

**Stellenwert des Biolumineszenz-Imagings
bakterieller Infektionen zur Evaluation der
Wirksamkeit neuer Antibiotika in der Maus**

**Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover**

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Stefanie Henken, Master of Science „Biomedizin“

geboren am 22.07.1982 in Bremerhaven

2010

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich A. Maus

Korreferent: Prof. Dr. med. Franz-Christoph Bange

Tag der Promotion: 13.01.2011

Für Tim,

für meine Familie

Inhaltsverzeichnis	Seite
Abkürzungsverzeichnis	I
Zusammenfassung	III
Abstract.....	V
1. Einleitung.....	1
1.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
1.1.1. Therapie der Pneumokokkenpneumonie	2
1.1.2. Resistenzentwicklung bei <i>S. pneumoniae</i>	3
1.2. Das Antibiotikum Daptomycin	4
1.3. Das Mausmodell der Pneumokokkenpneumonie	7
1.3.1. Biolumineszenz-Imaging in Kleintieren	8
2. Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....	11
3. Ergebnisse.....	13
3.1. Evaluierung des Biolumineszenz-Imaging-Verfahrens in der fokalen und invasiven Pneumokokkenerkrankung der Maus.....	13
3.1.1. Stellenwert des Biolumineszenz-Imaging-Verfahrens zur Analyse der fokalen Pneumokokkenpneumonie der Maus.....	14
3.1.2. Stellenwert des Biolumineszenz-Imaging-Verfahrens zur Analyse der invasiven Pneumokokkenerkrankung der Maus	17
3.2. Wirksamkeitsprofil des Lipopeptid-Antibiotikums Daptomycin im Mausmodell der fokalen und invasiven Pneumokokkenerkrankung	21
3.2.1. Effizienz von Daptomycin zur Therapie der fokalen Pneumokokkenpneumonie der Maus.....	23
3.2.2. Effizienz von Daptomycin zur Therapie der invasiven Pneumokokkenerkrankung der Maus.....	25
3.2.3. Einfluss des Serotyps von <i>S. pneumoniae</i> auf die Lungen- permeabilität und intraalveoläre Daptomycin-Verfügbarkeit	28
4. Diskussion	32

4.1.	Stellenwert des Biolumineszenz-Imaging-Verfahrens zur Analyse der fokalen versus der invasiven Pneumokokkenerkrankung der Maus	32
4.2.	Effizienz des Lipopeptid-Antibiotikums Daptomycin in der fokalen und invasiven Pneumokokkenerkrankung der Maus	34
4.3.	Stellenwert des Biolumineszenz-Imagings in der Bewertung der Daptomycin-Effizienz zur Therapie der fokalen versus der invasiven Pneumokokkenerkrankung der Maus.....	37
5.	Ausblick	40
6.	Literaturverzeichnis.....	41
7.	Danksagung.....	47
8.	Anlagen	49
8.1.	Originalarbeiten, Abstracts und Vorträge mit Bezug zur vorliegenden Dissertation.....	49
8.2.	Anlage 1	51
8.3.	Anlage 2	63
8.4.	Curriculum vitae.....	75
8.5.	Erklärung	77

Abkürzungsverzeichnis

AM	Alveolarmakrophagen
AU	Arbitrary units
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
CAP	Community-acquired pneumonia
CCD	Charge-coupled device
CFU	Colony Forming Unit
cSSTI	Complicated Skin and Soft Tissue Infection
DAP	Daptomycin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EM	Exudatmakrophagen
Eo	Eosinophile Granulozyten
FMN	Flavinmononukleotid
FMNH ₂	reduziertes Flavinmononukleotid
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
IL-6	Interleukin 6
i.p.	intraperitoneal
LP	Lungenpermeabilität
Lym	Lymphozyten
MRSA	methicillinresistente <i>Staphylococcus aureus</i>
NaCl	Natriumchlorid
NG	Neutrophile Granulozyten
ns	nicht signifikant
o.t.	orotracheal
p	Photon
PROTEKT	Prospective Resistant Organism Tracking and Epidemiology for the Ketolide Telithromycin
r	Korrelationskoeffizient nach Spearman
R-CHO	langkettiges aliphatisches Aldehyd
R-COOH	langkettige Fettsäure
RIE	rechtsseitige infektiöse Endokarditis
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Region of interest

s	Sekunde
sr	Steradian
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α

Zusammenfassung

Die durch *Streptococcus pneumoniae* induzierte ambulant erworbene Pneumonie (community-acquired pneumonia, CAP) gehört zu den häufigsten Infektionskrankheiten weltweit und ist somit von hoher klinischer und ökonomischer Bedeutung. In Abhängigkeit verschiedener Faktoren, wie dem Pathogenitätsprofil des Serotyps von *S. pneumoniae* sowie dem Immunstatus des Patienten, entwickelt sich im Verlauf einer CAP häufig eine pneumogene Sepsis als gefürchtete Komplikation. Trotz der Verfügbarkeit wirksamer Antibiotika ist insbesondere die Pneumokokkensepsis mit hohen Morbiditäts- und Letalitätsraten assoziiert. Vor dem Hintergrund weltweit zunehmender Resistenzentwicklungen von Pneumokokken gegenüber Antibiotika ist es dringend erforderlich, einerseits neue antibiotische Substanzen zur Therapie der Pneumokokkeninfektion zu entwickeln und andererseits robuste Screening-Verfahren zu etablieren, welche eine rasche, nicht invasive Bestimmung von Keimlasten in Versuchstieren erlauben. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit zum einen die Eignung des Biolumineszenz-Imaging-Verfahrens zur nicht invasiven Quantifizierung von Keimlasten in der fokalen Pneumokokkenpneumonie (verursacht durch Serotyp 19 *S. pneumoniae*) sowie in der pneumogenen Sepsis (verursacht durch Serotyp 2 *S. pneumoniae*) in C57BL/6- und BALB/c-Mäusen bewertet. Zum anderen wurde das Wirksamkeitsprofil des neuen Lipopeptid-Antibiotikums Daptomycin unter Verwendung klassischer sowie biolumineszenzbasierter Analyseverfahren in den vorgenannten Modellen der fokalen versus der invasiven Pneumokokkeninfektion in der Maus evaluiert. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass das Biolumineszenz-Imaging als Möglichkeit zur nicht invasiven Keimlastbestimmung den Verlauf einer invasiven Pneumokokkenerkrankung (Pneumokokkensepsis) in der Maus sehr akkurat abbilden kann, während der Verlauf einer fokalen pulmonalen Pneumokokkeninfektion deutlich weniger präzise dargestellt werden kann. Darüber hinaus ließ sich zeigen, dass die Leistungsfähigkeit des *in-vivo*-Biolumineszenz-Imagings zur Evaluation von Erregerlasten in Mauslungen entscheidend von der Virulenz des eingesetzten Pneumokokkenserotyps und weniger vom verwendeten Mausstamm selbst abhängt. Weiterführende Untersuchungen zur Charakterisierung der antibakteriellen Effizienz des neuen Lipopeptid-Antibiotikums Daptomycin in der Maus zeigten sowohl nach

klassischen Verfahren wie auch mittels biolumineszenzbasierter Analysen keine ausreichende Wirksamkeit des Daptomycins für die Behandlung der fokalen Pneumokokkenpneumonie. Hingegen zeigte Daptomycin in der Therapie der invasiven Pneumokokkenerkrankung hervorragende antibakterielle Effekte und führte somit zu einem verbesserten Überleben von Mäusen. Schließlich konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals beschrieben werden, dass Daptomycin bei intakter Lungenbarriere nicht im alveolären Kompartiment der Lunge selbst nachgewiesen werden kann, während bei einem floriden Lungenschaden, wie infolge einer Infektion mit Serotyp 19 *S. pneumoniae*, stark erhöhte Daptomycin-Konzentrationen im bronchoalveolären Kompartiment detektiert werden konnten. Insgesamt lassen die präsentierten Daten der vorliegenden Arbeit die Schlussfolgerung zu, dass das Biolumineszenz-Imaging-Verfahren als Screeningmethode zur Evaluation neuer antiinfektiver Substanzen zur Therapie septisch verlaufender bakterieller Infektionen der Maus hervorragend geeignet ist. Im Hinblick auf das Daptomycin lässt sich schlussfolgern, dass dieses Antibiotikum bei denjenigen Patienten, welche im Verlauf der Pneumonie eine Pneumokokkensepsis entwickeln, in Kombination mit einem lungenwirksamen Antibiotikum aller Wahrscheinlichkeit nach die Sepsis-assoziierte Letalität signifikant reduzieren kann.

Schlagwörter: *Streptococcus pneumoniae*, Biolumineszenz-Imaging, Antibiotika

Abstract

Streptococcus pneumoniae is the most prevalent pathogen in community-acquired pneumonia (CAP). CAP frequently progresses to invasive pneumococcal disease, thereby causing significant morbidity and mortality worldwide. Particularly in view of the rapid global spread of multi-resistant *S. pneumoniae* clones, a thorough pre-clinical evaluation of novel antibiotic substances is urgently needed. Therefore, in the current thesis, the importance of bioluminescence imaging as a non-invasive tool to estimate bacterial burdens in mice was evaluated in two infection models of either focal pneumonia or invasive pneumococcal disease by correlating *in vivo* and *ex vivo* obtained biophotonic signals with bacterial loads of infected mouse lungs. In addition, the efficacy profile of the lipopeptide antibiotic daptomycin was characterized in these two infection models using classical and bioluminescence-based quantification techniques. As opposed to focal pneumococcal pneumonia, bioluminescence imaging proved to be a valuable tool for imaging of invasive pneumococcal disease. In addition, both classical and innovative bioluminescence imaging approaches revealed that the novel lipopeptide antibiotic daptomycin proved to be highly effective for the treatment of life-threatening septic pneumococcal disease, thereby improving survival in mice. Overall, bioluminescence imaging for estimating lung bacterial loads in mice provides reliable quantitative data in those infectious disease entities characterized by bacteremia and sepsis in mice, which at the same time are of primary clinical interest. Moreover, the provided data strongly suggest that the antibiotic substance daptomycin, when given in combination with a lung-active antibiotic drug, is expected to significantly reduce sepsis-related lethality in patients where progression from pneumonia to septic pneumococcal disease is observed.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, bioluminescence imaging, antibiotics

1. Einleitung

1.1. *Streptococcus pneumoniae*

Das grampositive Bakterium *Streptococcus pneumoniae*, welches 1881 erstmals von Louis Pasteur und Georg Miller Sternberg aus menschlichem Sputum isoliert wurde, gehört morphologisch zur Gruppe der Diplokokken und induziert bei aerober Kultivierung auf bluthaltigem Agar charakteristischerweise eine α -Hämolyse (15). *S. pneumoniae* ist der wichtigste Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie (community-acquired pneumonia, CAP) (1). Als solcher erhielt der Erreger bereits Ende des 19. Jahrhunderts seinen Namen „Pneumokokkus“. Bei etwa 40 bis 70 % der gesunden Erwachsenen sind die Schleimhäute des Nasopharynx mit *S. pneumoniae* kolonisiert. Entsprechend beruhen Pneumokokkenkrankungen zuvor gesunder Personen meist auf endogenen Infektionen, welche sich entwickeln, wenn residente Pneumokokken des oberen Respirationstrakts in gewöhnlich sterile Kompartimente wie zum Beispiel das Mittelohr, die Lunge oder die Blutbahn vordringen (47). Neben der Pneumonie sind somit auch die Sinusitis, Otitis media sowie Meningitis und Bakteriämie weitere klinische Manifestationsarten einer Pneumokokkeninfektion. Die ambulant erworbene Pneumonie ist eine der weltweit häufigsten Infektionskrankheiten und geht regelhaft mit hoher Morbidität und Letalität einher (48). Die Letalität der Pneumokokkeninfektion hängt im Wesentlichen von der Art der Erkrankung, dem Alter sowie dem Immunstatus des Patienten ab. Das höchste Risiko zur Entwicklung einer Pneumokokkeninfektion tragen Kinder und Erwachsene über 64 Jahren sowie Personen mit chronischen Grunderkrankungen oder einer Immundefizienz. Nach Erhebungen des Kompetenznetzwerks für ambulant erworbene Pneumonien CAPNETZ treten allein in Deutschland pro Jahr ca. 400.000 - 670.000 ambulant erworbene Pneumonien auf (48, 50). Gerade bei älteren Personen ist die Pneumonie mit einer Letalitätsrate von 10 bis 20 % assoziiert, während die pneumogene Sepsis in dieser Patientengruppe sogar mit einer Letalität von bis zu 60 % behaftet ist (1). Die pneumogene Sepsis ist eine gefürchtete Komplikation der CAP und tritt in 20 bis 30 % der Pneumokokkenpneumonien auf (40). Insgesamt sind die durch *S. pneumoniae* verursachten Infektionen die am häufigsten mit einer Letalität behafteten Infektionen in den

Industrielländern und gehören zu den fünf häufigsten Todesursachen weltweit (22, 33).

Von großer Bedeutung für die Pathogenität von *S. pneumoniae* ist die Polysaccharidkapsel, welche bisher bei allen klinischen Isolaten nachgewiesen wurde. Eine wichtige Funktion der Polysaccharidkapsel besteht in der Inhibition der Phagozytose der Pneumokokken durch professionelle Phagozyten des Wirtes. Aufgrund ihrer chemischen Struktur können die Kapselpolysaccharide von *S. pneumoniae* in serologische Typen, sogenannte Serotypen, unterschieden werden. Bisher wurden über 90 verschiedene Serotypen identifiziert (28). Hierbei bestehen sowohl große Unterschiede im Virulenzprofil von *S. pneumoniae* ein und desselben Serotyps sowie zwischen Stämmen verschiedener Serotypen. Für die Virulenz von Pneumokokken sind neben den Kapselpolysacchariden weitere Virulenzfaktoren maßgeblich, welche einerseits auf der Zelloberfläche, jedoch auch im Zytoplasma der Pneumokokken lokalisiert sind. Eine bedeutende Rolle kommt hierbei dem intrazellulär lokalisierten Protein Pneumolysin zu, welches unter anderem in der Lage ist, zilienträgende Epithelien des Respirationstraktes und professionelle Phagozyten funktionell zu beeinträchtigen bzw. abzutöten, indem es Transmembranporen in der Zielzelle ausbildet, und somit essentiell zum Überleben von *S. pneumoniae* im infizierten Wirt beiträgt (23). Weiterhin von zentraler Bedeutung für die Virulenz von *S. pneumoniae* ist das Autolysin, welches unter anderem zur Autolyse und Zellteilung von Pneumokokken beiträgt, sowie die Hyaluronidase Hyla, welche für das invasive Wachstum von *S. pneumoniae* von Bedeutung ist.

1.1.1. Therapie der Pneumokokkenpneumonie

Die wichtigste Therapieform zur Behandlung einer Pneumonie ist nach wie vor die Antibiotika-Therapie. Diese erfolgt nach heutigem klinischen Erkenntnisstand in erster Linie risikostratifiziert (19), da eine verzögerte antiinfektive Therapie der Pneumonie deren Prognose signifikant verschlechtert (25). Eine erregerbasierte Therapie der ambulant erworbenen Pneumonie ist nur selten möglich, da zum Zeitpunkt der Diagnose der verursachende Erreger in den wenigsten Fällen bekannt ist (25). Obwohl verschiedene bakterielle Erreger als Auslöser der CAP identifiziert werden konnten, stellt *S. pneumoniae* dennoch den mit Abstand häufigsten Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie dar (48). Die Therapie-

entscheidung wird nach Eingrenzung des Erregerspektrums, welches sich aus der lokalen Erreger- und Resistenzsituation ableitet, unter Berücksichtigung individueller anamnestischer Angaben getroffen, wie Alter, Komorbidität und vorangegangene Antibiotika-Therapie. Insbesondere Komorbiditäten wie zum Beispiel Demenz, Herzinsuffizienz, chronisch obstruktive Lungenerkrankungen oder eine HIV-Infektion spielen als Risikofaktoren bei der Pneumokokkenpneumonie eine Rolle (19). Grundsätzlich ist für die ambulant erworbene Pneumokokkenpneumonie die hochdosierte Monotherapie mit einem β -Laktam-Antibiotikum – zumeist ein Aminopenicillin – die Therapie der Wahl (25, 27). Alternative Behandlungsstrategien bei Kontraindikation gegen eine β -Laktam-Therapie sind die Therapie mit einem Makrolid oder Tetracyclin. Alternative Therapieempfehlungen zur Behandlung der ambulant erworbenen Pneumonie bei Vorliegen von Risikofaktoren sind die Behandlung mit respiratorischen Fluorchinolonen der dritten oder vierten Generation wie Levofloxacin oder Moxifloxacin (19).

1.1.2. Resistenzentwicklung bei *S. pneumoniae*

Seit den ersten Beschreibungen von Pneumokokkenisolaten mit verminderter Suszeptibilität gegenüber Penicillin in den 60er und 70er Jahren (3, 4, 17) ist die Anzahl an resistenten oder auch multiresistenten Pneumokokkenstämmen stark angestiegen (15). Besonders hohe Penicillinresistenzraten bei *S. pneumoniae*-Isolaten waren laut der PROTEKT Surveillance Study 1999-2000 in Asien (53.4 %), Frankreich (46.2 %) und Spanien (42.1 %) zu verzeichnen. In Deutschland zeigten nur 2.2 % der isolierten Pneumokokkenstämme eine Penicillinresistenz (11). Die Resistenzraten gegen Makrolide stiegen hingegen auch in Deutschland auf inzwischen über 15 % an. Die höchsten Raten an Makrolidresistenzen bei *S. pneumoniae* sind jedoch wiederum in asiatischen Ländern wie Korea und Japan (80 %) zu finden, während in Europa die Länder Italien und Frankreich mit über 40 % der Pneumokokkenisolate die beträchtlichsten Raten an Makrolidresistenzen aufweisen (11, 34). Die Resistenzmechanismen von *S. pneumoniae* gegen Makrolide beruhen vorwiegend auf einer Ribosomen-Alteration durch Methyltransferasen, welche in einer verminderten Bindungsfähigkeit von Makroliden resultiert, oder auf einer Efflux-Pumpe, welche das Makrolid kontinuierlich aus dem Zellinneren transportiert (43).

Der erworbenen Penicillinresistenz bei Pneumokokken liegt eine Modifikation vorhandener penicillinbindender Proteine als Folge einer Mutation zugrunde. Ca. 60 % der penicillinresistenten Pneumokokkenisolate zeigen auch eine Resistenz gegen Makrolide (35).

Entgegen der im Jahre 1969 von William H. Stewart, Surgeon General der Vereinigten Staaten, getätigten euphorischen Äußerung, dass es an der Zeit sei, „das Buch der Infektionskrankheiten zu schließen“, erfordert die heutige weltweite Situation der *S. pneumoniae*-Resistenz gegen „First-Line“-Antibiotika wie β -Laktame und Makrolide, insbesondere mit Blick auf die schnelle globale Ausbreitung multiresistenter Klone, die Entwicklung neuer Immunisierungsstrategien sowie die Suche nach neuen effektiven Antiinfektiva (11). Während jedoch seitens der pharmazeutischen Industrie, vermutlich aufgrund mangelnder Rentabilität, kaum innovative antiinfektive Substanzen entwickelt werden (2), ist der weltweite Bedarf an neuen Antibiotika ungebrochen hoch. Gerade solche antibiotischen Substanzen, welche sich eines neuartigen und damit anderen Wirkmechanismus bedienen als die herkömmlich eingesetzten Antibiotikaklassen, sind besonders gefragt, weil Erreger möglicherweise später Resistenzen entwickeln werden und die Substanzen so länger wirksam bleiben.

1.2. Das Antibiotikum Daptomycin

Zu den wenigen neuen antibiotischen Substanzen, welche in den letzten Jahren auf dem Markt eingeführt wurden, gehört das Antibiotikum Daptomycin, der erste Vertreter aus der Gruppe der zyklischen Lipopeptide. Die Substanz wurde bereits in den frühen 80er-Jahren entdeckt, aber erst 2003 in den USA zugelassen und ist seit 2006 in Deutschland zur Therapie komplizierter Haut- und Weichgewebsinfektionen (cSSTI) auf dem Markt. Kurz darauf erfolgte die Zulassung für zwei weitere Indikationen, nämlich die durch *Staphylococcus aureus* verursachte rechtsseitige infektiöse Endokarditis (RIE) und die *S. aureus*-Bakteriämie, welche mit einer Endokarditis oder Weichteilinfektion assoziiert sein kann (13).

Daptomycin wird semisynthetisch aus einem Fermentationsprodukt von *Streptomyces roseosporus* hergestellt (5). Die zyklische Verbindung aus 13 Aminosäuren enthält hydrophile Bereiche und eine lipophile Seitenkette, die nach bisheriger Erkenntnis entscheidend zu dem neuartigen Wirkmechanismus von Daptomycin beiträgt, welcher im Detail noch immer nicht völlig aufgeklärt ist. Das

grundlegende Modell des Wirkmechanismus von Daptomycin nach Silverman *et al.* und nach weiterführenden Untersuchungen von Jung *et al.* (21, 39) ist in Abbildung 1 illustriert.

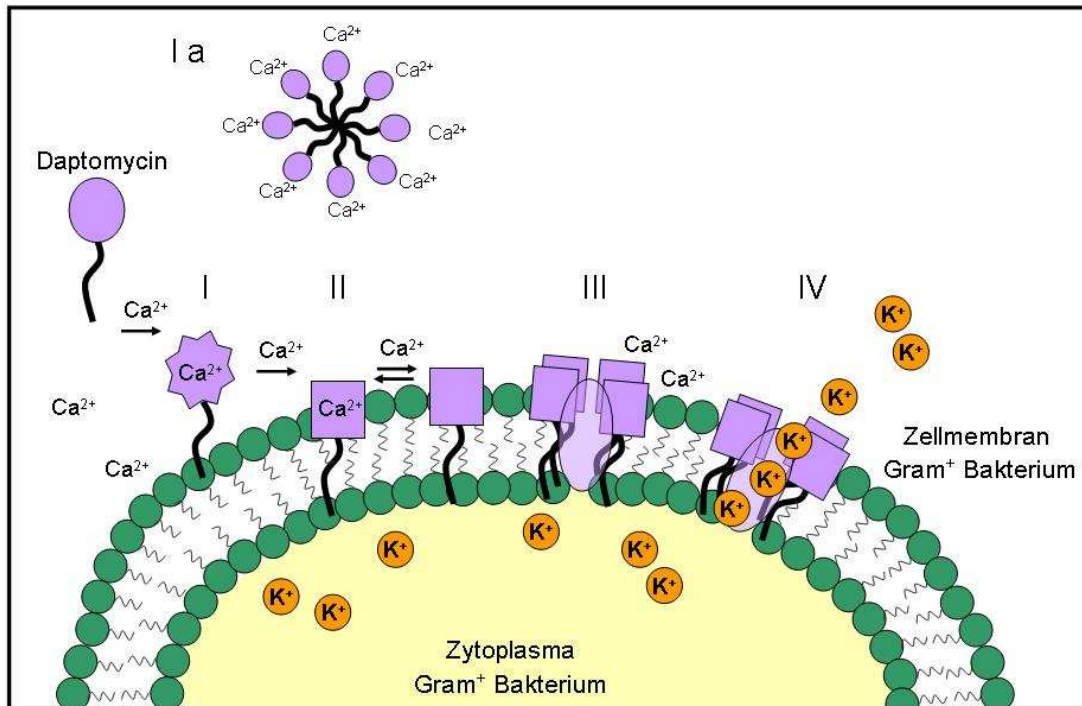


Abb. 1: Modell des Wirkmechanismus von Daptomycin

Schritt I a: Mögliche Mizellen-Bildung von Daptomycin Molekülen in Lösung in Gegenwart freier Calciumionen. Calcium-abhängige Bindung an (Schritt I) und Insertion der lipophilen Seitenkette des Daptomycins in die Zytoplasmamembran grampositiver Bakterien (Schritt II). Schritt III: Oligomerisierung und Ausbildung von Transmembranporen. Schritt IV: Ausstrom von Kaliumionen führt zum Arrest von RNA-, DNA- und Proteinsynthese und letztendlich zum Zelltod (verändert nach Silverman *et al.* und Jung *et al.* (21, 39)).

Zunächst wurde angenommen, dass die Bindung freier Calciumionen eine Konformationsänderung im Daptomycin-Molekül induziert und damit dessen Amphiphilie erhöht, welches Interaktionen mit der Membran grampositiver Bakterien ermöglicht (Schritt I). Anschließend fördert in einem zweiten Schritt eine weitere Calcium-abhängige Konformationsänderung des Daptomycins das tiefere Eindringen mit der lipophilen Seitenkette in die Zellmembran (21). Durch Oligomerisierung mehrerer Daptomycin-Moleküle kommt es zur Ausbildung von Transmembranporen (Schritt III), welche den Ausstrom intrazellulärer Kaliumionen ermöglichen (Schritt IV). Eine Beeinträchtigung der RNA-, DNA- und

Proteinsynthese ist die Folge, wodurch schnell eine konzentrationsabhängige bakterizide Wirkung eintritt. Der Einbau der Transmembranporen erfolgt ausschließlich in die Membran, nicht aber in die Zellwand, so dass die Bakterien ohne signifikante Zellyse abgetötet werden (39, 41). In Zusammenhang mit dem Ausstrom intrazellulärer Ionen wird außerdem eine Depolarisation des Membranpotentials diskutiert. Jedoch ist noch nicht eindeutig geklärt, ob diese die Ursache oder aber Folge des Zelltods ist (21). Neuere Untersuchungen deuten nunmehr darauf hin, dass Daptomycin-Moleküle bereits in Lösung in Gegenwart freier Calciumionen mit einem molaren Verhältnis von 1:1 Mizellen bilden (Schritt I a), wobei es zu einer Konformationsänderung kommt. Diese Multimere dissoziieren bei Kontakt mit der Zellmembran und die Daptomycin-Moleküle dringen dann wie bereits beschrieben unter einer weiteren Strukturänderung in die Membran ein (42). Aufgrund des besonderen Wirkmechanismus von Daptomycin sind Kreuzresistenzen mit anderen Antibiotika nicht zu erwarten. Darüber hinaus zeigen bisherige klinische Untersuchungen sehr niedrige Mutationsraten und damit eine geringe Resistenzentwicklung bei Erregern unter Daptomycin-Therapie (38). Daptomycin besitzt eine potente bakterizide Wirkung gegen klinisch relevante grampositive Bakterien. Das Wirkungsspektrum umfasst resistente Pathogene, wie z. B. methicillinresistente *S. aureus*, *S. aureus* mit intermediärer Glykopeptidempfindlichkeit, koagulasenegative Staphylokokken, vancomycinresistente Enterokokken und penicillinresistente *S. pneumoniae*, für die es gegenwärtig wenige therapeutische Alternativen gibt. Gramnegative Erreger weisen aufgrund von Unterschieden im Membranaufbau eine intrinsische Resistenz auf (5, 44).

Auch in Untersuchungen von Silverman *et al.* zeigte Daptomycin in einem Rattenmodell der hämatogenen Pneumonie, welche sich als Komplikation einer Bakteriämie entwickelte, sowohl bei Induktion durch methicillinsuszeptible als auch methicillinresistente *S. aureus* gute Wirksamkeit (37). In einem Mausmodell der *S. pneumoniae*- und auch methicillinresistenten *S. aureus* (MRSA)-induzierten alveolären Pneumonie hingegen war Daptomycin nicht in der Lage, die Bakterienlast innerhalb von 24 Stunden nach Infektion signifikant zu senken (37). Ähnlich war Daptomycin in klinischen Phase-III-Studien in einer Dosis von 4 mg/kg Körpergewicht zur Behandlung der ambulant erworbenen Pneumonie gegenüber Ceftriaxon unterlegen (79 gegenüber 87 % Wirksamkeit) (32). Die bis dato

vorliegenden Ergebnisse experimenteller als auch klinischer Studien legen nahe, dass Daptomycin keine ausreichende Wirksamkeit zur Behandlung der durch grampositive Erreger induzierten Pneumonie besitzt. Die unzureichende Wirksamkeit von Daptomycin in der Lunge ist vermutlich auf Interaktionen der Substanz mit dem pulmonalen Surfactantsystem zurückzuführen, wodurch seine Wirkung inhibiert wird (37). Daher ist Daptomycin für die Therapie der Pneumonie bisher nicht zugelassen.

1.3. Das Mausmodell der Pneumokokkenpneumonie

Laut statistischen Analysen der World Health Organisation sind beinahe ein Drittel aller Todesfälle weltweit auf Infektionen mit Erregern wie Plasmodien, *Mycobakterium tuberculosis*, dem humanen Immundefizienz-Virus HIV, sowie Infektionen des unteren Respirationstrakts zurückzuführen. Für ein umfassendes Verständnis der Pathomechanismen von Infektionskrankheiten sowie für die Entwicklung und Austestung wirksamer Therapiestrategien gegen Krankheitserreger bedarf es intensiver, grundlagenorientierter, tierexperimenteller Forschung, da die komplexen zugrunde liegenden Wirt-Erregerinteraktionen nicht in Zellkulturmodellen nachempfunden werden können. Insbesondere die Maus hat sich in der pulmonalen Infektionsforschung als tierexperimentelles Ganztier-Modellsystem durchgesetzt, da die Pathomechanismen einer Pneumonie beim Menschen und bei der Maus weitestgehend ähnlich sind (6, 29, 37). Um die Wirksamkeit neuer antibiotischer Testsubstanzen im Mausmodell der pulmonalen Infektion mit pathogenen Erregern zu evaluieren, bedient man sich bisher konventioneller Methoden, wie insbesondere der Analyse der Keimlast mittels Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (colony forming units, CFU). Zuverlässige Longitudinalanalysen des Krankheitsverlaufs und der Effizienz neuer Antibiotika oder auch Immunisierungsstrategien sind somit bisher mit einem hohen Zeit- und Kostenaufwand verbunden und bedeuten vor allem auch eine hohe Anzahl an Tierversuchen. Somit wären kosteneffizientere und zeitsparende sowie, insbesondere vor ethischem Hintergrund, die erforderliche Tierzahl reduzierende, alternative experimentelle Ansätze für die Infektionsforschung zur Evaluation neuer Therapieformen im Tiermodell wünschenswert.

1.3.1. Biolumineszenz-Imaging in Kleintieren

Das Biolumineszenz-Imaging-Verfahren ist ein innovatives, nicht invasives, bildgebendes Verfahren zur Darstellung von Infektionsabläufen im lebenden Versuchstier unter Echtzeitbedingungen. Der große Nutzen dieses neuen bildgebenden Verfahrens besteht darin, dass es *in-vivo*-Analysen biologischer und pharmakologischer Prozesse über die Zeit in ein und demselben Tier ermöglicht. Die erste Studie, in der mikrobiell erzeugte Lumineszenz in der lebenden Maus detektiert werden konnte, wurde 1995 von Contag *et al.* publiziert (7). In diesen Untersuchungen setzten die Autoren *Salmonella typhimurium* ein, welches mit dem Lux-Operon von *Photobacterium luminescens* transformiert worden war. Diese Untersuchungen legten den Grundstein für eine Vielzahl nachfolgender Infektionsstudien mit biolumineszenten gramnegativen und grampositiven Bakterien (10, 12, 14, 18, 24, 26).

In der vorliegenden Untersuchung wurden mit dem Luziferasesystem von *Photobacterium luminescens* transformierte Pneumokokken eingesetzt. Dieses System bietet den großen Vorteil, dass das Lux-Operon neben den Genen für die Synthese der Luziferase (LuxAB) auch diejenigen Gene enthält, die für die Synthese des Substrats (LuxCDE) erforderlich sind, so dass mit diesem Konstrukt transformierte Bakterien eine endogene Eigenlumineszenz emittieren (self-glowing). Eine exogene Zugabe des Substrats ist somit nicht mehr nötig. In diesem System katalysiert die Luziferase in Gegenwart von Sauerstoff die Oxidation eines reduzierten Flavinmononukleotids (FMNH₂) und eines langkettigen aliphatischen Aldehyds (R-CHO), wobei Energie in Form von Licht freigesetzt wird, welches bei einem Emissionsmaximum von 490 nm detektiert werden kann (14) (Abb. 2A).

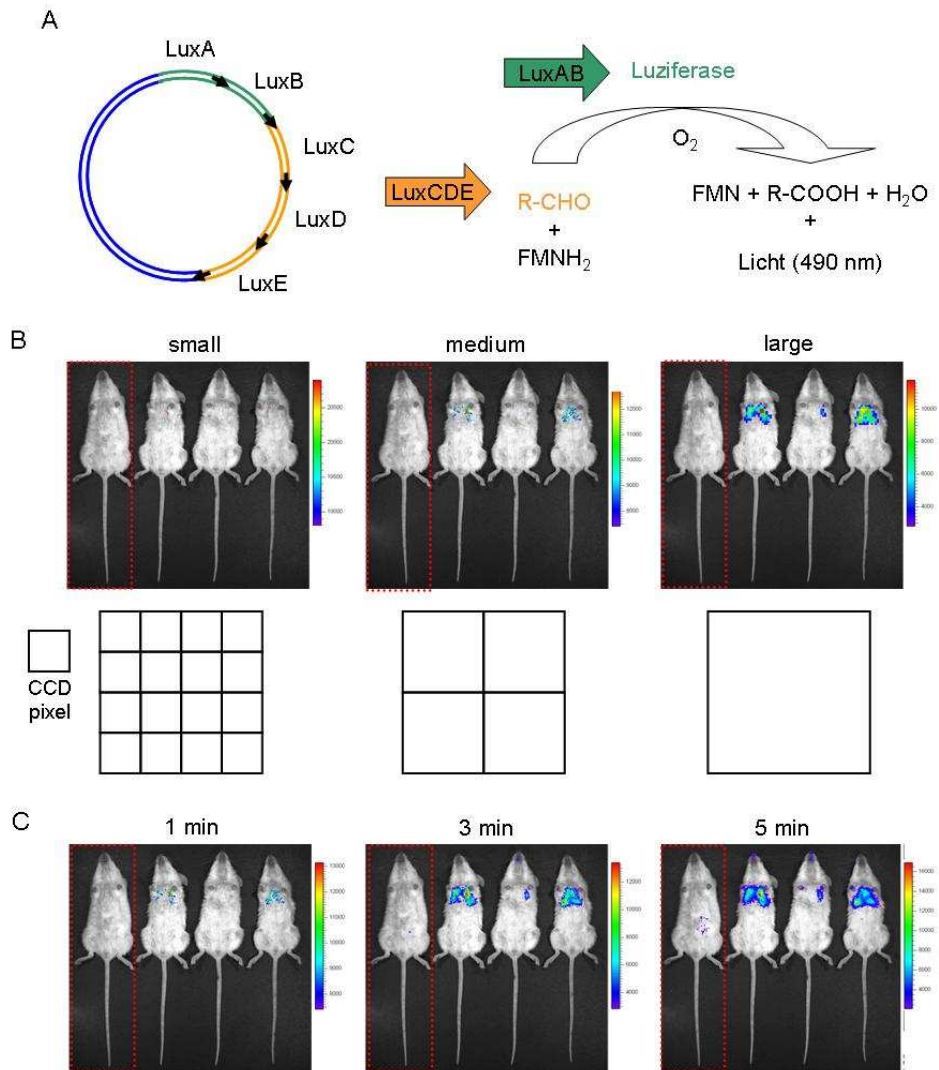


Abb. 2: Messprinzip des Biolumineszenz-Imagings

(A) Schematische Darstellung des Lux-Operons von *Photobacterium luminescens*. Nähere Erläuterung im Text. (B, C) Die Auflösung und Sensitivität des Biolumineszenz-Imagings wird durch das „Binning“ (B) und die Akquisitionszeit (C) beeinflusst. BALB/c-Mäuse wurden mit „self-glowing“ *S. pneumoniae* infiziert und anschließend wurde die Biolumineszenz-Emission der einzelnen Mäuse im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen (rote Umrandung; jeweils links im Bild) mit dem Biolumineszenz-Analysegerät analysiert. Die Umwandlung der Primärdaten erfolgt mit Hilfe der IVIS Living Image® 2.50.1 Software. In den resultierenden Bildern werden die Intensitäten durch eine Farbskala kodiert. Die Farben Rot und Blau repräsentieren die stärksten bzw. schwächsten Lumineszenzsignale. (B) Der Faktor „Binning“ (small-medium-large) erlaubt die Modulation der Pixelgröße der CCD-Kamera, wobei bei konstanter Akquisitionszeit ein kleines „Binning“ eine hohe räumliche Auflösung bei geringer Sensitivität repräsentiert, während ein großes „Binning“ umgekehrt eine geringe räumliche Auflösung bei hoher Sensitivität bedeutet. (C) Das Lumineszenzsignal, gemessen in Photonenemission pro Zeit und Fläche, ist proportional der Akquisitionszeit. Damit erhöht sich mit längerer Akquisitionszeit die Sensitivität des Biolumineszenz-Imagings.

Biolumineszenz-Imaging von Versuchstieren zielt grundsätzlich immer auf die Detektion (und Quantifizierung) der vom Versuchstier emittierten Biolumineszenz ab. Dies wird dadurch erreicht, dass das anästhesierte Versuchstier in eine lichtdichte Kammer positioniert wird, um anschließend die emittierte Biolumineszenz mit einer äußerst lichtempfindlichen Kamera zu detektieren. Bei der verwendeten Kamera handelt es sich um eine charge-coupled device (CCD) Kamera, welche zur Reduktion von Hintergrundrauschen auf -105°C gekühlt ist (36). Die CCD-Kamera ist eine kritische Komponente des Biolumineszenz-Imaging-Verfahrens. Für die Bilderzeugung und Analyse wandelt sie computergesteuert auftreffende Photonen in elektrische Ladungsmuster um. Das resultierende Biolumineszenz-Image besteht aus der Überlagerung eines Fotos des Versuchstieres mit dem Abbild der Biolumineszenz, dessen Signalstärke durch eine Farbskala kodiert ist (siehe Abbildung 2). Hierbei stellt die Farbe Rot das relativ stärkste Lumineszenzsignal dar, während schwache Lumineszenzsignale durch die Farbe Blau repräsentiert werden. Das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte IVIS 200 *in vivo* Imaging System (Xenogen) verfügt darüber hinaus über eine temperierbare Versuchskammer, um die Körpertemperatur der anästhesierten Versuchstiere konstant zu halten. Dieses ist neben dem Wohlergehen der Tiere von großer Bedeutung für die temperaturabhängige, enzymatische Katalyse des Substrats durch die Luziferase (51). Neben dem Einfluss der Einstellungen der CCD-Kamera via Akquisitionszeit und Binning (s. Abbildung 2B, C) wurden in der Literatur bereits eine Vielzahl weiterer Faktoren diskutiert, welche das Biolumineszenz-Imaging beeinflussen können. Hierzu zählen unter anderem das Fell der Versuchstiere sowie insbesondere die Organtopographie des zu analysierenden Gewebes. Als Faustregel gilt hierbei, dass die Photonenintensität pro Zentimeter Gewebetiefe um den Faktor 10 abnimmt. Folglich variiert die Anzahl detektierter Photonen, welche von einer definierten Anzahl an Erregern emittiert wird, in Abhängigkeit von der anatomischen Lage der Erreger (20).

2. Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Durch *Streptococcus pneumoniae* induzierte Infektionen sind trotz der Verfügbarkeit wirksamer Antibiotika und Immunisierungsstrategien noch immer weltweit mit hohen Morbiditäts- und Letalitätsraten assoziiert. Hierbei können Infektionen mit unterschiedlichen Serotypen von *S. pneumoniae* in der Klinik völlig verschiedene Verläufe nehmen. Gerade vor dem Hintergrund der weltweit zunehmenden Antibiotikaresistenzentwicklung bei Pneumokokken ist es notwendig, frühzeitig neue antibiotische sowie auch alternative therapeutische Interventionsmaßnahmen zu entwickeln und in präklinischen Infektionsmodellen zu evaluieren. Dieses zu gewährleisten, setzt jedoch zuverlässige und zugleich möglichst effiziente Methoden zur Analyse des Krankheitsverlaufs im intakten Organismus voraus. Konventionelle Methoden zur Analyse von Krankheitsverläufen in An- und Abwesenheit von Therapeutika gehen bisher mit einem hohen Zeit- und Kostenaufwand sowie mit einer hohen Anzahl an Versuchstieren einher. Ein innovatives und zugleich nicht invasives Analyseverfahren, das Biolumineszenz-Imaging, könnte ein wertvolles Mittel zur Behebung der gegenwärtig existierenden methodischen Limitationen in der Analyse von Krankheitsverläufen im Ganztiermodell darstellen.

Zudem gibt es einen steigenden Bedarf an neuen antibiotischen Substanzen. Daher besteht ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit in der Charakterisierung des Effizienzprofils des neuen Lipopeptid-Antibiotikums Daptomycin im Mausmodell der fokalen Pneumonie im Vergleich zur invasiven Pneumokokkenerkrankung unter Verwendung konventioneller sowie biolumineszenzbasierter Analyseverfahren.

Folgende Fragestellungen wurden in der vorliegenden Arbeit analysiert:

- 1) Welchen Stellenwert besitzt das Biolumineszenz-Imaging zur Evaluation der fokalen versus der invasiven Pneumokokkenpneumonie der Maus?
- 2) Welche Wirksamkeit zeigt Daptomycin im Mausmodell der fokalen versus der invasiven Pneumokokkenpneumonie?

- 3) Eignet sich das Biolumineszenz-Imaging-Verfahren zur Evaluation der Wirksamkeit antibiotischer Substanzen im Mausmodell der fokalen versus der invasiven Pneumokokkenpneumonie?

3. Ergebnisse

3.1. Evaluierung des Biolumineszenz-Imaging-Verfahrens in der fokalen und invasiven Pneumokokkenerkrankung der Maus

Die Biolumineszenz-Imaging Technologie ist ein innovatives Verfahren, welches zum Monitoring von Krankheitsverläufen und zur Charakterisierung von Wirksamkeitsprofilen von Testsubstanzen in lebenden Versuchstieren verwendet wird (10, 14, 26, 30). Bis dato wurde jedoch das Biolumineszenz-Imaging-Verfahren zur Abbildung von Krankheitsverläufen in verschiedenen pulmonalen Infektionsmodellen nicht systematisch evaluiert. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit zwei der am häufigsten zur Analyse von Krankheitsmodellen eingesetzten Mausstämme, C57BL/6 (schwarz) und BALB/c (Albino), mit biolumineszenten Pneumokokken des Serotyps 19 oder des Serotyps 2 infiziert. Serotyp 19 *S. pneumoniae* ist nicht invasiv wachsend und induziert in Mäusen primär eine fokale Pneumonie, entsprechend einer Lobärpneumonie beim Menschen. Hingegen führen pulmonale Infektionen mit Serotyp 2 *S. pneumoniae* im Mausmodell regelhaft zu einer invasiven Pneumokokkenerkrankung. Durch den Einsatz dieser beiden verschiedenen Serotypen soll den unterschiedlichen Verlaufsformen, welche in der Klinik bei Pneumokokkeninfektionen zu beobachten sind, Rechnung getragen werden. Der experimentelle Ansatz dieser Untersuchungen ist in Abbildung 3 illustriert. Dabei wurden die Versuchstiere nach orotrachealer Infektion mit Serotyp 19 oder 2 *S. pneumoniae* (jeweils $1,5 \times 10^7$ CFU/Maus) zunächst einer *in-vivo*-Biolumineszenz-Analyse unterworfen. Unmittelbar auf die *in-vivo*-Analyse folgend wurden die Mäuse euthanasiert und die Lungenlappen einzeln entnommen, um das kumulative Biolumineszenz-Signal der Lungenlappen *ex vivo* zu bestimmen. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung der Lungen zur Bestimmung der Bakterienlast mittels Plattiertechnik. Mit Hilfe der IgorPro Analyse-Software wurden sogenannte ROI's (region of interest) manuell eingezeichnet, um gezielt die in diesen Bereichen gemessenen Signale zu analysieren. Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Gating-Strategie der *in vivo* und *ex vivo* analysierten Lungen ist in Abbildung 1 der Anlage 1 dargestellt. Um das Biolumineszenz-Imaging als Methode zur Abschätzung von Keimlasten und Krankheitsverläufen bei fokaler Pneumonie oder septischer Pneumokokkenerkrankung zu bewerten, erfolgte anschließend eine Korrelationsanalyse der

Biolumineszenz-Daten mit den ermittelten Keimlasten der entsprechenden Lungen.

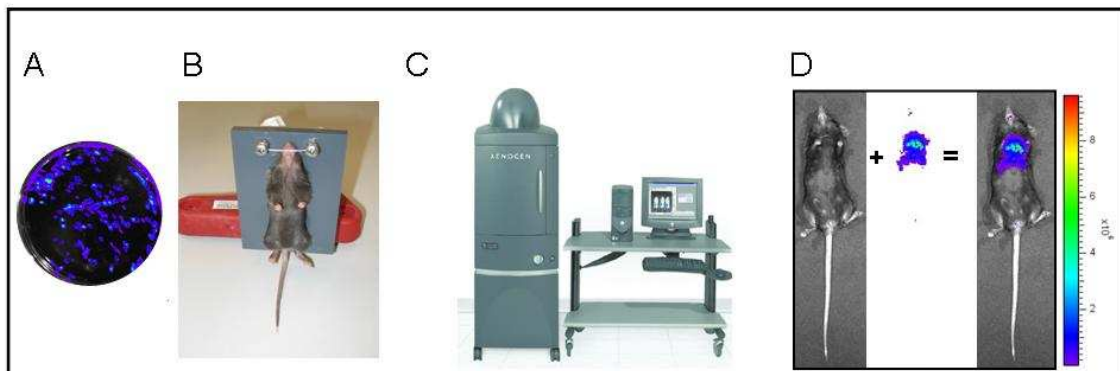


Abb. 3: Experimenteller Ansatz zur Analyse *S. pneumoniae*-induzierter Infektionen mit Hilfe des Biolumineszenz-Imaging-Verfahrens

(A) zeigt das Biolumineszenz-Image einer Schafblutagarplatte mit darauf wachsenden biolumineszenten *S. pneumoniae*-Kolonien. (B) Die orotracheale Infektion der Versuchstiere mit biolumineszenten Pneumokokkenstämmen ($1,5 \times 10^7$ CFU/Maus) erfolgte in vertikaler Positionierung. (C,D) Von den anästhesierten Versuchstieren wurde mittels des *in vivo* Imaging Systems (Xenogen) ein Foto aufgenommen sowie ein Abbild der Lumineszenz erstellt, welche anschließend zu einem „Overlay“ zusammengefügt wurden. Für weitere Details siehe Anlage 1.

3.1.1. Stellenwert des Biolumineszenz-Imaging-Verfahrens zur Analyse der fokalen Pneumokokkenpneumonie der Maus

Zunächst wurde der Einsatz des Biolumineszenz-Imaging-Verfahrens zur Analyse der fokalen Pneumokokkenpneumonie in C57BL/6-Mäusen charakterisiert. Wie Abbildungen 4 A,B und 5 A,B (Abb. 2 und S1 der Anlage 1) zeigen, war bis zu 2 Tage nach Infektion bei mehr als 50 % der *in vivo* analysierten Mauslungen nur ein ausgesprochen geringes ($< 5 \times 10^2$ p/s/cm²/sr) oder aber kein Biolumineszenz-Signal zu detektieren. Dieses illustriert zugleich die Limitation des *in-vivo*-Biolumineszenz-Imaging-Verfahrens. Im Gegensatz hierzu zeigten die *ex vivo* analysierten Lungen der gleichen Mäuse deutlich höhere Biolumineszenz-Signale (Abb. 4 A, B; Abb. S1 der Anlage 1). Gleichzeitig korrelierten die *ex-vivo*-Photonenemissionen mit den Erregerlasten besser als die *in-vivo*-Photonenemissionen der entsprechenden Mäuse (Abb. 5; Abb. 2 der Anlage 1). Wie in Abbildung 4C illustriert, ließ sich in *S. pneumoniae*-infizierten C57BL/6-Mäusen insbesondere an Tag 3 eine schwere Progression der Pneumonie anhand der

Zunahme des *in-vivo*-Biolumineszenz-Signals eindeutig darstellen (Abb. 4C im Vergleich zu 4A, B). In diesem fortgeschrittenen Stadium ergab sich zudem eine deutlich bessere Korrelation der *in-vivo*-Biolumineszenz mit den Bakterienlasten der Lunge ($r=0,92$) als an Tag 1 und 2 nach Infektion (Abb. 5C; Abb. 2 der Anlage 1).

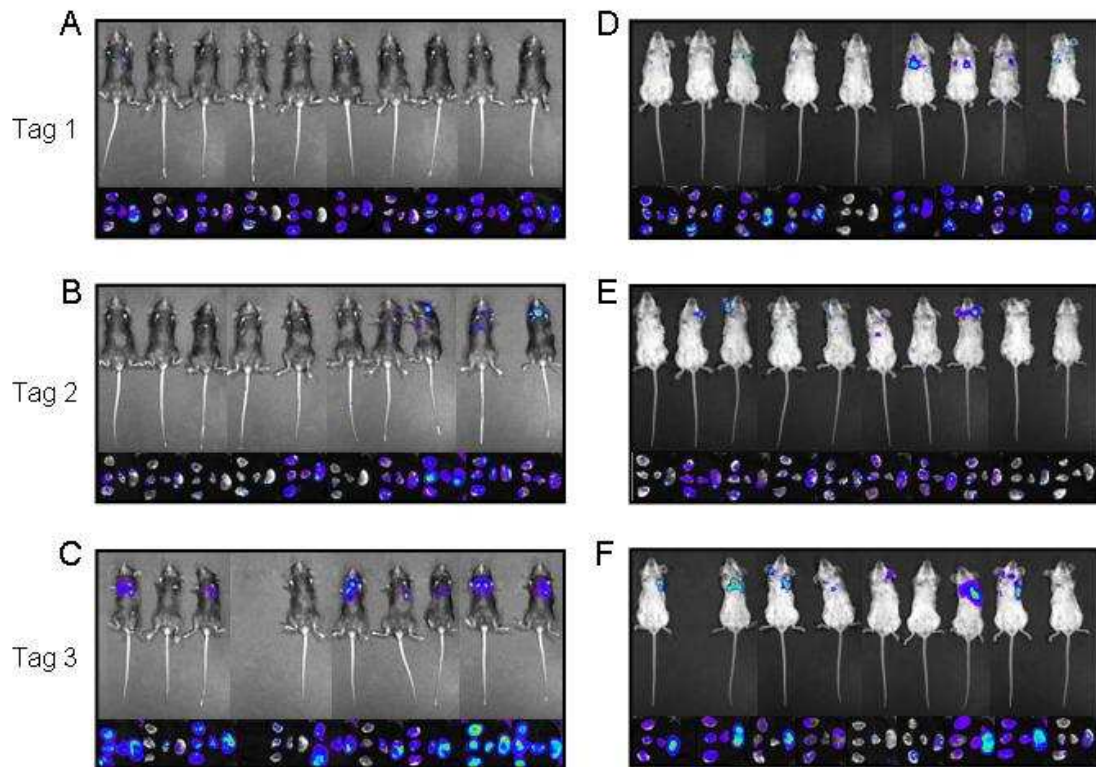


Abb. 4: Biolumineszenz-Imaging der fokalen Pneumonie der Maus

C57BL/6- (A-C) und BALB/c-Mäuse (D-F) wurden mit biolumineszenten Serotyp 19 *S. pneumoniae* ($1,5 \times 10^7$ CFU/Maus) orotracheal infiziert. Gezeigt wird die Biolumineszenz-Analyse infizierter, anästhesierter Mäuse (oberer Teil der jeweiligen Abbildungen) sowie die *ex-vivo*-Biolumineszenz-Analyse einzelner Lungenlappen der entsprechenden Mäuse (unterer Teil der entsprechenden Abbildungen).

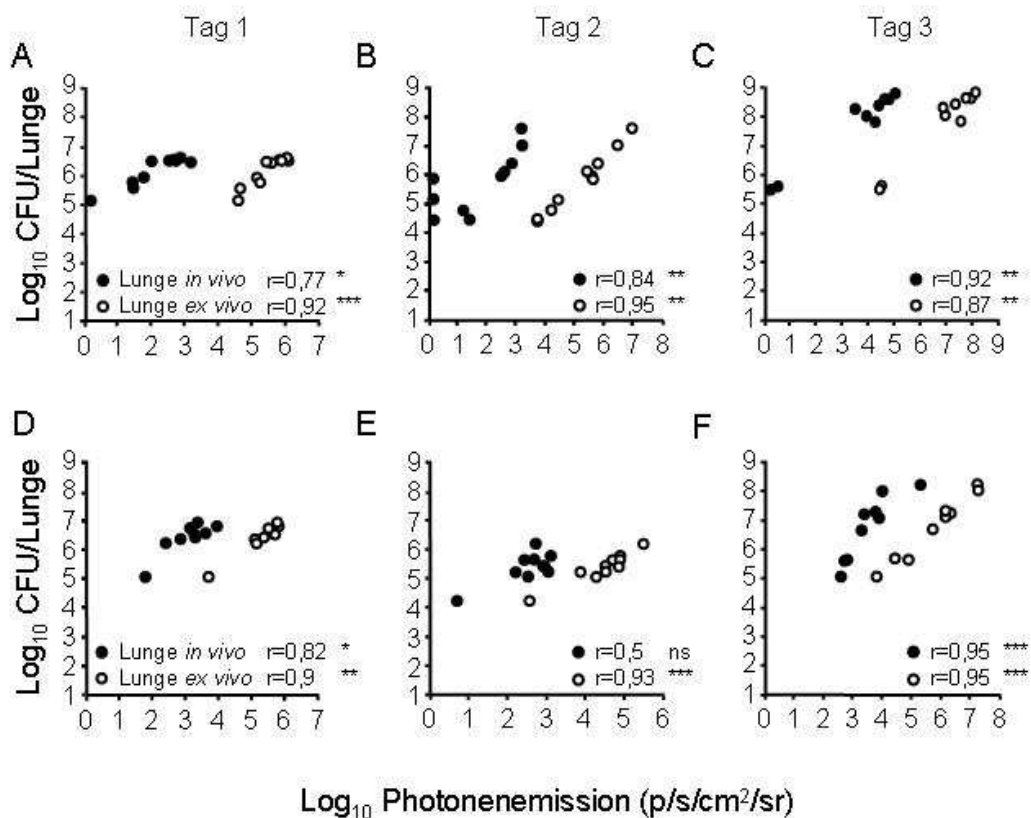


Abb. 5: Biolumineszenz-Analyse der Progression der fokalen Pneumonie in C57BL/6- und BALB/c-Mäusen

Korrelation zwischen Biolumineszenz und CFU der Lunge von C57BL/6- (A-C) und BALB/c-Mäusen (D-F) an Tag 1 bis 3 nach orotrachealer Infektion mit *S. pneumoniae* (Serotyp 19; $1,5 \times 10^7$ CFU/Maus). Dargestellt ist die Korrelation zwischen Bakterienlast der Lunge und der Photonenemission *in vivo* (schwarze Punkte) sowie der Bakterienlast mit der Photonenemission *ex vivo* analysierter Lungenlappen (weiße Punkte). Für weitere Details siehe Anlage 1.

Insgesamt ergaben die Biolumineszenz-Analysen der fokalen Pneumonie in C57BL/6-Mäusen, dass die Photonenemissionen *ex vivo* analysierter Lungen im Vergleich zu *in vivo* analysierten Lungen deutlich höher (10^3 - bis 10^4 -fach) lagen. Des Weiteren deuten die Analysen darauf hin, dass sich weniger als 10^6 Keime des Serotyps 19 in der Lunge der C57BL/6-Mäuse durch das Biolumineszenz-Imaging nicht zuverlässig abbilden lassen.

In der Literatur wurden bereits die Hautpigmentierung und Fellfarbe von Versuchstieren als Faktoren identifiziert, welche das Biolumineszenz-Imaging beeinträchtigen können (9, 20). Daher wurde in der vorliegenden Untersuchung der Verlauf der fokalen Pneumonie mittels des Biolumineszenz-Imaging-Verfahrens nicht nur in C57BL/6-Mäusen (schwarz), sondern auch in BALB/c-Mäusen (Albino) analysiert (Abb. 4 und 5; Abb. 2 und S1 der Anlage 1). Bereits

einen Tag nach Infektion von BALB/c-Mäusen mit Serotyp 19 *S. pneumoniae* konnte die Biolumineszenz-Analyse bei einem Großteil der analysierten Mäuse das Vorliegen einer fokalen Pneumonie anzeigen (Abb. 4D; Abb. S1 der Anlage 1). Darüber hinaus ließen sich in BALB/c-Mäusen an Tag 1 und 3 nach Infektion mit Serotyp 19 *S. pneumoniae* hervorragende Korrelationen zwischen der Biolumineszenz- und der konventionellen CFU-Analyse darstellen. An Tag 2 nach Infektion ergab sich hingegen eine nicht signifikante Korrelation zwischen *in-vivo*-Photonenemission und Bakterienlast der Lunge, welche möglicherweise auf die hier beobachtete sehr gleichmäßige Verteilung der Photonemission versus Keimzahlen zurückzuführen ist (Abb. 5D-F; Abb. 2 der Anlage 1). An Tag 3 zeigten sich große interindividuelle Variabilitäten in Keimlast und Biolumineszenz-Signal der Mäuse. Dieses deutet darauf hin, dass Mäuse individuelle Infektionsverläufe aufweisen. Insgesamt waren auch in BALB/c-Mäusen erwartungsgemäß höhere *ex-vivo*- als *in-vivo*-Biolumineszenz-Signale der entsprechenden Lungen über den gesamten Untersuchungszeitraum detektierbar. Ähnlich wie für C57BL/6-Mäuse dargestellt, zeigten sich auch hier um hundert- bis tausendfach höhere Photonemissionen in *ex vivo* analysierten im Vergleich zu *in vivo* analysierten Mauslungen (Abb. 5D-F; Abb. 2 der Anlage 1).

Die Untersuchungen ergaben, dass die Biolumineszenz-Analyse in BALB/c-Mäusen in einem frühen Stadium der fokalen Pneumonie (Tag 1 nach Infektion) geringfügig sensitiver war als in C57BL/6-Mäusen. Insgesamt zeigen die vergleichenden Biolumineszenz-Analysen in C57BL/6- und BALB/c-Mäusen jedoch, dass der eingesetzte Mausstamm die Leistungsfähigkeit des Biolumineszenz-Imaging-Verfahrens in der Analyse der fokalen Pneumonie nicht wesentlich beeinflusst.

3.1.2. Stellenwert des Biolumineszenz-Imaging-Verfahrens zur Analyse der invasiven Pneumokokkenerkrankung der Maus

Verschiedene *S. pneumoniae*-Serotypen weisen zum Teil stark unterschiedliche Virulenzprofile auf, und auch der klinische Verlauf einer Pneumokokkenerkrankung kann in Abhängigkeit vom Serotyp stark variieren. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit analog zur fokalen Pneumonie analysiert, welchen Stellenwert das Biolumineszenz-Imaging für die Verlaufsanalyse invasiver Pneumokokkenerkrankungen in C57BL/6- versus

BALB/c-Mäusen hat. Die Abbildung 6 (Abbildung S2 der Anlage 1) illustriert den Verlauf einer durch Serotyp 2 *S. pneumoniae* induzierten invasiven Pneumokokkenerkrankung an den Tagen 1, 2 und 3 nach Infektion in C57BL/6-Mäusen (Abb. 6A-C) versus BALB/c-Mäusen (Abb. 6D-F).

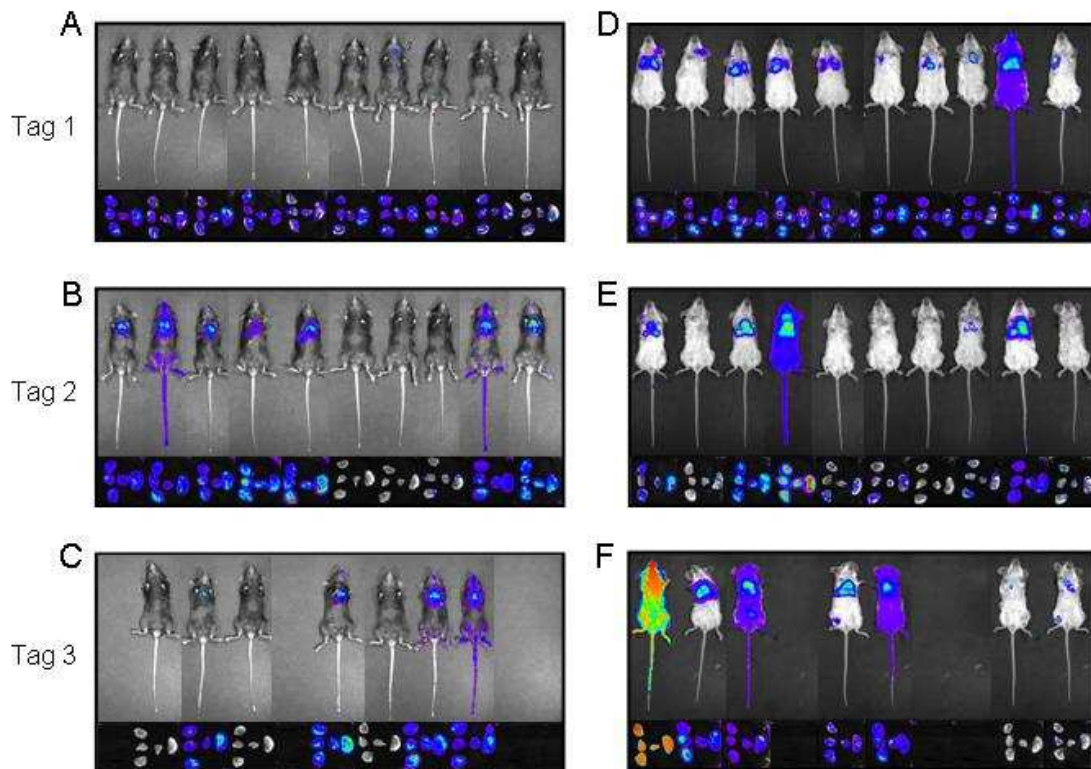


Abb. 6: Verlaufsanalyse der invasiven Pneumokokkenerkrankung durch das Biolumineszenz-Imaging

Analyse der *in-vivo*-Biolumineszenz der Lungen (oben) und nachfolgende Analyse der isolierten Lungenlappen *ex vivo* (unten) an Tag 1, 2 und 3 nach Infektion von C57BL/6- (A-C) und BALB/c-Mäusen (D-F) mit einem biolumineszenten Pneumokokkenstamm des invasiv wachsenden Serotyp 2 *S. pneumoniae*.

Während in C57BL/6-Mäusen an Tag 1 nach Infektion mit dem Serotyp 2 *S. pneumoniae* wenig Biolumineszenz-Signal detektierbar war, wiesen Mäuse an Tag 2 bereits in 70 % der Fälle (7 von insgesamt 10 Mäusen) eine deutliche thorakale Biolumineszenz-Emission auf. Die thorakale Biolumineszenz-Emission zeigte sich sowohl als Zeichen einer floriden Pneumonie als auch einer invasiven Pneumokokkenerkrankung, welche sich leicht anhand der über den gesamten Körper der Maus detektierbaren Biolumineszenz-Signale erkennen lässt (siehe Abbildung 6B 2. und 9. Maus von links). Im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen zeigten

BALB/c-Mäuse nach Infektion mit Serotyp 2 *S. pneumoniae* bereits an Tag 1 in allen analysierten Fällen eine deutliche thorakale Biolumineszenz-Emission beziehungsweise eine Biolumineszenz-Emission über den gesamten Körper der Maus (Abbildung 6D 2. Maus von rechts) mit einem progredienten Verlauf an Tag 2 und an Tag 3 nach Infektion. Die Photonenemissionen *ex vivo* analysierter Lungen waren an Tag 1 nach Infektion mit Serotyp 2 *S. pneumoniae* bei C57BL/6- und BALB/c-Mäusen gleichermaßen deutlich höher (bis zu 10^4 -fach) im Vergleich zur *in-vivo*-Biolumineszenz-Analyse (Abb. 7A und D; Abb. 3 der Anlage 1). An Tag 2 und 3 nach Infektion waren die *ex vivo* versus *in vivo* detektierten Photonenemissionen in beiden Gruppen nur noch um das 10- bis 100-fache erhöht (Abb. 7B,C und E, F; Abb. 3 in der Anlage 1). Gleichzeitig korrelierten die *in-vivo*-Photonenemissionen zu diesen Zeitpunkten sehr gut mit den Bakterienlasten der Lunge.

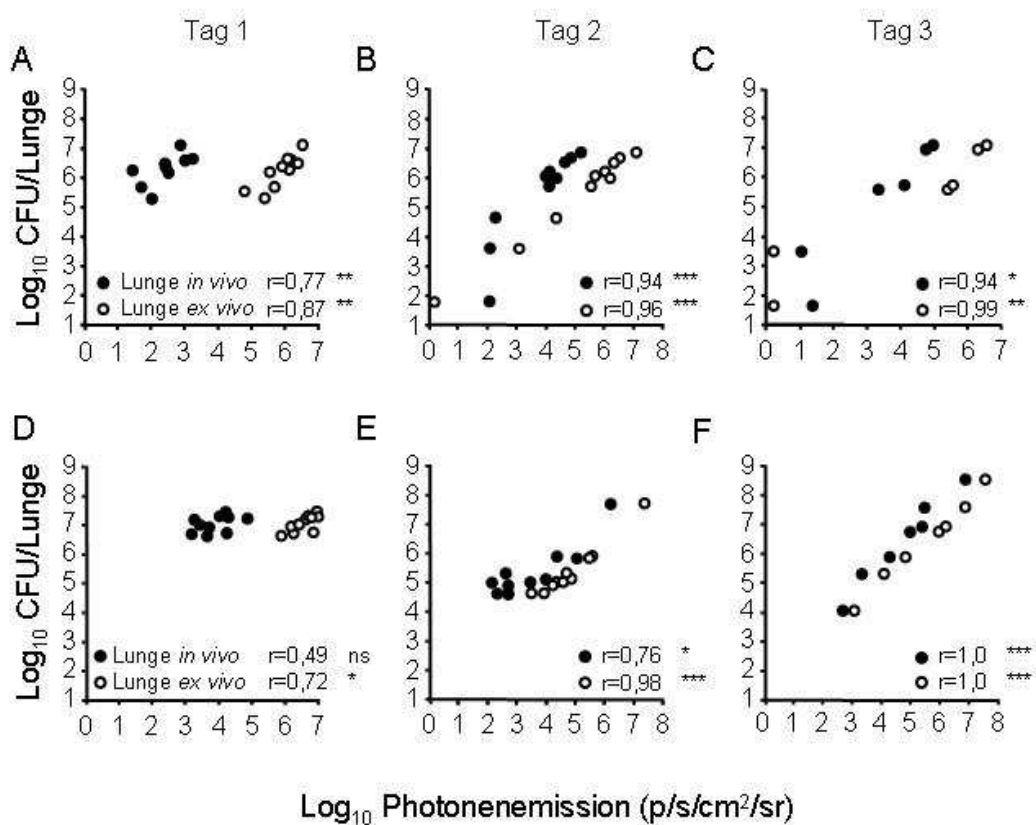


Abb. 7: Biolumineszenz-Analyse der invasiven Pneumokokkenenerkrankung in C57BL/6- und BALB/c-Mäusen

Korrelation der Bakterienlast der Lunge mit der *in-vivo*-Photonenemission der Lunge (schwarze Punkte) sowie der Erregerlast mit der Photonenemission *ex vivo* analysierter Lungenlappen (weiße Punkte) nach Infektion von C57BL/6- (A-C) und BALB/c-Mäusen (D-F) mit Serotyp 2 *S. pneumoniae*.

Zusammengefasst zeigen diese Untersuchungen, dass sich das Biolumineszenz-Imaging-Verfahren zur Verlaufskontrolle invasiver Pneumokokken-erkrankungen in der Maus gut eignet.

Die Verläufe der Infektionen mit den in dieser Arbeit eingesetzten Pneumokokken-serotypen 19 und 2 unterscheiden sich maßgeblich darin, dass es bei der Infektion mit Serotyp 19 *S. pneumoniae* primär zu einem Auswachsen der Erregerlast in dem bronchoalveolären Kompartiment und im Parenchym der Lunge kommt, während Serotyp 2 *S. pneumoniae* in Folge der Pneumonie regelhaft in die Blutbahn gelangt. Weiterführende Untersuchungen hatten daher zum Ziel, zu evaluieren, in welchem Umfang die Lokalisation der Erreger im Alveolarraum versus pulmonalen Kapillarnetz das Biolumineszenz-Imaging der Lunge beeinflusst. Hierfür wurden Lungen von Mäusen, die mit Serotyp 2 *S. pneumoniae* infiziert worden waren, unmittelbar vor dem *ex-vivo*-Biolumineszenz-Imaging unterschiedlichen Behandlungen unterzogen. Um den Einfluss der Erregerlast im bronchoalveolären Kompartiment auf das Biolumineszenz-Imaging der Lunge zu analysieren, wurden die Lungen *in situ* einer bronchoalveolären Lavage unterworfen und anschließend die kumulative Photonenemission der Lungenlappen bestimmt. Um den Einfluss der Bakteriämie, d.h. der Erregerlast im Kapillarnetz der Lunge auf das Biolumineszenz-Imaging zu evaluieren, wurden die Lungen vor der Biolumineszenz-Analyse perfundiert. Dabei wurden nur Versuchstiere in die Untersuchung eingeschlossen, die eine hochgradige Bakteriämie aufwiesen. Interessanterweise zeigten perfundierte Lungen im Vergleich zu unbehandelten Lungen deutlich niedrigere Photonenemissionen (2×10^4 versus 3×10^5 p/s/cm²/sr) (Abb. 8; Abb. 4 der Anlage 1). Hingegen zeigten lavagierte Lungen nur geringfügig reduzierte Photonenemissionen gegenüber unbehandelten Lungen.

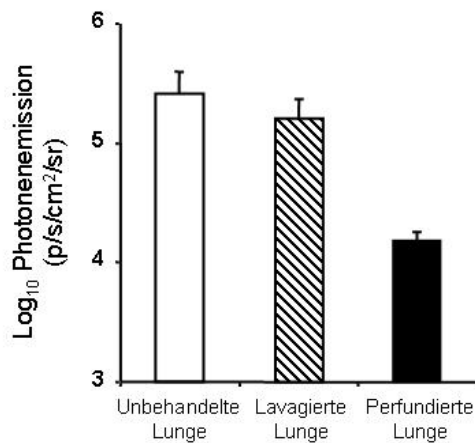


Abb. 8: Einfluss der Bakteriämie auf das Biolumineszenz-Imaging der Lunge

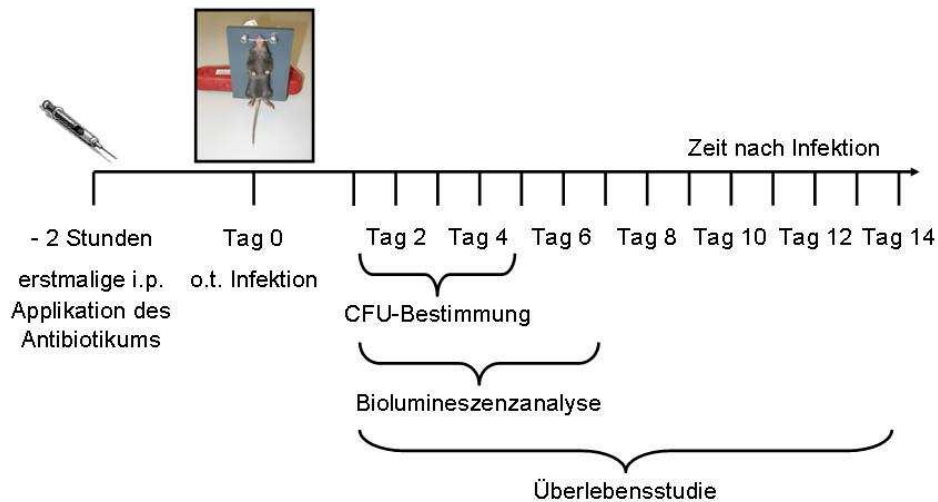
Dargestellt sind die Photonemissionen nicht behandelter Lungen im Vergleich zu unmittelbar vor der Biolumineszenz-Analyse lavagierter oder perfundierter Lungen bei nachgewiesener Bakteriämie 3 Tage nach Infektion mit dem invasiven Serotyp 2 *S. pneumoniae*.

Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass ein erheblicher Anteil der Photonemission der Lungen nach Infektion mit Serotyp 2 *S. pneumoniae* von Pathogenen im Kapillarsystem der Lunge ausgeht, hingegen Erreger im bronchoalveolären Kompartiment nicht wesentlich zum Gesamt-Biolumineszenz-Signal der Lunge beitragen. Diese Untersuchungen geben einen deutlichen Hinweis darauf, dass der Stellenwert des Biolumineszenz-Imaging-Verfahrens zur Abschätzung von Keimlasten in der Maus maßgeblich vom Virulenzprofil des verwendeten Erregers beeinflusst wird.

3.2. Wirksamkeitsprofil des Lipopeptid-Antibiotikums Daptomycin im Mausmodell der fokalen und invasiven Pneumokokkenerkrankung

Wie die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten zeigen, spielt der verwendete Mausstamm für das *in-vivo*-Biolumineszenz-Imaging bakterieller Infektionen der Lunge keine entscheidende Rolle, weswegen in den nunmehr folgenden Untersuchungen der Standard-Labormausstamm C57BL/6 verwendet wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde das Wirksamkeitsprofil von Daptomycin sowohl im Modell der fokalen wie auch im Modell der invasiven Pneumokokkenpneumonie charakterisiert. Als Vergleichssubstanz diente das β -Laktam-Antibiotikum Ceftriaxon (20 mg/kg), welches auch klinisch zur Behandlung der Pneumokokkenpneumonie eingesetzt wird. Die Untersuchungen wurden zum einen unter semitherapeutischen Konditionen (Applikation des Antibiotikums unmittelbar vor Infektion) sowie im Fall der invasiven Pneumokokkenerkrankung zusätzlich auch unter therapeutischen Konditionen (Beginn der Antibiotika-Behandlung an Tag 2 nach Infektion) durchgeführt (Abbildung 9).

A semitherapeutisches Behandlungsregime



B therapeutisches Behandlungsregime

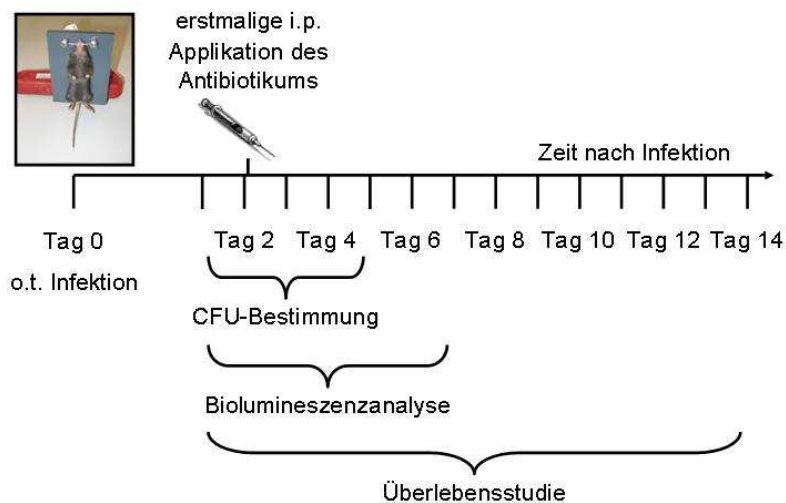


Abb. 9: Illustration des Versuchsablaufs zur Evaluation des Antibiotikums Daptomycin in der pulmonalen *S. pneumoniae*-Infektion der Maus

(A) Semitherapeutisches Behandlungsregime: Die erste intraperitoneale Applikation des Antibiotikums Daptomycin (6 mg/kg) oder Ceftriaxon (20 mg/kg) oder Plazebo (NaCl) erfolgte kurz vor orotrachealer Infektion der Versuchstiere mit *S. pneumoniae*. (B) Therapeutisches Behandlungsregime: Mäuse wurden mit *S. pneumoniae* infiziert und erhielten 2 Tage nach Infektion 1x täglich eine intraperitoneale Applikation von Daptomycin, Ceftriaxon oder Plazebo. (A,B) Zur Bewertung der Antibiotika-Effizienzen wurden Biolumineszenz-Analysen sowie Keimlastbestimmungen und Überlebensstudien durchgeführt.

3.2.1. Effizienz von Daptomycin zur Therapie der fokalen Pneumokokkenpneumonie der Maus

Zunächst erfolgte die Evaluation der antibakteriellen Wirksamkeit von Daptomycin unter semitherapeutischen Therapiebedingungen im Mausmodell der fokalen Pneumonie, welche in Mäusen durch Serotyp 19 *S. pneumoniae* induziert wurde. Wie Abb. 10A (Abb. 4 der Anlage 2) zeigt, führt eine Infektion der Maus mit Serotyp 19 *S. pneumoniae* bei $1,5 \times 10^7$ CFU/Maus zu einer Mortalität von ca. 80 % (Plazebogruppe). Die semitherapeutische Applikation von Daptomycin führte mit einer Mortalitätsrate von 60 % zu keinem signifikant verbesserten Überleben der Mäuse gegenüber der Plazebogruppe. Die Behandlung der fokalen Pneumonie mit der antibiotischen Vergleichssubstanz Ceftriaxon resultierte hingegen in einem 100 %igen Überleben der Mäuse (Abb. 10A; Abb. 4 der Anlage 2).

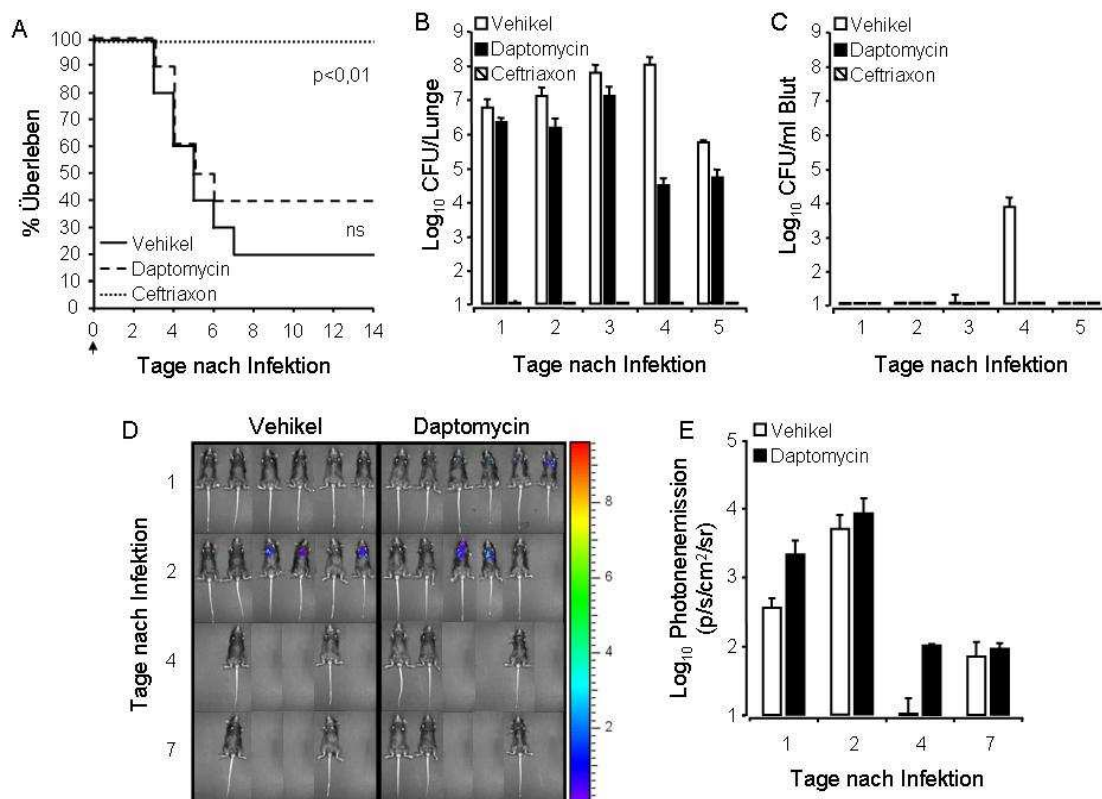


Abb. 10: Wirksamkeit von Daptomycin in der fokalen Pneumokokkenpneumonie

(A) Einfluss einer semitherapeutischen Behandlung einer Pneumokokkenpneumonie (induziert durch Serotyp 19 *S. pneumoniae*) mit Daptomycin oder Ceftriaxon auf das Überleben. (B,C) Bakterienlast in der Lunge (B) und im Blut (C) in An- und Abwesenheit von Daptomycin versus Ceftriaxon. (D) Biolumineszenz-Analyse der fokalen Pneumonie bei Plazebogruppe (links) im Vergleich zur Daptomycin-Therapie (rechts). (E) Quantifizierung der Photonenemission der Lunge nach Infektion mit biolumineszenterem *S. pneumoniae* in An- und Abwesenheit von Daptomycin.

Abbildung 10B (Tabelle 5 der Anlage 2) zeigt, dass die Behandlung Pneumokokken-infizierter Mäuse mit Ceftriaxon die pulmonale Erregerlast innerhalb von 24 Stunden unter die Nachweisgrenze senkte. Bei mit Daptomycin therapierten Mäusen ließen sich hingegen auch 5 Tage nach Infektion noch erhebliche Erregerlasten in der Lunge nachweisen, so dass für Daptomycin in diesem Kompartiment keine ausreichende Wirksamkeit gezeigt werden konnte (Abb. 10B; Tabelle 5 der Anlage 2). Gleichzeitig zeigen diese Ergebnisse klar, dass eine effiziente Erregerelimination im alveolären Kompartiment und Lungenparenchym von großer klinischer Relevanz für das Überleben einer fokalen Pneumonie ist. Passend zu früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Infektionen mit Serotyp 19 *S. pneumoniae* keine oder nur eine gering ausgeprägte Bakteriämie in Mäusen in Abwesenheit antibiotischer Therapie induzierte (Abb. 10C, Tabelle 5 der Anlage 2).

In einem weiteren experimentellen Ansatz wurde evaluiert, welchen Stellenwert das Biolumineszenz-Imaging-Verfahren im Vergleich zu den bereits vorgestellten Überlebensstudien und CFU-Bestimmungen hinsichtlich der Bewertung der Effizienz von Daptomycin zur Therapie der Pneumokokkenpneumonie hat. Wie Abb. 10D zeigt, ergab auch die Biolumineszenz-Analyse, dass die Therapie der fokalen Pneumonie mit Daptomycin keinen entscheidenden Überlebensvorteil bringt (66 versus 50 %, Plazebo versus Daptomycin). Darüber hinaus zeigte sich bei quantitativer Analyse der Photonenemissionen der in Abb. 10D analysierten Mauslungen der Plazebo-Gruppe bzw. Daptomycin-Gruppe gleichermaßen ein Anstieg der Photonenemissionen von Tag 1 zu Tag 2 nach Infektion (Abb. 10E), welches also auch in der Biolumineszenz-Analyse darauf hindeutet, dass die pulmonale Pneumokokkeninfektion der Maus durch Behandlung mit Daptomycin nicht suffizient zu therapieren ist.

Insgesamt lässt sich durch die CFU-Analyse und das Biolumineszenz-Imaging gleichermaßen darstellen, dass es im Modell der fokalen Pneumonie trotz semitherapeutischer Applikation von Daptomycin zu einem Auswachsen der Erreger in den Lungen der Mäuse kommt.

3.2.2. Effizienz von Daptomycin zur Therapie der invasiven Pneumokokken-erkrankung der Maus

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob Daptomycin trotz seiner insuffizienten Wirksamkeit in der Lunge dennoch bei Infektion des Wirtes mit einem invasiv wachsenden Pneumokokkenstamm die Entwicklung einer Sepsis verhindern kann. Hierfür wurde zunächst analog zum Modell der fokalen Pneumonie im semitherapeutischen Behandlungsregime (siehe Abb. 10) kurz vor der Infektion der Maus mit Serotyp 2 *S. pneumoniae* ($1,5 \times 10^7$ CFU/Maus) mit der Daptomycin-Therapie begonnen und anschließend das Überleben und die Erregerlast in Lunge und Blut analysiert (Abb. 11).

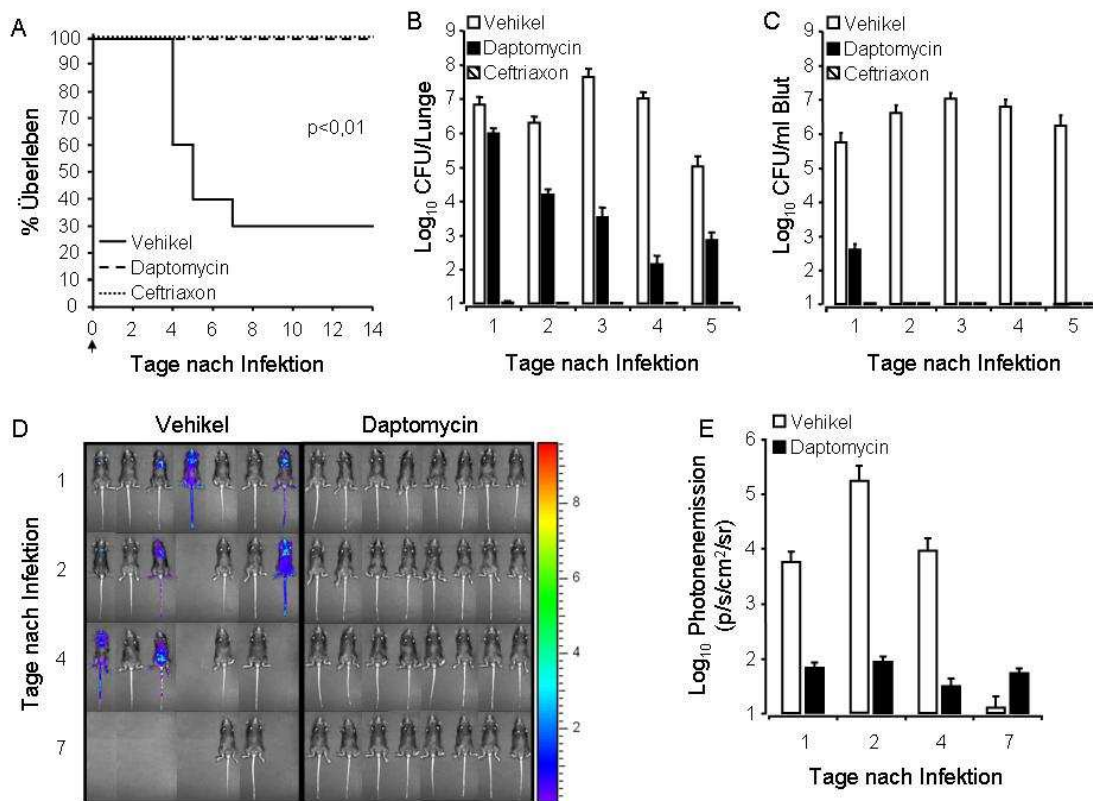


Abb. 11: Effizienz von Daptomycin in der Therapie der invasiven Pneumokokkenpneumonie im semitherapeutischen Behandlungsregime

(A) Überleben einer invasiven Pneumokokken-erkrankung der Maus unter Daptomycin- versus Ceftriaxon-Therapie (semitherapeutisch). (B,C) Erregerelimination in der Lunge (B) und im Blut (C) unter Antibiotika-Therapie. (D) Biolumineszenz-Analyse der invasiven Pneumokokken-erkrankung bei Placebo-Applikation (links) im Vergleich zur Daptomycin-Therapie (rechts). (E) Analyse der *in-vivo*-Photonenemission von Mauslungen nach Infektion mit Serotyp 2 *S. pneumoniae* in An- oder Abwesenheit von Daptomycin.

In diesem Modell der invasiven Pneumokokkeninfektion zeigten Plazebo-behandelte Mäuse eine Mortalität von 70 % (Abb. 11A; Abb. 2 der Anlage 2), welcher ein rapides Auswachsen der Erreger in Lunge und Blut vorausging (Abb. 11B, C; Tabelle 2 der Anlage 2). Im Gegensatz hierzu konnte durch die semitherapeutische Behandlung mit Daptomycin oder mit Ceftriaxon ein Überleben aller Versuchstiere erreicht werden (Abb. 11A; Abb. 2 der Anlage 2). Es fiel jedoch auf, dass die Applikation von Ceftriaxon innerhalb eines Tages zu einer vollständigen pulmonalen Erregerelimination führte, während unter Daptomycin-Applikation auch 5 Tage nach Infektion noch Erreger in der Lunge nachweisbar waren. Im Vergleich zur Plazebo-Gruppe war die Erregerlast bei Daptomycin-Therapie jedoch deutlich reduziert (Abb. 11B; Tabelle 2 der Anlage 2). Die Analyse der Keimlasten im Blut (Abb. 11C) sowie in Milz und Leber (Tabelle 2 der Anlage 2) zeigen zugleich eindrucksvoll, dass die Sepsiskomponente einer invasiven Pneumokokkenerkrankung der Maus mit Daptomycin vergleichbar effektiv wie mit Ceftriaxon beherrscht werden konnte. Die in den Überlebensstudien nachgewiesene Effektivität des Daptomycins in der Behandlung der invasiven Pneumokokkenerkrankung ließ sich korrespondierend auch mittels Biolumineszenz-Analyse bestätigen (Abb. 11D). Die Biolumineszenz-Quantifizierung ergab über den gesamten Beobachtungszeitraum niedrigere Photonenemissionen der Daptomycin-behandelten Mäuse, passend zu generell ebenfalls niedrigeren Keimlasten in dieser Behandlungsgruppe gegenüber Plazebo-behandelten Mäusen (Abb. 11B,E). Hierbei erreichten die Photonenemissionen der Lungen jedoch bereits an Tag 1 nach Daptomycin-Behandlung Basalniveau (10^1 bis 10^2 p/s/cm²/sr), während die CFU-Analyse zeigt, dass die Bakterienlasten in der Lunge unter Daptomycin-Therapie sukzessiv von Tag 1 bis Tag 4 abnahm. Insgesamt reichte somit die Sensitivität des Biolumineszenz-Imaging-Verfahrens hier nicht aus, um die langsame Kinetik der Erregerelimination in der Lunge der Daptomycin-behandelten Mäuse präzise widerzuspiegeln (vergleiche Abb. 11B und E an Tag 1 bis 4 post Infektion).

Nachfolgende Experimente hatten zum Ziel, die therapeutische und damit auch klinische Relevanz von Daptomycin zur Therapie der invasiven Pneumokokkenerkrankung zu evaluieren. Zu diesem Zweck wurden Mäuse mit Serotyp 2 *S. pneumoniae* infiziert und anschließend ab Tag 2 nach Infektion mit Daptomycin, Ceftriaxon oder Plazebo therapiert (therapeutisches Behandlungsregime). Auch in

diesem klinisch relevanten Therapiemodell führte die Daptomycin-Therapie vergleichbar zu Ceftriaxon zu einem signifikant verbesserten Überleben der Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 12 A; Abb. 3 der Anlage 2).

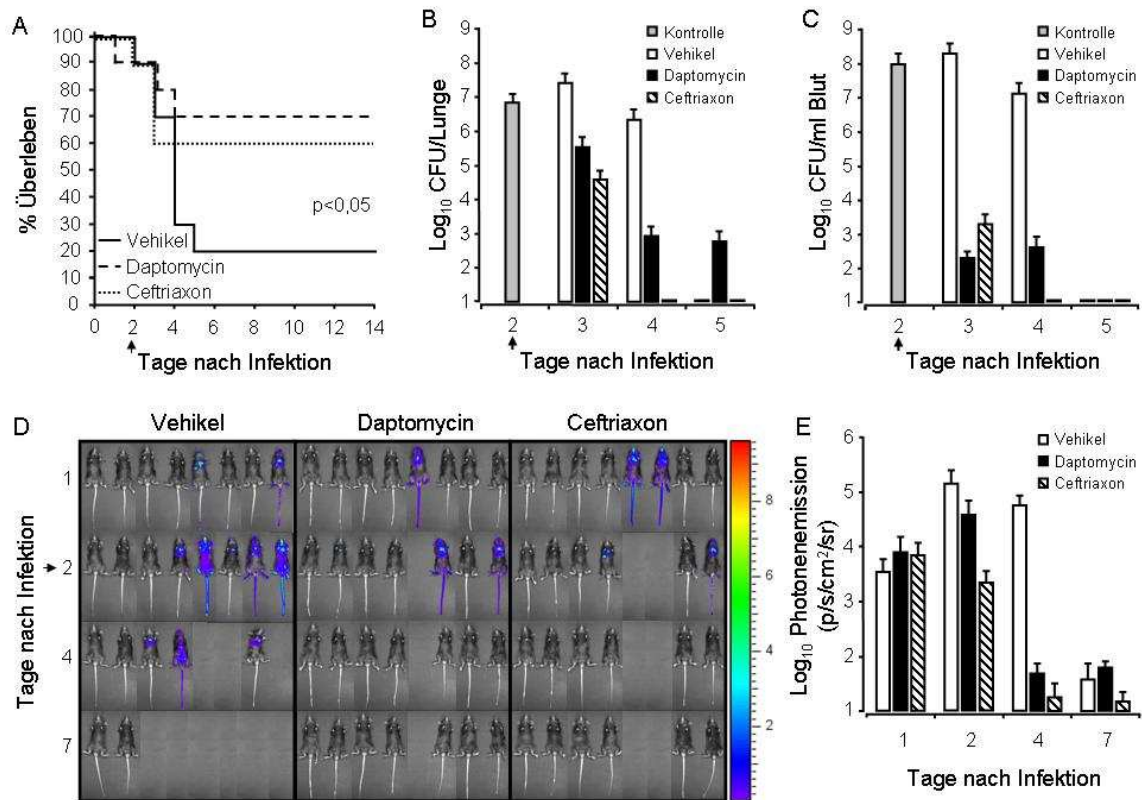


Abb. 12: Effizienz von Daptomycin zur Therapie der invasiven Pneumokokkenpneumonie im therapeutischen Behandlungsregime

(A) Effekt der therapeutischen Daptomycin- versus Ceftriaxon-Behandlung auf das Überleben im Modell der invasiven Pneumokokkenerkrankung (induziert durch Serotyp 2 *S. pneumoniae*). (B,C) Erregerlast in der Lunge (B) und im Blut (C) vor Behandlung (Kontrolle) sowie nach Beginn der therapeutischen Antibiotika-Applikation an Tag 2 nach Infektion. (D) Biolumineszenzbasierte Verlaufskontrolle der invasiven Pneumokokkenerkrankung in individuellen Mäusen nach therapeutischer Daptomycin- versus Ceftriaxon-Behandlung im Vergleich zur Plazebo-behandelten Kontrollgruppe. (E) Analyse der *in-vivo*-Photonenemission von Mauslungen unter therapeutischer Daptomycin-, Ceftriaxon- oder Plazebo-Behandlung. Pfeile zeigen den Beginn der Therapie an.

Abbildungen 12B und C (Tabelle 3 der Anlage 2) zeigen die hohen Bakterienlasten, welche unmittelbar vor Beginn der Behandlung an Tag 2 nach Infektion mit Serotyp 2 *S. pneumoniae* in der Lunge und im Blut der Mäuse nachweisbar waren. Bereits an Tag 1 nach antibiotischer Behandlung (Tag 3 nach Infektion) zeigte sich sowohl unter Daptomycin- als auch unter Ceftriaxon-

Therapie eine schnellere Erregerelimination im Blut im Vergleich zur Lunge mit residualen pulmonalen Keimlasten, welche noch an Tag 4 und 5 post Infektion in Daptomycin-, nicht aber in Ceftriaxon-therapierten Mäusen nachweisbar waren (Abb. 12B, C; Tabelle 3 der Anlage 2).

Die hohe Effizienz von Daptomycin zur Therapie der invasiven Pneumokokken-pneumonie konnte auch mittels Biolumineszenz-Imaging belegt werden. In beiden Antibiotika-Behandlungsgruppen konnte die Abnahme der Biolumineszenz-Signalarstärke auf Basalniveau in ein und demselben Versuchstier über die Zeit beobachtet werden (Abb. 12D; Abb. 3 in der Anlage 2). Die durch Antibiotika-Applikationen erzielte Reduktion der Keimlast zeigte sich in den über die Zeit stark reduzierten Photonenemissionen der Lungen (Abb. 12E), während Plazebobehandelte Mäuse (das Auswachsen der Keime reflektierend) anhaltend hohe Biolumineszenz-Signale zeigten (Abb. 12D, E). Insgesamt unterstützen diese Daten unser Konzept, dass Daptomycin in der Behandlung der septischen Verlaufsform der invasiven Pneumokokkenerkrankung ähnlich wirksam ist wie die Vergleichssubstanz Ceftriaxon und dies auch mittels Biolumineszenz-Imaging klar abgebildet werden kann.

3.2.3. Einfluss des Serotyps von *S. pneumoniae* auf die Lungenpermeabilität und intraalveoläre Daptomycin-Verfügbarkeit

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass Daptomycin den septischen Verlauf und die damit einhergehende Mortalität nach Infektion mit Serotyp 2 *S. pneumoniae* äußerst effektiv attenuieren konnte. Hingegen brachte eine Therapie mit Daptomycin keinen Benefit für das Überleben der Tiere im Infektionsmodell der durch Serotyp 19 *S. pneumoniae* induzierten, fokalen Pneumonie. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde die Hypothese überprüft, dass ein invasiv wachsender Pneumokokkenstamm wie Serotyp 2 *S. pneumoniae* eine Lungenpermeabilitäts-erhöhung in Mäusen triggert, welche nachfolgend zu einer besseren Bioverfügbarkeit von Daptomycin in der Lunge führt. Da bei der gewählten Infektionsdosis von $1,5 \times 10^7$ CFU Serotyp 2 oder 19 *S. pneumoniae* nicht alle Mäuse einen septischen Krankheitsverlauf bzw. eine fokale Pneumonie entwickeln, wurde das Biolumineszenz-Imaging zur Identifikation genau derjenigen Mäuse verwendet, welche an Tag 2 oder 3 nach Infektion eine hochgradige Bakteriämie, d.h. Sepsis entwickelten (Abb. 13A; Abb. 5 der Anlage 2), oder aber

eine fokale Pneumonie aufwiesen (Abb. 13B; Abb. 5 der Anlage 2). Überraschenderweise zeigten gerade diejenigen Mäuse, welche mit Serotyp 19 *S. pneumoniae* infiziert wurden, an Tag 3 nach Infektion (Tag 1 nach Behandlungsbeginn) eine 5- bis 6-fach erhöhte Lungenpermeabilität im Vergleich zu denjenigen Mäusen, welche mit Serotyp 2 *S. pneumoniae* infiziert worden waren (Abb. 13A-C; Abb. 5 der Anlage 2). Zugleich hatte die Daptomycin-Therapie der fokalen bzw. invasiven Pneumokokkenerkrankung keinen Einfluss auf die Lungenpermeabilität (Abb. 13C; Abb. 5 der Anlage 2).

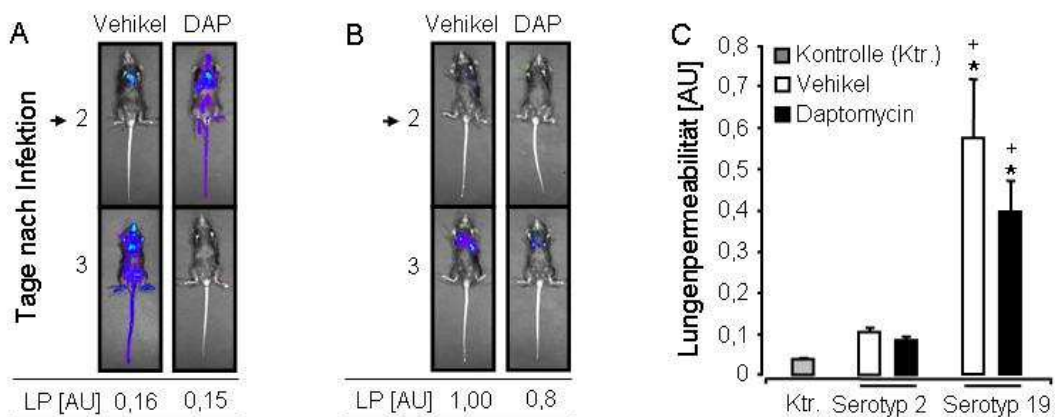


Abb. 13: Analyse der Lungenpermeabilität im Modell der fokalen versus der invasiven Pneumokokkenerkrankung der Maus

(A und B) Biolumineszenz-Analyse von Placebo- bzw. Daptomycin-behandelten Mäusen (therapeutisches Behandlungsregime) nach Infektion mit Serotyp 2 (A) oder Serotyp 19 (B) *S. pneumoniae* mit korrespondierenden Lungenpermeabilitäten (LP). (C) Kumulative Lungenpermeabilität von Placebo- bzw. Daptomycin-behandelten Mäusen nach Infektion mit Serotyp 2 oder 19 *S. pneumoniae* im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen (Ktr.). Pfeile zeigen den Beginn der Therapie an. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle, + $p < 0,05$ im Vergleich zum Serotyp 2 *S. pneumoniae*.

Um zu klären, ob die unterschiedliche Lungenpermeabilität in Serotyp 2 versus 19 *S. pneumoniae*-infizierten Mäusen möglicherweise durch differentiell regulierte Entzündungskaskaden des Wirtes bedingt ist, wurden Leukozytenrekrutierungs- und Zytokinprofile in Mäusen beider experimenteller Gruppen analysiert. Wie Abb. 14A zeigt, ließen sich in beiden Infektionsmodellen keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich Leukozytenrekrutierung in das bronchoalveoläre Kompartiment darstellen. Hingegen korrelierten die unterschiedlichen Lungenpermeabilitäten reziprok mit den proinflammatorischen Zytokinspiegeln in BAL und

Serum von Mäusen der entsprechenden Behandlungsgruppen: Während die Infektion mit Serotyp 19 *S. pneumoniae* stark erhöhte TNF- α - und IL-6-Spiegel in der BAL der Mäuse induzierte, ging eine Infektion mit Serotyp 2 *S. pneumoniae* mit einer systemischen Erhöhung der Zytokin-Spiegel im Serum der Mäuse einher (Abb. 14B,C).

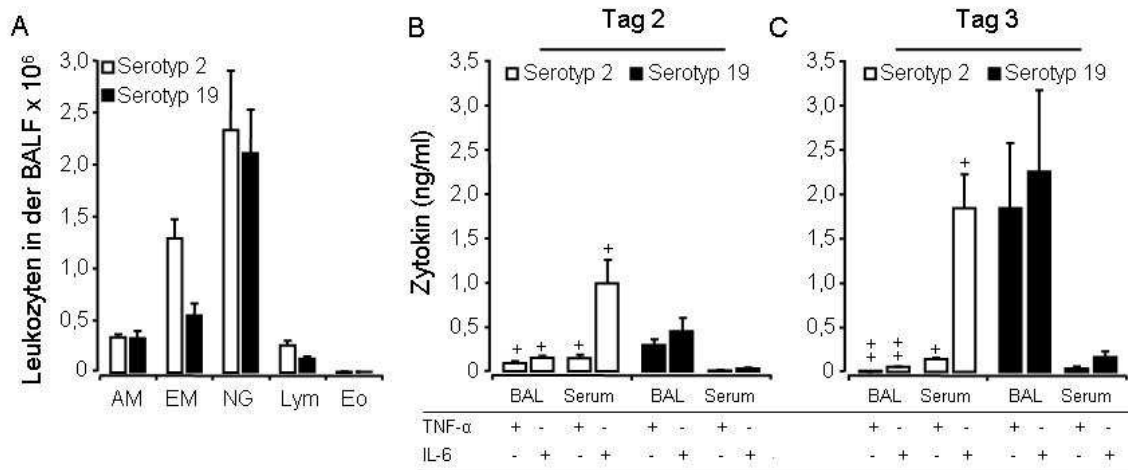


Abb. 14: Leukozytenrekretion und inflammatorische Zytokinprofile bei fokaler versus invasiver Pneumokokkeninfektion

(A) Leukozytenrekretierungsmuster in der bronchoalveolären Lavage von Mäusen an Tag 3 nach Infektion mit Serotyp 2 oder Serotyp 19 *S. pneumoniae*. (B,C) TNF- α - und IL-6-Spiegel in der BAL-Flüssigkeit und im Serum von Mäusen an Tag 2 (B) und 3 (C) nach Infektion mit Serotyp 2 versus Serotyp 19 *S. pneumoniae*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ im Vergleich zum Serotyp 2 *S. pneumoniae*.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Infektion der Lunge mit Serotyp 19 *S. pneumoniae* eine gesteigerte lokale, intraalveoläre Entzündungsantwort der Lunge induziert. Diese intraalveoläre Entzündung geht mit einer Schädigung des Lungenepithels und konsekutiver Permeabilitätserhöhung einher. Demgegenüber führt eine Infektion der Lunge mit dem invasiv wachsenden und Sepsis-induzierenden Serotyp 2 *S. pneumoniae* primär zu einer systemischen Entzündungsreaktion als Folge der Sepsis.

Interessanterweise wiesen Mäuse nach Infektion mit Serotyp 19 *S. pneumoniae* deutlich erhöhte Daptomycin-Spiegel in der BAL-Flüssigkeit auf (Abb. 15A; Abb. 5 der Anlage 2). Bereits eine halbe Stunde nach Applikation von Daptomycin an Tag 3 nach Infektion (Behandlungsbeginn an Tag 2 nach Infektion) waren die Daptomycin-Spiegel in der BAL-Flüssigkeit von Serotyp 19 *S. pneumoniae*-infizierten Mäusen sowohl im Vergleich zur uninfizierten Kontrollgruppe als auch

im Vergleich zu Mäusen nach Infektion mit Serotyp 2 *S. pneumoniae* signifikant erhöht und stiegen bis zu 4 Stunden nach Applikation weiter an (Abb. 15A; Abb. 5 der Anlage 2). Demgegenüber ergab die Analyse der Serum-Daptomycinspiegel keine gravierenden Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Abb. 15B; Abb. 5 der Anlage 2).

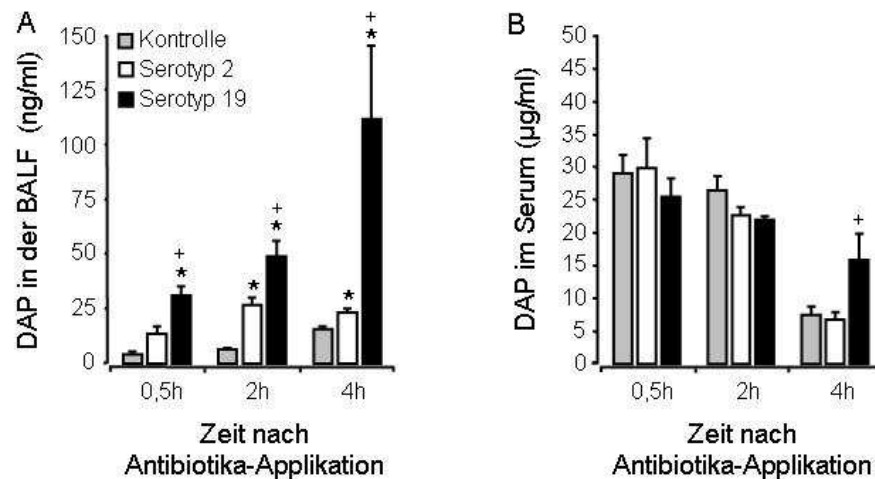


Abb. 15: Analyse der Daptomycin-Spiegel in der bronchoalveolären Lavage und im Serum von Mäusen nach Infektion mit Serotyp 19 versus 2 *S. pneumoniae*

(A) Daptomycin-Spiegel in der bronchoalveolären Flüssigkeit (BALF) und (B) im Serum von Mäusen nach Infektion mit Serotyp 2 bzw. Serotyp 19 *S. pneumoniae* im Vergleich zur Kontrolle. Daptomycin (DAP; 6 mg/kg) wurde an Tag 2 und 3 der Infektion i.p. appliziert. 0,5, 2 und 4 Stunden nach der zweiten Antibiotikagabe wurden die Daptomycin-Spiegel in der BAL und im Serum der Mäuse analysiert.

Diese Daten zeigen, dass eine Erhöhung der Lungenpermeabilität, welche durch eine Infektion mit Serotyp 19 *S. pneumoniae*, nicht jedoch Serotyp 2 *S. pneumoniae*, induziert wird, mit einer erhöhten Passage von Daptomycin in das bronchoalveoläre Kompartiment der Maus einhergeht. Insgesamt scheinen jedoch die intraalveolär erreichten Daptomycinspiegel nicht auszureichen, um das Überleben einer fokalen Pneumonie der Maus zu verbessern, oder aber das Antibiotikum wird im alveolären Kompartiment deaktiviert.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Stellenwert des Biolumineszenz-Imaging-Verfahrens zur Verlaufsanalyse bakterieller pulmonaler Infektionen in der Maus im Modell der fokalen Pneumonie versus dem der pneumogenen Sepsis evaluiert. Diese Mausmodelle wurden des Weiteren zur Charakterisierung des Effizienzprofils von Daptomycin, eines neuen Lipopeptid-Antibiotikums, unter Verwendung konventioneller sowie biolumineszenzbasierter Analyseverfahren eingesetzt.

4.1. Stellenwert des Biolumineszenz-Imaging-Verfahrens zur Analyse der fokalen versus der invasiven Pneumokokkenkrankung der Maus

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen sind die ersten, die den Stellenwert des Biolumineszenz-Imagings zur Verlaufskontrolle von Pneumokokkeninfektionen mit verschiedenen Serotypen in zwei verschiedenen Mausstämmen adressierten. Die Untersuchungen zeigten, dass in einem frühen Stadium der fokalen Pneumonie (Tag 1 nach Infektion mit Serotyp 19 *S. pneumoniae*) die Biolumineszenz-Analyse in BALB/c-Mäusen geringfügig sensitiver war als in C57BL/6-Mäusen. Insgesamt ergaben die Biolumineszenz-Analysen der fokalen Pneumonie in beiden Mausstämmen eine erhebliche Diskrepanz zwischen der Sensitivität des *ex-vivo*- und *in-vivo*-Biolumineszenz-Imagings. Diese Diskrepanz bestand über den gesamten Untersuchungszeitraum von 3 Tagen. Entsprechend konnte das *in-vivo*-Biolumineszenz-Imaging die tatsächlichen Keimlasten der Lunge insbesondere an Tag 1 und 2 einer fokalen Pneumonie nicht zuverlässig widerspiegeln.

In diesem Kontext ließ sich zeigen, dass die durch Serotyp 19 *S. pneumoniae* induzierte fokale Pneumonie mit einem erheblichen Lungenschaden einherging, welcher durch eine hohe Lungenpermeabilität und gravierend erhöhte Zytokin-Spiegel im Alveolarraum charakterisiert war. Eine gestörte Barrierefunktion der Lunge kann zu respiratorischer Insuffizienz führen, welche unter anderem auch mit einer deutlich reduzierten Sauerstoffverfügbarkeit in Mauslungen einhergeht. Unter diesen Bedingungen könnte die Luziferase-katalysierte Reaktion in Pneumokokken, welche Sauerstoff zur Erzeugung von Biolumineszenz benötigt, nur noch vermindert ablaufen. Dies würde im Falle der fokalen Pneumonie zu

einer verminderten Biolumineszenz-Emission führen. Hinzu kommt, dass Serotyp 19 *S. pneumoniae* massive konsolidierte Infiltratbildungen im distalen Respirationstrakt verursacht (49). Zusätzlich zu Faktoren wie Fell, Gewebe und Hämoglobin können diese Infiltrate einen weiteren Teil der Pathogen-emittierten Photonen absorbieren und somit zur verminderten Sensitivität des Biolumineszenz-Imaging im Modell der fokalen Pneumonie beitragen.

Das *in-vivo*-Biolumineszenz-Imaging erwies sich in unseren Untersuchungen hingegen als sehr geeignet, um Erregerlasten und Krankheitsverlauf einer Infektion mit dem hoch invasiven Serotyp 2 *S. pneumoniae* abzubilden. An Tag 2 und 3 nach Infektion mit Serotyp 2 *S. pneumoniae* zeigte sich, dass der Unterschied der *in vivo* und *ex vivo* detektierten Photonenemissionen der Lungen in beiden Mausstämmen (C57BL/6 und BALB/c) deutlich geringer war als bei der Biolumineszenz-Analyse der fokalen Pneumonie. Die Infektion von Mäusen mit dem invasiv wachsenden Serotyp 2 *S. pneumoniae* zeigte stark unterschiedliche Entzündungsmuster im Vergleich zur Infektion mit Serotyp 19 *S. pneumoniae*. Bei der Infektion mit Serotyp 2 *S. pneumoniae* wurde keine gravierende Störung der Lungenpermeabilität beobachtet, hingegen zeigten diese Mäuse eine hochgradige Bakteriämie mit schwerer septischer Verlaufsform. Das Vorliegen einer Sepsis geht mit einer Vielzahl pathophysiologischer Veränderungen einher, welche auch Einfluss auf das Biolumineszenz-Imaging haben könnten. Zum einen findet bei schweren septischen Erkrankungszuständen ein gesteigerter Lipid-Stoffwechsel statt, welcher zu einem drastischen Gewichtsverlust führen kann (46), zum anderen ist eine erhöhte Pilo-Erektion bei Mäusen ein weiteres klinisches Symptom der Sepsis (16). Beide Faktoren könnten zu einer verringerten Absorption der Photonenemission im Tiermodell der pneumogenen Sepsis beitragen und somit insgesamt die Leistungsfähigkeit des Biolumineszenz-Imaging-Verfahrens in der invasiven Pneumokokkenerkrankung positiv beeinflussen. Eine zentrale Rolle für das Biolumineszenz-Imaging spielte jedoch insbesondere die kompartimentspezifische Verteilung von *S. pneumoniae* in der Maus. An Tag 1 nach Infektion mit Serotyp 2 *S. pneumoniae* sowie während des gesamten Untersuchungszeitraums mit Serotyp 19 *S. pneumoniae* zeigte sich eine hohe Abweichung der *in vivo* detektierten Photonensignale von den *ex vivo* detektierten Signalen. Eine Annäherung zwischen *in-vivo*- und *ex-vivo*-Biolumineszenz-Signalen erfolgte nur mit Progression der invasiven Pneumo-

kokkeninfektion. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die biophotonische Analyse der Infektion mit invasiven Serotyp 2 *S. pneumoniae* in einem frühen Stadium der Erkrankung vorwiegend die intraalveoläre Bakterienlast abbildet. Bei progredienter Erkrankung (Tag 2 und 3 nach Infektion) wird hingegen vermutlich vor allem die Ausbreitung der Erreger im Kapillarsystem der Lunge erfasst. Diese Hypothese wurde durch weiterführende Untersuchungen gestützt, welche zeigten, dass eine Perfusion der Mauslungen nach Infektion mit Serotyp 2 *S. pneumoniae* zu einer erheblichen Abnahme des *ex vivo* detektierten Biolumineszenz-Signals führte. Pathogene im bronchoalveolären Kompartiment trugen währenddessen nur in einem geringen Maße zu dem detektierten Gesamt-Biolumineszenz-Signal der Lunge bei. Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen, dass sich der Verlauf einer invasiven Pneumokokkeninfektion mittels Biolumineszenz-Imaging zuverlässiger abbilden lässt als der Verlauf einer fokalen Pneumonie. Am sensitivsten war die Biolumineszenz-Analyse einer Infektion von BALB/c-Mäusen mit Serotyp 2 *S. pneumoniae*, gleichwohl der verwendete Mausstamm für sich eine untergeordnete Rolle hinsichtlich der Leistungsfähigkeit des Biolumineszenz-Imagings spielte. Demgegenüber repräsentiert die Virulenz des eingesetzten Serotyps von *S. pneumoniae* einen entscheidenden Faktor für die Leistungsfähigkeit des *in-vivo*-Biolumineszenz-Imagings zur Evaluation von Erregerlasten in Mauslungen.

4.2. Effizienz des Lipopeptid-Antibiotikums Daptomycin in der fokalen und invasiven Pneumokokkenerkrankung der Maus

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Wirksamkeitsprofil des Lipopeptid Antibiotikums Daptomycin im Infektionsmodell der fokalen und invasiven Pneumokokkenpneumonie der Maus evaluiert.

In bisherigen Studien zur Bewertung von Daptomycin für die Therapie der Pneumokokkenpneumonie wurde die antiinfektive Wirksamkeit ausschließlich in Tiermodellen beziehungsweise in klinischen Studien der *S. pneumoniae*-induzierten CAP bewertet (32, 37). Der Stellenwert von Daptomycin zur Therapie septischer Erkrankungsverläufe wurde hingegen nicht analysiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen die Wichtigkeit, neue Antiinfektiva unter Berücksichtigung der differierenden Pathogenitätsprofile verschiedener Pneumokokkenstämme zu bewerten. Präklinische Untersuchungen zur Analyse neuer

antiinfektiver Substanzen könnten folglich durch den Einsatz definierter Infektionsmodelle verbessert werden. Diese Modelle sollten die vorherrschenden klinischen Phänotypen der durch Pneumokokken induzierten Lungenentzündung abbilden, nämlich die fokale Pneumonie sowie septische Verlaufsformen. Das uneinheitliche Wirksamkeitsprofil von Daptomycin in den Infektionsmodellen der fokalen und invasiven Pneumokokkenpneumonie zeigt weiterhin, dass in Zukunft auch eine Auskunft über den der Infektion zugrunde liegenden Serotypen die Wahl der Antibiotika-Strategie in der Klinik beeinflussen könnte. Dabei darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass neben Kapselpolysacchariden eine Vielzahl weiterer Virulenzfaktoren von Pneumokokken das Virulenzprofil eines Pneumokokkenstammes bestimmen.

Die Analysen zur Wirksamkeit von Daptomycin zeigten klar, dass Daptomycin die durch den Serotyp 19 *S. pneumoniae* induzierte, fokale Pneumonie nicht hinreichend therapieren kann. Silverman *et al.* erklärten die fehlende Wirksamkeit von Daptomycin in der Therapie der Pneumonie mit der Inhibition der antibakteriellen Wirkung des Daptomyzins durch Interaktion mit dem pulmonalen Surfactantsystem (37). Ein weiterer wesentlicher Faktor für die pneumotrope Wirkung eines Antibiotikums ist seine Verfügbarkeit in der Lunge. Die komplexe alveolokapilläre Barriere könnte, ähnlich wie die Blut-Hirn-Schranke, den Zugang des Daptomyzins in die Lunge limitieren (8). In diesem Zusammenhang konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals beschrieben werden, dass in der bronchoalveolären Lavage gesunder Mäuse nur äußerst geringe Daptomycin-Spiegel nachzuweisen waren, bei gleichzeitig hohen Serumspiegeln von Daptomycin. Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass Daptomycin unter Basalbedingungen nur sehr limitierten Zugang zum Alveolarraum besitzt. Unsere Untersuchungen zeigten außerdem, dass die pulmonale Infektion mit nicht invasiv wachsendem Serotyp 19 *S. pneumoniae* im Vergleich zur Infektion mit invasiv wachsendem Serotyp 2 *S. pneumoniae* eine gravierend höhere Lungenpermeabilität induzierte, welche zu bemerkenswert erhöhten Daptomycin-Konzentrationen im bronchoalveolären Kompartiment führte. Angesichts der hochgradigen Bakteriämie, die in Mäusen nach Infektion mit Serotyp 2 *S. pneumoniae* vorlag, überraschte es, dass in diesem Infektionsmodell nur eine äußerst geringe Erhöhung der Lungenpermeabilität zu finden war. Diese Resultate lassen drei wichtige Schlussfolgerungen zu: 1) Bei intakter Lungenbarriere besitzt Daptomycin

nur limitierten Zugang zum bronchoalveolären Raum. 2) Der jeweilige Serotyp von *S. pneumoniae* beeinflusst den Grad der Lungenpermeabilität bzw. -schädigung, welches wiederum die Verfügbarkeit von Daptomycin im alveolären Kompartiment der Lunge determiniert. Diese Relation könnte von besonderer Wichtigkeit im Hinblick auf die Entwicklung und Prüfung von „second generation“ Lipopeptid-Antibiotika sein, welche weniger Interferenz mit pulmonalem Surfactant zeigen (5, 31).

3) Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit dargestellte fehlende Effektivität von Daptomycin zur Therapie der Serotyp 19 *S. pneumoniae*-induzierten Pneumonie kommt vermutlich primär aufgrund der Inaktivierung des Daptomycins durch das Surfactantsystem der Lunge zustande. Die vergleichenden Untersuchungen zur antibakteriellen Effizienz von Daptomycin versus Ceftriaxon im Modell der invasiven Pneumokokkenerkrankung zeigten zwar eine Überlegenheit des Ceftriaxon in der Erregerelimination der Lunge, jedoch eine hervorragende Effizienz von Daptomycin bei der Verhinderung septischer Krankheitsverläufe. Die unter Daptomycin-Therapie beobachteten residualen Keimlasten in der Lunge hatten keinen Einfluss auf das „Outcome“ einer invasiven Pneumokokkenerkrankung. Auch 14 Tage nach Beendigung der Daptomycin-Behandlung konnte kein erneutes Auswachsen der Pathogene beobachtet werden. Dieses ist vermutlich auf die durch die Infektion induzierte protektive Immunantwort der Lunge zurückzuführen. Aus den hier präsentierten Ergebnissen kann die klinisch wichtige Schlussfolgerung gezogen werden, dass bei Patienten, bei denen gemäß klinischer Kriterien eine invasive Pneumokokkenerkrankung vorliegt, Daptomycin in Kombinationstherapie mit einem lungenwirksamen Antibiotikum eine erfolgversprechende Therapieoption darstellen könnte. Im Gegensatz zu β -Laktam-Antibiotika, die ihre bakterizide Wirkung über die Zerstörung der Zellwand entfalten, besitzt Daptomycin den Vorteil, dass es bei der Erregerelimination aufgrund seines einzigartigen Wirkmechanismus keine signifikante Zellyse induziert. Ohne Zellyse unterbleibt die Freisetzung von Zellwandbestandteilen und bakteriellen Komponenten, welches sonst die bereits hohe systemische Entzündungsreaktion zusätzlich aggravieren könnte (45). Ob jedoch Daptomycin in diesem Zusammenhang aufgrund des unterschiedlichen Wirkmechanismus im Vergleich zu β -Laktam-Antibiotika einen positiven Einfluss auf den Therapieverlauf invasiver Pneumokokkenerkrankungen zeigt, bedarf weiterer Klärung.

4.3. Stellenwert des Biolumineszenz-Imagings in der Bewertung der Daptomycin-Effizienz zur Therapie der fokalen versus der invasiven Pneumokokkenerkrankung der Maus

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war, zu evaluieren, ob das Biolumineszenz-Imaging-Verfahren das Wirkprofil von Daptomycin gleichermaßen gut wie klassische Analyseverfahren abbilden kann. Gegenüber der traditionellen Plattiertechnik bietet die Anwendung der Biolumineszenz-Imaging Technologie neben Zeit- und Kostenersparnis den Vorteil, dass sich der Verlauf der Erkrankung longitudinal an ein und derselben Maus verfolgen lässt und gleichzeitig mit der Photonenemission ein quantifizierbarer Parameter zur Verfügung steht, der zur Abschätzung der Keimlast im gleichen Versuchstier herangezogen werden kann.

Der Einsatz des Biolumineszenz-Imaging-Verfahrens zeigte im Verlauf zu den Überlebensstudien erwartungsgemäß vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich Mortalität der fokalen Pneumonie und der invasiven Pneumokokkenerkrankung für Plazebo- und Daptomycin-behandelte Mäuse. Weiterhin wurde bei diesen Untersuchungen die Photonenemission mit den Erregerlasten in An- und Abwesenheit von Daptomycin verglichen. Hierbei ergab die Analyse der Photonenemission, dass bei Infektion mit Serotyp 19 *S. pneumoniae* ein Auswachsen der Erreger in der Lunge bei semitherapeutischer Applikation von Daptomycin nicht verhindert werden konnte. Gleichzeitig konnte mittels Biolumineszenz-Imaging gezeigt werden, dass eine Infektion mit Serotyp 19 *S. pneumoniae* keine Bakteriämie verursacht, da das beobachtete Biolumineszenz-Signal topographisch eindeutig der Lunge zuzuordnen war, und keine Biolumineszenz von anderen Körperregionen der Maus ausging. Insgesamt ergaben die CFU- und Biolumineszenz-Analysen hinsichtlich der Evaluation von Daptomycin in der fokalen Pneumonie übereinstimmende Resultate.

Bei Untersuchungen zur Effizienz der semitherapeutischen Daptomycin-Applikation in der invasiven Pneumokokkenerkrankung spiegelten die Ergebnisse der Biolumineszenz-Analyse der Lunge primär die systemischen, antibakteriellen Effekte des Daptomyzins wieder. Die unter Daptomycintherapie zu beobachteten residualen Keimlasten im Lungenparenchym verursachten hingegen kein *in vivo* detektierbares Biolumineszenz-Signal.

Bei der therapeutischen Applikation von Daptomycin zur Behandlung der invasiven Pneumokokkenerkrankung zeigte sich die Leistungsfähigkeit des

Biolumineszenz-Imaging-Verfahrens, den Infektionsverlauf longitudinal in ein und derselben Maus analysieren zu können. Unmittelbar vor Therapiebeginn an Tag 2 nach Infektion ließ sich hier der genaue Erkrankungsstatus jedes einzelnen Versuchstieres erfassen und ermöglichte somit eine biolumineszenzbasierte Longitudinalanalyse des Therapieerfolgs von Daptomycin. Es zeigte sich allerdings auch hier, dass das Biolumineszenz-Imaging unter diesen Bedingungen keine kompartimentspezifische Differenzierung (Lungenparenchym versus Blut) von Keimlasten (bzw. Antibiotika-Aktivitäten) erlaubte. Die Frage, ob Keimlasten beziehungsweise Biolumineszenz-Signale der Lungen von intraalveolär oder aber intrakapillär lokalisierten Erregern ausgehen, kann per Biolumineszenz-Imaging aufgrund der zweidimensionalen Bilddarstellung nicht beantwortet werden. Folglich kann mittels Biolumineszenz-Imaging auch keine kompartiment-spezifische Wirksamkeit eines Antibiotikums in den verschiedenen Kompartimenten der Lunge dargestellt werden, wie es bei klassischen Analyseverfahren zur Bestimmung der Erregerlast zumindest partiell (alveolär versus kapillär) möglich ist. Wie die Evaluation des nicht lungenwirksamen Daptomycins im Modell der invasiven Pneumokokkenerkrankung gezeigt hat, ist es aufgrund unzureichender Sensitivität des Biolumineszenz-Imaging-Verfahrens jedoch auch nicht möglich, residuale, intraalveolär lokalisierte Erreger zu erfassen. Das Biolumineszenz-Imaging eignet sich somit zwar hervorragend als Screening-Methode für neu entwickelte, antibakteriell wirksame Substanzen, ermöglicht aber gegenwärtig keine Aussagen über die genaue Lokalisation der Erreger in den verschiedenen Kompartimenten des untersuchten Organs, wie im vorliegenden Fall der Lunge.

Zusammengefasst ist das Biolumineszenz-Imaging hervorragend zur präklinischen Charakterisierung antiinfektiver Substanzen zur Therapie septisch verlaufender bakterieller Infektionen der Maus geeignet. Gleichzeitig lässt sich aus den in dieser Arbeit präsentierten Daten ableiten, dass es für jeden neuen Erregerstamm sowie jedes neue Infektionsmodell einer genauen Validierung des Biolumineszenz-Imagings bedarf. Allerdings stehen dem initial zu betreibenden Mehraufwand für die Etablierung des Biolumineszenz-Imagings bakterieller Infektionen in präklinischen Infektionsmodellen die sich derzeit international deutlich verschärfenden tierschutzrechtlichen Bestimmungen, aber auch ethische und nicht zuletzt wirtschaftliche Überlegungen gegenüber, welche insgesamt den hohen

Stellenwert des Biolumineszenz-Imagings in der heutigen Infektionsforschung erneut unterstreichen.

5. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die die Leistungsfähigkeit des Biolumineszenz-Imagings maßgeblich durch den jeweiligen Serotyp von *S. pneumoniae* beeinflusst wird. Invasive oder nicht invasive Verläufe bakterieller Infektionen zeigen sich in der Klinik auch bei anderen bakteriellen Erregern der CAP wie zum Beispiel *Haemophilus influenzae* und *Staphylococcus aureus*. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bieten somit einen Ansatzpunkt für die Analyse und Validierung des Biolumineszenz-Imaging-Verfahrens auch in anderen pneumologisch-klinisch relevanten Infektionsmodellen. Gerade vor dem Hintergrund der steigenden Antibiotika-Resistenzentwicklung von *S. aureus*-Stämmen könnte die gezielte biophotonische Analyse der *S. aureus*-induzierten Pneumonie und der pneumogenen Sepsis weiterhin bei der Suche nach und Bewertung von geeigneten antiinfektiven Behandlungsstrategien von großem Nutzen sein. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Wirksamkeit von Daptomycin in der invasiven Pneumokokkenerkrankung bietet in diesem Zusammenhang eine Basis für weiterführende Untersuchungen zur gezielten Evaluation von Daptomycin in der *S. aureus*-induzierten pneumogenen Sepsis, um somit den limitierten therapeutischen Alternativen für die Behandlung von MRSA-Infektionen Rechnung zu tragen.

6. Literaturverzeichnis

1. 2007. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization--WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* **82**:93-104.
2. **Adam, D.** 2006. Antibiotic therapy: progress and development of resistance. *Internist (Berl)* **47**:758-63.
3. **Appelbaum, P. C.** 1987. World-wide development of antibiotic resistance in pneumococci. *Eur J Clin Microbiol* **6**:367-77.
4. **Appelbaum, P. C., A. Bhamjee, J. N. Scragg, A. F. Hallett, A. J. Bowen, and R. C. Cooper.** 1977. *Streptococcus pneumoniae* resistant to penicillin and chloramphenicol. *Lancet* **2**:995-7.
5. **Baltz, R. H.** 2009. Daptomycin: mechanisms of action and resistance, and biosynthetic engineering. *Curr Opin Chem Biol* **13**:144-51.
6. **Buer, J., and R. Balling.** 2003. Mice, microbes and models of infection. *Nat Rev Genet* **4**:195-205.
7. **Contag, C. H., P. R. Contag, J. I. Mullins, S. D. Spilman, D. K. Stevenson, and D. A. Benaron.** 1995. Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts. *Mol Microbiol* **18**:593-603.
8. **Cottagnoud, P., M. Pfister, F. Acosta, M. Cottagnoud, L. Flatz, F. Kuhn, H. P. Muller, and A. Stucki.** 2004. Daptomycin is highly efficacious against penicillin-resistant and penicillin- and quinolone-resistant pneumococci in experimental meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:3928-33.
9. **Demidova, T. N., F. Gad, T. Zahra, K. P. Francis, and M. R. Hamblin.** 2005. Monitoring photodynamic therapy of localized infections by bioluminescence imaging of genetically engineered bacteria. *J Photochem Photobiol B* **81**:15-25.
10. **Engelsman, A. F., H. C. van der Mei, K. P. Francis, H. J. Busscher, R. J. Ploeg, and G. M. van Dam.** 2009. Real time noninvasive monitoring of contaminating bacteria in a soft tissue implant infection model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **88**:123-9.
11. **Felmingham, D., R. R. Reinert, Y. Hirakata, and A. Rodloff.** 2002. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among isolates of *Streptococcus pneumoniae* from the PROTEKT surveillance study, and

- comparative in vitro activity of the ketolide, telithromycin. *J Antimicrob Chemother* **50 Suppl S1**:25-37.
12. **Foucault, M. L., L. Thomas, S. Goussard, B. R. Branchini, and C. Grillot-Courvalin.** In vivo bioluminescence imaging for the study of intestinal colonization by *Escherichia coli* in mice. *Appl Environ Microbiol* **76**:264-74.
 13. **Fowler, V. G., Jr., H. W. Boucher, G. R. Corey, E. Abrutyn, A. W. Karchmer, M. E. Rupp, D. P. Levine, H. F. Chambers, F. P. Tally, G. A. Vigliani, C. H. Cabell, A. S. Link, I. DeMeyer, S. G. Filler, M. Zervos, P. Cook, J. Parsonnet, J. M. Bernstein, C. S. Price, G. N. Forrest, G. Fatkenheuer, M. Gareca, S. J. Rehm, H. R. Brodt, A. Tice, and S. E. Cosgrove.** 2006. Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* **355**:653-65.
 14. **Francis, K. P., D. Joh, C. Bellinger-Kawahara, M. J. Hawkinson, T. F. Purchio, and P. R. Contag.** 2000. Monitoring bioluminescent *Staphylococcus aureus* infections in living mice using a novel luxABCDE construct. *Infect Immun* **68**:3594-600.
 15. **Hahn, H., K. Miksits, and S. Gatermann.** 2004. Spezielle Bakteriologie, p. 210-215. *In* H. Hahn, D. Falke, S. H. E. Kaufmann, and U. Ullmann (ed.), *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, 5 ed. Springer-Verlag, Heidelberg.
 16. **Hanly, E. J., M. Mendoza-Sagaon, K. Murata, J. M. Hardacre, A. De Maio, and M. A. Talamini.** 2003. CO₂ Pneumoperitoneum modifies the inflammatory response to sepsis. *Ann Surg* **237**:343-50.
 17. **Hansman, D., H. N. Glasgow, J. Sturt, L. Devitt, and R. M. Douglas.** 1971. Pneumococci insensitive to penicillin. *Nature* **230**:407-8.
 18. **Hardy, J., K. P. Francis, M. DeBoer, P. Chu, K. Gibbs, and C. H. Contag.** 2004. Extracellular replication of *Listeria monocytogenes* in the murine gall bladder. *Science* **303**:851-3.
 19. **Hoffken, G., J. Lorenz, W. Kern, T. Welte, T. Bauer, K. Dalhoff, E. Dietrich, S. Ewig, P. Gastmeier, B. Grabein, E. Halle, M. Kolditz, R. Marre, and H. Sitter.** 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 Pneumonia. *Pneumologie* **64**:149-54.
20. **Hutchens, M., and G. D. Luker.** 2007. Applications of bioluminescence imaging to the study of infectious diseases. *Cell Microbiol* **9**:2315-22.
 21. **Jung, D., A. Rozek, M. Okon, and R. E. Hancock.** 2004. Structural transitions as determinants of the action of the calcium-dependent antibiotic daptomycin. *Chem Biol* **11**:949-57.
 22. **Kadioglu, A., and P. W. Andrew.** 2004. The innate immune response to pneumococcal lung infection: the untold story. *Trends Immunol* **25**:143-9.
 23. **Kadioglu, A., J. N. Weiser, J. C. Paton, and P. W. Andrew.** 2008. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol* **6**:288-301.
 24. **Kadurugamuwa, J. L., K. Modi, J. Yu, K. P. Francis, T. Purchio, and P. R. Contag.** 2005. Noninvasive biophotonic imaging for monitoring of catheter-associated urinary tract infections and therapy in mice. *Infect Immun* **73**:3878-87.
 25. **Kuhnke, A., T. Welte, and N. Suttorp.** 2006. Pneumonia - pathogen-based or constellation-based therapy?. *Internist (Berl)* **47 Suppl 1**:S14-9.
 26. **Kuklin, N. A., G. D. Pancari, T. W. Tobery, L. Cope, J. Jackson, C. Gill, K. Overbye, K. P. Francis, J. Yu, D. Montgomery, A. S. Anderson, W. McClements, and K. U. Jansen.** 2003. Real-time monitoring of bacterial infection in vivo: development of bioluminescent staphylococcal foreign-body and deep-thigh-wound mouse infection models. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:2740-8.
 27. **Lim, W. S., S. V. Baudouin, R. C. George, A. T. Hill, C. Jamieson, I. Le Jeune, J. T. Macfarlane, R. C. Read, H. J. Roberts, M. L. Levy, M. Wani, and M. A. Woodhead.** 2009. BTS guidelines for the management of community acquired pneumonia in adults: update 2009. *Thorax* **64 Suppl 3**:iii1-55.
 28. **Mitchell, A. M., and T. J. Mitchell.** *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. *Clin Microbiol Infect* **16**:411-8.
 29. **Mizgerd, J. P., and S. J. Skerrett.** 2008. Animal models of human pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **294**:L387-98.

30. **Mook-Kanamori, B. B., M. S. Rouse, C. I. Kang, D. van de Beek, J. M. Steckelberg, and R. Patel.** 2009. Daptomycin in experimental murine pneumococcal meningitis. *BMC Infect Dis* **9**:50.
31. **Nguyen, K. T., X. He, D. C. Alexander, C. Li, J. Q. Gu, C. Mascio, A. Van Praagh, L. Mortin, M. Chu, J. A. Silverman, P. Brian, and R. H. Baltz.** Genetically engineered lipopeptide antibiotics related to A54145 and daptomycin with improved properties. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:1404-13.
32. **Pertel, P. E., P. Bernardo, C. Fogarty, P. Matthews, R. Northland, M. Benvenuto, G. M. Thorne, S. A. Luperchio, R. D. Arbeit, and J. Alder.** 2008. Effects of prior effective therapy on the efficacy of daptomycin and ceftriaxone for the treatment of community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis* **46**:1142-51.
33. **Randerath, O., D. Konig, M. Saalman, B. Jansen, and G. Pulverer.** 2000. Prevention of infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Med Klin (Munich)* **95**:678-82.
34. **Reinert, R. R., S. Reinert, M. van der Linden, M. Y. Cil, A. Al-Lahham, and P. Appelbaum.** 2005. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in eight European countries from 2001 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:2903-13.
35. **Reinert, R. R., A. C. Rodloff, E. Halle, W. Baer, B. Beyreiss, H. Seifert, T. A. Wichelhaus, M. Maass, and M. Mehl.** 2004. Antibacterial resistance of community-acquired respiratory tract pathogens recovered from patients in Germany and activity of the Ketolide Telithromycin: results from the PROTEKT surveillance study (1999-2000). *Chemotherapy* **50**:143-51.
36. **Sadikot, R. T., and T. S. Blackwell.** 2005. Bioluminescence imaging. *Proc Am Thorac Soc* **2**:537-40, 511-2.
37. **Silverman, J. A., L. I. Mortin, A. D. Vanpraagh, T. Li, and J. Alder.** 2005. Inhibition of daptomycin by pulmonary surfactant: in vitro modeling and clinical impact. *J Infect Dis* **191**:2149-52.
38. **Silverman, J. A., N. Oliver, T. Andrew, and T. Li.** 2001. Resistance studies with daptomycin. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1799-802.

39. **Silverman, J. A., N. G. Perlmutter, and H. M. Shapiro.** 2003. Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:2538-44.
40. **Spindler, C., and A. Ortqvist.** 2006. Prognostic score systems and community-acquired bacteraemic pneumococcal pneumonia. *Eur Respir J* **28**:816-23.
41. **Steenbergen, J. N., J. Alder, G. M. Thorne, and F. P. Tally.** 2005. Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. *J Antimicrob Chemother* **55**:283-8.
42. **Straus, S. K., and R. E. Hancock.** 2006. Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *Biochim Biophys Acta* **1758**:1215-23.
43. **Tait-Kamradt, A., T. Davies, P. C. Appelbaum, F. Depardieu, P. Courvalin, J. Petitpas, L. Wondrack, A. Walker, M. R. Jacobs, and J. Sutcliffe.** 2000. Two new mechanisms of macrolide resistance in clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* from Eastern Europe and North America. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:3395-401.
44. **Tally, F. P., M. Zeckel, M. M. Wasilewski, C. Carini, C. L. Berman, G. L. Drusano, and F. B. Oleson, Jr.** 1999. Daptomycin: a novel agent for Gram-positive infections. *Expert Opin Investig Drugs* **8**:1223-38.
45. **Thallinger, C., M. Rothenburger, C. Marsik, S. Wuenscher, M. Popovic, G. Endler, O. Wagner, and C. Joukhadar.** 2008. Daptomycin does not exert immunomodulatory effects in an experimental endotoxin model of human whole blood. *Pharmacology* **81**:57-62.
46. **van Leeuwen, H. J., E. C. Heezius, G. M. Dallinga, J. A. van Strijp, J. Verhoef, and K. P. van Kessel.** 2003. Lipoprotein metabolism in patients with severe sepsis. *Crit Care Med* **31**:1359-66.
47. **Weiser, J. N.** The pneumococcus: why a commensal misbehaves. *J Mol Med* **88**:97-102.
48. **Welte, T., and T. Kohnlein.** 2009. Global and local epidemiology of community-acquired pneumonia: the experience of the CAPNETZ Network. *Semin Respir Crit Care Med* **30**:127-35.

-
49. **Winter, C., K. Taut, M. Srivastava, F. Langer, M. Mack, D. E. Briles, J. C. Paton, R. Maus, T. Welte, M. D. Gunn, and U. A. Maus.** 2007. Lung-specific overexpression of CC chemokine ligand (CCL) 2 enhances the host defense to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice: role of the CCL2-CCR2 axis. *J Immunol* **178**:5828-38.
 50. **Witzenrath, M., B. Schmeck, J. M. Doehn, T. Tschernig, J. Zahlten, J. M. Loeffler, M. Zemlin, H. Muller, B. Gutbier, H. Schutte, S. Hippenstiel, V. A. Fischetti, N. Suttorp, and S. Rosseau.** 2009. Systemic use of the endolysin Cpl-1 rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med* **37**:642-9.
 51. **Zinn, K. R., T. R. Chaudhuri, A. A. Szafran, D. O'Quinn, C. Weaver, K. Dugger, D. Lamar, R. A. Kesterson, X. Wang, and S. J. Frank.** 2008. Noninvasive bioluminescence imaging in small animals. *ILAR J* **49**:103-15.

7. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Experimentelle Pneumologie der Medizinischen Hochschule Hannover angefertigt. Bei der Anfertigung dieser Dissertation haben mich viele Menschen unglaublich unterstützt und ihnen allen schulde ich großen Dank.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Ulrich Maus, für die hervorragende fachliche Betreuung, seine stete Ansprechbarkeit und die Diskussionsfreude während der gesamten Doktorarbeit. Insbesondere bin ich ihm auch für seine Mühen und Geduld beim Überarbeiten der Manuskripte und für seine konstruktiven Anmerkungen äußerst dankbar. Des Weiteren möchte ich mich bei ihm für sein überaus großes Engagement sowie das tolle Arbeitsverhältnis, welches von großem Vertrauen geprägt war, ganz herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Tobias Welte möchte ich für die kompetente Unterstützung, insbesondere bei klinischen Aspekten, sowie seinem Interesse am Fortgang dieser Arbeit besonders herzlich danken.

Prof. Dr. Franz Bange danke ich sehr für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Kollegin Jennifer Bohling, die mit unermüdlichem Eifer an dieser Arbeit mitgewirkt und nicht zuletzt durch ihre überaus verlässliche Art und ihr großes Engagement ganz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Herzlichen Dank für die hervorragende Teamarbeit und die unvergleichbare Unterstützung während der gesamten letzten drei Jahre.

Allen Kollegen der Abteilung für Experimentelle Pneumologie bin ich überaus dankbar für die tolle Arbeitsatmosphäre sowie die tatkräftige und mentale Unterstützung. Insbesondere Ines Hahn und allen anderen Kollegen schulde ich einen großen Dank für die stetige Bereitschaft und das Interesse, neue Ansätze und Ergebnisse zu diskutieren.

Meinen Eltern, Ines Hahn und Dr. Bianca Überberg danke ich sehr für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Meinen Eltern bin ich in besonderem Maße dankbar für die uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung und den großen Rückhalt während der gesamten Zeit.

Meiner gesamten Familie danke ich für das Interesse an und die Unterstützung während meiner Arbeit. Meinem Opa möchte ich sehr dafür danken, dass er durch das Heraussuchen interessanter wissenschaftlicher Artikel mich den Fortschritt der Wissenschaft in anderen Fachbereichen nie vergessen ließ.

Ein ganz besonderer Dank gilt Tim, der mich in jeder nur erdenklichen Art und Weise unterstützt hat und mir unglaublich viel Kraft geschenkt hat. Durch sein uneingeschränktes Verständnis, seine Ratschläge und sein Interesse an der Arbeit war es ein Leichtes, nie die Motivation zu verlieren.

8. Anlagen

8.1. Originalarbeiten, Abstracts und Vorträge mit Bezug zur vorliegenden Dissertation

Die Daten der vorliegenden Dissertation sind in folgenden Arbeiten und Abstracts veröffentlicht bzw. in folgenden Vorträgen referiert worden:

Originalarbeiten:

1) **Henken, S.**, J. Bohling, J. Martens-Lobenhoffer, J.C. Paton, A.D. Ogunniyi, D.E. Briles, V.C. Salisbury, D. Wedekind, S.M. Bode-Böger, T. Welsh, F.C. Bange, T. Welte, U.A. Maus. 2010. Efficacy profile of daptomycin for the treatment of invasive as compared to non-invasive pulmonary infections with *S. pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **54**(2):707-717.

2) **Henken, S.**, J. Bohling, A.D. Ogunniyi, J.C. Paton, V.C. Salisbury, T. Welte, U.A. Maus. 2010. Evaluation of biophotonic imaging to estimate bacterial burden in mice infected with highly virulent compared to less virulent *Streptococcus pneumoniae* serotypes. *Antimicrob Agents Chemother* **54**(8):3155-60.

Abstracts:

1) **Henken, S.**, J. Bohling, D. Wedekind, T. Welsh, T. Welte, U.A. Maus. Bioluminescence imaging in mouse models of septic pneumococcal disease. 4th International Congress Sepsis and Multiorgan dysfunction 2009, Weimar. *Infection* 37 Suppl 3:S7, 2009.

2) **Henken, S.**, J. Bohling, J. Martens-Lobenhoffer, S.M. Bode-Böger, T. Welsh, T. Welte, U.A. Maus. Efficacy profile of daptomycin for the treatment of invasive as compared to non-invasive pulmonary infections with *S. pneumoniae*. 51. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. 2010, Hannover (im Druck).

3) **Henken, S.**, J. Bohling, T. Welte, U.A. Maus. Evaluation of biophotonic imaging to estimate bacterial burden in mice with invasive as compared to non-invasive pneumococcal disease. 20th Congress of the European Respiratory Society 2010, Barcelona (im Druck).

Vorträge:

1) Bioluminescence imaging in mouse models of septic pneumococcal disease. 4th International Congress Sepsis and Multiorgan dysfunction, Weimar, 2009

2) Evaluation of Bioluminescence Imaging for Monitoring of Pneumococcal Disease Progression in Mice. Jahrestagung der Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. Borstel, 2009.

3) Bildgebung bei experimenteller Pneumonie. 51. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. Hannover, 2010

8.2. Anlage 1

Henken, S., J. Bohling, A.D. Ogunniyi, J.C. Paton, V.C. Salisbury, T. Welte, U.A. Maus. 2010. Evaluation of biophotonic imaging to estimate bacterial burden in mice infected with highly virulent compared to less virulent *Streptococcus pneumoniae* serotypes. *Antimicrob Agents Chemother* **54**(8):3155-60.
doi:10.1128/AAC.00310-10

Reproduced with permission from American Society for Microbiology via the Copyright Clearance Center's Rightslink.

Evaluation of Biophotonic Imaging To Estimate Bacterial Burden in Mice Infected with Highly Virulent Compared to Less Virulent *Streptococcus pneumoniae* Serotypes^{∇†}

Stefanie Henken,¹ Jennifer Bohling,¹ A. David Ogunniyi,² James C. Paton,² Vyvyan C. Salisbury,³ Tobias Welte,⁴ and Ulrich A. Maus^{1*}

Department of Experimental Pneumology¹ and Clinic for Pneumology,⁴ Hannover School of Medicine, Hannover, Germany; Research Centre for Infectious Diseases, School of Molecular and Biomedical Science, University of Adelaide, Adelaide, Australia²; and Faculty of Health and Life Sciences, University of the West of England, Bristol, United Kingdom³

Received 4 March 2010/Returned for modification 10 May 2010/Accepted 31 May 2010

Bioluminescence imaging is an innovative, noninvasive tool to analyze infectious disease progression under real-life conditions in small laboratory animals. However, the relevance of bioluminescence imaging to monitor invasive compared to noninvasive bacterial infections of the lung has not been examined so far. In the current study, we systematically evaluated the importance of bioluminescence imaging to monitor pneumococcal disease progression by correlating biophotonic signals with lung bacterial loads in two mouse strains (BALB/c, C57BL/6) infected with either self-glowing, bioluminescent serotype 19 *Streptococcus pneumoniae* causing focal pneumonia or serotype 2 *S. pneumoniae* causing invasive pneumococcal disease. The best correlations between bioluminescence signals and lung CFU counts were observed in BALB/c mice compared to C57BL/6 mice just on day 3 after infection with invasive serotype 2 *S. pneumoniae*, while excellent correlations between photon counts and bacterial loads were observed in isolated lungs of BALB/c and C57BL/6 mice, irrespective of the employed pneumococcal serotype. Moreover, good correlations between biophotonic signals and CFU counts were also observed in mice upon infection with serotype 19 *S. pneumoniae* causing focal pneumonia in mice, again with best correlation values obtained for BALB/c mice at day 3 postinfection. Collectively, we show that the relevance of biophotonic imaging to monitor *S. pneumoniae*-induced lung infections in mice is largely influenced by the disease model under investigation. The provided data may be important for studies of infectious diseases.

The Gram-positive bacterium *Streptococcus pneumoniae* is the most prevalent pathogen in community-acquired pneumonia (CAP). The worldwide increase in antibiotic resistance of *S. pneumoniae* against frequently used antibiotics and the rapid global spread of multidrug-resistant clones require novel immunization strategies and antibiotic substances (17). Temporal information about novel drug or immunization efficacies to control disease progression is conventionally characterized by repeated, time-stacked animal sacrifice, e.g., for determination of bacterial loads (4). However, more cost-efficient and time-saving methods are needed for therapeutic and preventive screening approaches in laboratory animals (1, 7, 17). In this regard, bioluminescence imaging (BLI) technology is emerging as a powerful tool for monitoring real-time progression of infectious diseases, making it the most commonly used imaging technique to study drug efficacy profiles in infectious disease models (2, 3, 9–12, 16). However, to the best of our knowledge, no studies so far have systematically evaluated the reliability of bioluminescence imaging to accurately reflect infectious dis-

ease progression in different mouse lines and different infection models.

In the current study, BALB/c and C57BL/6 mice were infected either with self-glowing, bioluminescent capsular serotype 19 *S. pneumoniae*, known to trigger focal pneumonia in mice, or with self-glowing capsular serotype 2 *S. pneumoniae*, known to rapidly cause invasive pneumococcal disease, followed by correlation analysis of biophotonic signals with respective bacterial CFU for up to 3 days postinfection.

MATERIALS AND METHODS

Mice. Female C57BL/6 and BALB/c mice were purchased from Charles River (Sulzfeld, Germany) and were kept under conventional conditions with free access to food and water. Mice were used in all experiments at 8 to 12 weeks of age in accordance with the guidelines of our Institutional Animal Care and Use Committee. Animal experiments were approved by our local government authorities. The main reasons for choosing these two mouse strains were that they are the most commonly employed inbred mouse strains in disease models and that their contrasting fur colors (black and white) are ideally suited to study the impact of fur color on bioluminescence imaging approaches.

Culture and quantification of *S. pneumoniae*. In the current study, we employed two different bioluminescent, “self-glowing” strains of *S. pneumoniae*, i.e., a highly virulent serotype 2 *S. pneumoniae* strain (D39 lux), which has been shown to rapidly cause invasive disease progression in mice (9, 14), and a less virulent capsular group 19 *S. pneumoniae* strain (EF3030 lux), which is known to primarily cause focal pneumonia in mice (9, 20). Both strains of *S. pneumoniae* were transformed with essentially the same plasmid expressing the *luxABCDE* operon of *Photobacterium luminescens* and an erythromycin resistance cassette for positive selection purposes and were generated as recently described (2, 3).

* Corresponding author. Mailing address: Department of Experimental Pneumology, Hannover School of Medicine, Hannover 30625, Germany. Phone: 49-511-532-9617. Fax: 49-511-532-9616. E-mail: Maus.Ulrich@mh-hannover.de.

† Supplemental material for this article may be found at <http://aac.asm.org/>.

∇ Published ahead of print on 7 June 2010.

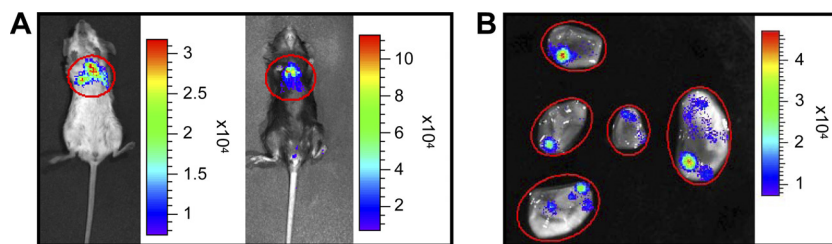


FIG. 1. Gating strategy for *in vivo* and *ex vivo* quantification of bioluminescence signals from lungs of *S. pneumoniae*-infected mice. Mice infected with self-glowing serotype 19 or 2 *S. pneumoniae* (1.5×10^7 CFU/mouse) were subjected to analysis of bioluminescence emission using a Xenogen bioluminescence analyzer. (A) Pseudocolor image overlay of a grayscale photograph of anesthetized BALB/c (left) and C57BL/6 (right) mice infected with *S. pneumoniae* with manually selected regions of interest (ROIs) (*in vivo* gating). (B) Manually selected ROIs of pseudocolor images of lung lobes of a mouse infected with *S. pneumoniae* (*ex vivo* gating).

Importantly, constitutive bioluminescence emission of the employed pneumococcal strains did not require application of a substrate (“self-glowing” strains).

Bioluminescent serotype 2 *S. pneumoniae* D39 lux was grown in Todd-Hewitt broth (THB) (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) supplemented with 0.5% yeast extract (Difco/BD Biosciences, Sparks, MD) in the presence of 0.2 $\mu\text{g/ml}$ erythromycin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Serotype 19 *S. pneumoniae* EF3030 lux was grown in Todd-Hewitt broth supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) in the presence of 0.2 $\mu\text{g/ml}$ erythromycin. Aliquots were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . *S. pneumoniae* stocks were quantified by plating serial dilutions of the bacteria on sheep blood agar plates (BD Biosciences, Heidelberg, Germany), followed by incubation of the plates at 37°C and 5% CO_2 for 18 h and subsequent determination of CFU.

Infection of mice with *S. pneumoniae*. Mice were anesthetized with tetrazoline hydrochloride (5 mg/kg) and ketamine (75 mg/kg). Subsequently, mice were orotracheally intubated with a 29-gauge Abbocath (Abbott, Wiesbaden, Germany), which was inserted into the trachea under visual control with transillumination of the neck region. Lung infection was induced by orotracheal instillation of either 1.5×10^7 CFU of serotype 2 *S. pneumoniae* (D39 lux) or serotype 19 *S. pneumoniae* (EF3030 lux) in a volume of 50 μl THB to trigger either invasive pneumococcal disease or focal pneumonia in mice. Subsequently, mice were brought back to their cages with free access to food and water.

Bioluminescence imaging. Groups of infected mice were subjected to bioluminescence analysis on days 1, 2, or 3 of infection using a Xenogen bioluminescence analyzer (Xenogen, Alameda, CA), essentially as described recently (9). Regions of interest (ROI) were manually selected, and the results were quantified as average radiance of photons emitted per second, area, and steradian ($\text{p/s/cm}^2/\text{sr}$) by using the IgorPro image analysis software package (Fig. 1). Regions of interest generated for *in vivo* analysis were identical between mice, and respective ROIs generated for *ex vivo* bioluminescence analysis of lungs were adjusted to the size and shape of individual lung lobes, overall requiring only minimal adjustments between lung lobes of different mice. All correlation studies performed were done with the average radiance of photons after subtraction of background signals obtained from lungs or lung lobes of uninfected control mice. Under the chosen experimental conditions, *in vivo* background photon counts of lungs of untreated C57BL/6 mice ranged between 80 and 300 $\text{p/s/cm}^2/\text{sr}$ and 400 and 1,000 $\text{p/s/cm}^2/\text{sr}$ for lungs of untreated BALB/c mice. For further details, see the supplemental material.

To evaluate the contribution of bioluminescent bacteria located within the lung capillary system, relative to the bronchoalveolar space, to overall lung bioluminescence emission of mice challenged with invasive serotype 2 *S. pneumoniae*, in selected experiments, lungs of serotype 2 *S. pneumoniae* (D39 lux)-infected mice either were left untreated or were treated by perfusion *in situ* with sterile Hanks’ balanced salt solution (HBSS) (5 ml) or bronchoalveolar lavage (BAL) prior to their *ex vivo* biophotonic imaging analysis. Whole-lung washes were performed as recently described, with instillation of 300- μl aliquots of ice-cold sterile PBS followed by careful aspiration, until a total BAL fluid volume of 6 ml was collected (13, 15).

Determination of bacterial loads. Subsequent to bioluminescence analysis performed on days 1, 2, and 3 postinfection, bacterial loads were determined in lungs of *S. pneumoniae*-infected mice. For determination of bacteremia, peripheral blood was collected from the inferior vena cava followed by plating of serial dilutions on sheep blood agar plates. For determination of CFU in lungs, organs were dissected and homogenized in Hanks’ balanced salt solution without supplements using a tissue homogenizer (IKA, Staufen, Germany). Resulting homogenates were filtered through a 100- μm cell strainer (BD Falcon), and ali-

quots of each sample were then plated in 10-fold serial dilutions on sheep blood agar plates followed by incubation at 37°C and 5% CO_2 for determination of bacterial loads, as recently described in detail (14, 19).

Statistics. Correlation analysis of *in vivo* or *ex vivo* collected bioluminescence signals and CFU counts was performed by Spearman rank correlation test using GraphPadPrism 5. Statistically significant differences were assumed when *P* values (two-tailed) were at least ≤ 0.05 .

RESULTS

Evaluation of bioluminescence imaging of pneumococcal pneumonia in mice. We first analyzed the correlation of bioluminescence signals with bacterial loads in a model of focal pneumococcal pneumonia by infection of C57BL/6 mice with less virulent serotype 19 *S. pneumoniae* (1.5×10^7 CFU/mouse). As shown in Fig. 2 and Fig. S1 in the supplemental material, more than 50% of lungs of mice analyzed on days 1 and 2 postinfection were found to emit either very low (photon counts of $<5 \times 10^2$ $\text{p/s/cm}^2/\text{sr}$) or no bioluminescence signals (Fig. 2A and B; see Fig. S1A and B in the supplemental material), resulting in correlation coefficients of 0.77 and 0.84, respectively, between photon counts and bacterial loads (Fig. 2A and B). When analyzed at later time points postinfection (day 3), *in vivo* bioluminescence signals emanating from lungs of mice infected with serotype 19 *S. pneumoniae* correlated even more strongly with CFU counts ($r = 0.92$), with only small differences relative to correlation coefficients of *ex vivo*-analyzed lung lobes from the same mice ($r = 0.92$ versus $r = 0.87$) (Fig. 2C; see Fig. S1C in the supplemental material). In contrast, isolated lung lobes of the same mice were found to exhibit strong bioluminescence signals, with bacterial counts ranging between 10^4 and 10^7 CFU/mouse lung (Fig. 2A and B; see Fig. S1A and B in the supplemental material), overall resulting in strong correlations between photon emission and CFU counts (Fig. 2A and B). Overall, we observed that *ex vivo*-analyzed mouse lungs (days 1 and 2) exhibited approximately 10^3 - to 10^4 -fold increased photon counts relative to *in vivo*-analyzed mouse lungs (Fig. 2A to C).

In the next set of experiments, we performed a bioluminescence analysis of BALB/c mice infected with self-glowing, less virulent serotype 19 *S. pneumoniae* (1.5×10^7 CFU/mouse). As shown in Fig. 2D and Fig. S1D in the supplemental material, virtually all *S. pneumoniae*-infected BALB/c mice showed detectable bioluminescence signals emanating from lungs as early as 24 h postinfection, together with a significant correlation ($r = 0.82$) of *in vivo* bioluminescence signals with CFU counts

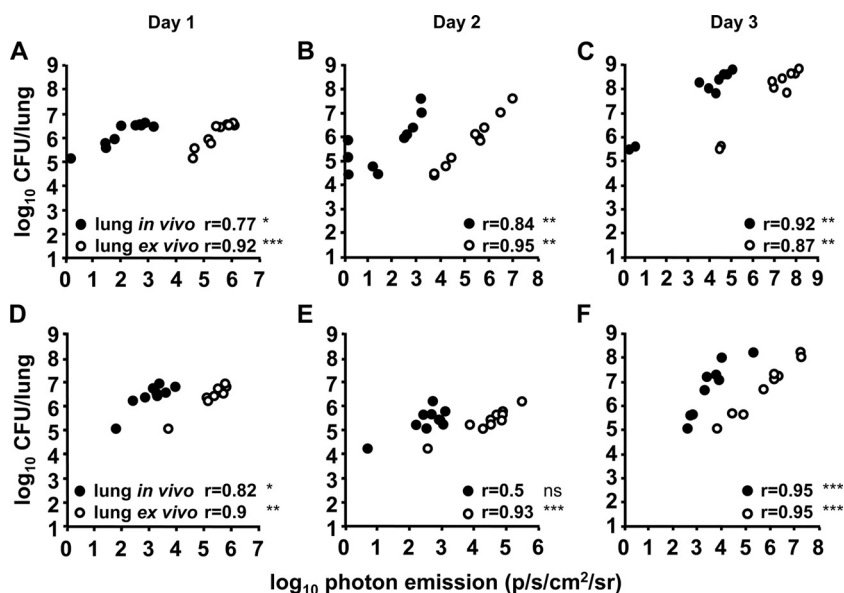


FIG. 2. Biophotonic analysis of developing focal pneumococcal pneumonia. Mice were infected with self-glowing serotype 19 *S. pneumoniae* (1.5×10^7 CFU/mouse) and subjected to bioluminescence analysis on day 1, 2, or 3 postinfection (*in vivo* analysis), using a Xenogen bioluminescence analyzer. Immediately after *in vivo* biophotonic imaging, mice were sacrificed and individual lung lobes of each mouse were subjected to bioluminescence analysis (*ex vivo* analysis) on day 1, 2, or 3 postinfection, followed by quantification of the respective bacterial loads. (A to C) Correlation of bioluminescence signals and CFU counts of the same lungs of C57BL/6 mice on day 1 (A), day 2 (B), and day 3 (C) after infection with serotype 19 *S. pneumoniae*. (D to F) Correlation of bioluminescence signals and CFU counts of the same lungs of BALB/c mice on day 1 (D), day 2 (E), and day 3 (F) after infection with serotype 19 *S. pneumoniae*. r, Spearman correlation coefficient; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

(Fig. 2D; see Fig. S1D in the supplemental material). At the same time, *ex vivo* bioluminescence signals of isolated lungs infected for 24 h with *S. pneumoniae* also resulted in slightly superior correlations ($r = 0.9$) with CFU counts, compared to *in vivo* correlation analysis (Fig. 2D). At day 2 postinfection, *ex vivo* photon counts still correlated well with CFU of lungs ($r = 0.93$), whereas *in vivo* bioluminescence signal and respective CFU analysis gave a correlation coefficient of 0.5 only at this time of infection (Fig. 2E). As shown in Fig. 2F (also see Fig. S1F in the supplemental material), strong correlations between *in vivo* and *ex vivo* bioluminescence signals and bacterial loads were observed in mice on day 3 postinfection, albeit with a strong interindividual variability between mice, indicating differences between mice to cope with infection. As in our observations of C57BL/6 mice, we observed that *ex vivo* bioluminescence analysis of lungs of BALB/c mice revealed approximately 100- to 1,000-fold higher photon counts relative to *in vivo* bioluminescence counts of the same mice (Fig. 2D to F).

Bioluminescence imaging of invasive pneumococcal disease in mice. To characterize the impact of bioluminescence imaging for studying different clinical courses of pneumococcal lung infection, we next infected C57BL/6 mice with highly invasive serotype 2 *S. pneumoniae*, which is known to rapidly cause invasive pneumococcal disease in mice. Similar to our observation with serotype 19 pneumococcal pneumonia, C57BL/6 mice infected with serotype 2 *S. pneumoniae* (1.5×10^7 CFU/mouse), though exhibiting bacterial loads of 10^5 to 10^7 CFU/lung, demonstrated a very weak bioluminescence emission on day 1 postchallenge (Fig. 3A; see Fig. S2A in the supplemental material), nevertheless yielding significant correlation coefficients

at this time point of investigation. In contrast, *ex vivo* bioluminescence emission of individual lung lobes of the same mice resulted in strongly increased bioluminescence profiles and significant correlations with respective CFU counts (Fig. 3A). At days 2 and 3 of infection, we found superior correlations between photon emission and CFU counts under both *in vivo* and *ex vivo* conditions of bioluminescence analysis (Fig. 3B and C). At the same time, differences in bioluminescence signals (ranging up to 10^3 - to 10^4 -fold) between *ex vivo*- and *in vivo*-analyzed lungs of mice declined over time (Fig. 3A to C). Notably, *ex vivo* bioluminescence imaging allowed detection of bacterial loads as low as $\sim 10^4$ CFU/lung, whereas $< 10^5$ CFU/lung were not adequately reflected by *in vivo* bioluminescence emission (Fig. 3A to C; see Fig. S2 in the supplemental material).

Next, we evaluated bioluminescence imaging of lungs of BALB/c mice infected with highly invasive serotype 2 *S. pneumoniae*. Interestingly, 10^3 to 10^5 p/s/cm²/sr were detected in mice *in vivo* as early as 1 day postinfection, along with CFU counts ranging from 5×10^6 to 5×10^7 CFU/lung, though not resulting in a significant correlation (Fig. 3D; see Fig. S2D in the supplemental material). Again, strong differences between *in vivo* and *ex vivo* bioluminescence signal intensities were noted in BALB/c mice after serotype 2 *S. pneumoniae* challenge at day 1 postinfection (Fig. 3D), a result which, however, was found to rapidly disappear over time (Fig. 3E and F). Excellent correlations between *ex vivo* bioluminescence signals and CFU counts were obtained on day 2 and particularly on day 3 postinfection ($r = 0.98$ for day 2, $r = 1.0$ for day 3). More importantly, correlation coefficients between *in vivo* bioluminescence signals and CFU counts also increased over time, resulting in perfect correlations for mice infected for 3 days

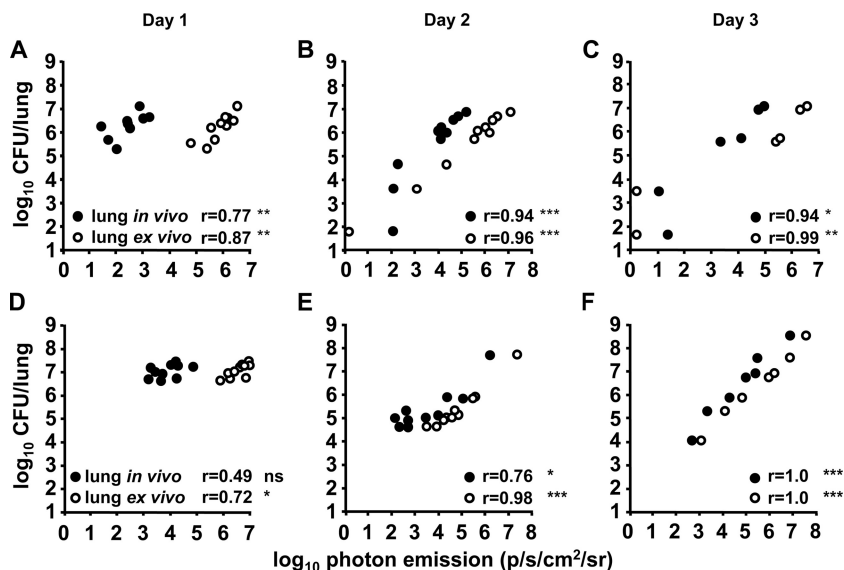


FIG. 3. Biophotonic analysis of invasive pneumococcal disease. Mice were infected with self-glowing serotype 2 *S. pneumoniae* (1.5×10^7 CFU/mouse) followed by bioluminescence imaging of disease progression on days 1, 2, and 3 postchallenge. Subsequent to analysis of whole mouse lungs (*in vivo* analysis), mice were euthanized and individual lung lobes were subjected to bioluminescence analysis (*ex vivo* analysis). In addition, lungs of the respective mice were further processed for determination of bacterial loads. (A to F) Correlation of bioluminescence signals with CFU counts of the respective lungs of C57BL/6 (A to C) and BALB/c (D to F) mice on day 1 (A and D), day 2 (B and E), and day 3 (C and F) after infection with serotype 2 *S. pneumoniae*. *r*, Spearman correlation coefficient; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

with invasive serotype 2 *S. pneumoniae* (Fig. 3D to F), thereby illustrating the power of bioluminescence imaging for monitoring invasive pneumococcal disease models.

Effect of bacteremia on lung bioluminescence signal intensity in BALB/c mice infected with invasive serotype 2 *S. pneumoniae*. Invasive serotype 2 *S. pneumoniae* is known to rapidly evade local lung host defense to trigger bacteremia and sepsis in mice (14). Therefore, to estimate to what degree bacteremia would contribute to biophotonic imaging of lungs of mice infected with serotype 2 *S. pneumoniae*, lungs of mice were either left untreated, perfused, or subjected to bronchoalveolar lavage immediately prior to bioluminescence analysis. Notably, all of the mice included in this analysis were confirmed to be highly bacteremic without significant differences between groups (data not shown). Notably, as shown in Fig. 4, analysis of bioluminescence signals of untreated compared to perfused lungs of serotype 2 *S. pneumoniae*-infected mice revealed $3 \times 10^5 \pm 1 \times 10^5$ versus $2 \times 10^4 \pm 3 \times 10^3$ p/s/cm²/sr (mean \pm standard error of the mean [SEM]; $n = 5$ mice), thus demonstrating that the major portion of photon counts of lungs of mice challenged with invasive serotype 2 *S. pneumoniae* are derived from bioluminescent pathogens within the lung capillary system but not the bronchoalveolar space. In line with this, bronchoalveolar lavage of lungs of mice infected with serotype 2 *S. pneumoniae* only weakly affected overall lung photon counts ($2 \times 10^5 \pm 7 \times 10^4$ p/s/cm²/sr), thus demonstrating minimal contribution of bronchoalveolar pathogens to total bioluminescence emission of lungs infected with invasive *S. pneumoniae*.

DISCUSSION

The current study aimed at evaluating the use of bioluminescence imaging for monitoring of pneumococcal disease in two mouse models of either pneumococcal pneumonia in-

duced by less virulent serotype 19 *S. pneumoniae* or pneumococcal sepsis induced by highly virulent serotype 2 *S. pneumoniae* in C57BL/6 compared to those in BALB/c mice. *In vivo* bioluminescence imaging was found to equally reflect bacterial loads and disease progression in BALB/c mice and C57BL/6 mice on days 1 and 2 of infection with highly virulent serotype 2 *S. pneumoniae*, whereas best correlations between photon and CFU counts were observed in BALB/c mice on day 3 of infection with serotype 2 *S. pneumoniae*. Overall, detection of bioluminescence signals *per se* during the observation period of 3 days appeared more sensitive in BALB/c than in C57BL/6 mice. Weakest bioluminescence signal detection was obtained in C57BL/6 mice infected with focal pneumonia-inducing se-

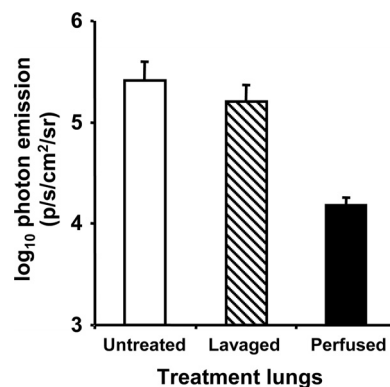


FIG. 4. Impact of bacteremia on lung bioluminescence imaging in invasive pneumococcal disease. BALB/c mice were infected with self-glowing serotype 2 *S. pneumoniae* (1.5×10^7 CFU/mouse) for 3 days. Subsequently, mice were euthanized and lung lobes were either left untreated, subjected to bronchoalveolar lavage, or perfused with HBSS prior to analysis of biophotonic signals. The shown data represent the mean \pm SEM of results for 5 mice per treatment regimen.

rotype 19 *S. pneumoniae*, which, however, was found to be still sufficient to allow a thorough correlation analysis of photon counts with CFU under these conditions, similar to corresponding analyses in BALB/c mice. Together, these results imply that the importance of bioluminescence imaging for estimating bacterial burdens in the lungs of mice primarily depends on the pneumococcal serotype and, albeit to a lesser extent, on the mouse background employed.

Various biophysical parameters and factors have been described to affect bioluminescence imaging in mice. One important factor is the availability of oxygen at the microanatomical site of infection, which has been shown to strongly impact bioluminescence imaging. Also, potential signal impedance can occur due to oxyhemoglobin- and deoxyhemoglobin-dependent light absorption (4, 5, 8, 11, 18). Moreover, recent reports suggest that absolute values of bioluminescence produced by a defined number of bacteria differ in various anatomical sites because of absorption and scattering of light by overlying tissue. Finally, sensitivity of bioluminescence imaging can also be decreased by skin and fur pigmentation (6, 11). However, the power of bioluminescence imaging to monitor (and differentiate between) invasive compared to noninvasive bacterial infections of the lung has not been evaluated so far.

We observed that under all experimental conditions examined, bacterial loads of lungs comparable to the initial infection dose of $\sim 10^7$ CFU/mouse were clearly detectable by bioluminescence imaging in mice throughout the observation period. In contrast, in most of the mice subjected to bioluminescence analysis immediately after intratracheal delivery of 1.5×10^7 CFU *S. pneumoniae*, virtually no bioluminescence emission was detectable (data not shown). This discrepant observation may be due to the fact that upon intratracheal instillation, bacteria are distributed along the trachea and the bronchial tree toward the lower respiratory tract and distal air spaces, thereby causing a "dilution effect" of instilled pneumococci within the lungs, making them undetectable by bioluminescence imaging. In addition, considerable numbers of these bacteria will be removed from the lung by mucociliary clearance mechanisms, and just those bacteria outgrowing within lung distal air spaces to cause pneumonia or invasive disease may contribute to overall photon emission. Therefore, depending on the employed infection dose, pathogen, and model system, bioluminescence imaging of bacterial infections in mice should be initiated no earlier than 24 h postinfection.

It is currently poorly characterized how bioluminescence imaging of pneumonia is affected by the virulence profile of the underlying pathogen. In the current study, we observed that bioluminescence imaging of pneumococcal pneumonia was less effective than imaging of invasive pneumococcal disease. In this context, we recently observed that less invasive serotype 19 *S. pneumoniae* also employed in the current study caused a significant mortality in mice that was due to lung permeability and intra-alveolar cytokine storms but not due to bacteremia and sepsis (9). Lung permeability is known to cause respiratory failure and death in patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS) and, due to lowered oxygen availability, may also limit the photon generation by self-glowing serotype 19 *S. pneumoniae* in mice. Moreover, since serotype 19 pneumococci trigger the formation of consolidated infiltrates within distal air spaces characteristic of focal pneumonia, such inflam-

matory infiltrates may biophysically hamper detection of bacterium-derived photon emission by the charge-coupled-device (CCD) camera, thereby additionally lowering the sensitivity of *in vivo* bioluminescence imaging of focal pneumonia in mice.

On the other hand, we recently observed that highly invasive serotype 2 *S. pneumoniae* did not cause lung permeability or intra-alveolar cytokine storms in mice but rather rapidly escaped local lung host defense to cause systemic cytokine storms, bacteremia, and sepsis in mice (9). However, life-threatening invasive bacterial infections are known to drastically accelerate catabolic lipid metabolism, resulting in a rapid loss of body weight in mice. Thus, bacterial shift toward the lung capillary system, underlying bacteremia, and sepsis, together with resulting cachexia-like phenomena, may, at least in part, make bioluminescence imaging approaches more effective and sensitive in invasive infectious disease models, although in the current study, we did not see differences in body weight between serotype 2 *S. pneumoniae*-infected C57BL/6 and BALB/c mice (data not shown). In addition, increasing piloerection developing concomitantly with septic disease progression may be another factor in bioluminescence imaging, because fur standing on end may quench photon emission to a lesser extent than fur lying flat, analogous to the effects of fur pigment.

In the current study, we observed that photon signals collected from the lungs of mice at day 1 of infection with serotype 2 or 19 *S. pneumoniae* differed from those collected *ex vivo* but approximated each other only on days 2 and 3 of serotype 2 *S. pneumoniae* challenge. In contrast, in serotype 19 *S. pneumoniae*-induced focal pneumonia not progressing toward sepsis, discrepancies between *in vivo*- and *ex vivo*-collected lung photon counts were maintained over time. These data strongly suggest that bioluminescence imaging of invasive lung disease performed at early time points postinfection (day 1) appears to reflect bacterial loads within the alveolar compartment but when performed at later time points postinfection (day 3) appears to largely represent bacterial loads of the lung capillary system rather than the lung itself. This concept is clearly supported by the finding that perfusion of lungs challenged with invasive serotype 2 *S. pneumoniae* led to $\sim 90\%$ decreased *ex vivo*-collected lung photon counts relative to photon counts collected from nonperfused mouse lungs, whereas the effect of bronchoalveolar lavage on lung bioluminescence emission appeared negligible in the described model system.

In summary, this is the first report to address the importance of bioluminescence imaging for monitoring pneumococcal lung infection caused by different serotypes of *S. pneumoniae* in two different mouse lines. The best reflection of bacterial loads by bioluminescence signals with minimal differences between *in vivo*- and *ex vivo*-collected photon counts were observed in BALB/c mice challenged with highly invasive serotype 2 *S. pneumoniae*. We conclude that bioluminescence imaging offers an alternative method to classical approaches to estimate bacterial burdens in mice, particularly in sepsis-related research areas, characterized by bacteremic disease progression, with a major impact on ethical, time, and cost considerations, and will be particularly helpful for improved preclinical characterization of anti-infective agents and their effectiveness.

ACKNOWLEDGMENT

The current study has been supported by the German Research Foundation grant SFB 587 to U.A.M. and T.W.

REFERENCES

1. **Akins, R. L., and K. K. Haase.** 2005. Gram-positive resistance: pathogens, implications, and treatment options: insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Pharmacotherapy* **25**:1001–1010.
2. **Alloush, H. M., V. Salisbury, R. J. Lewis, and A. P. MacGowan.** 2003. Pharmacodynamics of linezolid in a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae* genetically modified to express lux genes. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**:511–513.
3. **Beard, S. J., V. Salisbury, R. J. Lewis, J. A. Sharpe, and A. P. MacGowan.** 2002. Expression of lux genes in a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae*: using bioluminescence to monitor gemifloxacin activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:538–542.
4. **Contag, C. H., and M. H. Bachmann.** 2002. Advances in vivo bioluminescence imaging of gene expression. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **4**:235–260.
5. **Contag, C. H., P. R. Contag, J. I. Mullins, S. D. Spilman, D. K. Stevenson, and D. A. Benaron.** 1995. Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts. *Mol. Microbiol.* **18**:593–603.
6. **Doyle, T. C., S. M. Burns, and C. H. Contag.** 2004. In vivo bioluminescence imaging for integrated studies of infection. *Cell. Microbiol.* **6**:303–317.
7. **Felmingham, D., R. Canton, and S. G. Jenkins.** 2007. Regional trends in beta-lactam, macrolide, fluoroquinolone and telithromycin resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates 2001–2004. *J. Infect.* **55**:111–118.
8. **Hardy, J., K. P. Francis, M. DeBoer, P. Chu, K. Gibbs, and C. H. Contag.** 2004. Extracellular replication of *Listeria monocytogenes* in the murine gall bladder. *Science* **303**:851–853.
9. **Henken, S., J. Bohling, J. Martens-Lobenhoffer, J. C. Paton, A. D. Ogunniyi, D. E. Briles, V. C. Salisbury, D. Wedekind, S. M. Bode-Böger, T. Welsh, F. Bange, T. Welte, and U. A. Maus.** 2010. Efficacy profiles of daptomycin for treatment of invasive and noninvasive pulmonary infections with *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:707–717.
10. **Hollingshead, M. G., C. A. Bonomi, S. D. Borgel, J. P. Carter, R. Shoemaker, G. Melillo, and E. A. Sausville.** 2004. A potential role for imaging technology in anticancer efficacy evaluations. *Eur. J. Cancer* **40**:890–898.
11. **Hutchens, M., and G. D. Luker.** 2007. Applications of bioluminescence imaging to the study of infectious diseases. *Cell. Microbiol.* **9**:2315–2322.
12. **Kadurugamuwa, J. L., K. Modi, O. Coquoz, B. Rice, S. Smith, P. R. Contag, and T. Purchio.** 2005. Reduction of astrogliosis by early treatment of pneumococcal meningitis measured by simultaneous imaging, in vivo, of the pathogen and host response. *Infect. Immun.* **73**:7836–7843.
13. **Maus, U., K. von Grote, W. A. Kuziel, M. Mack, E. J. Miller, J. Cihak, M. Stangassinger, R. Maus, D. Schlondorff, W. Seeger, and J. Lohmeyer.** 2002. The role of CC chemokine receptor 2 in alveolar monocyte and neutrophil immigration in intact mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **166**:268–273.
14. **Maus, U. A., M. Backi, C. Winter, M. Srivastava, M. K. Schwarz, T. Ruckle, J. C. Paton, D. Briles, M. Mack, T. Welte, R. Maus, R. M. Bohle, W. Seeger, C. Rommel, E. Hirsch, J. Lohmeyer, and K. T. Preissner.** 2007. Importance of phosphoinositide 3-kinase gamma in the host defense against pneumococcal infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **175**:958–966.
15. **Maus, U. A., K. Waelsch, W. A. Kuziel, T. Delbeck, M. Mack, T. S. Blackwell, J. W. Christman, D. Schlondorff, W. Seeger, and J. Lohmeyer.** 2003. Monocytes are potent facilitators of alveolar neutrophil emigration during lung inflammation: role of the CCL2-CCR2 axis. *J. Immunol.* **170**:3273–3278.
16. **Mook-Kanamori, B. B., M. S. Rouse, C. I. Kang, D. van de Beek, J. M. Steckelberg, and R. Patel.** 2009. Daptomycin in experimental murine pneumococcal meningitis. *BMC Infect. Dis.* **9**:50.
17. **Reinert, R. R.** 2009. The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae*. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**(Suppl. 3):7–11.
18. **Wiles, S., K. M. Pickard, K. Peng, T. T. MacDonald, and G. Frankel.** 2006. In vivo bioluminescence imaging of the murine pathogen *Citrobacter rodentium*. *Infect. Immun.* **74**:5391–5396.
19. **Winter, C., W. Herbold, R. Maus, F. Langer, D. E. Briles, J. C. Paton, T. Welte, and U. A. Maus.** 2009. Important role for CC chemokine ligand 2-dependent lung mononuclear phagocyte recruitment to inhibit sepsis in mice infected with *Streptococcus pneumoniae*. *J. Immunol.* **182**:4931–4937.
20. **Winter, C., K. Taut, F. Langer, M. Mack, D. E. Briles, J. C. Paton, R. Maus, M. Srivastava, T. Welte, and U. A. Maus.** 2007. FMS-like tyrosine kinase 3 ligand aggravates the lung inflammatory response to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice: role of dendritic cells. *J. Immunol.* **179**:3099–3108.

Fig. S1

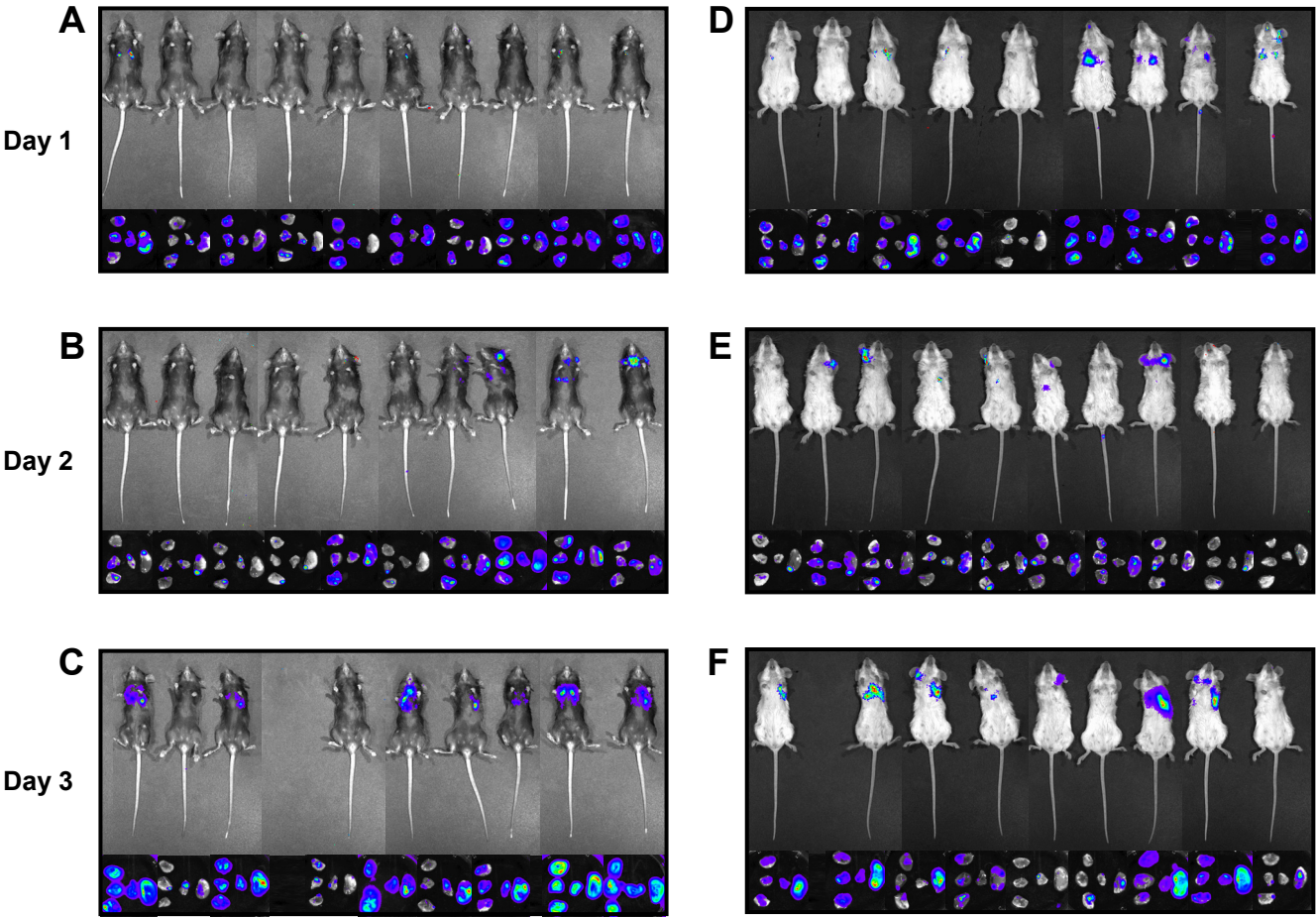
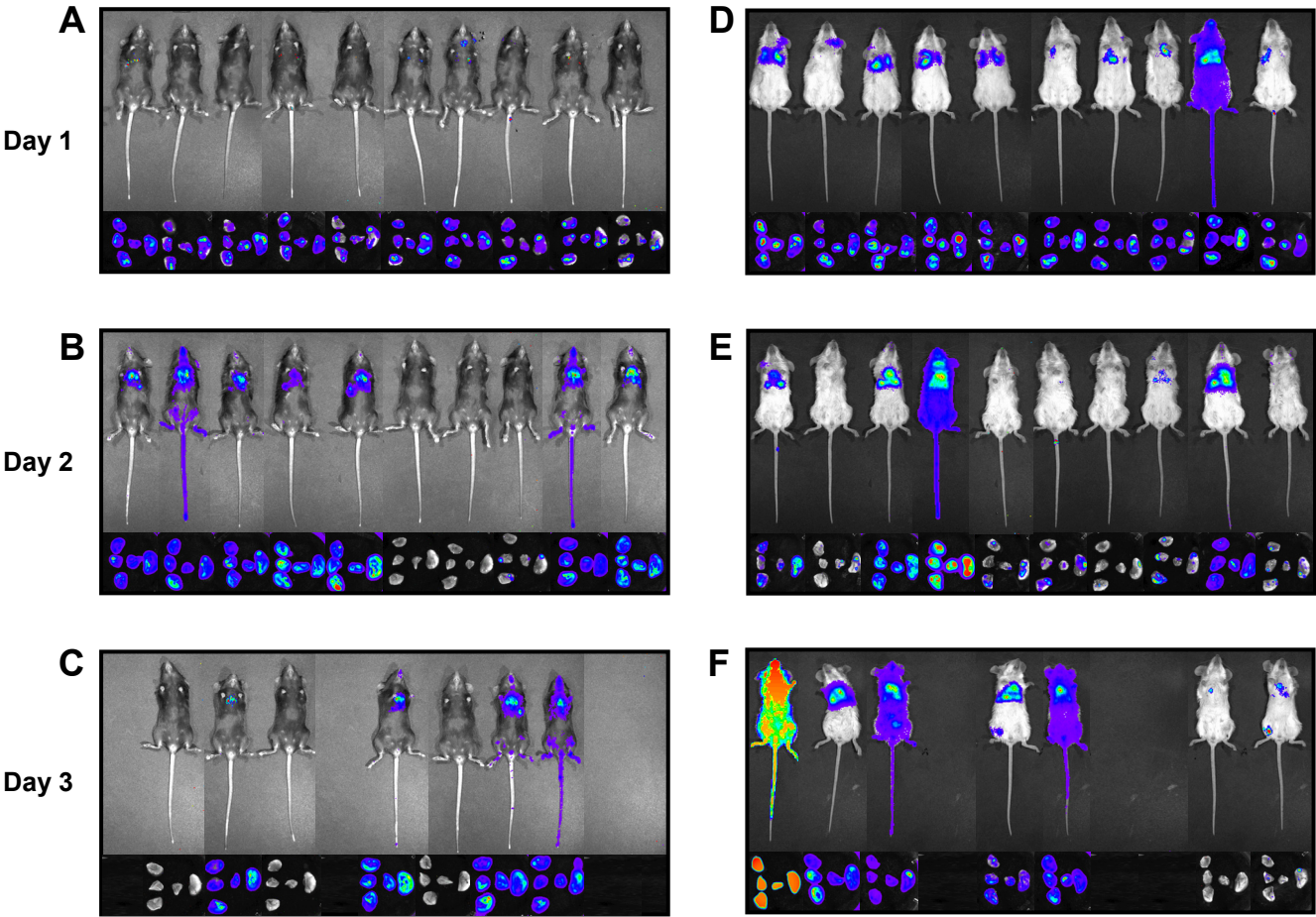


Fig. S2



1 **Supplemental material**

2

3 **Evaluation of biophotonic imaging to estimate bacterial burden in mice infected**
4 **with highly as compared to less virulent *Streptococcus pneumoniae***

5

6 Stefanie Henken, Jennifer Bohling, E. David Ogunniyi, James C. Paton, Vyvyan C.

7 Salisbury, Tobias Welte, Ulrich A. Maus

1 **Supplemental material**

2 *Bioluminescence imaging*

3 The employed imaging system measures numbers of photons originating from “self-
4 glowing” pneumococci, which are collected by a CCD camera, followed by conversion of
5 the primary data into false-color images using IVIS Living Image® 2.50.1 software
6 (Xenogen). Areas of intense luminescence are depicted in red, moderate luminescence
7 in yellow and green, and mild luminescence in blue color. For bioluminescence imaging-
8 based correlation analyses, lightly anaesthetized mice were transferred in supine
9 position to an imaging chamber and exposed to the CCD camera for exposure times
10 ranging from 5 s up to 1 min to assure that photon emission quantifications for
11 correlation purposes were recorded within the linear detection range of the CCD camera
12 device. Notably, individual mice exhibiting different severities of their disease
13 progression expectedly demonstrated different photon emission profiles and thus
14 demanded different exposure times for photon collections within the linear detection
15 range of the camera. Subsequently, to assure comparability of correlation analyses
16 between individual mice, mouse-specific photon counts were transformed by software-
17 based algorithms to respective photon counts per one second of exposure time per area
18 and steradian ($\text{p/s/cm}^2/\text{sr}$). In Fig. S1 and S2, all bioluminescence images were
19 recorded at an exposure time of 1 min for qualitative comparability of bioluminescence
20 images of individual mice. Images displayed in the current report are grayscale
21 photographs with an overlay image of bioluminescence using the aforementioned
22 computer-generated false-color scale. Images were taken with the widest lens opening
23 ($f/1$), the Field of View set to 19.2 cm, and subject height set to 1.5 cm.

1 **Figure legends**

2

3 **Fig. S1: Bioluminescence imaging of focal pneumococcal pneumonia.** C57BL/6 (A-
4 C) and BALB/c mice (D-F) were infected with self-glowing serotype 19 *S. pneumoniae*
5 (1.5×10^7 CFU/mouse) and subjected to bioluminescence analysis on days 1, 2, or 3
6 post-infection, using a Xenogen bioluminescence analyzer. Immediately after *in vivo*
7 biophotonic imaging of lungs of mice (top), mice were sacrificed and individual lung
8 lobes of each mouse were gated as described in Fig. 1 and subjected to
9 bioluminescence analysis on days 1, 2, or 3 post-infection (bottom).

10

11 **Fig. S2: Bioluminescence imaging of invasive pneumococcal disease.** C57BL/6 (A-
12 C) and BALB/c mice (D-F) were infected with self-glowing serotype 2 *S. pneumoniae*
13 (1.5×10^7 CFU/mouse) followed by bioluminescence imaging of disease progression on
14 days 1, 2, and 3 post-challenge. Subsequent to analysis of whole mouse lungs *in vivo*
15 (top), mice were euthanized and individual lung lobes were subjected to *ex vivo*
16 bioluminescence analysis (bottom).

17

8.3. Anlage 2

Henken, S., J. Bohling, J. Martens-Lobenhoffer, J.C. Paton, A.D. Ogunniyi, D.E. Briles, V.C. Salisbury, D. Wedekind, S.M. Bode-Böger, T. Welsh, F.C. Bange, T. Welte, U.A. Maus. 2010. Efficacy profile of daptomycin for the treatment of invasive as compared to non-invasive pulmonary infections with *S. pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **54**(2):707-717.
doi:10.1128/AAC.00943-09

Reproduced with permission from American Society for Microbiology via the Copyright Clearance Center's Rightslink.

Efficacy Profiles of Daptomycin for Treatment of Invasive and Noninvasive Pulmonary Infections with *Streptococcus pneumoniae*[∇]

Stefanie Henken,¹ Jennifer Bohling,¹ Jens Martens-Lobenhoffer,³ James C. Paton,⁴
A. David Ogunniyi,⁴ David E. Briles,⁵ Vyvyan C. Salisbury,⁶ Dirk Wedekind,²
Stefanie M. Bode-Böger,³ Thomas Welsh,⁷ Franz C. Bange,⁸
Tobias Welte,¹ and Ulrich A. Maus^{1*}

Clinic for Pulmonary Medicine, Department of Experimental Lung Research,¹ Institute of Laboratory Animal Science,² and Institute of Medical Microbiology and Hospital Epidemiology,⁸ Hannover School of Medicine, Hannover, Germany; Institute of Clinical Pharmacology, Otto-von-Guericke University, Magdeburg, Germany³; Research Centre for Infectious Diseases, School of Molecular and Biomedical Science, University of Adelaide, Adelaide, Australia⁴; Department of Microbiology, University of Alabama, Birmingham, Alabama 35294⁵; Faculty of Health and Life Sciences, University of the West of England, Bristol, United Kingdom⁶; and Novartis Pharma GmbH, Nürnberg, Germany⁷

Received 8 July 2009/Returned for modification 23 October 2009/Accepted 5 November 2009

Daptomycin is a novel lipopeptide antibiotic with excellent activity against Gram-positive bacterial pathogens, but its therapeutic value for the treatment of invasive pneumococcal disease compared to that for the treatment of pneumococcal pneumonia is incompletely defined. We investigated the efficacy of daptomycin in two models of *Streptococcus pneumoniae*-induced lung infection, i.e., pneumococcal pneumonia and septic pneumococcal disease. Mice were infected with a bioluminescent, invasive serotype 2 *S. pneumoniae* strain or a less virulent serotype 19 *S. pneumoniae* strain and were then given semitherapeutic or therapeutic daptomycin or ceftriaxone. Readouts included survival; bacterial loads; and septic disease progression, as determined by biophotonic imaging. Semitherapeutic daptomycin treatment fully protected the mice against the progression of septic disease induced by serotype 2 *S. pneumoniae*, while therapeutic treatment of the mice with daptomycin or ceftriaxone led to ~70% or ~60% survival, respectively. In contrast, mice infected with serotype 19 *S. pneumoniae* developed severe pneumonia and lung leakage even in the presence of increased intra-alveolar daptomycin levels, resulting in only 40% survival, whereas the ceftriaxone-treated mice had 100% survival. Together, although daptomycin demonstrates little efficacy in the treatment of pneumococcal pneumonia, daptomycin is highly effective in preventing *S. pneumoniae*-induced septic death, thus possibly offering a therapeutic option for patients with life-threatening septic pneumococcal disease.

The Gram-positive bacterium *Streptococcus pneumoniae* is the most prevalent pathogen in community-acquired pneumonia (CAP). CAP is known to frequently progress to invasive pneumococcal disease, thereby causing significant morbidity and mortality worldwide. In developed countries, death from pneumococcal disease occurs primarily among elderly individuals, in whom bacteremic pneumonia is associated with case-fatality rates of 10 to 20% and in whom pneumococcal bacteremia is associated with a case-fatality rate of up to 60% (33). As such, *S. pneumoniae* causes more deaths from invasive infections than any other bacterium and is the fifth leading cause of death worldwide (12). The worldwide increase in the rates of resistance of *S. pneumoniae* to frequently used antibiotics such as beta-lactams and macrolides and the rapid global spread of multidrug-resistant clones require both the development of novel immunization strategies and the search for novel antibiotic substances that are active against *S. pneumoniae*

strains resistant to other antimicrobial drugs (1, 9, 24). The clinical situation with *S. pneumoniae* is further complicated by the fact that pathogenicity profiles vary considerably between and among different serotypes of *S. pneumoniae*. For example, serotypes 19 and 23 of *S. pneumoniae* are considered less virulent in humans and mice, whereas serotypes 2 and 4 frequently cause invasive pneumococcal disease and multiorgan failure (MOF) (14). It is just the progression from local infection to sepsis and MOF that contributes to the unacceptably high mortality rates in intensive care units. In view of the distinct pathogenicity profiles of *S. pneumoniae* serotypes and strains that result in different clinical courses, novel antibiotic substances with the potential to cure infections with *S. pneumoniae* need to be rigorously validated in experimental model systems specifically representing the major clinical phenotypes of pneumococcal lung infections, i.e., localized pneumococcal pneumonia or invasive pneumococcal disease.

Daptomycin is a novel, transmembrane pore-forming 13-amino-acid compound that is produced by *Streptomyces roseosporus* (21). It belongs to the group of cyclic lipopeptides (for a review, see reference 25), which have particular efficacy against Gram-positive bacterial pathogens, whereas Gram-negative bacterial pathogens are not affected, probably due to

* Corresponding author. Mailing address: Clinic for Pulmonary Medicine, Department of Experimental Lung Research, Hannover School of Medicine, Hannover 30625, Germany. Phone: 49-511-532-9617. Fax: 49-511-532-9616. E-mail: Maus.Ulrich@mh-hannover.de.

[∇] Published ahead of print on 16 November 2009.

their outer membrane (28). Daptomycin inserts into the bacterial cell membrane in a calcium-dependent manner and causes oligomerization of the daptomycin peptide into transmembrane pores, thereby triggering membrane leakage, the release of intracellular ions, and rapid cell death (28, 29). Daptomycin has potent bactericidal activity against a wide range of Gram-positive bacteria and antibiotic-resistant Gram-positive pathogens, such as vancomycin-resistant enterococci, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), glycopeptide-intermediate *S. aureus*, and penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*, for which there are few therapeutic alternatives (4, 27, 30). Importantly, the spontaneous bacterial acquisition of daptomycin resistance has rarely been observed (11, 27, 31). Until now, daptomycin has been approved for use for the treatment of complicated skin and soft tissue or skin structure infections caused by Gram-positive bacteria and for the treatment of endocarditis and staphylococcal sepsis (10). However, in a mouse model of *S. pneumoniae* or MRSA pneumonia, daptomycin failed to significantly purge bacterial loads at 24 h after infection, although the findings of time-response and survival studies were not reported (26). In contrast, daptomycin was found to be effective in a rat model of hematogenous pneumonia caused by *S. aureus* (26). Of note, in a phase III clinical trial for the treatment of patients with community-acquired pneumonia, daptomycin (applied at a dose of 4 mg/kg of body weight) failed to achieve superiority over ceftriaxone (efficacies, 79 and 87%, respectively) (23). Thus, the currently available experimental and clinical data for mice and humans suggest that daptomycin has little efficacy against Gram-positive bacterial infections of the lung, possibly due to interactions of the compound with pulmonary surfactant components (26), and is therefore currently not recommended for use for the monotherapy of pneumonia.

To the best of our knowledge, no detailed experimental data are available from investigations of the efficacy of daptomycin in defined mouse models of *S. pneumoniae*-induced lung infections either causing pneumonia in the absence of sepsis or causing fatal invasive pneumococcal disease. Therefore, in the current study, we made use of self-glowing, bioluminescent strains of *S. pneumoniae* with different virulence profiles to determine the efficacy of daptomycin compared to that of ceftriaxone in two models: a model of pneumococcal pneumonia caused by a less virulent serotype 19 *S. pneumoniae* strain and a model of septic pneumococcal disease caused by a highly invasive serotype 2 *S. pneumoniae* strain.

MATERIALS AND METHODS

Mice. C57BL/6 mice were purchased from Charles River (Sulzfeld, Germany) and were kept under conventional conditions with free access to food and water. The mice were used in all experiments at 8 to 12 weeks of age, in accordance with the guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committee of the Hannover School of Medicine. Animal experiments were approved by local government authorities in Hannover, Germany.

Culture and quantification of *S. pneumoniae*. In the current study, we employed two bioluminescent, self-glowing strains of *S. pneumoniae*, i.e., a highly virulent serotype 2 *S. pneumoniae* strain (strain D39 lux) and a capsular group 19 *S. pneumoniae* strain (strain EF3030 lux) with a low level of virulence. Both strains of *S. pneumoniae* contained a plasmid expressing the *luxABCDE* operon of *Photobacterium luminescens* and an erythromycin resistance cassette for positive selection purposes and were generated as described recently (2, 5). Importantly, constitutive bioluminescence emission of the pneumococcal strains used did not require application of a substrate (self-glowing strains).

The serotype 2 *S. pneumoniae* strain was grown in Todd-Hewitt broth (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) supplemented with 0.5% yeast extract (Difco/BD Biosciences, Sparks, MD) in the presence of 0.2 µg/ml erythromycin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). The serotype 19 *S. pneumoniae* strain was grown in Todd-Hewitt broth supplemented with 10% fetal calf serum in the presence of 0.2 µg/ml erythromycin. Aliquots were snap-frozen in liquid nitrogen and were stored at -80°C. The *S. pneumoniae* stocks were quantified by plating serial dilutions of the bacteria on sheep blood agar plates (BD Biosciences, Heidelberg, Germany), followed by incubation of the plates at 37°C in 5% CO₂ for 18 h and subsequent determination of the numbers of CFU.

Antibiotics. Daptomycin was kindly provided by Novartis GmbH (Nürnberg, Germany). The comparator agent, ceftriaxone, was purchased from Ratiopharm GmbH (Ulm, Germany). Both daptomycin and ceftriaxone were freshly reconstituted in vehicle (sterile saline), according to the manufacturers' recommendations, immediately prior to each experiment. Mice received daily applications of either daptomycin, applied at a clinically relevant dose of 6 mg/kg body weight intraperitoneally (i.p.); ceftriaxone (20 mg/kg i.p.); or vehicle (12 ml/kg body weight i.p.). Determination of the MICs of daptomycin for the inhibition of *S. pneumoniae* growth was done by Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden), as recommended by the manufacturer, and MICs of ≤0.094 µg/ml daptomycin were revealed for the serotype 2 and 19 *S. pneumoniae* strains. The MICs of the antibiotic ceftriaxone were tested in a semiautomated Micronaut system (Merlin, Bornheim-Hersel, Germany). Briefly, single colonies were inoculated in 0.9% NaCl to a McFarland standard of 0.5. Pneumococci (serotype 2 or 19) were mixed with M broth supplemented with phytigel and lysed horse blood, as recommended by the manufacturer, and inoculated in 96-well microtiter plates (E1-922-100 Micronaut-*S. pneumococci* and *Haemophilus* 2 plates). Following overnight incubation at 37°C in 5% CO₂, the bacterial growth was determined photometrically at a wavelength of 690 nm. The MICs were interpreted by using an advanced expert system (AES; MCN-6 of the Merlin Micronaut system) and were found to be less than 0.125 µg/ml.

Treatment groups. The antibacterial efficacy of daptomycin compared to that of ceftriaxone was evaluated for the following treatment groups: (i) a group receiving semitherapeutic treatment, in which antibiotics (daptomycin or ceftriaxone versus vehicle) were administered intraperitoneally immediately prior to infection with either serotype 2 or serotype 19 *S. pneumoniae* (applied at either 5 × 10⁶ CFU/mouse or 1.5 × 10⁷ CFU/mouse), or (ii) a group receiving therapeutic treatment, in which the mice received antibiotics (daptomycin or ceftriaxone versus vehicle) 2 days after infection with serotype 2 *S. pneumoniae* (applied at 1.5 × 10⁷ CFU/mouse). In those experiments in which the *S. pneumoniae*-infected mice were subjected to a time-response analysis of their bioluminescence emission, the antibiotics were always applied immediately after the respective biophotonic analysis.

Infection of mice with *S. pneumoniae*. Mice were anesthetized with tetrazoline hydrochloride (5 mg/kg) and ketamine (75 mg/kg). Subsequently, the mice were orotracheally intubated with a 29-gauge Abbocath catheter (Abbott, Wiesbaden, Germany), which was inserted into the trachea under visual control with transillumination of the neck region. Lung infection with *S. pneumoniae* was induced by orotracheal instillation of either 5 × 10⁶ CFU (low-dose challenge) or 1.5 × 10⁷ CFU (high-dose challenge) of serotype 2 or 19 *S. pneumoniae* in a volume of 50 µl Todd-Hewitt broth (THB). Vehicle-treated mice received intratracheal applications of THB only. Subsequent to infection, the mice were taken back to their cages, where they had free access to food and water, and were monitored daily for disease symptoms. The survival of the *S. pneumoniae*-infected mice was recorded daily over an observation period of 14 days.

Determination of bacterial loads. At various time points postinfection, the *S. pneumoniae*-infected mice were killed with an overdose of isoflurane (Baxter, Unterschleißheim, Germany) and the bacterial loads in the blood, lung, liver, and spleen were determined. For the determination of bacteremia, peripheral blood was collected from the inferior vena cava, followed by the plating of serial dilutions on sheep blood agar plates. For determination of the numbers of CFU in the lungs, spleens, and livers, the organs were dissected and homogenized in Hanks' balanced salt solution without supplements by using a tissue homogenizer (IKA, Staufen, Germany). The resulting homogenates were filtered through a 100-µm-pore-size cell strainer (BD Falcon), and aliquots of each sample were then plated in 10-fold serial dilutions on sheep blood agar plates, followed by incubation at 37°C in 5% CO₂ for determination of the bacterial loads, as recently described in detail (18, 34).

Bioluminescence imaging. To evaluate the effect of semitherapeutic treatment (i.e., at the time of infection) or therapeutic treatment (2 days after infection) with daptomycin compared to that with ceftriaxone on the progression of *S. pneumoniae*-induced lung infection in individual mice over time, separate groups of serotype 2 *S. pneumoniae* (strain D39 lux)-infected or serotype 19 *S. pneu-*

moniae (strain EF3030 lux)-infected mice receiving daptomycin, ceftriaxone, or vehicle were subjected to bioluminescence analysis on days 1, 2, 4, and 7 of infection by using a bioluminescence analyzer (Xenogen, Alameda, CA). The imaging system employed measures the numbers of photons originating from the self-glowing pneumococci, which are collected by a charge-coupled-device camera, followed by conversion of the primary data into false color images by using IVIS Living Image (version 2.50.1) software (Xenogen). Areas of intense luminescence are depicted in red, areas of moderate luminescence are depicted in yellow and green, and areas of mild luminescence are depicted in blue. For bioluminescence analysis, lightly anesthetized mice were transferred in the supine position to an imaging chamber for an exposure time of 1 min. The images displayed in the current report are grey-scale photographs with an overlay image of bioluminescence obtained by using the aforementioned computer-generated false color scale. Images were taken with the widest lens opening (*f*-stop 1), the field of view was set equal to 19.2 cm, the subject height was set equal to 1.5 cm, and the binning was set to medium. Fatal septic disease progression is characterized by the emanation of high-intensity bioluminescence signals from the entire mouse (22).

BAL and determination of BAL fluid leukocyte differentials. The total numbers of bronchoalveolar lavage (BAL) fluid leukocytes were determined from whole-lung washes of *S. pneumoniae*-infected mice, as recently described in detail (19, 20). In brief, mice were euthanized with an overdose of isoflurane (Forene; Abbott Laboratories), and the tracheas of the mice were exposed and cannulated with a shortened 20-gauge needle that was firmly fixed to the trachea. Subsequently, 300- μ l aliquots of ice-cold sterile phosphate-buffered saline were instilled, followed by careful aspiration, until a BAL fluid volume of 1.5 ml was collected. Bronchoalveolar lavage was then continued until an additional BAL fluid volume of 4.5 ml was collected. The whole-lung washes were subjected to centrifugation at 1,400 rpm (4°C, 10 min), and the cell pellets were pooled to determine the total numbers of BAL fluid leukocytes. The quantification of the BAL fluid leukocyte subsets was done on the differential cell counts of Papanicolaou-stained cytocentrifuge preparations by using the overall morphological criteria, including the cell size and the shape of the nuclei, and the subsequent multiplication of those values with the respective absolute BAL fluid cell counts.

Determination of lung permeability. In selected experiments, we determined the effect of daptomycin treatment on the lung permeability induced in mice after infection with different serotypes of *S. pneumoniae*. Lung permeability was determined essentially as described recently (8, 16, 17, 35). In brief, mice received an intravenous injection of fluorescein isothiocyanate-labeled human albumin (1 mg/mouse in 100 μ l saline; Sigma, Deisenhofen, Germany) 1 h before they were killed. Subsequently, undiluted BAL fluid samples and serum samples (diluted 1/10 in saline) were placed in a 96-well microtiter plate, and the fluorescence intensities were measured with a fluorescence spectrometer (FL 880 microplate fluorescence reader; Bio-Tek, Bad Friedrichshall, Germany) operating at an absorbance of 488 nm and an emission wavelength of 525 ± 20 nm. The lung permeability index is defined as the ratio of the fluorescence signals of undiluted BAL fluid samples relative to the fluorescence signals of 1/100-diluted serum samples.

Determination of daptomycin in mouse serum and BAL fluid. Mouse serum daptomycin concentrations were determined by a previously published (15) high-performance liquid chromatography (HPLC) method, with some modifications. In short, proteins of 50 μ l serum were precipitated by the addition of 100 μ l methanol, and after centrifugation, 50 μ l of the clear supernatant was injected into the HPLC system. The separation of daptomycin was achieved by gradient elution on a C_8 reversed-phase column with an acetonitrile buffer (20 mM trifluoroacetic acid, 15 mM triethylamine) gradient. The calibration range was 3.5 to 350 μ g/ml, and the accuracy of the assay was better than 1.5%. The determination of daptomycin in BAL fluids (which is anticipated to contain low concentrations) was found to require sample cleanup and concentration by solid-phase extraction (SPE). After conditioning of Oasis HLB SPE columns (Waters, Milford, CA) with 1 ml methanol and 1 ml water, 1 ml of BAL fluid was passed through, and the columns were subsequently rinsed with 1 ml water and sucked dry for 5 min under vacuum. Daptomycin was eluted from the columns with 1 ml methanol, and the extract was evaporated under vacuum. The residue was reconstituted with 25 μ l methanol and 75 μ l water, and 50 μ l of this mixture was injected into the HPLC system by using the same conditions described for the determination of daptomycin in serum samples. The calibration range for BAL samples was 5 to 800 ng/ml, and the precision was better than 2.5%.

Statistics. All data are given as means \pm standard errors of the means (SEMs). The differences between the controls and the respective treatment groups over time were analyzed by one-way analysis of variance, followed by the post hoc Tukey test for paired comparisons, by using the SPSS for Windows software package. Survival rates and survival curves were compared by the Pearson chi-

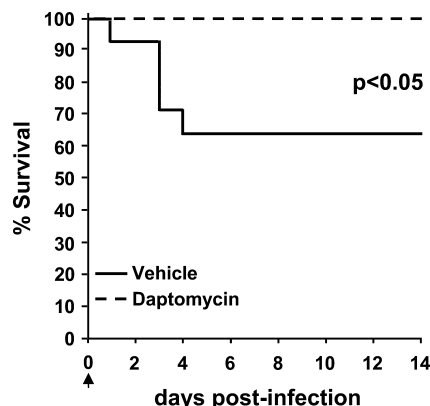


FIG. 1. Effect of semitherapeutic daptomycin treatment on the survival of mice infected with highly virulent serotype 2 *S. pneumoniae*. Mice were challenged with a low dose of a highly virulent, self-glowing serotype 2 *S. pneumoniae* strain (5×10^6 CFU/mouse) in the absence (vehicle) or the presence of daptomycin treatment initiated at day 0 (arrow; semitherapeutic treatment regimen). The results of the survival analysis for groups of *S. pneumoniae*-infected mice receiving either saline or daptomycin ($n = 14$ to 15 mice per experimental group and treatment regimen) are indicated.

square test and log-rank test, respectively. The differences between the groups were assumed to be statistically significant when *P* values were at least ≤ 0.05 .

RESULTS

Semitherapeutic daptomycin treatment protects mice from invasive pneumococcal disease in a low-dose infection model.

In initial experiments in which a semitherapeutic treatment protocol was used and in which the mice received the antibiotic at the time of infection, we evaluated the efficacy of daptomycin at protecting mice against low-dose infection with a highly virulent serotype 2 *S. pneumoniae* strain (5×10^6 CFU/mouse). As shown in Fig. 1, semitherapeutic daptomycin treatment fully protected the mice against a low-dose *S. pneumoniae* infection during the entire observation period of 14 days, whereas vehicle-treated mice showed a survival rate of only ~60% (Fig. 1; $P < 0.05$). The results of the analysis of the bacterial loads in the lungs, spleens, and livers, as well as the bacterial loads and levels of bacteremia in the blood of mice receiving daptomycin semitherapeutically are given in Table 1. Interestingly, the loads of the highly virulent serotype 2 *S. pneumoniae* strain were detectable in the lungs of daptomycin-treated mice up until day 10 of infection, albeit at significantly lower levels than in the vehicle-treated mice. At the same time, the early bacteremia that developed in the blood, as well as the spleens and livers, of mice in either treatment group was rapidly purged from the daptomycin-treated mice within 24 h of treatment. These data illustrate that although daptomycin was not highly effective in purging pneumococcal loads from the lung itself, the antibiotic provided full protection against serotype 2 *S. pneumoniae*-induced sepsis in mice.

Semitherapeutic daptomycin treatment protects mice from fatal invasive pneumococcal disease in a high-dose infection model.

In the next set of experiments, we questioned whether semitherapeutic daptomycin treatment would also protect the mice from lethal pneumococcal sepsis in a high-dose serotype 2 *S. pneumoniae* infection model. As shown in Fig. 2, the

TABLE 1. Bacterial loads in the lungs, blood, spleens, and livers of mice infected with serotype 2 *S. pneumoniae*^a and receiving either vehicle or semitherapeutic daptomycin treatment

Treatment	Day postinfection	Total no. of mice/no. of bacteremic mice	Log ₁₀ CFU (mean ± SEM)			
			Lung	Blood	Spleen	Liver
Vehicle	1	13/6	5.6 ± 5.0	3.4 ± 3.3	2.3 ± 2.2	2.4 ± 2.2
	2	9/6	5.5 ± 5.2	5.0 ± 4.9	4.0 ± 3.7	4.0 ± 3.8
	3	9/5	6.6 ± 6.4	7.1 ± 7.0	5.2 ± 5.0	6.3 ± 6.3
	5	7/1	4.6 ± 4.6	5.2 ± 5.2	4.2 ± 4.2	4.6 ± 4.6
	10	9/0	1.4 ± 1.3	— ^b	—	—
Daptomycin	1	13/2	5.4 ± 5.0	2.0 ± 1.9	2.2 ± 1.0	1.8 ± 1.7
	2	8/0	3.6 ± 3.0 ^c	—	—	—
	3	9/0	3.8 ± 3.7	—	—	—
	5	8/0	3.2 ± 2.9	—	—	—
	10	10/0	2.5 ± 2.4	—	—	—

^a 5×10^6 CFU/mouse.

^b —, the numbers of CFU were below the detection limit.

^c Significant difference ($P < 0.05$) compared to the results for day 1 postinfection.

challenge of vehicle-treated mice with a high dose of the serotype 2 *S. pneumoniae* strain (1.5×10^7 CFU/mouse) resulted in an overall mortality rate of ~70% by day 7 postinfection. In contrast, semitherapeutic treatment of mice with daptomycin or the comparator antibiotic, ceftriaxone, fully protected the mice against the invasive pneumococcal disease induced by serotype 2 *S. pneumoniae* (Fig. 2; $P < 0.01$ for both treatments compared to the results obtained for the vehicle-treated mice). Analysis of the bacterial loads in serotype 2 *S. pneumoniae*-infected mice receiving semitherapeutic daptomycin or ceftriaxone treatment showed that under high-dose infection conditions, *S. pneumoniae* was also detectable in the lungs of mice up until day 5 of infection, whereas strong bacterial outgrowth was demonstrated in the distal lung airspaces of the vehicle-treated mice (Table 2). In contrast, ceftriaxone treatment of the mice resulted in the rapid clearance of the bacteria from the lungs by 24 h of infection. Again, however, daptomycin was

as effective as ceftriaxone in preventing serotype 2 *S. pneumoniae*-induced bacteremia and sepsis in mice, as determined by analysis of the peripheral blood, spleens, and livers (Table 2). Importantly, the residual bacterial counts observed in the lungs of daptomycin-treated mice had no influence on the overall rate of survival, again supporting the conclusion that the prevention of septic disease progression is more important in view of survival rather than the complete removal of bacteria from distal airspaces, at least in this model of serotype 2 *S. pneumoniae*-induced lung infection.

Therapeutic efficacy of daptomycin in a mouse model of highly virulent serotype 2 *S. pneumoniae*-induced lung infection. We next determined the efficacy of daptomycin compared to that of ceftriaxone on the survival of mice under therapeutic treatment conditions, i.e., when the mice were administered antibiotics at day 2 of the high-dose infection with the serotype 2 *S. pneumoniae* strain (1.5×10^7 CFU/mouse). As shown in Fig. 3A, high-dose challenge of the mice with the serotype 2 *S. pneumoniae* strain resulted in an overall rate of survival of the vehicle-treated mice of 20% by day 5 postinfection. In contrast, the therapeutic application of daptomycin resulted in a significantly improved rate of survival of 70% ($P < 0.05$), with a 60% survival rate being observed in the ceftriaxone treatment group by day 3 postinfection. Biophotonic imaging of mice therapeutically treated with daptomycin or ceftriaxone (Fig. 3B, right) demonstrated the complete loss of bioluminescence emission over time, reflecting the strong antibacterial activities of the substances in mice after challenge with a high dose of the serotype 2 *S. pneumoniae* strain, while, at the same time, mice receiving the vehicle only demonstrated a continuous increase in bioluminescence emission over time until death (Fig. 3B, left).

Having determined the survival in mice therapeutically treated with daptomycin subsequent to infection with a high dose of the serotype 2 *S. pneumoniae* strain, we next analyzed the bacterial loads and levels of bacteremia in peripheral blood and lung tissue of the mice in the respective treatment groups. As shown in Table 3, the bacterial loads in the lungs and blood of the mice at day 2 postinfection with serotype 2 *S. pneumoniae* determined immediately prior to therapeutic application of the respective antibiotics ranged from $\sim 10^7$ CFU in the

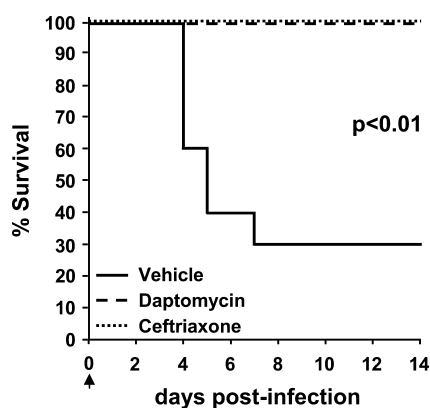


FIG. 2. Effect of semitherapeutic daptomycin treatment on the survival of mice after high-dose challenge with highly virulent serotype 2 *S. pneumoniae*. Mice were infected with a high inoculum of a highly virulent, self-glowing serotype 2 *S. pneumoniae* strain (1.5×10^7 CFU/mouse) in the absence (vehicle) or the presence of daptomycin or ceftriaxone applied once daily, beginning at the time of infection (semitherapeutic treatment regimen, arrow). The results of the survival analysis for groups of *S. pneumoniae*-infected mice receiving either saline or daptomycin or ceftriaxone ($n = 10$ mice per group and treatment regimen) are indicated.

TABLE 2. Bacterial loads in the lungs, blood, spleens, and livers of mice infected with serotype 2 *S. pneumoniae*^a and receiving either vehicle or semitherapeutic daptomycin or ceftriaxone treatment

Treatment	Day postinfection	Total no. of mice/no. of bacteremic mice	Log ₁₀ CFU (mean ± SEM)			
			Lung	Blood	Spleen	Liver
Vehicle	1	10/9	6.8 ± 6.7	5.8 ± 5.7	2.2 ± 2.2	2.3 ± 2.3
	2	10/8	6.3 ± 6.0	6.6 ± 6.5	5.1 ± 4.9	5.5 ± 5.2
	3	9/5	7.6 ± 7.5	7.0 ± 6.7	5.8 ± 5.6	6.3 ± 6.1
	4	9/5	7.0 ± 6.8	6.8 ± 6.6	6.1 ± 6.0	6.1 ± 5.9
	5	5/1	5.0 ± 5.0	6.2 ± 6.2	5.2 ± 5.2	5.9 ± 5.9
Daptomycin	1	10/7	6.0 ± 5.6	2.6 ± 2.2	1.4 ± 1.2	1.2 ± 1.2
	2	10/1	4.2 ± 3.9 ^b	0.1 ± 0.1 ^b	0.4 ± 0.4	— ^c
	3	9/0	3.5 ± 3.5	—	—	—
	4	9/0	2.2 ± 2.0	—	—	—
	5	8/0	2.9 ± 2.7	—	—	—
Ceftriaxone	1	10/0	0.8 ± 0.8	—	—	—
	2	10/0	—	—	—	—

^a 1.5×10^7 CFU/mouse.

^b Significant difference ($P < 0.05$) compared to the results for day 1 postinfection.

^c —, the numbers of CFU were below the detection limit.

lungs to $\sim 10^8$ CFU in the blood of the mice. Analysis of the bacterial loads in the lungs and blood and determination of the level of bacteremia on day 1 posttreatment (i.e., on day 3 postinfection) with either daptomycin or ceftriaxone showed a much higher level of reduction in the bacterial loads in the blood than in the lungs for both antibiotic substances tested. Again, while ceftriaxone led to the complete elimination of *S. pneumoniae* from the lungs by day 2 of therapeutic treatment (day 4 postinfection), low bacterial counts were still detectable in the lungs of daptomycin-treated mice by day 3 of therapeutic treatment (day 5 postinfection). Together with the currently chosen therapeutic treatment regimen, these data strongly support the conclusion that daptomycin appears to be as effective as the comparator substance, ceftriaxone, for the treatment of invasive pneumococcal disease.

Efficacy of daptomycin in a mouse model of pneumonia induced by a serotype 19 *S. pneumoniae* strain with a low level of virulence. The pathogenicity profiles differ considerably between and among different serotypes of *S. pneumoniae* (14). As opposed to serotype 2 *S. pneumoniae*, which rapidly triggers sepsis in mice, serotype 19 *S. pneumoniae* is known to primarily cause pneumonia in mice without septic disease progression (6, 35, 36). Therefore, we also determined the efficacy of daptomycin in a model of *S. pneumoniae* lobar pneumonia induced by infection with a low dose of serotype 19 *S. pneumoniae* (5×10^6 CFU/mouse). As shown in Table 4, the semitherapeutic treatment of mice with daptomycin did not improve the elimination of the bacterial pathogen from the distal airspaces over that achieved in the vehicle-treated mice during the up to 10-day observation period. In contrast to the bacteremia observed in mice after challenge with a low dose of a highly virulent serotype 2 *S. pneumoniae* strain (Table 1), infection of the mice with a low dose of a serotype 19 *S. pneumoniae* strain did not cause any bacteremia in mice in either treatment group.

Because approximately 95% of the vehicle-treated mice were found to survive the current low-dose infection with serotype 19 *S. pneumoniae* (data not shown), we further evalu-

ated the efficacy of daptomycin in a mouse model of a high-dose challenge with a serotype 19 *S. pneumoniae* strain (1.5×10^7 CFU/mouse), using semitherapeutic treatment conditions. As shown in Fig. 4, the vehicle-treated mice demonstrated 20% survival by day 7 postinfection. Importantly, the semitherapeutic treatment of mice with daptomycin had no significant impact on the survival of mice infected with 1.5×10^7 CFU serotype 19 *S. pneumoniae*, with an overall rate of survival of approximately 40% by day 6 postinfection (Fig. 4). In sharp contrast, treatment of the mice with the comparator antibiotic, ceftriaxone, resulted in 100% survival of the mice after infection with serotype 19 *S. pneumoniae* ($P < 0.01$). Determination of the bacterial loads in the lungs and blood of vehicle-, daptomycin-, or ceftriaxone-treated mice infected with serotype 19 *S. pneumoniae* revealed the superior antibacterial efficacy of ceftriaxone in purging the serotype 19 *S. pneumoniae* infection, resulting in the complete clearance of bacteria from lung parenchymal tissue by day 1 postinfection (Table 5). In contrast, treatment of the mice with daptomycin did not reduce the bacterial loads in their lungs during the first 3 days of infection, while lower CFU counts were observed by days 4 and 5 postinfection (Table 5). As expected in the currently employed pneumonia model, weak and transient bacteremia was detectable only in vehicle-treated mice on day 4 postinfection, whereas daptomycin- and ceftriaxone-treated mice did not develop bacteremia during the observation period of 5 days. These data suggest that in contrast to pneumococcal sepsis, in pneumococcal pneumonia, the outcome appears to be critically dependent on the rapid elimination of the pathogen from the alveolar compartment to limit the degree of acute lung injury. Thus, unlike ceftriaxone, daptomycin demonstrated only weak and nonsignificant efficacy in improving survival in a mouse model of severe pneumococcal pneumonia induced by a serotype 19 *S. pneumoniae* strain.

Effect of daptomycin on lung permeability in mice after high-dose infection with serotype 19 as opposed to serotype 2 *S. pneumoniae*. So far, we have demonstrated that daptomycin is highly effective in preventing death induced by highly viru-

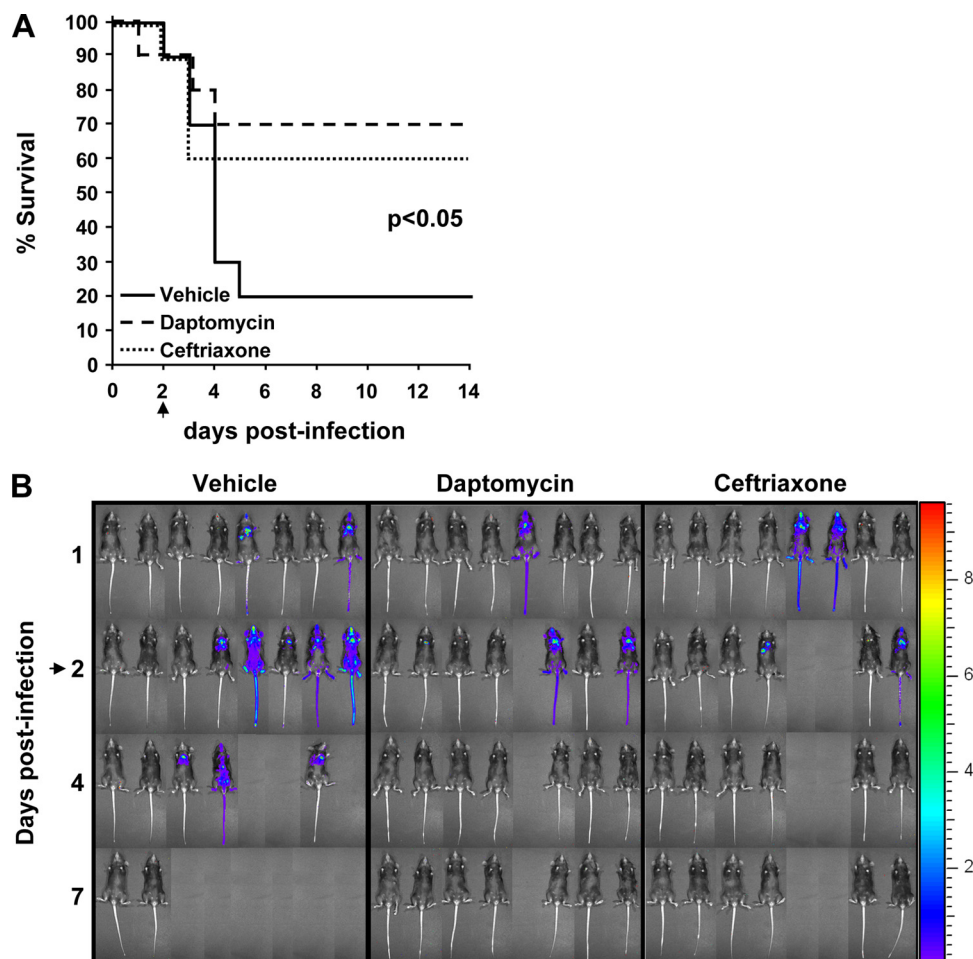


FIG. 3. Effect of therapeutic daptomycin treatment on the survival of mice after low-dose challenge with highly virulent serotype 2 *S. pneumoniae*. Mice received a high inoculum of a highly virulent, self-glowing serotype 2 *S. pneumoniae* strain (1.5×10^7 CFU/mouse). The arrows indicate the beginning of treatment with vehicle, daptomycin, or ceftriaxone once daily 2 days postinfection (therapeutic treatment regimen). (A) Survival analysis of groups of *S. pneumoniae*-infected mice receiving saline, daptomycin, or ceftriaxone ($n = 10$ mice per group and treatment regimen), as indicated; (B) longitudinal analysis (days 1, 2, 4, and 7) of the bioluminescence emission from individual mice infected with a self-glowing serotype 2 *S. pneumoniae* strain (1.5×10^7 CFU/mouse) and treated therapeutically with either saline (left), daptomycin (middle), or ceftriaxone (right) beginning on day 2 after infection, as indicated. The images were generated with IVIS Living Image (version 2.50.1) software (Xenogen).

TABLE 3. Bacterial loads in the lungs and blood of mice when vehicle, daptomycin, or ceftriaxone treatment was initiated on day 2 after infection with serotype 2 *S. pneumoniae*^a

Treatment	Days postinfection	Total no. of mice/no. of bacteremic mice	Log ₁₀ CFU (mean ± SEM)	
			Lung	Blood
No treatment	2	7/7	6.9 ± 6.7	8.1 ± 8.1
Vehicle	3	9/7	7.4 ± 7.3	8.3 ± 8.3
	4	4/1	6.3 ± 6.3	7.4 ± 7.1
Daptomycin	3	8/2	5.5 ± 5.5	2.3 ± 2.1
	4	8/1	2.9 ± 2.9	2.6 ± 2.6 ^b
	5	6/0	2.8 ± 2.8	— ^c
Ceftriaxone	3	9/2	4.6 ± 4.5	3.3 ± 3.3
	4	8/0	—	—

^a 1.5×10^7 CFU/mouse.

^b Significant difference ($P < 0.05$) compared with the results for vehicle-treated mice.

^c —, the numbers of CFU were below the detection limit.

lent serotype 2 *S. pneumoniae* but not serotype 19 *S. pneumoniae* with a low level of virulence. We next tested whether the highly invasive serotype 2 *S. pneumoniae* strain would trigger an increased lung barrier dysfunction in mice, thereby possibly improving the bioavailability of the antibiotic within lung parenchymal tissue. Because not all vehicle-treated mice challenged with 1.5×10^7 CFU/mouse developed septic disease progression, we used our biophotonic imaging approach to specifically identify those mice demonstrating progression from pneumonia to sepsis after infection with serotype 2 *S. pneumoniae* (Fig. 5A, vehicle) and to identify those mice developing only pneumococcal pneumonia from day 2 to day 3 of infection with serotype 19 *S. pneumoniae* (Fig. 5B, vehicle). Unexpectedly, we found that mice analyzed at day 3 of infection (day 1 after the beginning of daptomycin treatment) with serotype 19 *S. pneumoniae* with a low level of virulence responded with five- to sixfold higher levels of lung permeability compared with that for mice infected with highly virulent se-

TABLE 4. Bacterial loads in the lungs and blood of mice infected with serotype 19 *S. pneumoniae*^a and receiving either vehicle or semitherapeutic daptomycin treatment

Treatment	Day postinfection	Total no. of mice/no. of bacteremic mice	Log ₁₀ CFU (mean ± SEM)	
			Lung	Blood
Vehicle	1	10/0	6.4 ± 6.1	— ^b
	2	9/0	5.0 ± 4.6	—
	3	8/0	6.4 ± 6.2	—
	5	6/0	3.8 ± 3.5	—
	10	5/0	1.7 ± 1.7	—
Daptomycin	1	9/0	6.3 ± 6.2	—
	2	9/0	5.5 ± 5.3	—
	3	8/0	5.5 ± 5.5	—
	5	7/0	3.5 ± 3.2	—
	10	6/0	—	—

^a 5 × 10⁶ CFU/mouse.

^b —, the numbers of CFU were below the detection limit.

rotype 2 *S. pneumoniae*, as exemplified in Fig. 5A and B and as summarized in Fig. 5C. Interestingly, such differences in lung permeability were not due to the differences in neutrophil counts observed in the BAL fluids of serotype 2 or 19 *S. pneumoniae*-infected mice (Fig. 5D). Importantly however, serotype 19 *S. pneumoniae*-infected mice but not serotype 2 *S. pneumoniae*-infected mice demonstrated increased daptomycin levels in their BAL fluids over time when they were analyzed at 0.5 h, 2 h, and 4 h immediately after the second application of daptomycin on day 2 of treatment (i.e., day 3 postinfection) (Fig. 5E), while at the same time, no overt differences in serum daptomycin levels were noted between the groups (Fig. 5F). These data suggest that the increased lung permeability induced by serotype 19 *S. pneumoniae* actually leads to increased daptomycin access to the bronchoalveolar compartment.

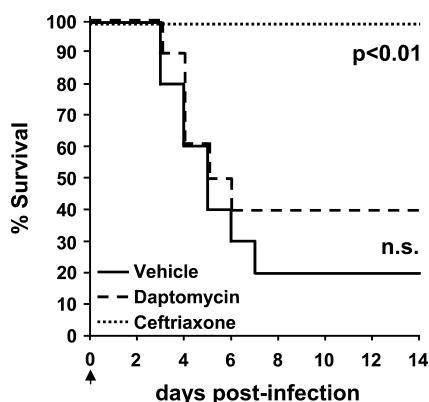


FIG. 4. Effect of semitherapeutic daptomycin treatment on the survival of mice after high-dose challenge with low-virulence serotype 19 *S. pneumoniae*. Mice were infected with a high dose of a low-virulence, self-glowing serotype 19 *S. pneumoniae* strain (1.5 × 10⁷ CFU/mouse) in the absence (vehicle) or the presence of daptomycin or ceftriaxone applied once daily, beginning at the time of infection (semitherapeutic treatment regimen, arrow). The results of survival analysis of groups of *S. pneumoniae*-infected mice either receiving saline, daptomycin, or ceftriaxone (n = 10 mice per group and treatment regimen) are indicated.

TABLE 5. Bacterial loads in the lungs and blood of mice infected with serotype 19 *S. pneumoniae*^a and receiving either vehicle or semitherapeutic daptomycin treatment

Treatment	Day postinfection	Total no. of mice/no. of bacteremic mice	Log ₁₀ CFU (mean ± SEM)	
			Lung	Blood
Vehicle	1	7/0	6.8 ± 6.7	— ^b
	2	7/0	7.1 ± 7.0	—
	3	7/2	7.8 ± 7.6	1.0 ± 0.9
	4	4/2	8.1 ± 7.9	3.8 ± 3.8
	5	2/0	5.8 ± 5.0	—
Daptomycin	1	7/0	6.4 ± 5.9	—
	2	7/0	6.2 ± 6.1	—
	3	6/0	7.1 ± 7.1	—
	4	7/0	4.5 ± 4.3 ^c	—
	5	5/0	4.7 ± 4.6 ^c	—
Ceftriaxone	1	7/0	0.5 ± 0.5	—
	2	7/0	—	—

^a 1.5 × 10⁷ CFU/mouse.

^b —, the numbers of CFU were below the detection limit.

^c Significant difference (P < 0.05) compared with the results for the vehicle-treated mice.

DISCUSSION

In the current study, we investigated the efficacy of the cyclic lipopeptide daptomycin in two mouse models of either pneumococcal pneumonia induced by a serotype 19 *S. pneumoniae* strain with a low level of virulence or pneumococcal sepsis induced by a highly virulent serotype 2 *S. pneumoniae* strain under both semitherapeutic and therapeutic treatment conditions. Semitherapeutic treatment with daptomycin was highly effective in inhibiting the septic disease progression in mice induced by serotype 2 *S. pneumoniae*, leading to 100% survival of the mice after a low-dose or even a high-dose bacterial challenge. Under therapeutic treatment conditions, daptomycin was as effective as the comparator substance, ceftriaxone, at inhibiting septic disease progression in mice after challenge with a high dose of a serotype 2 *S. pneumoniae* strain. Importantly, although daptomycin was not as effective as ceftriaxone in rapidly purging the bacterial loads from the lung parenchymal tissue of serotype 2 *S. pneumoniae*-infected mice, such residual bacterial loads had no influence on the overall survival of the daptomycin-treated mice. In sharp contrast, daptomycin was not found to be effective for the treatment of pneumococcal pneumonia induced by a serotype 19 *S. pneumoniae* strain with a low level of virulence. Even the semitherapeutic application of daptomycin failed to purge the bacterial loads from the lungs of mice in response to a low-dose or a high-dose challenge with serotype 19 *S. pneumoniae*. Consequently, daptomycin treatment of mice infected with serotype 19 *S. pneumoniae* resulted in a survival rate of 40%, whereas 100% survival was observed in the ceftriaxone-treated mice. These data show that the novel cyclic lipopeptide daptomycin demonstrates little efficacy for the treatment of low-virulence serotype 19 *S. pneumoniae*-induced pneumococcal pneumonia but proves to be highly effective for the treatment of life-threatening septic pneumococcal disease progression subsequent to pulmonary infection with highly virulent serotype 2 *S. pneumoniae*.

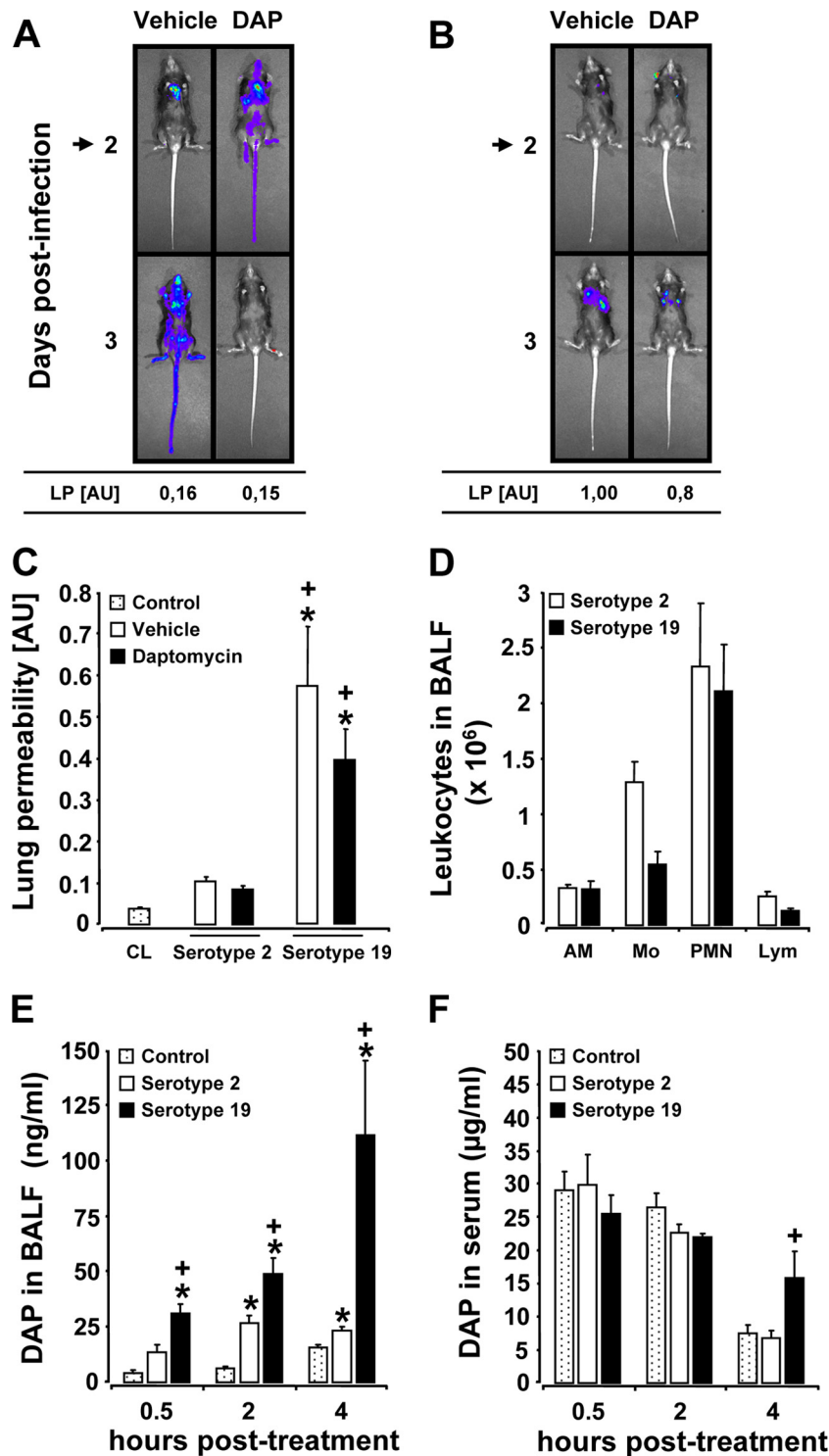


FIG. 5. Analysis of lung permeability in mice infected with serotype 19 as opposed to serotype 2 *S. pneumoniae*. Mice were infected with a high inoculum of either a highly virulent, self-glowing serotype 2 strain or a serotype 19 *S. pneumoniae* strain with a low level of virulence (1.5×10^7 CFU/mouse). Treatment of infected mice with either vehicle or daptomycin (DAP) was initiated at day 2 until day 3 postinfection (therapeutic treatment regimen). (A and B) Bioluminescence emissions from selected vehicle-treated mice or mice infected with bioluminescent serotype 2 (A) or serotype 19 (B) *S. pneumoniae* (1.5×10^7 CFU/mouse) on days 2 and 3 postinfection, as indicated. The lung permeability values (LP) for the given mice are indicated below the biophotonic images and are given in arbitrary units (AU). (C) Cumulative lung permeability data for vehicle-treated (white bars) or daptomycin-treated (black bars) mice on day 3 postinfection (therapeutic daptomycin treatment) with serotype 2 *S. pneumoniae* (left) or serotype 19 *S. pneumoniae* (right) compared to those for uninfected control mice (CL; dotted bars). (D) Leukocyte recruitment profiles in BAL fluids (BALF) of mice 3 days after infection with a high dose (1.5×10^7 CFU/mouse) of serotype 2 *S. pneumoniae* (white bars) or serotype 19 *S. pneumoniae* (black bars). (E and F) Analysis of daptomycin levels in BAL fluids (E) or serum (F) of untreated control

To the best of our knowledge, the current study is the first to provide detailed information about the efficacy of the antibiotic substance daptomycin for the treatment of *S. pneumoniae*-induced lung infections with distinct clinical courses. The pathogenicity profiles of *S. pneumoniae* differ significantly between and among serotypes. This fact is evidenced by the clinical observation that some pneumococcal lung infections cause focal pneumonia, sinusitis, or otitis media in the absence of a septic component, while others trigger severe septic complications (33). Just the septic component of *S. pneumoniae*-induced lung infection causes significant morbidity and mortality rates worldwide and is the most frequent severe complication observed in patients with CAP. The results of studies investigating the efficacy of daptomycin in pneumococcal infection models currently available are limited, in our view, because in those studies the efficacies of daptomycin were evaluated only in animal models (or the clinical condition) of *S. pneumoniae*-induced CAP and not in animal models of septic pneumococcal disease progression (23, 26). Thus, in view of the various pathogenicity profiles of different pneumococcal strains, novel antibiotic substances with activities against *S. pneumoniae* should be evaluated with defined models representing the major clinical phenotypes of lung infections with *S. pneumoniae*, i.e., pneumococcal pneumonia and septic pneumococcal disease.

Silverman and colleagues recently reported a lack of efficacy of daptomycin in a mouse model of bronchoalveolar pneumonia, although no results of time-response analyses of bacterial clearance or survival were reported (26). The data from the current study extend the findings presented in that report by demonstrating that daptomycin is not effective in eliminating serotype 19 *S. pneumoniae* from the lungs of mice during an observation period of more than 5 days. In addition, we found that only weak but nonsignificant protection from *S. pneumoniae*-induced death triggered by a high-dose challenge of mice with serotype 19 *S. pneumoniae* could be achieved by daptomycin treatment. One possible reason for the reduced ability of daptomycin to kill pneumococci within the lungs has been related to its interference with surfactant components (26). Another aspect might be the bioavailability of daptomycin in the lungs of mice, which, similar to its bioavailability in the brain, appears to be limited, possibly due to the tight alveolocapillary barrier (7). Importantly, we found for the first time that daptomycin levels are, indeed, very low in the BAL fluids of uninfected control mice, despite high serum daptomycin levels. These data taken alone strongly support the argument that the access of daptomycin to the bronchoalveolar space is limited under baseline conditions. Importantly, we observed that it was not the highly virulent serotype 2 *S. pneumoniae* strain but, rather, was the less virulent serotype 19 *S. pneumoniae* strain that significantly increased the lung perme-

ability on day 3 postinfection, leading to the increased access of daptomycin to the bronchoalveolar space as early as 0.5 h, 2 h, and 4 h after the application of daptomycin on day 3 of infection. Taken together, these observations allow three important conclusions to be made. (i) Under baseline conditions, daptomycin access to the bronchoalveolar space appears to be limited. (ii) Different *S. pneumoniae* serotypes causing different degrees of lung permeability in mice differentially promoted the bioavailability of daptomycin in the distal lung airspaces, which may be of particular importance for broad-spectrum lipopeptide preparations exhibiting less surfactant interference (3). (iii) The lack of efficacy of daptomycin in curing serotype 19 *S. pneumoniae*-induced pneumonia in mice was not due to the principal lack of the bioavailability of the compound in distal lung airspaces but, rather, was most probably due to its inactivation by the lung surfactant system.

Serotype 2 *S. pneumoniae* is known to rapidly trigger invasive pneumococcal disease and death in mice, which appears to be correlated with the initial infection dose (18). In the current study, we found that a high-dose challenge of mice with highly virulent serotype 2 *S. pneumoniae* caused only a weak increase in lung permeability in mice, which was surprising in view of the severe bacteremia that developed in these mice, as also evidenced by biophotonic imaging. Although daptomycin was highly efficacious in improving the survival of mice challenged with serotype 2 *S. pneumoniae* under both semitherapeutic and therapeutic treatment conditions, daptomycin did not prove as efficacious as the comparator agent, ceftriaxone, in purging serotype 2 pneumococcal loads within the lung itself. However, such residual bacterial colonization of distal airspaces with serotype 2 *S. pneumoniae* did not affect the overall rate of survival of the mice, and the termination of daptomycin treatment after day 5 postinfection with serotype 2 *S. pneumoniae* did not again trigger invasive disease in these mice during an additional observation period of 14 days (data not shown), most probably due to the infection-induced protective immune responses of the lung.

The data from the current study provide three clinically important conclusions. First, in those patients with pneumococcal lung infections in whom, according to clinical criteria, progression from pneumonia to invasive pneumococcal disease occurs, daptomycin should significantly reduce the rate of sepsis-related mortality when it is given as part of combination therapy with a lung-active antibiotic. Importantly, contrary to cell wall-active beta-lactam antibiotics (13), daptomycin, due to its mode of action, has no or little immunomodulatory activity that might further aggravate the proinflammatory cytokine storms that are part of the systemic inflammatory response to invasive pneumococcal infections, which is an important aspect in the management of sepsis therapy (32). Second, when it is considered that daptomycin therapy was

mice (dotted bars) or mice infected (1.5×10^7 CFU/mouse) with serotype 2 *S. pneumoniae* (white bars) or serotype 19 *S. pneumoniae* (black bars) for 3 days. BAL fluid and serum samples were collected immediately at 0.5 h, 2 h, and 4 h after intraperitoneal daptomycin application on day 3 of infection by using therapeutic treatment conditions (i.e., daptomycin treatment initiated on day 2 postinfection). The data in panels C to F are shown as means \pm SEMs, with $n = 3$ mice (control) and $n = 4$ to 6 mice per time point and treatment group. *, $P < 0.05$ compared to the results for the control group; +, $P < 0.05$ for the comparison between serotypes. AM, alveolar macrophages; Mo, monocytes; PMN, polymorphonuclear neutrophils; Lym, lymphocytes.

more effective against serotype 2 pneumococcal infections than serotype 19 pneumococcal infections of the lung, information about the serotype of the causative pathogen might possibly affect the future design of antibiotic strategies in patients, although one must keep in mind that the invasive capacity of a given serotype is also influenced by noncapsular virulence factors. As such, the data from the present study strongly suggest that daptomycin is very likely to be of clinical relevance for the treatment of pneumococcal infections induced by highly virulent serotypes/clones and, possibly, for the treatment of immunocompromised patients known to frequently develop severe complications in response to relatively harmless bacterial infections (34). Third, the observation that the less invasive *S. pneumoniae* serotypes causing lobar pneumonia in mice significantly increased the low baseline bioavailability of daptomycin within the lung distal air spaces might favor the efficacy profile of broad-spectrum lipopeptides showing decreased or even no surfactant interference for the treatment of lobar pneumonias in humans.

Collectively, the study described here provides a detailed investigation of the efficacy profile of the antibiotic substance daptomycin for the treatment of pneumococcal pneumonia compared to that for the treatment of invasive pneumococcal disease. We provide experimental evidence that in response to low-dose and high-dose infections with *S. pneumoniae* and under both semitherapeutic and therapeutic treatment conditions, daptomycin is particularly efficacious for the treatment of pneumococcal sepsis but not pneumococcal pneumonia. Thus, we believe that daptomycin may have the potential to be used for combination therapy with a lung-active antibiotic, particularly for patients with life-threatening septic complications of community-acquired Gram-positive bacterial infections of the lung.

ACKNOWLEDGMENT

This study was financially supported by Novartis Pharma.

REFERENCES

- Akins, R. L., and K. K. Haase. 2005. Gram-positive resistance: pathogens, implications, and treatment options: insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Pharmacotherapy* **25**:1001–1010.
- Alloush, H. M., V. Salisbury, R. J. Lewis, and A. P. MacGowan. 2003. Pharmacodynamics of linezolid in a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae* genetically modified to express lux genes. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**:511–513.
- Baltz, R. H. 2009. Daptomycin: mechanisms of action and resistance, and biosynthetic engineering. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**:144–151.
- Barry, A. L., P. C. Fuchs, and S. D. Brown. 2001. In vitro activities of daptomycin against 2,789 clinical isolates from 11 North American medical centers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1919–1922.
- Beard, S. J., V. Salisbury, R. J. Lewis, J. A. Sharpe, and A. P. MacGowan. 2002. Expression of lux genes in a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae*: using bioluminescence to monitor gemifloxacin activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:538–542.
- Briles, D. E., S. K. Hollingshead, J. C. Paton, E. W. Ades, L. Novak, F. W. van Ginkel, and W. H. Benjamin, Jr. 2003. Immunizations with pneumococcal surface protein A and pneumolysin are protective against pneumonia in a murine model of pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* **188**:339–348.
- Cottagnoud, P., M. Pfister, F. Acosta, M. Cottagnoud, L. Flatz, F. Kuhn, H. P. Muller, and A. Stucki. 2004. Daptomycin is highly efficacious against penicillin-resistant and penicillin- and quinolone-resistant pneumococci in experimental meningitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:3928–3933.
- Del Maschio, A., A. De Luigi, I. Martin-Padura, M. Brockhaus, T. Bartfai, P. Fruscella, L. Adorini, G. Martino, R. Furlan, M. G. De Simoni, and E. Dejana. 1999. Leukocyte recruitment in the cerebrospinal fluid of mice with experimental meningitis is inhibited by an antibody to junctional adhesion molecule (JAM). *J. Exp. Med.* **190**:1351–1356.
- Felmingham, D., R. Canton, and S. G. Jenkins. 2007. Regional trends in beta-lactam, macrolide, fluoroquinolone and telithromycin resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates 2001–2004. *J. Infect.* **55**:111–118.
- Hair, P. I., and S. J. Keam. 2007. Daptomycin: a review of its use in the management of complicated skin and soft-tissue infections and *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Drugs* **67**:1483–1512.
- Jorgensen, J. H., and S. A. Crawford. 2006. Assessment of two commercial susceptibility test methods for determination of daptomycin MICs. *J. Clin. Microbiol.* **44**:2126–2129.
- Kadioglu, A., and P. W. Andrew. 2004. The innate immune response to pneumococcal lung infection: the untold story. *Trends Immunol.* **25**:143–149.
- Karlstrom, A., K. L. Boyd, B. K. English, and J. A. McCullers. 2009. Treatment with protein synthesis inhibitors improves outcomes of secondary bacterial pneumonia after influenza. *J. Infect. Dis.* **199**:311–319.
- Mahdi, L. K., A. D. Ogunniyi, K. S. LeMessurier, and J. C. Paton. 2008. Pneumococcal virulence gene expression and host cytokine profiles during pathogenesis of invasive disease. *Infect. Immun.* **76**:646–657.
- Martens-Lobenhoffer, J., J. T. Kielstein, C. Oye, and S. M. Bode-Boger. 2008. Validated high performance liquid chromatography-UV detection method for the determination of daptomycin in human plasma. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **875**:546–550.
- Maus, U., J. Huwe, R. Maus, W. Seeger, and J. Lohmeyer. 2001. Alveolar JE/MCP-1 and endotoxin synergize to provoke lung cytokine upregulation, sequential neutrophil and monocyte influx, and vascular leakage in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164**:406–411.
- Maus, U., K. von Grote, W. A. Kuziel, M. Mack, E. J. Miller, J. Cihak, M. Stangassinger, R. Maus, D. Schlondorff, W. Seeger, and J. Lohmeyer. 2002. The role of CC chemokine receptor 2 in alveolar monocyte and neutrophil immigration in intact mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **166**:268–273.
- Maus, U. A., M. Backi, C. Winter, M. Srivastava, M. K. Schwarz, T. Ruckle, J. C. Paton, D. Briles, M. Mack, T. Welte, R. Maus, R. M. Bohle, W. Seeger, C. Rommel, E. Hirsch, J. Lohmeyer, and K. T. Preissner. 2007. Importance of phosphoinositide 3-kinase gamma in the host defense against pneumococcal infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **175**:958–966.
- Maus, U. A., M. A. Koay, T. Delbeck, M. Mack, M. Ermert, L. Ermert, T. S. Blackwell, J. W. Christman, D. Schlondorff, W. Seeger, and J. Lohmeyer. 2002. Role of resident alveolar macrophages in leukocyte traffic into the alveolar air space of intact mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **282**:L1245–L1252.
- Maus, U. A., K. Waelsch, W. A. Kuziel, T. Delbeck, M. Mack, T. S. Blackwell, J. W. Christman, D. Schlondorff, W. Seeger, and J. Lohmeyer. 2003. Monocytes are potent facilitators of alveolar neutrophil emigration during lung inflammation: role of the CCL2-CCR2 axis. *J. Immunol.* **170**:3273–3278.
- Miao, V., M. F. Coeffet-Legal, P. Brian, R. Brost, J. Penn, A. Whiting, S. Martin, R. Ford, I. Parr, M. Bouchard, C. J. Silva, S. K. Wrigley, and R. H. Baltz. 2005. Daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus*: cloning and analysis of the gene cluster and revision of peptide stereochemistry. *Microbiology* **151**:1507–1523.
- Orihuela, C. J., G. Gao, M. McGee, J. Yu, K. P. Francis, and E. Tuomanen. 2003. Organ-specific models of *Streptococcus pneumoniae* disease. *Scand. J. Infect. Dis.* **35**:647–652.
- Pertel, P. E., P. Bernardo, C. Fogarty, P. Matthews, R. Northland, M. Benvenuto, G. M. Thorne, S. A. Luperchio, R. D. Arbeit, and J. Alder. 2005. Effects of prior effective therapy on the efficacy of daptomycin and ceftriaxone for the treatment of community-acquired pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* **46**:1142–1151.
- Reinert, R. R. 2009. The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae*. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**(Suppl. 3):7–11.
- Saueremann, R., M. Rothenburger, W. Graninger, and C. Joukhadar. 2008. Daptomycin: a review 4 years after first approval. *Pharmacology* **81**:79–91.
- Silverman, J. A., L. I. Mortin, A. D. Vanpraagh, T. Li, and J. Alder. 2005. Inhibition of daptomycin by pulmonary surfactant: in vitro modeling and clinical impact. *J. Infect. Dis.* **191**:2149–2152.
- Silverman, J. A., N. Oliver, T. Andrew, and T. Li. 2001. Resistance studies with daptomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1799–1802.
- Silverman, J. A., N. G. Perlmutter, and H. M. Shapiro. 2003. Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2538–2544.
- Steenbergen, J. N., J. Alder, G. M. Thorne, and F. P. Tally. 2005. Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**:283–288.
- Tally, F. P., and M. F. DeBruin. 2000. Development of daptomycin for gram-positive infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**:523–526.
- Tally, F. P., M. Zeckel, M. M. Wasilewski, C. Carini, C. L. Berman, G. L. Drusano, and F. B. Oleson, Jr. 1999. Daptomycin: a novel agent for Gram-positive infections. *Expert Opin. Investig. Drugs* **8**:1223–1238.
- Thallinger, C., M. Rothenburger, C. Marsik, S. Wuenschner, M. Popovic, G. Ender, O. Wagner, and C. Joukhadar. 2008. Daptomycin does not exert immunomodulatory effects in an experimental endotoxin model of human whole blood. *Pharmacology* **81**:57–62.
- WHO. 2007. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization. WHO position paper. *Wkly. Epidemiol. Rec.* **82**:93–104.

34. **Winter, C., W. Herbold, R. Maus, F. Langer, D. E. Briles, J. C. Paton, T. Welte, and U. A. Maus.** 2009. Important role for CC chemokine ligand 2-dependent lung mononuclear phagocyte recruitment to inhibit sepsis in mice infected with *Streptococcus pneumoniae*. *J. Immunol.* **182**:4931–4937.
35. **Winter, C., K. Taut, F. Langer, M. Mack, D. E. Briles, J. C. Paton, R. Maus, M. Srivastava, T. Welte, and U. A. Maus.** 2007. FMS-like tyrosine kinase 3 ligand aggravates the lung inflammatory response to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice: role of dendritic cells. *J. Immunol.* **179**:3099–3108.
36. **Winter, C., K. Taut, M. Srivastava, F. Langer, M. Mack, D. E. Briles, J. C. Paton, R. Maus, T. Welte, M. D. Gunn, and U. A. Maus.** 2007. Lung-specific overexpression of CC chemokine ligand (CCL) 2 enhances the host defense to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice: role of the CCL2-CCR2 axis. *J. Immunol.* **178**:5828–5838.

8.4. Curriculum vitae

Name	Stefanie Henken
Geburtsdatum	22. Juli 1982
Geburtsort	Bremerhaven
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch
Eltern	Dieter Henken Sabine Henken, geb. Specht

Schulischer Werdegang

August 1988 – Juli 1992	Grundschule Lunestedt
August 1992 – Juli 1994	Orientierungsstufe, Adolf-Butenandt-Schule, Beverstedt
August 1994 – Juni 2001	Gymnasium Wesermünde des Landkreises Cuxhaven, Bremerhaven Abitur

Beruflicher Werdegang

Oktober 2001 – Juli 2004	Bachelorstudiengang Molekulare Biotechnologie an der Medizinische Universität zu Lübeck BSc
Oktober 2004 – November 2006	Masterstudiengang Biomedizin an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz MSc
seit September 2007	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung für Experimentelle Pneumologie der Medizinischen Hochschule Hannover Beginn der Dissertation zum Dr. rer. nat.

Publikationsliste

1. Kirschbaum, K.M., **S. Henken**, C. Hiemke, U. Schmitt. 2008.
Pharmacodynamic consequences of P-glycoprotein-dependent pharmacokinetics of risperidone and haloperidol in mice. *Behav Brain Res* **188**(2):298-303.

2. **Henken, S.**, J. Bohling, J. Martens-Lobenhoffer, J.C. Paton, A.D. Ogunniyi, D.E. Briles, V.C. Salisbury, D. Wedekind, S.M. Bode-Böger, T. Welsh, F.C. Bange, T. Welte, U.A. Maus. 2010.
Efficacy profile of daptomycin for the treatment of invasive as compared to non-invasive pulmonary infections with *S. pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **54**(2):707-717.

3. **Henken, S.**, J. Bohling, A.D. Ogunniyi, J.C. Paton, V.C. Salisbury, T. Welte, U.A. Maus. 2010.
Evaluation of biophotonic imaging to estimate bacterial burden in mice infected with highly virulent compared to less virulent *Streptococcus pneumoniae* serotypes. *Antimicrob Agents Chemother* **54**(8):3155-60.

8.5. Erklärung

Erklärung zur Dissertation

gemäß §6(1) der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

für die Promotion zum Dr. rer. nat.

Hierdurch erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

Stellenwert des Biolumineszenz-Imagings bakterieller Infektionen zur Evaluation
der Wirksamkeit neuer Antibiotika in der Maus

selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

