweisbar (siehe Abb. 8). In der mit Cpl-1 behandelten Gruppe waren 60h nach Infektion bei einigen Tieren Bakterien im Blut nachweisbar. In der mit Amoxicillin behandelten Gruppe waren vereinzelt Bakterien zum Zeitpunkt 36h und 120h nach Infektion nachweisbar. In der mit Cpl-1 und Amoxicillin gleichzeitig behandelten Gruppe waren während des gesamten Beobachtungszeitraums keine Bakterien im Blut nachweisbar.

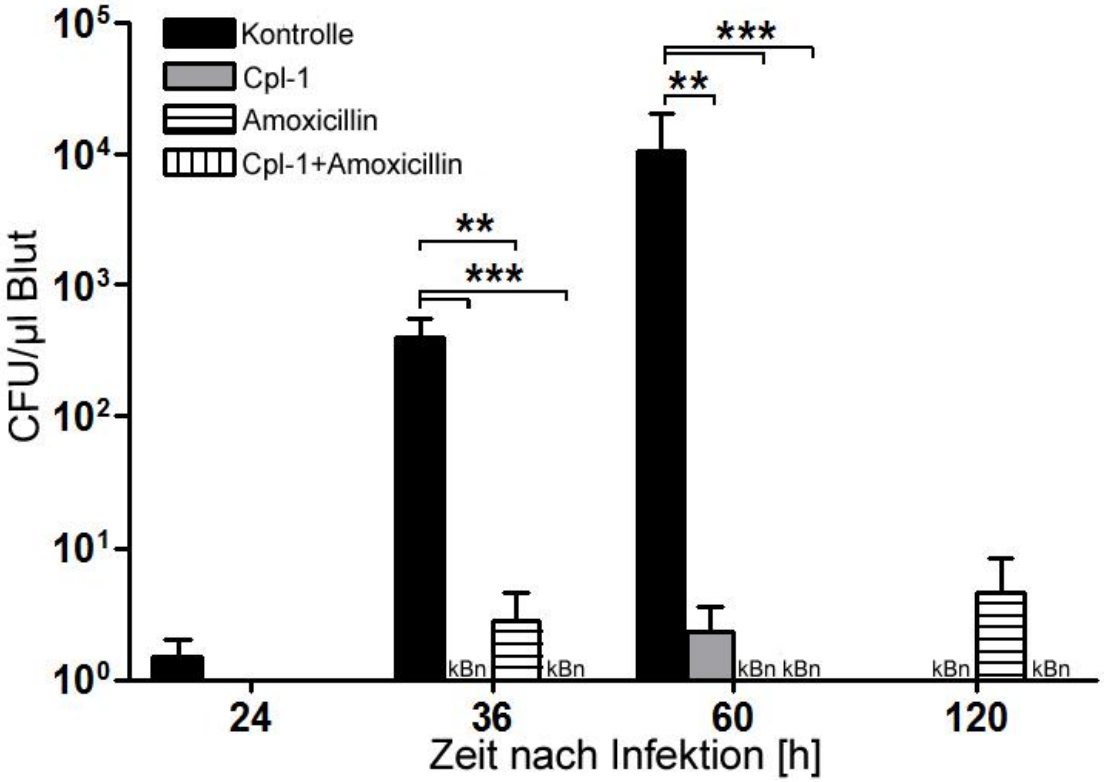


Abbildung 9: **Bakterienlast im Blut.** C57Bl/6 Mäuse wurden intranasal mit $1x10^6$ CFU/Tier *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) infiziert. Nach 24h erfolgten bis zu sechs (120h Gruppen) i.p. Applikationen von Kontrolllösung, 1 mg Cpl-1, 0,4 mg Amoxicillin oder Cpl-1 und Amoxicillin in Kombination im Abstand von 12 h. In der Kontrollgruppe erfolgte die Bestimmung der Bakterienlast 24h, 36h und 60h nach Infektion, in den TherapiegruppeTherapiegruppen zu den Zeitpunkten 36h, 60h und 120h nach Infektion. Zu den angebenden Zeitpunkten wurde aus venösem Blut die Bakterienlast bestimmt. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM (n=6-7 pro Gruppe) angegeben. kbn = keine Bakterien nachgewiesen. **p<0,01;***p<0,001 zwischen den angezeigten Gruppen.

5.3 Die intraperitoneale Applikation von Cpl-1 reduzierte die Einschränkung des pulmonalen Gasaustausches im Verlauf einer Pneumokokken-Pneumonie

Die akuten pathophysiologischen Veränderungen während einer Pneumokokken-Pneumonie haben Einfluss auf die Gasaustauschfunktion der Lunge. Zur Beurteilung der Gasaustauschfunktion in der Lunge kann der Oxygenierungs-Quotient (PaO_2 / FiO_2) dienen. Um die Wirkung einer Behandlung mit Cpl-1 auf die Gasaustauschfunktion während der Pneumonie zu untersuchen, wurden Mäuse intranasal mit $1x10^6$ CFU/Tier *S. pneumoniae* infiziert, die nicht infizierten Kontrollmäuse erhielten in gleicher Weise steriles PBS. Der Oxygenierungs-Quotient wurde bei den Kontrolltieren 24h, 36h und 60h nach der Infektion gemessen bzw. 60h bei den nicht infizierten Kontrolltieren. Bei den mit Cpl-1 behandelten Tieren wurden die Werte zu den Zeitpunkten 36h, 60h und 120h nach Infektion bestimmt. 24h nach Infektion zeigte sich in der infizierten und nicht anti-mikrobiell behandelten Kontrollgruppe ein signifikant geringerer Oxygenierungs-Quotient ($p<0,05$) im Vergleich zu der nicht infizierten Kontrollgruppe (siehe Abb. 9). In der mit Cpl-1 behandelten Gruppe zeigte sich 12h nach erstmaliger Applikation (36h *p. i.*) ein leichter, nicht signifikanter Abfall des Oxygenierungs-Quotient im Vergleich zu den infizierten Kontrolltieren. Zum Zeitpunkt 60h nach Infektion lag der Oxygenierungs-Quotient der infizierten Kontrollgruppe unter 300 mmHg (siehe Abb. 8) und damit definitionsgemäß im Bereich des milden bis moderaten Lungenschadens (ARDS). Im Vergleich zu dieser Gruppe zeigten die Cpl-1 behandelten Tiere 60h nach Infektion einen signifikant ($p<0,01$) höheren Oxygenierungs-Quotient. Der Oxygenierungs-Quotient in der Gruppe der mit Cpl-1 behandelten Tiere war zum Zeitpunkt 120h nach Infektion im Mittel über dem Wert 24h nach Infektion, jedoch tendenziell unterhalb der nicht infizierten Kontrolltiere. Die mit Cpl-1 behandelten Tiere zeigten zu keinem der untersuchten Zeitpunkte Werte für den Oxygenierungs-Quotient, die per Definition im Bereich einer akuten Lungenschädigung (ARDS) lagen.

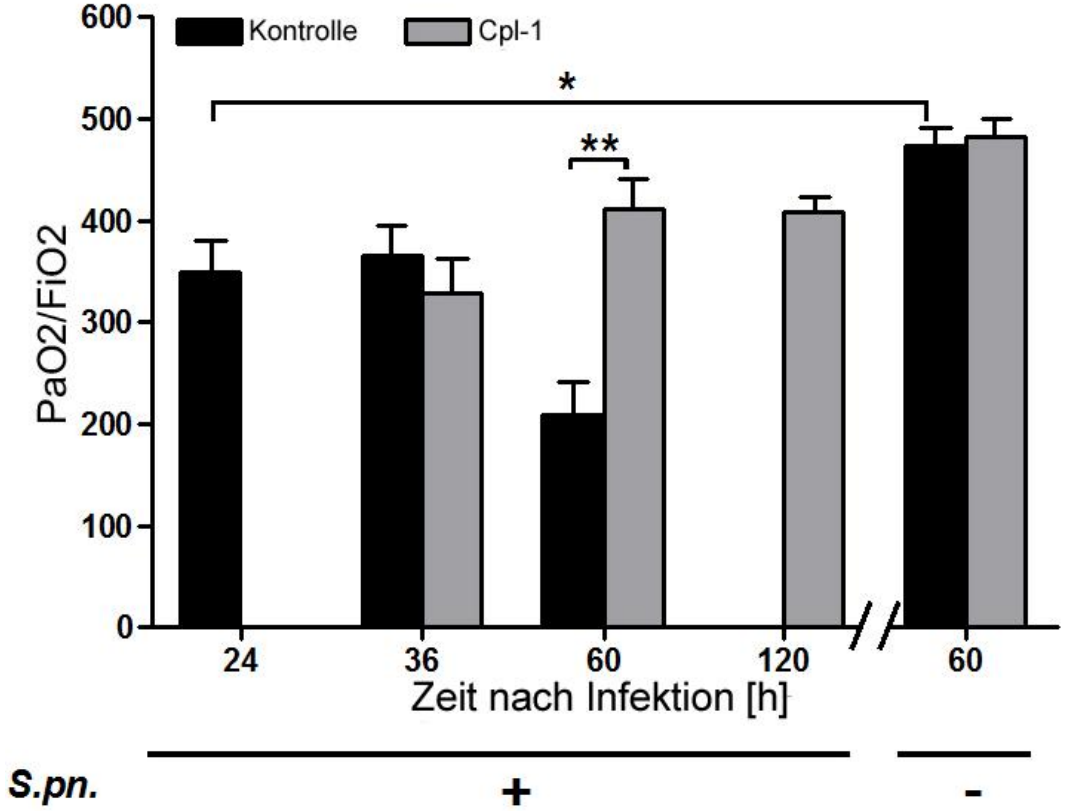


Abbildung 10: **Einfluss der Cpl-1 Gabe auf den Oxygenierungs-Quotient.** C57Bl/6 Mäuse wurden intranasal mit $1x10^6$ CFU/Tier *S. pneumoniae* (S.pn.) infiziert. Die nicht infizierten Kontrolltiere erhielten steriles PBS intranasal. Nach 24h erfolgten bis zu sechs (120h Gruppe) i.p. Applikationen von Kontrolllösung oder 1 mg Cpl-1 im Abstand von 12h. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Tiere narkotisiert, tracheotomiert und mit 100% Sauerstoff beatmet. Die finale Blutentnahme erfolgte durch einen in der A. carotis liegenden Katheter. Der PaO_2 wurde unmittelbar im Anschluss an die Entnahme durch eine Blutgasanalyse bestimmt. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM angegeben (n=6-7 pro Gruppe). Der Oxygenierungs-Quotient ist als PaO2/FiO2 dargestellt. FiO2 = 100%. (S.pn. +) = mit *S. pneumoniae* infizierte Tiere; (S.pn. -) = nicht infizierte Tiere. *p<0,05; **p<0,01 zwischen den angezeigten Gruppen.

5.4 Die intraperitoneale Behandlung mit Cpl-1 reduzierte den Abfall der dynamischen Lungencompliance im Verlauf einer Streptokokken-Pneumonie

Durch den Entzündungsprozess während einer Pneumonie verändert sich die Atmungsmechanik. Quantifizierbar ist dies anhand der Veränderung der dynamischen Lungencompliance (C_{dyn}). Um den Einfluss der Behandlung mit Cpl-1 auf die dynamische Lungencompliance zu untersuchen, wurden Mäuse wie zuvor beschrieben mit $1x10^6$ CFU/Tier von *S. pneumoniae* infiziert und anschließend behandelt. Die Mäuse der nicht infizierten Kontrollgruppe erhielten steriles PBS intranasal. Die dynamische Compliance wurde im Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge zu folgenden Zeitpunkten gemessen: Nicht anti-mikrobiell behandelte Kontrolltiere 24h, 36h und 60h nach Infektion; nicht infizierte Kontrolltiere 60h nach Scheininfektion; Cpl-1 bzw. Amoxicillin behandelte Tiere: 36h, 60h und 120h nach Infektion. Die Applikation von Cpl-1 oder Amoxicillin bei nicht infizierten Tieren hatte keinen Einfluss auf die C_{dyn}. Zum Zeitpunkt 24h nach Infektion zeigte sich ein signifikanter ($p<0,01$) Abfall der C_{dyn} im Vergleich zu den nicht infizierten Tieren der Kontrollgruppe (siehe Abb.10). Zum Zeitpunkt 60h nach Infektion zeigten die mit Cpl-1 behandelten Tiere einen signifikant ($p<0,001$) höheren C_{dyn}-Wert als die Tiere aus der infizierten Kontrollgruppe.

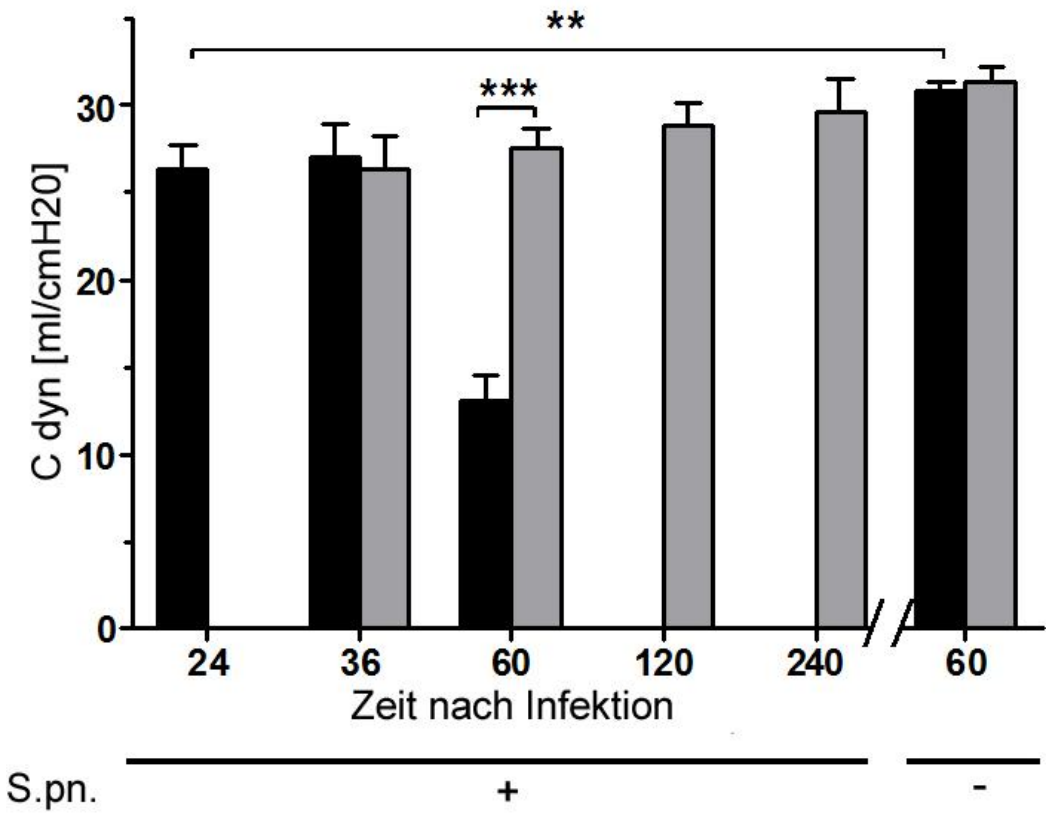


Abbildung 11: **Lungencompliance unter Behandlung mit Cpl-1.** C57Bl/6 Mäuse wurden intranasal mit $1x10^6$ CFU/Tier von *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) infiziert. Die nicht infizierten Kontrolltiere erhielten steriles PBS intranasal. 24h nach Infektion erfolgten bis zu sechs (120h Gruppen) i.p. Applikationen von Kontrolllösung oder 1 mg Cpl-1 im Abstand von 12h. Die Bestimmung der dynamischen Compliance (C dyn) erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten im Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM dargestellt (n=5-6 pro Gruppe). **p<0,01;***p<0,001 zwischen den angezeigten Gruppen.

5.5 Die intraperitoneale Behandlung mit Cpl-1 führte zu einem Rückgang der Entzündungsreaktion im Lungengewebe

Die akute Entzündungsreaktion während einer Pneumonie beinhaltet eine Infiltration von neutrophilen Granulozyten und die Entstehung eines interstitiellen und pulmonalen Ödems. Der Grad beider Prozesse ist ein wichtiger prognostischer Parameter im Verlauf der Pneumonie (9). Um den Einfluss von Cpl-1 auf die akute

Entzündungsreaktion im Lungengewebe zu untersuchen, wurden histologische Begutachtungen zu folgenden Zeitpunkten durchgeführt: Nicht behandelte anti-mikrobiell behandelte Kontrolltiere 24h, 36h und 60h nach Infektion; nicht infizierte Kontrolltiere 60h nach Scheininfektion; Cpl-1 behandelte Tieren 36h, 60h, 120h und 240h nach Infektion. Die Tiere der nicht infizierten Kontrollgruppen zeigten unabhängig von der jeweiligen Behandlung keine histopathologischen Veränderungen (Daten nicht gezeigt). Fokale Entzündungsreaktionen wie perivaskuläre Ödeme und interstitielle wie auch alveoläre neutrophile Zellinfiltrationen (siehe Sterne in Abb. 11 B, C) waren 24h, 36h und 60h nach Infektion nachweisbar. In der mit Cpl-1 behandelten Gruppe war im Vergleich zur unbehandelten Gruppe ein Rückgang der Entzündungszeichen 60h nach Infektion nachweisbar (Abb. 11 E). Bei der Betrachtung 120h nach der Infektion und 36h nach der sechsten und letzten anti-mikrobiellen Behandlung war in der Cpl-1 behandelten Gruppe kein Wiederauftreten einer Entzündungsreaktion nachweisbar. Der histologisch nachweisbare Rückgang der Entzündungsreaktion war in beiden Behandlungsgruppen vergleichbar stark ausgeprägt. Bei der Betrachtung 240h nach Infektion bzw. 156h nach der letzten Applikation waren die histologischen Anzeichen der Entzündung in der mit Cpl-1 behandelten Gruppe vollständig aufgehoben.

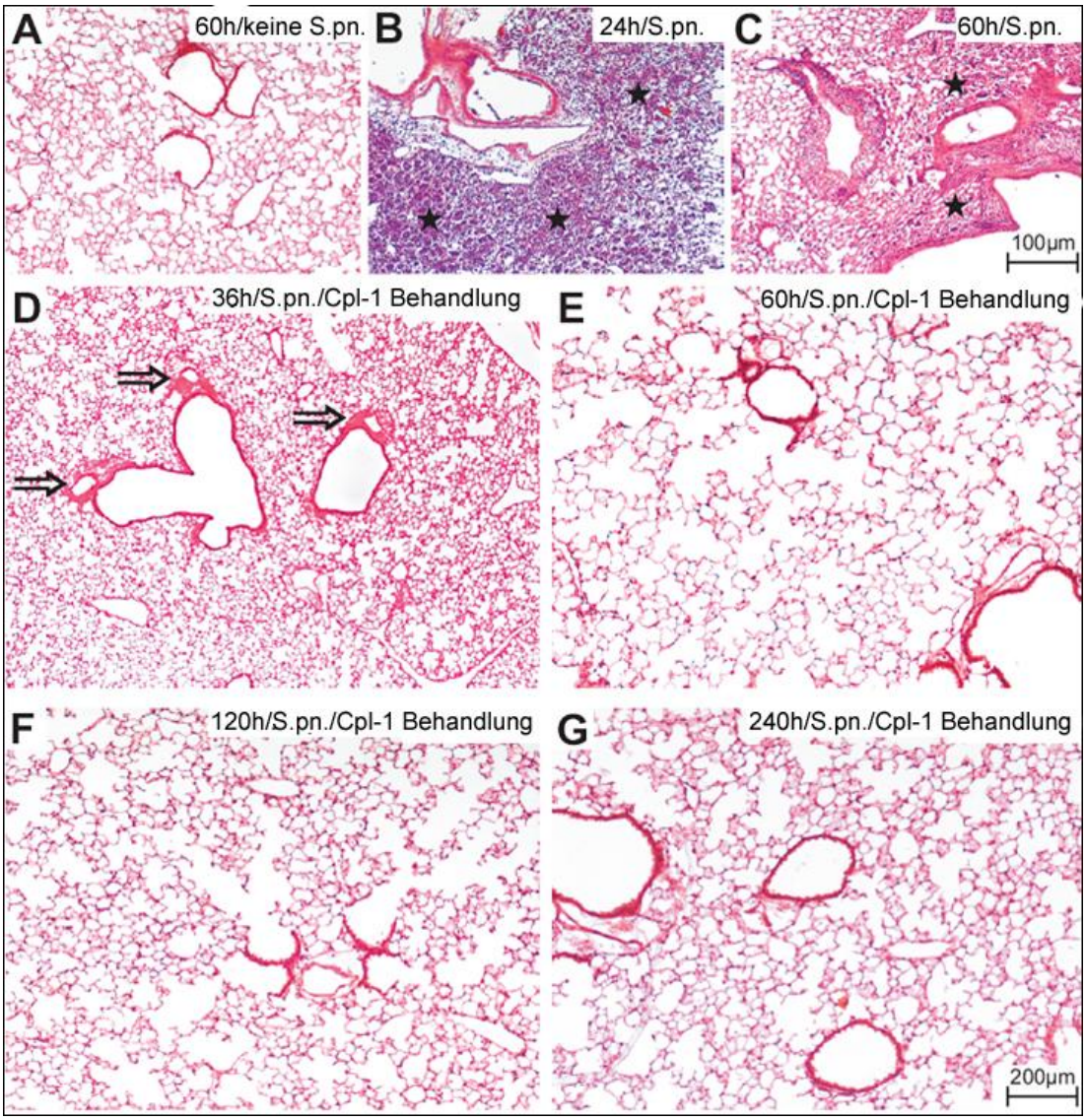


Abbildung 12: **Histologische Veränderungen im Lungengewebe nach Cpl-1 Behandlung.** C57Bl/6 Mäuse wurden mit $1x10^6$ CFU/Tier *S. pneumoniae* (S.pn.) infiziert. Nach 24h erfolgten bis zu sechs (120h Gruppe) i.p. Applikationen von 1 mg Cpl-1 bzw. Kontrolllösung im Abstand von 12h. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurden die Lungen entnommen, mit Paraformaldehyd transtracheal (10 cm H2O für 10min) gefüllt und Paraffinschnitte angefertigt. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen H&E-gefärbter Schnitte. In jeder Gruppe wurden 4-6 Lungen untersucht. Die Pfeile deuten auf perivaskuläres Ödem. (A) Keine S.pn.= Gewebe von nicht infizierten Tieren 60h nach Scheininfektion; (B-C) Lungengewebe 24h bzw. 60h nach Infektion; (D-G) Lungengewebe nach der Applikation von Cpl-1 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion. Die Sterne deuten auf Zellinfiltrate, die Pfeile auf perivaskuläre Ödeme.

5.6 Die intraperitoneale Behandlung mit Cpl-1 verhinderte einen septischen Verlauf der Pneumokokken-Pneumonie

Um das klinische Bild einer im Verlauf der Pneumonie auftretenden Sepsis bzw. schweren Sepsis erfassen zu können, wurden bei den Kontrolltieren zu den Zeitpunkten 24h, 36h und 60h nach der Infektion die Laktat-Konzentration im Blut (siehe Abb. 12) sowie der mittlere arterieller Blutdruck (MABP)(siehe Abb. 13) erfasst. Bei den mit Cpl-1 behandelten Tieren wurden die Werte zu den Zeitpunkten 36h, 60h und 120h nach Infektion bestimmt. Die Applikation von Cpl-1 alleine hatte keinen Einfluss auf den Laktatwert oder MABP bei den nicht infizierten Tieren. Die Infektion führte nach 24h zum Abfall des MABP (siehe Abb. 13) im Vergleich zu der nicht infizierten Kontrollgruppe, wobei kein Unterschied in der Laktat-Konzentration zwischen den Gruppen zu verzeichnen war (siehe Abb. 12).

Dagegen zeigte sich 60h nach Infektion in der Kontrollgruppe eine ausgeprägte Bakteriämie (siehe Abb. 7), ein mittlerer Laktatwert von 3 mmol/L und ein reduzierter MABP von 40 mmHg. In der mit Cpl-1 behandelten Gruppe gab es keine Hinweise für einen septischen Verlauf der Pneumonie oder für konsekutive Organschädigung.

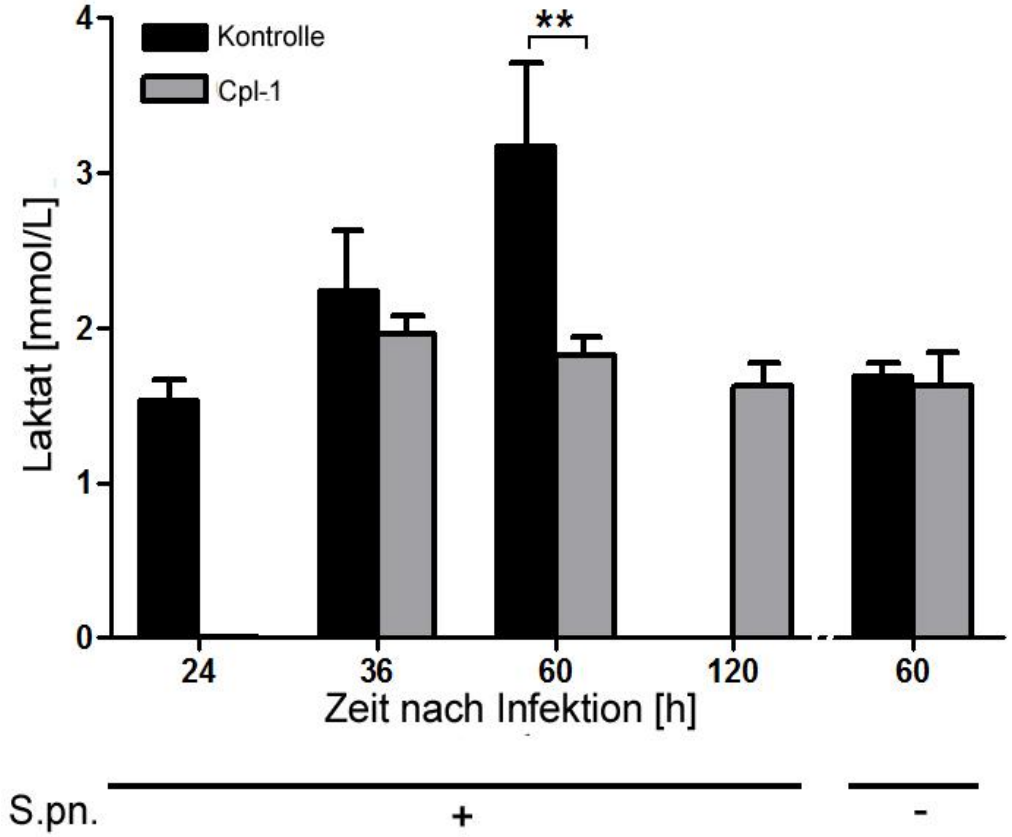


Abbildung 13: **Verlauf des Laktatwertes unter Cpl-1 Gabe.** C57Bl/6 Mäuse wurden intranasal mit 1x 10^6 CFU/Tier *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) infiziert. Die nicht infizierten Kontrolltiere erhielten PBS intranasal. Nach 24h erfolgten bis zu sechs (120h Gruppe) i.p. Applikationen von 1 mg Cpl-1 bzw. 0,9%ige NaCl-Lösung im Abstand von 12h. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Tiere narkotisiert, tracheotomiert und mit 100% Sauerstoff beatmet. Die finale Blutentnahme erfolgte durch einen in der *A. carotis* liegenden Katheter. Die Laktatkonzentration wurde unmittelbar im Anschluss an die Blutentnahme bestimmt. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM dargestellt (n=6-7 pro Gruppe). **p<0,01 zwischen den angezeigten Gruppen. (S.pn. +) = mit *S. pneumoniae* infizierte Tiere; (S.pn. -) = nicht infizierte Tiere.

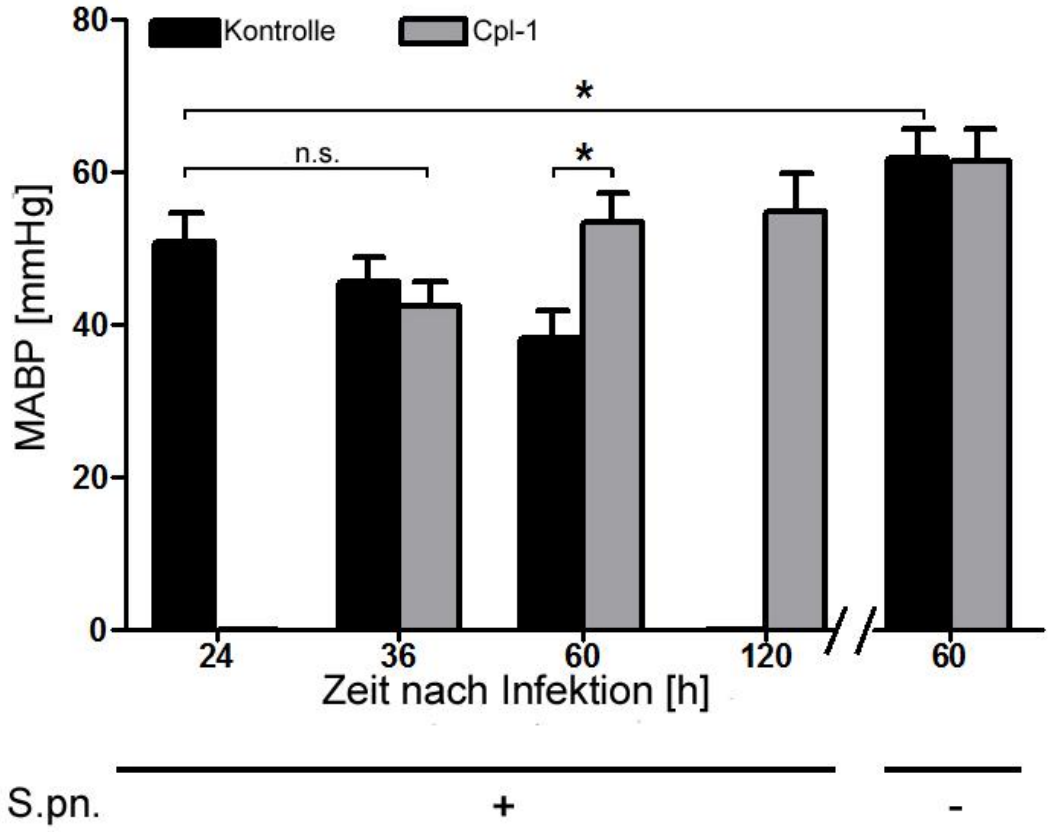


Abbildung 14: **Verlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks (MABP) unter Cpl-1 Behandlung.** C57Bl/6 Mäuse wurden intranasal mit $1x10^6$ CFU/Tier *S. pneumoniae* infiziert. Die nicht infizierten Kontrolltiere erhielten PBS intranasal. Nach 24h erfolgten bis zu sechs i.p. Applikationen (120h Gruppe) von 1 mg Cpl-1 bzw. Kontrolllösung im Abstand von 12h. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Tiere narkotisiert, tracheotomiert und mit 100% Sauerstoff beatmet. Über einen in der *A. carotis* eingebrachten Katheter wurde der MABP bestimmt. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM dargestellt (n=6-7 pro Gruppe). *$p<0,05$ zwischen den angezeigten Gruppen. (S.pn. +) = mit S. pneumoniae infizierte Tiere; (S.pn. -) = nicht infizierte Tiere; n.s. = nicht signifikant.

5.7 Nach intraperitonealer Behandlung mit Cpl-1 zeigte sich weder systemisch noch pulmonal eine erhöhte inflammatorische Reaktion

Zur Betrachtung der systemischen und lokalen inflammatorischen Reaktion während der Pneumokokken-Pneumonie wurden C57Bl/6 Mäuse transnasal mit $1x10^6$ CFU/Tier *S. pneumoniae* infiziert. Nicht infizierte Kontrollmäuse erhielten steriles PBS transnasal. Die Cpl-1 Applikationen erfolgten 24h nach Infektion im Abstand von 12h. Zu den

Zeitpunkten 24h, 36h und 60h (nicht infizierte Kontrollgruppe 60h) nach Infektion wurden sowohl in der Therapiegruppe als auch in der Kontrollgruppe im Lungengewebe und im Plasma mittels *Bioplex Cytokine Assay*™ simultan die Konzentrationen der Zytokine IL-1β, IL-6, IL-10, G-CSF, KC, MCP-1 und MIP-1α sowie Interferon-γ bestimmt. In der mit Cpl-1 behandelten Gruppe erfolgten zusätzliche Zytokin-Analysen zu den Zeitpunkten 30h und 120h nach Infektion. Der Zeitpunkt 30h nach Infektion bzw. 6h nach erstmaliger Behandlung wurde gewählt, um eine mögliche immunmodulierende Wirkung der Cpl-1 Therapie zu einem frühen Zeitpunkt nach Infektion zu untersuchen.

In nicht infizierten Tieren zeigte die Behandlung mit Cpl-1 oder Amoxicillin alleine keinen Effekt auf die Zytokinausschüttung, weder systemisch noch pulmonal (siehe Abb. 13 und Abb. 14). In den Tieren der infizierten Kontrollgruppe kam es jedoch 24h nach Infektion zu einem Anstieg aller gemessenen Zytokine im Lungengewebe, mit Ausnahme des antiinflammatorischen IL-10, im Vergleich zur nicht infizierten Kontrollgruppe. Zu den Untersuchungszeitpunkten 36h und 60h stieg das Zytokin Interleukin-6 im Zeitverlauf an. Ebenso zeigten die Chemokine KC (CXCL8), MIP-1α (CCL3), MCP-1(CCL2) und G-CSF im Verlauf einen Konzentrationsanstieg. IL-10 dagegen war erst 60h nach Infektion nachweisbar. Bei Interferon-γ und IL-12p40 zeigte sich 24h nach Infektion ein moderater Anstieg im Vergleich zu den nicht infizierten Tieren, der aber im Verlauf der Infektion wieder tendenziell rückläufig war.

Im Gegensatz zur Kontrollgruppe führte die Behandlung mit Cpl-1 zu einem zeitabhängigen Abfall der Konzentrationen von IL-1β, IL-6, sowie KC, MIP1-α, MCP-1 und G-CSF im Lungengewebe. Bei IL-12p-40 zeigte sich zum Zeitpunkt 60h nach Infektion eine erhöhte Konzentration im Vergleich zu den infizierten Kontrolltieren. IL-10 war zu keinem Zeitpunkt in der mit Cpl-1 behandelten Gruppe messbar. Hinsichtlich der Plasmakonzentrationen der verschiedenen Mediatoren zeigte sich 24h nach Infektion ein moderater Anstieg von IL-6 und KC. Im Verlauf der Infektion stiegen zeitabhängig IL-6, KC, IL-10, IFN-γ, G-CSF, MIP1-α und MCP in der Kontrollgruppe an. Die Cpl-1 Gabe induzierte bei den infizierten Tieren sechs Stunden nach erstmaliger Gabe einen moderaten Anstieg von KC und G-CSF im Vergleich zur 24h Kontrolle. Dieser Anstieg war transient und nach weiteren 6h (12h nach erster Behandlung) nicht mehr nachweisbar. Insgesamt führte die Behandlung mit Cpl-1 im Zeitverlauf zu einer Abnahme der pulmonalen und systemischen Zytokinproduktion verglichen zum Wert 24

h nach Infektion. Bezüglich der Zytokin-Produktion während der Pneumonie wurden keine Unterschiede zwischen der Behandlung mit Cpl-1 und Amoxicillin beobachtet.

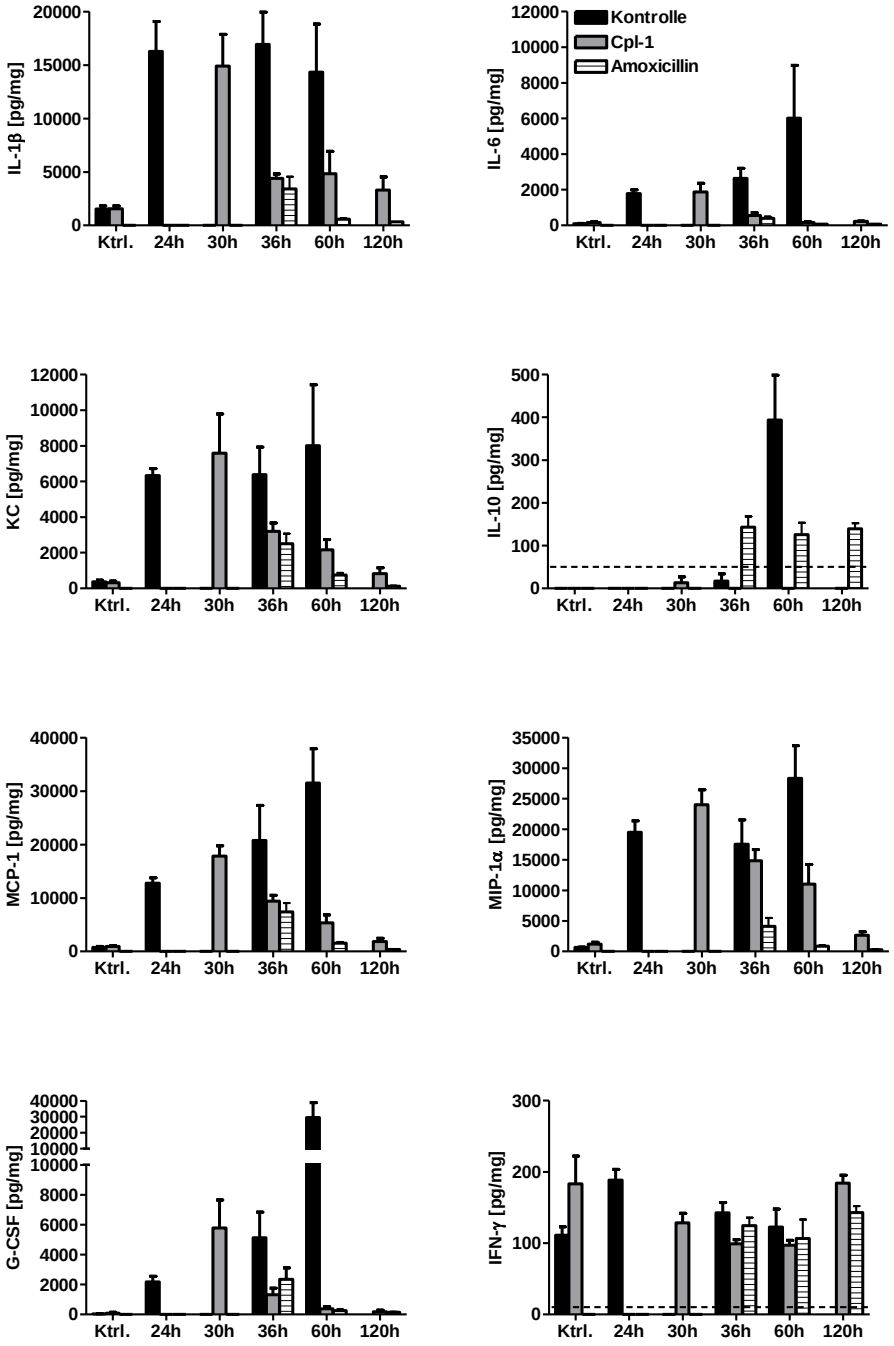


Abbildung 15: **Zytokin- und Chemokinkonzentrationen im Lungengewebe.** C57Bl/6 Mäuse wurden intranasal mit 1x10^6 CFU/Tier *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC

7978) infiziert. Die nicht infizierten Kontrolltiere erhielten PBS intranasal. Nach 24h erfolgten bis zu sechs i.p. Applikationen (120h Gruppe) von 1 mg Cpl-1 bzw. 0,9%iger NaCl-Lösung. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Lungen der Tiere entnommen. Die Quantifizierung der Mediatoren erfolgte gleichzeitig mittels Bioplex Cytokine Assay™. Die gestrichelten Linien repräsentieren die Detektionsgrenzen. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM dargestellt (n=5-6 pro Gruppe). INF-γ = *Interferon gamma*; IL = interleukin; G-CSF = *growth colony-stimulating factor*; KC = *keratinocyte-derived cytokine*; MCP = *monocyte chemoattractant protein-1*; MIP-1α = *macrophage inflammatory protein-1α*.

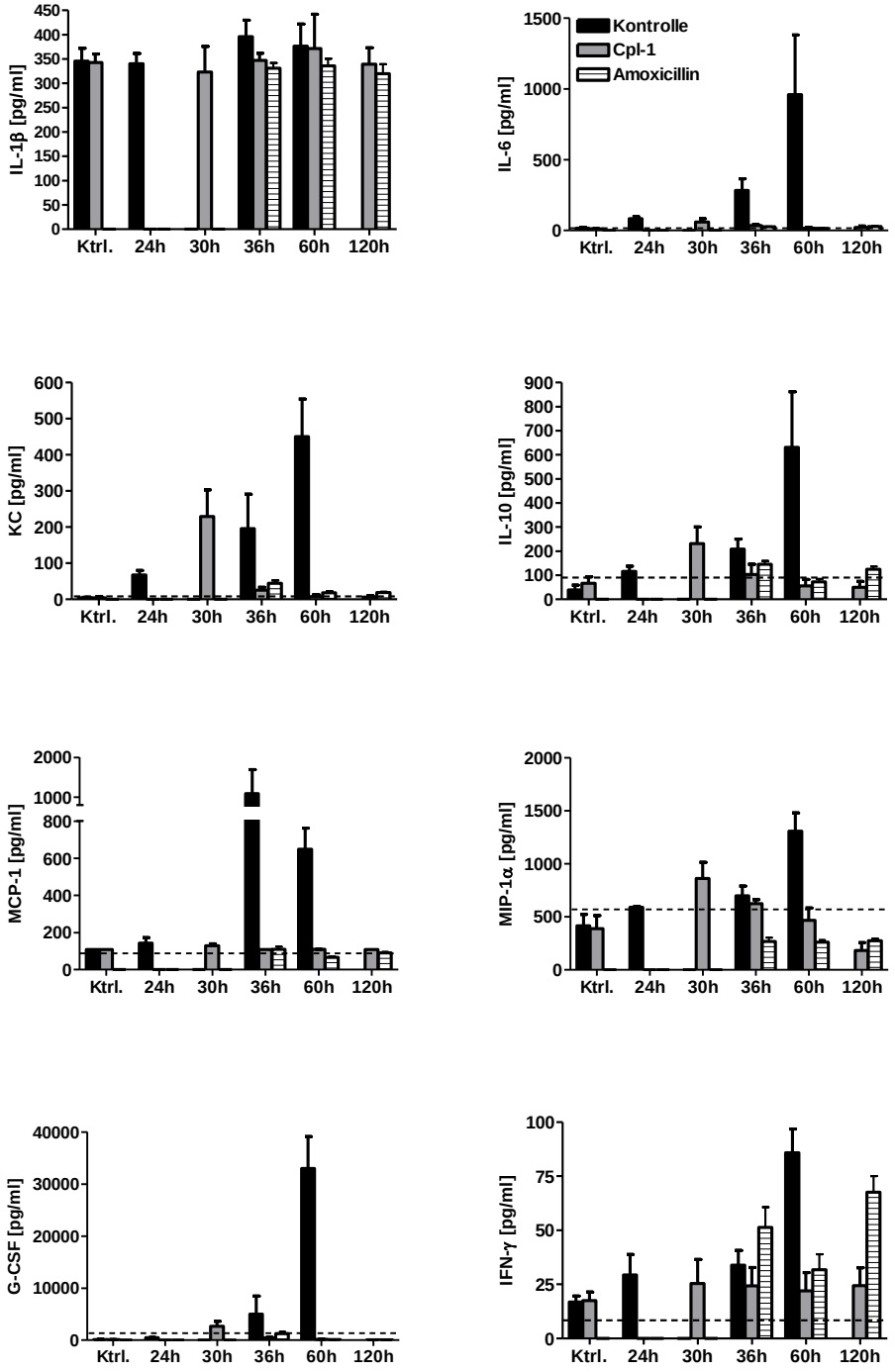


Abbildung 16: **Zytokin- und Chemokinkonzentrationen im Plasma.** C57Bl/6 Mäuse wurden intranasal mit 1x10^6 CFU/Tier *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) infiziert. Die nicht infizierten Kontrolltiere erhielten PBS intranasal. Nach 24h erfolgten bis zu sechs i.p. Applikationen (120h Gruppe) von 1 mg Cpl-1 oder 0,9% NaCl. Zu den

angegeben Zeitpunkten wurden Blutproben entnommen. Die Quantifizierung der Mediatoren erfolgte gleichzeitig mittels Cytokine Multiplex Assay. Die gestrichelten Linien repräsentieren die Detektionsgrenzen. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM dargestellt (n=5-6 pro Gruppe). INFγ = *Interferon gamma*; IL = interleukin; G-CSF = *growth colony-stimulating factor*; KC = *keratinocyte-derived cytokine*; MCP = *monocyte chemoattractant protein-1*; MIP-1α = *macrophage inflammatory protein-1α*.

5.8 Einfluss der Cpl-1 bzw. Amoxicillin Gabe auf die Körpermasse und Körpertemperatur der Tiere während der Pneumokokken-Pneumonie

Der klinische Zustand der Tiere wurde alle 12h während der Pneumonie mit oder ohne Behandlung mit Cpl-1 bzw. Amoxicillin anhand der Körpermasse und -temperatur beurteilt. Die Infektion führte nach 24h zu einem Verlust an Körpermasse der Tiere um 8-10% (siehe Abb. 12A). Die Tiere der Kontrollgruppe verloren mit fortschreitender Pneumonie weiter an Gewicht und zeigten zum letzten Zeitpunkt der Messung im Mittel einen Verlust von ca. 20% ihres Ausgangsgewichtes. Die Körpertemperatur fiel bei den Tieren der Kontrollgruppe 48h nach Infektion im arithmetischen Mittel auf 34,5°C ab (siehe Abb. 12B). Mit Cpl-1 behandelte Tiere zeigten 24h nach erstmaliger Gabe von Cpl-1 (48h nach Infektion) keinen weiteren Abfall der Körpermasse. Zum Zeitpunkt 96h nach Infektion hatten die Tiere ihr Ausgangsgewicht wieder erreicht und zeigten keinen weiteren Gewichtsverlust. Hinsichtlich der Körpermasse und Körpertemperatur gab es keinen Unterschied zwischen den mit Amoxicillin oder Cpl-1 behandelten Tiere.

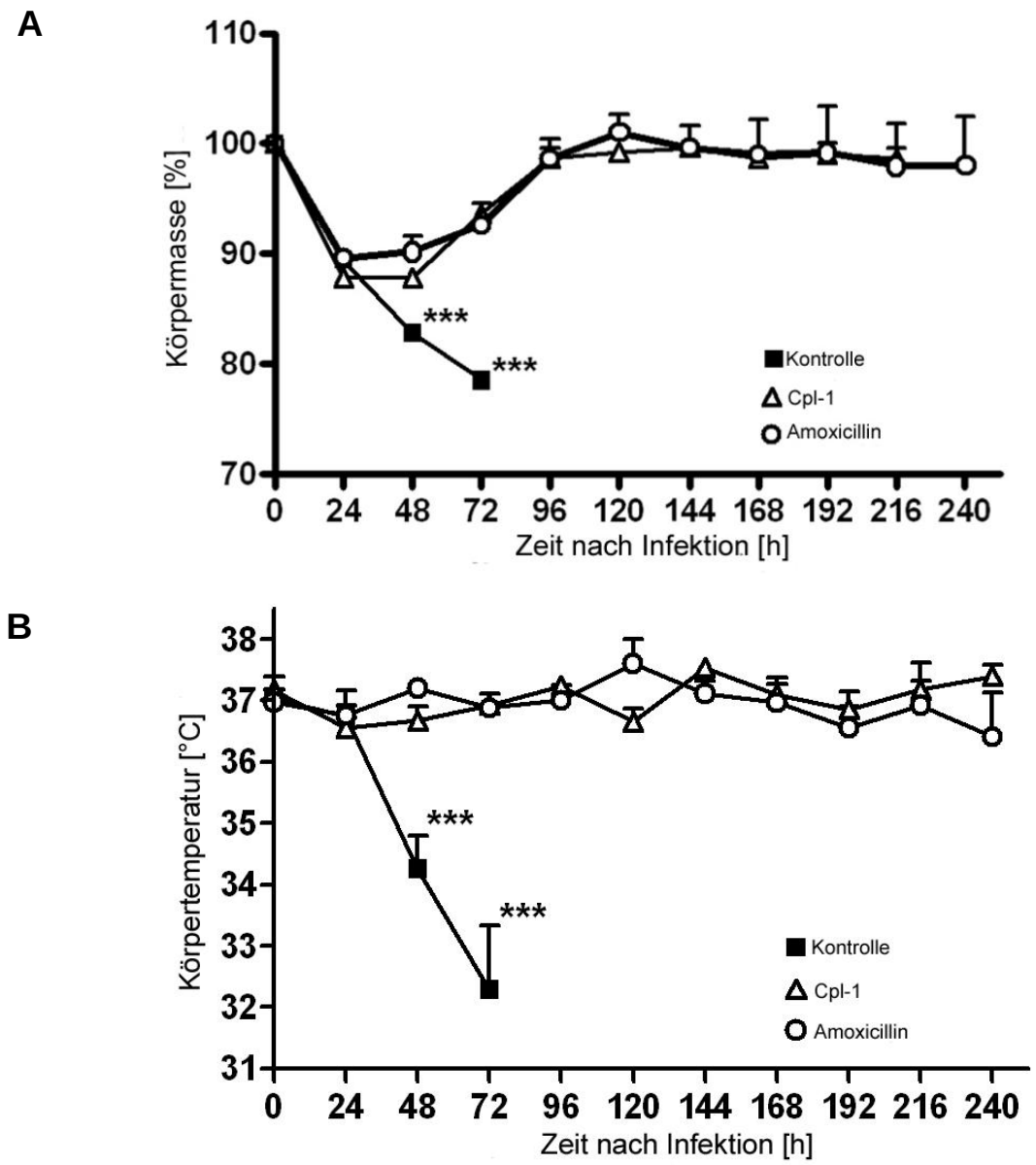


Abbildung 17: **Verlauf von A) Körpermasse und B) Körpertemperatur nach Cpl-1 bzw. Amoxicillin Gabe.** C57Bl/6 Mäuse wurden intranasal mit $1x10^6$ CFU/Tier *S. pneumoniae* infiziert. Nach 24h erfolgten sechs i.p. Applikationen von 1mg Cpl-1, 0,4mg Amoxicillin oder Kontrolllösung im Abstand von 12h. Die Körpertemperatur wurde mittels Rektalsonde und das Körpergewicht mittels Tischwaage bestimmt. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. Kontrollgruppe n=21; Cpl-1 24h: n=14; Amoxicillin 24h: n=7. ***p<0,001. Die Fehlerbalken fehlen in den Graphen bei Überschneidungen mit den Symbolen.

5.9 Die intraperitoneale Behandlung mit Cpl-1 oder Amoxicillin reduzierte die Sterblichkeit in Abhängigkeit vom Therapiebeginn

Untersucht wurde der Einfluss einer Cpl-1- bzw. Amoxicillin-Behandlung auf die approximative Sterblichkeit der Tiere während einer Pneumokokken-Pneumonie. Die Tiere wurden mit einer letalen Dosis von 1 x 10^6*Cfu* von*S. pneumoniae* infiziert und 24h oder 48h nach Infektion mit Cpl-1, Amoxicillin oder einer Kontrolllösung intraperitoneal behandelt. Die Behandlung erfolgte alle 12h mit insgesamt sechs Dosen. Über einen Zeitraum von 10 Tagen wurden die Tiere täglich überwacht und das Überleben registriert. Tiere, die erhebliche Krankheitszeichen aufwiesen, wurden euthanasiert. Bei einer Infektionsdosis von 1x10^6 CFU starben in einem Zeitraum von 60h bis 108h nach Infektion alle Tiere der Kontrollgruppe. Wurden die Mäuse jedoch 2 h nach Infektion mit Cpl-1 behandelt, überlebten alle Tiere bis zum Beobachtungszeitpunkt von 240h nach Infektion. Die Behandlung mit Amoxicillin war vergleichbar effektiv. Wurde mit der Behandlung 48h nach Infektion begonnen, überlebten 3 von 7 Tieren (42%) in der Cpl-1 Gruppe und 5 von 7 Tieren (71%) in der Amoxicillin behandelten Gruppe.

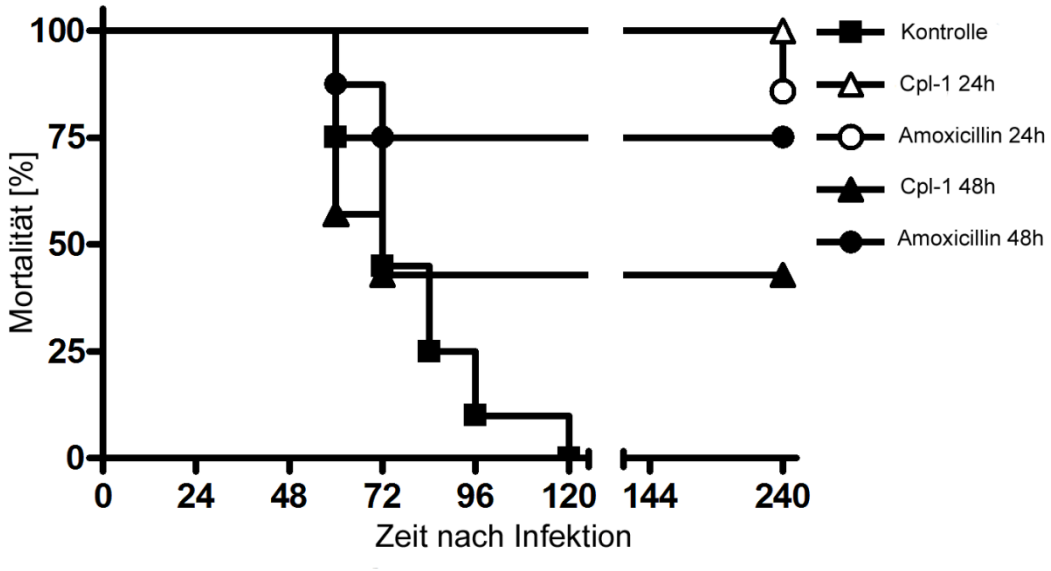


Abbildung 18: **Überleben nach Behandlung mit Cpl-1 oder Amoxicillin.** C57Bl/6 Mäuse wurden intranasal mit 1x10^6 CFU/Tier *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) infiziert. Nach 24h oder 48h erfolgten sechs i.p. Applikationen von Cpl-1,

Amoxicillin oder Kontrolllösung im Abstand von 12h. Der klinische Zustand der Tiere wurde über einen Zeitraum von 240h nach Infektion beobachtet. Kontrollgruppe: n=21; Cpl-1 24h: n=14; Amoxicillin 24h: n=7; Cpl-1 48h: n=7; Amoxicillin 48h: n=7.

5.10 Die intratracheale Behandlung mit Cpl-1 reduzierte die Erregerlast im Lungengewebe

Zur Untersuchung der anti-mikrobiellen Wirkung von Cpl-1 bei lokaler Applikation erfolgte die intratracheale Gabe von Cpl-1 mittels Mikrosprayer. Für die Untersuchung wurde bei den Mäusen durch intranasale Gabe von $5x10^5$ CFU/Tier *S. pneumoniae* eine Pneumonie induziert Die Tiere wurden 24h nach Infektion mittels einer Isofluran Inhalationsnarkose sediert und erhielten einmalig entweder 100 U Cpl-1 oder sterile NaCl 0,9% Lösung. Zu den Zeitpunkten 1h, 24h und 48h nach Cpl-1 oder Applikation der Kontrolllösung wurde die Anzahl der CFU im Lungengewebe bestimmt. In den nicht antimikrobiell behandelten Kontrolltieren hatte sich zum Zeitpunkt 25h nach Infektion die Bakterienanzahl im Vergleich zur eingesetzten Infektionsdosis verdoppelt und zeigte im Verlauf der Infektion einen Anstieg bis auf etwa 10^8 CFU pro Lunge zum Zeitpunkt 72h nach Infektion. Zu diesem Zeitpunkt konnte nur das Lungengewebe von drei Tieren untersucht werden, da zwei Tiere dieser Gruppe an der Infektion verstorben waren. In der mit Cpl-1 behandelten Gruppe kam es 1h nach Applikation zu einer Reduktion der Bakterienlast um zwei logarithmische Einheiten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zum Zeitpunkt 48h nach Cpl-1Applikation zeigten die antimikrobiell behandelten Mäuse eine im Mittel um vier logarithmische Einheiten geringere Bakterienlast im Vergleich zu den Kontrolltieren.

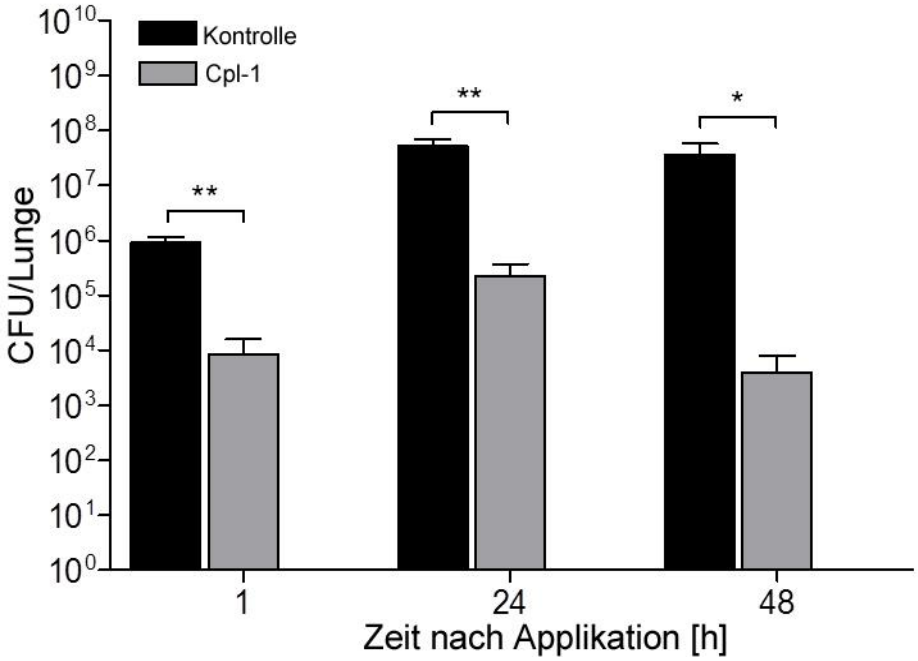


Abbildung 19: **Bakterienlast im Lungengewebe nach intratrachealer Cpl-1 Applikation.** C57Bl/6 Mäuse wurden intranasal mit $5x10^5$ CFU *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) infiziert. Nach 24h erfolgte die intratracheale Gabe von 100 Units Cpl-1 oder 0,9%iger NaCl-Lösung. Die Bestimmung der Kolonie-bildenden Einheiten im Lungengewebe erfolgte 1h, 24h und 48h nach intratrachealer Applikation. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM (n=5 pro Gruppe) angegeben; Ausnahme Kontrollgruppe 72h: n=3, da moribunde Tiere noch vor Versuchsende euthanasiert werden mussten. *p<0,05; **p<0,01 zwischen den angezeigten Gruppen.

5.11 Die intratracheale Behandlung mit Cpl-1 reduzierte die Translokation von Bakterien in Blut und Milz

Zur Untersuchung der Translokation von Bakterien während der Pneumonie erfolgte die Bestimmung der Bakterienlast pro µl Blut zu den Zeitpunkten 24h und 48h nach intratrachealer Cpl-1 bzw. NaCl Applikation. Zu den Zeitpunkten 24h und 48h nach Infektion zeigte sich eine deutliche Translokation in der unbehandelten Kontrollgruppe. Im Homogenat der Milz zeigte sich in dieser Gruppe im Mittel eine Bakterienlast von 10^5 *CFU* 48h nach Infektion. Nach intratrachealer Instillation von 100 U Cpl-1 waren während des gesamten Beobachtungszeitraums weder Bakterien im Blut (mit einer Ausnahme zum Zeitpunkt 24h nach Applikation) noch in der Milz nachweisbar.

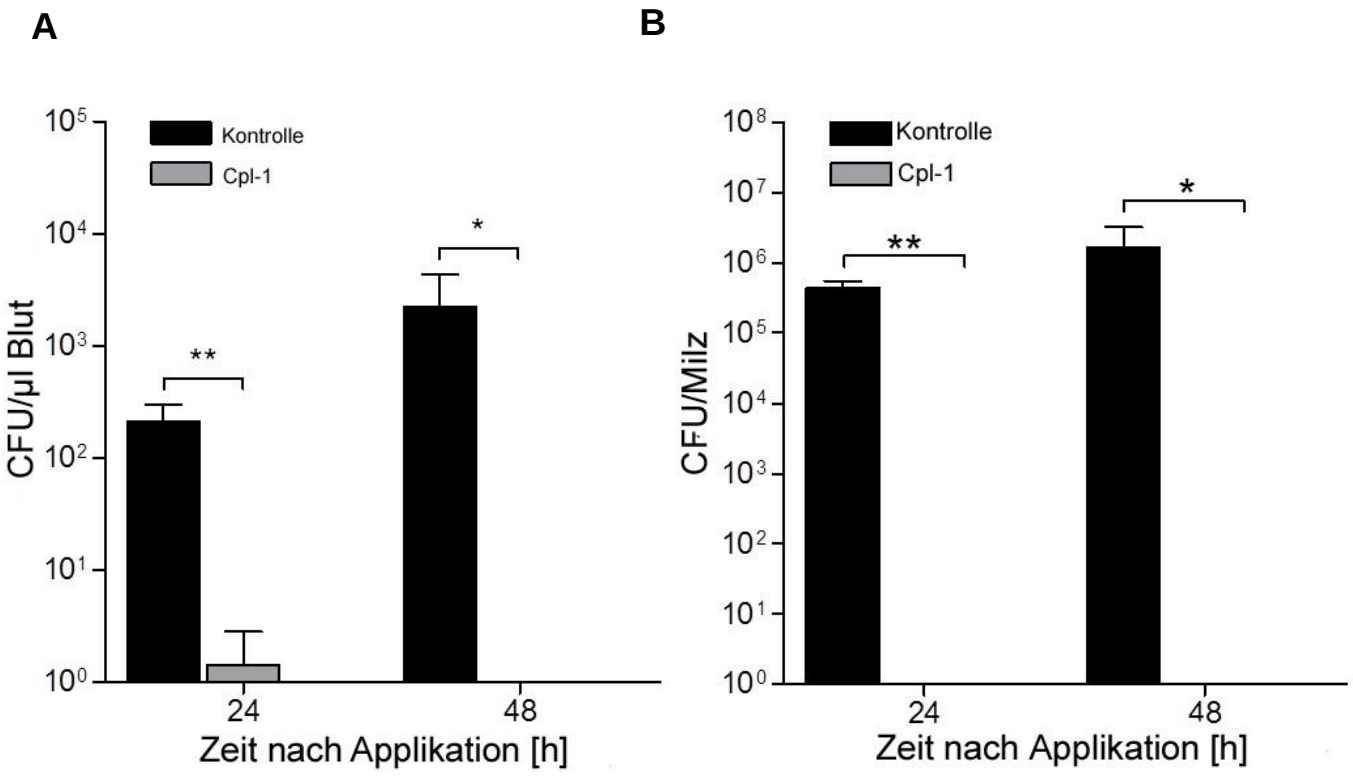


Abbildung 20: **Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten in A) Blut und B) Milz nach intratrachealer Cpl-1 Applikation.** C57Bl/6 Mäuse wurden intranasal mit $5x10^5$ CFU/Tier *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) infiziert. Nach 24h erfolgte die intratracheale Gabe von 100 Units Cpl-1 oder Kontrolllösung. Die Bestimmung der CFU im Blut oder Milzgewebe erfolgte 24h und 48h nach Applikation. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM (n=5 pro Gruppe) angegeben; Ausnahme Kontrollgruppe 72h: n=3, da moribunde Tiere noch vor Versuchende euthanasiert werden mussten. *p<0,05; **p<0,01 zwischen den angezeigten Gruppen.

5.12 Die histologische Untersuchung zeigte einen Rückgang der Pneumonie in der mit Cpl-1 behandelten Gruppe

Um den Einfluss der intratrachealen Applikation von Cpl-1 auf die akute Entzündungsreaktion im Lungengewebe zu untersuchen, wurden histologische Schnitte vom Lungengewebe zu den Zeitpunkten 1h, 24h und 48h nach intratrachealer Applikation angefertigt und mit H&E gefärbt. In der Gruppe der mit Cpl-1 behandelten Tiere wurden Proben für die Histologie zusätzlich zum Zeitpunkt 216h nach Applikation

genommen. Das Lungengewebe der mit Cpl-1 oder 0,9%iger NaCl-Lösung behandelten, nicht infizierten Tiere zeigte keine histopathologischen Veränderungen. Nach der Infektion waren fokale Entzündungsreaktionen wie perivaskuläre Ödeme und interstitielle wie auch alveoläre neutrophile Zellinfiltrationen nachweisbar. In der mit Cpl-1 behandelten Gruppe war, im Vergleich zur unbehandelten Gruppe, ein Rückgang der Entzündungszeichen nach 24h erkennbar. Bei der histologischen Analyse zum Zeitpunkt 48h nach der Infektion zeigte sich ein deutlicher Unterscheid zwischen beiden Gruppen. In der mit Cpl-1 behandelten Gruppe waren 216h nach Infektion kaum noch Anzeichen für entzündliche Gewebeveränderungen nachweisbar.

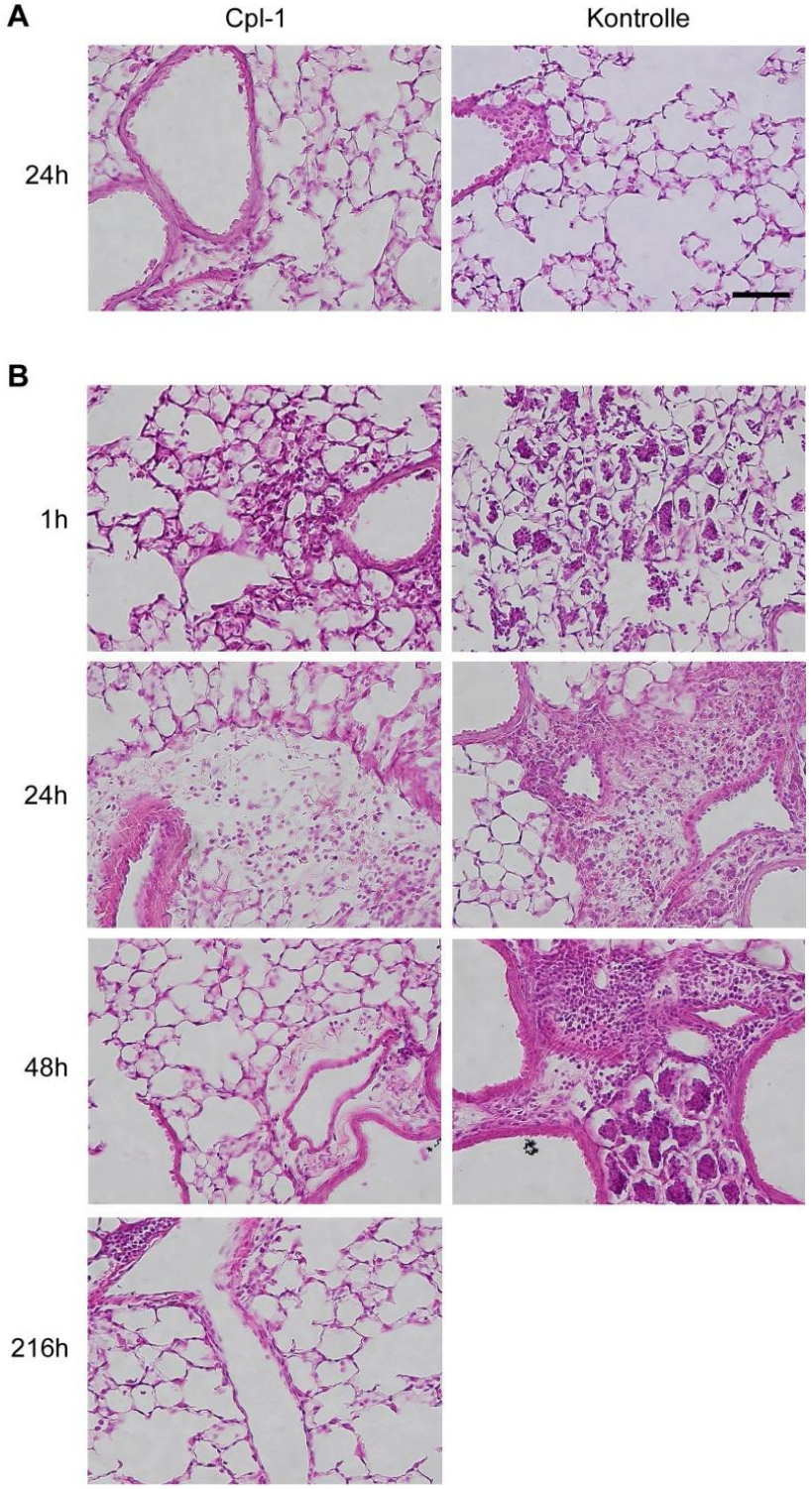


Abbildung 21: **Histologische Veränderungen im Lungengewebe nach intratrachealer Cpl-1 Applikation.** Repräsentative H&E gefärbte Aufnahmen von Lungengewebe von nicht infizierten (A) bzw. infizierten (B) Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach Cpl-1 bzw. 0,9%iger NaCl-Lösung Applikation. Die jeweilige Applikation erfolgte intratracheal 24h nach Infektion. C57Bl/6 Mäuse wurden mit $5x10^5$

CFU/Tier*S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC7978) infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Applikation wurden die Lungen entnommen und mit Paraformaldehyd transtracheal (10 mm$H_2$0 für 10 min) gefüllt. In jeder Gruppe wurden 3 Lungen untersucht. Der Maßstabsbalken entspricht 250 µm (gültig für alle Aufnahmen).

5.13 Nach intratrachealer Behandlung mit Cpl-1 zeigte sich keine pulmonale erhöhte inflammatorische Reaktion

Zur Betrachtung der pulmonalen inflammatorischen Reaktion während der intratrachealen Cpl-1 Behandlung der Pneumokokken-Pneumonie wurden C57Bl/6 Mäuse transnasal mit $5x10^5$ CFU/Tier *S. pneumoniae* infiziert. Nicht infizierte Kontrollmäuse erhielten steriles PBS transnasal. Die i.t. Cpl-1 Applikationen erfolgten 24h nach Infektion. Zu den Zeitpunkten 1h, 6h und 48h (nicht infizierte Kontrollgruppe 6h) nach Applikation wurden in der bronchoalevoläre Lavage mittels *Bioplex Cytokine Assay*™ simultan die Konzentrationen der ZytokineInterleukin 1β und IL-6 bestimmt. Der Zeitpunkt 6h nach intratrachealer Behandlung wurde gewählt, um eine mögliche immunmodulierende Wirkung der Cpl-1 Therapie zu einem frühen Zeitpunkt nach Therapie zu untersuchen.

In der mit Cpl-1 behandelten Experimental Gruppe kam es weder 6h noch 48h nach Applikation zu einer erhöhten Konzentration der gemessenen Zytokine in der BALF im Vergleich zur infizierten Kontrollgruppe zu diesen Zeitpunkten. Bei nicht infizierten Tieren war 6h nach Cpl-1 Applikation eine höher Konzentration sowohl von IL-1β als auch IL-6 im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrolltieren nachweisbar.

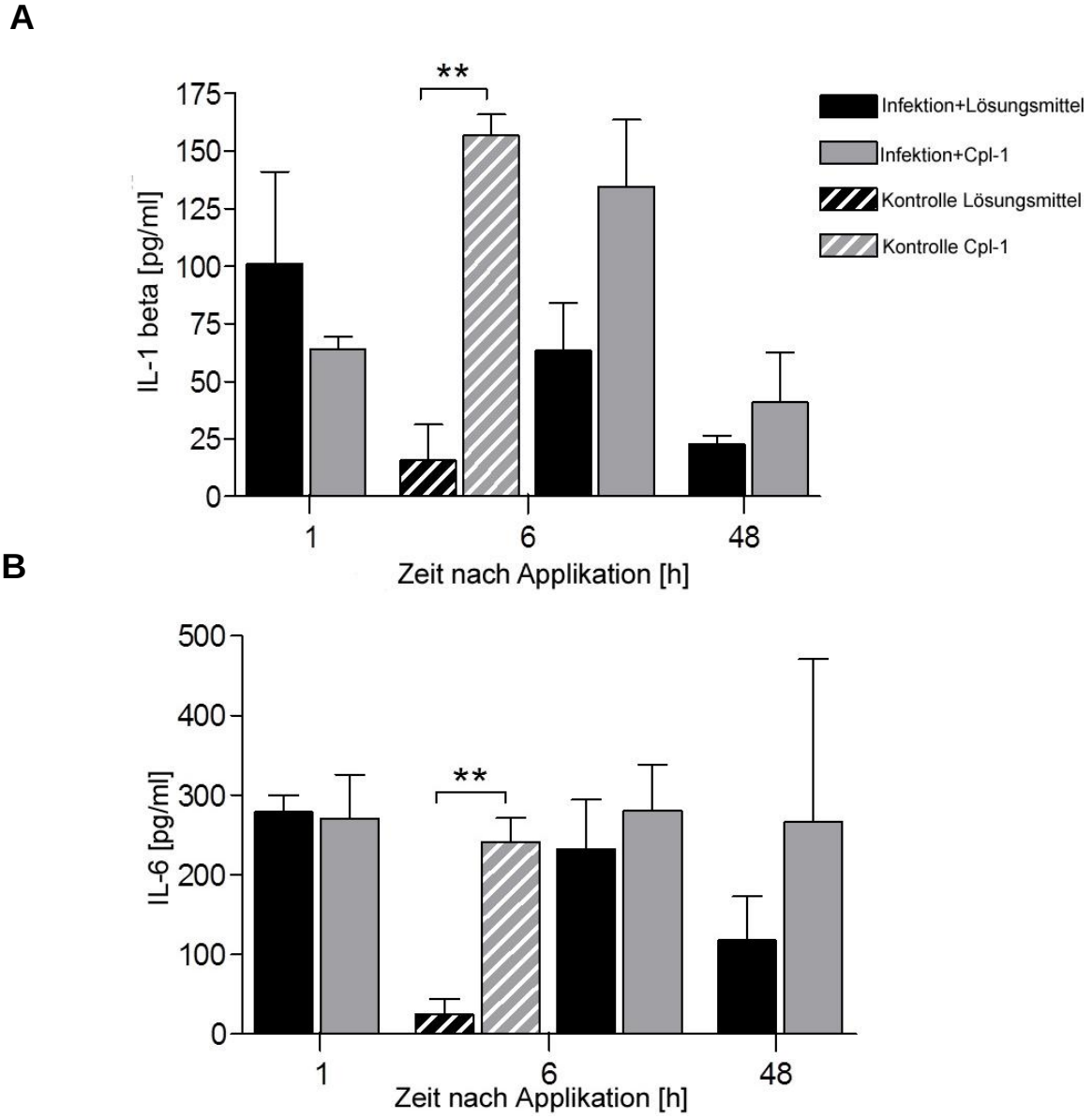


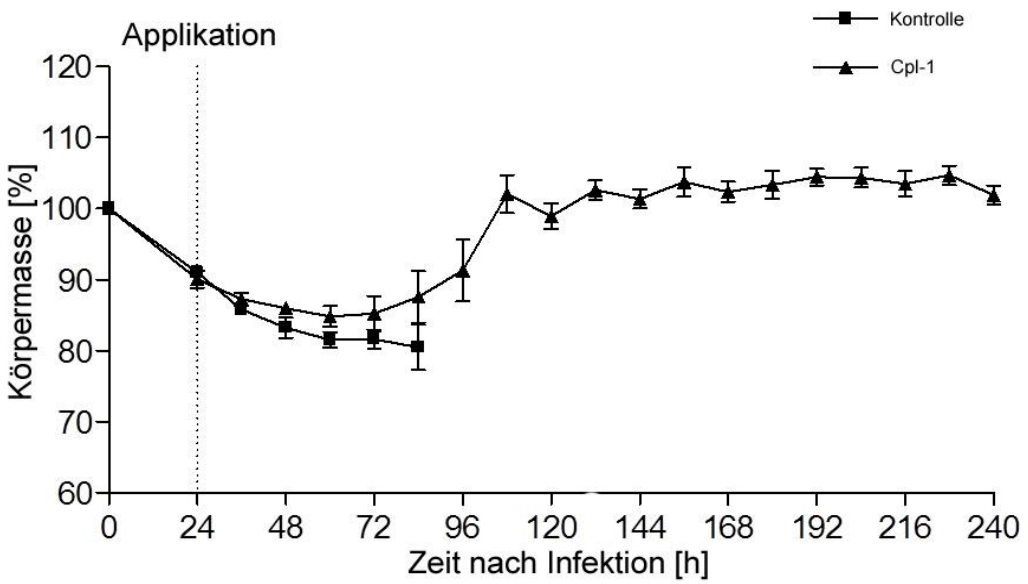
Abbildung 22: **Zytokin- und Chemokinkonzentrationen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit nach intratrachealer Cpl-1 Applikation.** C57Bl/6 Mäuse wurden intranasal mit $5x10^5$ CFU/Tier *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) infiziert. Nach 24h erfolgte die intratracheale Gabe von 100 Units Cpl-1 oder Kontrolllösung. Die Quantifizierung der Mediatoren erfolgte gleichzeitig mittels Cytokine Multiplex Assay 1h, 6h und 48h nach Applikation von Cpl-1 bzw. 0,9%iger NaCl-Lösung. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM (n=5 pro Gruppe) angegeben **p<0,01 zwischen den angezeigten Gruppen; *IL = interleukin;*

5.14 Einfluss der intratrachealen Behandlung mit Cpl-1 auf Körpermasse und Körpertemperatur während der Pneumokokkenpneumonie

Der klinische Zustand der Tiere wurde über den Beobachtungszeitraum von 240h anhand von Körpermasse und -temperatur beurteilt. Die Infektion führte nach 24h zu einem mittleren Verlust an Körpermasse der Tiere von 10%. In beiden Gruppen kam es bis zum Zeitpunkt 60h nach Infektion zu einem weiteren Verlust an Körpermasse. Insgesamt verloren die Tiere im Mittel 15% ihres Körpergewichtes im Vergleich zum Ausgangsgewicht bei Versuchsbeginn. In der Kontrollgruppe zeigte sich ab dem Zeitpunkt 60h nach Infektion ein weiterer Abfall der Körpermasse, während sich in der mit Cpl-1 behandelten Gruppe das Gewicht zunächst stabilisierte und ab dem Zeitpunkt 72h nach Infektion wieder anstieg. Die anti-mikrobiell behandelten Tiere hatten 12 h nach Infektion ihr Ausgangsgewicht wieder erreicht.

In der infizierten Kontrollgruppe zeigte sich ein Abfall der Körpertemperatur von 36h zu 72h nach Infektion, wobei die Tiere zum Zeitpunkt 72h nach Infektion eine mittlere Körpertemperatur von 32,5°C aufwiesen. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich jedoch eine starke interindividuelle Streuung. In den mit Cpl-1 behandelten Tieren war zu keinem Untersuchungszeitpunkt ein Abfall der Körpertemperatur unter 36°C nachweisbar.

A



B

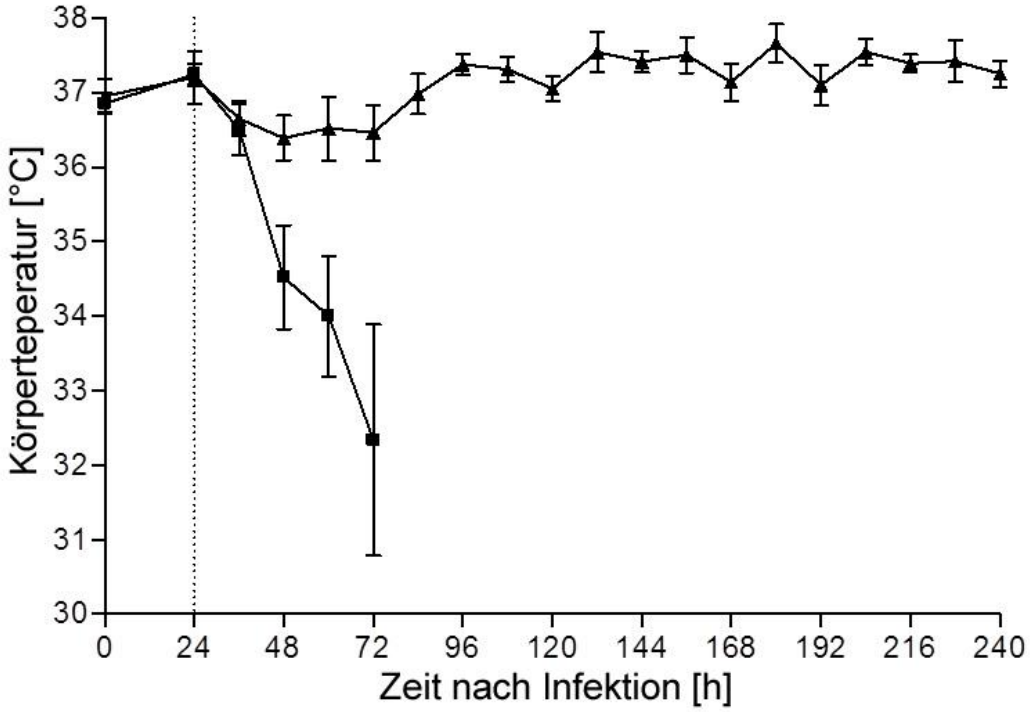


Abbildung 23: **Verlauf der A) Körpermasse und B) Körpertemperatur nach intratrachealer Cpl-1 Applikation.** C57Bl/6 Mäuse wurden intranasal mit $5x10^5$ CFU/Tier *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) infiziert. Nach 24h erfolgte die intratracheale Gabe von 100 Units Cpl-1 oder 0,9%ige NaCl-Lösung. Das Körpergewicht A) wurde mittels Laborwaage bestimmt und ist prozentual zum Ausgangswert vor Infektion dargestellt. Die Körpertemperatur B) wurde mittels Rektalsonde bestimmt. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM dargestellt (n=10 pro Gruppe).

5.15 Die intratracheale Cpl-1-Behandlung reduzierte die Sterblichkeit bei der murinen Pneumokokken-Pneumonie

Untersucht wurde der Effekt der intratrachealen Cpl-1-Behandlung auf die approximative Sterblichkeit der Tiere während einer Pneumokokken-Pneumonie. Die Tiere wurden mit einer letalen Dosis von $5x10^5$ CFU/Tier *S. pneumoniae* infiziert und 24h nach der Infektion mit Cpl-1 oder Kontrolllösung intratracheal behandelt. Über einen Zeitraum von 10 Tagen wurden die Tiere täglich überwacht und der klinische Zustand dokumentiert. Tiere, die erhebliche Krankheitszeichen aufwiesen, wurden euthanasiert. Bei der eingesetzten Infektionsdosis mussten in einem Zeitraum von 84h nach Infektion

alle Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe aufgrund eines ausgeprägten Krankheitsverlaufs euthanasiert werden. In der mit Cpl-1 behandelten Gruppe überlebten 80% der Tiere den Untersuchungszeitraum von 240h nach Infektion.

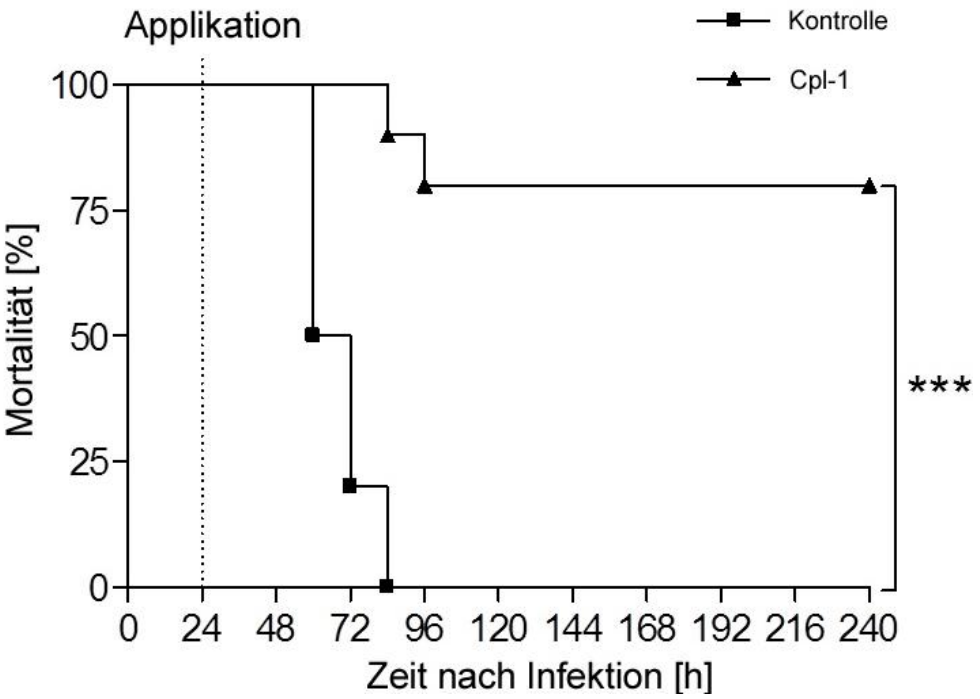


Abbildung 24: **Mortalität nach intratrachealer Cpl-1 Applikation.** C57Bl/6 Mäuse wurden intratranasal mit $5x10^5$ CFU/Tier *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) infiziert Die Applikation von Cpl-1 oder Kontrolllösung erfolgte 24 Stunden nach Infektion. Der klinische Zustand der Tiere wurde alle 12h über einen Zeitraum von 240h beobachtet (n=10 pro Gruppe); ***p<0,001 zwischen den angezeigten Gruppen.

6 Diskussion

In der vorliegenden tierexperimentellen Arbeit wurde die therapeutische Wirkung des Phagenenzyms Cpl-1 auf den klinischen Verlauf der murinen Pneumokokken-Pneumonie untersucht. Zunächst konnte die Wirksamkeit von Cpl-1 nach repetitiver systemischer Applikation gezeigt werden. Nachfolgend konnte außerdem die Wirksamkeit bei einmaliger inhalativer Applikation nachgewiesen werden. Die Untersuchung der systemischen Applikation wurde als Nicht-Unterlegenheits (*non-inferiority)*-Studie konzipiert, bei der das Potenzial von Cpl-1 mit Amoxicillin verglichen wurde. Hierzu erfolgte in einem ersten Versuchsansatz eine mehrfache, intraperitoneale Behandlung mit Cpl-1 oder Amoxicillin. Die mit Cpl-1 behandelten Tiere überlebten vollständig die in der Kontrollgruppe letal verlaufende Infektion. Ferner verbesserte sich unter Cpl-1-Gabe das klinische Erscheinungsbild der Tiere. So nahmen die Tiere 60h nach Beginn der Cpl-1-Gabe wieder an Körpermasse zu.

Die quantitative Untersuchung der Erregerelimination in der Lunge ergab nach erstmaliger Applikation eine Reduktion der Erregerlast um fast 99 % im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe. Im Verlauf der Behandlung blieb die Bakterienlast konstant niedrig. Darüber hinaus wurde durch die Cpl-1-Behandlung die systemische Ausbreitung der Pneumokokken ins Blut und in die Milz weitgehend verhindert. Im histologischen Vergleich zu den mit Lösungsmittel behandelten und infizierten Kontrolltieren konnte unter Cpl-1-Behandlung eine deutlich rückläufige Infektionsreaktion nachgewiesen werden. Die inflammatorische Antwort auf der Ebene der systemischen und pulmonalen Zytokin- und Chemokin-Konzentrationen war nach Cpl-1-Applikation weder kurzfristig noch im Verlauf verstärkt im Vergleich zur infizierten Kontrollgruppe. Vielmehr näherten sich im Verlauf der Cpl-1-Behandlung die Konzentrationen der Mediatoren wieder dem Ausgangsniveau an. Die antimikrobielle Behandlung mit bakteriolytischem Cpl-1 löste somit keine verstärkte inflammatorische Reaktion aus. Die Cpl-1-Gabe führte bei infizierten Tieren weiterhin zu einer verbesserten Lungen- und Gasaustauschfunktion im Vergleich zur infizierten Kontrollgruppe. Nicht infizierte und mit Cpl-1 behandelte Kontrolltiere zeigten keine Auffälligkeiten.

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass die intraperitoneale Applikation von Cpl-1 im verwendeten murinen Pneumonie-Modell wirksam der Infektion mit *S. pneumoniae* entgegenwirkt und konsekutiv die Überlebenswahrscheinlichkeit bei der Pneumonie verbessert. Cpl-1 war in dieser Studie Amoxicillin bei der Behandlung der durch Penicillin-sensible Pneumokokken verursachten Pneumonie nicht unterlegen.

In einem zweiten Versuchsansatz wurde das therapeutische Potenzial einer einmaligen, intratrachealen Applikation von Cpl-1 evaluiert. Ziel war es, die Gesamtdosis von Cpl-1 durch eine topische Applikation im Vergleich zu einer intraperitonealen Gabe zu reduzieren. Bei den Versuchstieren wurde wiederum eine schwere Pneumokokken-Pneumonie induziert und 24 Stunden später Cpl-1 (100 Units) intratracheal appliziert. Die mit Cpl-1 behandelten Tiere überlebten zu 80% die in der Kontrollgruppe letal verlaufende Infektion. Auch war eine Reduktion der Bakterienlast im Lungengewebe um ca. 99% im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Stunde nach Applikation messbar. In der einhergehenden histologischen Untersuchung des Lungengewebes 48 Stunden nach Applikation von Cpl-1 war ein Rückgang der Entzündungsreaktion nachweisbar.
In diesem Versuchsteil reduzierte die intratracheale Applikation von Cpl-1 die Bakterienlast im Lungengewebe deutlich und führte zu einer erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bemerkenswert ist, dass dieser Effekt schon durch die einmalige Gabe von Cpl-1 erzielt wurde. Bei der einmaligen inhalativen Applikation konnte die Gesamtdosis von Cpl-1 gegenüber der mehrfachen intraperitonealen Applikation deutlich reduziert werden.
Da Cpl-1 *in-vitro* und *in-vivo* auch antibiotikaresistente Pneumokokken lysiert, könnte perspektivisch die Behandlung von Infektionen, verursacht durch multiresistente *S. pneumoniae* Stämme, erleichtert werden. Darüber hinaus könnte eine spezifische Anti-Pneumokokken-Therapie mit Cpl-1 helfen, die Resistenzentwicklung bei *S. pneumoniae* und Kollateralschäden bei anderen Bakterienarten zu reduzieren. Im Folgenden werden die Ergebnisse detaillierter diskutiert.

6.1 Intraperitoneal appliziertes Cpl-1 wirkt im Mausmodell einer letalen Pneumokokken-Pneumonie entgegen und ist Amoxicillin nicht unterlegen

Anti-mikrobielle Substanzen gelten als wirksame Therapiestrategie bei der ambulant erworbenen Pneumonie des Menschen (112). Aktuelle Placebo-kontrollierte Studien zur Wirksamkeit von Antibiotika bei der CAP liegen nicht vor. Untersuchungen aus den 1930er Jahren zeigen jedoch eine um 10-19% reduzierte Gesamtmortalität der CAP nach der Behandlung mit Sulfapyridinen (früher Sulfonamide) gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe (112). Gegenwärtig durchgeführte klinische Studien am Menschen mit Antibiotika werden als Nicht-Unterlegenheits (*non-inferiority)*-Studien konzipiert, in welchen eine Testsubstanz mit einer wirksamen Kontrolle verglichen wird (113) (114).

Als wirksame anti-mikrobielle Substanzen haben sich in tierexperimentellen Studien Bakteriophagen(115–120) sowie deren lytische Bakteriophagenenzyme (116) (121) (122) gezeigt. Die Studien belegten einen protektiven Effekt bei der Behandlung in unterschiedlichen Infektions-Modellen mit verschiedenen Erregern (Übersicht in (88).

In der vorliegenden Studie wurde das lytische Bakteriophagenenzym Cpl-1 als anti-mikrobielles Agens verwendet. In Übereinstimmung mit Studien zu anderen Bakteriophagenenzymen zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit die Behandlung mit Cpl-1 als wirksam im Tiermodell einer Infektionskrankheit. Alle mit Cpl-1 behandelten Tiere überlebten die Pneumonie, während in der Kontrollgruppe die Tiere innerhalb von 120 Stunden nach Infektion verstarben. Wurden die Tiere nach gleichem Therapieschema mit Amoxicillin behandelt, überlebten (mit einer Ausnahme) alle Tiere die Infektion. Die Behandlung mit Cpl-1 war somit in diesem Modell der Behandlung mit Amoxicillin nicht unterlegen.

Zwei weitere Studien untersuchten bisher ebenfalls den Einfluss der Behandlung mit Cpl-1 auf das Überleben bei einer Infektion im Tierexperiment. Loeffler et al. beobachteten im murinen Pneumokokken-Bakteriämie-Modell, dass alle mit Cpl-1 behandelten Tiere die Infektion überlebten, während nach 48 Stunden in der infizierten, unbehandelten Kontrollgruppe 80% der Tiere verstarben (107). Jado *et al*. zeigten in einem weiteren murinen Infektions-Modell, in welchem durch eine intraperitoneale Applikation von Pneumokokken eine Pneumokokken-Sepsis simuliert wurde, dass 100% der mit Cpl-1 intraperitoneal behandelten Tiere überlebten, während alle Kontrolltiere innerhalb von 72 Stunden verstarben. In beiden Studien war das

vollständige Überleben der Tiere jedoch abhängig von der in Relation zur Infektion zeitnahen Cpl-1 Applikation (Loeffler et al.≤1h; Jado et al. ≤2h) (107) (108).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine bisher für Cpl-1 nicht beschriebene therapeutische Herangehensweise gewählt, um dem Translationsanspruch bestmöglich Rechnung zu tragen. Die Therapie erfolgte (I) im Gegensatz zu vorangegangen Untersuchungen nicht im Kompartiment der Infektion, (II) mit deutlicher zeitlicher Verzögerung (24 Stunden) nach Infektion und (III) durch mehrmalige Applikationen des Enzyms.

Die Fähigkeit einer antimikrobiellen Substanz, ein Bakterium zu töten oder dessen Wachstum zu hemmen, hängt sowohl von der Konzentration der Substanz im infizierten Organismus als auch am Infektionsort ab (Pharmakokinetik). Entscheidend für die Wirkung ist auch die Beziehung zwischen der Konzentration der Substanz und der Wachstumsrate der sensiblen Bakterienpopulation (Pharmakodynamik) (86). Für eine erfolgreiche Therapie mit einer bakteriziden Substanz muss mindestens die minimale Hemm-Konzentration (MHK) am Infektionsort erreicht werden (123). In der vorliegenden Studie wurde *in-vitro* eine MHK von 8 µg/ml für Cpl-1 gegenüber dem hier verwendeten Pneumokokken-Stamm ermittelt.

Obwohl die Konzentration von Cpl-1 im Lungengewebe in dieser Arbeit nicht ermittelt wurde, kann basierend auf dem Ergebnis der reduzierten pulmonalen Bakterienlast indirekt angenommen werden, dass es nach der intraperitonealen Applikation zu einer Verteilung von Cpl-1 im Lungengewebe kam, die ausreichte um die Bakterienzahl zumindest temporär zu reduzieren. Dies steht im Einklang mit einer tierexperimentellen Untersuchung der Meningitis, bei der nach intraperitonealer Gabe eine Verteilung von Cpl-1 auch im Liquor nachweisbar war (110). In der genannten Studie konnte gezeigt werden, dass die Plasmakonzentration von Cpl-1 nach intraperitonealer Applikation (200 mg/kg KM) für vier Stunden zwischen 50 und 60 µg/ml liegt. Gleichzeitig zeigte sich nach i.p. Gabe über mindestens drei Stunden eine Konzentration von 7 bis 12 µg Cpl-1 pro Milliliter im Liquor (110). Dies ist insofern bemerkenswert, da die Blut-Liquor-Schranke im Vergleich zum Lungengewebe für Antibiotika als gering permeabel gilt(124). Hinsichtlich der Pharmakokinetik von Cpl-1 sind bisher nur Daten zur Halbwertszeit von Cpl-1 publiziert. Loeffler et al. berichten über eine kurze Serumhalbwertszeit von Cpl-1 von 20,5 Minuten (107). Fraglich bleibt, warum trotz

dieser kurzen HWZ eine Reduktion der Bakterienlast um fast 99% im Lungengewebe zwölf Stunden nach Applikation erreicht wurde.
Eine Erklärung für die besondere Wirksamkeit des hier gewählten Therapieschemas könnte wiederum die bereits erwähnte Studie im Meningitis-Modell liefern (110). Die Ergebnisse dieser Studie implizieren, dass es nach intraperitonealer Applikation zu einer Depotbildung und längerfristigen Freisetzung von Cpl-1 aus dem Peritonealraum kommt. In der vorliegenden Arbeit wurde im Vergleich eine geringere Cpl-1-Dosis (ca. 50mg/kg KM) verwendet. Dennoch erscheint auch hier eine kontinuierliche Freisetzung von Cpl-1 ins Plasma möglich. Somit wäre denkbar, dass die physiologisch kurze HWZ von Cpl-1 im Plasma durch eine längere Freisetzung des Enzyms aus der Peritonealhöhle teilweise kompensiert wurde. Die Konzentration von aktivem Cpl-1 nach i.p. Applikation wurde im Lungengewebe bisher in keiner Studie untersucht. Dies erscheint aber zur Optimierung eines Therapieschemas hilfreich. Interessant wäre auch die Untersuchung der Fragestellung, ob eine intravenöse Applikation von Cpl-1 im vorliegenden Modell eine effektive antimikrobielle Wirkung erzielen würde.

Aufgrund der gezeigten effektiven anti-mikrobiellen Wirkung von Cpl-1 ist von einer guten peritonealen Absorption des 39 kDa großen Proteins auszugehen, die auch in anderen Studien beschrieben wurde (107) (110). Ferner wurde dies auch für das größere Phagenlysin $LysGH_{15}$ (55 kDA) beschrieben (125). In den jeweiligenUntersuchungen wurde nach intraperitonealer Applikation des Lysin jeweils eine schnelle Reduktion der Bakterienlast im Blut bzw. Liquor nachgewiesen. Des Weiteren konnte in der erwähnten Meningitis-Studie mittels Western Blot-Analyse nach intraperitonealer Applikation Cpl-1 im Serum nachgewiesen werden (110). Weitere Studien sind erforderlich, um den genauen Mechanismus der Absorption von Cpl-1 aus dem Peritonealraum aufzudecken.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der approximativen Sterblichkeitsanalyse auf ein therapeutisches Potential von Cpl-1 bei der Pneumokokken-Pneumonie hin. Im Unterschied zu vorangegangenen *in-vivo* Untersuchungen zur Sterblichkeit unter Cpl-1-Behandlung wurde in dieser Studie ein zeitlich verzögerter und systemischer Therapieansatz, fern vom eigentlichen Infektionsort, gewählt. Die beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass eine systemische Behandlung mit Cpl-1 auch noch zu einem

Zeitpunkt effektiv ist, zu dem bereits eine schwere Pneumonie etabliert ist. Ferner wurde bisher nur in einer weiteren Studie direkt die antimikrobielle Aktivität von Endolysinen und Antibiotika verglichen (109). Daher konnten bislang keine vergleichenden Aussagen zur Effektivität von Lysinen und traditionellen Antibiotika gemacht werden. Die vorliegenden Erkenntnisse ergänzen auch in diesen Punkten den bisherigen Wissensstand zur Infektionstherapie mit lytischem Bakteriophagenenzym.

6.2 Cpl-1 ist der Amoxicillin-Behandlung auch bei verzögerter Applikation 48 Stunden nach Infektion nicht unterlegen

Aufgrund eingeschränkter Diagnostik oder unklarer Resistenzlage kann es zur Verzögerung bei der effektiven anti-mikrobiellen Therapie der CAP kommen (26) (53). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Wirksamkeit einer Therapie mit Cpl-1 zu einem späteren Zeitpunkt nach der Infektion untersucht. Wurde die Therapie 48h nach Infektion begonnen, überlebten drei von sieben (42 %) der mit Cpl-1 behandelten und fünf von sieben (71%) der mit Amoxicillin behandelten Tiere. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war dabei statistisch nicht signifikant.

Wie aus den Untersuchungen zur Bakterienlast im Blut ersichtlich, entwickelten die Tiere 48h nach der Infektion eine Bakteriämie. Zusätzlich lagen klinische Zeichen einer Sepsis vor. Somit handelte es sich zu diesem Zeitpunkt nicht um die Behandlung einer Pneumonie, sondern einer pneumogenen Sepsis. Eine derart schwere Infektion muss beim Menschen nicht nur antimikrobiell, sondern auch supportiv behandelt werden (126). Denkbar ist deshalb, dass die erhöhte Mortalität im Vergleich zur Therapiegruppe, die 24h nach Infektion mit Cpl-1 behandelt wurde, Folge eines durch die fortgeschrittene Infektion bedingten Multiorganversagens ist.

Hinsichtlich einer anti-mikrobiellen Behandlung zu diesem Zeitpunkt ist weiterhin zu berücksichtigen, dass die Behandlung mit Cpl-1 zur Freisetzung von Bakterienbestandteilen, wie beispielsweise Pneumolysin führen kann, woraus eine verstärkte pro-inflammatorische Reaktion resultieren kann (127). Möglicherweise korreliert der Grad der pro-inflammatorischen Reaktion mit der Menge der freigesetzten Mediatoren und diese mit der Bakterienlast (68) (128). Fraglich bleibt daher, ob die Behandlung mit Cpl-1, welches innerhalb kurzer Zeit Bakterien lysiert, auch zu einem späteren Zeitpunkt, mit einer hohen Bakterienlast in Blut und Lunge, protektiv wirkt.

Trotz des Schweregrades der Infektion zeigte sich in der mit Cpl-1 behandelten Gruppe eine deutlich erhöhte Überlebensrate gegenüber der Kontrollgruppe. Die Behandlung mit Cpl-1 führte auch bei verzögerter Applikation zu keinen klinischen Anzeichen einer pro-inflammatorischen Reaktion. Dies steht im Einklang mit einer Studie von Jado et al. im murinen Sepsis-Modell, die ebenfalls einen protektiven Effekt bei der Behandlung mit Cpl-1 nachwies, auch wenn die Tiere mit einer hohen Dosis von Pneumokokken ($5x10^7$ CFU/Tier) intraperitoneal infiziert und zwei Stunden später mit 200 µg Cpl-1 i.p. behandelt wurden (108). Die Studie von Jado et al. besitzt jedoch einige Limitationen. So ist kritisch anzumerken, dass in der Studie nur Daten zur Behandlung 2h nach Infektion gezeigt und klinische Parameter nicht beschrieben wurden. Auch war die Größe der Versuchsgruppe mit n = 4 niedrig.

Die Aussagen der vorliegenden Untersuchung beziehen sich ebenfalls nur auf kleine Versuchsgruppen mit sieben Tieren pro Gruppe. Deshalb haben die hier gezeigten Ergebnisse nur eine eingeschränkte Aussagekraft und sollten in Folgestudien anhand eines größeren Kollektivs verifiziert werden.

6.3 Cpl-1 verringert die Bakterienlast im Lungengewebe bei schwerer Pneumokokken-Pneumonie

Mehrere *in-vitro*-Studien zeigen, dass Phagenlysine nach exogener Applikation eine effiziente und spezifische Bakteriolyse bei verschiedenen grampositiven Bakterien verursachen (122) (129–131).

In der vorliegenden Studie wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion die Bakterienlast im Lungengewebe mit und ohne Cpl-1 Applikation bestimmt. Die Applikation (1 mg) von Cpl-1 begann 24h nach der Infektion jeweils im Abstand von 12h. Maximal wurden sechs Applikationen gegeben. Zwölf Stunden nach erstmaliger Gabe von Cpl-1 war die Bakterienlast im Lungenparenchym um fast 99% im Vergleich zur Kontrollgruppe verringert. Unter fortgesetzter Cpl-1-Therapie stieg die Bakterienlast zwar nicht wieder an, es wurde jedoch keine Eradikation der Bakterien erreicht. Im Gegensatz hierzu reduzierte in einer Arbeit von Loeffler et al. im Pneumokokken-Bakteriämie Modell bereits eine Einzeldosis von 2 mg Cpl-1, die intravenös appliziert wurde, den bakteriellen Titer innerhalb von 15 Minuten unter die Nachweisgrenze (<2,00 log_{10} CFU/ml) (107). Auch waren zehn Stunden nach der Applikation keine Bakterien mehr im Blut nachweisbar. In einer Studie von Isabel Jado et al. war ebenfalls

eine einmalige Gabe des Enzyms ausreichend, um sowohl eine Eradikation der Bakterien, als auch einen vollständig protektiven Effekt zu erreichen (108).
Verschiedene Erklärungen sind denkbar, warum es im vorliegenden Modell trotz mehrmaliger Applikationen keine vollständige Bakterieneliminierung erreicht wurde. So unterschieden sich die verabreichte Dosis, die Applikationsart und das Infektionsmodell in den Studien von Jado et al. und Loeffler et al. von der vorliegenden Studie deutlich. Insbesondere erfolgte im vorliegenden Modell die Applikation von Cpl-1 erst nach Ausbildung und Organisation der Pneumonie. Es ist nicht auszuschließen, dass sich im Pneumonie-Modell Pneumokokken transient intrazellulär in Epithel- und Endothelzellen befanden (132) (133) und dadurch von Cpl-1 nicht erreicht werden konnten. Eine intrazelluläre Wirkung von Cpl-1 wurde bislang nicht untersucht. Kritisch für eine intrazelluläre Penetration erscheint allerdings die hohe atomare Masse (39 kDA) des Enzyms. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass Cpl-1 nur reduziert Inflammationsareale penetrieren konnte. Hierfür spricht unter anderem, dass auch die Gabe von Amoxicillin, welches begrenzt auch intrazellulär wirkt, nicht zu einer vollständigen Entfernung der Penicillin-sensiblen Pneumokokken aus dem Lungengewebe führte.
Eine weitere Erklärung könnte auch in den pharmakodynamischen Eigenschaften von Cpl-1 liegen. Das Aktivitätsmaximum von Cpl-1 liegt bei einem pH-Wert um 3,5 (107). Das Enzym kann somit auch in saurem Entzündungsmilieu effektiv arbeiten. Allerdings verlängert ein niedriger pH-Wert die Replikationszeit von Bakterien, was sowohl deren Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika als auch Phagen vermindert. Denkbar erscheint daher, dass vereinzelt Bakterien nicht für Cpl-1 empfindlich waren und somit keine vollständige Eradikation erreicht wurde. Aus diesem Grund könnte auch in der vorliegenden Studie eine Behandlungsdauer von 84Stunden nötig gewesen sein. Die hier gewählte Behandlungsdauer ist im Vergleich zur Empfehlung bei der Behandlung der CAP des Menschen mit Antibiotika aber als ein kurzer Zeitraum anzusehen (30).

6.4 Cpl-1 und Amoxicillin haben *in-vivo* einen synergistischen Effekt

Untersucht wurde der antimikrobielle Effekt einer kombinierten Therapie mit Cpl-1 und Amoxicillin. Wenn zwei antimikrobielle Substanzen *in-vitro* kombiniert werden, kann es zu einem (1) indifferenten, (2) synergistischen oder (3) antagonistischen Mechanismus gegen den Mikroorganismus kommen. Eine gängige Definition für die Bestimmung einer Synergie durch die Kombination zweier Substanzen stellt die Titerreduktion um ≥ 2 $\log_{10}$ CFU/ml gegenüber dem Effekt der Einzelsubstanz dar (105). Bei der

Kombinationstherapie aus zwei Phagen-Enzymen (Cpl-1 und Pal) zeigte sich *in- vitro* ein synergistischer anti-mikrobieller Effekt gegenüber *S. pneumoniae* (105).
Dieser synergistische Effekt bestätigte sich auch *in-vivo* in einem auf der Infektion mit Penicillin-resistenten Pneumokokken basierenden Sepsis-Modell (108). Zur Kombinationstherapie von Cpl-1 mit Antibiotika sind bislang nur *in-vitro* Daten publiziert. Ein Synergismus von Cpl-1 mit Penicillin wurde nur bei Pneumokokken-Stämmen mit hoher minimaler Hemmkonzentration gegenüber Penicillin beobachtet. Weiterhin wurde gezeigt, dass ein synergistischer Effekt von Cpl-1 mit Gentamycin nur bei Penicillin-empfindlichen, nicht jedoch bei Penicillin-resistenten Pneumokokken-Serotypen auftritt (134). In derselben Studie wurde weiterhin gezeigt, dass ein Synergismus Antibiotikum-spezifisch ist. So wurde kein Synergismus für Levofloxacin oder Azithromycin und Cpl-1 entdeckt. Im Gegensatz hierzu ergaben Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe mittels Chequer-board-titration einen synergistischen Effekt von Cpl-1 in Kombination mit Moxifloxacin für einen Moxifloxacin-resistenten Stamm (FL5629) und mit Cefotaxime für einen Cefotaxime-resistenten Stamm (MJD3693) (135). Unklar bleibt, wie diese synergistischen Effekte zustande kommen. *Djurkovic* et al. erscheinen unterschiedliche Angriffspunkte der antimikrobiellen Substanzen als nicht schlüssige Erklärung, da die beschriebenen synergistischen Effekte nur bei resistenten Stämmen (mit Ausnahme von Gentamycin) beobachtet wurden (109).
Zur Klärung der Frage, ob synergistische Wirkungen von Cpl-1 mit einem herkömmlichen Antibiotikum auch *in-vivo* auftreten, wurde in dieser Arbeit erstmalig ein möglicher Synergismus *in-vivo* zwischen einem lytischen Phagenenzym und einem herkömmlichen Antibiotikum untersucht. Amoxicillin wurde als Kombinationstherapeutikum gewählt, da es als Antibiotikum der ersten Wahl bei der unkomplizierten ambulanten Pneumonie gilt, ein breites Wirkungsspektrum hat, eine große therapeutische Breite besitzt, die Bakterienzellwand angreift und im murinen Pneumonie-Modell bereits getestet wurde (136) (137). In der vorliegenden Studie wurde ein Penicillin-sensibler Serotyp 3 für die pulmonale Infektion verwendet. Da sowohl die Gabe von Amoxicillin als auch Cpl-1 allein im untersuchten Modell zu einem vollständigen Überleben der Mäuse führte, wurde die Erregerelimination in Lungengewebe und Blut als Surrogatparameter für einen möglichen Synergismus untersucht.

Die Kombinationstherapie führte im angewandten Modell zum Zeitpunkt 60 Stunden nach der Infektion zu einer signifikanten Reduktion der Bakterienlast im Lungengewebe im Vergleich zur Monotherapie mit Cpl-1 oder Amoxicillin. Zum Zeitpunkt 120 Stunden nach der Infektion zeigte sich tendenziell eine verstärkte Reduktion der Bakterienlast in der Kombinationstherapie im Vergleich zur Monotherapie. Diese Ergebnisse differieren zu denen der *in-vitro*-Beobachtungen, die einen synergistischen Effekt von Cpl-1 mit einem β-Lactam-Antibiotikum nur bei penicillinresistenten, nicht aber bei penicillin-sensiblen Pneumokokken zeigen konnten (105). Dieser Unterschied könnte auf den unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften der Substanzen basieren, die im *in-vitro* Versuch nicht berücksichtigt wurden. Amoxicillin (365,4 g x mol^{-1}) hat eine geringere Molekülgröße als Cpl-1 (39000 g x mol^{-1}) und damit evtl. eine bessere Gewebegängigkeit. Cpl-1 hingegen wirkt wesentlich schneller auf sensible Bakterien als Amoxicillin. Möglicherweise ergänzen sich die beiden Substanzen, was zu der hier beobachteten Reduktion der Bakterienlast führte. Eine längere Halbwertzeit von Amoxicillin gegenüber Cpl-1 scheidet als Erklärung jedoch aus, da die HWZ von Amoxicillin und Cpl-1 im Plasma bei Mäusen vergleichbar ist (136).

Potenzielle synergistische Effekte von Antibiotika und Phagenenzymen könnten klinische Relevanz haben. Eine Kombinationstherapie könnte nicht nur zu einer Verkürzung der Behandlungsdauer führen, sondern die Wirkung der Antibiotika gegenüber pathogenen Erregern verbessern und die Resistenzentstehung der Bakterien reduzieren. Bei der Verwendung von Phagenenzymen könnte weiterhin eine Kombinationstherapie den Nachteilen, die durch die kurze Halbwertszeit von Cpl-1 im Plasma entstehen, entgegenwirken.

6.5 Die Behandlung mit Cpl-1 reduziert die pulmonale, funktionelle Beeinträchtigung während der schweren Pneumokokken-Pneumonie

Der Abfall der dynamischen Lungencompliance (C_{dyn}) ist ein unspezifischer Indikator für eine akute Lungenschädigung sowohl beim Menschen, als auch bei Mäusen (138) (139). Bei Parker *et al*. werden als pathophysiologischer Mechanismus für den Abfall der C_{dyn} während der Pneumonie ein neu aufgetretenes interstitielles sowie alveoläres Ödem, diffuse Atelektasenbildung und zelluläre Infiltrate genannt (140). In früheren Arbeiten zu dem hier verwendeten Modell konnte zeigt werden, dass es während einer Pneumonie zu einer gesteigerten Permeabilität der Lungengefäße und damit

einhergehend zu einem Abfall der C_{dyn} kommt (68). Eine schwere Pneumonie führt ebenfalls zu arterieller Hypoxämie und steigendem alveolo-arteriellen Sauerstoffgradienten(141) (19). In Übereinstimmung mit diesen Studien zeigt sich in der vorliegenden Studie 24 Stunden nach der Infektion ein Abfall des mittleren arteriellen Oxygenierungs-Quotienten im Vergleich zur nicht infizierten Kontrollgruppe. Mögliche Ursachen hierfür können u.a. eine verschlechterte Surfactant-Sekretion, ein Ausfall der Hypoxie bedingten pulmonalen Vasokonstriktion (Euler-Liljestrand-Mechanismus) während der Pneumonie (142), sowie ein interstitielles Ödem(19) sein. Die histologisch nachweisbare Progression der Entzündung ging dabei mit der Verschlechterung des Oxygenierungs-Quotienten einher. Im Verlauf der Erkrankung waren 36 Stunden nach Infektion eine weitere Ausbreitung des perivaskulären Ödems und nach 60 Stunden eine Destruktion des Lungengewebes nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt wurde auch ein signifikanter Unterschied im Oxygenierungs-Quotienten zwischen den infizierten und mit Cpl-1 behandelten Mäusen und denen der Kontrollgruppe dokumentiert. Während bei den infizierten Kontrollmäusen funktionell bereits ein ARDS mit einem mittleren Oxygenierungs-Quotienten <300 nachweisbar war, zeigten die mit Cpl-1 behandelten Mäuse im Mittel Werte des Oxygenierungs-Quotienten >400. In Zusammenschau mit den Ergebnissen der Histologie ist davon auszugehen, dass es unter Cpl-1-Behandlung zum Rückgang der Entzündungsreaktion kam, und damit zu einem verbesserten Gasaustausch.

Zusammenfassend indizieren die Ergebnisse der Messungen der dynamischen Compliance und des Oxygenierungs-Quotienten sowie der histologischen Analyse, dass die Behandlung mit Cpl-1 auch zu einer pulmonalen, funktionellen Verbesserung während der schweren Pneumonie im Vergleich zu unbehandelten Tieren führte. Die Reduktion des Laktatwertes spiegelt am ehesten die Verhinderung einer pneumogenen Sepsis durch die Cpl-1 Therapie wieder.

6.6 Die intraperitoneale Behandlung mit Cpl-1 wirkt dem septischen Verlauf der Pneumokokken-Pneumonie entgegen

Im Verlauf einer unbehandelten Pneumonie kommt es häufig zu einer Bakterämie, sowohl beim Patienten als auch im murinen Modell der Pneumokokken-Pneumonie (143) (144) Eine Bakteriämie zeigt eine pneumogene Sepsis an, sofern es zu einer systemisch entzündlichen Abwehrreaktion (SIRS; engl.:*Systemic Inflammatory*

Response Syndrome) kommt, die anhand von mindestens zwei der folgenden Kriterien nachgewiesen wird: (i) Hypo- oder Hyperthermie, (ii) Tachykardie, (iii) Tachypnoe und (iv) Leukozytose oder Leukopenie.. Sie ist beim Menschen, selbst bei maximaler Therapie, mit einer Mortalität von 15-20% vergesellschaftet (44) (48).

Die Definition der *schweren Sepsis* ist an das Vorliegen von Organdysfunktionen geknüpft. Der septische Schock ist definiert als Sepsis plus therapieresistente Hypotension oder Hypoperfusion trotz adäquater hoher Flüssigkeitstherapie (51). In der vorliegenden Studie wurden bei den Tieren sowohl der Verlauf der Körpertemperatur, die Bakterienanzahl im Blut als auch die systemische Zytokinfreisetzung und Serumlaktat bestimmt. Zum Zeitpunkt der erstmaligen Behandlung mit Cpl-1 waren bei den infizierten Tieren bereits deutliche klinische Krankheitszeichen wie erschwerte Atmung, Gewichtsverlust, struppiges Fell und reduzierte Reaktion auf äußere Reize, sowie ein Abfall der Körpertemperatur und des Körpergewichtes nachweisbar. Dieser klinische Verlauf deckte sich mit der Beobachtung einer vergleichbaren Studie im murinen Pneumokokken-Pneumonie Modell von Wang et al.(144).

In der infizierten Kontrollgruppe waren 36 Stunden nach Induktion der Pneumonie Bakterien im Blut nachweisbar. In der Folge stieg in der unbehandelten Gruppe die Bakterienlast im Blut sukzessive an. Parallel kam es zum Abfall der Körpertemperatur und des Körpergewichtes und schließlich zu einem deutlichen Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks. Dabei ist der Abfall des arteriellen, mittleren Blutdrucks möglicherweise Folge einer Freisetzung von gefäßwirksamen Mediatoren und damit verbundener erhöhter vaskulärer Permeabilität, einer Sepsis-bedingten Kardiomyopathie oder eines nicht ausgeglichenen intravaskulären Volumenverlustes (145). In der mit Cpl-1 behandelten Gruppe waren zu keinem untersuchten Zeitpunkt (mit Ausnahme eines vereinzelten Nachweises nach 60h) Bakterien im Blut nachweisbar. Diese Ergebnisse in Zusammenschau mit den Untersuchungen zur Bakterienlast im Lungengewebe deuten darauf hin, dass die Cpl-1-Gabe die Verbreitung von *S. pneumoniae* aus dem Lungengewebe in den Blutkreislauf verhindert und konsekutiv einer Bakteriämie und Streuung der Bakterien effektiv entgegenwirkt. Dieser Befund steht im Einklang mit denen anderer Studien von Jado et al. und Loeffler et al. So zeigte sich Cpl-1 sowohl intravenös als auch intraperitoneal appliziert als effektives Therapeutikum bei einer durch Pneumokokken induzierten peritonealen Sepsis und Bakteriämie (108) (109). Unterstützt wird die Annahme, dass Cpl-1 eine

Sepsis verhindert hat durch die Messung des Serum-Laktatwertes. Die Ursachen für einen Anstieg des Laktatwertes sind vielseitig. Neben der verminderten Laktat-Clearance können anaerober Metabolismus in hypoxischen Regionen, Hypoperfusion von Organen, Effekte von Zytokinen, sowie infektionsspezifische metabolische Adaptionsmechanismen zu einem Anstieg führen (146) (147). Bei der Sepsis ist ein ansteigender Laktatwert ein sensitiver und klinisch viel beachteter Parameter der Organdysfunktion. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass es in der Kontrollgruppe zu einem Anstieg des systemischen Laktatwerts kam. In der mit Cpl-1 behandelten Gruppe blieb der Laktatwert jedoch auf dem Niveau der nicht infizierten Tiere.

Zusammengefasst verhinderte die Gabe von Cpl-1 eine Bakteriämie, Hypothermie, Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks, Anstieg des Laktatwertes im Serum und in Gesamtbetrachtung die Entstehung einer pneumogenen Sepsis.

6.7 Nach der Applikation von Cpl-1 kommt es zu keinem Zytokinsturm im Verlauf der murinen Pneumokokken-Pneumonie

Zytokine und Chemokine bilden funktionell eine der vielseitigsten Gruppen von Mediatoren, welche die Immunantwort entscheidend beeinflussen (17). Die Erkennung von Pathogenen und die Freisetzung von Zytokinen sind zentraler Bestandteil der angeborenen Immunantwort. Sowohl bei der Pneumokokken-Pneumonie des Menschen als auch im Tiermodell kommt es zu einer lokalen Immunantwort, die sich auch systemisch ausbreiten kann (127, 143, 144, 148). Eine Immunantwort kann sowohl von lebenden Bakterien als auch von Bakterienbestandteilen ausgelöst werden (149–151).

Während der Bakteriolyse durch Cpl-1 können pro-inflammatorische Zellwand- und Membran-assoziierte Komponenten freigesetzt werden. Dies kann zu einer pro-inflammatorischen Reaktion und eventuell einer Schädigung des Gesamtorganismus führen (128). Für herkömmliche Antibiotika wurde eine Immunreaktion nach Therapiebeginn erstmals von Herxheimer et al. beschrieben (152).

Bisher wurden bei *in-vivo* Studien zum therapeutischen Einsatz von Endolysinen keine Bakteriolyse-assoziierten Nebenwirkungen beobachtet. Auch wurde unter der Therapie von bakteriellen Infektionen mit Phagen beim Menschen von keinen pro-inflammatorischen Reaktionen berichtet (153). Gezielt wurde bisher nur in einer Arbeit im Ratten-Modell der Pneumokokken-Endokarditis und Bakteriämie die Zytokinantwort

nach der Behandlung mit Endolysinen untersucht. In dieser Studie wurde gezeigt, dass es nach der Applikation von Cpl-1 (250 mg/kg KM Bolus +250 mg/kg KM/h Infusion für 6 Stunden) zu einem deutlichen Anstieg der Zytokine IL-1α, IL-1β, IL-6, TNFβ und IL-10 im Blut kam. Die Autoren sprechen in diesem Zusammenhang von einem möglichen negativen Effekt der Cpl-1 Behandlung auf den Organismus (109).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Konzentrationen verschiedener Zytokine nach Cpl-1-Therapie im Blut und im Lungengewebe gemessen. Um einen frühzeitigen Anstieg der Zytokine beobachten zu können, erfolgte die erste Untersuchung sechs Stunden nach erstmaliger Applikation von Cpl-1. In der Gruppe der unbehandelten Tiere zeigte sich zum Zeitpunkt der Behandlung ein Anstieg der Zytokinkonzentrationen von IL-6, KC, IL-10, MIP-1α, MCP-1 und G-CSF im Lungengewebe. Die im Verlauf der Infektion gemessenen Konzentrationen der Chemokine korrelierten mit den histologischen Veränderungen. Die hohe IL-10 Expression in der Gruppe der unbehandelten Tiere ist wahrscheinlich Ursache einer unkontrollierten pro-inflammatorischen Reaktion, wie sie sowohl beim Menschen(154), als auch in tierexperimentellen Studien beobachtet wurde (155). Der Anstieg der Zytokinkonzentrationen im Blut war im Vergleich zum Lungengewebe niedriger und zeitlich verzögert. Möglicherweise ist dies durch die Kompartimentierung der Infektion bedingt (156). Diese Beobachtung deckt sich mit Untersuchungen am Menschen mit unilateraler Pneumonie, bei denen hohe Level von IL-6 nur in der BALF des infizierten Lungenflügels, nicht jedoch im Serum oder in nicht betroffenen Lungenbereichen gemessen wurden (156). Interessanterweise kam es zu keinem Zeitpunkt nach der Behandlung mit Cpl-1 zu einer ansteigenden Konzentration der gemessenen Zytokine im Vergleich zur Kontrollgruppe. Vielmehr war im Verlauf der Behandlung mit Cpl-1 ein Rückgang der Zytokin-Antwort zu beobachten, was Folge einer wirkungsvollen Therapie sein könnte (148).

Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen, im Gegensatz zur Studie von *Entenza* et al., keinen Anstieg der Zyokinfreisetzung nach Cpl-1-Gabe, weder systemisch noch lokal. Diese Ergebnisse werden von *in-vitro*-Daten aus humanen Bronchialepithelzellen bestätigt (157). Auch hier zeigte sich nach Inkubation der Zellen mit durch Cpl-1 (bis zu 10 U/ml) lysierten Pneumokokken kein Anstieg der Zytokine IL-1β, IL-8, IFN und G-CSF. Unklar bleibt, warum sich die Ergebnisse im Endokarditis-Modell bei jungen Ratten und im vorliegenden murinen Modell unterscheiden. Neben einer Spezies-

spezifischen Reaktion könnte der Grund in der Verwendung unterschiedlich virulenter Pneumokokken-Stämme liegen. Studien in verschiedenen Meningitis-Modellen beschreiben eine Serotyp-spezifische Inflammationsreaktion (158) (159). Im Endokarditis-Modell wurde der penicillin- und erythromycin-resistente Stamm *S. pneumoniae* WB4, im Pneumonie-Modell der penzilin-sensible Stamm der Serogruppe 3 (Stamm NCTC 7978) verwendet. Des Weiteren lag beim Endokarditis-Modell bei Therapiebeginn bereits eine ausgeprägte Bakteriämie vor, während im Pneumonie-Modell bei erstmaliger Gabe nur vereinzelt Bakterien im Blut nachweisbar waren. Schließlich unterschieden sich die eingesetzten Dosen von Cpl-1 in den beiden Modellen erheblich (50 mg/kg KM vs. 250 mg/kg KM als Bolus, gefolgt von einer kontinuierlichen Infusion von 250 mg/kg/h für 6 Stunden). Denkbar wäre, dass eine höhere Dosis zu einer stärkeren Fragmentierung der bakteriellen Zellwand führt und damit zu einer stärkeren Immunantwort. Zu beachten ist auch, dass im Endokarditis-Modell das Endolysin direkt in den Blutkreislauf gegeben wurde, während im vorliegenden Modell eine intraperitoneale Applikation gewählt wurde (109). Wahrscheinlich wurde im Endokarditis-Modell eine wesentlich höhere Konzentration von Cpl-1 pro Bakterienzelle erreicht.

6.8 Die intratracheale Applikation von Cpl-1 ermöglicht eine Reduktion der Gesamtdosis bei gleich bleibend hoher Effektivität

Antibiotika können bei schweren Infektionen auch als Aerosol gegeben werden (160–162). Als Vorteil der gezielten Applikation gegenüber der systemischen Applikation wird in der Literatur vor allem die Möglichkeit der Dosisreduktion und einhergehend eine Verringerung von Nebenwirkungen genannt (163) (164). Mehrere Studien sowohl beim Menschen als auch in Tiermodellen legen die therapeutischen Möglichkeiten dieses Applikationsweges nahe, der inzwischen klinische Realität ist (88) (162). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, ob eine intratracheale Applikation von Cpl-1 eine Behandlungsoption bei der murinen Pneumonie ist und eine Reduktion der Cpl-1 Dosis im Vergleich zur systemischen Applikation ermöglicht. Hierzu wurde Cpl-1 im murinen Pneumonie-Modell mittels Microsprayer 24 Stunden nach der Infektion intratracheal aerosolisiert. Die mit Cpl-1 behandelten Tiere zeigten bereits eine Stunde nach der Applikation eine deutliche Reduktion der Bakterienlast im Vergleich zu den Kontrolltieren. Darüber hinaus waren bei den behandelten Tieren keine Bakterien im

Blut nachweisbar. Bei der histologischen Analyse zeigte sich im Verlauf ein Rückgang der Pneumonie. Einhergehend mit diesen Beobachtungen verbesserte die Cpl-1-Behandlung das Überleben deutlich. Im Gegensatz zur intraperitonealen Applikation zeigte sich bei der intratrachealen Gabe ein Anstieg der Zytokine IL-1β und IL-6 nach Applikation. Die histologische Auswertung zeigte jedoch keine Infiltrat- oder Ödem-Bildung.

Denkbar ist, dass die inflammatorische Reaktion durch das Protein selbst und/oder durch die Lyse von Pneumokokken und die damit einhergehende Bildung von bakteriellen Strukturen und Freisetzung von intrazellulären Bestandteilen ausgelöst wurde. Interessanterweise steht dieser Befund im Einklang mit einer Studie, in der in einem Modell der Pneumokokken-Endokarditis und Bakteriämie ebenfalls erhöhte Plasma Level von IL-1β, IL-6, Interferon-γ und TNFα nach Cpl-1 Applikation gemessen wurden (109). Möglicherweise ist die erhöhte Konzentration von Cpl-1 am Ort der Infektion hierfür verantwortlich, während es bei der intraperitonealen Applikation wahrscheinlich zu einem verzögerten Anfluten am Infektionsort kommt. Bemerkenswert ist, dass weder die mehrfache intraperitoneale Applikation von Cpl-1 oder Amoxicillin, noch die Kombination beider Substanzen oder die intratracheale Applikation zu einer vollständigen Eradikation der Bakterien aus dem Lungengewebe führte.

Wie bei der intraperitonealen Applikation von Cpl-1 stieg auch nach intratrachealer Applikation das Körpergewicht und das klinische Erscheinungsbild verbesserte sich deutlich im Zuge der Behandlung (157). Im Gegensatz zur intraperitonealen Behandlung zeigten sich bei der intratrachealen Applikation eine geringere Dosis und eine einmalige Behandlung als ausreichend, um ein nahezu vollständiges Überleben der Tiere zu erreichen.

6.9 Ausblick

Die steigende Rate an Antibiotika-Resistenzen bei Bakterien und die daraus resultierend erschwerte Behandlung von Infektionskrankheiten erhöht die Notwendigkeit, alternative antimikrobielle Therapiestrategien zu etablieren. In diesem Zusammenhang ist der Einsatz von phagenspezifischen Endolysinen in den Fokus gerückt. Die in den letzten Jahren steigende Anzahl an Publikationen zum Thema verdeutlicht das wissenschaftliche Interesse an dieser antimikrobiellen Therapie. Vor

der klinischen Erprobung von Endolysinen bei Pneumokokken-Pneumonie müssen jedoch noch einige Fragen geklärt sein.

1. Cpl-1 wirkt selektiv auf *S. pneumoniae*. Deshalb muss der Erreger vor der Behandlung eindeutig und schnell nachgewiesen werden. Dies ist durch die Verwendung eines für *S. pneumoniae* spezifischen Antigen-Tests möglich. Der Urin-Antigentest basiert auf einer immunochromatographischen Membran-Untersuchung, detektiert das Polysaccharide-C-Antigen von *S. pneumoniae* und besitzt eine hohe Spezifität und Sensitivität bei der CAP des Erwachsenen (165). Dieser Test könnte somit den zielgerichteten Einsatz von Cpl-1 ermöglichen.
Allerdings ist zu bedenken, dass auch bei einem positiven Nachweis von *S. pneumoniae* eine Mischinfektion bestehen kann, da spezifische Antigene in ca. 10 bis 15% der Mischinfektionen vorliegen (166). Ein alleiniger Einsatz einer für Pneumokokken-spezifischen antimikrobiellen Substanz erscheint deshalb selbst bei einem positiven Testergebnis fraglich. Daher ist für den therapeutischen Einsatz zu klären, ob eine Kombinationstherapie von Cpl-1 und einem herkömmlichen Antibiotikum möglich ist. Daten aus der vorliegenden Studie deuten die Möglichkeit einer Kombinationstherapie an. Klinische Relevanz könnte dieses Vorgehen insbesondere bei unklaren Erregerresistenzen haben. Mit Cpl-1 könnte eine frühzeitige antibiotische Behandlung auch bei antibiotika-resistenten Pneumokokken gewährleistetet werden, was insbesondere bei der Therapie von lebensbedrohlichen Infektionskrankheiten wie z.B. der Sepsis entscheidend ist (54).

2. Das Enzym Cpl-1 stellt als körperfremdes Protein ein Antigen dar und induziert bei systemischer Gabe im Mausmodell eine Antikörperbildung (107) (108). Daher bleibt zu klären, ob bei einem positiven Anti-Cpl-1-Antikörper Titer eine Behandlung mit Cpl-1 zu unerwünschten Reaktionen des Immunsystems führt. Bisher konnten nach der Sensibilisierung von Mäusen oder Kaninchen weder bei Cpl-1 noch bei anderen Phagen-Lysinen bei erneuter Applikation des Lysins Zeichen schwerer Nebenwirkungen oder gar einer anaphylaktischen Reaktion beobachtet werden (121). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass selbst nach der Bildung von Antikörpern gegen Cpl-1 die Mortalität im murinen Sepsis-Modell durch Cpl-1 effektiv gesenkt werden kann (108). Fraglich bleibt dennoch, ob diese tierexperimentellen Ergebnisse auf den Menschen

übertragbar sind. Vor diesem Hintergrund erscheinen eingehende pharmakologische Tests vor dem Einsatz von lytischen Bakteriophagen-spezifischen Enzymen beim Menschen dringend notwendig.

3. Im Gegensatz zu Antibiotika sind bis heute keine Resistenzbildungen gegen Phagen-lysine beschrieben (61). Für Cpl-1 konnte *in-vitro,* auch nach wiederholter Exposition (bis zu 50 Zyklen) mit niedrig konzentrierten Lysinen, sowohl in flüssigem als auch auf festem Medium keine Restenzbildung bei Pneumokokken beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung könnte die spezifische Bindung von Cpl-1 an Phosphocholin darstellen. Phosphocholin dient sowohl Cpl-1 als auch bakterieneigenen Murinhydrolasen, wie Autolysin A und C, als Rezeptor (66).
Eine genetische Variation am Rezeptormolekül scheint deshalb unwahrscheinlich. Es ist anzunehmen, dass sich im Laufe der Evolution der letzten drei bis vier Milliarden Jahre zwischen Phagen und Bakterien dieser Angriffspunkt als effizientester Rezeptor erwiesen hat (167). Die Bindung von Lysinen an spezifische Zellwandstrukturen, die bei der Vermehrung der Zelle unerlässlich sind, scheint ein Vorteil gegenüber den Antibiotika darzustellen, bei denen Resistenzbildung häufiger beobachtet wird.

4. In der weiteren präklinischen Phase der Entwicklung ist zu diskutieren, ob und in welchem Umfang Untersuchungen an weiteren Tierarten nötig sind, um die pharmakologischen Eigenschaften von Cpl-1 zu charakterisieren und die klinische Wirksamkeit (beim Menschen) bei Infektionskrankheiten zu prognostizieren. Bisher ist die Anzahl der Untersuchungen sowohl zu pharmakokinetischen als auch pharmakodynamischen Eigenschaften von Cpl-1 begrenzt. Das Wissen über Kompartimentkonzentrationen und Dosis-Wirkungs-Beziehungen könnte wertvolle Hinweise hinsichtlich der optimalen Dosierung und Art der Applikation von Cpl-1 erbringen.

5. Eine weitere Herausforderung wird die verbesserte Produktion des Enzyms darstellen. Das in dieser Studie verwendete Enzym wurde rekombinant in *Escherichia coli* hergestellt und mittels Affinitätschromatografie gereinigt. Für einen Einsatz im Menschen muss das Enzym besonders hohen Sicherheitsanforderungen entsprechen, frei von bakteriellen Bestandteilen und in großen Mengen herstellbar sein. Ein

möglicher Weg, um diese Ziele zu erreichen, könnte die kürzlich von einer Arbeitsgruppe am Max Planck Institut in Potsdam beschriebene Klonierung von Phagen-Enzymen in Chloroplast sein (168). Wie die Autoren in ihrer Studie berichten, könnte dieser Ansatz nicht nur die Gewinnung höherer Proteinkonzentrationen pro Zelle ermöglichen, sondern auch einen sicheren und kostengünstigeren Weg der Herstellung darstellen. So enthalten die gewonnenen Pflanzenextrakte keine Bakterienbestandteile und müssen somit auch nicht kostenintensiv von Endotoxinen befreit werden.

6. Kürzlich veröffentlichte Studien zeigen Möglichkeiten zur Proteinmodifikation von Phagenlysinen auf, welche zu einem breiten Anwendungsgebiet für lytische Enzyme führen könnten. Durch Veränderungen an den Domänen lassen sich beispielsweise Lysine mit multiplen Bindungsdomänen und/oder lytischen Eigenschaften herstellen (169) (170)Fortschritte bei der Erforschung von Proteinzusammensetzung und -herstellung könnten zukünftig weitere Verbesserungen erbringen (171). In aktuellen Studien wurden bereits einige Lysinproteine auf ihre aktiven Bestandteile verkürzt, ohne dabei ihre Aktivität einzubüßen (172) (173).

Auf der Welt gibt es schätzungsweise 10^{31}Phagen (61). Daher erscheint das Potenzial zur Entdeckung neuer lytischer Phagenenzyme und das damit verbundene therapeutische Potenzial weitreichend. Die hier gezeigten Ergebnisse ergänzen das Wissen über eine vielversprechende, neue Klasse von antimikrobiellen Substanzen.

7 Literaturverzeichnis

1. Baumann R, Kurtz A. Atmung. In: Klinke R, Pape HC, Kurtz A, Sibernagel S. Physiologie. 6. Auflage. Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag 2010;258-262.

2. Dunker HR, Kummer W. Atemsystem. In: Drenckhahn D, Benninghoff, A. Anatomie 1. 17. Auflage. München / Jena, Deutschland: Urban & Fischer bei Elsevier 2008;559-575.

3. Crapo JD, Barry BE, Gehr P, Bachofen M, Weibel ER. Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *The American Review of Respiratory Disease* 1982;126:332–7.

4. Herzog EL, Brody AR, Colby T V, Mason R, Williams MC. Knowns and unknowns of the alveolus. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2008;5:778–82.

5. Matthay MA, Zemans RL. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. *Annual Review of Pathology* 2011;6:147–63.

6. Donnelly LE, Barnes PJ. Defective phagocytosis in airways disease. *Chest* 2012;141:1055–62.

7. Knowles MR, Boucher RC. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *The Journal of Clinical Investigation* 2002;109:571–7.

8. Hippenstiel S, Opitz B, Schmeck B, Suttorp N. Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia--molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction. *Respiratory Research* 2006;7:97.

9. Mizgerd JP. Acute lower respiratory tract infection. *The New England Journal of Medicine* 2008;358:716–27.

10. Seeley EJ, Matthay MA, Wolters PJ. Inflection Points in Sepsis Biology: From Local Defense to Systemic Organ Injury. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology* 2012;

11. Kondo T, Kawai T, Akira S. Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling. *Trends in Immunology* 2012;33:449–58.

12. Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock D. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *Journal of Immunology* 1999;163:1–5.

13. Means TK, Lien E, Yoshimura A, Wang S, Golenbock DT, Fenton MJ. The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *Journal of immunology* 1999;163:6748–55.

14. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000;408:740–5.

15. Calbo E, Garau J. Of mice and men: innate immunity in pneumococcal pneumonia. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2010;35:107–13.

16. Malley R, Henneke P, Morse SC, Cieslewicz MJ, Lipsitch M, Thompson CM, Kurt-Jones E, Paton JC, Wessels MR, Golenbock DT. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:1966–71.

17. Strieter RM, Belperio JA, Keane MP. Cytokines in innate host defense in the lung. *The Journal of Clinical Investigation* 2002;109:699–705.

18. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *The New England Journal of Medicine* 2000;342:1334–49.

19. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome. *The Journal of Clinical Investigation* 2012;122:2731–40.

20. Welte T. [Community-acquired pneumonia]. *Der Internist* 2009;50:331–9; quiz 340.

21. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Barker-Collo S, Bartels DH, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bhalla K, Bikbov B, Bin Abdulhak A, Birbeck G, Blyth F, Bolliger I, Boufous S, Bucello C, *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012;380:2095–128.

22. Williams BG, Gouws E, Boschi-Pinto C, Bryce J, Dye C. Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. *The Lancet Infectious Diseases* 2002;2:25–32.

23. O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, Lee E, Mulholland K, Levine OS, Cherian T. Burden of disease caused by Streptococcus pneumoniae in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* 2009;374:893–902.

24. Berkley JA, Lowe BS, Mwangi I, Williams T, Bauni E, Mwarumba S, Ngetsa C, Slack MPE, Njenga S, Hart CA, Maitland K, English M, Marsh K, Scott JAG. Bacteremia among children admitted to a rural hospital in Kenya. *The New England Journal of Medicine* 2005;352:39–47.

25. Ewig S, Birkner N, Strauss R, Schaefer E, Pauletzki J, Bischoff H, Schraeder P, Welte T, Hoeffken G. New perspectives on community-acquired pneumonia in 388 406 patients. Results from a nationwide mandatory performance measurement programme in healthcare quality. *Thorax* 2009;64:1062–9.

26. Mongardon N, Max A, Bougle A, Pene F, Lemiale V, Charpentier J, Cariou A, Chiche J-D, Bedos J-P, Mira J-P. Epidemiology and outcome of severe pneumococcal pneumonia admitted to intensive care unit: a multicenter study. *Critical Care* 2012;16:R155.

27. Schnoor M, Hedicke J, Dalhoff K, Raspe H, Schäfer T. Approaches to estimate the population-based incidence of community acquired pneumonia. *The Journal of Infection* 2007;55:233–9.

28. Jepson SL, Pakkal M, Bajaj A, Raj V. Pulmonary complications in the non-HIV immunocompromised patient. *Clinical Radiology* 2012;67:1001–10.

29. Pletz MW, Von Baum H, Van der Linden M, Rohde G, Schütte H, Suttorp N, Welte T. The Burden of Pneumococcal Pneumonia - Experience of the German Competence Network CAPNETZ. *Pneumologie (Stuttgart, Germany)* 2012;66:470–475.

30. Höffken G, Lorenz J, Kern W, Welte T, Bauer T, Dalhoff K, Dietrich E, Ewig S, Gastmeier P, Grabein B, Halle E, Kolditz M, Marre R, Sitter H. Guidelines of the Paul-Ehrlich-Society of Chemotherapy, the German Respiratory Diseases Society, the German Infectious Diseases Society and of the Competence Network CAPNETZ for the Management of Lower Respiratory Tract Infections and Community-acquired P. *Pneumologie (Stuttgart, Germany)* 2010;64:149–54.

31. Loke YK, Kwok CS, Niruban A, Myint PK. Value of severity scales in predicting mortality from community-acquired pneumonia: systematic review and meta-analysis. *Thorax* 2010;65:884–90.

32. Huss A, Scott P, Stuck AE, Trotter C, Egger M. Efficacy of pneumococcal vaccination in adults: a meta-analysis. *Canadian Medical Association journal* 2009;180:48–58.

33. Musher DM, Sampath R, Rodriguez-Barradas MC. The potential role for protein-conjugate pneumococcal vaccine in adults: what is the supporting evidence? *Clinical Infectious Diseases* 2011;52:633–40.

34. Hsu HE, Shutt KA, Moore MR, Beall BW, Bennett NM, Craig AS, Farley MM, Jorgensen JH, Lexau CA, Petit S, Reingold A, Schaffner W, Thomas A, Whitney CG, Harrison LH. Effect of pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis. *The New England Journal of Medicine* 2009;360:244–56.

35. Pilishvili T, Lexau C, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, Reingold A, Thomas A, Schaffner W, Craig AS, Smith PJ, Beall BW, Whitney CG, Moore MR. Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. *The Journal of Infectious Diseases* 2010;201:32–41.

36. Moore MR, Gertz RE, Woodbury RL, Barkocy-Gallagher GA, Schaffner W, Lexau C, Gershman K, Reingold A, Farley M, Harrison LH, Hadler JL, Bennett NM, Thomas AR, McGee L, Pilishvili T, Brueggemann AB, Whitney CG, Jorgensen JH, Beall B. Population snapshot of emergent Streptococcus pneumoniae serotype

19A in the United States, 2005. *The Journal of Infectious Diseases* 2008;197:1016–27.

37. Burgos J, Lujan M, Falcó V, Sánchez A, Puig M, Borrego A, Fontanals D, Planes AM, Pahissa A, Rello J. The spectrum of pneumococcal empyema in adults in the early 21st century. *Clinical Infectious Diseases* 2011;53:254–61.

38. Gertz RE, Li Z, Pimenta FC, Jackson D, Juni BA, Lynfield R, Jorgensen JH, Carvalho M da G, Beall BW. Increased penicillin nonsusceptibility of nonvaccine-serotype invasive pneumococci other than serotypes 19A and 6A in post-7-valent conjugate vaccine era. *The Journal of Infectious Diseases* 2010;201:770–5.

39. Rice TW, Rubinson L, Uyeki TM, Vaughn FL, John BB, Miller RR, Higgs E, Randolph AG, Smoot BE, Thompson BT. Critical illness from 2009 pandemic influenza A virus and bacterial coinfection in the United States. *Critical Care Medicine* 2012;40:1487–98.

40. Bonafede MM, Suaya JA, Wilson KL, Mannino DM, Polsky D. Incidence and cost of CAP in a large working-age population. *The American Journal of Managed Care* 2012;18:380–7.

41. Bogaert D, De Groot R, Hermans PWM. Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease. *The Lancet Infectious Diseases* 2004;4:144–54.

42. Van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* 2009;374:1543–56.

43. Thigpen MC, Whitney CG, Messonnier NE, Zell ER, Lynfield R, Hadler JL, Harrison LH, Farley MM, Reingold A, Bennett NM, Craig AS, Schaffner W, Thomas A, Lewis MM, Scallan E, Schuchat A. Bacterial meningitis in the United States, 1998-2007. *The New England Journal of Medicine* 2011;364:2016–25.

44. Naucler P, Darenberg J, Morfeldt E, Ortqvist A, Henriques Normark B. Contribution of host, bacterial factors and antibiotic treatment to mortality in adult patients with bacteraemic pneumococcal pneumonia. *Thorax* 2013;doi:68(6):571-9

45. De Roux A, Cavalcanti M, Marcos MA, Garcia E, Ewig S, Mensa J, Torres A. Impact of alcohol abuse in the etiology and severity of community-acquired pneumonia. *Chest* 2006;129:1219–25.

46. Nunes MC, Von Gottberg A, De Gouveia L, Cohen C, Kuwanda L, Karstaedt AS, Klugman KP, Madhi SA. Persistent high burden of invasive pneumococcal disease in South African HIV-infected adults in the era of an antiretroviral treatment program. *PloS one* 2011;6:e27929.

47. Yuste J, Sen A, Truedsson L, Jönsson G, Tay L-S, Hyams C, Baxendale HE, Goldblatt F, Botto M, Brown JS. Impaired opsonization with C3b and phagocytosis of Streptococcus pneumoniae in sera from subjects with defects in the classical complement pathway. *Infection and Immunity* 2008;76:3761–70.

48. Austrian R, Gold J. Pneumococcal bacteremia with especial reference to bacteremic pneumococcal pneumonia. *Annals of Internal Medicine* 1964;60:759–76.

49. Lujan M, Gallego M, Fontanals D, Mariscal D, Rello J. Prospective observational study of bacteremic pneumococcal pneumonia: Effect of discordant therapy on mortality. *Critical Care Medicine* 2004;32:625–31.

50. Hagel S, Pletz MW, Brunkhorst FM, Seifert H, Kern W V. Bacteremia and sepsis. *Der Internist* 2013;54:399–407.

51. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R, Calandra T, Dhainaut J-F, Gerlach H, Harvey M, Marini JJ, Marshall J, Ranieri M, Ramsay G, Sevransky J, Thompson BT, Townsend S, Vender JS, Zimmerman JL, Vincent J-L. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Critical Care Medicine* 2008;36:296–327.

52. Dremsizov T, Clermont G, Kellum JA, Kalassian KG, Fine MJ, Angus DC. Severe sepsis in community-acquired pneumonia: when does it happen, and do systemic inflammatory response syndrome criteria help predict course? *Chest* 2006;129:968–78.

53. Garnacho-Montero J, Garcia-Garmendia JL, Barrero-Almodovar A, Jimenez-Jimenez FJ, Perez-Paredes C, Ortiz-Leyba C. Impact of adequate empirical antibiotic therapy on the outcome of patients admitted to the intensive care unit with sepsis. *Critical Care Medicine* 2003;31:2742–51.

54. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Herrera-Melero I, Aldabó-Pallás T, Cayuela-Dominguez A, Marquez-Vacaro JA, Carbajal-Guerrero J, Garcia-Garmendia JL. Mortality and morbidity attributable to inadequate empirical antimicrobial therapy in patients admitted to the ICU with sepsis: a matched cohort study. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008;61:436–41.

55. Rubenfeld GD, Herridge MS. Epidemiology and outcomes of acute lung injury. *Chest* 2007;131:554–62.

56. Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *Journal of the American Medical Association* 2012;307:2526–33.

57. Dawson MH. The transformation of pneumococcal types : I. the conversion of r forms of pneumococcus into s forms of the homologous type.. *The Journal of Experimental Medicine* 1930;51:99–122.

58. Avery OT, Macleod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types : induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *The Journal of Experimental Medicine* 1944;79:137–58.

59. Heidelberger M, Avery OT. The soluble specific substance of pneumococcus. *The Journal of Experimental Medicine* 1923;38:73–9.

60. Musher DM. *Streptococcus pneumoniae*. In: Mandell GL. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 7. Auflage. Churchill Livingstone; 2009;2623-39.

61. Fischetti VA. Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Current Opinion in Microbiology* 2008;11:393–400.

62. Hathaway LJ, Brugger SD, Morand B, Bangert M, Rotzetter JU, Hauser C, Graber WA, Gore S, Kadioglu A, Mühlemann K. Capsule type of Streptococcus pneumoniae determines growth phenotype. *PLoS pathogens* 2012;8:e1002574.

63. Hausdorff WP, Feikin DR, Klugman KP. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. *The Lancet Infectious Diseases* 2005;5:83–93.

64. Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature Reviews Microbiology* 2008;6:288–301.

65. Hammerschmidt S, Wolff S, Hocke A, Rosseau S, Müller E, Rohde M. Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infection and Immunity* 2005;73:4653–67.

66. Domenech M, García E, Moscoso M. In vitro destruction of Streptococcus pneumoniae biofilms with bacterial and phage peptidoglycan hydrolases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011;55:4144–8.

67. Berry AM, Yother J, Briles DE, Hansman D, Paton JC. Reduced virulence of a defined pneumolysin-negative mutant of Streptococcus pneumoniae. *Infection and Immunity* 1989;57:2037–42.

68. Witzenrath M, Gutbier B, Hocke AC, Schmeck B, Hippenstiel S, Berger K, Mitchell TJ, De los Toyos JR, Rosseau S, Suttorp N, Schütte H. Role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia. *Critical Care Medicine* 2006;34:1947–54.

69. Hansman D, Devitt L, Miles H, Riley I. Pneumococci relatively insensitive to penicillin in Australia and New Guinea. *The Medical journal of Australia* 1974;2:353–6.

70. Richter SS, Heilmann KP, Dohrn CL, Riahi F, Beekmann SE, Doern G V. Changing epidemiology of antimicrobial-resistant Streptococcus pneumoniae in the United States, 2004-2005. *Clinical Infectious Diseases* 2009;48:e23–33.

71. Liu Z, Nachamkin I, Edelstein PH, Lautenbach E, Metlay JP. Serotype emergence and genotype distribution among macrolide-resistant invasive Streptococcus

pneumoniae isolates in the postconjugate vaccine (PCV-7) era. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2012;56:743–50.

72. Jenkins SG, Brown SD, Farrell DJ. Trends in antibacterial resistance among Streptococcus pneumoniae isolated in the USA: update from PROTEKT US Years 1-4. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2008;7:1.

73. Patel SN, McGeer A, Melano R, Tyrrell GJ, Green K, Pillai DR, Low DE. Susceptibility of Streptococcus pneumoniae to Fluoroquinolones in Canada. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011;55:3703–3708.

74. Flamm RK, Farrell DJ, Mendes RE, Ross JE, Sader HS, Jones RN. LEADER Surveillance program results for 2010: an activity and spectrum analysis of linezolid using 6801 clinical isolates from the United States (61 medical centers). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2012; 74(1):54-61.

75. Richter SS, Heilmann KP, Dohrn CL, Riahi F, Beekmann SE, Doern G V. Changing epidemiology of antimicrobial-resistant Streptococcus pneumoniae in the United States, 2004-2005. *Clinical Infectious Diseases* 2009;48:e23–33.

76. Imai S, Ito Y, Ishida T, Hirai T, Ito I, Maekawa K, Takakura S, Iinuma Y, Ichiyama S, Mishima M. High prevalence of multidrug-resistant Pneumococcal molecular epidemiology network clones among Streptococcus pneumoniae isolates from adult patients with community-acquired pneumonia in Japan. *Clinical Microbiology and Infection* 2009;15:1039–45.

77. Gant CM, Rosingh AW, López-Hontangas JL, Van der Heijden M, González-Morán F, Bijlsma JJE, Canton E. Serotype distribution and antimicrobial resistance of invasive pneumococcal disease strains in the Comunidad Valenciana, Spain during the winter of 2009-2010; low PCV7 coverage and high levofloxacin resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2012; 56(9):4988-9.

78. Cardoso MRA, Nascimento-Carvalho CM, Ferrero F, Berezin EN, Ruvinsky R, Camargos PAM, Sant'anna CC, Brandileone MCC, De Fátima P March M, Feris-Iglesias J, Maggi RS, Benguigui Y. Penicillin-resistant pneumococcus and risk of treatment failure in pneumonia. *Archives of Disease in Childhood* 2008;93:221–5.

79. Tleyjeh IM, Tlaygeh HM, Hejal R, Montori VM, Baddour LM. The impact of penicillin resistance on short-term mortality in hospitalized adults with pneumococcal pneumonia: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases* 2006;42:788–97.

80. Fuller JD, Low DE. A review of Streptococcus pneumoniae infection treatment failures associated with fluoroquinolone resistance. *Clinical Infectious Diseases :* 2005;41:118–21.

81. Kang C-I, Song J-H, Kim SH, Chung DR, Peck KR, Thamlikitkul V, Wang H, So TM, Hsueh P-R, Yasin RM, Carlos CC, Van PH, Perera J. Association of levofloxacin resistance with mortality in adult patients with invasive pneumococcal diseases: a post hoc analysis of a prospective cohort. *Infection* 2013; 41(1):151-7.

82. Dryden M, Hand K, Davey P. Antibiotics for community-acquired pneumonia. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009;64:1123–5.

83. Spellberg B, Bartlett JG, Gilbert DN. The future of antibiotics and resistance. *The New England Journal of Medicine* 2013;368:299–302.

84. Wenzel RP. The antibiotic pipeline--challenges, costs, and values. *The New England Journal of Medicine* 2004;351:523–6.

85. Fischetti VA, Nelson D, Schuch R. Reinventing phage therapy: are the parts greater than the sum? *Nature Biotechnology* 2006;24:1508–11.

86. Levin BR, Bull JJ. Population and evolutionary dynamics of phage therapy. *Nature Reviews Microbiology* 2004;2:166–73.

87. Ackermann H-W, Kropinski AM. Curated list of prokaryote viruses with fully sequenced genomes. *Research in Microbiology* 2007;158:555–66.

88. O'Flaherty S, Ross RP, Coffey A. Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. *FEMS Microbiology reviews* 2009;33:801–19.

89. Shapiro OH, Kushmaro A. Bacteriophage ecology in environmental biotechnology processes. *Current Opinion in Biotechnology* 2011;22:449–55.

90. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology* 2010;8:317–27.

91. Young I, Wang I, Roof WD. Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends in Microbiology* 2000;8:120–8.

92. White R, Chiba S, Pang T, Dewey JS, Savva CG, Holzenburg A. Holin triggering in real time. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108(2):798-803.

93. Sheehan MM, García JL, López R, García P. The lytic enzyme of the pneumococcal phage Dp-1: a chimeric lysin of intergeneric origin. *Molecular Microbiology* 1997;25:717–25.

94. Loessner MJ. Bacteriophage endolysins--current state of research and applications. *Current Opinion in Microbiology* 2005;8:480–7.

95. Monterroso B, Sáiz JL, García P, García JL, Menéndez M. Insights into the structure-function relationships of pneumococcal cell wall lysozymes, LytC and Cpl-1. *The Journal of Biological Chemistry* 2008;283:28618–28.

96. Wu H, Lu H, Huang J, Li G, Huang Q. EnzyBase: a novel database for enzybiotic studies. *BMC Microbiology* 2012;12:54.

97. Lang LH. FDA approves use of bacteriophages to be added to meat and poultry products. *Gastroenterology* 2006;131:1370.

98. Weber-Dabrowska B, Mulczyk M, Górski A. Bacteriophages as an efficient therapy for antibiotic-resistant septicemia in man. *Transplantation Proceedings* 2003;35:1385–6.

99. Loeffler JM, Nelson D, Fischetti VA. Rapid killing of Streptococcus pneumoniae with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science* 2001;294:2170–2.

100. Ronda C, López R, García E. Isolation and characterization of a new bacteriophage, Cp-1, infecting Streptococcus pneumoniae. *Journal of Virology* 1981;40:551–9.

101. Häuser R, Sabri M, Moineau S, Uetz P. The proteome and interactome of Streptococcus pneumoniae phage Cp-1. *Journal of Bacteriology* 2011;193:3135–8.

102. Martín AC, López R, García P. Analysis of the complete nucleotide sequence and functional organization of the genome of Streptococcus pneumoniae bacteriophage Cp-1. *Journal of Virology* 1996;70:3678–87.

103. Aksyuk AA, Bowman VD, Kaufmann B, Fields C, Klose T, Holdaway HA, Fischetti VA, Rossmann MG. Structural investigations of a Podoviridae streptococcus phage C1, implications for the mechanism of viral entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2012;109(35):14001-6.*

104. García JL, García E, Arrarás A, García P, Ronda C, López R. Cloning, purification, and biochemical characterization of the pneumococcal bacteriophage Cp-1 lysin. *Journal of Virology* 1987;61:2573–80.

105. Loeffler JM, Fischetti VA. Synergistic lethal effect of a combination of phage lytic enzymes with different activities on penicillin-sensitive and -resistant Streptococcus pneumoniae strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003;47:375–7.

106. Pérez-Dorado I, Campillo NE, Monterroso B, Hesek D, Lee M, Páez JA, García P, Martínez-Ripoll M, García JL, Mobashery S, Menéndez M, Hermoso JA. Elucidation of the molecular recognition of bacterial cell wall by modular pneumococcal phage endolysin CPL-1. *The Journal of Biological Chemistry* 2007;282:24990–9.

107. Loeffler JM, Djurkovic S, Fischetti VA. Phage Lytic Enzyme Cpl-1 as a Novel Antimicrobial for Pneumococcal Bacteremia. *Infection and Immunity* 2003;71:6199–6204.

108. Jado I, López R, García E, Fenoll A, Casal J, García P. Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant Streptococcus pneumoniae infection in a murine sepsis model. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003;52:967–73.

109. Entenza JM, Loeffler JM, Grandgirard D, Fischetti VA, Moreillon P. Therapeutic Effects of Bacteriophage Cpl-1 Lysin against Streptococcus pneumoniae Endocarditis in Rats. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005;49:4789–4792.

110. Grandgirard D, Loeffler JM, Fischetti V a, Leib SL. Phage lytic enzyme Cpl-1 for antibacterial therapy in experimental pneumococcal meningitis. *The Journal of Infectious Diseases* 2008;197:1519–22.

111. McCullers J a, Karlström A, Iverson AR, Loeffler JM, Fischetti V a. Novel strategy to prevent otitis media caused by colonizing Streptococcus pneumoniae. *PLoS pathogens* 2007;3:e28.

112. Singer M, Nambiar S, Valappil T, Higgins K, Gitterman S. Historical and regulatory perspectives on the treatment effect of antibacterial drugs for community-acquired pneumonia. *Clinical Infectious Diseases* 2008; 1;47 Suppl 3:S216-24.

113. English ML, Fredericks CE, Milanesio NA, Rohowsky N, Xu Z-Q, Jenta TRJ, Flavin MT, Eiznhamer DA. Cethromycin versus clarithromycin for community-acquired pneumonia: comparative efficacy and safety outcomes from two double-blinded, randomized, parallel-group, multicenter, multinational noninferiority studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2012;56:2037–47.

114. File TM, Low DE, Eckburg PB, Talbot GH, Friedland HD, Lee J, Llorens L, Critchley IA, Thye DA. FOCUS 1: a randomized, double-blinded, multicentre, Phase III trial of the efficacy and safety of ceftaroline fosamil versus ceftriaxone in community-acquired pneumonia. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2011;66 Suppl 3:iii19–32.

115. Biswas B, Adhya S, Washart P, Paul B, Trostel AN, Powell B, Carlton R, Merril CR. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant Enterococcus faecium. *Infection and Immunity* 2002;70:204–10.

116. Uchiyama J, Rashel M, Maeda Y, Takemura I, Sugihara S, Akechi K, Muraoka A, Wakiguchi H, Matsuzaki S. Isolation and characterization of a novel Enterococcus

faecalis bacteriophage phiEF24C as a therapeutic candidate. *FEMS Microbiology letters* 2008;278:200–6.

117. Wang J, Hu B, Xu M, Yan Q, Liu S, Zhu X, Sun Z, Tao D, Ding L, Reed E, Gong J, Li QQ, Hu J. Therapeutic effectiveness of bacteriophages in the rescue of mice with extended spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli bacteremia. *International journal of molecular medicine* 2006;17:347–55.

118. Wang J, Hu B, Xu M, Yan Q, Liu S, Zhu X, Sun Z, Reed E, Ding L, Gong J, Li QQ, Hu J. Use of bacteriophage in the treatment of experimental animal bacteremia from imipenem-resistant Pseudomonas aeruginosa. *International Journal of Molecular Medicine* 2006;17:309–17.

119. Vinodkumar CS, Neelagund YF, Kalsurmath S. Bacteriophage in the treatment of experimental septicemic mice from a clinical isolate of multidrug resistant Klebsiella pneumoniae. *The Journal of Communicable Diseases* 2005;37:18–29.

120. Kumari S, Harjai K, Chhibber S. Bacteriophage versus antimicrobial agents for the treatment of murine burn wound infection caused by Klebsiella pneumoniae B5055. *Journal of Medical Microbiology* 2011;60:205–10.

121. Rashel M, Uchiyama J, Ujihara T, Uehara Y, Kuramoto S, Sugihara S, Yagyu K-I, Muraoka A, Sugai M, Hiramatsu K, Honke K, Matsuzaki S. Efficient elimination of multidrug-resistant Staphylococcus aureus by cloned lysin derived from bacteriophage phi MR11. *The Journal of Infectious Diseases* 2007;196:1237–47.

122. Nelson D, Loomis L, Fischetti VA. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98:4107–12.

123. McKinnon PS, Paladino JA, Schentag JJ. Evaluation of area under the inhibitory curve (AUIC) and time above the minimum inhibitory concentration (T>MIC) as predictors of outcome for cefepime and ceftazidime in serious bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2008;31:345–51.

124. Feldman C, Anderson R. Bacteraemic pneumococcal pneumonia: current therapeutic options. *Drugs* 2011;71:131–53.

125. Gu J, Xu W, Lei L, Huang J, Feng X, Sun C, Du C, Zuo J, Li Y, Du T, Li L, Han W. LysGH15, a novel bacteriophage lysin, protects a murine bacteremia model efficiently against lethal methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection. *Journal of Clinical Microbiology* 2011;49:111–7.

126. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, Dowell SF, File TM, Musher DM, Niederman MS, Torres A, Whitney CG. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clinical Infectious Diseases* 2007;44 Suppl 2:S27–72.

127. Calbo E, Alsina M, Rodríguez-Carballeira M, Lite J, Garau J. The impact of time on the systemic inflammatory response in pneumococcal pneumonia. *The European Respiratory Journal* 2010;35:614–8.

128. Nau R, Eiffert H. Minimizing the release of proinflammatory and toxic bacterial products within the host: a promising approach to improve outcome in life-threatening infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2005;44:1–16.

129. Schuch R, Nelson D, Fischetti VA. A bacteriolytic agent that detects and kills Bacillus anthracis. *Nature* 2002;418:884–9.

130. Yoong P, Schuch R, Nelson D, Fischetti VA. Identification of a broadly active phage lytic enzyme with lethal activity against antibiotic-resistant Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium. *Journal of Bacteriology* 2004;186:4808–12.

131. Rodríguez L, Martínez B, Zhou Y, Rodríguez A, Donovan DM, García P. Lytic activity of the virion-associated peptidoglycan hydrolase HydH5 of Staphylococcus aureus bacteriophage vB_SauS-phiIPLA88. *BMC Microbiology* 2011;11:138.

132. Kadioglu A, Sharpe JA, Lazou I, Svanborg C, Ockleford C, Mitchell TJ, Andrew PW. Use of green fluorescent protein in visualisation of pneumococcal invasion of broncho-epithelial cells in vivo. *FEMS Microbiology Letters* 2001;194:105–10.

133. Uchiyama S, Carlin AF, Khosravi A, Weiman S, Banerjee A, Quach D, Hightower G, Mitchell TJ, Doran KS, Nizet V. The surface-anchored NanA protein promotes

pneumococcal brain endothelial cell invasion. *The Journal of Experimental Medicine* 2009;206:1845–52.

134. Djurkovic S, Loeffler JM, Fischetti VA. Synergistic Killing of Streptococcus pneumoniae with the Bacteriophage Lytic Enzyme Cpl-1 and Penicillin or Gentamicin Depends on the Level of Penicillin Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005;49:1225–1228.

135. Rodríguez-Cerrato V, García P, Del Prado G, García E, Gracia M, Huelves L, Ponte C, López R, Soriano F. In vitro interactions of LytA, the major pneumococcal autolysin, with two bacteriophage lytic enzymes (Cpl-1 and Pal), cefotaxime and moxifloxacin against antibiotic-susceptible and -resistant Streptococcus pneumoniae strains. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007;60:1159–62.

136. Abgueguen P, Azoulay-Dupuis E, Noel V, Moine P, Rieux V, Fantin B, Bedos J-P. Amoxicillin is effective against penicillin-resistant Streptococcus pneumoniae strains in a mouse pneumonia model simulating human pharmacokinetics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007;51:208–14.

137. Moine P, Mazoit J-X, Bedos J-P, Vallee E, Azoulay-Dupuis E. Correlation Between In Vitro and In Vivo Activity of Amoxicillin Against Streptococcus pneumoniae in a Murine Pneumonia Model. *Journal of Pharmacol Exp Therapy* 1997;280:310–315.

138. Wright TW, Gigliotti F, Finkelstein JN, McBride JT, An CL, Harmsen AG. Immune-mediated inflammation directly impairs pulmonary function, contributing to the pathogenesis of Pneumocystis carinii pneumonia. *The Journal of Clinical Investigation* 1999;104:1307–17.

139. Stahl CA, Möller K, Schumann S, Kuhlen R, Sydow M, Putensen C, Guttmann J. Dynamic versus static respiratory mechanics in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Critical Care Medicine* 2006;34:2090–8.

140. Parker JC, Townsley MI. Evaluation of lung injury in rats and mice. *American Journal of physiology Lung cellular and molecular Physiology* 2004;286:L231–46.

141. Sanz F, Restrepo MI, Fernández E, Briones ML, Blanquer R, Mortensen EM, Chiner E, Blanquer J. Is it possible to predict which patients with mild pneumonias will develop hypoxemia? *Respiratory Medicine* 2009;103:1871–7.

142. Naeije R, Brimioulle S. Physiology in medicine: importance of hypoxic pulmonary vasoconstriction in maintaining arterial oxygenation during acute respiratory failure. *Critical Care* 2001;5:67–71.

143. Reppe K, Tschernig T, Lührmann A, Van Laak V, Grote K, Zemlin M V, Gutbier B, Müller HC, Kursar M, Schütte H, Rosseau S, Pabst R, Suttorp N, Witzenrath M. Immunostimulation with macrophage-activating lipopeptide-2 increased survival in murine pneumonia. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2009;40:474–81.

144. Bergeron Y, Ouellet N, Deslauriers AM, Simard M, Olivier M, Bergeron MG. Cytokine kinetics and other host factors in response to pneumococcal pulmonary infection in mice. *Infection and Immunity* 1998;66:912–22.

145. Landry DW, Oliver JA. The pathogenesis of vasodilatory shock. *The New England Journal of Medicine* 2001;345:588–95.

146. Leverve XM. Energy metabolism in critically ill patients: lactate is a major oxidizable substrate. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 1999;2:165–9.

147. Levraut J, Ciebiera JP, Chave S, Rabary O, Jambou P, Carles M, Grimaud D. Mild hyperlactatemia in stable septic patients is due to impaired lactate clearance rather than overproduction. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1998;157:1021–6.

148. Calbo E, Alsina M, Rodríguez-Carballeira M, Lite J, Garau J. Systemic expression of cytokine production in patients with severe pneumococcal pneumonia: effects of treatment with a beta-lactam versus a fluoroquinolone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008;52:2395–402.

149. Ginsburg I. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. *The Lancet Infectious Diseases* 2002;2:171–9.

150. Tuomanen E, Tomasz A, Hengstler B, Zak O. The relative role of bacterial cell wall and capsule in the induction of inflammation in pneumococcal meningitis. *The Journal of Infectious Diseases* 1985;151:535–40.

151. Tuomanen E, Rich R, Zak O. Induction of pulmonary inflammation by components of the pneumococcal cell surface. *The American Review of Respiratory Disease* 1987;135:869–74.

152. Negussie Y, Remick DG, DeForge LE, Kunkel SL, Eynon A, Griffin GE. Detection of plasma tumor necrosis factor, interleukins 6, and 8 during the Jarisch-Herxheimer Reaction of relapsing fever. *The Journal of Experimental Medicine* 1992;175:1207–12.

153. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG. Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001;45:649–59.

154. Van der Poll T, De Waal Malefyt R, Coyle SM, Lowry SF. Antiinflammatory cytokine responses during clinical sepsis and experimental endotoxemia: sequential measurements of plasma soluble interleukin (IL)-1 receptor type II, IL-10, and IL-13. *The Journal of Infectious Diseases* 1997;175:118–22.

155. Latifi SQ, O'Riordan MA, Levine AD. Interleukin-10 controls the onset of irreversible septic shock. *Infection and Immunity* 2002;70:4441–6.

156. Dehoux MS, Boutten A, Ostinelli J, Seta N, Dombret MC, Crestani B, Deschenes M, Trouillet JL, Aubier M. Compartmentalized cytokine production within the human lung in unilateral pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1994;150:710–6.

157. Witzenrath M, Schmeck B, Doehn JM, Tschernig T, Zahlten J, Loeffler JM, Zemlin M, Müller H, Gutbier B, Schütte H, Hippenstiel S, Fischetti VA, Suttorp N, Rosseau S. Systemic use of the endolysin Cpl-1 rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia. *Critical Care Medicine* 2009;37:642–9.

158. Ribes S, Taberner F, Cabellos C, Tubau F, Ardanuy C, Gerber J, Liñares J, Nau R, Gudiol F. Contribution of capsular and clonal types and beta-lactam resistance to the severity of experimental pneumococcal meningitis. *Microbes and Infection* 2008;10:129–34.

159. Engelhard D, Pomeranz S, Gallily R, Strauss N, Tuomanen E. Serotype-related differences in inflammatory response to Streptococcus pneumoniae in experimental meningitis. *The Journal of Infectious Diseases* 1997;175:979–82.

160. Ramsey BW, Pepe MS, Quan JM, Otto KL, Montgomery AB, Williams-Warren J, Vasiljev-K M, Borowitz D, Bowman CM, Marshall BC, Marshall S, Smith AL. Intermittent administration of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Inhaled Tobramycin Study Group. *The New England Journal of Medicine* 1999;340:23–30.

161. Ghannam DE, Rodriguez GH, Raad II, Safdar A. Inhaled aminoglycosides in cancer patients with ventilator-associated Gram-negative bacterial pneumonia: safety and feasibility in the era of escalating drug resistance. *European journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2009;28:253–9.

162. Mubareka S, Rubinstein E. Aerosolized colistin for the treatment of nosocomial pneumonia due to multidrug-resistant Gram-negative bacteria in patients without cystic fibrosis. *Critical Care* 2005;9:29–30.

163. Joukhadar C, Frossard M, Mayer BX, Brunner M, Klein N, Siostrzonek P, Eichler HG, Müller M. Impaired target site penetration of beta-lactams may account for therapeutic failure in patients with septic shock. *Critical Care Medicine* 2001;29:385–91.

164. Badia JR, Soy D, Adrover M, Ferrer M, Sarasa M, Alarcón A, Codina C, Torres A. Disposition of instilled versus nebulized tobramycin and imipenem in ventilated intensive care unit (ICU) patients. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2004;54:508–14.

165. Smith MD, Sheppard CL, Hogan A, Harrison TG, Dance DAB, Derrington P, George RC. Diagnosis of Streptococcus pneumoniae infections in adults with bacteremia and community-acquired pneumonia: clinical comparison of pneumococcal PCR and urinary antigen detection. *Journal of Clinical Microbiology* 2009;47:1046–9.

166. Luna CM, Bruno D. Role for bacteriophages in the preparedness for fighting against pneumonia in the postantibiotic era. *Critical Care Medicine* 2009;37:779–80.

167. Garcia E. Molecular Evolution of Lytic Enzymes of Streptococcus pneumoniae and Its Bacteriophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1988;85:914–918.

168. Oey M, Lohse M, Scharff LB, Kreikemeyer B, Bock R. Plastid production of protein antibiotics against pneumonia via a new strategy for high-level expression of antimicrobial proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009;106:6579–84.

169. Resch G, Moreillon P, Fischetti VA. A stable phage lysin (Cpl-1) dimer with increased antipneumococcal activity and decreased plasma clearance. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2011;38:516–21.

170. Daniel A, Euler C, Collin M, Chahales P, Gorelick KJ, Fischetti VA. Synergism between a novel chimeric lysin and oxacillin protects against infection by methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010;54:1603–12.

171. Bustamante N, Campillo NE, García E, Gallego C, Pera B, Diakun GP, Sáiz JL, García P, Díaz JF, Menéndez M. Cpl-7, a lysozyme encoded by a pneumococcal bacteriophage with a novel cell wall-binding motif. *The Journal of Biological Chemistry* 2010;285:33184–96.

172. Donovan DM, Dong S, Garrett W, Rousseau GM, Moineau S, Pritchard DG. Peptidoglycan hydrolase fusions maintain their parental specificities. *Applied and Environmental Microbiology* 2006;72:2988–96.

173. Horgan M, O'Flynn G, Garry J, Cooney J, Coffey A, Fitzgerald GF, Ross RP, McAuliffe O. Phage lysin LysK can be truncated to its CHAP domain and retain lytic activity against live antibiotic-resistant staphylococci. *Applied and Environmental Microbiology* 2009;75:872–4.

8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jan-Moritz Doehn, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Therapie der murinen Pneumokokken-Pneumonie mit lytischem Bakteriophagenenzym Cpl-1“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -*www.**icmje**.org*) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Jan-Moritz Doehn hatte folgenden Anteil an den Publikationen, die Grundlage für diese Monographie sind:

Publikation 1: *Delivery of the endolysin Cpl-1 by inhalation rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia.*
Doehn JM, Fischer K, Reppe K, Gutbier B, Tschernig T, Hocke AC, Fischetti VA, Löffler J, Suttorp N, Hippenstiel S, Witzenrath M.
J Antimicrob Chemother. 2013. Apr 30. [Epub ahead of print]
IF: 5.068
Anteil 70 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Der Promovend hat das Thema selbstständig ausgewählt, experimentelle Modelle und Methoden selbstständig etabliert und Experimente durchgeführt. Er hat auch die experimentellen Beiträge mit geplant und die Daten für die Publikation ausgewählt.
Er hat das Manuskript geschrieben und unter Anleitung bis zur Publikation betreut und bearbeitet.

Publikation 2: *Systemic use of the endolysin Cpl-1 rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia.*
Witzenrath M*, Schmeck B*, **Doehn JM**, Tschernig T, Zahlten J, Loeffler JM, Zemlin M, Müller H, Gutbier B, Schütte H, Hippenstiel S, Fischetti VA, Suttorp N, Rosseau S.
**contributed equally*
Crit Care Med. 2009 ;37(2):642-9.
IF: 6.330
Anteil 35 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Der Promovend hat das Thema selbstständig bearbeitet und inhaltlich mitgestaltet. Die experimentellen Modelle und Methoden wurden unter Anleitung weiterentwickelt und selbstständig verwendet. Sämtlich *in-vivo* Experimente wurden vom Promovenden eigenständig durchgeführt. Er hat die Daten ausgewertet und war an der Erstellung des Manuskriptes und seiner Publikation beteiligt.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

9 Lebenslauf

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

10 Publikationen

Orginalarbeiten

(1) *Delivery of the endolysin Cpl-1 by inhalation rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia.*
Doehn JM, Fischer K, Reppe K, Gutbier B, Tschernig T, Hocke AC, Fischetti VA, Löffler J, Suttorp N, Hippenstiel S, Witzenrath M.
J Antimicrob Chemother. 2013 Apr 30. [Epub ahead of print]

(2) *Systemic use of the endolysin Cpl-1 rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia.*
Witzenrath M*, Schmeck B*, Doehn JM, Tschernig T, Zahlten J, Loeffler JM, Zemlin M, Müller H, Gutbier B, Schütte H, Hippenstiel S, Fischetti VA, Suttorp N, Rosseau S. **contributed equally*
Crit Care Med. 2009;37(2):642-9.

Kongressbeiträge

Inhalative use of the endolysin Cpl-1 rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia.
Doehn JM, Fischer K, Reppe K, Gutbier B, Tschernig T, Hocke A,Fischetti VA, Suttorp N, Hippenstiel S, Witzenrath M.
International Conference „Innate immunity of the lung – Improving pneumonia outcome" 2012 in Berlin.

Inhalative use of the endolysin Cpl-1 rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia.
Doehn JM, Reppe K, Gutbier B, Tschernig T, Hocke A, Fischetti VA, Suttorp N, Hippenstiel S, Witzenrath M.
52. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin 2011.Pneumologie 2011; 65: S1–S104.

Systemic use of the endolysin Cpl-1 rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia.
Witzenrath M, Schmeck B, **Doehn JM**, Tschernig T, Zahlten J, Loeffler JM, Zemlin M, Muller HC, Gutbier B, Schutte H, Hippenstiel S, Fischetti VA, Suttorp N, Rosseau S.
20th Annual Congress, European Respiratory Society (ERS), Barcelona 2010

Systemic Use of the Endolysin Cpl-1 Rescues Mice with Fatal Pneumococcal Pneumonia.
Witzenrath M, Schmeck B, **Doehn JM**, Tschernig T, Zahlten J, Loeffler JM, Zemlin M, Muller HC, Gutbier B, Schutte H, HippenstielS, Fischetti VA, Suttorp N, Rosseau S.
18th European Students Conference, Berlin 2007

Therapie mt lytischem Bakteriophagenenzym Cpl-1 rettet Mäuse vor letaler Pneumokokkenpneumonie
Witzenrath M, Schmeck B, **Doehn JM**, Tschernig T, Zahlten J, Loeffler JM, Zemlin M, Muller HC, Gutbier B, Schutte H, HippenstielS, Fischetti VA, Suttorp N, Rosseau S.
48. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin 2007. *Pneumologie 2007;61DOI: 10.1055/s-2007-973375*

Therapie mt lytischem Bakteriophagenenzym Cpl-1 rettet Mäuse vor letaler Pneumokokkenpneumonie
Witzenrath M, Schmeck B, **Doehn JM**, Tschernig T, Zahlten J, Loeffler JM, Zemlin M, Muller HC, Gutbier B, Schutte H, HippenstielS, Fischetti VA, Suttorp N, Rosseau S.
Herbsttagung Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin, Mainz 2006.

11 Danksagung

Bei dieser Arbeit haben mich viele Menschen in unterschiedlicher Weise unterstützt, denen ich hier herzlich danken möchte.

Herrn Prof. Dr. Norbert Suttorp, Direktor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, danke ich für die Möglichkeit, meine Dissertation im infektiologischen Forschungslabor der Charité Campus Mitte anfertigen zu können. Auch Oberärztin Frau Dr. Simone Rosseau und Prof. Bernd Schmeck danke ich für ihren Beitrag.

Herrn Prof. Dr. Martin Witzenrath danke ich für die Überlassung des Themas, die unzähligen Ratschläge und die vielseitige Betreuung dieser Arbeit, sowie für die stets fruchtbare wissenschaftliche Diskussion. Ebenso danke ich ihm für die Möglichkeit, an Herausforderungen wachsen zu können.

Herrn Prof. Dr. Stefan Hippenstiel danke ich dafür, dass er es mir ermöglicht hat, weitere Aspekte in der präklinischen Forschung kennen lernen zu dürfen.

Prof. Dr. Vincent Fischetti und Dr. Jutta Loeffler danke ich für die Überlassung des Cpl-1 und Prof. Dr. Thomas Tschernig für die Durchführung und Auswertung der histologischen Untersuchungen der Lungen.

Frau Dr. Janine Zahlten danke ich für ihre freundschaftliche Unterstützung bei den Arbeiten an der Zellkultur und Frau Dr. Jasmin Lienau für die Unterstützung bei der Korrektur dieser Arbeit.

Ein besonders großes Dankeschön möchte ich an Frau Dr. Birgitt Gutbier aussprechen. Sie stand immer mit Rat und Tat zur Seite und zeigte mir praktisch Lösungswege auf, wo scheinbar keine waren.

Die Arbeit im Labor besteht aus guten und weniger guten Tagen. Umso wichtiger ist es, Menschen um sich zu haben, die einem im Alltag mit Rat und Witz zur Seite stehen. Nicht zuletzt deshalb möchte ich mich auch bei unserem Laborteam herzlich bedanken, insbesondere bei Dr. Christoph Tabeling, Dr. Katrin Reppe, Dr. Andreas Hocke, Jenny Thiele, Dr. Holger Müller-Redetzky und Dr. Maren Zemlin.

Einen ganz besonders herzlichen Dank verdient mein Wingman Katja, die für mich die größte Entdeckung im Labor war.

Meiner Mutter Karin und meinem Bruder Christoph danke ich für Alles, was sie für mich taten und tun und dafür dass es sie gibt. Ich bin glücklich wenn ich bei Euch bin.

Diese Arbeit ist meinem Vater Prof. Dr. Manfred Doehn gewidmet. In dem Wissen, dass ein großer Teil von Ihm in mir lebt. Möge der Wind in Deinen Segeln stets der eigene sein.

12 Anhang

12.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Langform
ALI	*Acute Lung Injury*
Aqua dest.	Aqua destillata
ARDS	*Acute Respiratory Distress Syndrome*
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit
CAP	Ambulant erworbene Pneumonie
CbP	cholinbindendes Protein
Cpl-1	Lytisches Bakteriophagenenzym des Phagen Cp-1
CO_2	Kohlenstoffdioxid
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	*Escherichia Coli*
FiO_2	Inspiratorische Sauerstofffraktion
G-CSF	*Granulocyte Colony-stimulating Factor*
h	Stunde(n)
H&E	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
H_2O	Wasserstoffoxid
HSA	Humanes Serum Albumin
I. E.	Internationale Einheiten
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
i.p.	*intraperitoneal*

i.t.	intratracheal
IVC	Individuell belüftete Käfige
KC	*Keratinocyte Chemoattractant* (Homolog zu humanem IL-8)
KG	Körpergewicht
KM	Körpermasse
LytA	*Autolysin A*
MCP	*Monocyte Chemotactic Protein*
MDRSP	Multidrug- resistant *S. pneumoniae*
M	Molare Masse
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MIP	*Macrophage Inflammatory Protein*
MHK	minimale Hemmkonzentration
MyD88	*Myeloid Differentiation Primary-Response Protein 88*
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	*Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*
OD	Optische Dichte
PAMPs	*pathogen-associated molecular patterns*
PaO_2	Arterieller O_2-Partialdruck
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehydlösung
PG	Peptidoglykan
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PMN	*Polymorphkernige neutrophile Granulozyten*
Pneumokokken	*Streptococcus pneumoniae*
PRRs	*pattern recognition receptors*
PsaA	*Pneumococcal Surface Adhesin A*

PspA	*Pneumococcal Surface Protein A*
U/min	Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
STIKO	Ständige Impfkommission am Robert Koch Institut
THY	Todd Hewitt-Bouillion
TLRs	„*Toll-like*“-Rezeptoren
TNF	Tumornekrosefaktor

12.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über unterschiedliche Cpl-1 Applikationen in verschiedenen Infektionsmodellen
Tabelle 2: Reagenzien
Tabelle 3: Apparatur Lungenfunktionsmessung
Tabelle 4: Allgemeine Geräte und Technik
Tabelle 5: Fertigmaterial
Tabelle 6: Handlungsanweisungen zur klinischen Beurteilung von Tieren

12.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Immunhistochemische Darstellung von *Streptococcus pneumoniae*.
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Zellwand und Kapsel von *Streptococcus pneumoniae*.
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Phagenvermehrung.
Abbildung 4: Elektronmikroskopische Aufnahme des Phagen CP-1.
Abbildung 5: a) Kristallstruktur von Cpl-1 b) Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Streptococcus pneumoniae*.
Abbildung 6: Therapieschema intraperitonal Cpl-1/Amoxicillin Applikation.
Abbildung 7: Therapieschema intratracheale Cpl-1 Applikation.
Abbildung 8: Bakterienlast im Lungengewebe.
Abbildung 9: Bakterienlast im Blut.
Abbildung 10: Einfluss der Cpl-1 Gabe auf den Oxygenierungs-Quotient.
Abbildung 11: Lungencompliance unter Behandlung mit Cpl-1.
Abbildung 12: Histologische Veränderungen im Lungengewebe nach Cpl-1 Behandlung.
Abbildung 13: Verlauf des Laktatwertes unter Cpl-1 Gabe.
Abbildung 14: Verlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks (MABP) unter Cpl-1 Behandlung.
Abbildung 16: Zytokin- und Chemokinkonzentrationen im Plasma.

Abbildung 17: Verlauf von A) Körpermasse und B) Körpertemperatur nach Cpl-1 bzw. Amoxicillin Gabe.
Abbildung 18: Überleben nach Behandlung mit Cpl-1 oder Amoxicillin.
Abbildung 19: Bakterienlast im Lungengewebe nach intratrachealer Cpl-1 Applikation.
Abbildung 20: Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten in A) Blut und B) Milz nach intratrachealer Cpl-1 Applikation.
Abbildung 21: Histologische Veränderungen im Lungengewebe nach intratrachealer Cpl-1 Applikation.
Abbildung 22: Zytokin- und Chemokinkonzentrationen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit nach intratrachealer Cpl-1 Applikation.
Abbildung 23: Verlauf der A) Körpermasse und B) Körpertemperatur nach intratrachealer Cpl-1 Applikation.
Abbildung 24: Mortalität nach intratrachealer Cpl-1 Applikation.