

Titelblatt zum Schlussbericht

(Gemäß Nrn. 6.6 BNBest-BMBF 98 bzw. 11.6 NKBF 98)

Thema: MAPVAP

Präklinische mechanistische Analyse von zwei Bakteriophagen-Cocktails gegen multiresistente Pseudomonas aeruginosa und Escherichia coli für die Behandlung von beatmungsassozierter Pneumonie (VAP)

| Förderkenn-zeichen | Autoren | Zuwendungs-empfänger | Laufzeit | Hinweis auf Vertraulichkeit |
|--------------------|---|---|------------------------------------|-----------------------------|
| 01KI2124 | <i>Martin Witzenrath, Bastian Opitz, Gopinath Krishnamoorty, Geraldine Nouailles, Jasmin Lienau</i> | <i>Charité – Universitätsmedizin Berlin</i> | <i>01.01.2020 – 30.06.2023</i> | <i>ohne</i> |

Kontaktperson:

Name: Prof. Dr. Martin Witzenrath
Straße: Charitéplatz 1
PLZ Ort: 10117 Berlin
E-Mail: martin.witzenrath@charite.de
Telefon: +49 30 450 553892

Teil I: Kurzbericht

Förderkennzeichen: 01KI2124

Verbundprojekt: MAPVAP

Präklinische mechanistische Analyse von zwei Bakteriophagen-Cocktails gegen multiresistente *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* für die Behandlung von beatmungsassozierter Pneumonie (VAP)

1. Aufgabenstellung

Ziel des Verbundvorhabens MAPVAP war es, ein umfassendes und zugleich detailliertes Verständnis der Interaktion zwischen ausgewählten Bakteriophagen (Bakteriophagen-Cocktail gegen *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*) und deren Wirtsbakterien sowohl im Kontext der beatmungsassoziierten Pneumonie als auch unter *in vitro* Bedingungen zu gewinnen. Neue Mechanismen der Resistenz gegen Bakteriophagen, die im Verlaufe einer Therapie entstehen können, sowie der Einfluss dieser Cocktails auf Mikrobiota-abhängige Abwehrmechanismen und auf die Auflösung von Biofilmen sollten charakterisiert, neue Erkenntnisse zur Rolle des Immunsystems (angeboren und adaptiv) bei Bakteriophagen-Therapie identifiziert sowie neue Einsichten in die zugrundeliegenden Mechanismen dieses Geschehens auf der Basis mathematischer Modelle erlangt werden. Damit sollten Grundlagen für eine Zulassung von Bakteriophagen als Arzneimittel in der Therapie der beatmungsassoziierten Pneumonie gelegt werden. Die Arbeitspakete 2, 3 und 4 schafften hierfür wesentliche Grundlagen durch die Lieferung experimenteller Daten.

Im **Arbeitspaket 2 (AP2)** sollte der Einfluss von Phagen im Vergleich zu Antibiotika auf die Mikrobiom-Immunsystem-Wechselwirkung bzw. die Mikrobiom-abhängige antibakterielle Immunität im Kontext einer bakteriellen Lungeninfektion charakterisiert werden.

Im **Arbeitspaket 3 (AP3)** sollte die Effektivität und die mögliche Immunantwort auf die beiden Phagen-Cocktails sowohl mithilfe humaner Zellen als auch in einem klinisch relevanten Lungeninfektionsmodell mit biofilmbildenden Erregern in engem Austausch mit den französischen Kollegen erstmalig analysiert werden.

Im **Arbeitspaket 4 (AP4)** sollten phagenspezifische bzw. durch die Phagen-Therapie induzierte Immunreaktionen im Detail in hoch standardisierten und gut charakterisierten experimentellen Modellen mit unterschiedlicher Skalierung (*in vitro* und *in vivo*) analysiert werden.

2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Die Häufigkeit von Infektionen durch antibiotikaresistente Bakterien nimmt weltweit zu. Besonders betreute Patient*innen auf der Intensivstation tragen ein erhöhtes Risiko für Infektionen mit multiresistenten Erregern, eine sogenannte beatmungsassizierte Pneumonie führt häufig zum Tod. Die Therapie mit Bakteriophagen stellt eine attraktive therapeutische Möglichkeit dar. Bei lytischen Phagen handelt es sich um Viren, welche mit hoher Spezifität Bakterien infizieren, darin replizieren und die Bakterienzellen lysieren. Phagen sind im Vergleich zu konventionellen Antibiotika selbst-dosierend und beeinträchtigen durch ihre Spezifität die Mikrobiota vermutlich kaum. Bisherige Berichte gehen nicht über die bakterizide Aktivität der verwendeten Phagen hinaus, wodurch klar das mangelnde Verständnis über die wesentlichen Mechanismen der Phagen-Therapie zum Ausdruck kommt. Ziel des Verbundvorhabens MAPVAP war es, die komplexen Vorgänge der Interaktion von ausgewählten Bakteriophagen (Bakteriophagen-Cocktail gegen *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*) mit deren Wirtsbakterien sowohl im Kontext der beatmungsassoziierten Pneumonie als auch unter *in vitro* Bedingungen durch eine systemorientierte Herangehensweise besser zu verstehen und in Computersimulationen abzubilden.

Im Verbund MAPVAP kombinierten wir synergistisch unsere Expertisen aus dem Bereich der grundlagenbasierten, translationalen und klinischen Forschung aus dem Pasteur Institut (Paris), dem Universitätsklinikum Bichat (Paris) und der Charité – Universitätsmedizin Berlin, um die Grundlagen für eine Zulassung von Bakteriophagen als Arzneimittel in der Therapie der beatmungsassoziierten Pneumonie zu schaffen.

3. Ablauf des Vorhabens

Vor Beginn der Arbeiten an den Arbeitspaketen wurde ein Kooperationsvertrag zwischen den Verbundpartnern aufgesetzt und unterzeichnet.

Im **Arbeitspaket 2** wurden *in vivo* Experimente in sehr anspruchsvollen Mausmodellen durchgeführt, die es ermöglichen, zentrale Mechanismen der Phagen-Mikrobiom-Interaktion zu untersuchen. Zusätzlich erfolgten Untersuchungen zum Risiko für Neu-Infektionen nach vorausgegangener erfolgreicher Therapie in einem klinisch sehr relevanten Mausmodell. Es erfolgten die Analyse des Mikrobioms sowie Untersuchungen zum Einfluss der Vorbehandlung der Tiere auf die pulmonale Immunität.

Im **Arbeitspaket 3** wurde die Wirksamkeit der Phagen-Cocktails gegen verschiedene *P. aeruginosa*- und *E. coli*-Stämme in humanen Modellen unterschiedlicher Komplexität überprüft. Es kamen *ex vivo* Modelle auf dem Integritätsniveau eines intakten Gewebeverbandes (isoliert kultiviertes und infiziertes/stimulierte humanes Lungengewebe) und *in vitro* Modelle (infizierte/stimulierte humane Zellen, statische und dynamische Biofilmbildung) zum Einsatz.

Im **Arbeitspaket 4** wurde die Interaktion zwischen Immunsystem und Phagen-Therapie in hoch standardisierten sowie relevanten Mausmodellen analysiert. Mittels faktoriellen Designs der Experimente sollten die Therapie bei Patient*innen sowie spezifische Aspekte des Krankheitsverlaufs abgebildet werden. Dabei wurden sowohl spezifische Aspekte der Immunogenität der Phagen-Cocktails in naiven Tieren als auch zentrale Mechanismen im komplexen *in vivo* Modell der beatmungsassoziierten Pneumonie untersucht.

4. Wesentliche Ergebnisse und Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

In **AP 2** wurde untersucht, wie Antibiotika und Phagen die Mikrobiom-abhängige antibakterielle Abwehr beeinflussen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine Behandlung mit Breitspektrum-Betalaktam-Antibiotika über die Schädigung des Darmmikrobioms und dessen Fähigkeit, nützliche Metabolite zu produzieren, die antibakterielle Immunantwort in der Lunge schwächt. Demgegenüber konnten wir keine negativen Einflüsse des Phagen-Cocktails auf die Abwehr gegen nachfolgende Lungeninfektionen feststellen. So führte eine Therapie mit dem Phagen-Cocktail zwar zu einer deutlichen Verringerung der Bakterienlast in der *Pseudomonas*-Pneumonie, diese Behandlung hatte aber in unserem Modell keinen negativen Einfluss auf die Empfänglichkeit für eine nachfolgende Klebsiellen-Pneumonie.

In **AP 3** wurden die folgenden wesentlichen Ergebnisse erzielt: (i) Nachweis, dass die Wirksamkeit des Phagen-Cocktails in Abhängigkeit vom Wachstumszustand von *P. aeruginosa* variiert; (ii) Aufklärung einer unerwarteten Phagen-Phagen-Konkurrenz und ihrer Auswirkungen auf die Wirksamkeit des Phagen-Cocktails; und (iii) Nachweis, dass ein synergistisches Phagen-Antibiotikum den Erwerb von Phagen- und Antibiotikaresistenz verhindern kann. Außer der Zusammenarbeit mit Kollegen vom Institut Pasteur, Frankreich, und dem Leibniz-Institut DSMZ, Deutschland, legte diese Arbeit den Grundstein für eine neuere Zusammenarbeit mit Prof. Kai Papenfort, Universität Jena, um das komplexe Transkriptionsnetzwerk der Interaktion zwischen Phagen und *P. aeruginosa* aufzuklären.

In **AP 4** wurde die Interaktion zwischen Immunsystem und Phagen-Therapie analysiert, wobei zunächst gezeigt werden konnte, dass die Phagen-Cocktails gegen *P. aeruginosa* bzw. *E. coli* nicht immunogen sind und nach systemischer Applikation die Lunge mit langer Stabilität und ohne klinische Nebenwirkungen erreichen. In Zusammenarbeit mit den Tierpathologen der Freien Universität Berlin gelang es uns, auch geringgradige Keimzentrenbildung nachzuweisen. In Kooperation mit dem Institut für Anatomie der Charité konnten wir die Phagen-Cocktails mittels Elektronenmikroskopie visualisieren. In der Folge konnte der Mechanismus der Immunophagen-Synergie zwischen Phagen und angeborenen Immunzellen weiter aufgeklärt werden, wobei sich vor allem Neutrophile als wesentlicher Bestandteil herausstellten. Weiterführende Analysen in einem Mausmodell der *Pseudomonas*-induzierten VAP zeigten eine hohe therapeutische Wirksamkeit des Phagen-Cocktails und belegten darüber hinaus, dass eine synergistische Interaktion von Phagen und Antibiotikum die therapeutische Effizienz sowohl *in vivo* als auch *in vitro* erhöhen und Phagenresistenzen verhindern kann. Diese Ergebnisse tragen dazu bei, Phagen *per se* und das synergistische Potenzial eines spezifischen Phagen-Cocktails in Kombination mit einer Antibiotikabehandlung als vielversprechende Option für die Behandlung von VAP-Infektionen weiter in Betracht zu ziehen.

Teil II: Eingehende Darstellung

Förderkennzeichen: 01KI2124

Verbundprojekt: MAPVAP

Präklinische mechanistische Analyse von zwei Bakteriophagen-Cocktails gegen multiresistente *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* für die Behandlung von beatmungsassozierter Pneumonie (VAP)

1. Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Im Folgenden werden die entsprechenden Aktivitäten und erzielten Ergebnisse in den Arbeitspaketen 2, 3 und 4 dargestellt:

Arbeitspaket 2: Charakterisierung der Interaktion zwischen Phagen, intestinaler und pulmonaler Mikrobiota und der Mikrobiota-abhängigen antibakteriellen Immunität

AP 2.1 Charakterisierung der Mikrobiota unter Phagen- und Antibiotikatherapie

M2-1: Vorliegen grundlegender Daten zur Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora (erreicht)

Entsprechende Tierversuchsanträge und Änderungsanzeichen wurden geschrieben, eingereicht und genehmigt. Grundlegende experimentelle Techniken wurden spezifisch für AP 2-1 entwickelt oder angepasst (z. B. Applikation des Phagen-Cocktails *in vivo*, Etablierung eines *Pseudomonas aeruginosa* PAO1-Infektionsmodells, Overlay-Plaque-Assays zur Bestimmung der Phagentiter in der Lunge etc.). Unsere tierexperimentellen Versuche zeigen, dass das *Pseudomonas*-Pneumoniemodell gut funktioniert, dass die Phagen nach intraperitonealer Applikation die Lunge erreichen, und dass die Behandlung mit dem Phagen-Cocktail die Bakterienlast in der Lunge nach *Pseudomonas*-Infektion deutlich senkt (Abb. 1A). Die entsprechenden Mikrobiotaproben wurden gesammelt und die mikrobielle DNA isoliert und zum Teil sequenziert. Zusätzlich wurde untersucht, wie Antibiotika die Mikrobiota im Darm beeinflussen. Es zeigte sich, dass eine Therapie mit Breitspektrum-Betalaktam-Antibiotika zu einer Veränderung der Darmmikrobiota führt, die zu einer Verringerung der Diversität und einer Depletion von verschiedenen Anaerobiern (z. B. zur Ordnung *Clostridiales* gehörend) führte.

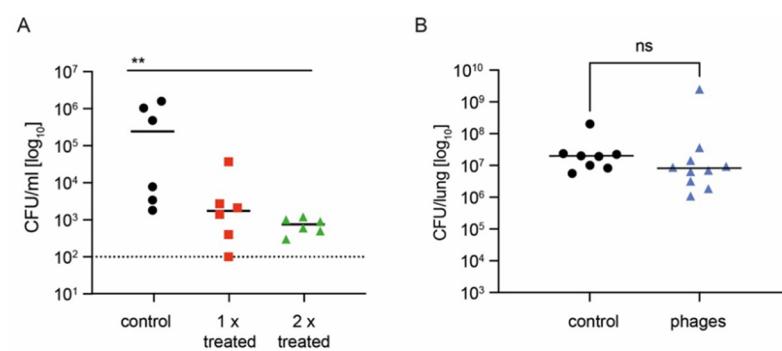


Abbildung 1. Die intraperitoneale Verabreichung von *Pseudomonas*-spezifischen Phagen reduzierte nach *P. aeruginosa*-Infektion die Bakterienlast in der Lunge, hatte aber keinen erkennbaren Einfluss auf die nachfolgende Infektion mit *K. pneumoniae*. (A) Die Tiere ($n = 6/\text{Gruppe}$) wurden mit $5 \cdot 10^5$ KBE *P. aeruginosa* intranasal (*i.n.*) infiziert. 8 h und 16 h nach der Infektion erhielten die Mäuse entweder NaCl (Kontrolle) oder Phagen (2 x behandelt) oder Phagen um 8 h und NaCl

um 16 h (1 x behandelt) durch intraperitoneale (*i.p.*) Verabreichung. Die Phagen wurden als Cocktail verabreicht, der aus zwei Phagen (JG024 und JG005) mit $5 \cdot 10^7$ PFU/ml bestand. Die Anzahl der KBE von *P. aeruginosa* in der Lunge wurde 24 h p.i. bestimmt. (B) Mäuse ($n = 8/\text{Gruppe}$) wurden 14 Tage lang mit $5 \cdot 10^5$ KBE *P. aeruginosa* PAO1 *i.n.* infiziert. Während der ersten 7 Tage der Infektion erhielten die Mäuse entweder inaktivierte Phagen (Kontrolle) oder den Phagen-Cocktail (Phagen) alle 8 Stunden *i.p.* Danach wurden die Mäuse beider Gruppen bis zum Tag 14 alle 8 Stunden mit NaCl *i.p.* behandelt. 15 Tage nach der Erstinfektion mit PAO1 wurden die Mäuse erneut mit $1 \cdot 10^8$ KBE *K. pneumoniae* *i.n.* infiziert, und die KBE in der Lunge wurden 24 Stunden nach der Sekundärinfektion bestimmt. Bei beiden Experimenten wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen durch ANOVA oder einen ungepaarten Mann-Whitney-U-Test ermittelt, und $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen. ** $P < 0,01$.

AP 2.2 Einfluss von Phagen und Antibiotika auf die Mikrobiota-abhängige Immunität im direkten Vergleich

M2-2: Verständnis grundlegender Mechanismen zur Mikrobiota-abhängigen Immunität nach Phagen-Therapie (erreicht)

Alle notwendigen Methoden wurden etabliert. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Therapie mit Breitspektrum-Betalaktam-Antibiotika zu einer Schwächung der antibakteriellen Immunantwort in der Lunge führt. Insbesondere zeigte sich, dass die antibakterielle Aktivität von myeloiden Zellen gegen eine nachfolgende Infektion durch die Antibiotika geschwächt wurde. Demgegenüber erhielten wir keine Hinweise darauf, dass die Therapie mit *Pseudomonas*-spezifischen Bakteriophagen ebenfalls die antibakterielle Abwehr beeinträchtigt. Zusammengenommen deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass eine Breitspektrum-Antibiotikatherapie, wahrscheinlich aber nicht eine Phagentherapie, unerwünschte Nebenwirkungen auf die antibakterielle Abwehr haben kann.

AP 2.3 Bestimmung des Einflusses von Phagen- und Antibiotikatherapie auf den Verlauf nachfolgender Infektionen

M2-3: Grundlegende Daten zum Verständnis des Einflusses einer Phagen-Therapie auf sekundäre Infektionen (erreicht)

Ein entsprechender Tierversuchsantrag wurde geschrieben, eingereicht und genehmigt. Grundlegende experimentelle Techniken wurden entwickelt oder angepasst (z. B. Etablierung eines *Pseudomonas aeruginosa* PAO1-Infektionsmodells, Etablierung der *Klebsiella pneumoniae*-Infektionen (als sekundäre Infektion), etc.). Alle Tierversuche zur Bestimmung des Einflusses der Phagentherapie (im Vergleich zur Antibiotikatherapie) auf sekundäre *K. pneumoniae*-Infektionen wurden durchgeführt. Im Vergleich haben wir das Antibiotikum Meropenem getestet, da es sich hierbei um ein häufig in der Klinik bei *Pseudomonas*-Infektion eingesetztes Antibiotikum handelt. Parallel dazu haben wir Experimente durchgeführt, in denen humane Mikrobiota von Patient*innen mit und ohne Antibiotikatherapie in Mäuse transplantiert und diese Mäuse nachfolgend mit *K. pneumoniae* infiziert wurden.

Entgegen unserer Erwartungen zeigte die 2-wöchige Behandlung der Mäuse mit Meropenem keinen Einfluss auf die nachfolgende Infektion mit *K. pneumoniae*, wohingegen die Patient*innen-Mikrobiotransfer-Versuche deutliche Hinweise dafür liefern, dass Meropenem die Mikrobiota sehr wohl schädigt, dass deren Wechselwirkungen mit dem Immunsystem beeinträchtigt werden und die Abwehr gegen *K. pneumoniae* in der Lunge schlechter funktioniert (Daten nicht gezeigt). Warum wir diese Effekte nicht im reinen Mausmodell sehen, ist aktuell unklar. Im Mausmodell hatten *Pseudomonas*-spezifische Bakteriophagen keinen Einfluss auf die nachfolgende *K. pneumoniae*-Infektion (Abb. 1B).

Teile der Ergebnisse sind bereits in ein Manuskript eingeflossen, welches bei *Nature Communications* in Revision ist (Dörner et al. #NCOMMS-23-21801-T).

Arbeitspaket 3: Analyse der antibakteriellen Aktivität von Phagen auf Biofilmen auf humanen Zellen und ex vivo kultiviertem, humanem Lungengewebe

AP 3.1 Wirksamkeit spezifischer Phagen-Cocktails auf Biofilme in vitro

M3-1: Vorliegen grundlegender Daten zur Wirkung von Phagen auf Biofilmen *in vitro* (erreicht)

Ziel dieses Arbeitspakets war die Untersuchung der Auswirkungen eines Phagen-Cocktails auf Biofilme von *P. aeruginosa* und *E. coli* mittels eines integrierten genetischen und mikrobiologischen Ansatzes. Wie im Sachbericht (2020) beschrieben, passten wir aufgrund der COVID-19-Pandemie unsere Forschung an das Prinzip "ein Partner – ein Pathogen" an. Daher konzentrierten wir unsere Studien auf *P. aeruginosa*. Gegen Ende des Jahres 2020 wurde ein Protokoll für die robuste Entwicklung von *P. aeruginosa*-Biofilmen *in vitro* entwickelt, das anschließend für *E. coli*-Biofilmexperimente im Labor des französischen Partners (Jean-Marc Ghigo, Institut Pasteur, Frankreich) übernommen und reproduziert wurde. Umgekehrt wurden die benötigten *P. aeruginosa*-Mutanten ($\Delta retS$ und $\Delta pel/\Delta psl$), die unterschiedliche Biofilme produzieren, von Paris nach Berlin geschickt.

Reduzierte Phagen-Cocktail-Wirksamkeit durch räumlich-zeitliche Organisation des Biofilms: Im Jahr 2021 fokussierten wir uns weiterhin auf Biofilm- und Phagen-Wirksamkeitsstudien mit *P. aeruginosa* PAO1 und seinen Deletions-Mutanten, die verschiedene Biofilm-Biomasse erzeugen. Dies sollte das Spektrum der Biofilmbildung in der Lungenumgebung simulieren. Unsere Ergebnisse bestätigten bereits bestehende Erkenntnisse und zeigten, dass die $\Delta retS$ -Mutante von *P. aeruginosa* 2,3-mal mehr Biofilm produzierte als der PAO1-Stamm. Im Gegensatz dazu bildete das $\Delta pel/\Delta psl$ -Mutantenderivat unter den getesteten Bedingungen kaum Biofilm.

Der Phagen-Cocktail, bestehend aus Bhz17, JG024 und JG005, wurde entweder bei einem 10-fach hohen (Phage_{high}) oder einem 10-fach niedrigen (Phage_{low}) Verhältnis von Phagen zu Bakterienlast in statischen Biofilmen in einer 96-Mikrotestplatte bewertet, wobei nur JG005 und JG024 in der Lage waren, *P. aeruginosa* PAO1 eindeutig zu lysieren. Biofilmstrukturen weisen eine räumlich-zeitlich Heterogenität auf, in der *P. aeruginosa*-Populationen ungleichmäßig verteilt und physiologisch unterschiedlich mit erhöhter Toleranz gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen sind. Daher wurden die Stabilität und die Anti-*Pseudomonas*-Wirkung des Phagen-Cocktails in zwei Phasen untersucht: adhärentes (an der Oberfläche haftendes) und nicht-adhärentes (dispersives) Kompartiment (Abb. 2). Unabhängig von der Phagenkonzentration oder dem PAO1-Derivat reduzierte der Phagen-Cocktail die bakterielle Lebensfähigkeit nach 6 Stunden zunächst um 3-4,5 log₁₀ (Abb. 2). Überlebende Bakterienpopulationen vermehrten sich jedoch nach 24 Stunden wieder. Bemerkenswert ist, dass der Phagen-Cocktail auch gegen einen hyperbiofilmbildenden Δ retS-Stamm wirksam war und die Häufigkeit der Entwicklung einer Phagenresistenz verringerte, wenn mit einer „Phage_{high}“-Konzentration behandelt wurde. Ein weiteres wichtiges Ergebnis ist die Fähigkeit des Phagen-Cocktails, die "nicht adhärente" (empfindlichere) und die "adhärente" (phagentolerantere) *P. aeruginosa*-Population abzutöten. Die komplexe räumliche Struktur des Biofilms sowie auch die veränderte bakterielle Physiologie könnten die Interaktionen der Phagen negativ beeinflussen. Dies könnte potenziell die therapeutische Wirksamkeit gegen Biofilme beeinträchtigen.

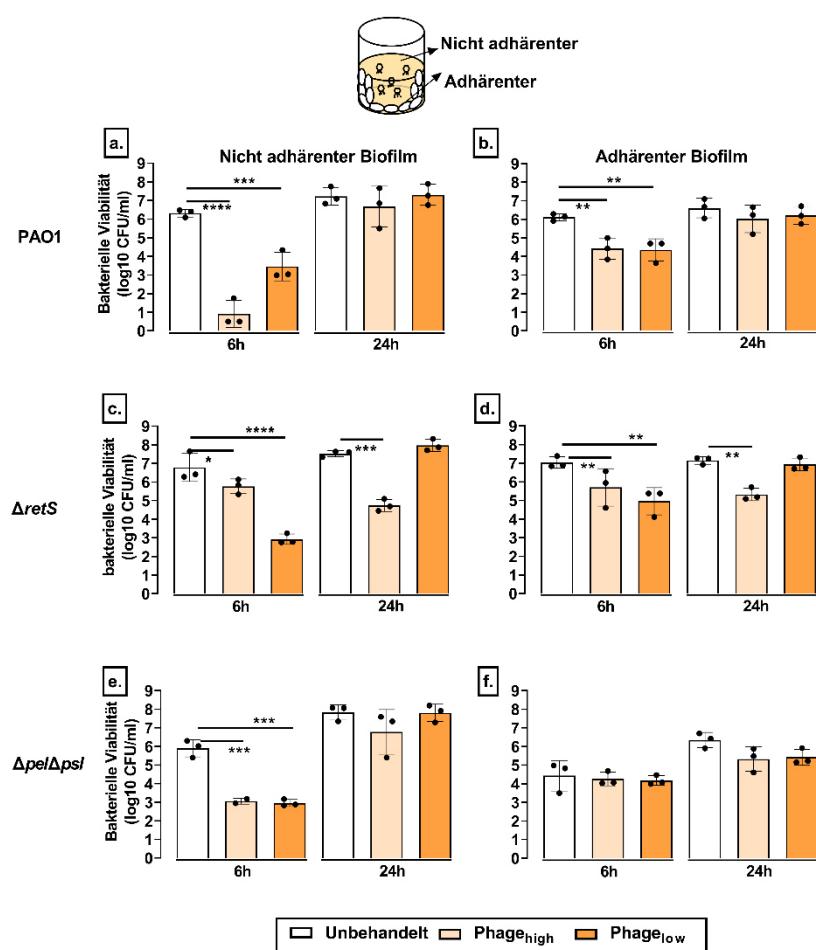
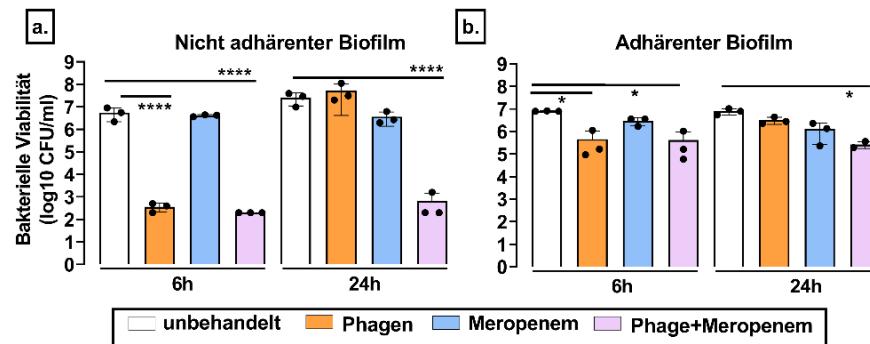


Abbildung 2: Bakterielle Viabilität (Colony forming unit/ml, CFU/ml) von *P. aeruginosa* PAO1 (nachstehend als *P. aeruginosa* bezeichnet) 6 h und 24 h nach Phagenbehandlung in den beiden Kompartimenten des Biofilms. Die Kompartimente werden als nicht-adhärentes und adhärentes Kompartiment des Biofilms beschrieben und stellen zwei physiologisch unterschiedliche, aber zusammengehörende Teile des Biofilms dar. In Weiß ist immer der Phagen-unbehandelte Biofilm aufgetragen, in Hellorange die Behandlung mit niedriger Phagendosis (1:0,1) und in Dunkelorange die Behandlung mit hoher Phagendosis (1:10). (a.) Nicht-adhärente CFUs des *P. aeruginosa* Biofilms; (b.) korrespondierende adhärente Biofilm-CFUs; (c.) nicht-adhärente Biofilm-CFUS der retS-Deletionsmutante; (d.) korrespondierende adhärente Biofilm-CFUs; (e.) nicht-adhärente Biofilm-CFUs der pepsI-Deletionsmutante; (f.) korrespondierende adhärente Biofilm-CFUs. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Experimenten im Doppelansatz. Analyse der gepoolten Daten mittels Student's t-Test oder Mann-Whitney-U-Test. **P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001.

Der Phagen-Cocktail zeigte im Vergleich zu Antibiotika eine Wirkung gegen *P. aeruginosa*-Biofilme, jedoch nur kurz nach der Behandlung. Veränderte bakterielle Physiologie und Barrieren innerhalb von *P. aeruginosa*-Biofilmen reduzierten die antimikrobielle Aktivität. Unsere Ergebnisse zeigen, dass Meropenem allein die Zahl der lebensfähigen Bakterien in Biofilmen nicht effektiv reduzieren konnte (Abb. 3). Eine Kombination aus Phagen-Cocktail und Meropenem eliminierte im "nicht-adhärenten" Biofilmwachstum die Bakterienpopulation vollständig und verhinderte die Entwicklung einer *P. aeruginosa*-Population. Beachtenswert ist, dass diese Wirkung in der "adhärenten" Population nur begrenzt auftrat.



SD von drei unabhängigen Experimenten im Doppelansatz. *P<0.05, ***P<0.0001 (Student's t-Test).

Abbildung 3: Bakterielle Viabilität (CFU/ml) von *P. aeruginosa* 6 h und 24 h nach Phagen-, Meropenem- und Kombinations-Behandlung im nicht-adhärenen (a.) und adhärenen (b.) Kompartiment des Biofilms. Die sequenzielle Gabe der Phagen erfolgte im Abstand von 2 h (erste Applikation: JG024, zweite Applikation: JG005). Dargestellt sind Mittelwerte ± SD.

Konkurrenz der Phagen im Cocktail: Die Anzahl der Phagen stieg am Ende der Behandlung um mindestens das Zehnfache an. Die Replikation am Infektionsherd ist ein möglicher Vorteil der "Phagen-Therapie" gegenüber traditionellen Antibiotika/Medikamenten. Die Phagenproduktion war im nicht-adhärenen Teil des Biofilms deutlich, jedoch zeigte sich in der adhärenen Population keine erkennbare Zunahme. Dies deutet darauf hin, dass die Phagen entweder nicht in der Lage sind, die Biofilmstruktur zu durchdringen, oder dass die bakteriellen Gemeinschaften innerhalb des Biofilms die Phagenvermehrung nicht begünstigen.

Unerwarteterweise stellten wir fest, dass die Fitness der Phagen JG024 in beiden Biofilmphasen stark reduziert war (Abb. 4a-b). Die Abnahme der Fitness von JG024 war so stark, dass die Anzahl der aktiven viralen Partikel zeitweise geringer war als die des nicht-lytischen Bhz17-Phagen. Diese Fitnessabnahme von JG024 war nicht nur Biofilm-assoziiert, sondern trat auch bei normalem, planktonischem Wachstum (Abb. 4c) von *P. aeruginosa* PAO1 auf. Darüber hinaus wurde dieses potenzielle Konkurrenzphänomen zwischen JG005 und JG024 auch bei einem anderen klinischen *P. aeruginosa*-Stamm CHA sowie bei der Untersuchung einiger anderer Phagen beobachtet, die gemeinsame Eigenschaften mit JG005 und JG024 aufweisen. Nach Abschluss dieser Arbeiten im März 2022 (ca. 2,5 Jahre Projektlaufzeit) bestand das nächste unmittelbare Ziel darin, die Grundlage der Konkurrenz zwischen JG024 und JG005 zu identifizieren. Die RNA-Sequenzierungsanalyse von mit JG005 und JG024 koinfizierten *P. aeruginosa* (in Kooperation mit Dr. Kai Papenfort, Friedrich-Schiller-Universität Jena), zeigte, dass es keine spezifischen *P. aeruginosa*-Mechanismen gibt, die in Koinfektion die Replikation von JG024 verhindern. Auch die Anheftung von JG024 an *P. aeruginosa* war durch die Gegenwart von JG005 nicht gestört (Abb. 4d).

Des Weiteren untersuchten wir Phagengenome (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Christine Rohde und Dr. Johannes Wittmann, Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), um die Determinanten der Konkurrenz zwischen JG005 und JG024 zu identifizieren. Während in JG005 mindestens 15 tRNAs vorhanden sind, konnte im Genom von JG024 keine einzige nachgewiesen werden. Das Fehlen von tRNAs im JG024-Genom bedeutet, dass JG024 für die Translation der Gene komplett vom Wirt abhängig ist, was zu einer verlängerten Latenzzeit und einer verringerten Nettoreproduktionsrate in Gegenwart des Konkurrenten JG005 führt. Diese Vermutung wurde in einem *in vitro* Experiment zur Kinetik der Phagenreplikation bestätigt (Abb. 4e), in dem JG005 die Replikation von JG024 während einer Koinfektion deutlich verzögerte/unterdrückte. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Monopolisierung der Ressourcen von *P. aeruginosa* durch JG005 die Replikationsfähigkeit von JG024 verringert. Eine solche nachteilige Folge der Phagen-Phagen-Konkurrenz wurde bisher noch nicht in Betracht gezogen. Der in diesem Projekt geschaffene experimentelle Rahmen wird daher nicht nur zur Beantwortung der Frage beitragen, warum bestimmte Phagenkombinationen besser sind als andere, sondern auch die Vorhersage der therapeutischen Wirkung von Phagen ermöglichen.

Alle Biofilmproben (adhärente und nicht-adhärente Populationen) wurden Mitte 2022 an unseren französischen Partner Laurent Debarbieux (AP 1) zur Sequenzierung des Genoms geschickt, um Mutationen zu identifizieren, die die Phagenresistenz in *P. aeruginosa* verursachen.

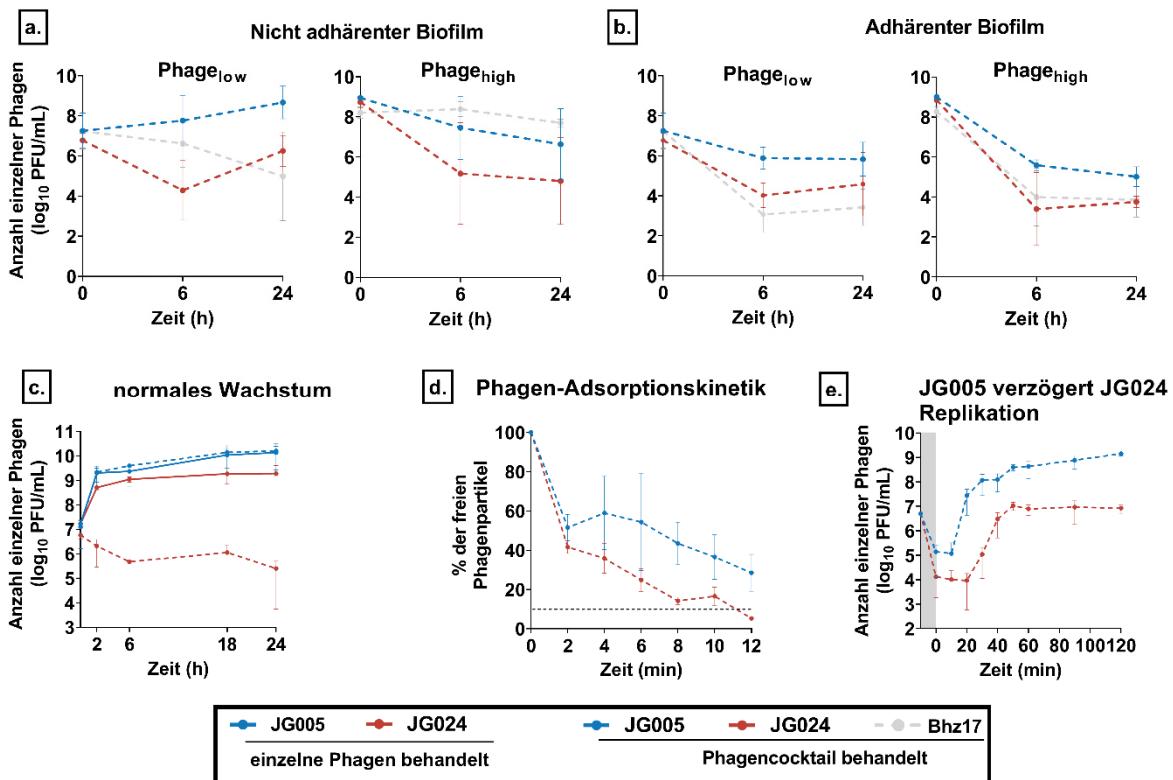


Abbildung 4: Individuelle Phagen-Anzahl (Plaque forming units/ml, PFU/ml) nach Phagen-Behandlung verschiedener *P. aeruginosa* Wachstums- und Behandlungs-Bedingungen. In (a.) sind nicht-adhärente PFUs des *P. aeruginosa*-Biofilms dargestellt, während (b.) die korrespondierenden adhärenten Biofilm-PFUs zeigen. Die Kinetik der Phagen Replikation unter normalen (planktonischen) Wachstumsbedingungen ist in (c.) dargestellt. Die angegebenen CFU-Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten, die in doppelter Ausführung durchgeführt wurden. Abbildung (d.) zeigt die Adsorptionskinetik der Phagen JG005 und JG024 in Kombination auf *P. aeruginosa* und (e.) die Reproduktionskinetik der beiden Phagen JG005 und JG024 bei kombinierter Gabe auf *P. aeruginosa* (One-Step-Wachstumskurve).

AP 3.2a/b Charakterisierung der Phagen-Bakterien-Wirts-Interaktion in humanem Lungengewebe ex vivo und Effizienz der Phagen-Cocktails in kolonisierten humanen Lungenepithelzellen

M3-2: Vorliegen grundlegender Daten zur Phagen-Bakterien-Wirts-Interaktion in humanem Lungengewebe und Zelllinien (erreicht)

AP 3.2a Humanes Lungengewebe: Dieser Teil der Arbeit wurde in den ersten 1,5 Jahren der Projektlaufzeit durchgeführt. Das Protokoll für den Nachweis einer *P. aeruginosa*-Infektion und die anschließende Bestimmung des Phagentiters aus diesen Proben wurden standardisiert. Nach Analyse von Pilotexperimenten mit verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämmen (PA14, CHA, PAK, PAO1 und PA103) haben wir uns auf den PAO1-Stamm beschränkt und unser Ziel erfolgreich erreicht. Besonders deutlich zeigte sich, dass der Phagencocktail die Viabilität von *P. aeruginosa* und die Entwicklung der Phagenresistenz im Vergleich zu den *in vitro* Versuchsbedingungen stark reduzierte (Abb. 5a). Synergien zwischen Phagen und der menschlichen Immunantwort zur Bekämpfung von Infektionen sind weithin bekannt und konnten in diesem ex vivo System gegen *P. aeruginosa*-Infektionen gezeigt werden.

AP 3.2b Zelllinien: Im Jahresbericht 2022 wurde die Verzögerung bei der Umsetzung von AP 3.1 erläutert, die sich zwangsläufig auch auf dieses Unterarbeitspaket auswirkte. Die Standardisierung des 2D-Infektionsmodells mit humanen A549-Epithelzellen begann Mitte 2022 und alle Experimente wurden Anfang 2023 erfolgreich abgeschlossen. Die Verabreichung des Phagencocktails (in zwei Konzentrationen) verringerte effektiv die Lebensfähigkeit von *P. aeruginosa* (Abb. 5b-d), jedoch nur zum frühen Zeitpunkt (6 Stunden nach Behandlung). Die Entwicklung einer Phagenresistenz bei *P. aeruginosa* war zum späteren Zeitpunkt deutlich, wenn auch in geringerem Ausmaß als unter *in vitro* Biofilm-Wachstumsbedingungen. Auch hier ist es wahrscheinlich, dass das Wirtsimmunsystem der infizierten A549-Zellen (wie in den oben erwähnten Experimenten mit menschlichem Lungengewebe) zur verstärkten Abtötung von *P. aeruginosa* beiträgt. Schließlich wurde auch in diesem Modell die Konkurrenz zwischen JG024 und JG005 beobachtet, was auf die Relevanz des Phänomens der Phage-Phage-Interaktion unter krankheitsrelevanten Bedingungen hindeutet.

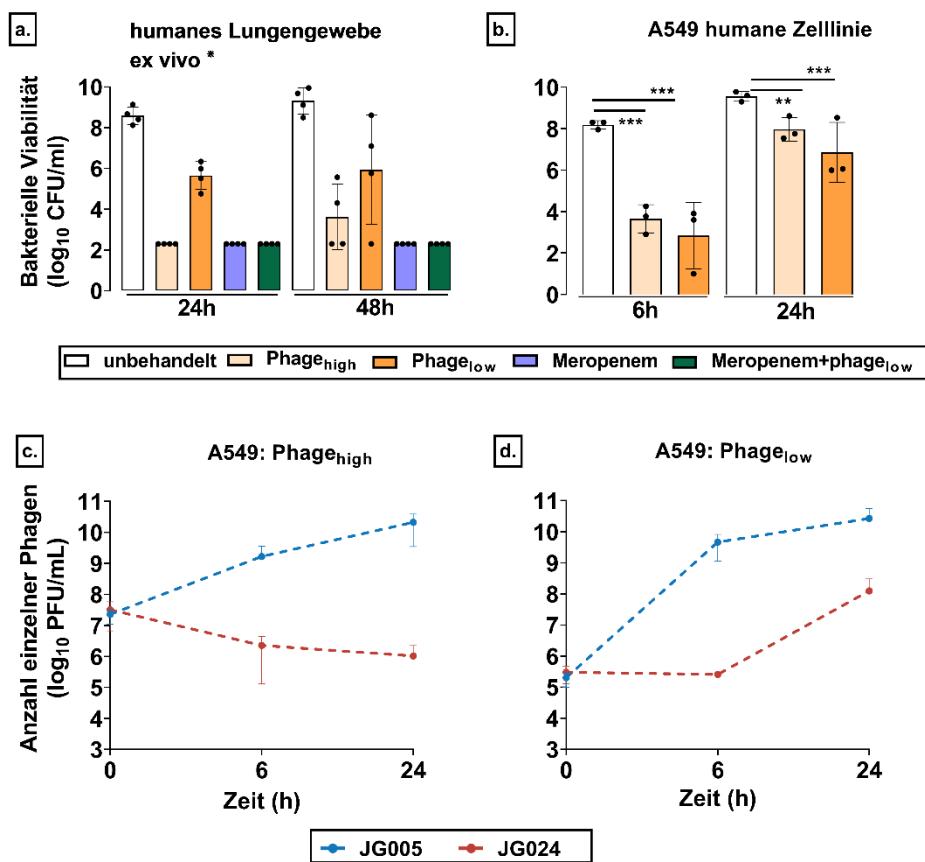


Abbildung 5. Die Abbildung (a.) veranschaulicht die bakterielle Viabilität (CFU/ml) von *P. aeruginosa* 24 und 48 Stunden nach Infektion und Behandlung von ex vivo kultiviertem Lungengewebe. Das Gewebe wurde 30 min nach Infektion mit dem Phagen-Cocktail in unterschiedlichen Konzentrationen, dem Antibiotikum Meropenem (5 µg/ml) oder einer Kombination aus Phagen-Cocktail und Meropenem behandelt, die Gewebsstücke zu den entsprechenden Zeitpunkten geerntet, homogenisiert und die bakterielle Viabilität in CFU/g Lungengewebe dargestellt. (b.) repräsentiert die bakterielle Viabilität (CFU/ml) von *P. aeruginosa* 6 und 24 Stunden nach Phagenbehandlung einer A549-Infektion. Die Phagen-Kombinationsbehandlung erfolgte in zwei verschiedenen Konzentrationen 1 Stunde nach Infektion des Zell-Monolayers. (c.) repräsentiert die korrespondierenden individuellen Phagen-Anzahlen (PFU/ml) nach Phagen-Behandlung der A549-Infektion in hoher Phagen-Dosis vs. (d.) niedriger Phagen-Dosis. Analyse der gepoolten Daten mittels Student's t-Test oder Mann-Whitney-U-Test. Statistische Signifikanz im Vergleich zu der Gruppe ohne Phagenbehandlung. **P<0.01, ***P<0.001.

*In Abbildung 5a zeigten alle Behandlungsgruppen in den Experimenten zur Infektion von menschlichem Lungengewebe (N=4) statistische Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe vor der Phagen/Wirkstoff-Behandlung und sind daher in der Abbildung nicht dargestellt.

Im April 2023 wurden die gesammelten Proben an den französischen Partner gesendet, um Resistenzverleihende Mutationen in *P. aeruginosa* zu identifizieren.

Die vollständige Identifizierung von Phagenresistenzmutationen ist Aufgabe von AP 1. Wir fanden jedoch Mutationen in Genen, die alle an der Lipopolysaccharidsynthese beteiligt sind: Eine Frameshift-Mutation im *wzy*-Gen, die eine Resistenz gegen beide Phagen verleiht, und eine Missense-Mutation im *lalC*-Gen, die die Anfälligkeit von *P. aeruginosa* für beide Phagen verringert. Es gibt auch einige spezifische Nukleotidveränderungen (z. B. in *wzz2* oder *AlgC*), die eine Resistenz gegen JG005 verleihen, aber die Anfälligkeit für JG024 verringern.

Die Ergebnisse von AP 3 sind in Abb. 6 zusammengefasst. Im Hinblick auf translationale Aspekte können die entwickelten *in vitro* Systeme Phagenresistenz und Phagen-Phagen-Konkurrenz während der Phagentherapie testen. Durch die genauere Identifizierung der Phagen-Antibiotika-Kombinationen für die bakterielle Sterilisierung könnten sie eine robustere biologische Grundlage für frühe klinische Versuche und letztlich kürzere, kleinere Zulassungsversuche bieten.

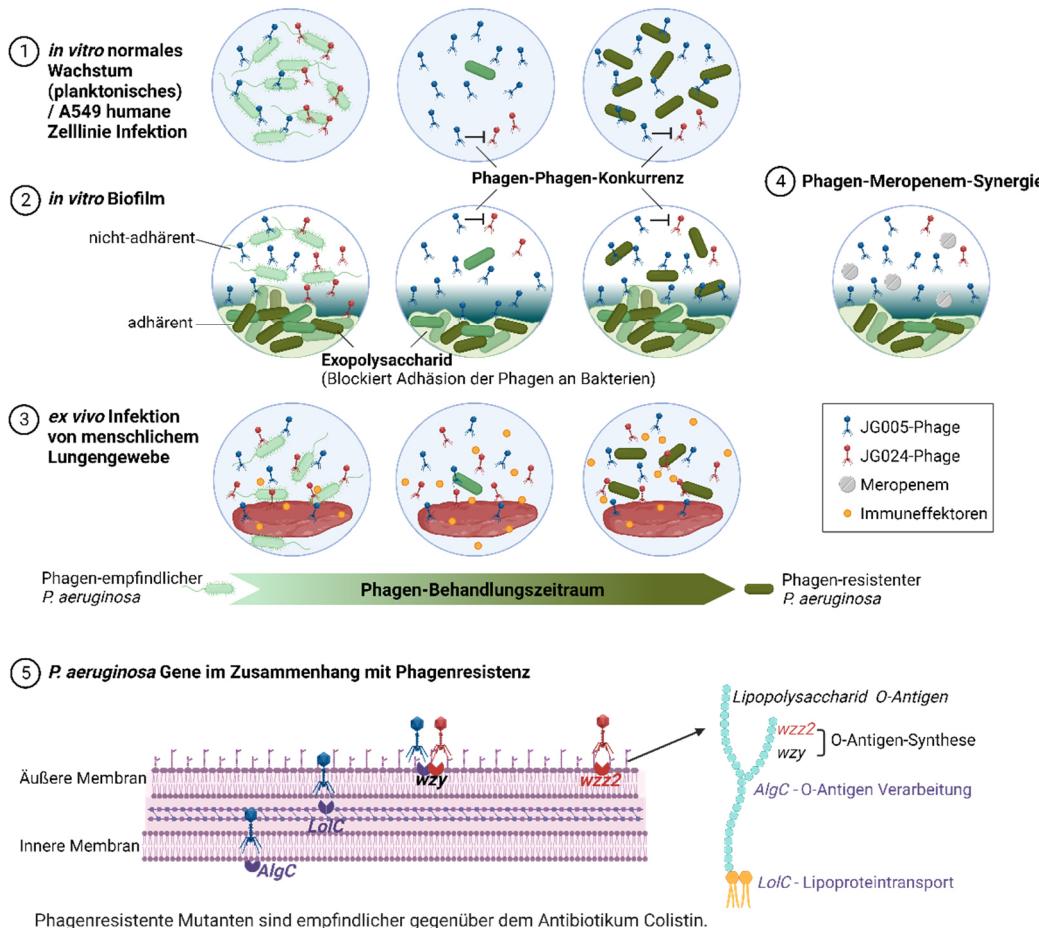


Abbildung 6: Schematische Zusammenfassung (erstellt mit Biorender.com) der Ergebnisse aus dem Arbeitspaket 3. Es zeigt die Wirkungsweise der Phagen-Kombination auf *P. aeruginosa* ① Wachstum in normaler Flüssigkultur und A549-Zelllinie ② in statischen Biofilmen ③ und ex vivo kultiviertem menschlichem Lungengewebe. Abgesehen von menschlichem Lungengewebe wurde die Entwicklung der Phagenresistenz bei normalem in vitro Wachstum, beim Biofilm und beim Infektionsmodell der A549-Zelllinie beobachtet. Dies ist ein direkter Beweis dafür, dass die Immunaktivierung im menschlichen Lungengewebe die schnelle Entwicklung einer Phagen-Resistenz verhindert. In ④ ist der gefundene Antibiotika-Phagen Synergismus auf Biofilm-Dispersion schematisch dargestellt und ⑤ erfasst und stellt alle gefundenen Mutationen in Phagen-resistenten Klonen dar, die alle in Genen gefunden wurden, die an der Lipopolysaccharid-Synthese beteiligt sind.

Arbeitspaket 4: Mechanistische Analyse der Phagen-assoziierten Immunantwort

AP 4.1 Charakterisierung der Immunogenität der Phagen-Cocktails in naiven Tieren

M4-1: Vorliegen grundlegender Daten zur Immunogenität von Phagen (erreicht)

Ziel von AP 4.1 war die Evaluation der Immunogenität der beiden in diesem Verbundprojekt genutzten Phagen-Cocktails gegen *Pseudomonas aeruginosa* (*P. ae*) oder *Escherichia coli* (*E. coli*) in naiven Tieren. Eine möglichst geringe Immunogenität ist dabei wünschenswert, da sowohl eine zelluläre Immunreaktion gegen die Phagen-Cocktails als auch das Auftreten Phagen-spezifischer, neutralisierender Antikörper die Effektivität der Phagen-Cocktails nachhaltig negativ beeinflussen können.

Ein entsprechender, für AP 4.1 spezifischer Tierversuchsantrag wurde geschrieben, eingereicht und genehmigt. Grundlegende experimentelle Techniken wurden spezifisch für AP 4.1 entwickelt oder angepasst (z. B. Inaktivierung der Phagen für Kontrollbehandlungen, Multicolor-Durchflusszytometrie Analysestrategien für angeborene und adaptive Immunzellen). Der tierexperimentelle Teil wurde bis Ende April 2021 durchgeführt. Im Anschluss erfolgten Auswertung, Analyse und Interpretation der Ergebnisse.

Zum Zeitpunkt 6 h nach intraperitonealer Applikation konnten wir Phagen in verschiedenen Organen nachweisen, wobei die anti-*P. ae* Phagen entgegen der anti-*E. coli* Phagen auch noch nach 10 Tagen nachweisbar waren. Die Versuchstiere zeigten nach den Phagen-Applikationen keinerlei klinische

Symptomatik (Abb. 7). Die Blutanalyse zeigte keine Veränderung in der Neutrophilen- und Monozytenanzahl. Mittels Durchfluszytometrie haben wir die Aktivierung der angeborenen Immunzellen sowie der adaptiven Immunzellen untersucht und konnten keine Aktivierung nach Phagentherapie feststellen. In der histopathologischen Untersuchung zeigte sich nach drei Wochen dabei nur eine geringgradige Entwicklung von Keimzentren in den Milzen der mit Phagen behandelten Versuchstiere (Abb. 8). Die Ergebnisse wurden in der Fachzeitschrift *Viruses* eingereicht und zur Veröffentlichung angenommen (Weissfuss et al., *Viruses* 2023; 15:387; doi: 10.3390/v15020387).

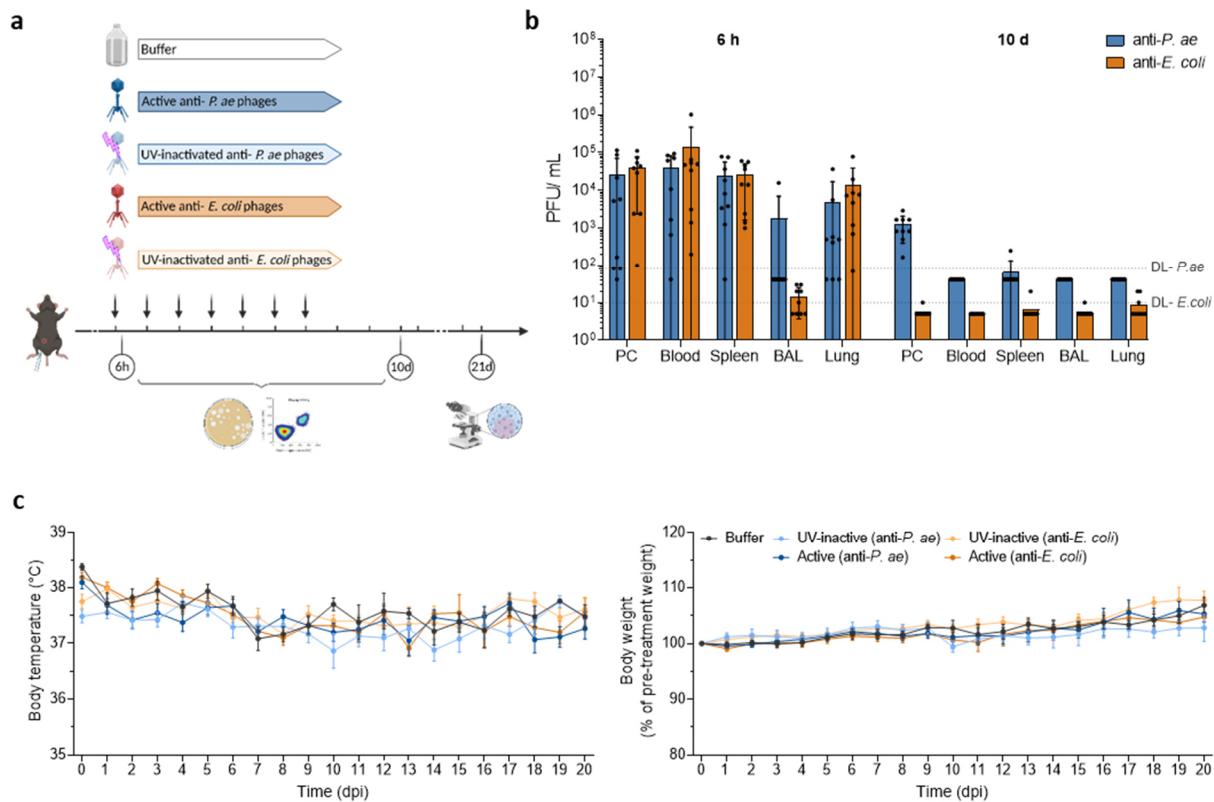


Abbildung 7. Die Behandlung naiver Mäuse mit Phagen führte zu keinen klinischen Symptomen, während die Phagen nach intraperitonealer Applikation die Lunge erreichten. (a) Schema für das experimentelle Design der Studie. Naive Mäuse (C57BL/6J WT, weiblich, 8-10 Wochen, Janvier Labs) wurden intraperitoneal mit den aktiven oder UV-inaktivierten Phagen-Cocktails gegen *P. ae* oder *E. coli* sowie Puffer einmalig oder täglich über 7 Tage behandelt (je 100 µl). Die Analysezeitpunkte waren 6 h, 10 d und 21 d. N = 6-9 pro Gruppe. (b) Logarithmische Darstellung der Phagenbelastung zu den Zeitpunkten 6 h und 10 d in den angegebenen Organen (Peritonealhöhle (PC), Blut, Milz, Alveolarräume (BAL) und Lunge). DL *P. ae*, Nachweisgrenze Anti-*P. ae*-Phagen gegen PA74 = 83 PFU/ml; DL *E. coli*, Nachweisgrenze Anti-*E. coli*-Phagen gegen AN33 = 10 PFU/ml. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit SEM angegeben. N = 9 pro Gruppe. (b) Körpertemperatur und prozentualer Körpergewichtsverlust der Tiere im Laufe der Zeit. N = 6-9 pro Gruppe. dpi, days post infection.

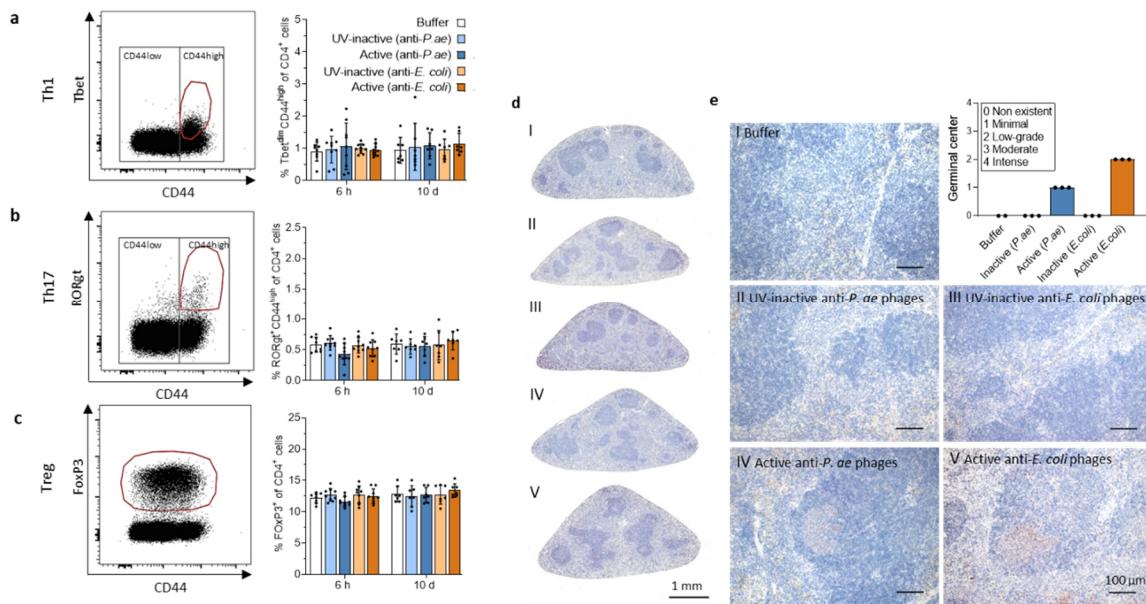


Abbildung 8. Die T-Helferzellpopulationen blieben nach der Phagenbehandlung in den drainierenden Lymphknoten unverändert, während eine geringgradige Keimzentrumsbildung nachweisbar war. Analyse der Effektor-T-Zellen (a) Th1, (b) Th17 und (c) Treg in den Lymphknoten zum Zeitpunkt 6 h und 10 Tagen (d). Abgebildet sind repräsentative Dotplots (links) und prozentuale Anteile der Zelltypen (rechts). Die Ergebnisse sind als Mittelwert mit SD angegeben und wurden mittels two-way ANOVA und Tukey's multiplem Vergleichstest analysiert, *P < 0,05. N = 7-9 pro Gruppe. Histopathologische Analyse zum Zeitpunkt 21 d mit immunhistochemischer Färbung von B-Zellen des Keimzentrums (aGL-7-Antikörper; rot) im Vergleich zu Hämatoxylin (blau). Repräsentative Milzschnitte (d) und entsprechende Vergrößerungen (e, 20x) von Tieren nach Behandlung mit (I) Puffer, (II) UV-inaktivem anti-*P. ae*-Phagen-Cocktail, (III) UV-inaktivem anti-*E. coli*-Phagen-Cocktail, (IV) aktivem anti-*P. ae*-Phagen-Cocktail und (V) aktivem anti-*E. coli*-Phagen-Cocktail. N = 2-3 pro Gruppe.

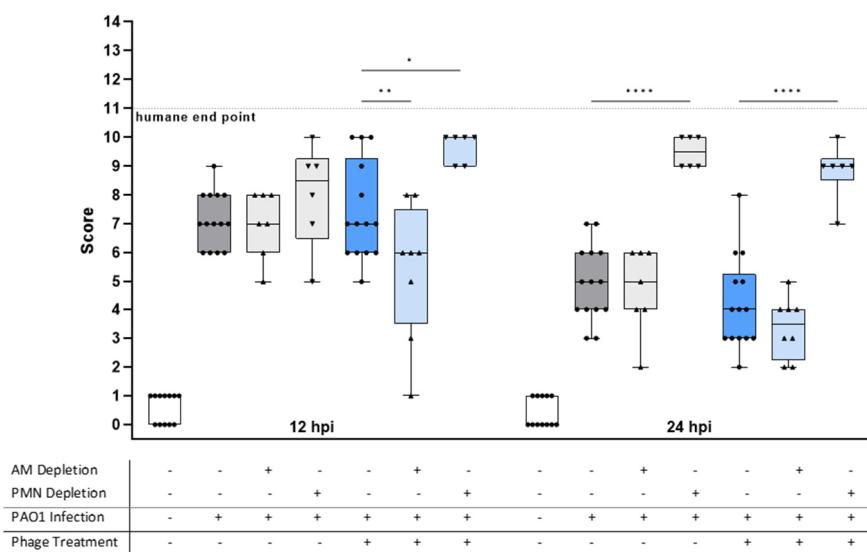
AP 4.2 Untersuchung von Immunsystem-Phagen-Synergie-Mechanismen nach Phagen-Therapie bei Pneumonie

M4-2: Verständnis grundlegender Mechanismen der Immunophage Synergie (erreicht)

Das Ziel dieses Arbeitspakets war die Untersuchung des postulierten „Immunophage-Synergie-Mechanismus“ in *Pseudomonas*-infizierten Mäusen. Der Zusammenhang und eine mögliche Synergie zwischen Immunzellen und einer Phagentherapie sind dabei noch weitgehend unerforscht.

Ein entsprechender, für AP 4.2 und AP 4.3 spezifischer Tierversuchsantrag wurde geschrieben, einge-reicht und genehmigt. Entsprechend der Reviewer-Empfehlung, in diesem Arbeitspaket den Fokus auf die Rolle der Alveolarmakrophagen anstelle der Neutrophilen zu legen, haben wir zuerst Methoden zur Depletion von Alveolarmakrophagen entwickelt. Ferner wurden essenzielle grundlegende experimentelle Techniken entwickelt bzw. angepasst (Infektion mit *P. aeruginosa* PAO1, Alveolarmakrophagen-Depletion, Neutrophilen-Depletion). Der Tierversuchsantrag wurde mittels Änderungsanzeige an die angepassten experimentellen Techniken für AP 4.2 aktualisiert und die Versuche durchgeführt.

Der tierexperimentelle Teil des Arbeitspaketes 4.2 wurde 2022 abgeschlossen. Die Rolle von Neutrophilen und Alveolarmakrophagen wurde mittels Depletionsversuchen (>95% Depletionsrate) untersucht. Es zeigte sich, dass der Verlauf der *Pseudomonas*-Infektion nach der Neutrophilen-Depletion sehr viel schwerwiegender war und die Behandlung der Tiere mit einer einmaligen Dosis des Phagen-Cocktails (2 Stunden p.i.) den Verlauf nur geringgradig verbessern konnte (Abb. 9). Klinisch und anhand der Auswertung der bakteriellen Last in diversen Organen sowie der durchflusszytometrischen Analyse von angeborenen Immunzellen des Respirationstrakts und der Analyse inflammatorischer Zytokine/Chemo-kine zeigten die Tiere Anzeichen einer mittelschweren bis schweren Pneumonie, mit einem signifikant erhöhten Lungenschaden und einem systemischen Infektionsverlauf (Abb. 10). Eine signifikante Reduktion der bakteriellen Last in der Lunge sowie bronchoalveolären Lavage nach der Phagenbehandlung bei bestehender Neutrophilendepletion konnte beobachtet werden. Die Depletion der Alveolarma-krophagen ergab nur einen geringfügigen Einfluss dieser Zellen auf den postulierten Synergie-Mechanismus. Weiterführende *in vitro* Experimente zur detaillierten Aufklärung, u. a. mit humanen Organoiden, sind geplant und wurden bereits begonnen. Die Ergebnisse sollen Anfang 2024 in einem Fachartikel zur Veröffentlichung in einer Fachzeitschrift zusammengestellt werden.



CFU in 20 µl), wobei Kontrolltiere analog PBS erhielten, und die einmalige intraperitoneale Behandlung der Tiere 2 h nach Infektion (hpi) mit dem aktiven oder UV-inaktiviertem Phagen-Cocktail (ca. 5×10^7 PFU/Phage in 100 µl). Dargestellt ist der klinische Score der Tiere zu den Zeitpunkten 12 hpi und 24 hpi. Die Ergebnisse sind in Form von Boxplots dargestellt, die den Median, die Quartile sowie Minimum und Maximum zeigen, analysiert durch eine two-way ANOVA mit Tukey's multiplem Vergleichstest: *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,0001; N = 6-8 Mäuse pro Gruppe.

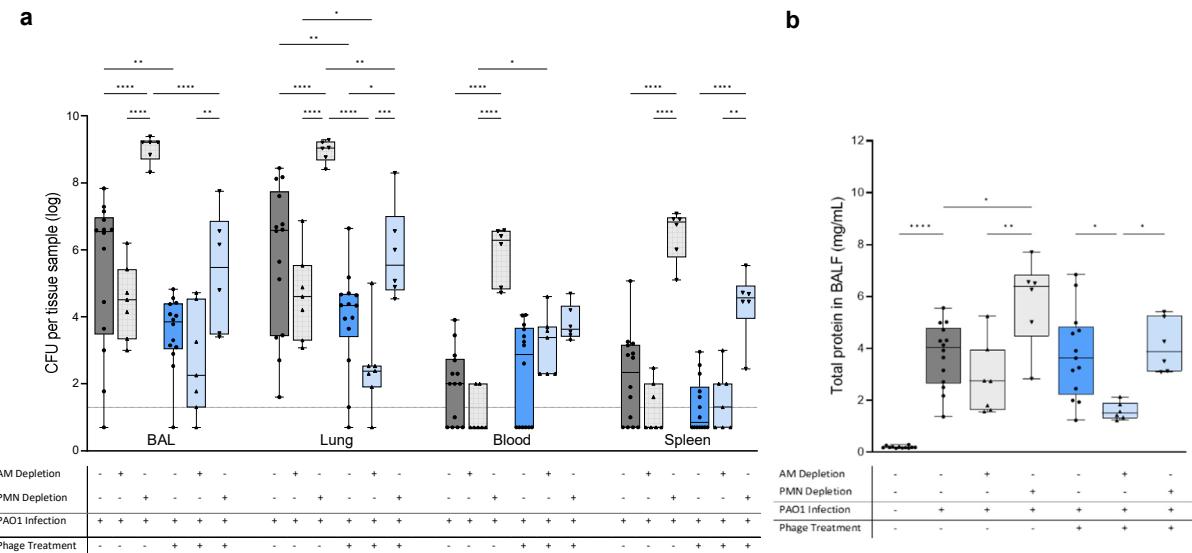


Abbildung 10. Phagentherapie kann, bei bestehender Neutrophilendepletion, den (systemischen) Verlauf der murinen Pseudomonas-Infektion mit induziertem Lungenschaden verbessern, aber nicht verhindern. **(a)** Logarithmische Darstellung (Y = log(CFU+1)) der Bakterienlast zum Zeitpunkt 24 hpi in angegebenen Organen (BAL, homogenisierte halbe Lunge (rechts), Blut, Milz). **(b)** Induzierter Lungenschaden, analysiert mittels Bestimmung des Gesamtproteingehalts in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) zum Zeitpunkt 24 hpi. Die Ergebnisse sind in Form von Boxplots dargestellt, die den Median, die Quartile sowie Minimum und Maximum zeigen, analysiert durch eine two-way ANOVA mit Tukey's multiplem Vergleichstest: *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001; N = 6-8 Mäuse pro Gruppe. Die gestrichelte Linie gibt das Detektionslimit an. AM, Alveolarmakrophagen; PMN, Polymorphkerniger Leukozyt, Neutrophile.

Abbildung 9. Die Depletion von Neutrophilen der Lunge verschlimmert die *Pseudomonas*-induzierte Pneumonie in der Maus. Naiven Wildtyp-Mäusen (C47BL/6J, weiblich, 8-10 Wochen, Janvier Labs) wurden Alveolarmakrophagen 3 Tage vor Infektion mittels Clodronat-Liposomen (transtracheal, 80 µl) bzw. Neutrophile 1 Tag vor Infektion mittels Ly6G-Antikörper (intraperitoneal, 200 µl) depletiert. Kontrolltiere erhielten analog PBS gefüllte Liposomen bzw. eine Isotypkontrolle. Anschließend erfolgte die intranasale Infektion mit PAO1 (5×10^6

AP 4.3 Präklinische und immunologische Beurteilung der systemischen Applikation von Phagen-Cocktails im Rahmen einer beatmungsassoziierten Pneumonie

M4-3: Detailliertes Verständnis der immunologischen Vorgänge der Phagen-Therapie im Kontext experimenteller VAP (erreicht)

Nachdem vorrangig im AP 4.1 die geringe Immunogenität der Phagen-Cocktails gezeigt werden konnte, war Ziel dieses Arbeitspakets die Evaluation der therapeutischen Effizienz des spezifischen Phagen-Cocktails bei der Behandlung *Pseudomonas*-induzierter VAP (ventilationsassoziierte Pneumonie) im murinen Tiermodell. Aufgrund der zunehmenden Antibiotikaresistenz von Pathogenen rückt die Phagentherapie immer mehr in den Fokus der Behandlung multiresistenter Erreger und könnte auch bei der Behandlung von VAP-Patient*innen von Nutzen sein.

Ein entsprechender, für AP 4.2 und AP 4.3 spezifischer Tierversuchsantrag wurde geschrieben, eingereicht und genehmigt. Das murine VAP-Modell mit nachfolgender Behandlung der Tiere mittels des *Pseudomonas*-spezifischen Phagen-Cocktails, des Standard-of-Care Antibiotikums Meropenem oder der Kombination beider Therapeutika wurde weiterentwickelt und angepasst.

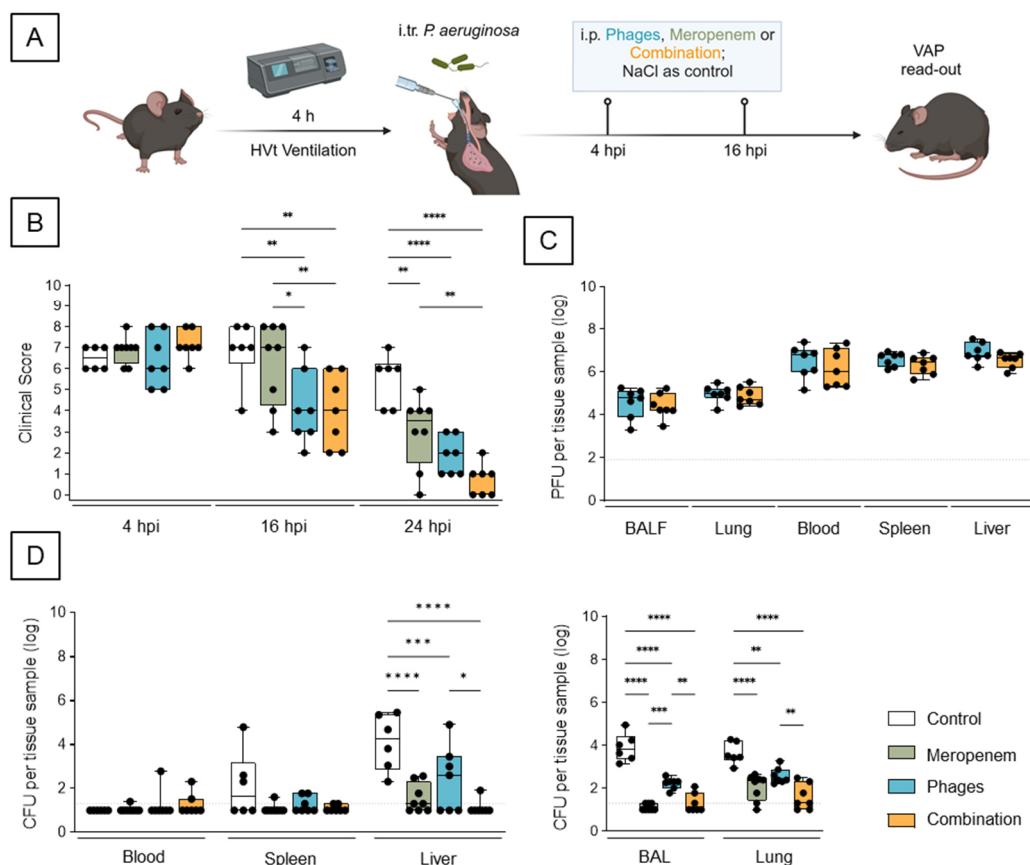


Abbildung 11. Schnellere klinische Genesung unter Phagen-Behandlung im *P. aeruginosa*-induzierten VAP-Modell der Maus. (A) Schema des experimentellen Designs, erstellt mit Biorender.com. Naive Mäuse (C57BL/6J WT, weiblich, 8-10 Wochen; Charles River) wurden für 4 h mit hohem Tidalvolumen (HVT: 34 ml/kg KM) beatmet, um eine beatmungsinduzierte Lungenschädigung hervorzurufen. VAP wurde anschließend durch intratracheale Infektion mit PAO1 (5×10^4 /20 µl) induziert, gefolgt von Extubation und zwei intraperitonealen Behandlungen 4 h nach der Infektion (pi) und 16 hpi mit einem *Pseudomonas*-spezifischen Phagen-Cocktail (blau; ca. 5×10^7 PFU/Phage pro Injektion), Meropenem (grün; 10 mg/Maus pro Injektion) oder der Kombination beider (ocker). Kontrolltiere (weiß) erhielten jeweils NaCl (0,9 %). Analysezeitpunkt war 24 hpi. (B) Klinischer Score der Mäuse zu den angegebenen Zeitpunkten. Humaner Endpunkt war ein Score = 10. Logarithmische Darstellung ($Y = \log(CFU/CFU+1)$) von (C) Phagentiter und (D) Bakterienlast zum Zeitpunkt 24 hpi in angegebenen Organen (BAL, homogenisierte halbe Lunge (rechts), Blut, Milz, Leber). Die Ergebnisse sind in Form von Boxplots dargestellt, die den Median, die Quartile und Extremwerte zeigen, analysiert durch eine two-way ANOVA mit Tukey's multiplem Vergleichstest: *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001; N = 6-8 Mäuse pro Gruppe. Die gestrichelte Linie gibt das Detektionslimit an.

Der tierexperimentelle Teil des Arbeitspaktes 4.3 wurde 2023 abgeschlossen. Naive Wildtyp-Mäuse wurden zunächst für 4 h mit hohen Tidalvolumina (34 ml/kg KM) beatmet, um eine beatmungsbedingte Lungenschädigung (VILI, *ventilator-induced lung injury*) zu verursachen. Anschließend wurde eine

Pseudomonas-induzierte VAP durch die intratracheale Infektion mit PAO1 induziert, gefolgt von der Extubation der Mäuse und zwei intraperitonealen Behandlungen 4 h und 16 h nach der Infektion (p.i.) mit dem Phagen-Cocktail, Meropenem oder einer Kombination aus beiden Therapeutika.

Nach 24 h reduzierte die Kombinationstherapie die bakterielle Last in BAL und Lunge um bis zu 3 log-Stufen, ebenso wie Meropenem, zeigte jedoch nur eine minimale Entzündung und eine noch schnellere Erholung der Mäuse als unter der Phagen-Cocktailtherapie allein (Abb. 11). Der klinische Score nahm mit steigender Körpertemperatur bereits zum Zeitpunkt 16 Stunden p.i. ab, während mit Meropenem behandelte Mäuse erst nach 24 Stunden p.i. normale Werte erreichten. Außerdem reduzierte die Phagenbehandlung inflammatorische Entzündungsmediatoren und den induzierten Organ- und Lunsenschaden (Abb. 12), nicht aber die angeborenen Immunzellen in den Alveolarräumen. Somit stellt die Kombinationstherapie eines spezifischen Phagen-Cocktails mit einer Standard-Antibiotikabehandlung eine vielversprechende therapeutische Option zur Behandlung von *P. aeruginosa*-induzierten VAP-Infektionen dar.

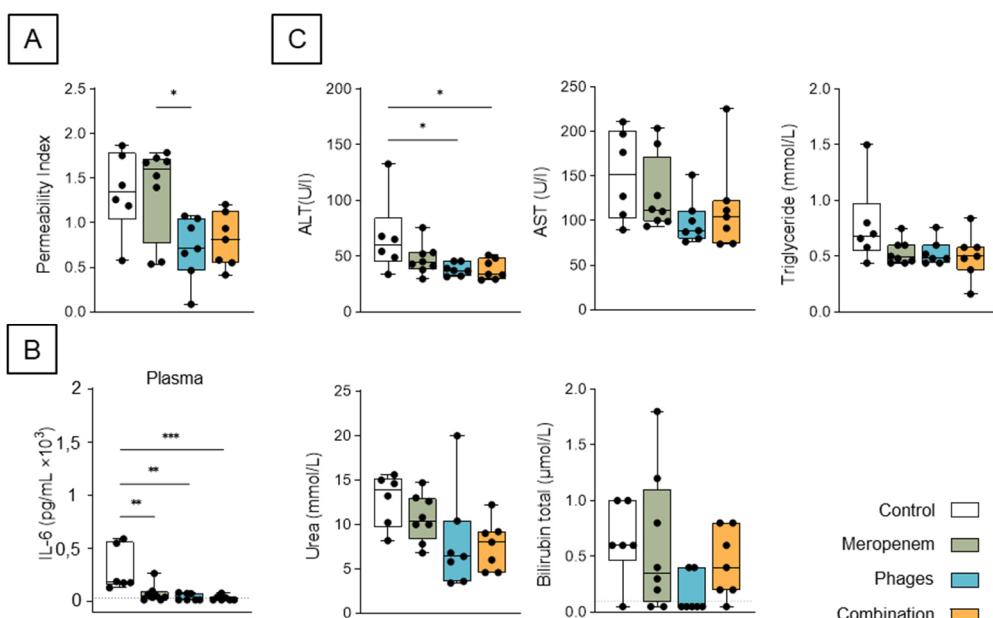


Abbildung 12. Verbesserung der Lungenbarrierefunktion und minimierte Organschädigung durch Phagenbehandlung von VAP-Mäusen. (A) Lungenpermeabilitätsindex von VAP-Mäusen zum Zeitpunkt 24 hpi, ermittelt durch Messung von murinem Serumalbumin in BALF und Plasma und Kalkulation des Verhältnisses. Plasmaspiegel von VAP-Mäusen zum Zeitpunkt 24 hpi (B) des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6, analysiert mittels IL-6 ELISA und (C) von Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST), Harnstoff (Urea), Triglycerid und Gesamtbilirubin zur Quantifizierung des Grades der Organschädigung, analysiert von Laboklin GmbH & Co. KG. Die Ergebnisse sind als Boxplots dargestellt, die den Median, die Quartile sowie Minimum und Maximum zeigen, analysiert mittels one-way ANOVA mit Tukey's multiplem Vergleichstest: *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001; N = 6-8 Mäuse pro Gruppe. BALF, bronchoalveolare Lavageflüssigkeit; hpi, hours post infection.

Weiterführende *in vitro* Experimente zur detaillierten Aufklärung u. a. von Effizienz und unterschiedlichen bakteriellen Lysekinetiken von Phagen und Antibiotika sind geplant und wurden bereits begonnen. Erste Ergebnisse konnten die *in vivo* Daten bestätigen und zeigten einen additiven Effekt der Einzelvorteile beider Therapiestrategien. Generell wirken Phagen sehr spezifisch und schnell bei der bakteriellen Lyse ohne Nebenwirkungen, bergen jedoch das Risiko des Auftretens Phagen-resistenter Stämme über die Zeit. Antibiotika haben ein hohes therapeutisches Potential über einen langen Zeitraum, können jedoch z. B. die Darm-Mikrobiota negativ beeinflussen. Die Kombinationsbehandlung zeigte eine hohe Effizienz ohne das erneute Hochwachsen Phagen-resistenter Stämme bei gleichzeitig drastisch reduzierter Antibiotikakonzentration, was für eine klinische Anwendung vielversprechend ist. Die Ergebnisse werden derzeit zusammengestellt und sollen Anfang 2024 in einem Fachartikel zur Veröffentlichung in einer Fachzeitschrift eingereicht werden.

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die Gesamtausgaben für das Projekt (AP 2, 3 und 4) beliefen sich auf 414.870,42 €. Bitte finden Sie nachfolgend eine Aufschlüsselung der Ausgaben nach Finanzpositionen:

0812 – wissenschaftliches Personal: Von den insgesamt bewilligten 272.062,06 € wurden 272.011,59 € (99,98 %) für die Beschäftigung von wissenschaftlichem Personal zur Bearbeitung der wissenschaftlichen Fragestellungen in den Arbeitspaketen 2, 3 und 4 des Verbundprojektes verwendet.

0835 Vergabe von Aufträgen: Die bewilligten 11.219,80 € wurden zweckentsprechend für die geplanten Sequenzierungen ausgegeben.

0843 Sonstige Ausgaben: Von den insgesamt bewilligten 130.468,14 € wurden 131.564,03 € (100,84 %) zweckentsprechend für Verbrauchsmaterialien (Tiere, Materialien für Infektionen sowie Zell- und Gewebekultur, diverse Antikörper und Assays etc.) ausgegeben.

0846 Reisekosten: Von den insgesamt bewilligten 1.575,00 € für Dienstreisen konnten nur 75,00 € (4,76 %) ausgegeben werden. Dies ist vor allem auf die eingeschränkten Reisemöglichkeiten während der COVID-19 Pandemie zurückzuführen. Konferenzen und Projekttreffen wurden in dieser Zeit vorwiegend ersatzweise virtuell durchgeführt.

Insgesamt konnten die zur Verfügung gestellten Mittel mit einem Nutzungsgrad von 99,89 % für das Projekt eingesetzt werden.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die Häufigkeit von Infektionen durch antibiotikaresistente Bakterien nimmt weltweit zu. Besonders betroffene Patient*innen auf der Intensivstation tragen ein erhöhtes Risiko für Infektionen mit multiresistenten Erregern, die sogenannte beatmungsassoziierte Pneumonie (*ventilator-induced pneumonia, VAP*) ist mit einer hohen Mortalität assoziiert. Zu den wichtigsten MDR-Bakterien gehören *Enterobacteriaceae* (z. B. *Klebsiella pneumoniae*), *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii*, die alle, wenn sie gegen Carbapeneme resistent sind, auf der WHO-Liste der prioritären Erreger als kritisch eingestuft werden.

Die Therapie mit Bakteriophagen stellt eine attraktive therapeutische Möglichkeit dar. Bei lytischen Phagen handelt es sich um Viren, welche mit hoher Spezifität Bakterien infizieren, darin replizieren und die Bakterienzellen lysieren. Phagen sind im Vergleich zu konventionellen Antibiotika selbst-dosierend und haben aufgrund ihrer Spezifität vermutlich kaum Auswirkungen auf die mikrobielle Standortflora. Die zum Zeitpunkt der Antragstellung veröffentlichten Berichte gingen jedoch nicht über die bakterizide Aktivität der eingesetzten Phagen hinaus, das Verständnis der grundlegenden Mechanismen der Phagen-Therapie war unzureichend.

Obwohl die Europäische Arzneimittelagentur (EMA) das große Potenzial von Phagenpräparaten anerkennt, betont sie, dass Phagen erst dann zur Zulassung empfohlen werden können, wenn ihre Wirksamkeit und Sicherheit in adäquat konzipierten klinischen Studien nachgewiesen wurden. Darüber hinaus ist ein tieferes mechanistisches Verständnis der Wirkungsweise und der Interaktion zwischen Phagen, Zielbakterien und dem menschlichen Wirt von großer Bedeutung und wird von der EMA und dem BfArM (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte) gefordert.

Mit dem interdisziplinären Verbundprojekt MAPVAP konnten wir ein leistungsstarkes Forschungskonsortium etablieren, das sich zum Ziel gesetzt hat, die notwendigen präklinischen Daten für zwei etablierte Phagen-Cocktails gegen MDR-*Pseudomonas aeruginosa* und *E. coli* hinsichtlich Biologie, Wirksamkeit und Auswirkungen auf Mikrobiota und Immunität zu generieren, um eine zukünftige klinische Phase II-Studie für schwere MDR-Pneumonien bei VAP-Patient*innen zu unterstützen.

Die beantragten Mittel wurden umfänglich für die Planung, die vorbereitenden Arbeiten, die Initiierung und Durchführung der experimentellen Versuche und Untersuchungen, einschließlich der Datenanalysen eingesetzt. Im Rahmen des Projektes konnten wichtige Daten zum Einfluss des Phagen-Cocktails auf die *Pseudomonas*-Pneumonie sowie von Phagen im Vergleich zu Antibiotika auf Mikrobiota-abhängige antimikrobielle Abwehrfunktionen erhoben und publiziert werden.

4. Voraussichtlicher Nutzen, Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Aufgrund der interdisziplinären Natur des Verbundvorhabens und der Interdependenz der Arbeitspakete kann und soll die Verwertung der Ergebnisse des MAPVAP Konsortiums ausschließlich gemeinsam erfolgen.

Mit dem Projekt MAPVAP haben wir zu einem besseren Verständnis des Wirkmechanismus von Bakteriophagen und deren Einfluss auf das Immunsystem und die Mikrobiota beigetragen.

Es war eine äußerst produktive und für beide Seiten vorteilhafte Zusammenarbeit in einem Projekt, das durch die Konvergenz der Forschungsinteressen deutscher und französischer Laboratorien motiviert war, einen mechanistischen Rahmen für die Vorhersage und Verbesserung des klinischen Erfolgs der Phagentherapie gegen MDR-Erreger zu schaffen, die eine erhebliche Morbidität und Mortalität bei VAP-Patient*innen verursachen.

Im Rahmen des MAPVAP-Projekts wurden insbesondere die folgenden Schlüsselaspekte behandelt:

1. Neue und verbesserte präklinische experimentelle Systeme (*in vitro*-Biofilm-, Zelllinien- und Mausmodelle), die insgesamt das gesamte Spektrum der physiologischen Zustände des Erregers, die bei einer Phagentherapie auftreten können, besser widerspiegeln.
2. Die gewonnenen Erkenntnisse über die Synergie zwischen Phagen und Immunsystem sowie über die Mechanismen der Phagenresistenz werden eine empirische Auswahl von Phagentherapie-Kombinationen ermöglichen, die die bakteriellen Mechanismen der intrinsischen Arzneimittelresistenz blockieren und das Risiko des Erwerbs einer Phagen-/Wirkstoffresistenz verringern.
3. Die experimentellen (präklinische *in vitro*- und *in vivo*-Modelle) und integrierten mathematischen Modellierungen werden wichtige Daten liefern, um Entscheidungskriterien für den Übergang von Phagen-Kombinationen (mit Antibiotika) zu klinischen Studien der Phase II bei VAP-Patient*innen zu identifizieren. Dem Konsortium gehören bereits Vertreter europäischer Zulassungsbehörden und/oder Mitglieder länderspezifischer Gremien an, die die Forschung und Entwicklung phagenbasierter Therapeutika beaufsichtigen, und die Wirkung der Phagentherapie wird demnächst in einer klinischen Studie untersucht (Phage4Cure, PI: Martin Witzenrath). Diese Studie wird es uns nicht nur ermöglichen, die Faktoren zu identifizieren, die die Ergebnisse der Phagentherapie beeinflussen, sondern diese auch in klinischen Studien zu evaluieren.
4. Das Projekt ermöglichte auch die Ausbildung von drei Doktorandinnen in deutschen Laboratorien in der Durchführung modernster Forschung zur Interaktion zwischen Bakterien und Phagen und zur Entwicklung von Phagentherapeutika. Darüber hinaus stärkt dieses Kooperationsprojekt die Kapazitäten der einzelnen Partner in diesem neuen und noch wenig erforschten Bereich.

5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Während der Projektlaufzeit wurden keine neuen Studien zum untersuchten Phagen-Cocktail veröffentlicht. Eine im Jahr 2022 publizierte Arbeit zur Phagenresistenz von *P. aeruginosa* (Markwitz P et al., ISME J 2022;16(2):533-542; doi: 10.1038/s41396-021-01096-5) lieferte uns das Protokoll für die DNA-Sequenzierung und -Analyse sowie den experimentellen Rahmen für die Identifizierung von Mutationen, die eine Phagenresistenz in *P. aeruginosa* bewirken, und deren Auswirkungen auf die bakterielle Fitness.

6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses

Die nachfolgende Liste beinhaltet Publikationen, die bis zum Zeitpunkt des Abschlussberichtes veröffentlicht wurden. Weitere Publikationen sind geplant, u. a. zum Verständnis grundlegender Mechanismen der Immunophagie Synergie sowie zu den immunologischen Vorgängen der Phagen-Therapie im Kontext experimenteller VAP.

1. Dörner PJ, Anandakumar H, Röwekamp I, Milek M, Fiocca Vernengo F, Millet Pascual-Leone B, Krzanowski M, Igboekwe, Löber U, Holstein M, Heinz G, Mashreghi MF, Schulte LN, Klatt AB, Caesar S, Wienhold SM, Offermanns S, Mack M, Witzenrath M, Beule D, Forslund SK, Wilck N, Bartolomaeus H, Heimesaat MM, Opitz B. Clinically used broad-spectrum antibiotics compromise inflammatory monocyte-dependent antibacterial defense in the lung. *Research Square (preprint; manuscript in revision, Nat Commun; #NCOMMS-23-21801-T)*. doi.org/10.21203/rs.3.rs-2873449/v1.
2. Pappe E, Hammerich R, Saccomanno J, Sgarbossa T, Pohrt A, Schmidt B, Grah C, Eisenmann S, Holland A, Eggeling S, Stanzel F, Witzenrath M, Hübner RH. Impact of COVID-19 on Hospital Admissions, Health Status, and Behavioral Changes of Patients with COPD. *Chronic Obstr Pulm Dis.* **2023**; 10:211-223.
3. Nouailles G, Adler JM, Pennitz P, Peidli S, Teixeira Alves LG, Baumgardt M, Bushe J, Voss A, Langenhagen A, Langner C, Martin Vidal R, Pott F, Kazmierski J, Ebenig A, Lange MV, Mühlbach MD, Goekeri C, Simmons S, Xing N, Abdelgawad A, Herwig S, Cichon G, Niemeyer D, Drosten C, Goffinet C, Landthaler M, Blüthgen N, Wu H, Witzenrath M, Gruber AD, Praktikno SD, Osterrieder N, Wyler E, Kunec D, Trimpert J. Live-attenuated vaccine sCPD9 elicits superior mucosal and systemic immunity to SARS-CoV-2 variants in hamsters. *Nat Microbiol.* **2023**; 8:860-874.
4. Goekeri C, Pennitz P, Groenewald W, Behrendt U, Kirsten H, Zobel CM, Berger S, Heinz GA, Mashreghi MF, Wienhold SM, Dietert K, Dorhoi A, Gruber AD, Scholz M, Rohde G, Suttorp N, Capnetz Study Group, Witzenrath M, Nouailles G. MicroRNA-223 Dampens Pulmonary Inflammation during Pneumococcal Pneumonia. *Cells.* **2023**; 12:959.
5. Weissfuss C, Wienhold SM, Bürkle M, Gaborieau B, Bushe J, Behrendt U, Bischoff R, Korf IHE, Wienecke S, Dannheim A, Ziehr H, Rohde C, Gruber AD, Ricard JD, Debarbieux L, Witzenrath M, Nouailles G. Repetitive Exposure to Bacteriophage Cocktails against *Pseudomonas aeruginosa* or *Escherichia coli* Provokes Marginal Humoral Immunity in Naïve Mice. *Viruses.* **2023**; 15:387.
6. Asmus E, Karle W, Brack MC, Wittig C, Behrens F, Reinshagen L, Pfeiffer M, Schulz S, Mandzimba-Maloko B, Erfinanda L, Perret PL, Michalick L, Smeele PJ, Lim EHT, van den Brom CE, Vonk ABA, Kaiser T, Suttorp N, Hippensiel S, Sander LE, Kurth F, Rauch U, Landmesser U, Haghikia A, Preissner R, Bogaard HJ, Witzenrath M, Kuebler WM, Szulcek R, Simmons S. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators attenuate platelet activation and aggregation in blood of healthy donors and COVID-19 patients. *Eur Respir J.* **2023**; 61:2202009.
7. Klatt AB, Diersing C, Lippmann J, Mayer-Lambertz S, Stegmann F, Fischer S, Caesar S, Fiocca Vernengo F, Hötzke K, Hocke AC, Ruland J, Witzenrath M, Lepenies B, Opitz B. CLEC12A Binds to *Legionella pneumophila* but Has No Impact on the Host's Antibacterial Response. *Int J Mol Sci.* **2023**; 24:3891.
8. Felten M, Dame C, Lachmann G, Spies C, Rubarth K, Balzer F, Kramer A, Witzenrath M. Circadian rhythm disruption in critically ill patients. *Acta Physiol (Oxf).* **2023**; 238:e13962. Review.
9. Felten M, Ferencik S, Teixeira Alves LG, Letsiou E, Lienau J, Müller-Redetzky HC, Langenhagen AK, Voß A, Dietert K, Kershaw O, Gruber AD, Michalick L, Kuebler WM, Ananthasubramaniam B, Maier B, Uhlenhaut H, Kramer A, Witzenrath M. Ventilator-induced Lung Injury Is Modulated by the Circadian Clock. *Am J Respir Crit Care Med.* **2023**; 207:1464-1474.
10. Pennitz P, Goekeri C, Trimpert J, Wyler E, Ebenig A, Weissfuss C, Mühlbach MD, Witzenrath M, Nouailles G. Protocol to dissociate healthy and infected murine- and hamster-derived lung tissue for single-cell transcriptome analysis. *STAR Protoc.* **2022**; 4:101957.
11. Lingscheid T, Kinzig M, Krüger A, Müller N, Bölke G, Tober-Lau P, Münn F, Kriedemann H, Witzenrath M, Sander LE, Sörgel F, Kurth F. Pharmacokinetics of Nirmatrelvir and Ritonavir in COVID-19 Patients with End-Stage Renal Disease on Intermittent Hemodialysis. *Antimicrob Agents Chemother.* **2022**; 66:e0122922.

12. Steinbeis F, Knape P, Mittermaier M, Helbig ET, Tober-Lau P, Thibeault C, Lippert LJ, Xiang W, Müller-Plathe M, Steinbrecher S, Meyer HJ, Ring RM, Ruwwe-Glösenkamp C, Alius F, Li Y, Müller-Redetzky H, Uhrig A, Lingscheid T, Grund D, Temmesfeld-Wollbrück B, Suttorp N, Sander LE, Kurth F, Witzenrath M, Zoller T. Functional limitations 12 months after SARS-CoV-2 infection correlate with initial disease severity: An observational study of cardiopulmonary exercise capacity testing in COVID-19 convalescents. *Respir Med.* **2022**; 202:106968.
13. Ni B, Chen S, Ryan KA, Maitland ML, Farrar JS, Witzenrath M, Gubier B, Serdjebi C, Bertotti K, Wang R, Salloum FN, Marino L, Mitchell BD, Celi FS. Selective adipocyte loss of Angiopoietin-2 prompts female-specific obesity and metabolic syndrome. *Mol Metab.* **2022**; 65:101588.
14. Pennitz P, Kirsten H, Friedrich VD, Wyler E, Goekeri C, Obermayer B, Heinz GA, Mashreghi MF, Büttner M, Trimpert J, Landthaler M, Suttorp N, Hocke AC, Hippenstiel S, Tönnies M, Scholz M, Kuebler WM, Witzenrath M, Hoenzke K, Nouailles G. A pulmonologist's guide to perform and analyse cross-species single lung cell transcriptomics. *Eur Respir Rev.* **2022**; 31:220056.
15. Dannebaum R, Suwalski P, Asgharian H, Du Zhipei G, Lin H, Weiner J, Holtgrewe M, Thibeault C, Müller M, Wang X, Karadeniz Z, Saccomanno J, Doechn JM, Hübner RH, Hinzmann B, Blüher A, Siemann S, Telman D, Suttorp N, Witzenrath M, Hippenstiel S, Skurk C, Poller W, Sander LE, Beule D, Kurth F, Guettouche T, Landmesser U, Berka J, Luong K; Pa-COVID Study Group, Rubelt F, Heidecker B. Highly multiplexed immune repertoire sequencing links multiple lymphocyte classes with severity of response to COVID-19. *EClinicalMedicine.* **2022**; 48:101438.
16. Hollenhorst MI, Nandigama R, Evers SB, Gamayun I, Abdel Wadood N, Salah A, Pieper M, Wyatt A, Stukalov A, Gebhardt A, Nadolni W, Burow W, Herr C, Beisswenger C, Kusumakshi S, Ectors F, Kichko TI, Hübner L, Reeh P, Munder A, Wienhold SM, Witzenrath M, Bals R, Flockerzi V, Gudermann T, Bischoff M, Lipp P, Zierler S, Chubanov V, Pichlmair A, König P, Boehm U, Krasteva-Christ G. Bitter taste signaling in tracheal epithelial brush cells elicits innate immune responses to bacterial infection. *J Clin Invest.* **2022**; 132:e150951.
17. Lingscheid T, Lippert LJ, Hillus D, Kruis T, Thibeault C, Helbig ET, Tober-Lau P, Pfäfflin F, Müller-Redetzky H, Witzenrath M, Zoller T, Uhrig A, Opitz B, Suttorp N, Kramer TS, Sander LE, Stegemann MS, Kurth F. Characterization of antimicrobial use and co-infections among hospitalized patients with COVID-19: a prospective observational cohort study. *Infection.* **2022**; 50:1441-1452.
18. Wyler E, Adler JM, Eschke K, Alves GT, Peidli S, Pott F, Kazmierski J, Michalick L, Kershaw O, Bushe J, Andreotti S, Pennitz P, Abdellgawad A, Postmus D, Goffinet C, Kreye J, Reincke SM, Prüss H, Blüthgen N, Gruber AD, Kuebler WM, Witzenrath M, Landthaler M, Nouailles G, Trimpert J. Key benefits of dexamethasone and antibody treatment in COVID-19 hamster models revealed by single cell transcriptomics. *Mol Ther.* **2022**; 30:1952-1965.
19. Kühnapfel A, Horn K, Klotz U, Kiehntopf M, Rosolowski M, Loeffler M, Ahnert P, Suttorp N, Witzenrath M, Scholz M. Genetic Regulation of Cytokine Response in Patients with Acute Community-Acquired Pneumonia. *Genes (Basel).* **2022**; 13:111.
20. Bahrs C, Kesselmeier M, Kolditz M, Ewig S, Rohde G, Barten-Neiner G, Rupp J, Witzenrath M, Welte T, Pletz MW; CAPNETZ Study Group. A longitudinal analysis of pneumococcal vaccine serotypes in pneumonia patients in Germany. *Eur Respir J.* **2022**; 59:2102432.
21. Wienhold SM, Brack MC, Nouailles G, Krishnamoorthy G, Korf IHE, Seitz C, Wienecke S, Dietert K, Gurtner C, Kershaw O, Gruber AD, Ross A, Ziehr H, Rohde M, Neudecker J, Lienau J, Suttorp N, Hippenstiel S, Hocke AC, Rohde C, Witzenrath M. Preclinical Assessment of Bacteriophage Therapy against Experimental *Acinetobacter baumannii* Lung Infection. *Viruses.* **2021**; 14:33.
22. Weiner J, Suwalski P, Holtgrewe M, Rakitko A, Thibeault C, Müller M, Patriki D, Quedenau C, Krüger U, Ilinsky V, Popov I, Balnis J, Jaitovich A, Helbig ET, Lippert LJ, Stubbemann P, Real LM, Macías J, Pineda JA, Fernandez-Fuertes M, Wang X, Karadeniz Z, Saccomanno J, Doechn JM, Hübner RH, Hinzmann B, Salvo M, Blueher A, Siemann S, Jurisic S, Beer JH, Rutishauser J, Wiggli B, Schmid H, Danninger K, Binder R, Corman VM, Mühlmann B, Arjun Arkal R, Fragiadakis GK, Mick E, Comet C, Calfee CS, Erle DJ, Hendrickson CM, Kangelaris KN, Krummel MF, Woodruff PG, Langelier CR, Venkataramani U, García F, Zyla J, Drosten C, Alice B, Jones TC, Suttorp N, Witzenrath M, Hippenstiel S, Zemojtel T, Skurk C, Wolfgang P, Borodina T, Pa-Covid SG, Ripke S, Sander LE, Beule D, Landmesser U, Guettouche T, Kurth F, Heidecker B. Increased risk of severe clinical course of COVID-19 in carriers of HLA-C*04:01. *EClinicalMedicine.* **2021**; 40:101099.

23. Nouailles G, Wyler E, Pennitz P, Postmus D, Vladimirova D, Kazmierski J, Pott F, Dietert K, Muelleder M, Farztdinov V, Obermayer B, Wienhold SM, Andreotti S, Hoefer T, Sawitzki B, Drosten C, Sander LE, Suttorp N, Ralser M, Beule D, Gruber AD, Goffinet C, Landthaler M, Trimpert J, Witzenrath M. Temporal omics analysis in Syrian hamsters unravel cellular effector responses to moderate COVID-19. **Nat Commun.** **2021;** 12:4869.
24. Witzenrath M, Kuebler WM. The CypA-netics of Ventilator-induced Lung Injury. **Am J Respir Crit Care Med.** **2021;** 204:385-387.
25. Thibeault C, Suttorp N, Opitz B. The microbiota in pneumonia: from protection to predisposition. **Sci Transl Med.** **2021;** 13:eaba0501.